第51回 NMR討論会

The 51st Annual Meeting of The Nuclear Magnetic Resonance Society of Japan

講演要旨集

Abstracts

会　期：**2012年11月8日（木），9日（金），10日（土）**
November 8(Thu)–10(Sat), 2012

会　場：**ウインクあいち　WINC HALL**
WINC HALL, WINC AICHI
〒450–0002　愛知県名古屋市中村区名駅4–4–38

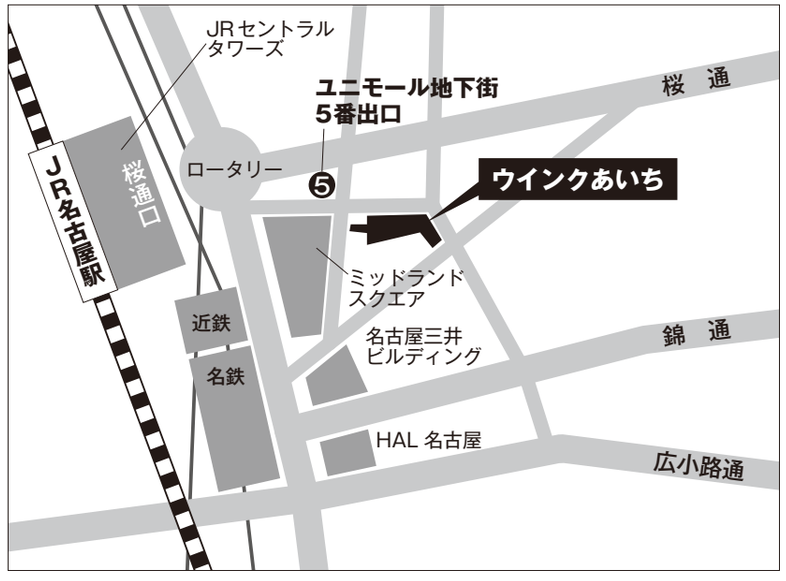
主　催：日本核磁気共鳴学会

第51回NMR討論会プログラム委員会

委員長　　加藤　晃一（自然科学研究機構）

委　員　　西村　勝之（自然科学研究機構）
廣明　秀一（名古屋大学）
吉水　広明（名古屋工業大学）
内藤　晶　（横浜国立大学）
村田　道雄（大阪大学）

会場（ウインクあいち）への交通案内



ウインクあいち
愛知県産業労働センター
〒450-0002　愛知県名古屋市中村区名駅4-4-38

電車をご利用の場合
（JR・地下鉄・名鉄・近鉄）名古屋駅より
◎JR名古屋駅桜通口から
　ミッドランドスクエア方面　徒歩5分
◎ユニモール地下街　5番出口　徒歩2分
※名駅地下街サンロードからミッドランドスクエア、マルケイ観光ビル、
名古屋クロスコートタワーを経由　徒歩8分

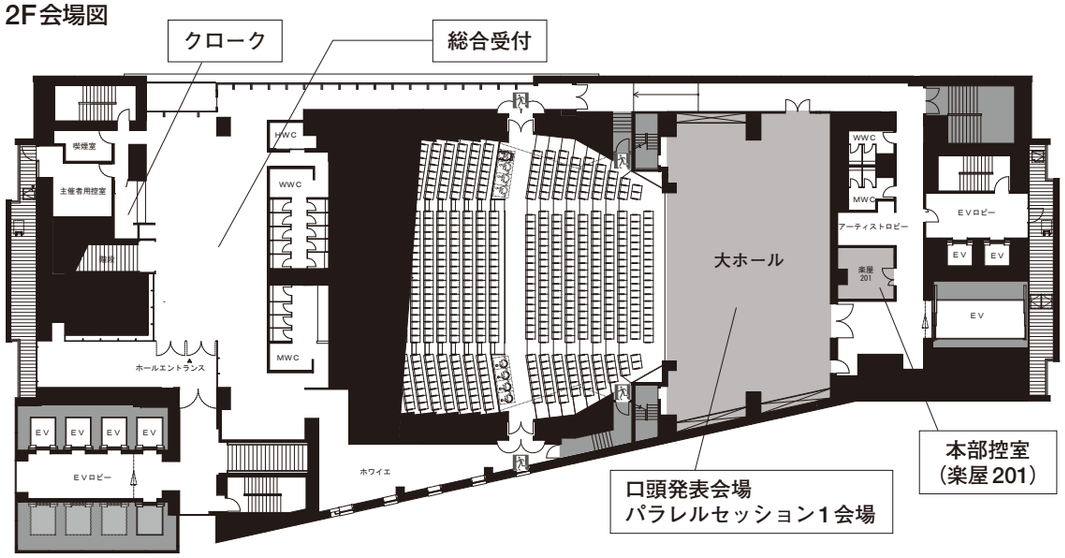
お車をご利用の場合
名古屋高速都心環状線「錦橋」出口より約6分
ウインクあいち駐車場…30分／250円
（※うちきり料金　24時間まで　1,800円）

＊詳細は会場ホームページ（http://www.winc-aichi.jp/access/）をご覧ください。

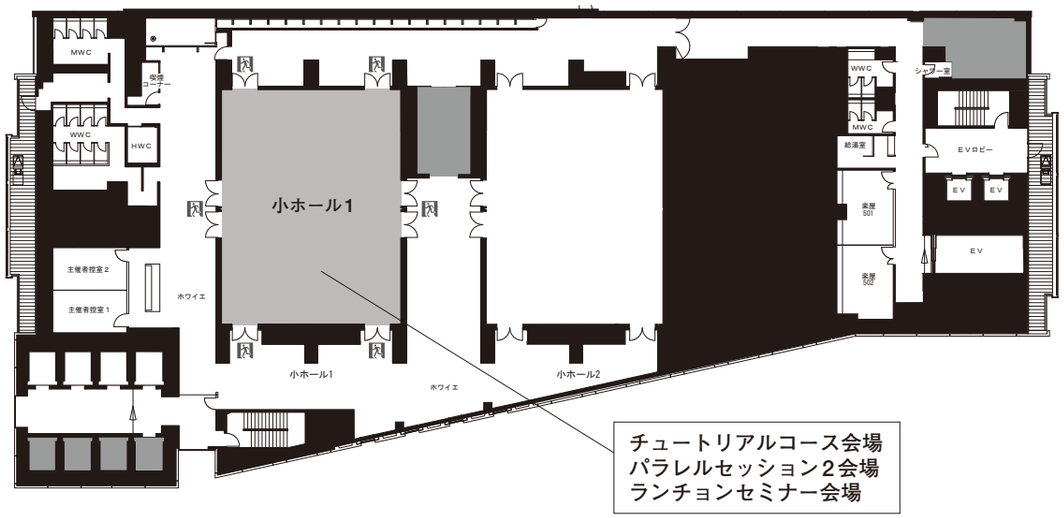
会場の案内図

◆2F大ホール：口頭発表会場、パラレルセッション1会場
◆5F小ホール1：チュートリアルコース会場、パラレルセッション2会場、ランチョンセミナー会場
◆6F展示場（602～605）：ポスター発表会場、機器・試薬展示場、インターネットコーナー、休憩所
◆9F（906）：理事会、評議員会会場
◆2F楽屋（201）：本部控室

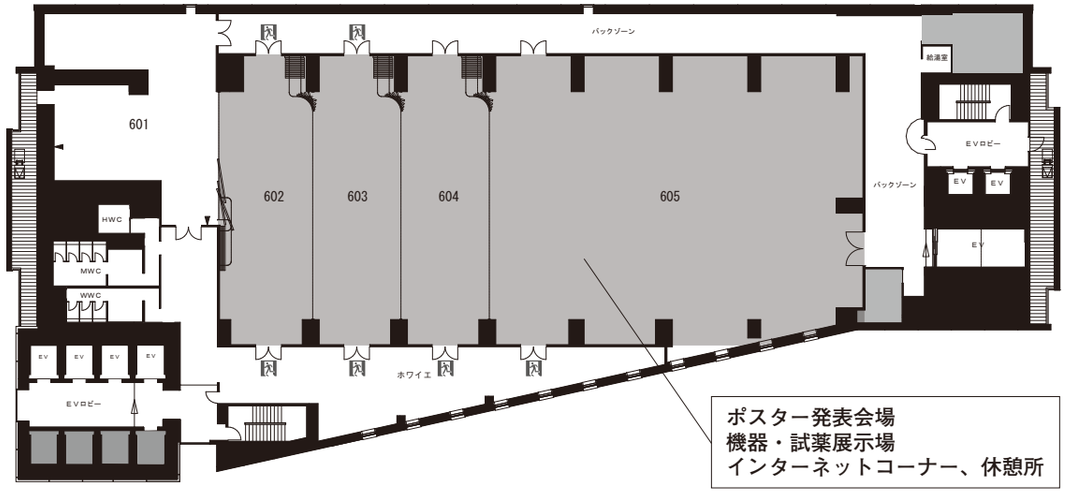
2F会場図



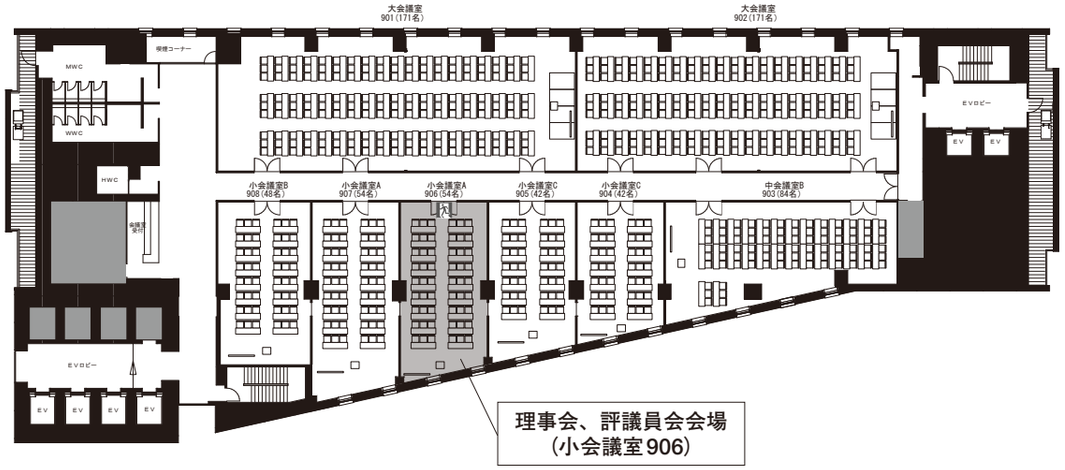
5F会場図



6F会場図



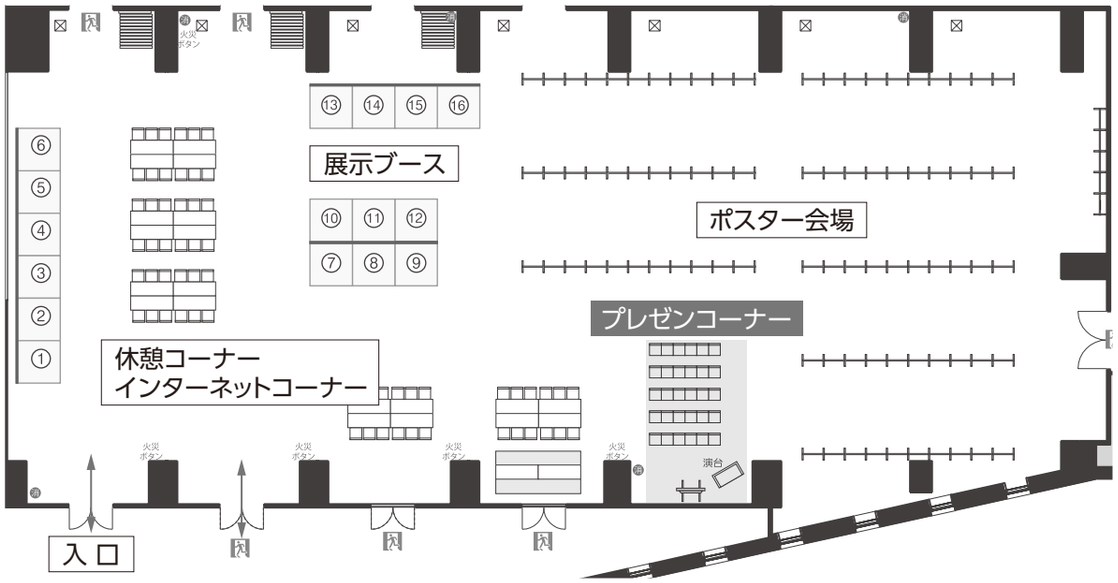
9F会場図



ポスター・展示会場詳細図

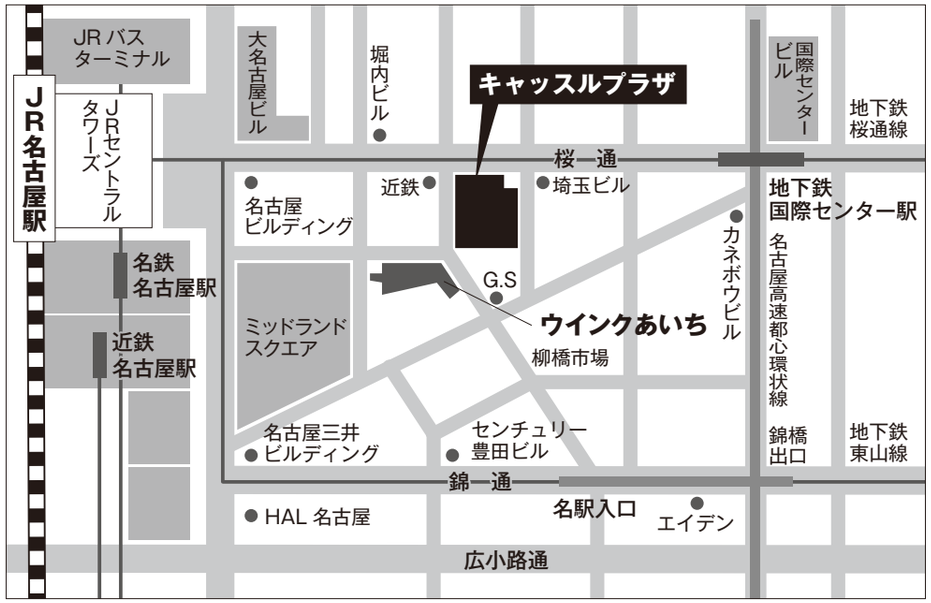
場　所：ウインクあいち　6F展示場（602 ～ 605）

ポスター発表会場、機器・試薬展示場、インターネットコーナー、休憩所



位置	社　名
①②	ブルカー・バイオスピン株式会社
③	株式会社セルフリーサイエンス
④	株式会社 エムアールテクノロジー
⑤	株式会社ニッピ
⑥	Wiley
⑦⑧	(株)JEOL RESONANCE
⑨	大陽日酸株式会社
⑩	セティ株式会社
⑪	株式会社フレックス
⑫	SIサイエンス株式会社
⑬	株式会社シゲミ
⑭	株式会社エルエイシステムズ
⑮⑯	アジレント・テクノロジー株式会社

懇親会会場案内図



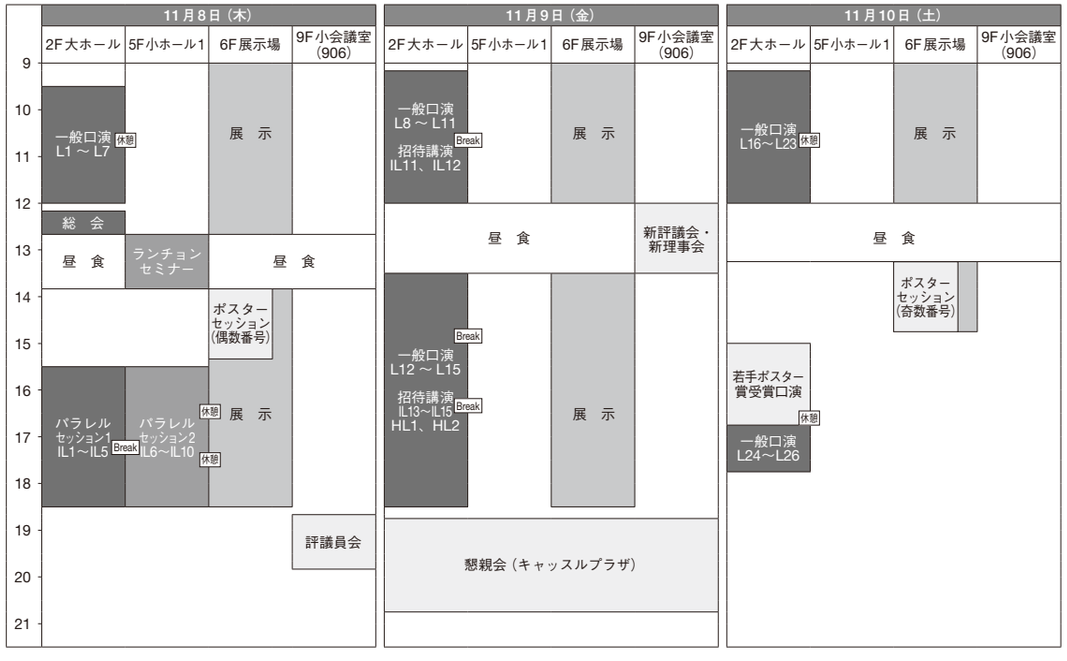
キャッスルプラザ

450-0002 名古屋市中村区名駅4-3-25
TEL: 052-582-2121

開始時間：18:45 ～
会　　場：キャッスルプラザ　3F　孔雀
ウインクあいち（ミニストップ横の出口）より徒歩2分

＊詳細は会場ホームページ（http://www.castle.co.jp/plaza/access/）をご覧ください。

討論会日程表



参加者へのご案内

1．受付と参加登録

◇受　付

受付はウインクあいち2F大ホール前に設けます。

受付時間：11月 8日（木）　8：45 ～ 18：00
　　11月 9日（金）　8：45 ～ 18：00
　　11月10日（土）　8：45 ～ 16：35

・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51回NMR討論会ホームページ（http://www.nmrj.jp/NMR2012/index_j.html）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参加には整理券が必要となります。整理券は、当日の8:45より、2F大ホール前にて配布いたします。

2．会場内のサービス・施設

◇クローク

ウインクあいち2F大ホールホワイエ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、懇親会会場の前に、懇親会用のクロークを設置します。

利用時間　11月 8日（木）　8:45 ～ 18:45
　　11月 9日（金）　8:45 ～ 18:45
　　11月10日（土）　8:45 ～ 18:00
　　（＊口演が延びた場合の終了時間は、最終口演終了の30分後とします。）

◇昼　食

ウインクあいち内、および周辺に、レストランが複数あります。

◇インターネットコーナー

6F展示ホール内に無線LAN接続のインターネットコーナーを設置します。コンピュータは各自用意してください。

◇呼び出し

会場内での呼び出しは、緊急の場合を除いては一切行いません。

3. 禁止事項

◇喫煙・飲食

会場内は禁煙です。また、口頭発表会場（大ホール）内での飲食は固く禁じられています。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（大ホールおよび小ホール1）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
〒450-0002　愛知県名古屋市中村区名駅4-4-3
ウインクあいち　2F　大ホール前

◇会期外

51ST 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：nmr51@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、大ホール内の「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、口演時間終了後には会議や懇親会などが予定されております。質疑応答などにおいてイ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。

◇口演者の方へ

招待講演、一般口演および若手ポスター賞受賞口演の口演方法：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。口演に使用するコンピュータは各自で持参してください。
音声出力には対応していません。バッテリー切れに備えて、必ず電源アダプターを持参してください。液晶プロジェクターとの接続はD-sub15ピンとなります。一部のノートパソコン（特にMacintosh）では専用の変換ケーブルが必要となりますので、必ず持参してください。バックアップ用として、発表データをCD-ROMあるいはUSBフラッシュメモリで持参してください。

招待講演、一般口演および若手ポスター賞受賞口演の受付：口演前の休憩時間までに、大ホール内の「PC受付」に口演に使用するコンピュータを持参してください。

口演時間：進行は座長に一任されています。持ち時間は特別講演40分、一般口演20分、ベルの鳴動時刻は以下のとおりです。

	一鈴	二鈴（発表終了）	三鈴（質疑終了）
招待講演と特別講演	30分	35分	40分
一般口演（日本語または英語）	13分	15分	20分

※若手ポスター賞受賞者には10分程度のショートトークを行って頂く予定です。

◇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210cm×横90cmです。左上隅20cm四方のスペースに演題番号を表示してあります。床から30cm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6F展示ホールです。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8日（木）9：00～12：00の間に掲示し、11月10日（土）14：55～16：45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および若手ポスター賞候補の方（P2, P4,…）は、11月8日（木）13：50～15：20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10日（土）13：15～14：45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。また、発表者はポスターボードに備え付けられたリボンを付けて発表して下さい。

6. 第51回日本核磁気共鳴学会　総会開催通知

日　時：2012年11月8日（木）　12：05～12：35
場　所：ウインクあいち　大ホール（2F、口頭発表会場）

第51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7日（水）18：00より	ウインクあいち9F　小会議室906
評議員会	11月8日（木）18：40より	同上
新評議員会	11月9日（金）12：00より	同上
新理事会	11月9日（金）引き続いて	同上

◇いずれも、食事の用意があります。
◇9F 小会議室906へは、8Fにて高層階用のエレベーターにお乗り換え下さい（1Fからは直通で 9Fまでお越しいただけます）。

チュートリアルコース

日　時：11月7日（木）／ Nov. 7, Thu.
会　場：ウインクあいち（5F 小ホール1）
（受付　5F）

13:00 ～ 14:30
「2次元NMR：フーリエ変換と共分散」

竹腰　清乃理　先生（京都大学大学院理学研究科 教授）

とある分子のNMR信号の帰属や合成高分子の単量体や生体高分子のアミノ酸・核酸の連鎖（2次元構造）から分子の3次元構造の決定、さらには、分子の運動やイメージングにと多次元NMR法の役割は大きい。本講義では、2次元交換NMR法を題材に、基礎原理と方法を解説する。また、発展として、その代表的な処理法であるフーリエ変換と近年提案されてそのメリットが実感されつつある共分散法について比較紹介する。

14:45 ～ 16:15
「MRIの基礎」

巨瀬　勝美　先生（筑波大学大学院数理物質科学研究科 教授）

MRIの開発により、NMRの測定対象は、溶液や固体試料などの試験管に入った試料から、構造を持った任意の形状を有する試料（生体など）へと大きく拡大した。そして、それまでの分子構造などに関する情報から、生体の解剖学的構造や、疾患等に伴う化学的・物理的な変化の空間的構造など、従来のNMR手法ではアクセスできない空間的情報も得ることができるようになった。また、MRIによる医用診断は、医療では不可欠なものとなっており、装置販売の市場だけでも、世界で年間3,000億円を超えている。本稿では、MRIの一般的な紹介ではなく、NMR分光計を使用している研究者がMRIを始めるときに必要な知識などを中心に、MRIの解説を行う。

16:30 ～ 18:00
「NMRはいかに創られたか：6. 固体高分解能NMRその2」

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。今回は昨年に引き続き固体高分解能NMRについて話す予定である。

第51回 NMR討論会

The 51st Annual Meeting of The Nuclear Magnetic Resonance Society of Japan

会　期：　2012年11月8日（木）～10日（土）
November 8(Thu)-10(Sat), 2012
会　場：　ウインクあいち
WINC HALL
〒450-0002　愛知県名古屋市中村区名駅4-4-38

第1日目　11月8日(木)／Day 1 (Nov. 8, Thu)

9:25 ～ 9:30
開会の挨拶　朝倉　哲郎（日本核磁気共鳴学会会長）

9:30 ～ 10:30
座長　児嶋　長次郎

L1　脂質膜中におけるアンフォテリシンB－エルゴステロール分子間相互作の固体NMR解析
Bimolecular Interaction Analysis between Amphotericin B and Ergosterol in Lipid Membrane as Viewed by Solid-State NMR
○梅川　雄一，中川　泰男，土川　博史，松森　信明，村田　道雄（大阪大学大学院 理学研究科）

L2　絹の多様な^{13}Cラベル化と固体NMRによるβシート構造の解析
Structural analysis of silks with β-sheet structure by combination of several ^{13}C labeling and solid-state NMR
○奥下　慶子[1]，小川　達也[1]，鈴木　悠[1]，宮澤　健太[1]，中澤　靖元[1]，朝倉　哲郎[1,2]（[1]東京農工大学大学院 工学府，[2]分子科学研究所）

L3　ベイズ法を利用した新規構造計算手法の開発
Development of the Bayesian-based structure determination
○池谷　鉄兵[1]，嶋崎　真那人[1]，三島　正規[1]，伊藤　隆[1]，Peter Güntert[1,2,3]（[1]首都大学東京大学院 理工学研究科，[2]フランクフルトゲーテ大学 生物物理研究科，[3]フランクフルトゲーテ大学先端研究所）

10:30 ～ 10:40　**休憩/Break**

10:40 ～ 11:20
Chairperson: Daisuke Kohda

L4　A solid-state NMR study of banana liquid crystals
○Kazuhiko Yamada[1], Sungmin Kang[1], Eun Woo Lee[1], E-Joon Choi[2], Kenzo Deguchi[3], Tadashi Shimizu[3], Junji Watanabe[1]（[1]Tokyo Institute of Technology, [2]Kumoh National University of Technology, [3]National Institute for Materials Science）

L5　Induction of Residual Dipolar Coupling by Aggregates of Magnetically Aligning Self-Assembled Complexes
○Ryosuke Takeuchi[1], Sota Sato[1], Maho Yagi[3,4], Yoshiki Yamaguchi[2], Koichi Kato[3,4,5], Makoto Fujita[1,5]（[1]Department of Engineering, The University of Tokyo, [2]RIKEN, [3]Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University, [4]Okazaki Institute for Integrative Bioscience, [5]CREST）

11:20 ～ 12:00

Chairperson: Yutaka Ito

L6 Pressure-induced chemical shifts as probes for conformational fluctuations in proteins
○Ryo Kitahara[1], Kazumi Hata[2], Hua Li[3], Michael P Williamson[4], Kazuyuki Akasaka[5] ([1] College of Pharmaceutical Sciences, Ritsumeikan University, [2] R-GIRO, Ritsumeikan University, [3] Shanghai Institute of Biochemistry and Cell Biology, Institute for Biological Sciences, [4] Department of Molecular Biology and Biotechnology, The University of Sheffield, [5] High Pressure Protein Research Center, Institute of Advanced Technology, Kinki University)

L7 Transient Structure of the Kinetic Intermediate of Apomyoglobin Monitored by Quench-Flow HD Exchange NMR
○Chiaki Nishimura[1, 2], Peter E. Wright[1] ([1] Department of Molecular Biology, The Scripps Research Institute, [2] Faculty of Pharmaceutical Sciences, Teikyo-Heisei University)

12:05 ～ 12:35 **日本核磁気共鳴学会総会/Meeting of the NMR Society of Japan**

12:35 ～ 13:50 **昼食/Lunch**
ランチョンセミナー/Luncheon Seminar

13:50 ～ 15:20 **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 ～ 15:30 **移動・休憩/Break**

Parallel Session 1

15:30 ～ 18:30 **"New Frontiers of NMR in Asia"**

Chairpersons: Hideo Akutsu and Koichi Kato

15:30 ～ 15:35 **Introduction**

15:35～17:05

IL1 *Invited Lecture 1*
Recognition and regulation of small ubiquitin-like modifier (SUMO)
○Tai-huang Huang（Institute of Biomedical Sciences Academia Sinica）

IL2 *Invited Lecture 2*
Method Development and Application of Magnetic Resonances for Membrane Protein Structure and Function Studies
Chaowei Shi[1], Kaiqi Wu[1], Pan Shi[2], Juan Li[1], Dong Li[1], Fangming Wu[2] ,○Changlin Tian[1, 2] ([1] School of Life Sciences, University of Science and Technology of China, [2] High Magnetic Field Laboratory, Chinese Academy of Sciences)

IL3 *Invited Lecture 3*
To walk or not to walk, and how should they walk: myosin's "clients" share some decision making power
○Mingjie Zhang（Division of Life Science, Hong Kong University of Science and Technology）

17:05 ～ 17:20 **Break/休憩**

17:20～18:20

IL4 *Invited Lecture 4*
Are the Dynamics of Acyl Carrier Protein Domain in FAS/PKS Critical to its Function?
Jackwee Lim[1], Huihua Sun[2], Jing-Song Fan[1], Zhao-Xun Liang[2], ○Daiwen Yang[1] ([1] Department of Biological Sciences, National University of Singapore, [2] School of Biological Sciences, Nanyang Technological University)

IL5 *Invited Lecture 5*
NMR-based rational drug design: Applications to GPCR-targeted drugs
○Weontae Lee[1], Jihye Yun[1], Daesuk Oh[1], Sung-Kil Lim[2] ([1] Department of Biochemistry and Structural Biochemistry & Molecular Biophysics Laboratoty, Yonsei University, [2] Department of Internal Medicine, College of Medicine, Yonsei University)

18:20 ～ 18:30 **Discussion**

Parallel Session 2

15:30 ～ 18:30 **「材料分析・評価・品質管理におけるNMR」**
座長　吉水　広明，浅川　直紀

15:30 ～ 15:35 **趣旨説明**

15:35～16:25

IL6 *Invited Lecture 6*
合成高分子の一次構造解析にむけた溶液NMRのアプローチ：スペクトルの多変量解析とDOSY
Multivariate Analysis and DOSY —— Solution NMR Approaches to the Molecular Characterization of Synthetic Polymers
○右手　浩一（徳島大学大学院ソシオテクノサイエンス研究部）

16:25 ～ 16:35 **休　憩/Break**

16:35～17:25

IL7 *Invited Lecture 7*
NMRの分析手法としての汎用性について
NMR as a versatile analytical tool for industrial issues from research and development activities to quality control
○山口　秀幸（味の素株式会社イノベーション研究所 フロンティア研究所食品官能特性研究グループ）

IL8 *Invited Lecture 8*
無機ガラス材料の構造解析入門編
An introduction of structural analysis for glass
○閔　庚薫（旭硝子(株)中央研究所）

17:25 ～ 17:35 **休　憩/Break**

17:35～18:25

IL9 *Invited Lecture 9*
リチウムイオン二次電池材料のNMR分析
NMR analysis of Li-ion battery materials
○上口　憲陽（株式会社日産アーク）

IL10 *Invited Lecture 10*
NMRと材料開発
NMR applications for the material developments
○橋本　康博（旭化成（株）・新事業企画開発室）

18:25 ～ 18:30　**総合討論**

18:40 ～　**評議員会（会議室906）**

第2日目　11月9日(金)／Day 2 (Nov. 9, Fri)

9:10 ～ 9:50

Chairperson: Masatsune Kainosho

L8 Interaction of RNA Aptamer with Prion Protein and Monitoring of Biodegradation of Wood Biomass
Tsukasa Mashima[1], Hiroshi Nishimura[2, 5], Hideyasu Okamura[1], Fumiko Nishikawa[3], Yuji O. Kamatari[4], Takashi Nagata[1], Satoshi Nishikawa[3], Kazuo Kuwata[4], Takashi Watanabe[2, 5], ○Masato Katahira[1, 5]（[1] Institute of Advanced Energy, Kyoto University, [2] RISH, Kyoto University, [3] AIST, [4] Gifu University, [5] CREST）

L9 Functional modulation of protein through the change in its structure dynamics
○Shin-ichi Tate（Department of Mathematical and Life Sciences, Hiroshima University）

9:50 ～ 10:30

Chairperson: Ichio Shimada

IL11 *Invited Lecture 11*
Dynamics on the surface of amyloid β protofibrils in solution: Dark-state exchange saturation transfer NMR
○Nicolas L. Fawzi[1], Jinfa Ying[1], Rodolfo Ghirlando[2], Dennis A. Torchia[3], G. Marius Clore[1]（[1] Laboratories of Chemical Physics, [2] Molecular Biology, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, [3] National Institute of Dental and Craniofacial Research, National Institutes of Health）

10:30 ～ 10:40　**Break/休憩**

10:40 ～ 11:20

Chairperson: Fuyuhiko Inagaki

L10 Manganese-enhanced MRI using intermediate-affinity manganese chelates
○Yoshiteru Seo[1], Hironobu Morita[2], Masataka Murakami[3]（[1] Dept of Regulatory Physiology, Dokkyo Medical University School of Medicine, [2] Dept of Physiology, Gifu University Graduate School of Medicine, [3] National Institute for Physiological Sciences）

L11 Electronic Structure of Heme Sandwiched between All-parallel G-quadruplex DNAs
○Yasuhiko Yamamoto[1], Hulin Tai[1], Kaori Saito[1], Hikaru Hemmi[2], Nagao Kobayashi[3]（[1] Department of Chemistry, University of Tsukuba, [2] National Food Research Institute, National Agriculture and Food Research Organization, [3] Department of Chemistry, Graduate School of Science, Tohoku University）

11:20 ～ 12:00

Chairperson: Michio Murata

IL12 *Invited Lecture 12*
New Developments in the ADEQUATE NMR Experiments
○R. Thomas Williamson[1], Gary E. Martin[2], Alexei Buevich[3], Misha Reibarkh[1], Wolfgang Bermel[4]（[1] Merck & Co. Inc. Discovery and Preclinical Sciences, Process and Analytical Chemistry-Structure Elucidation, [2] Merck & Co. Inc. Discovery and Preclinical Sciences, Process and Analytical Chemistry-Structure Elucidation, [3] Merck & Co. Inc. Discovery and Preclinical Sciences, Process and Analytical Chemistry-Structure Elucidation, [4] Bruker BioSpin GmbH）

12:00 ～ 13:30　**Lunch/昼食**
新評議員会・新理事会（会議室906）

13:30 ～ 14:10

Chairperson: Kiyonori Takegoshi

L12 ^{1}H-^{14}N overtone HMQC above 110 kHz MAS
○Yusuke Nishiyama, Michal Malon, Takahiro Nemoto, Yuki Endo（JEOL RESONANCE Inc.）

L13 Breakdown of a common notion for ^{29}Si NMR of aluminosilicates: Information from J-resolved and CPMG measurements
○Xianyu Xue, Masami Kanzaki（Institute for Study of the Earth's Interior, Okayama University）

14:10 ～ 14:50

Chairperson: Motohiro Mizuno

IL13 *Invited Lecture 13*
Following Function in Real Time: New NMR and MRI Methods for Studying Structure and Dynamics in Batteries, Fuel Cells and Supercapacitors
○Clare P. Grey（[1]Department of Chemistry, University of Cambridge, [2] Department of Chemistry, Stony Brook University）

14:50 ～ 15:00 **Break/休憩**

15:00 ～ 15:40

Chairperson: Makoto Demura

L14 Photo reaction cycle and photo-activated structural changes of photoreceptor membrane proteins as reveled by *in situ* photoirradiated solid-state NMR
○Akira Naito[1], Yuya Tomonaga[1], Tetsurou Hidaka[1], Ryota Miyasa[1], Izuru Kawamura[1], Yuki Sudo[2], Takashi Okitsu[3], Akimori Wada[3], Naoki Kamo[4]（[1] Graduate School of Engineering, Yokohama National University, [2] Graduate School of Science, Nagoya University, [3] Department of Organic Chemistry for Life Science, Kobe Phamaceeutical University, [4] College of Pharmeutical Science, Matsuyama University）

L15 Automated Signal Assignment and Secondary Structural Analysis of Non-Crystalline Proteins by Fragment-Based Solid-State NMR Spectral Reconstruction
○Keisuke Ikeda[1, 2], Ayako Egawa[1], Kokoro Hayashi[3], Chojiro Kojima[1], Toshimichi Fujiwara[1]（[1] Institute for Protein Research, Osaka University, [2] Graduate School of Pharmaceutical Sciences, University of Toyama, [3] Graduate School of Biological Sciences, Nara Institute of Science and Technology）

15:40 ～ 16:20

Chairperson: Akira Naito

IL14 *Invited Lecture 14*
Interleaved CW irradiation and rf pulses for efficient re- and decoupling in solid-state NMR
○Niels C. Nielsen（Center for Insoluble Protein Structures（inSPIN）, Interdisciplinary Nanoscience Center（iNANO）and Department of Chemistry, Aarhus University）

16:20 ～ 16:30 **Break/休憩**

16:30 ～ 17:10

Chairperson: Yoshifumi Nishimura

HL1 *Honorary Lecture 1*
Protein NMR before the dawn
○Keiichi Kawano（Grad. Sch. Life Sci., Hokkaido University）

17:10 ～ 17:50

Chairperson: Tetsuo Asakura

HL2 *Honorary Lecture 2*
A short essay on my NMR studies
○Taro Eguchi（Osaka University）

17:50 ～ 18:30

Chairperson: Mitsuhiko Ikura

IL15 *Invited Lecture 15*
Singlet NMR
○Malcolm H. Levitt（Southampton University）

18:45 ～ **Banquet（Hotel Castle Plaza）/懇親会（キャッスルプラザ）**

第3日目　11月10日(土)／Day 3 (Nov. 10, Sat)

9:10 ～ 9:50
座長　河合　剛太

L16　SAIL－NMR法によるジスルフィド結合の立体配座決定と動態解析
SAIL-NMR studies on the disulfide bond conformation and dynamics in proteins
○武田　光広[1]，寺内　勉[2,3]，甲斐荘　正恒[1,2,4]，([1]名古屋大学大学院　理学研究科，[2]首都大学東京　戦略研究センター，[3]SAILテクノロジーズ，[4]大阪大学　蛋白質研究所)

L17　高分子量機能性RNAの局所構造・状態解析のため部位特異的標識法
Site-specific stable-isotope-labeling techniques of RNA molecules for structural and mechanistic studies with NMR spectroscopy
○田中　好幸[1]，芦原　悠太[1]，春田　佳一郎[1]，河原　郁美[1,2]，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)

9:50 ～ 10:30
座長　大木　進野

L18　βラクトグロブリンの折り畳みストラテジー
Folding Strategy of bovine β-Lactoglobulin
○櫻井　一正[1]，北山　寛貴[1]，八木　正典[2]，池上　貴久[1]，西村　千秋[3]，後藤　祐児[1]，([1]大阪大学　蛋白質研究所，[2]大阪大学　微生物病研究所，[3]帝京平成大学　薬学部)

L19　Structure and dynamics of yeast calmodulin
○小椋　賢治[1]，岡村　英保[2]，久米田　博之[1]，矢澤　道生[3]，稲垣　冬彦[1]，([1]北海道大学先端生命科学研究院，[2]京都大学エネルギー理工学研究所，[3]北海道大学大学院理学研究科)

10:30 ～ 10:40　**休憩/Break**

10:40 ～ 11:20
座長　山本　泰彦

L20　準静的な内部/外部磁場勾配下でのNMR：
固体高分子の輸送現象と磁気共鳴イメージング
A utilization of internal/external quasi-static magnetic field gradients:
transport phenomenon and magnetic resonance imaging of solid polymers
○浅川　直紀，小畑　命輝（群馬大学大学院工学研究科応用化学・生物化学専攻)

L21　ナノダイアモンドを用いた光検出磁気共鳴顕微鏡装置の開発と生物試料への応用
Development of a microscope optically detecting magnetic resonance in nanodiamond and application to observation of biological samples
○森　重之[1]，吉成　洋祐[2]，五十嵐　龍治[1]，外間　進悟[1]，横田　浩章[2]，栃尾　豪人[1]，白川昌宏[1]，原田　慶恵[2,3]，池田　和寛[4]，角谷　均[4]([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]京都大学大学院生命科学研究科，[4]住友電気工業株式会社　エレクトロニクス・材料研究所)

11:20 ～ 12:00
座長　林　繁信

L22　固体^{43}Ca NMRによるガラス中のカルシウムの構造的役割の特定
Probing the structural role of calcium in alkaline and alkaline-earth aluminosilicate glass by solid-state ^{43}Ca NMR
○金橋　康二（新日鐵住金(株) 先端技術研究所)

L23　高磁場光ポンピングによるアルカリ金属イオンの核スピン偏極
High-field optical pumping for nuclear spin polarization of alkali-metal ions
○石川　潔（兵庫県立大学大学院 物質理学研究科)

12:00 ～ 13:15　**昼食/Lunch**

13:15 ～ 14:45　**ポスターセッション（奇数番号）**
Poster Sessions（odd numbers）

14:45 ～ 14:55　**移動・休憩/Break**

14:55 ～ 16:35　**若手ポスター賞受賞口演**
Short talks by Young Scientists Poster Awards Winners
座長　藤原　敏道，鈴木　榮一郎

16:35 ～ 16:45　**休憩/Break**

16:45 ～ 17:45
座長　平沖　敏文

L24　固体NMRによるマジックサイズCdSeナノ粒子の表面構造解析
Solid-State NMR Study of Surface Structure on Magic-Sized CdSe Nanoparticles
○野田　泰斗[1,2]，水野　敬[3]，武田　和行[1]，竹腰　清乃理[1]，粕谷　厚生[4]，([1]京都大学大学院理学研究科，[2]JST・先端，[3](株)JEOL RESONANCE，[4]東北大学学際センター)

L25　常磁性により複雑化したMAS線形における選択励起
－リチウムイオン電池正極材への応用－
Selective excitation of a MAS sideband spectrum spreading widely by paramagnetic interaction: application to cathode materials of Li-ion battery
○村上　美和[1]，高澤　信明[2]，汐月　大志[2]，寺島　純平[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]トヨタ自動車株式会社，[3]京都大学大学院 人間・環境学研究科)

L26　固体^{15}N NMRを用いた鉄含有ポリアニリン炭素化物の構造解析
^{15}N Solid State NMR Study of Iron-Containing Pyrolyzed Polyaniline
○黒木　重樹[1]，上口　憲陽[2]，木村　英昭[3]，山内　一夫[4]，([1]東京工業大学大学院 理工学研究科，[2](株) 日産アーク，[3]ブルカー・バイオスピン(株)，[4]KAUST)

17:45　**閉会の挨拶　　加藤　晃一（第51回NMR討論会世話人代表）**

一般ポスター発表／Poster presentation

P1 SAIL法による巨大蛋白質の新規立体構造解析法の開発
Structural analysis for larger proteins using the relaxation optimized SAIL amino acids
○宮ノ入　洋平[1]，武田　光広[1]，大熊　宏昌[2,3]，小野　明[2,3]，寺内　勉[2,3]，甲斐荘　正恒[1,2]（[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]首都大学東京 戦略研究センター，[3]SAILテクノロジーズ株式会社）

P2 Y1 安定同位体標識セルロース系バイオマスの溶液および固体NMR法による構造解析
Structural Analysis for Stable-Isotope labeled Cellulosic Biomass using Solution and Solid-State NMR Spectroscopy
○小松　功典[1]，菊地　淳[1,2,3,4]（[1]横浜市立大学大学院 生命ナノシステム科学研究科，[2]理化学研究所 植物科学研究センター，[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）

P3 酵母*K. Lactis*発現系を用いた高分子量蛋白質の重水素化およびメチル選択標識
Perdeuteration and methyl selective $^{1}H/^{13}C$-labeling using *Kluyveromyces lactis* expression system
宮沢-大浪　真由美[1]，○竹内　恒[2]，杉木　俊彦[1]，高野　等覚[1]，嶋田　一夫[2,3]，高橋　栄夫[2,4]（[1]バイオ産業情報化コンソーシアム，[2]産業技術総合研究所・バイオメディシナル情報研究センター，[3]東京大学大学院・薬学系研究科，[4]横浜市立大学・生体超分子システム科学専攻）

P4 Y1 ヒト主要組織適合複合体の安定化機構に関する解析
The analysis on stabilization mechanism of Human Leukocyte Antigen
○谷中　冴子[1]，菅瀬　謙治[2]，上野　貴将[3]，津本　浩平[1]（[1]東京大学大学院新領域創成科学研究科，[2]（財）サントリー生物有機科学研究所，[3]熊本大学エイズ学研究センター）

P5 特徴的なリピート構造を有するカイコ由来DNA結合ドメインSTPRの解析
NMR analysis of the novel DNA-binding domain STPR of the silkworm
○柚原　光佑，西野　明理沙，横山　卓也，相沢　智康，神谷　昌克，熊木　康裕，滝谷　重治，菊川　峰志，出村　誠，河野　敬一（北海道大学大学院 生命科学院）

P6 NMRとシミュレーションによるクルクミンのカルシトニン線維形成阻害機構の解明
Interaction of human calcitonin with curcumin as an inhibitor of fibrillation as revealed by NMR and docking simulation
○竹内　健[1]，渡邊　ひかり[1]，ナムスライ　ジャブクラントゥス[1]，廣田　洋[2]，内藤　晶[1]（[1]横浜国立大学大学院 工学研究院，[2]理化学研究所）

P7 カブトガニ由来抗菌ペプチドTachyplesin Iとキチンの相互作用解析
Analysis of interaction between tachyplesin I, an antimicrobial peptide derived from horseshoe crab, and chitin
○櫛引　崇弘[1]，神谷　昌克[1]，相沢　智康[1]，熊木　康裕[2]，菊川　峰志[1]，出村　誠[1]，川畑　俊一郎[3]，河野　敬一[1]（[1]北海道大学 大学院生命科学院，[2]北海道大学 大学院理学院，[3]九州大学 大学院理学院）

P8 Y1 DNA修復蛋白質MutLの核磁気共鳴法による解析
NMR study on DNA repair protein MutL
○水島　良太[1,2]，高井　朋代[2]，福井　健二[3]，李　映昊[2]（[1]大阪大学大学院 生命機能研究科，[2]大阪大学 蛋白質研究所，[3]理化学研究所 播磨研究所 放射光システム生物学研究グループ）

P9 マウス由来の新規低分子RNAの構造的特徴の解析
Structural analysis of novel small RNA from mouse
○奥居　沙弥[1]，牛田　千里[2]，清澤　秀孔[3]，河合　剛太[1]（[1]千葉工業大学，[2]弘前大学，[3]高知大学）

P10 NMR structure and dynamics of chromatin remodeling component BAF155
○Sunjin Moon, Sooho Choi, Weontae Lee (Department of Biochemistry, College of Life Science and Biotechnology, Yonsei University)

P11 ナガガジ由来III型不凍蛋白質の不活性型および活性型変異体の溶液構造解析
NMR structure of a defective isoform and its activity-improved variant of type III antifreeze protein form *Zoarces elongates Kner*
○久米田　博之[1]，小椋　賢治[1]，西宮　佳志[2]，三浦　愛[2]，稲垣　冬彦[1]，津田　栄[2]（[1]北海道大学先端生命科学院 構造生物学研究室，[2]産業技術総合研究所　生物プロセス研究部門）

P12 Y1 β_2-アドレナリン受容体のefficacy決定機構の解明
Efficacy of the β_2-adrenergic receptor is determined by conformational equilibrium in the transmembrane region
○幸福　裕[1,2]，上田　卓見[1]，奥出　順也[1]，白石　勇太郎[1]，近藤　啓太[1]，前田　正洋[3]，辻下　英樹[3]，嶋田　一夫[1,4]（[1]東京大学 大学院薬学系研究科，[2]日本バイオ産業情報化コンソーシアム，[3]塩野義製薬，[4]産業技術総合研究所 バイオメディシナル情報研究センター）

P13 ヘテロクロマチンタンパク質HP1αセリンリン酸化クロモドメインのNMR構造解析
NMR structure of the HP1-α chromodomain phosphorylated at N-terminal serine residues
○川口　あゆみ[1]，下條　秀朗[1]，濱田　京子[2]，中山　潤一[2]，西村　善文[1]（[1]横浜市立大学大学院 生命ナノシステム科学研究科，[2]理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター）

P14 NMR Studies on NOX Activator 1 (NOXA1)
○Pravesh Shrestha[1], Ji-Hye Yun[1], Yun Soo Bae[2], Weontae Lee[1] ([1]Department of Biochemistry, College of Life Science and Biotechnology, Yonsei University, [2]Department of Life Science, Ewha Woman's University)

P15 ヘテロクロマチン構造形成因子Swi6クロモドメインとヒストンH3K9me3ペプチドの複合体の構造解析
Structural analysis of heterochromatin-related protein, Swi6 chromodomain bound to histone H3K9me3 peptide
○中村　紗里[1]，下條　秀朗[1]，中山　潤一[2]，西村　善文[1]（[1]横浜市立大学院　生命ナノシステム科学研究科，[2]理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター）

P16 Y1 100残基を超える機能性RNAのNMR法による立体構造解析
Structural analysis of functional RNA longer than 100 nt by using NMR
○大山　貴子，河合　剛太（千葉工業大学工学部生命環境科学科）

P17 テロメアDNAとhTRF2塩基性ドメインの相互作用解析
Analysis of telomere DNA - hTRF2 basic domain interactions
○鈴木　啓介，下條　秀朗，岩沢　佳尚，村井　元気，西村　善文（横浜市立大学大学院 生命ナノシステム科学研究科 生体超分子システム科学専攻）

P18 NMRに基づく白血球遊走制御因子FROUNT－抗炎症薬候補化合物の相互作用解析
NMR analyses of the interaction between the chemotaxis-regulating factor FROUNT and an anti-inflammatory compound
○日隈　達也[1]，吉永　壮佐[1]，江崎　芳[1]，寺島　裕也[2]，遠田　悦子[2]，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）

P19 NMR and Native-PAGE analyses of the phospholipase C-δ1 pleckstrin homology domain
○谷生　道一，西村　勝之（分子科学研究所）

P20 Y1 **ユビキチンの高エネルギー状態N_2の立体構造解明**
Solution stucture of the alternatively folded state of ubiquitin
○北沢　創一郎[1]，亀田　倫史[2]，矢木　真穂[3,4]，菅瀬　謙治[5]，Nicky Baxter[6]，加藤　晃一[3,4]，Williamson Michael P.[6]，北原　亮[1]（[1]立命館大学薬学部，[2]産総研・生命情報工学研究センター，[3]岡崎統合バイオサイエンスセンター，[4]名古屋市立大学院薬学研究科，[5]サントリー生命科学財団，[6]シェフィールド大学・分子生物バイオテクノロジー学科）

P21 **PDZドメインに群特異的に相互作用する低分子化合物の探索**
Screening of small molecules specifically interacting with PDZ domains
○天野　剛志[1,2]，合田　名都子[1,2]，岩谷　奈央子[1]，木下　賢吾[2,3,4]，太田　元規[2,5]，廣明　秀一[1,2]（[1]名古屋大学大学院 創薬科学研究科，[2]JST BIRD，[3]東北大学大学院 情報科学研究科，[4]東北大学 加齢医学研究所，[5]名古屋大学大学院 情報科学研究科）

P22 **メチル基選択的プロトン標識を用いたHeLa細胞中の in-cell NMR解析**
Methyl group as probes for proteins in NMR experiments in HeLa cells
○晴桉　貴洋[1]，浜津　順平[1]，Dambarudhar Shiba Sanker Hembram[1]，池谷　鉄兵[1]，三島　正規[1]，白川　昌宏[2]、伊藤　隆[1]（[1]首都大学東京大学院 理工学研究科，[2]京都大学大学院 工学研究科）

P23 **ミミズ由来R型レクチンC末端ドメインの異なったラクトース結合状態でのNMR解析**
NMR analysis of the C-terminal domain of R-type lectin from earthworm in different lactose-bound states
○逸見　光[1]，久野　敦[2]，海野　幸子[2]，平林　淳[3]（[1]農研機構・食総研，[2]産総研・糖鎖医工学研究センター，[3]産総研・幹細胞工学研究センター）

P24 Y1 **リジン^{13}Cメチル化法のタンパク質・タンパク質相互作用解析への適用**
Utilization of lysine ^{13}C-methylation NMR for protein-protein interaction studies
○服部　良一[1]，古板　恭子[1]，大木　出[2]，池上　貴久[1]，深田　はるみ[3]，白川　昌宏[4]，藤原　敏道[1]，児嶋　長次郎[1,2]（[1]大阪大学 蛋白質研究所，[2]奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科，[3]大阪府立大学大学院 生命環境科学研究科，[4]京都大学大学院 工学研究科）

P25 **ヒトストマチンSPFHドメインの溶液構造とその多量体形成に関する研究**
後藤　俊介[1,2]，岩谷　奈央子[1,2]，亀川　亜希子[3]，合田　名都子[1,2]，濱田　大三[1]，天野　剛志[1,2]，藤吉　好則[3]，○廣明　秀一[1,2,4]（[1]神戸大学大学院医学研究科，[2]名古屋大学大学院創薬科学研究科，[3]名古屋大学細胞生理学研究センター，[4]神戸大学G-COE統合的膜生物学の国際教育研究拠点）

P26 **高圧NMR法によるc-Myb DNA結合ドメインの動的構造に関する研究**
High-Pressure NMR Study on Structural Dynamics of c-Myb DNA-Binding Domain
○稲葉　理美[1]，前野　覚大[2]，金折　賢二[3]，赤坂　一之[2]，織田　昌幸[1]（[1]京都府立大学大学院生命環境科学研究科，[2]近畿大学 高圧力蛋白質研究センター，[3]京都工芸繊維大学 工芸科学研究科）

P27 **好熱性水素細菌シトクロムc_{552}におけるヘリックス接触界面への構造化学的摂動がヘム活性部位の電子構造に及ぼす影響の解析**
Structural and Functional Consequences of Perturbations on Interhelical Interaction in *Hydrogenobacter thermophilus* Cytochrome c_{552}
○利根川　健[1]，太　虎林[1]，逸見　光[2]，山本　泰彦[1]（[1]筑波大学大学院数理物質科学研究科，[2]農業・食品産業技術総合研究機構）

P28 Y1 Large amplitude interface dynamics in FKBP-ligand complexes revealed by the aromatic ring flipping and hydroxyl proton exchange rates for the interfacial tyrosine residues
○Chun-Jiun Yang[1], Mitsuhiro Takeda[2], JunGoo Jee[3], Akira M. Ono[4], Tsutomu Terauchi[4], Masatsune Kainosho[1,2,5] ([1]Graduate School of Science and Engineering & Center for Priority Areas, Tokyo Metropolitan University, [2]Structural Biology Research Center, Graduate School of Science, Nagoya University, [3]College of Pharmacy, Kyungpook National University, [4]SAIL Technologies Inc., [5]Protein Research Institute, Osaka University）

P29 **アメロジェニンの自己集合の性質**
Self-assembly properties of amelogenin
○熊木　康裕[1]，相沢　智康[2]，神谷　昌克[2]，出村　誠[2]，河野　敬一[2]（[1]北海道大学大学院 理学研究院，[2]北海道大学大学院　先端生命科学研究院）

P30 **αラクトアルブミンのモルテン・グロビュール状態と生物機能**
The molten globule state and its biological function in α-lactalbumin
○中村　敬[1,2]，真壁　幸樹[1,2,3]，相沢　智康[4]，河野　敬一[4]，出村　誠[4]，桑島　邦博[1,2,3]（[1]分子科学研究所，[2]岡崎統合バイオサイエンスセンター，[3]総合研究大学大学院 物理科学研究科 機能分子科学専攻，[4]北海道大学大学院 先端生命科学研究院）

P31 **家蚕液状絹の特異構造-Silk I-の構造解析**
Observation of Silk I conformation in *Bombyx mori* liquid silk
○鈴木　悠[1]，山崎　俊正[2]，朝倉　哲郎[1]（[1]東京農工大学大学院工学府生命工学専攻，[2]農業生物資源研究所）

P32 **MAP キナーゼ p38αの活性および基質選択性のアロステリックな調節機構の解明**
Allosteric enhancement of enzymatic activity and substrate selectivity of MAP kinase p38α by the docking interaction
○徳永　裕二[1,2]，竹内　恒[2]，高橋　栄夫[2,3]，嶋田　一夫[2,4]（[1]バイオ産業情報化コンソーシアム研究開発部門，[2]産業技術総合研究所 バイオメディシナル情報研究センター，[3]横浜市立大学 生体超分子システム科学専攻，[4]東京大学大学院 薬学系研究科）

P33 **Chp1クロモドメインの立体構造解析**
Solution structure of the Chp1 chromodomain
○下條　秀朗[1]，石田　真由美[2,3]，中山　潤一[2,3]，西村　善文[1]（[1]横浜市立大学大学院生命ナノシステム科学研究科生体超分子システム科学専攻，[2]理研CDBクロマチン動態研究チーム，[3]関西学院大学大学院理工学研究科）

P34 **少数の標識体を用いてアミノ酸を判別する組み合わせ選択標識法**
Novel Combinatorial Selective Isotope Labeling Method to Discriminate Amino-acids with a Small Number of Labeled Samples
○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 生命分子システム基盤研究領域 NMRパイプライン高度化研究チーム，[2]横浜市立大学 生命ナノシステム科学研究科 生体超分子システム科学専攻，[3]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，[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 知能システム科学専攻）

P35 **好熱性水素細菌シトクロムc_{552}のヘム軸配位子Metと環状水素結合ネットワークを形成するアミノ酸側鎖の性質とレドックス機能の関係**
Roles of Gly50 Residue Forming a Unique Loop Hydrogen Bond Network with Axial Met59 in Functional Control of *Hydrogenobacter thermophilus* Cytochrome c_{552}
○伊豆本　幸恵，三上　真一，太　虎林，山本　泰彦（筑波大学大学院 数理物質科学研究科）

P36 Y1 Solution structure and dynamics of C-ter100 domain of Vibrio extracellular metalloprotease derived from *vibrio vulnificus*

○Ji-Hye Yun[1], Heeyoun Kim[1], Juang Eun Park[2], Jung Sup Lee[2], Weontae Lee[1] ([1] Department of Biochemistry, College of Life Science and Biotechnology, Yonsei University, [2] Department of Biotechnology, College of National Sciences, Chosun University)

P37 キャビティが決める蛋白質構造の揺らぎ：T4リゾチームの ^{13}C-, ^{15}N-, ^{1}H- 高圧NMR

Crucial roles of cavity in the conformational fluctuation of a protein: A high pressure ^{13}C-, ^{15}N-, ^{1}H-NMR study of T4 lysozyme

○前野　覚大[1,2]，北原　亮[2,3]，横山　茂之[4,5]，F.W. Dahlquist[6]，F.A.A. Mulder[7]，赤坂　一之[1,2] ([1] 近畿大学先端技術総合研究所 高圧力蛋白質研究センター，[2] 理化学研究所播磨 SPring-8，[3] 立命館大学 薬学部，[4] 東京大学大学院 理学系研究科，[5] 理化学研究所 生命分子システム基盤研究領域，[6] カリフォルニア大学サンタバーバラ校 生物化学科，[7] オーフス大学 化学科)

P38 気孔密度を調節するペプチドホルモンの構造と機能

Structure-function relationship of peptide hormones regulating stomatal density

○大木　進野[1]，竹内　誠[1]，森　正之[2] ([1] 北陸先端科学技術大学院大学ナノマテリアルテクノロジーセンター，[2] 石川県立大学生物資源工学研究所)

P39 ヒストンシャペロン hNap1のC末酸性ドメインとヒストンH2A/H2Bの相互作用

Interaction between H2A/H2B heterodimer and the acidic domain of histone chaperone hNap1

○森脇　義仁[1]，奥脇　暢[2]，永田　恭介[2]，戸所　泰人[1]，佐藤　昌彦[1]，長土居　有隆[1]，西村　善文[1] ([1] 横浜市立大学大学院 生命ナノシステム科学研究科，[2] 筑波大学大学院 人間総合科学研究科)

P40 Y1 Structural studies of plant telomere binding proteins and their binding mechanism to telomeric DNA

○Inhwan Lee[1], Ji-Hye Yun[1], Myeon Haeng Cho[2], Weontae Lee[1] ([1] Department of Biocheistry, Yonsei University, [2] Department of Biology, Yonsei Univeristy)

P41 NMRによるマルチドメインタンパク質PKCの構造解析

NMR studies of the multidomain protein PKC

秋吉　克昴[1]，金場　哲平[1]，前崎　綾子[1,2]，宮崎　健介[1]，伊藤　隆[1]，○三島　正規[1] ([1] 首都大学東京 理工学研究科，[2] 奈良先端大バイオサイエンス研究科)

P42 ケモカインシグナル制御因子FROUNTの構造生物学的研究

Structural analyses of FROUNT, the regulator of chemokine signaling

○吉永　壮佐[1]，辻　辰一朗[1]，薗田　晃弘[1]，石田　規人[1]，土屋　祐輔[1]，江崎　芳[1]，寺島　裕也[2]，遠田　悦子[2]，齊藤　貴士[3]，神田　大輔[3]，嶋田　一夫[4]，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] 東京大学大学院 薬学系研究科)

P43 タンパク質リンカー変異を用いた残基特異的化学シフト異方性テンソル決定技術

Determination of the residue-specific ^{15}N chemical shift anisotropy by using the loop length variant mutants

○玉利　佑，徐　宇，楯　真一 (広島大学大学院 理学研究科)

P44 Y1 ^{19}F NMRを用いた精確な定量分析法の開発

Development of accurate quantification method by using ^{19}F NMR

○山崎　太一，齋藤　剛，井原　俊英 (産業技術総合研究所 計測標準研究部門)

P45 新規重水素標識コリンの合成と ^{15}N DNP-NMRスペクトル

Synthesis and ^{15}N DNP-NMR profile of a new perdeuterated choline

○熊谷　慶子[1]，赤壁　麻依[1]，川島　一泰[1]，津田　雅之[1]，阿部　孝政[2]，津田　正史[3] ([1] 高知大学総合研究センター，[2] オックスフォード・インストゥルメンツ株式会社，[3] 高知大学海洋コア総合研究センター)

P46 Y1 重水素化グルコースを用いたDNP-13C-NMRスペクトル

^{13}C-NMR Spectra of Hyperpolarized Deuterated Glucoses by DNP

○赤壁　麻依[1]，熊谷　慶子[1]，津田　雅之[1]，津田　正史[2]，市川　和洋[3]，阿部　孝政[4]，福士　江里[5]，川端　潤[5] ([1] 高知大学 総合研究センター，[2] 高知大学 海洋コア総合研究センター，[3] 九州大学 先端融合医療レドックスナビ研究拠点，[4] オックスフォード・インストゥルメンツ株式会社，[5] 北海道大学大学院農学研究院)

P47 長い縦緩和時間を利用した高感度溶液NMR測定法の開発と ^{13}C直接観測への応用

Development of a novel high-sensitivity solution NMR measurement method utilizing long longitudinal relaxation time and the application to ^{13}C direct detection

○古板　恭子，服部　良一，池上　貴久，藤原　敏道，児嶋　長次郎 (大阪大学 蛋白質研究所)

P48 Y1 Sf9細胞のin-cell NMR：シグナル帰属と構造解析の試み

In-cell NMR in Sf9 cells: strategies for resonance assignments and structural analyses

○浜津　順平[1]，田中　孝[1]，白井　隆弘[1]，池谷　鉄兵[1]，三島　正規[1]，白川　昌宏[2]，伊藤　隆[1] ([1] 首都大学東京大学院 理工学研究科 分子物質化学，[2] 京都大学大学院 工学部 分子工学)

P49 天然変性蛋白質PQBP1のセグメント標識

Segmental labeling of the intrinsically disordered protein PQBP1

○水口　峰之，鍋島　裕子 (富山大学薬学部)

P50 Y2 緩和分散差スペクトル法による混みあったNMRスペクトルの緩和分散データの解析

Extracting information on protein dynamics from crowded NMR spectra using relaxation dispersion difference

○小沼　剛，菅瀬　謙治 ((公財) サントリー生命科学財団 生物有機科学研究所)

P51 対流の影響を抑制した ^{13}C観測DOSY

^{13}C-Detected DOSY with Convection Compensation

○松原　康史 (日本ポリケム株式会社 研究開発部)

P52 Y2 ポリ乳酸の物性を左右する立体規則性とそのNMRピークの起源

The Chemical Shift Origin of Stereoregularity of Poly Lactic Acid controlling the Physical Properties

○菅沼　こと[1,2]，堀内　健[2]，松田　裕生[2]，右手　浩一[3]，朝倉　哲郎[1] ([1] 東京農工大大学院 工学府，[2] 帝人株式会社 構造解析研究所，[3] 徳島大学大学院 ソシオテクノサイエンス研究部)

P53 マンノースオリゴ糖鎖の配座解析に有益なNMR測定法

Useful NMR methods for the conformational analysis of the oligomannose chains

○鵜澤　洵[1,2]，関　宏子[2]，山口　芳樹[1] ([1] 理化学研究所 糖鎖構造生物学研究チーム，[2] 千葉大学分析センター)

P54 Y2 エピガロカテキンガレート (EGCg) 誘導体の合成とNMRによる構造解析

Synthesis and structure analysis using NMR of (-)-epigallocatechin gallate (EGCg) derivatives

○梅原　将洋，西村　栄作，斎　政彦，伊藤　建比古 (森永製菓株式会社ヘルスケア事業部)

P55 GM-1ガングリオシドがクラスター化したナノ表面の自己組織化

Self-Assembly of Nano-Surface Decolated with Ganglioside GM-1 Clusters

○佐藤　宗太[1]，吉正　泰[1]，藤田　大士[1]，矢木　真穂[2]，加藤　晃一[2,3]，藤田　誠[1,3] ([1] 東京大学大学院工学系研究科，[2] 岡崎統合バイオサイエンスセンター，[3] CREST)

P56 Y2 溶液NMRを用いたポリカーボネート樹脂中の難燃剤の定量

Quantitative analysis of fire retardants in polycarbonate by NMR

○古川　諒一，兼崎　隆 (出光興産株式会社 先進技術研究所)

P57 植物代謝活性の評価技術高度化の試み
Evaluating plant metabolic activity by advanced NMR method

○大石　梨紗[1]，渡辺　太二[1]，篠　阿弥宇[2]，菊池　淳[1,2,3,4]（[1]横浜市立大学 大学院生命ナノシステム科学研究科，[2]理化学研究所 植物科学研究センター，[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）

P58 Y1 ^{19}F NMRによる液相析出法の反応機構の評価
Evaluation of the reaction mechanism for Liquid Phase Deposition (LPD) method by ^{19}F NMR

○奥村　雄三，牧　秀志，水畑　穣（神戸大学大学院 工学研究科）

P59 常磁性効果を応用した糖鎖の動的立体構造解析
Paramagnetic-tagging approaches for exploring conformational dynamics of oligosaccharides

○山口　拓実[1,2,3]，Zhang Ying[1,2,3]，山本　さよこ[1,3]，亀田　倫史[4]，加藤　晃一[1,2,3]（[1]自然科学研究機構 分子科学研究所，[2]総合研究大学院大学 物理科学研究科，[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 生命情報工学研究センター）

P60 チオリン酸イオン群の酸解離および加水分解挙動の多成分同時解析
Simultaneous multicomponent analysis of the protonation equilibria and stepwise hydrolysis behavior of a series of thiomonophosphate anions by ^{31}P NMR

○牧　秀志，植田　佳樹，成相　裕之，水畑　穣（神戸大学 大学院工学研究科）

P61 ^{9}Be NMRによる環状イミドリン酸イオン群の微視的錯生成平衡の定量解析
^{9}Be NMR analyses on Be^{2+} microscopic complexation with a series of *cyclo*-μ-imido triphosphate anions in aqueous solution

○牧　秀志，辻戸　正彦，山田　哲司，成相　裕之，水畑　穣（神戸大学 大学院工学研究科）

P62 COSY法の新しい応用測定――BASHD-J-resolved COSY法について
BASHD-J-Resolved-COSY: A New Method for Measuring Proton-Proton Spin Coupling Constants of Multiplet Signals

○降旗　一夫[1]，田代　充[2]（[1]東京大学大学院農学生命科学研究科，[2]明星大学理工学部化学科）

P63 ^{1}H-NMR法による親水性有機化合物水溶液中における水分子周辺ミクロ構造の考察
Study on microstructure of water-clusters in aqueous solutions of hydrophilic organic compounds by the method of ^{1}H-NMR technique

○ 春木　健作[1]，長谷部　亨[2]（[1]福島大学大学院理工学研究科，[2]福島大学共生システム理工学類）

P64 Y1 *In-situ* マイクロ波照射 NMR による物質の非平衡加熱状態の観測
Non-equilibrium heating state of substances as observed by in-situ microwave irradiated solid-state NMR

○田制　侑悟[1]，藤戸　輝昭[2]，川村　出[1]，内藤　晶[1]（[1]横浜国立大学大学院 工学府，[2]プローブ工房）

P65 多量子NMRによる ^{1}H配列の次元性の研究
Dimensionality in Solid Materials studied by Multiple Quantum NMR

○最上　祐貴，石川　洋人，竹腰　清乃理（京都大学大学院 理学研究科）

P66 Y1 デュアルレシーバシステムを用いた同種核及び異種核間2次元相関 covariance NMR
Homo- and Heteronuclear two-dimensional covariance solid-state NMR spectroscopy with a dual-receiber system

○日下部　寧[1]，野田　泰斗[1]，福地　将志[2]，武田　和行[1]，竹腰　清乃理[1]（[1]京都大学大学院理学研究科，[2]京都大学化学研究所）

P67 二重および三重回転照射を用いた異種核 ^{1}Hデカップリング
Heteronuclear ^{1}H-Decoupling using Double / Triple Nutation

○脇坂　朝人，武田　和行，竹腰　清乃理（京都大学大学院 理学研究科）

P68 DARR照射下での ^{13}C-^{13}C交換速度の計算
^{13}C-^{13}C Exchange Rate under DARR

○大橋　竜太郎，笹川　匡裕，水野　元博（金沢大学大学院自然科学研究科）

P69 *In operando* 固体NMR測定システムの開発とそれを用いた分子クラスター電池の電池特性の解明
Development of *in operando* solid-state NMR system and its application to high-performance molecular cluster batteries

○山田　哲也[1,2]，藤田　将史[3]，吉川　浩史[3]，阿波賀　邦夫[1,2]（[1]名古屋大学　物質科学国際研究センター，[2]CREST，[3]名古屋大学大学院 理学研究科）

P70 超偏極 ^{129}Xe NMRによる多孔質上吸着相の解析
Adsorption Property of Xenon Gas on Mesoporous Materials using Hyperpolarized ^{129}Xe Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy

○服部　峰之（産業技術総合研究所 電子光技術研究部門）

P71 MAS下の ^{19}F-^{13}C交差分極における ^{19}F化学シフト異方性の影響
The effect of ^{19}F chemical shift anisotropy on ^{19}F-^{13}C cross-polarization under magic angle spinning (MAS)

○神原　孝之，武田　和行，竹腰　清乃理（京都大学大学院 理学研究科）

P72 Y1 重水素固体NMRによる脂質ラフトにおけるスフィンゴミエリンの運動性解析
^{2}H Solid State NMR Studies on the Mobility of Sphingomyelin in Lipid Rafts

○安田　智一[1]，山口　敏幸[2]，土川　博史[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）

P73 固体NMR法を用いた生理的環境での膜蛋白質 *p*HtrII の構造解析
Solid-state NMR structural analysis of transmembrane halobacterial transducer *p*HtrII under physiological environment

○江川　文子[1]，池田　恵介[1,2]，Lili Mao[3]，林　こころ[4]，児嶋　長次郎[1]，井上　正順[3]，藤原　敏道[1]（[1]大阪大学蛋白質研究所，[2]富山大学大学院医学薬学研究部，[3]ニュージャージー医科歯科大学，[4]奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科）

P74 Y1 生体分子の ^{1}H精密位置決定～超高速MAS ^{1}H固体NMRによる ^{1}H DQMAS測定とGIPAW化学シフト計算～
Determination of precise ^{1}H geometry in Biomolecules -^{1}H solid state NMR analysis by ^{1}H DQMAS under ultra high speed MAS and GIPAW chemical shift calculations.-

○矢澤　宏次[1]，鈴木　不律[2]，西山　裕介[3]，西村　勝之[4]，梶　弘典[2]，朝倉　哲郎[1,3]（[1]東京農工大学大学院工学府，[2]京都大学化学研究所，[3]JEOL　RESONANCE，[4]分子科学研究所）

P75 固体NMRを用いたヌクレオソームおけるヒストンH2Aの構造解析
Structural analysis of histone H2A in nucleosome using by solid-state NMR

○戸所　泰人[1]，森脇　義仁[1]，長土居　有隆[1]，立和名　博昭[2]，胡桃坂　仁志[2]，西村　善文[1]（[1]横浜市立大学大学院生命ナノシステム科学研究科，[2]早稲田大学理工学術院）

P76 Y1 In-situ光照射固体NMRによるバクテリオロドプシン光中間体の捕捉
Trapping of photo-intermediates in bacteriorhodopsin as studied by in-situ photo-irradiated solid-state NMR

○宮佐　亮太[1]，川村　出[1]，辻　暁[2]，内藤　晶[1]（[1]横浜国立大学大学院 工学府，[2]兵庫県立大学大学院 生命理学研究科）

P77 固体NMRにおけるタンパク質連鎖帰属へのGFT NMR法の応用
Application of GFT-NMR for sequential assignment of proteins in solid state

○田巻　初[1]，江川　文子[2]，神谷　昌克[1]，菊川　峰志[1]，相沢　智康[1]，河野　敬一[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）

P78 Pradimicin Aとマンノースとの結合様式の固体NMRによる精密解析
Solid-State NMR Analysis of the Binding Mode of Pradimicin A with Mannose

○土井　崇嗣[1]，中川　優[2]，伊藤　幸成[2,3]，五十嵐　康弘[4]，竹腰　清乃理[1]（[1]京都大学大学院理学研究科，[2]理化学研究所 基幹研究所，[3]JST ERATO，[4]富山県立大学 生物工学科）

P79 固体NMRを用いた温度および圧力に対するバクテリオロドプシンの構造変化の解析
Temperature and pressure induced structural changes in Bacteriorhodopsin as studied by solid-state NMR

○川村　出[1]，堀籠　美也子[1]，西川　大英[1]，田島　可奈[1]，沖津　貴志[2]，和田　昭盛[2]，辻　暁[3]，岩佐　達郎[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]兵庫県立大学，[4]室蘭工科大学）

P80 Y2 固体NMRを用いたインドメタシン－ニコチンアミド共結晶における分子間水素結合の同定
Identifying the mode of intermolecular hydrogen-bonding in an indomethacin-nicotinamide cocrystal by multinuclear solid-state NMR spectroscopy

○丸吉　京介[1], Dinu Iuga[2], Oleg N. Antzutkin[2,3], Sitaram P. Velaga[4], Steven P. Brown[2]（[1]第一三共株式会社 分析評価研究所，[2]ウォーリック大学 物理学科，[3]ルーレオ工科大学 化学科，[4]ルーレオ工科大学 保健科学科）

P81 Cryocoil MAS プローブによる固体有機物の^{33}S NMR 測定にむけて
Toward ^{33}S MAS NMR of organic materials by using a cryocoil MAS probe

○松尾　真嗣[1]，水野　敬[2]，野田　泰斗[1]，増田　裕一[3]，竹腰　清乃理[1]（[1]京都大学大学院理学研究科，[2]株式会社 JEOL RESONANCE，[3]東北大学大学院薬学研究科）

P82 Y2 非晶化セルロースのCP/MAS ^{13}C NMR解析
CP/MAS ^{13}C NMR analysis of non-crystallized cellulose

○高橋　塁[1]，田中　篤史[1]，五十嵐　一暁[2]，堀井　文敬[3]（[1]花王（株）解析科学研究所，[2]花王（株）エコイノベーション研究所，[3]福井大・遠赤外領域開発研究センター）

P83 MQMAS法による高分子-Al錯体の研究
MQMAS NMR studies on polymer complexes with Al ion

○平沖　敏文，藤江　正樹（北海道大学大学院工学研究院）

P84 Y2 固体NMRによるセメント硬化体の化学構造および水和・硬化プロセスの解析
Analysis of Chemical Structure, and Hydrating and Hardening Process of Cement Paste Using Solid State NMR

○高橋　貴文[1]，古瀬　佑馬[2]，大窪　貴洋[2]，金橋　康二[1]（[1]新日鐵住金（株）先端技術研究所，[2]千葉大学大学院 工学研究科）

P85 魚類資源の多様性比較代謝プロファイリングに向けた条件検討
Examining of comparative metabolic profiling of diversed fish resources for effective utilization

○星野　玲緒奈[1]，葭田　征司[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ナノシステム科学研究科，[2]理化学研究所 植物科学研究センター，[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）

P86 Y2 固体NMRによるゴム材料の構造解析
Solid-state NMR structural study of rubber materials

○宇川　仁太，清水　敏喜，酒井　秀之（東洋ゴム工業株式会社）

P87 常磁性ポリ酸の固体^{95}Mo NMR
Solid-State ^{95}Mo NMR of a Paramagnetic Polyoxomolybdate

○飯島　隆広[1]，山瀬　利博[2,3]，丹所　正孝[4]，清水　禎[4]，西村　勝之[1]（[1]分子科学研究所，[2]東京工業大学，[3]MOデバイス，[4]物質・材料研究機構）

P88 Y2 マイクロプローブ固体NMRによるLED部材の劣化分析
Degradation Analysis of LED package by solid-state NMR using micro probe

○三好　理子，石田　宏之，三輪　優子（(株) 東レリサーチセンター）

P89 システインに保護されたマジックサイズCdSeクラスターの多核固体NMR
Multinuclear Solid State NMR of Cysteine Capped Magic-Sized CdSe Clusters

○澤上　勲[1]，野田　泰斗[1,2]，武田　和行[1]，竹腰　清乃理[1]（[1]京都大学大学院 理学研究科 化学専攻，[2]JST・先端）

P90 Y2 ^{27}Al, ^{17}O MQMAS NMR法を用いたUSYゼオライトの局所構造解析
Local structural characterization of am-monium-treated USY zeolite using ^{27}Al and ^{17}O MQMAS NMR

○上口　憲陽[1]，真田　貴志[1,2]，芦田　淳[3]，奥村　和[2]（[1]株式会社日産アーク，[2]鳥取大学，[3]アジレント・テクノロジー株式会社）

P91 同種核REDOR NMR法による層状複合材料中のゲスト分子包摂状態の研究
Homonuclear REDOR NMR study of the local arrangement of the guest molecules in layered nanocomposites

○櫻木　隆広[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）

P92 Y1 ゴム素材の静止状態固体^{13}C NMR化学シフトと磁化率
Strain Induced Static State ^{13}C NMR Chemical Shift and Magnetic Susceptibility of Rubbers

○北村　成史[1]，浅野　敦志[1]，畑　慶明[2]，安岡　宏[2]，黒津　卓三[1]（[1]防衛大学校応用化学，[2]防衛大学校応用物理）

P93 高圧水素シール用ゴム材料の水素膨潤挙動の解明
Study of volume expansion in rubber for high pressure hydrogen sealing in terms of dissolved hydrogen

○藤原　広匡[1]，西村　伸[2]（[1]産業技術総合研究所 水素材料先端科学研究センター，[2]九州大学大学院工学研究院機械工学部門）

P94 Y1 ^{2}H, ^{27}Al NMRによるアルギン酸ゲルのダイナミクス解析
Dynamics of alginate gels as studied by ^{2}H, ^{27}Al NMR

○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）

P95 アミノ基を持つ高分子における二酸化炭素によるゲルの生成
Characterization of gels from polymers which have amino group as a side chain and carbon dioxide as gellant

高木　健[1]，小林　未奈[1]，○前田　史郎[1]，国本　浩喜[2]（[1]福井大学大学院工学研究科，[2]金沢大学大学院自然科学研究科）

P96 Y1 多摂動二次元相関分光法
Multiple-perturbation Two-dimensional Correlation Spectroscopy

○新澤　英之，西田　雅一，兼松　渉（産業技術総合研究所 計測フロンティア研究部門）

P97 トリメチルホスフィンオキシドを用いた固体表面の酸性質観測
Acid Properties of Solid Surfaces Probed by Trimethylphosphine Oxide
○林　繁信，治村　圭子，小島　奈津子（産業技術総合研究所 計測フロンティア研究部門）

P98 固体NMRによる木質系材料の水蒸気処理過程の解析
Solid State NMR Study of Stream Treatments of Woody Materials
○西田　雅一[1]，田中　智子[1]，兼松　渉[1]，三木　恒久[1]，金山　公三[1]，伊藤　貴文[2]（[1]産業技術総合研究所，[2]奈良県森林技術センター）

P99 ポリ乳酸系繊維の製造過程と劣化過程の解析評価
Instrumental Analyses of Manufacturing and Degradation Processes of Polylactic Acid Fibers
○西田　雅一，新澤　英之，田中　智子，兼松　渉（産総研計測フロンティア（中部））

P100 Y1 固体NMRによるコハク酸水素イミダゾリウムのプロトン伝導メカニズムの研究
Mechanism of Proton Conduction of imidazolium succinate using Solid-State NMR
○海山　剛史，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）

P101 Y-89 MAS NMRによる欠陥蛍石型酸化物 CeO_2-$YO_{1.5}$ の局所構造解析
Local structure analysis of defect-fluorite oxide CeO_2-$YO_{1.5}$ by Y-89 NMR
○安東　真理子[1]，及川　格[1]，前川　英己[1]，中村　彰夫[2]，高橋　正[3]（[1]東北大学大学院 工学研究科，[2]日本原子力研究開発機構，[3]東邦大学理学部）

P102 Y1 逆蛍石型リチウム二次電池正極材料の局所構造解析
Local Structure around Lithium Ions in Anti-Fluorite Type Positive Electrode for Lithium Ion Battery
○奥村　豊旗，山口　洋一，鹿野　昌弘，小林　弘典（産業技術総合研究所）

P103 固体NMRにおける BEt_3Me 塩を用いた柔粘性結晶の物性研究
Solid-State NMR Studies on Physical Property of New Plastic-Crystals Containing BEt_3Me Anions
○平川　悟[1]，本多　尚[1,2]，早崎　智之[2]（[1]横浜市立大学 国際総合科学部，[2]横浜市立大学大学院 生命ナノシステム科学研究科）

P104 水分子プローブを用いた表面処理カーボンブラックの固体NMRによる検討
Investigation of surface-treated carbon blacks using a water molecule probe by solid-state NMR
秦　弘一郎[1]，○出田　圭子[2]，大畠　雄三[1]，宮脇　仁[1,2]，戸田　繁美[3]，原田　竜介[3]，持田　勲[4]，尹　聖昊[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]九州大学炭素資源国際教育研究センター）

P105 多孔性金属錯体の細孔内におけるイオン伝導の拡散NMR法による評価
Diffusion NMR study on fast ion conducting coordination polymer
○犬飼　宗弘[1]，上坪　祐介[2]，堀毛　悟史[2,3]，福島　知宏[2]，北川　進[1,2]（[1]京都大学 物質－細胞統合システム拠点，[2]京都大学大学院工学研究科，[3]JST-さきがけ）

P106 リチウムイオン電池正極材・電解質溶液間の反応についての考察
Study of Degradation of Lithium-ion Battery Cathode Material in Electrolyte Solution
○清水　俊介[1]，村上　美和[2]，竹腰　清乃理[1]（[1]京都大学大学院理学研究科，[2]京都大学産官学連携本部）

P107 In situ NMR測定による $LiCoO_2$ 正極セルのリチウム挙動のその場観察
In situ NMR observation of the lithium extraction/insertion from $LiCoO_2$ cathode
○下田　景士[1]，村上　美和[1]，高松　大郊[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]日立製作所，[3]京都大学 総合人間学部　人間・環境学研究科）

P108 ポリ4-メチル-1-ペンテンの結晶相における気体輸送特性のNMRによる評価
Gas Transport Properties of Crystalline Phase of Poly (4-methyl-1-pentene) by NMR
○島崎　彩奈，吉水　広明（名古屋工業大学大学院工学研究科）

P109 3種類のメタクリルポリマーにおける局所分子運動性評価
A study on local molecular mobilities of three methacrylate polymers
○萬濃　香穂，吉水　広明（名古屋工業大学大学院工学研究科）

P110 Y1 MRIを用いた高温超伝導バルク磁石着磁過程の評価
Evaluation of the magnetization process in the high Tc bulk superconducting magnet using the MRI
○玉田　大輝[1,2]，仲村　高志[1,2]，巨瀬　勝美[1]（[1]筑波大学大学院 数理物質科学研究科 電子・物理工学，[2]独立行政法人理化学研究所）

P111 MRIを用いた湖沼底泥サンプルの撮像条件の検討
Visualizing 3D internal structure of lake sediments by MRI
○高屋　展宏，渡邉　英宏，高津　文人，今井　章雄，小松　一弘，佐藤　貴之（国立環境研究所）

P112 Y1 地磁気MRIにおける送受信共振回路の不感時間低減による高感度化
Sensitivity enhancement of Earth's field MRI by reducing dead time of resonant circuit
○山根　知明，赤羽　英夫，糸﨑　秀夫（大阪大学大学院 基礎工学研究科）

P113 安定同位体標識技術を用いた土壌微生物叢の代謝動態の評価
Evaluating metabolic activity of soil microbiota by monitoring stable-isotopes from plants
○小倉　立己[1,2]，伊達　康博[1,2]，坪井　裕理[2]，菊地　淳[1,2,3,4]（[1]横浜市立大学大学院 生命ナノシステム科学研究科，[2]理化学研究所 植物科学センター，[3]名古屋大学大学院 生命農学研究科，[4]理化学研究所 バイオマス工学研究プログラム）

P114 ^{1}H-NMRメタボロミクスの医療応用－その6－
透析治療廃液スペクトルの統計的パターン認識
Clinical Application of ^{1}H NMR Metabolomics-Part VI
Statistical Pattern Recognition of Dialysate Spectra in Hemodialysis
○新川　隆朗[1]，安藤　一郎[1]，高橋　征三[1]，今井　潤[1]，竹内　和久[1,2]，藤原　正子[1]（[1]東北大学薬学部薬学研究科，[2]医療法人宏人会中央クリニック）

P115 異種計測データプロセッシングによる水圏植物バイオマス評価の試み
Evaluation of plant biomass from hydrosphere by data processing of various analytical measurements
○伊藤　研悟[1]，坂田　研二[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ナノシステム科学研究科，[2]（独）理化学研究所植物科学研究センター，[3]（独）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）

P116 深海底泥反応場を評価するための異種計測データマイニング
Data mining across heterogeneous measurements for evaluation of sediment ecosystems in the deep-sea area
○伊達　康博[1,2]，朝倉　大河[2]，坪井　裕理[1]，吉田　尊雄[3]，丸山　正[3]，菊地　淳[1,2,4,5]（[1]理化学研究所 植物科学研究センター，[2]横浜市立大学大学院 生命ナノシステム科学研究科，[3]JAMSTEC，[4]理化学研究所 バイオマス工学研究プログラム，[5]名古屋大学大学院生命農学研究科）

P117 ^{1}H-NMR メタボロミクスの医療応用 その5 血清脂質の共通因子法によるスペクトル分解
Clinical Application of ^{1}H-NMR Metabolomics: Part V Spectral Separation of Saline Lipids by GRAM
○高橋　征三[1]，安藤　一郎[1]，今井　潤[1]，竹内　和久[1,2]，藤原　正子[1]（[1]東北大学 薬学研究科，[2]宏人会 中央クリニック）

P118 Sf9細胞のin-cell NMRにおける測定条件の最適化
Evaluation of parameters for observing proteins inside living Sf9 cells by in-cell NMR spectroscopy

○田中　孝，浜津　順平，清和　恵美子，池谷　鉄兵，三島　正規，伊藤　隆（首都大学東京大学院 理工学研究科 分子物質化学専攻）

P119 Nonlinear Samplingデータに対する複数の信号再構成法の包括的な比較
A comprehensive comparison of multiple methods of signal reconstruction for NMR data nonlinear sampled

○山本　晃広[1]，池谷　鉄兵[1]，角越　和也[2]，三島　正規[1]，伊藤　隆[1]（[1]首都大学東京大学院 理工学研究科，[2]東京大学大学院 農学生命科学研究科）

P120 Y1 ラジオ波帯NQR用直方体型コイルの内部磁場均一化
NQR using homogeneous magnetic field of Rectangular Cross-section RF coils

○桂　祥太[1]，Jamie Barras[2]，赤羽　英夫[1]，糸﨑　秀夫[1]（[1]大阪大学大学院 基礎工学研究科，[2]Department of Informatics, King's College London）

P121 二面角系分子動力学計算を用いたタンパク質立体構造決定における構造最適化計算法の開発
Development of NMR structure refinement by torsion angle molecular dynamics in protein structure determination

○嶋崎　真那人[1]，池谷　鉄兵[1]，三島　正規[1]，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）

P122 Y1 極推定法によるFID信号の強度推定
Intensity Estimation of FID signal by Pole Estimation Method

○中尾　朋喜[1]，末松　孝子[2]，堤　遊[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）

P123 化学シフトデータベースを利用した高精度なNMR構造評価システム
A highly accurate NMR structure validation system using the chemical shift database

○小林　直宏，児嶋　長次郎，藤原　敏道（大阪大学蛋白質研究所）

P124 Y2 部位特異的アミノ酸選択標識とタンパク質立体構造を活用した相互作用界面の同定
Determination of Protein-Protein Interaction Surface based on Specific Atom Type Labeling and 3D Structure of the Protein

○小玉　優哉[1,2,3]，Michael L. Reese[4]，榛葉　信久[1]，小野　克輝[2,3]，金森　英司[2,3,5]，Volker Dötsch[6]，福西　快文[2]，鈴木　榮一郎[1]，高橋　栄夫[2,7]（[1]味の素（株），[2]産総研・BIRC，[3]バイオ産業情報化コンソーシアム，[4]Stanford University，[5]日立ソフトウェアエンジニアリング（株），[6]University of Frankfurt，[7]横市大・院生命ナノシステム）

P125 X_0シムコイルの開発とMAS角度の超微細操作
Improvement of X_0 Shim Coil for Precise Adjustment of the Magic Angle

○松永　達弥[1]，水野　敬[2]，竹腰　清乃理[1]（[1]京都大学大学院理学研究科化学専攻，[2]（株）JEOL Resonance）

P126 Y2 クライオNMRを用いたポリオレフィンの末端二重結合定量法
Quantitation of Unsaturation in Polyolefins by NMR with a High Temperature Cryoprobe

○茂呂　ふみか，佐藤　浩子，恩田　光彦（株式会社 三井化学分析センター 構造解析研究部）

P127 1.03 GHz NMR用三重共鳴溶液プローブの開発
－超1 GHz NMRを可能にするRFコイル形状－
Development of triple resonance solution probes for 1.03 GHz NMR
- Design study of next generation RF coils over 1 GHz-

○高橋　雅人[1,2]，秋山　弘成[2]，高杉　憲司[3]，長谷　隆司[4]，柳澤　吉紀[5]，中込　秀樹[5]，大嶋　重利[6]，木吉　司[7]，山崎　俊夫[1]，前田　秀明[1,2]（[1]理化学研究所 生命分子システム基盤研究領域，[2]横浜市立大学大学院 生命ナノシステム科学研究科，[3]JEOL RESONANCE，[4]神戸製鋼所，[5]千葉大学大学院 工学研究科，[6]山形大学大学院 理工学研究科，[7]物質・材料研究機構 環境・エネルギー材料部門）

P128 Y2 半導体レジスト用モデルポリマーの脱保護による分子運動性変化
Changes in the molecular mobility of model polymers for chemically amplified resist during de-protection reaction

○相見　敬太郎[1]，鈴木　真由美[1]，西山　文之[2]，西川　尚之[3]（富士フイルム株式会社 R&D統括本部[1]解析技術センター，[2]エレクトロマテリアルズ研究所，[3]有機合成化学研究所）

P129 定量分析におけるNMR装置に起因する測定不確かさの考察
Consideration of measurement uncertainty originating from NMR instrument in quantitative analysis

○齋藤　剛，斎藤　直樹，山崎　太一，大手　洋子，村上　雅代，井原　俊英（産業技術総合研究所 計測標準研究部門）

P130 Y1 NMRを用いた定量的元素分析
Quantitative elemental analysis by NMR

○一条　直規，武田　和行，野田　泰斗，竹腰　清乃理（京都大学大学院 理学研究科 化学専攻）

P131 Cryocoil MAS 二重共鳴プローブの開発
Development of a ^{1}H-^{13}C double-tuned Cryocoil MAS probe

○水野　敬[1]，戸田　充[1]，野田　泰斗[2]，竹腰　清乃理[2]，藤岡　耕治[3]（[1]（株）JEOL RESONANCE，[2]京都大学大学院 理学研究科 化学専攻，[3]（株）クライオウェア）

P132 Y1 高温超伝導薄膜のRFコイルを用いた5 mm NMR低温プローブの開発
－高温超伝導薄膜の磁化による磁場均一性への影響－
Towards an Ultra High Sensitivity 5mm-Cryogenic NMR Probe with high temperature superconducting (HTS) RF Coils-Effect of Diamagnetic Magnetization of the HTS thin film-

○金丸　朗[1]，古島　諒[1]，田中　佑斗[2]，大嶋　重利[2]，辻　成悟[3]，田中　良二[3]，末松　浩人[3]，高橋　雅人[1,4]，前田　秀明[1,4]（[1]横浜市立大学大学院 生命ナノシステム科学研究科，[2]山形大学大学院 理工学研究科，[3]株式会社JEOL RESONANCE，[4]理化学研究所SSBC）

P133 水圏植物バイオマスの多様性を評価するための異種データ統合解析
Integrated analysis based on heterogeneous measurements to evaluate diversity of the seaweed biomass

○坂田　研二[1]，伊藤　研悟[2]，伊達　康博[1,2]，菊地　淳[1,2,3,4]（[1]理科学研究所PSC，[2]理化学研究所BMEP，[3]横浜市立学大学院生命ナノシステム科学研究科，[4]名古屋大学大学院生命農学研究科）

P134 Y1 マンガン造影 MRI による脳下垂体の活性化とホルモン分泌の研究
Study of pituitary cell activation and hormone secretion utilizing manganese-enhanced magnetic resonance imaging (MEMRI)

○平金　真[1]，國領　大介[2]，寺沢　宏明[1]，青木　伊知男[2]（[1]熊本大学大学院生薬学教育部 構造生命イメージング分野，[2]放射線医学総合研究所 分子イメージング研究センター）

P135 **底質試料プロファイリング技術構築と水圏環境評価の試み**
Metabolic profiling technique for the detritus analysis toward the evaluation of hydrosphere environment

○朝倉　大河[1]，葭田　征司[1]，伊達　康博[1,2]，菊地　淳[1,2,3,4]（[1]横浜市立大学大学院 生命ナノシステム科学研究科，[2]理化学研究所PSC，[3]理化学研究所BMEP，[4]名古屋大学大学院 生命農学研究科）

P136 Y1 **マンガン造影 MRI 法による中枢神経障害モデルにおける炎症反応の検出**
In vivo detection of neuroinflammation using manganese-enhanced MRI in CNS disorder model rats

○岩本　成人[1]，寺沢　宏明[1]，青木　伊知男[2]（[1]熊本大学大学院薬学教育部 構造生命イメージング分野，[2]放射線医学総合研究所 分子イメージング研究センター）

第一日目
11月8日（木）
日本語セッション
英語セッション
パラレルセッション

Day 1 (Nov. 8, Thu)
(Japanese Session)
(English Session)
(Parallel sessions)

L1

脂質膜中におけるアンフォテリシンBーエルゴステロール分子間相互作の固体NMR解析

○梅川雄一, 中川泰男, 土川博史, 松森信明, 村田道雄
阪大院理

Bimolecular Interaction Analysis between Amphotericin B and Ergosterol in Lipid Membrane as Viewed by Solid-State NMR

○Yuichi Umegawa, Yasuo Nakagawa, Hiroshi Tsuchikawa, Nobuaki, Matsumori, and Michio Murata
[2]Department of Chemistry, Graduate School of Science, Osaka University,Osaka, Japan.

Amphotericin B (AmB, **1**) is thought to exert its antifungal activity by forming an ion-channel assembly in the presence of ergosterol. To elucidate the AmB-ergosterol interaction manner and intermolecular distance, REDOR measurements were performed using ^{19}F-AmBs (**2**, **3**) and ^{13}C-ergosterol (**4**). The results unambiguously demonstrated that the presence of not only "parallel" but also "anti-parallel" interaction between AmB and ergosterol. Especially, the latter interaction is a new finding. Furthermore, we successfully calculated intermolecular distances for both the orientations. Based on these results, we will discuss about a model of AmB ion-channel complex.

アンフォテリシンB (**1**) (AmB, Fig.1) は放線菌 *Streptomyces nodosus* が生産するポリエンマクロライド化合物であり、抗真菌薬として広く用いられている。その活性発現機構は真菌の脂質二重膜中でエルゴステロールと共に形成されるイオン透過性チャネル複合体に起因するとされている。我々はこの複合体の構造を詳細に解析するため、固体NMRによるアプローチを試みてきた。これまでに固体^{2}H NMR測定から、AmBがステロール構造の違いを認識し、エルゴステロール選択的に複合体を形成することが示された。更に、AmBとエルゴステロールの相互作用様式には"平行型"と"反平行型"の二種類が存在することが分子間REDOR測定により示唆され、第48回の本討論会において報告した[1]。

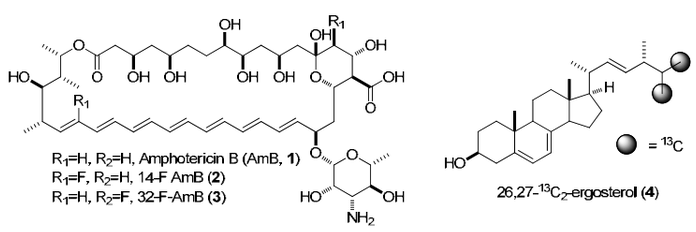


Fig. 1 Structure of AmB, ^{19}F-AmBs and ergosterol

そこで、今回この二分子間の相互作用をより詳細に解析するべく、位置選択的に^{19}Fまたは^{13}Cを導入した標識体(Fig.1)を調製し、REDOR測定による距離情報の取得を試みた。即ち、32-F AmB(**3**)と26,27-$^{13}C_2$-エルゴステロール(**4**)の相互作用からは平行型配向が、14-F AmB(**2**)と**4**の相互作用からは反平行型配向の情報が得られると考えた。

Amphotericin B, Ion-channel complex, REDOR

○うめがわゆういち, なかがわやすお, つちかわひろし, まつもりのぶあき, むらたみちお

各標識体は化学合成により調製し、^{19}F標識体については非標識のものと同程度の生理活性を保持していることを確認した。REDOR測定に先立ち、リン脂質膜中での^{13}C-エルゴステロールのCP-MAS測定を行うと、AmBの濃度依存的に^{13}C化学シフトが変化し、広幅化した。これらは、膜中でAmBとエルゴステロールの複合体が形成され、エルゴステロールの置かれている化学的環境と運動性が変化したことを示す結果と言える。

次にREDOR測定のため、^{19}F-AmBと^{13}C-エルゴステロールを不飽和リン脂質であるPOPCに1/1/9の比になるように混合し、50 wt %になるよう水和したサンプルを調製した。

^{13}C{^{19}F}REDOR測定の結果、^{19}F標識体に32-F AmB(**3**)(Fig. 2a)、14-F AmB(**2**)(Fig. 2b)のどちらを用いた場合でも26, 27-$^{13}C_2$-エルゴステロール(**4**)の標識部位に顕著なREDOR減衰が確認された。この結果によりAmBとエルゴステロールの配向には平行型と反平行型の2種類が存在することを実験的に明かにした。特に、反平行型の相互作用様式はこれまで想定されておらず新たな知見であった[2]。この反平行型配向はPOPCと26, 27-$^{13}C_2$-エルゴステロール(**4**)の分子間^{13}C{^{31}P}REDOR測定からも間接的に裏付けられた。またこれらのREDOR減衰は全て38℃での測定において観測されたことから、AmBーエルゴステロールーリン脂質の三者複合体が生理的環境下においても長寿命で存在することが推測される。更に、得られたREDOR減衰曲線からこれら二つの配向の存在比を計算したところ、平行型と反平行型は約2:1の割合で存在することが示唆された。また、原子間距離の算出も行っており、複合体のモデル構造と合わせて議論する予定である。

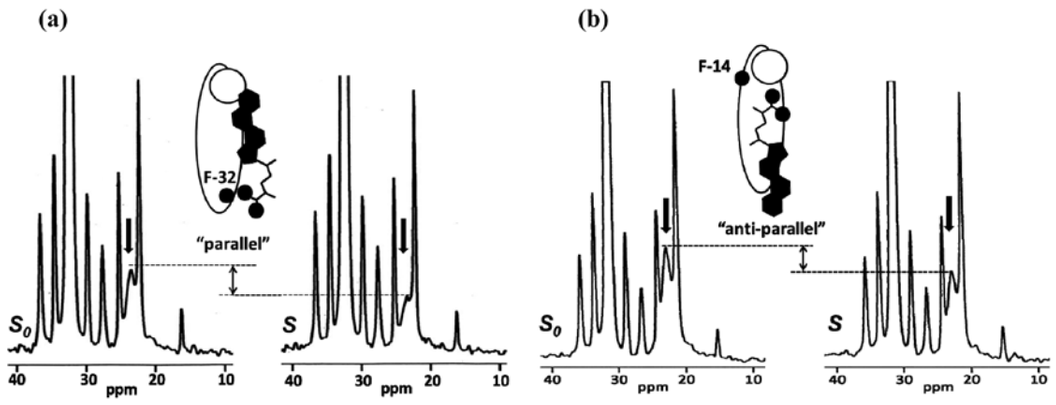


Fig. 2 ^{13}C{^{19}F}REDOR spectra of ^{19}F-AmB/^{13}C-ergosterol/POPC.
(a) 32-F AmB/26, 27-$^{13}C_2$-ergosterol/POPC = 1/1/9; dephasing time: 9.6 ms.
(b) 14-F AmB/26, 27-$^{13}C_2$-ergosterol/POPC = 1/1/9; dephasing time: 12.8 ms.

Reference
1) 第48回NMR討論会要旨集 p 90, 福岡, **2009**
2) Umegawa, Y., Nakagawa, Y., Tahara, K., Tsuchikawa, H., Matsumori, N., Oishi, T., Murata, M. *Biochemistry* **2012**, *51*, 83−89.

L2

絹の多様な^{13}Cラベル化と固体NMRによるβシート構造の解析

○奥下慶子[1]、小川達也[1]、鈴木悠[1]、宮澤健太[1]、中澤靖元[1]、
朝倉哲郎[1,2]
[1]農工大院・工、[2]分子研

Structural analysis of silks with β-sheet structure by combination of several ^{13}C labeling and solid-state NMR

○Keiko Okushita[1], Tatsuya Ogawa[1], Yu Suzuki[1], Kenta Miyazawa[1], Yasumoto Nakazawa[1], and Tetsuo Asakura[1,2]
[1] Department of Biotechnology, Graduate School of Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology, Tokyo, Japan.
[2] Institute for Molecular Science, Aichi, Japan.

In order to determine the inter-molecular structure of *Bombyx mori* silk fibroin, several solid state NMR can be used. In this study, DARR was used for the purpose. The relationship of the detection of the correlation peak intensity and atomic distance was justified with U-^{13}C labeled anti-parallel β-sheet alanine tetramer. The DARR spectrum of [U-^{13}C] *B. mori* silk fibroin was observed and analyzed on the basis of the justified parameter to obtain the information on the inter-molecular structure.

［緒言］　家蚕(*B. mori*)絹の結晶形態は2種類あり、繊維化前の固体構造はSilk I、繊維化後の構造はSilk IIと区別される。Silk I構造の決定は困難であったが、その理由は、精度の高い構造情報を得ようとして、結晶化や配向を試みると容易にSilk II型構造に変化してしまうためであった。朝倉ら[1]は、結晶とならなくても原子レベルでの構造解析が可能な各種固体NMR法を用いて、初めて、Silk Iの構造を決定することができた。一方、Silk II構造に関しては、Marsh, Paulingら[2]によってanti-parallel β-sheet構造が提唱され、生化学の教科書にも引用されてきた。その後、さらに精密な構造決定を目指して多くの研究がなされてきた[3]が、もともと不均一な繊維構造である[4]こともあって、構造決定は進んでいない。
本研究では、^{13}Cラベル化の異なる家蚕絹について多数の原子間距離情報が得られるDARR法を用いて解析し、家蚕絹の構造、特に分子間構造を決定することを目的とした。
［実験］　試料は、固相合成によって当研究室で既に作製された構造既知の[U-^{13}C] anti-parallel β-sheet alanine tetramer (AP-β-Ala$_4$)ならびに5齢期蚕に[U-^{13}C] Glucose、[1-^{13}C] Glucose、[2-^{13}C] Glucose、[1-^{13}C]Alanine、[3-^{13}C]Alanine、[1-^{13}C]Glycine、[2-^{13}C]Glycineを与えて飼育することによって各種^{13}Cラベル繭を得、精練によって絹セリシンを取り除いたSilk II型家蚕絹フィブロインである。^{13}C-^{13}C DARR測定は、Bruker Avance 400 NMR装置を用い、MAS = 9 kHz、リカップリングのための^{1}H照射パワー1×ω_r の条件下で行った。

［結果・考察］
1. DARR測定による^{13}Cラベルモデルペプチドの^{13}C核間原子間距離解析条件の検証
　DARR測定による原子間距離の算出のためのリファレンス試料として、X線構造解析により原子の座標が決定されているAP-β-Ala$_4$のU-^{13}C標識化合物のDARR測定を行った。

スピン交換速度kは原子間距離rに関わる双極子カップリング定数の2乗と比例関係にある。したがって、Mixing timeの異なるDARRスペクトルの相関ピーク強度変化から交換速度kを求め、X線構造における最短炭素間距離r_{XRD}の6乗分の1(r_{XRD}^{-6})との比例定数を求めた。次にU-^{13}Cラベル化された家蚕絹フィブロインに本手法を適用した。

2. DARR測定によるSilk II型家蚕絹フィブロインの構造解析
　家蚕絹の結晶領域配列のモデルとしては(Ala-Gly-Ser-Gly-Ala-Gly)$_n$という配列で示すことができ、家蚕絹フィブロインの^{13}C CP/MASスペクトルはFigure 1 (a)のように帰属される。U-^{13}Cラベル化された家蚕絹フィブロインのDARRスペクトルにおいて、mixing time= 300 msまでモデル中の全炭素間の組み合わせに対応する交差ピークが観測された。1で求めた比例定数を用いて、ピーク強度の変化から各炭素間の最短距離が計算された。DARRによる観測距離の多くは、過去に提唱された構造モデル[2,3]における分子内炭素間距離に近い値を示していたが、一部の観測距離についてはシート内またはシート間といった分子間構造に対応する炭素間距離に近い値を示していた。今後、さらに^{13}Cラベル部位を変えた家蚕絹フィブロインを作製、DARR測定を含む各種^{13}C固体NMRを測定し合わせて分子間構造の解明を進めている。

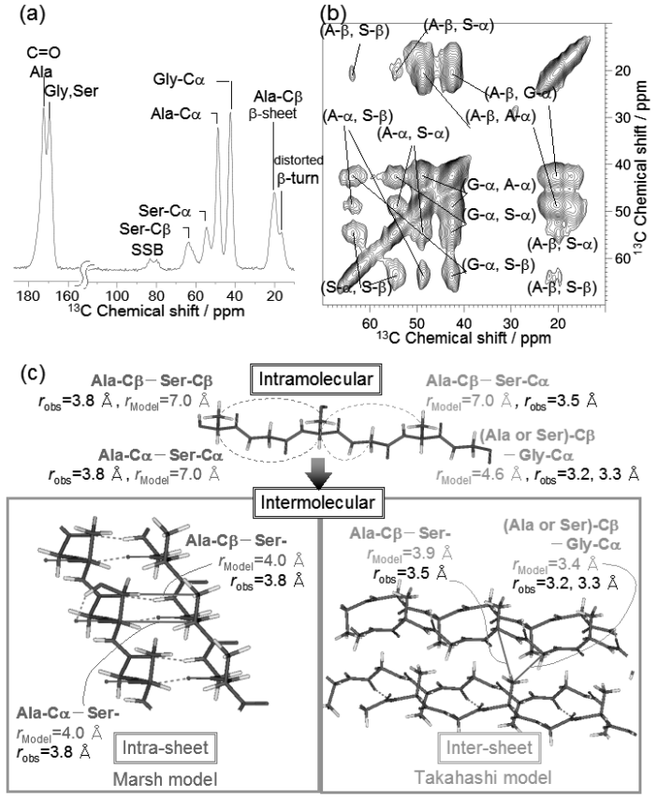


Fig 1. (a) ^{13}C CP/MAS spectrum and (b) DARR spectrum of [U-^{13}C] *B. mori* silk fibroin (MAS = 9 kHz). (c) Comparison of observed C-C distances with the previous models.

［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平成23年度科学研究費補助金基盤研究Ａ（課題番号23245045）により実施された。

［参考文献］
[1] Asakura T.; Ashida J.; Yamane T.; Kameda T.;Nakazawa Y.; Ohgo K. *J Mol Biol*. **2001**, 306, 291-305.
[2] Marsh, R.; Corey, R. B.; Pauling, L. *Biochim. Biophys. Acta* **1955**, 16, 1-34.
[3] Takahashi, Y.; Gehoh, M.; Yuzuriha, K. *Int. J. Biol. Macromol.* **1999**, 24, 127–138
[4] Asakura, T.; Yao, J.; Yamane, T.; Uemura, K.; Ulrich, A. *J. Am. Chem. Soc*. **2002**, 124, 8794-8795

Silk, β-sheet, ^{13}C labeling
○おくしたけいこ, おがわたつや、すずきゆう、みやざわけんた、なかざわやすもと、あさくらてつお

L3 ベイズ法を利用した新規構造計算手法の開発

○池谷 鉄兵[1], 嶋崎真那人[1], 三島正規[1], 伊藤隆[1],
Peter Güntert[1,2,3]
[1] 首都大学東京・理工学研究科, [2] フランクフルトゲーテ大学・生物物理化学科, [3] フランクフルトゲーテ大学・先端研究所

Development of the Bayesian-based structure determination

○Teppei Ikeya[1], Manato Shimazaki[1], Masaki Mishima[1], Yutaka Ito[1], Peter Güntert[1,2,3]
[1] Graduate School of Science, Tokyo Metropolitan University, Tokyo
[2] Institute of Biophysical Chemistry, Goethe-University Frankfurt, Frankfurt am Main, Germany
[3] Frankfurt Institute of Advanced Studies, Goethe-University Frankfurt, Frankfurt am Main, Germany

NMR protein structure determination is an ill-posed inverse problem that essentially requires some prior information. One of the main prior is physical energy potential, in which the structure of a protein is determined by minimizing a target function combined with the mean square error between predicted and observed data. A problem of the NMR structure determination is that one arbitrary has to determine the weight factor that balances between its two terms. It is practically not trivial because the weight depends on a model and the quality and amount of data. Additionally, there is an another difficulty that one also has to find out the calibration factor that converts the observed data into atomic coordinates. To overcome these problems and obtain accurate structures objectively, Nilges, et.al proposed a new structure determination algorithm called as Inferential Structure Determination (ISD) based on the Bayesian theorem. We show a new implementation of the Bayesian based-structure calculation in the program CYANA and its feasibility for protein structure refinement.

【イントロダクション】

NMRの立体構造決定は，不良設定な逆問題を解かなければならず，何らかの事前情報を必要とする．一般的な立体構造計算では，事前情報としての正則化項にポテンシャルエネルギーを用いて，構造モデルと実験値の二乗誤差項とを組み合わせた目的関数を最小化する．しかしながら，正則化項と二乗誤差項のバランスをとる重み因子の決定には，一般解はなく，これまではユーザが任意に決定するか，ソフトウェアのデフォルト値を用いて計算する必要があった．加えて，NMRの実験値を距離，角度情報に変換する補正項の決定も，試料，測定法に大きく依存しており，任意に値を決めなければならなかった．

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，ベイズモデリング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得ることができる．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，データに合わせた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，従来のSimulated Annealing（SA）法による立体構造計算との比較，検討を行っている．ここではいくつかの蛋白質データに２つの方法を適用させ，新規手法の有用性について議論する．

Bayesian, structure refinement, CYANA

○いけやてっぺい，しまざきまなと，みしままさき，いとうゆたか，
ぺーたーぎゅんたーと

【方法】

CYANA ver 3.0 に,デカルト座標系分子動力学（MD）計算で広く用いられているAmberの物理ポテンシャルと一般化ボルン水モデルを新たに導入し，２面角空間での計算に最適化させた．エネルギー最適化計算には，limited Broyden–Fletcher–Goldfarb–Shann (L-BFGS) 準ニュートン法を用い，数値積分計算には，予測子・修正子法を採用した．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，σ 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，構造のサンプリングは，MDとMC法を組み合わせたハイブリッドMC法により行うことで，それぞれの事前確率分布を作成した．これら変数のサンプリングは，変数空間内での局所状態に落ち込むことを避けるために，レプリカ交換MC法による広域探索を行い，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．新規計算手法の評価のために，TTHA1718蛋白質について，ベイズ法とSA法でそれぞれ構造計算を行い，構造比較を行った．

【結果】

TTH1718蛋白質について，従来法とベイズ法による立体構造計算法を実行した（Fig. 1). 従来のSAによる構造計算では，任意に決められた計算する構造の個数に依存するため，そこから得られた構造間の平均二乗偏差(RMSD)は，正確な構造評価の指標とする事はできなかった．一方で，新規手法ではレプリカ交換 MC 法により，得られた実験データを満たす可能な変数空間を網羅的に探索することになるため，事後確率分布に基づいた構造を得ることができる．Fig.1 では，得られた事後確率分布の標準偏差内にある構造すべてを表示している．新規手法では，現在の実験値から求まる構造の可能性をより客観的に評価することができる．



Fig. 1 TTHA1718 structures obtained by the conventional simulated annealing (A) and the Bayesian-based structure calculation (B,C). While 20 bundle structures with the lowest energies computed by SA are imposed (A), all conformations within the standard deviation on the posterior by the Bayesian approach are shown (B,C).

TTHA1718の実験データは構造決定に十分なデータ量であったが，今後は，よりデータ数の少ない実験データやその他の蛋白質に対しても本手法を適用し，従来法との比較を行う予定である．

【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.

L4

固体NMR法を用いたバナナ型液晶分子の構造解析

○山田和彦[1], 姜聲敏[1], Eun Woo Lee[1], E-Joon Choi[2], 出口健三[3],
清水禎[3], 渡辺順次[1]
[1]東工大院理工
[2]Kumoh National University of Technology
[3]物材研

A Solid-state NMR Study of Banana Liquid Crystals

○Kazuhiko Yamada[1], Sungmin Kang[1], Eun Woo Lee[1], E-Joon Choi[2], Kenzo Deguchi[3], Tadashi Shimizu[3] and Junji Watanabe[1]
[1]Tokyo Institute of Technology, Tokyo, Japan.
[2]Kumoh National University of Technology, Gumi, Korea.
[3]National Institute for Materials Science, Ibaraki, Japan.

We will present experimental and theoretical investigations of the molecular properties for banana liquid crystals, obtained by multi-dimensional solid-state NMR. The banana-shaped or bent-core molecules have both academically and industrially attracted much attention due to the fact that chirality occurs in the smectic phases (so-called B-phases) by these achiral molecules and the associated ferroelectric properties are induced. So far, various schematic structures for the banana liquid crystals have been proposed on the basis of the results for X-ray diffraction. To the best of our knowledge, however, the atomic resolution structure and, if exist, molecular motions have not yet been understood completely. The present NMR measurements including ^{13}C CP-SUPER, SLF, Dipole-Dephase, DARR, EXSY, MAS-j-HMQC, INADEQUATE, HETCOR, ^{1}H wPMLG, NOESY, and DQMAS, combined with quantum chemical and molecular dynamics calculations, have provided unambiguous NMR parameters such as ^{13}C chemical shift tensors, which were used for construction of the three-dimensional structure with the molecular dynamics. Relationship between the macro physical properties in the smectic phases and the molecular structures will be discussed.

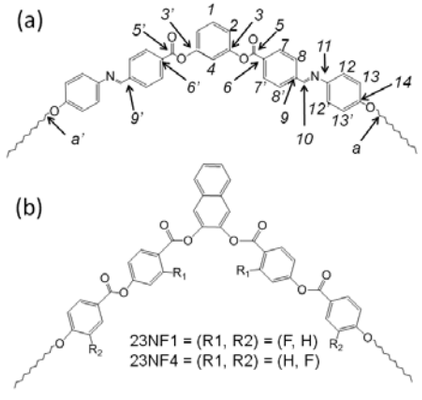


Fig. 1 Molecular structures of (a) P10-O-PIMB and (b) 23NF1 and 23NF4.

The molecular structures of liquid crystals used in the present work are illustrated in Fig. 1. P-10-O-PIMB is known as a classic banana-shaped molecule, while 23NF1 and 23NF4 were newly synthesized as a model of liquid crystals containing mesogen unit of naphthalene. Due to limitations of space, we focus on P-10-O-PIMB here. It has been reported that it exhibits two types of smectic phases, designated as B2 and B4. In the B2 phase, it is a smectic mesophase as its *n*-director is tilted to the layer normal while its bent direction remains parallel to the layer in addition to ferro- or antiferro-electric switching features. The structure and physical properties of the B2 phase have been well investigated and understood. In the B4 phase which is our interest, it doesn't show ferroelectric switching but its characteristic feature of the presence of transparency and visible blue color. Although a helical structure named as the "twisted gain boundary (TGB)" has been recently proposed for this phase, the detailed properties such as molecular structure remain uncertain.

Banana liquid crystal, molecular structure, solid-state NMR
○やまだかずひこ, かんそんみん, Eun Woo Lee, E-Joon Choi, でぐちけんぞう, しみずただし, わたなべじゅんじ

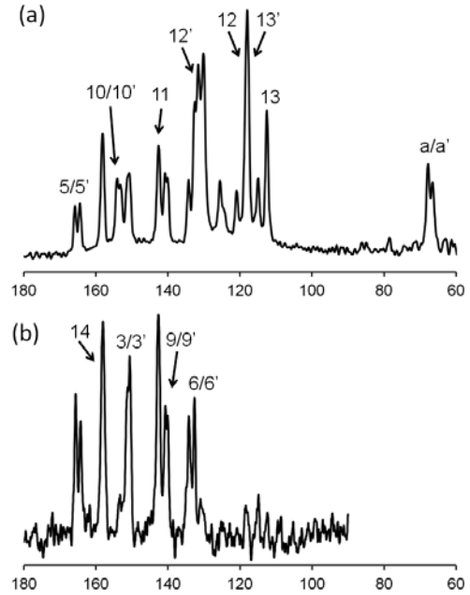


Fig. 2 (a) ^{13}C CPMAS and (b) dipole-dephase NMR spectra of P10-O-PIMB.

The ^{13}C CPMAS spectrum of P-10-O-PIMB in the B4 phase, observed at 14.1 T, is given in Fig. 2(a). Assignments of all the ^{13}C peaks, some of which are labeled in the figure, could be achieved by quantum chemical calculations, extrapolation of solution NMR, and conventional solid-state NMR techniques (*ex*., see Fig. 2(b)). It was observed that there were chemical exchanges among C7/7', C8/8', C12/12', and C13/13', indicating slow phenyl ring rotations in the arms of the bent-core structure (see Fig. 1). Moreover, doubled peaks for alkoxy (a), Schiff's base (10), aromatic (3,6,9), and carbonyl (5) carbon sites were found, suggesting that the molecule has asymmetric (twisted) structure, which we believe is a key element to form the TGB structure.

Fig. 3 shows the CSA powder patterns of C5/5' from the f_1 slices of the 2D SUPER spectrum in the B4 phase of P-10-O-PIMB for (a) 165.3 and (b) 164.2 ppm. The theoretical powder line shapes are also shown as dashed lines in the figure. It is well known that magnitudes and direction of the ^{13}C CSA tensors are strongly related to the local molecular structure such as torsion angles. Thus, by analyzing the obtained CSA tensors, we carried out to construct the three-dimensional molecular structure, followed by refinement with MD calculations. We believe that the present method which only requires non-labeled sample is useful for applications to material sciences where isotope enrichment is nearly impossible.

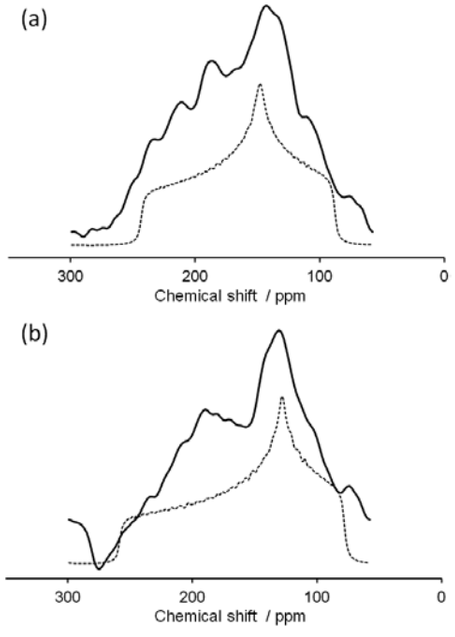


Fig. 3 ^{13}C NMR spectra of f_1 slices from the 2D SUPER spectrum for carbon sites 5/5' of (a) 165.3 and (b) 164.2 ppm.

L5

磁場配向性錯体の会合体を用いた残余磁気双極子相互作用の誘起

○武内 良介 [1],佐藤 宗太 [1],矢木 真穂 [3,4],山口 芳樹 [2],
加藤 晃一 [3,4,5],藤田 誠 [1,5]
[1]東大院工 [2]理研 [3]名市大院薬 [4]岡崎統合バイオ [5]CREST

Induction of Residual Dipolar Coupling by Aggregates of Magnetically Aligning Self-Assembled Complexes

○Ryosuke Takeuchi [1], Sota Sato [1], Maho Yagi [3,4], Yoshiki Yamaguchi [2], Koichi Kato [3,4,5], Makoto Fujita [1,5]
[1]Department of Engineering, The University of Tokyo, [2]RIKEN, [3]Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University, [4]Okazaki Institute for Integrative Bioscience, [5]CREST

Residual dipolar coupling (RDC), observed for magnetically aligned molecules in solution-state NMR, provides valuable 3D structural information. Our group has reported the induction of magnetic alignment using host-guest chemistry between self-assembled complexes composed of aromatic rings and small analyte molecules. Here, we use the aggregates of these magnetically orienting complexes to extend the applicability of this RDC inducing complex to analyte molecules of larger biomolecular sizes.

Residual dipolar coupling (RDC) is a magnetically induced dipolar coupling between two spin active nuclei, observed in solution-state NMR only when the analyte molecule is anisotropically oriented. RDC, giving the angle between the internuclear bond vector and the applied external magnetic field, has served as a valuable source of 3D structural information for various molecules. In order to align an analyte, magnetically aligning materials ("alignment media") are often introduced as cosolutes to restrict the analyte's random tumbling.

Our group has focused on the diamagnetic property of aromatic rings which gives rise to the energetically favored parallel alignment against the magnetic field. Following this principle, we have constructed self-assembled complexes composed of parallely stacked aromatic rings and demonstrated their magnetic alignment which becomes stronger as the number of aromatic rings increase.

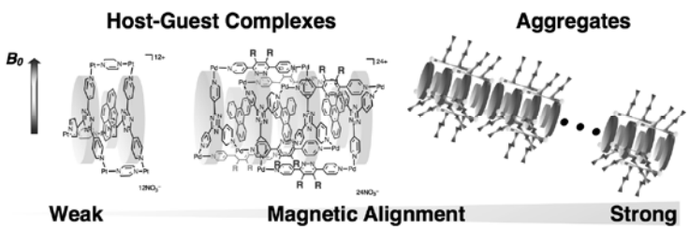


Figure 1. Magnetically aligning self-assembled complexes.

RDC, 自己組織化錯体

○たけうちりょうすけ, さとうそうた, やぎまほ, やまぐちよしき, かとうこういち, ふじたまこと

We have used these complexes as alignment media based on host-guest chemistry, by incorporating small analyte molecules into their cage-like structures, and aligning the analytes along with the complex.

Here, we extend the use of this stacked aromatic complex by aiming at applications to larger molecules. The complex bearing functional groups can aggregate into one-dimensional rod-like structures, the aggregation numbers of which are controllable by concentration. We envisioned that the complex aggregates can behave as an alignment medium with tunability in a wide concentration range and by functionalization, compensating for the narrow tunability range provided by conventional media such as liquid crystals.

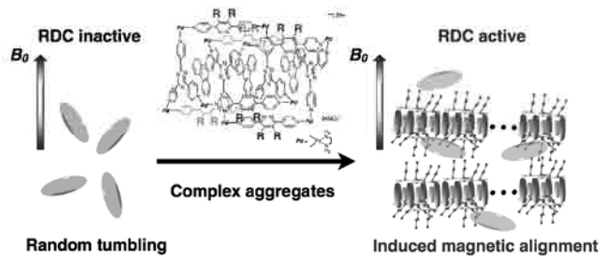


Figure 2. Concept of this work.

The alignment of the complex aggregates was observed through the quadrupole splitting $\Delta\nu$ of the solvent ^2H_2O signal by ^2H NMR. The $\Delta\nu$ value, proportional to the degree of alignment, increased as the concentration of the complex increased (Figure 3).

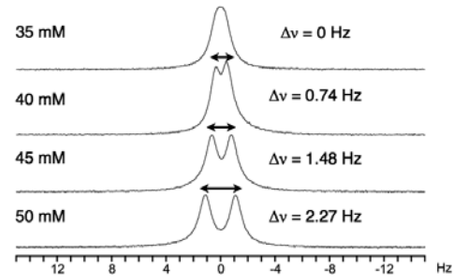


Figure 3. ^2H NMR spectra (92 MHz, ^2H_2O, 308 K) of the complex at various concentrations.

Next, we investigated the capability of the complex as an alignment medium. We used ^{15}N-labeled ubiquitin as a model analyte. When a molecule is oriented, the variable RDC value ($^1D_{NH}$) is added onto the invariable coupling constant ($^1J_{NH}$). The difference in the chemical shifts of the ^1H-^{15}N correlation peak between the HSQC and TROSY spectra gives half the $^1J_{NH} + {}^1D_{NH}$ value.

The solution of ubiquitin and 35 mM complex added as a cosolute were measured and $^1J_{NH} + {}^1D_{NH}$ values were compared. A significant difference for several signals was observed; e.g., the signal from amino acid I61 experienced a 6 Hz decrease in the value (Figure 4.). Futhermore, when a lower 30 mM concentration of the complex was added, the value decreased to 3 Hz. The results constitute that aggregates of the complexes are capable of tuning the induced RDC through the adjustment of their concentration.

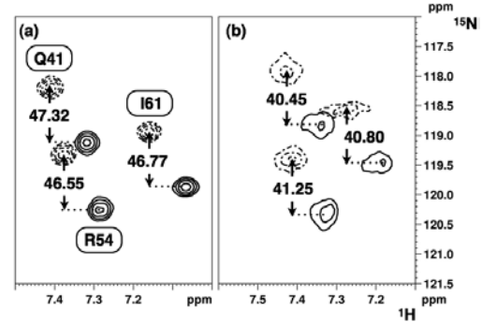


Figure 4. Overlap of ^1H-^{15}N HSQC (dotted) and TROSY (solid) NMR spectra of ubiquitin in (a) water and (b) aqueous 35 mM complex. ½ ($^1J_{NH} + {}^1D_{NH}$) values are indicated in Hz.

In summary, we have succeeded in extending the use of the magnetically orienting self-assembled complexes as alignment media to a larger biomolecular analyte. Furthermore, the tunability of the alignment of the aggregates indicates suggests the applicability of this medium to a wide variety of analytes.

L6 圧力応答化学シフトを用いた蛋白質の構造揺らぎ解析

○北原亮、秦和澄、李華、Michael P. Williamson、赤坂一之
[1] 立命館大学薬学部
[2] 立命館大学総合科学研究機構 R-GIRO
[3]Shanghai Institute of Biochemistry and Cell Biology
[4]Department of Molecular Biology and Biotechnology, The University of Sheffield
[5] 近畿大学先端技術総合研究所・高圧力蛋白質研究センター

Pressure-induced chemical shifts as probes for conformational fluctuations in proteins

Ryo Kitahara, Kazumi Hata, Hua Li, Michael P Williamson, Kazuyuki Akasaka
[1]College of Pharmaceutical Sciences, Ritsumeikan University
[2]R-GIRO, Ritsumeikan University
[3]Shanghai Institute of Biochemistry and Cell Biology, Institute for Biological Sciences
[4]Department of Molecular Biology and Biotechnology, The University of Sheffield
[5]High Pressure Protein Research Center, Institute of Advanced Technology, Kinki University

For proteins in solution under closely physiological conditions, we may expect that the partial molar volume of a protein molecule decreases in parallel with the loss of its conformational order (volume rule). On this basis, one can explore the fluctuation across nearly the entire conformational space up to full unfolding with pressure as variable. By using high-pressure NMR spectroscopy, various intermediate conformers with fairly distinct average structures have been detected, including alternately folded, locally unfolded, and MG conformers. Here, we demonstrate that chemical shift analysis resulting from pressure perturbation is a useful method to explore low-populated high-energy conformers exchanging rapidly with the basic folded ones in the NMR time scale. These observations disclose a rich world of protein structures beyond the basic folded ones.

The difficulty of detection of high-energy conformers of proteins by conventional NMR is obvious, as such conformers are rare in solution by the Boltzmann distribution law. We apply pressure to increase the population of high-energy conformers. We take advantage of the fact that the *partial molar volume* (the effective volume of the protein in solution taking solvent effect into account) is dependent sensitively on its conformational state and that, according to

High pressure, chemical shifts, high-energy states

○きたはらりょう、はたかずみ、りふあ、ウイリアムソンマイク、あかさかかずゆき

the Le Chatelier's principle, pressure stabilizes the conformation with a smaller partial molar volume (the total volume of the system [protein+solvent] is smaller). On the other hand, there is a general and practical rule (the volume rule) for a globular protein in solution that *the partial molar volume of a protein deceases in parallel with the loss of conformational order.* This volume rule is an essential characteristic of the volume behavior of proteins, which predicts the conformational variation of a protein with pressure. Use of site-specific NMR spectroscopy with varying pressure promises characterization of structural details of high-energy conformers in a wide conformational space of a protein.

We are particularly focusing the region of high-energy conformers that are found relatively close to the "native" structure, the lower region of the folding energy landscape. ^{1}H, ^{15}N, and ^{13}C chemical shifts are the most sensitive parameters for monitoring subtle structural changes in amino acids and proteins. Since a change in chemical shift generally corresponds to that in a molecular structure, a linear pressure dependence of the chemical shift indicates a linear change in the molecular structure as a function of pressure. In contrast, a nonlinear contribution of the pressure-induced chemical shifts may indicate a transition into a different conformational state with a different compressibility. We have encountered numerous cases showing distinctly nonlinear pressure shifts of amide ^{1}H and ^{15}N signals in many proteins. It is clear that the degree of nonlinearity varies greatly from protein to protein and appears to be characteristic for each protein. To explore the generality of the nonlinearity in proteins, we analyzed the nonlinearity quantitatively and compared the results among the 16 proteins we previously reported. Interestingly, the magnitude of the linear coefficient is comparable within the 16 proteins, indicating that the structural fluctuation within the basic folded ensemble is of comparable magnitude for all globular proteins, despite their substantially different tertiary folds. In contrast, a large variation is found in the nonlinear coefficients for both ^{1}H and ^{15}N pressure shifts in different proteins. We identified clear correlation of linearity between proton and nitrogen and correlation of nonlinearity between proton and nitrogen (Fig. 1). The statistical analysis supports our understanding that the linear chemical-shift changes with pressure in both ^{1}H and ^{15}N nuclei result from a linear change in averaged inter-nuclear distances and torsion angles, whereas the nonlinear changes result from a transition into high energy states giving different slopes of pressure shifts, namely different inter-nuclear distances and torsion angles.

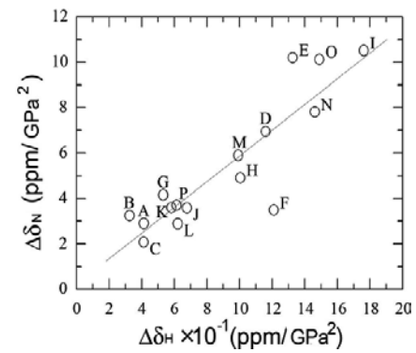


Figure 1. Correlation between nonlinear coefficients of pressure induced ^{1}H and ^{15}N shifts.

L7

瞬間HD交換法による過渡的中間体の構造解析

○西村千秋[1, 2], Peter E. Wright[1]
[1]スクリプス研究所・分子生物
[2]帝京平成大・薬

Transient Structure of the Kinetic Intermediate of Apomyoglobin Monitored by Quench-Flow HD Exchange NMR

○Chiaki Nishimura[1, 2], and Peter E. Wright[1]
[1]*Department of Molecular Biology, The Scripps Research Institute, California, USA.*
[2]*Faculty of Pharmaceutical Sciences, Teikyo-Heisei University, Chiba, Japan.*

It is very challenging to observe the folding intermediate structure transiently appearing between the unfolded state and native state. NMR is the most powerful tool to figure out the structure in solution at the atomic level, but generally the acquisition of the data is time-consuming. We have developed the quench-flow strategy for the pH-pulse labeling HD exchange. Particularly, the usage of DMSO as the solvent for the NMR acquisition has improved this strategy dramatically. The difference between the kinetic and equilibrium intermediates has been clearly shown using the DMSO method. We also tried to change the folding pathway of apomyoglobin by the mutations. The biggest change has been observed in the F-helix mutations, where the intrinsically disordered F-helix without heme at the native state was surprisingly formed even at the intermediate state.

The study on the folding intermediate is really important for the protein technology. It is because the protein aggregation as well as the amyloid formation arises from the folding intermediate. Apomyoglobin is a helical protein, which has seven helices at the native state (ABCDEGH helices). The F-helix is missing at the native state, probably because the F-helix plays an important role in binding heme, and is intensely fluctuated without heme. Here, we demonstrate the various series of the obligatory folding intermediates, which is accumulated at the early stage of apomyoglobin folding transiently (5-50ms).

1) Difference of the intermediate structure between the globin proteins: Apoleghemoglobin (soybean) is evolutionally related to apomyoglobin (whale) in the function and native structure. However, the helical structure of the kinetic intermediate was apparently different between two proteins: apomyoglobin intermediate was composed of ABGH helices, whereas apoleghemoglobin intermediate was EGH helices.

2) Difference between the kinetic and equilibrium intermediates: The equilibrium intermediate is widely studied as a model intermediate for the protein folding instead of the kinetic intermediate. The condition for the equilibrium intermediate is just at the slightly

Quench-Flow HD Exchange, Apomyoglobin, Folding Intermediate

○ にしむらちあき，ピーターライト

acidic pH (pH4) in case of apomyoglobin. The high resolution strategy, which combines the quench-flow HD exchange and DMSO method, revealed the somehow differences between two intermediates. In the kinetic intermediate the N- and C-terminal parts of G-helix was more protected than in the equilibrium intermediate, whereas the D-helix area was more stabilized in the equilibrium intermediate.

3) Apoleghemoglobin-like apomyoglobin intermediate: Based on the AABUF, L11G/W14G/A71L/G73W has been designed for the E-helix stabilized and A-helix destabilized apomyoglobin intermediate without the change of the native structure. The quench-flow studies showed that the design for the change of the intermediate structure was quite successful.

4) Non-native structure in the intermediate of apomyoglobin: It turned out by the quench-flow NMR studies that the interaction between the G- and H-helices in the intermediate was significantly shifted compared to the native structure. In addition, the refolding of both globin proteins was much slower (2-5 s) than the other typical proteins. It might be due to the existence of the non-native structure in the folding intermediate of two globin proteins.

5) Stabilization of the weak points of apomyoglobin: The F-helix region is fluctuated in the apomyoglobin structure at the native state. This fluctuation can be very important for capturing and binding heme. The F-helix mutation including P88K/A90L/S92K/A94L has stabilized this region not only at the native state but also at the intermediate state.

We have demonstrated that the structure of the intermediate can be changed by the mutation and solution condition, and be monitored by the quench-flow NMR strategy accurately. The structure and stability of the folding intermediate can be related to the formation of the aggregate and amyloid, which cause the serious damage in the human body and cell.

References

1. Nishimura, C. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 4765~4770, 2005.
2. Nishimura, C. et al. *J. Mol. Biol.* **351**, 383~392, 2005
3. Nishimura, C. et al. *J. Mol. Biol.* **355**, 139~156, 2006
4. Nishimura, C. et al. *J. Mol. Biol.* **378**, 715~725, 2008
5. Nishimura, C. et al. *J. Mol. Biol.* **396**, 1319~1328, 2010
6. Nishimura, C. et al. *J. Mol. Biol.* **411**, 248~263, 2011

IL1

Recognition and regulation of small ubiquitin-like modifier (SUMO)

Tai-Huang Huang

Institute of Biomedical Sciences Academia Sinica, Taipei 11529, Taiwan

Small ubiquitin-like modifier (SUMO) conjugation and interaction are increasingly associated with various cellular processes. However, little is known about the cellular signaling mechanisms that regulate proteins for distinct SUMO paralogue conjugation and interactions. Using the transcriptional coregulator Daxx as a model, we show that SUMO paralogue-selective binding and conjugation is regulated by phosphorylation of the Daxx SUMO-interacting motif (SIM). NMR structural studies show that Daxx ^{732}E-I-I-V-L-S-D-S-D^{740} is a bona fide SIM that binds to SUMO-1 in a parallel orientation. Daxx-SIM is phosphorylated by CK2 kinase at residues S737 and S739. Phosphorylation promotes Daxx-SIM binding affinity toward SUMO-1 over SUMO-2/3, causing Daxx preference for SUMO-1 conjugation and interaction with SUMO-1-modified factors. Furthermore, Daxx-SIM phosphorylation enhances Daxx to sensitize stress-induced cell apoptosis via anti-apoptotic gene repression. Our findings provide structural insights into the Daxx-SIM:SUMO-1 complex, a model of SIM phosphorylation-enhanced SUMO paralogue-selective modification and interaction, and phosphorylation-regulated Daxx function in apoptosis.

While numerous small ubiquitin-like modifier (SUMO) conjugated substrates have been identified, very little is known about the cellular signaling mechanisms that discriminatorily regulate substrate sumoylation. The conjugation process of protein substrates by mammalian SUMO isoforms (SUMO-1,-2 and -3) requires the E1-activating enzyme (SAE1/SAE2), the E2 conjugase (Ubc9) and, in some cases, E3 ligases. Ubc9 catalyzes the formation of an isopeptide bond between the C-terminus of SUMO and the amino group of the target lysine via a direct interaction with a consensus motif ψ-K-X-E/D (where ψ is a large hydrophobic residue and X is any residue) present in protein substrates. In addition, the flanking residues surrounding this canonical four amino acid SUMO motif have been shown to promote substrate sumoylation via additional interaction with Ubc9 such as the negatively charged amino acid-dependent SUMO motif (NDSM). I will also present our recent findings on Ubc9 acetylation and Ubc9-SUMO interactions.

IL2

Method Development and Application of Magnetic Resonances for Membrane Protein Structure and Function Studies

Chaowei Shi[1], Kaiqi Wu[1], Pan Shi[2], Juan Li[1], Dong Li[1], Fangming Wu[2] and Changlin Tian[1,2]

[1] *School of Life Sciences, University of Science and Technology of China, Hefei, 230027, P. R. China*

[2] *High Magnetic Field Laboratory, Chinese Academy of Sciences, Hefei, 230031, P. R. China*

Membrane proteins are playing vital roles in different aspects of cellular life. Structural and functional studies of membrane proteins provide direct evidence to illustrate their molecular mechanism. To maintain stability of recombinant membrane proteins, quantitative protein/detergent molar ratios were strictly controlled to guarantee high quality sample reproduction. Structures of several membrane or membrane associated proteins in Mycobaterium tuberculosis were determined using combinational methods of nuclear magnetic resonance and electronic paramagnetic resonances. Besides structural studies, dynamics and functional studies of some membrane proteins were also analyzed using newly developed in situ NMR methods or EPR method. Further method developments of magnetic resonances are still undergoing for structural, dynamics and function studies of more complicate membrane proteins.

IL3

To walk or not to walk, and how should they walk: myosin's "clients" share some decision making power

Mingjie Zhang

Division of Life Science, Hong Kong University of Science and Technology, Clear Water Bay, Kowloon, Hong Kong

High resolution, solution NMR spectroscopy has been playing extraordinary roles in the advancements of modern biology. However, the filed is also facing its own challenge due to rapid development of many competing techniques including X-ray crystallography, mass spectrometry, and other high throughput technologies as well as intrinsic limitations of NMR spectroscopy. In this talk, I will use our recent studies of interactions of several unconventional myosins (myosin VI, VII, and X) with their cargo proteins to illustrate the unique power of NMR spectroscopy (often in combination with other complimenting biophysical techniques) in elucidating the structure and functions of complicated protein assemblies. I try to argue that NMR spectroscopy, as a relatively mature biophysical/structural biology technique, has its unique and increasingly important position in modern biology.

IL4

Are the Dynamics of Acyl Carrier Protein Domain in FAS/PKS Critical to its Function?

Jackwee Lim[1], Huihua Sun[2], Jing-Song Fan[1], Zhao-Xun Liang[2] and Daiwen Yang[3]

[1]*Department of Biological Sciences, National University of Singapore, 14 Science Drive 4, Singapore 117543*

[2]*School of Biological Sciences, Nanyang Technological University, 60 Nanyang Drive, Singapore 637551*

Fatty acid synthases (FAS) and polyketide synthases (PKS) are divided into type I and type II systems. Type I systems are large, highly integrated modular proteins and type II systems consist of small discrete proteins. Acyl carrier proteins (ACPs) are small (~9 kDa) monomeric domains and proteins in types I and II FAS/PKS systems, respectively. ACPs play a central role in both FAS and PKS systems for the production of fatty acids and a wealth of secondary metabolites by shuttling acyl intermediates among the catalytic domains of multi-domain type I FAS/PKS or among various partner enzymes of type II FAS/PKS. It is believed that the unique function of ACPs is associated with their dynamic property, but it remains to be fully elucidated what type of protein dynamics is critical for the shuttling domain. Using NMR techniques, we have showed that the ACP domain of iterative type I PKS CalE8 from *Micromonospora echinospora* is highly dynamic on the ms-s timescales. Introduction of an inter-helical disulfide linkage in the ACP domain (Fig. 1a) suppresses the dynamics on the ms-s timescales (Fig. 1b) and reduces the mobility on the ps-ns timescale. We have demonstrated that the full-length polyketide synthase CalE8 is still fully functional upon the rigidification of the ACP domain through a disulfide linkage (Fig. 1c), suggesting that the internal dynamics of the structural regions of the ACP domain are not critical for its function although the flexibility of the disordered terminal linkers may be important.

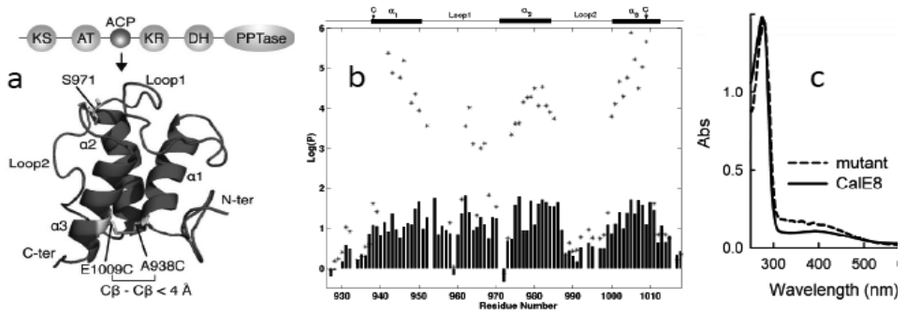


Figure 1. **a.** Domain organization of CalE8 and structure of ACP domain where active site S971 and mutation sites A938C and E1009C are highlighted. **b.** Comparison of protection factors for wild type (bar) and mutant ('*') ACP domain. **c.** Enzymatic activity of CalE8 and the double mutant A938C/E1009C. The absorbance at 400 nm is from the PKS-tethered polyene product synthesized in *E. coli*.

IL5

NMR-based rational drug design: Applications to GPCR-targeted drugs

Weontae Lee*[1], Jihye Yun[1], Daesuk Oh[1] and Sung-Kil Lim [2]

[1]*Department of Biochemistry and Structural Biochemistry & Molecular Biophysics Laboratoty, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea;*
[2]*Department of Internal Medicine, College of Medicine, Yonsei University, Seoul, 120-749, Korea,*

Naturally occuring bioactive peptides and small proteins that regulate their relevant biological activities have been considered as strong candidates for rational drug designs. High resolution NMR and molecular modeling techniques combined with biological data would be a powerful technique to provide structure-function of peptide hormones and their interaction to receptor molecules for structure-based drug design (SBDD) purpose. The melanotropins (MSHs) together with G-protein coupled receptor (GPCR), melanocortin receptors (MCRs) are involved in a multitude of physiological functions including thermoregulation, obesity, attention, learning, and memory, as well as immuno-modulatory effects. Especially, melanocyte-stimulating hormones (MSHs) and GPCR, melanocortin receptors (MCRs) are key components of the hypothalamic response to obesity. To provide receptor selectivity, the three dimensional structures of MCR-MSH complex were constructed based on NMR data together with both mutagenesis and biochemical data. We could design potent selective peptidomimetic analogues and organic compounds based on structural information, providing the selectiveness to the receptors. Second example, parathyroid hormone (PTH) and PTH receptors are the major regulator of calcium and phosphate homeostasis. When PTH is presented in a pulsatile or intermittent fashion, it stimulates a net increase in bone mass. Therefore, PTH analogues have been developed as one of most important anabolic agents for the treatment of osteoporosis. Our approach could be served as a very efficient tool to provide key information in developing receptor selective as well as GPCR- specific drug candidates using NMR spectroscopy.

IL6

合成高分子の一次構造解析にむけた溶液NMRのアプローチ：スペクトルの多変量解析とDOSY

○ 右手 浩一[1]
[1]徳島大学大学院ソシオテクノサイエンス研究部

Multivariate Analysis and DOSY —— Solution NMR Approaches to the Molecular Characterization of Synthetic Polymers

○Koichi Ute[1]
[1]*Department of Chemical Science and Technology, The University of Tokushima, Tokushima, Japan.*

Most of vinyl polymers for practical use are copolymers comprising two to several different monomeric units. Analysis of distributions in comonomer sequence and stereoregularity is essential for the understanding of the polymer properties. Since the copolymers are complex mixtures of chemical species differing in molecular weight (MW) and chemical structures, their NMR spectra generally show broad and complicated resonance patterns. Recently, we showed that the methods of multivariate analysis are useful to obtain quantitative information about chemical compositions of methacrylate copolymers and terpolymers without assigning individual resonance peaks in their ^{13}C NMR spectra. Diffusion-ordered NMR spectroscopy (DOSY), which gives information about MW-dependence of chemical composition in a polymer sample, is another method useful for the molecular characterization of copolymers.

実用的なビニルポリマーの多くは共重合体である。その用途に求められる特性に応じて，性質の異なるモノマーが3種以上共重合されることも珍しくない。各々のモノマー単位がポリマー鎖中にどのように分布しているかを調べることは，共重合体の特性を理解する上で重要であり，その結果は共重合体の製造過程にフィードバックされる。しかし，共重合体のNMRスペクトルは，一般に複雑で線幅が広く，モノマー連鎖や立体規則性に関する定量的情報を得るためには工夫が必要である。本講演では，多変量解析[1)]とDOSY（Diffusion-ordered NMR spectroscopy）[2)]を応用した，メタクリレート系共重合体のキャラクタリゼーションについて述べる。

共重合体のNMRスペクトルの多変量解析

メタクリル酸メチル（MMA）とメタクリル酸*t*-ブチル（TBMA）の共重合体の^{13}C NMRスペクトルに多変量解析を応用すると，複雑な共鳴線の帰属を行うことなく，組成とモノマー連鎖に関する定量的情報が得られる[3,4)]。

乳酸エチル中80°Cでのラジカル重合で合成したMMAとTBMAの単独重合体（PMMAおよびPTBMA），PMMAとPTBMA混合物9種，組成や収率が異なるMMA-TBMA共重合体16種の合計27種のサンプルを用意した。これら全試料の^{13}C NMRスペクトルを$CDCl_3$中55°Cで測定し，情報量の豊富なα-メチル炭素（15.1～23.1 ppm），四級炭素（44.1～48.1 ppm）およびカルボニル炭素（175.0～179.0 ppm）の領域をそれぞれ一定間隔（0.25 ppm）で機械的に積分した（このような操作をバケット積分とよぶ）。各領域の積分強度を規格化したのち，全試料のデータについて主成分分析（PCA）を行った結果，第1主成分（PC1）と第2主成分（PC2）の寄与率は，それぞれ77.1および20.7 %となった。この系に含まれる情報の97.8 %が二つのパラメータで説明できることがわかる。それぞれ，共重合組成とモノマー連鎖の2連子に対応しているものとして矛盾なく説明できる。

共重合体のスペクトルを複雑にする要素のもう一つは，立体規則性である。MMAとTBMAの共重合を*t*-ブチル亜鉛酸リチウム（TBZL）を用いて行い，ラジカル重合で得られた共重合体と比較した（**図１**）。PCAスコアプロットをみると，TBZLによる共重合体はラジカル共重合体に比べてブロック性に富み，かつ，シンジオタクチック含量に乏しいことがよくわかる。部分最小二乗回帰による検量モデルを作成すれば，MMA-TBMA連鎖の分率と立体規則性を推定することも可能である。

多変量解析を応用した統計的２次元 NMR スペクトルは，共重合体の NMR スペクトルの共鳴線の帰属にも利用できる[5)]。

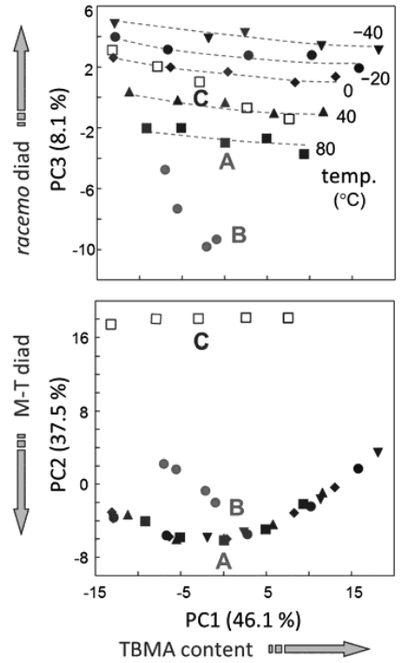


Figure 1 Principal component score plots for ^{13}C NMR spectra of the MMA-TBMA system; (A) copolymers prepared by radical polymn., (B) copolymers prepared with $(t\text{-Bu})_4ZnLi_2$, (C) PTBMA-PMMA blends.

共重合体の DOSY：組成の分子量依存性

図２は，20°C での光ラジカル共重合の初期（収率 2.2 %）および終期（収率 90.4 %）に得られた MMA-メタクリル酸 2-ヒドロキシエチル（HEMA）共重合体のエステル基領域の DOSY スペクトルである。OCH_3 基と OCH_2 基の共鳴周波数で *D* 軸上に投影すると，終期重合体では MMA 単位の方が HEMA 単位より低分子量側（*D* の大きい側）にピークを示すのに対し，初期重合体では両者のピークはほぼ一致している。これは，終期重合体の組成に分子量依存性があることを示している[6)]。

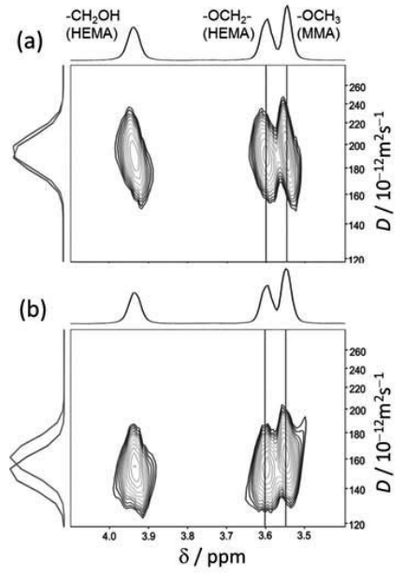


Figure 2 DOSY spectra of poly(MMA-*co*-HEMA) obtained (a) at an early stage of copolymerization (M_n 25000, M_w/M_n 2.56) and (b) at a late stage of copolymerization (M_n 41000, M_w/M_n 2.91).

[1)] 尾崎幸洋, 宇田明史, 赤井俊雄, 「化学者のための多変量解析―ケモメトリックス入門」, 講談社サイエンティフィック (2002). [2)] C. S. Johnson, Jr, *Prog. NMR Spectrosc.*, **34**, 203 (1999). [3)] H. Momose, K. Hattori, T. Hirano, K. Ute, *Polymer*, **50**, 3819 (2009). [4)] H. Momose, T. Maeda, K. Hattori, T. Hirano, K. Ute, *Polym. J.*, **44**, 808 (2012). [5)] T. Hirano, T. Anmoto, N. Umezawa, H. Momose, Y. Katsumoto, M. Oshimura, K. Ute, *Polym. J.*, **44**, 815 (2012). [6)] T. Maeda, K. Hattori, H. Momose, T. Hirano, K. Ute, *Polym. Prepr. Jpn.*, **59** (1), 759 (2010).

Comonomer sequence distribution, Tacticity, Molecular-weight dependence

IL7 NMRの分析手法としての汎用性について

○山口秀幸
味の素株式会社イノベーション研究所
フロンティア研究所食品官能特性研究グループ

NMR as a versatile analytical tool for industrial issues from research and development activities to quality control

○Hideyuki Yamaguchi
Frontier research laboratory, Institute for innovation, Ajinomoto Co., Inc.
Kanagawa, Japan.

In Ajinomoto group, various products such as processed foods, seasonings, beverages, pharmaceuticals, amino acids, and chemical products (e.g. cosmetics, electronic materials) are handled. Those products are quite different in forms, solid, liquid, and its homogeneous or inhomogeneous mixture. In order to meet analytical issues occurred in research and development activities or quality control of such diverse products, NMR spectroscopy may be a powerful tool because of its extensible hardware equipments and multifunctional analytic software. In this session, several applications of NMR techniques in our research and development activities as well as quality control issues will be shown .

味の素グループでは、調味料から加工食品、飲料、医薬品、アミノ酸、化成品など多彩な製品を製造販売している。それ故、分析の対象となる試料は、液体、固体、またはそれらが混ざり合ったものであり、その目的も品質保証から研究開発に至るまで様々である。一方、NMRはどのような性状の試料も基本的に非侵襲で測定可能な点が魅力であり、測定法やハードウェア及びソフトウェアの幅広さは状況に応じた柔軟な分析研究を可能にする。NMRは多彩な製品を製造販売するメーカーにとって使い勝手の良い有益な分析ツールであることに間違いない。本会では、食品の研究開発、及び医薬品の品質保証に関する事例を通して、当社におけるNMRの活用について概説する。

＜食品素材の加工度とその調理特性＞
食品素材の加工度とその調理特性を明らかにすることは、商品開発、及び工業的視点において重要である。ここでは大麦を題材として、NMRマイクロイメージングによって炊飯過程を定量的に解析した例を示す。大麦は米よりも堅く、調理し難い性質を持つ。このことから、表面を削り（搗精）、加熱水蒸気で加熱圧扁し米との混炊に適した状態にまで加工した“押麦”として食することが多い。このような加工処理とその効果との関係を明確にすることは商品開発の効率化のみならず、素材の特徴をより深く理解し、次への課題を導き出すきっかけにもなる。

食品素材、医薬品、品質保証

（参考）NMRマイクロイメージングによる麦飯の炊飯特性に関する研究
日本食品科学工学会第57回大会（2010）
山口秀幸[1]、菅原沙織[2]、Lewis Andrew[2]、井出博之[1]、丹尾式希[1]、香西みどり[2]
[1]味の素株式会社、[2]お茶の水女子大学

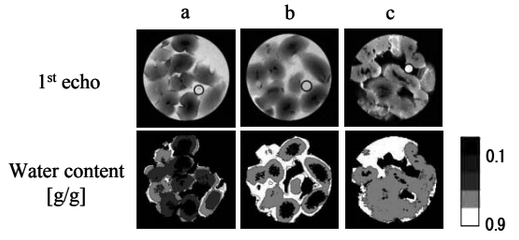


Fig.1. First-echo images and water concentration distributions calculated from the ^{1}H T_2 NMR images for each barley at cooking time 35 min. (a) 80% milled, (b) 60% milled, (c) steamed and pressed (Oshimugi) barley.

＜酵素による食品素材の構造制御＞
αグルコシダーゼは米飯の老化防止を示す酵素であり、糖鎖のα-1,4結合の切断とα-1,6結合の転移活性を有することが知られている。しかし、単純な繰り返し構造をとる糖鎖の解析は容易ではなく、αグルコシダーゼ反応による切断や転移の分子機構については殆ど報告されていない。ここでは、溶液NMRを用いて、様々な鎖長のオリゴ糖を基質とした場合の生成物の経時変化を調べた。
（参考）酵素のNMRによる食品素材の構造変化と食品物性
第46回NMR討論会(2007)
榛葉信久、山口秀幸、品川麻衣、鈴木榮一郎
味の素株式会社
Shimba, N. *et al*., *Analytical Chemistry*, **393**, 23-28 (2009)

＜医薬品の品質保証＞
ヘパリンはグリコサミノグリカン重合によって形成された多糖であり、血液透析時の血液凝固の防止や血栓塞栓症の治療等、様々なケースにて抗凝血剤として使用されている。2008年、米国にてヘパリン投与患者にアナフィラキシー様症状が現れ、患者が死亡する事例が報告された。原因は、ヘパリン原料中に混入した不純物である、過硫酸化されたコンドロイチン硫酸であることが発表され、米国FDAよりNMRによる分析が提唱された。日本では米国のような事例は報告されなかったが、ヘパリン製剤の一部回収が行われるなど社会問題になった。実際の分析では、^{1}H-NMRが用いられるが、この時、^{13}Cに結合したヘパリンのサテライトシグナルとの識別が重要である。この事件をきっかけに、NMRによるヘパリンの純度試験法が日本薬局法に取り込まれた。
（参考）NMRによるヘパリン不純物問題への対応
第47回NMR討論会(2008)
山口秀幸、品川麻衣、榛葉信久、宮野博、鈴木榮一郎
味の素株式会社
Yamaguchi, H. *et al*., *Yakugaku Zasshi*, **128**, 1513-1515 (2008)

IL8 無機ガラス材料の構造解析入門編

○閔　庚薫
旭硝子㈱中央研究所

An introduction of structural analysis for glass

○Kyon Hun Min
Research Center, Asahi Glass Co. Ltd., Yokohama, Japan.

Multinuclear solid-state NMR has been improved remarkably. High magnetic field, high speed MAS and MQ-MAS are in practical use, recently. Multinuclear solid-state NMR is useful technique for structural analysis of glass not only in scientific field but also in industrial field. But it has some difficulties to master multinuclear solid-state NMR for beginners. In this section, basics of glass structural analysis and of multinuclear solid-state NMR will be presented.

ガラスは、透明性、耐擦傷性、剛性に優れ、ディスプレイ部材、建築及び自動車の窓材として広く利用されている。他方、割れ易く、軽量性に劣ることから、その利用が制限される場面も、これまでには認められた。これらの課題を解決する手段として、ガラスの化学強化と薄板化が挙げられる。旭硝子㈱は、化学強化用特殊ガラスDragontrail™の開発と、フロート法を用いた0.1㎜厚み超薄板ガラスの開発に、それぞれ成功している。これらの技術革新は、タッチパネル、次世代ディスプレイ等に対するガラス材料の利用を促進する。

構造解析の分野でも、ガラスに関する進歩は著しい。ガラスは非晶質であり、また、工業用途に供されるガラスは一般的に多成分系である。これらの特徴を考慮すれば、固体多核NMRは最も有望な構造解析法であった。近年、固体多核NMRの進歩は著しく、ハード面ではマグネットの高磁場化とMASの高速化が、ソフト面ではMQ-MAS法の実用化が、それぞれ実現されている。これらの技術は、NMRスペクトルの分離能を十分に高め、質の高い構造解析の実施を可能とした。また、良質な成書も出版されつつある。今や固体多核NMRは、学術界にとどまらず産業界においても、実用的なガラス構造解析法としての地位を獲得している。

しかしながら、指導者が身近に存在しない場合、初心者が固体多核NMRに取り組むことは、現在でも相応に難しい。主な理由は、取り扱うべき核種が多数存在し、その核種ごとに注意事項が異なることに因る。また、利用可能な装置が旧式である等の理由により、データの取得自体ができない場合や、得られる情報の質に不足を生じる場合がある。

本講演では、ガラスの構造解析に関する基本事項と、初心者が固体多核NMRに取り組む際の注意点を、具体例を挙げながら説明する。

Glass, Multinuclear NMR, Solid-state NMR

○みん　きょんふん

IL9 リチウムイオン二次電池材料のNMR分析

上口憲陽
株式会社日産アーク

NMR analysis of Li-ion battery materials

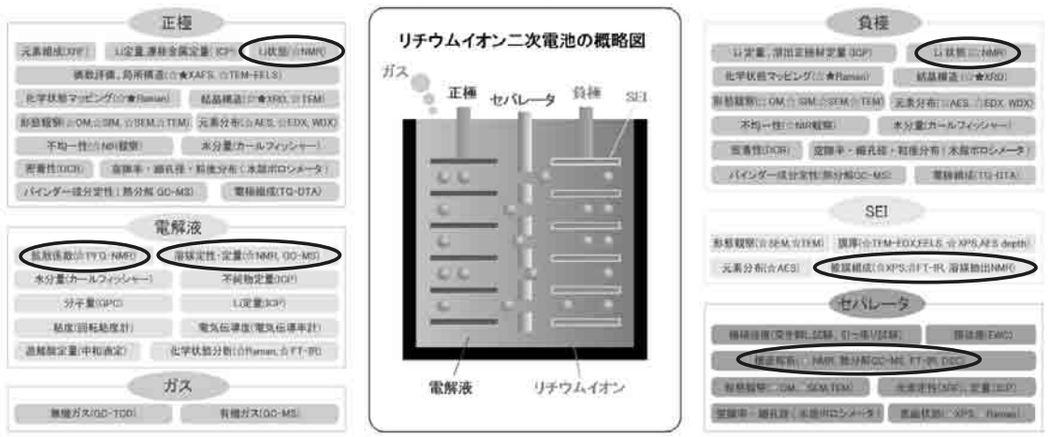
Kazuhiro Kamiguchi
Energy-device Analysis Department, NISSAN ARC Ltd., Yokosuka, Japan.

Li-ion battery is an important power source for modern electrical devices such as mobile phone, electric vehicle etc. NMR spectroscopy is a powerful tool for analyzing the structure and ion dynamics. We are applying such NMR spectroscopy for analyzing Li-ion battery materials.

近年、リチウムイオン二次電池は、従来のモバイル機器電源用途に加えて電気自動車やスマートグリッド用途へと需要が大きく拡大し、研究開発が盛んに行われている。リチウムイオン二次電池の研究開発において NMR は、軽元素であるリチウムの状態、電解質中のイオン、分子の拡散挙動、電解液の劣化状態等の有用かつ他の手法では取得困難な情報を得ることができるため、研究開発から製造ラインでの評価分析、市場回収品の劣化分析等、様々な場面で活用されている。

表１に、リチウムイオン二次電池の分析、解析手法のまとめを示す。一般に、リチウムイオン二次電池は、正極（リチウム遷移金属酸化物）、負極（カーボン材料等）、セパレータ（オレフィン樹脂）、電解液（有機溶媒系電解液）から構成されている。それら各部材は Li、H、C、F、P など NMR の得意とする核種を多く含んでいるため、いずれの材料の評価、研究開発においても、NMR は欠かすことのできない重要な役割を担っている。本講演では、各部材の NMR 分析事例を中心に、リチウムイオン二次電池開発における NMR の活用例を紹介する。

Table 1. Analytical techniques for Li-ion battery



Solid state NMR, analytical chemistry, Li-ion battery
かみぐちかずひろ

IL10 NMRと材料開発

○橋本康博
旭化成(株)・新事業企画開発室

NMR applications for the material developments

○Yasuhiro Hashimoto
Asahi Kasei Corporation, Strategic Planning & Development

A wide variety of materials from biomolecules to organic and inorganic chemical fields could be applied to NMR analysis. Further, NMR has a potential that the vital information for the material development could be deduced if appropriately combined with other analytical methods. Here, we present our recent efforts on taking advantage of such NMR characteristics, showing some examples including fuel cell membranes or concrete materials.

語学がコミュニケーション等の手段であり、それ自身が目的ではないのと同様、“分析”も手段であって目的ではない。“NMR”の立場から見ると、数ある分析手法のなかから、目的に応じてNMRが選ばれ、あるいは選ばれるべくNMRを発展させることが必要である。このとき我々はNMRの長所を生かすような選び方をすべきであり、他手法で簡単に得られる情報を、NMRで苦労して取得するようなことは避けるべきである。

NMRの特徴は、医薬から無機半導体まで多岐にわたる材料分野に応用でき、そこから化学構造、立体構造、そして動的情報など、実にさまざまな情報が得られることである。すなわち、①バイオ／有機／無機など幅広い材料に適用が可能、②サンプル対象は、溶液／固体、結晶／非晶を問わない、③化学構造／立体構造／組成（定量）／ダイナミクス／結晶構造情報が得られる、④確度の高い定量データが得られる、⑤混合物であっても、個々物質ごとに情報を切り分けることが可能、⑥それぞれの情報を結び付けて解析できる。

ただし、この幅広い応用性の一方で、NMR単独では決定的な情報を得るに至らない場合が多々あり、使い方を間違えると、曖昧模糊とした結果に終わるリスクが大きい。このことが、分析担当者が手法を選択するときの判断を難しくしている。

むしろ他手法と連携して種々情報をとりながら、さらにそれらを化学的な情報へと統合的に結び付けるような “ハブ機能”としてのNMRの使い方が有効といえる。たとえば、NMRと他手法で得られたダイナミクス情報をハブにし、それをさらに化学構造情報（定量情報、組成情報などさまざま）に落とし込むような解析などは一つの例である。

我々はNMRの特長をいかに活かすか、を模索しながら、種々材料への展開を検討している（表１）。正直なところ、すべてに満足な結果が得られているわけではない。本発表では、うまく応用ができなかった結果も含めて、燃料電池やコンクリート材料開発への適用例を挙げながら、NMRの応用ポイントを述べる。ぜひ皆様からの意見をいただければ幸いである。

Fuel cell、autoclaved aerated concrete、ionic diffusion

Talbe.1 Examples of NMR applications in Asahikasei Corporation.

手法	解析目的	対象	他手法 組み合わせ
溶液１次元 固体 CPMAS/DDMAS	組成 構造	種々合成高分子 低分子有機化合物	MS、IR
F-NMR（溶融）	微細構造	燃料電池隔膜（劣化メカニズム）	GPC、IR、計算
Low-γ核種	微細構造	コンクリート（合成追跡）（^{43}Ca）	XRD
PGSE-NMR	会合	シクロデキストリン（包接）	CD、計算
	微細構造	共重合高分子（組成/分子量相関）	２次元LC
	イオン拡散	燃料電池（H^+拡散機構）	IR、SAXS
		リチウムイオン電池（Li^+拡散機構）	FIBSEM、計算
		食塩電解（イオン選択透過性）	SAXS、計算
MQMAS	無機微細	ゼオライト（酸点構造）	NH3-TPD
		コンクリート（非晶中間体）	XRD
固体緩和測定	結晶/非晶/界面	コンポジット（相互作用） 種々フィルム	XRD、DMA、DSC
溶液多次元	立体構造	タンパク（糖結合カルシトニン）	CD

参考文献

(1)橋本康博、青柳岳司、服部真貴子、飯嶋秀樹、植松信之，池田正紀：「燃料電池用フッ素系高分子電解質膜の劣化機構」　高分子学会予稿、Vol.55、2T02（2006）
(2)橋本康博、坂本直紀、飯嶋秀樹：「フッ素系燃料電池電解質膜の水の状態とクラスター構造がイオン伝導性に与える影響」 高分子論文集、Vol.63、166（2006）
(3)橋本康博、堀池則子：「DOSY NMR 法の展開 包接現象を評価する」 化学と生物、Vol.47、No.8、578（2009）
(4)橋本康博、名雪三依、堀池則子、吉野彰：「PFG-NMR法から得られる情報～イオン拡散挙動､分子会合状態､合成高分子の分子量/組成相関」日本電子News､Vol.40、14（2008）
(5)名雪三依、橋本康博、綱嶋正通、菊間淳、松野信也、丹所正孝、清水禎、松井久仁雄：「高磁場固体^{43}Ca NMRによるトバモライト生成過程の解析」 第49回NMR討論会要旨、Vol.49（2010）

謝辞：　セメント材料の高磁場固体NMR測定で(独)物質材料研究機構の清水様、丹所様、大木様、出口様や、(株)Jeol Resonanceの下池田様、根本様に、PGSENMRによるイオン拡散解析では、(独)産業総合研究所の早水様や、(株)Jeol Resonanceの櫻井様に大変お世話になりました。この場をお借りして感謝申し上げます。

第二日目
11月9日（金）
英語セッション

Day 2 (Nov. 9, Fri)
(English Session)

L8

プリオンタンパク質とRNAアプタマーの相互作用及び木質バイオマスの生分解のモニタリング

真嶋司[1], 西村裕志[2,5], 岡村英保[1], 西川富美子[3], 鎌足雄司[4], 永田崇[1], 西川諭[3], 桑田一夫[4], 渡辺隆司[2,5], ○片平正人[1,5]
[1]京大・エネルギー理工学研究所, [2]京大・生存圏研究所, [3]産総研, [4]岐阜大, [5]CREST

Interaction of RNA Aptamer with Prion Protein and Monitoring of Biodegradation of Wood Biomass

Tsukasa Mashima[1], Hiroshi Nishimura[2,5], Hideyasu Okamura[1], Fumiko Nishikawa[3], Yuji O. Kamatari[4], Takashi Nagata[1], Satoshi Nishikawa[3], Kazuo Kuwata[4], Takashi Watanabe[2,5], and ○Masato Katahira[1,5]
[1]Institute of Advanced Energy, Kyoto University, Japan. [2]RISH, Kyoto University, Japan. [3]AIST, Japan. [4]Gifu University, Japan. [5]CREST, Japan.

Transformation of a normal form to an abnormal form of prion protein (PrP) causes diseases. We have recently found that RNA aptamer against PrP exhibits anti-prion activity through the stabilization of the normal form. Here, we show with the N-terminal-half of PrP that the one monomer of the aptamer dimer binds to the one binding site of PrP and that the other monomer simultaneously binds to the other binding site, resulting in much higher affinity.

Wood biomass is promising resource to obtain energy and various chemical products through its degradation. We present the successful monitoring by NMR of biodegradation of wood biomass. Depending on a kind of rot fungus applied, selective degradation of either polysaccharide or lignin has been found. A key metabolite for a selective degradation has also been detected with the assist of ^{13}C labeling.

［序論］

①プリオンタンパク質とRNAアプタマーの相互作用

プリオンタンパク質(PrP)は正常型から異常型に変換されると、狂牛病等の病気を引き起こす。我々は正常型のPrPに対して高い結合能を示すRNA分子(RNAアプタマー)を取得した。神経細胞を用いた解析によって、このRNAアプタマーが抗プリオン活性を有する事を最近見出した。結合によって正常型を安定化して異常型への変換を阻害する事で、この活性がもたらされていると考えられる。PrPにはRNAアプタマーの結合部位が２つ存在する。各結合部位断片とRNAアプタマーとの相互作用様式をこれまで報告してきた。今回、２つの結合部位が存在するPrPのN末領域(107残基)とRNAアプタマーの相互作用に関する研究結果を報告する。

Aptamer, Prion protein, Wood biomass

ましまつかさ,にしむらひろし,おかむらひでやす,にしかわふみこ,かまたりゆうじ,ながたたかし,にしかわさとし,くわたかずお,わたなべたかし, ○かたひらまさと

②木質バイオマスの生分解のモニタリング

現在石油への依存からの脱却が、石油資源の枯渇及び環境への配慮の観点から望まれている。木質バイオマスは、エネルギーと化成品の石油に替わる供給源として有望である。木質バイオマスを利活用する為には、主要構成成分である多糖とリグニンを選択的・効率的に分解する事が求められる。木材腐朽菌による生分解は、この為の有効な手段となると期待される。今回NMR法によって生分解過程を木材丸ごとモニタリングする事に成功し、有用な知見を得たので報告する。

［結果と考察］

①プリオンタンパク質とRNAアプタマーの相互作用

イミノプロトンを用いたケミカルシフトパータベーション実験から、PrPのN末領域(107残基)とRNAアプタマーの複合体におけるストイキオメトリーは、0.5:1.0であった。RNAアプタマーは複合体においてダイマーを形成する事が判明したので、N末領域とRNAアプタマーのダイマーが1:1で複合体を形成する事が分かった。N末領域の２つの結合部位断片各々を用いたこれまでの解析結果と総合すると、以下の結論が得られた。ダイマーを形成したRNAアプタマーの片方のモノマーがPrPのN末領域の片方の結合部位に結合し、同時にRNAアプタマーのもう片方のモノマーがPrPのN末領域の他方の結合部位に結合する。この２か所同時結合によって、RNAアプタマーの高い結合能がもたらされる。この事が、本RNAアプタマーが抗プリオン活性を示す源泉だと考えられる。

②木質バイオマスの生分解のモニタリング

我々は溶液NMR法に適した木材の試料調製方法を工夫する事で、分解能の高い^{1}H-^{13}C HSQC/HMBCスペクトルを取得する事に成功した。異なる種類の木材腐朽菌を木片/木粉に付着させ、腐朽の進行に伴う木材の主要成分(多糖類とリグニン)の生分解過程を、これらのスペクトルを利用してモニタリングした。

リグニンは非常に複雑な化学構造を有しているが、NMR法を用いれば多様な化学構造に関して分子・原子レベルの分解能で情報が得られる事が示された。多糖類に関する情報も得られ、腐朽菌の種類に依存して、多糖類の選択的分解やリグニンの選択的分解が生じる事を観測できた。また^{13}C標識を活用する事で、リグニンの選択的な分解において重要な役割を担う事が分かっている代謝物であるセリポリック酸が、腐朽の進行に伴って生じてくる事も確認できた。またNMR試料管内に培地を入れ、ここに腐朽菌を付着させた木片を浮かばせる事で、NMR管内で腐朽過程を連続的に進行させる事にも成功した。

多糖類とリグニンは、リグニン-炭化水素複合体(Lignin-Carbohydrate Complex, LCC)構造を介して結合していると考えられているが、その実体は不明である。LCC構造の解明は、植物細胞壁の成り立ち・機能・物性を理解する上で重要であり、さらに木質バイオマスの主要成分であるセルロース・ヘミセルロース・リグニンを分離して利活用する上でも重要である。今回の解析によってLCC由来と考えられる相関ピークを複数同定する事ができ、LCC構造に関する知見が得られた。

L9 タンパク質の構造揺らぎによる機能制御機構

○楯　真一[1]
[1]広島大・院理・数理分子生命理学

Functional modulation of protein through the change in its structure dynamics

○Shin-ichi Tate[1]
[1]Department of Mathematical and Life Sciences, Hiroshima University, Hiroshima, Japan

The protein structure dynamics have been the central issues in exploring the protein function. The significance to the protein structure dynamics, however, has not been clearly seen by experiments due to the severe inter-relation between the structure and dynamics. A mutation to the active site could alter the structure, and it might simultaneously change its dynamics. The functional modulation, thus, cannot be readily ascribed to structure change; it may also be mediated by the change in the active site dynamics, to some extent. The difficulty in discriminating the functional contributions from the structure and dynamics has prohibited studying the roles of protein structure dynamics; although they have been suggested through the various theoretical studies, including molecular dynamics simulation. In this work, we have applied '*distal mutation*' to explore the functional roles of the structure dynamics. This allowed us to see how the protein dynamics role in the function.

Protein structure has a wide variety of motions, ranging from psec to msec time regimes. The structural motions are intimately related to its spatial structure, as revealed by molecular dynamics simulations that show single residue change can alter the dynamics even in the regions distant from the mutation site. This inter-dependency between the structure and its dynamics makes the quantitative elucidation of the functional significance of the structure dynamics elusive; a residue mutation can change both the structure and its dynamics and thus the functional disturbances from them are not clearly discriminated. This also warns that the functional residue identification based on site directed mutations may sometimes mislead the results without considering the dynamics change to the structure, although we conventionally focus solely on the structural aspects. The experimental approaches, thus, for discriminating the functional roles between the structure and its associating dynamics is, thus, essential to enhance our understanding how protein works.

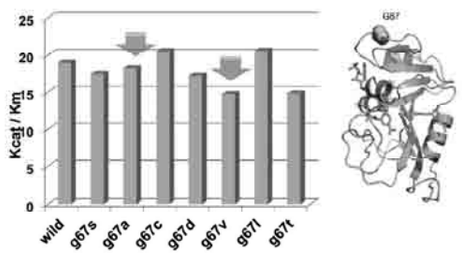


Fig. 1: Distal mutation to G67 alters the enzyme activity of DHFR. [6]

nuclear spin relaxation, protein structure dynamics, DHFR

○たて　しんいち

Our group has been systematically analyzed the effects of the site directed mutations to the distal loops from the active site in dihydrofolate reductase (DHFR) (1, 2). Based on the collected data, we focused on the G67 mutations that have significant functional modulations, Fig. 1. Particularly, G67V mutation had significantly attenuated the enzyme reaction of DHFR. The preceding research has suggested the structural fluctuation of the active site loops should be related to the hydride transfer process happening between cofactor NADPH and ligand dihydrofolate. As a working hypothesis, we thought the G67V mutation may change the active loop dynamics thus reduce the enzyme action. This long-range effect is expected through the disturbance on the dynamic coupling between the active loops and the mutation site, which was evidenced by the normal mode analysis.

The stopped-flow analyses, in collaboration with Prof. Kuwajima in IMS, have shown that G67V mutation had caused 30% reduction in the hydride transfer rate relative to the wild-type. The active loop motions in psec time range were not apparently changed in the G67V mutant, as evidenced by the $^{15}N\{^{1}H\}$ heteronuclear NOE profile compared with the wild-type. The R_2 relaxation dispersion analyses have shown the G67V active loop motions have a triplicate structure transition rate relative to the wild-type, Fig. 2. This enhanced active loop motion is related to the observed reduction in the hydride transfer in the G67V mutant.

In this presentation, I will discuss how the change in the active loop dynamics is related to the activity reduction. I am going to also describe some technical aspects in the R2 dispersion analyses done using the home-written programs adopting genetic algorithms-based optimization.

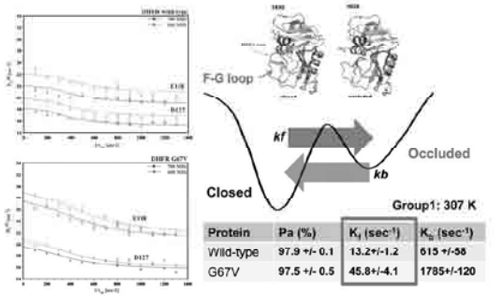


Fig. 2: R_2 relaxation dispersion analyses have shown the structural transition rate of the active loop is enahcned by G67V mutation.

Acknowledgements
This work has been done in collaboration with Prof. Gekko and Dr. Ohmae in Hiroshima University with the aids by Dr. Chiho Murakami and Yuji Wada, the former students in my laboratory. The NMR data used in the early stage of this work were collected in Riken NMR facility.

References

1. Ohmae, E., Iriyama, K., Ichihara, S., and Gekko, K. (1996) Effects of Point Mutations at the Flexible Loop Glycine-67 of Escherichia coli; Dihydrofolate Reductase on its Stability and Function, *Journal of Biochemistry 119*, 703-710.
2. Horiuchi, Y., Ohmae, E., Tate, S., and Gekko, K. (2010) Coupling effects of distal loops on structural stability and enzymatic activity of Escherichia coli dihydrofolate reductase revealed by deletion mutants, *Biochim Biophys Acta 1804*, 846-855.

IL11

Dynamics on the surface of amyloid β protofibrils in solution: Dark-state exchange saturation transfer NMR

Nicolas L. Fawzi[1], Jinfa Ying[1], Rodolfo Ghirlando[2], Dennis A. Torchia[3], and G. Marius Clore[1]

[1]Laboratories of Chemical Physics and [2]Molecular Biology, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, and [3]National Institute of Dental and Craniofacial Research, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland 20892-0520, U.S.A

The exchange between molecules in free solution and bound to the surface of large biomolecules plays a critical role in biological processes. Of particular interest is the formation of aggregates of the amyloid β (Aβ) peptide, linked to neurotoxicity in Alzheimer's Disease. We have introduced a solution NMR technique, Dark-state Exchange Saturation Transfer (DEST), to probe the protofibril-bound form of Aβ at atomic resolution in solution. DEST imprints dynamic information in the bound form and exchange kinetics between monomers and protofibril-bound species onto the easily observed NMR spectrum of the monomer. Slower dynamics for the C-terminal residues of Aβ42 compared to Aβ40 revealed by DEST may explain the former's higher propensity for rapid aggregation and fibril formation. The DEST technique, as well as extensions to observe sidechains for globular protein applications, enables the observation of dynamics at atomic resolution of otherwise invisible 'dark' states and will be applicable to many areas of current interest including the interaction of unfolded proteins with the proteasome and very large chaperones, the binding of soluble proteins to membrane-bound receptors, the formation of low-affinity, large supramolecular complexes, and the folding-upon-binding of intrinsically disordered proteins.

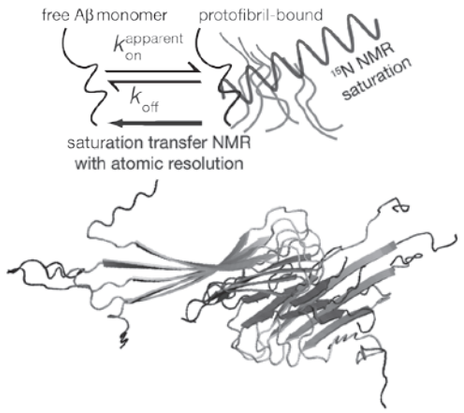


Figure 1. Monomeric amyloid β reversibly binds to amyloid β protofibrils, exchanging between free and bound states with very large differences in ^{15}N-R_2. These differences in R_2 enable Dark-state Exchange Saturation Transfer (DEST) NMR measurements of the dynamics at atomic resolution in the protofibril bound state by observation of monomer resonance attenuations arising from off-resonance ^{15}N saturation.

L10

低安定度定数のMnキレートによるマンガン造影脳機能画像法

○瀬尾　芳輝[1]、森田　啓之[2]、村上　政隆[3]
[1]獨協医大・医・生理学（生体制御）
[2]岐阜大学院・医・生理学
[3]自然科学研究機構・生理研

Manganese-enhanced MRI using intermediate-affinity manganese chelates

○Yoshiteru Seo[1], Hironobu Morita[2] and Masataka Murakami[3]
[1]*Dept of Regulatory Physiology, Dokkyo Medical University School of Medicine, Mibu, Japan*
[2]*Dept of Physiology, Gifu University Graduate School of Medicine, Gifu, Japan*
[3]*National Institute for Physiological Sciences, Okazaki, Japan*

Three manganese chelates (Mn-bicine, Mn-citrate and Mn-HIDA) were nominated as contrast reagents for manganese-enhanced MRI (MEMRI), and tested 1) the relaxation characters in an artificial cerebrospinal fluid and human plasma, 2) the effects on the contractility of the isolated perfused frog heart, 3) the effects on the hemodynamic functions of rats, and 4) the MEMRI of hypothalamic nucleus of rats. Compared with $MnCl_2$ and Mn-bicine solutions, the intravenous infusion of Mn-citrate and Mn-HIDA showed less effect on cardiac functions and neuronal activities in the brain and offered similar T_1 contrasted images. Thus, Mn-citrate and Mn-HIDA both appear to be a better choice for maintaining the vital conditions of experimental animals, and they may also improve the reproducibility of MEMRI.

マンガン造影脳機能画像法(MEMRI)の測定原理をFig. 1に示す。血液あるいは脳脊髄液に投与されたMn^{2+}は、脳実質に浸透し脳神経細胞に達する。脳神経細胞のCa^{2+}チャネルは、神経活動時にCa^{2+}を細胞内に取り込むが、このチャネルはMn^{2+}もまた透過させる。細胞内に入ったMn^{2+}イオンは細胞内液のT_1緩和時間を短縮させる。これをT_1強調MRI法で、脳実質の信号強度の上昇として捉えるのが、MEMRIである。BOLD fMRI法に比べ、高い検出感度を持ち、小動物の脳神経核活動も検出可能である。

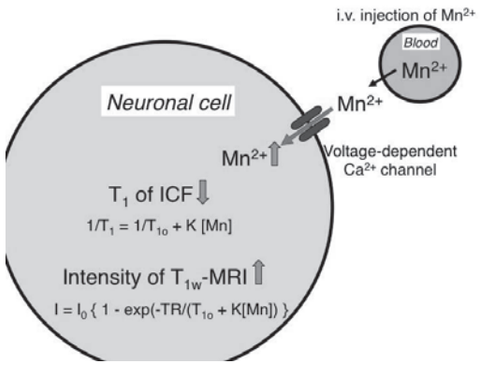


Fig. 1 Basic concept of MEMRI

マンガン、キレート、脳機能画像法、ラット

○ せお　よしてる，もりた　ひろのぶ、むらかみ　まさたか

しかし、$MnCl_2$溶液の投与は、循環器系、脳神経活動に対して強い抑制作用がある。この欠点を改善するために、我々は低安定度定数のMnキレートの利用を考え、Mn-bicine (pKa' = 2.9)、 Mn-citrate (pKa' =4.0)、Mn-HIDA (pKa' = 5.0)を候補として選択した。Fig. 2にMnキレートの解離平衡から推定したMn^{2+}イオン濃度を示す。Mn^{2+}の生理的濃度限界（100 μM）から有害濃度（500 μM）の範囲までに押さえつつ、できるだけ多量のMnを投与するには、Mn-HIDA、Mn-citrateが適切と考えられる。

人工脳脊髄液中での T_1 relaxivity は、いずれも約 4.5 $s^{-1}mM^{-1}$ で大きな差違はなかった。ヒト血漿では、低濃度の Mn-citrate, Mn-HIDA で relaxivity の大きな増加が確認された。Mn^{2+}がアルブミンに競合的に結合したもの考えられる。

カエル単離灌流心では、500 μM以上で心収縮力が有意に低下した。1000 μMではMn-HIDAは$MnCl_2$およびMn-bicineに比べ高い収縮力を示した。

ラットに各キレートの100 mM溶液を5 mL kg^{-1} hr^{-1}の速度で連続的に静脈内投与し、循環器系への影響をみた。$MnCl_2$では血圧は90%程度を保ったが、心拍数は2/3に、腎交感神経活動は半減した。3種のキレートでは、大きな変化はみられなかったが、Mn-bicineでは腎交感神経活動の増加が他よりも大きく。また、脳血管関門を破壊した後には大きく低下した。Mn-citrate、Mn-HIDAでは、大きな変化は認められなかった。

正常な脳では、静脈投与したMnキレートは、脈絡叢の血管から脳脊髄液を経由して脳実質に取り込まれることが確認できた。また、3種のキレートの取り込み速度は、ほぼ同等であった。直径300 μmの視床下部神経核の神経活動を測定したところ、Mn-citrateおよびMn-HIDAで、$MnCl_2$やMn-bicineと同程度の感度で検出できることが確認された。

以上より、$MnCl_2$に比べ、Mn-citrateとMn-HIDAは循環系・自律神経系への影響が小さく、脳実質への取り込み速度やMEMRIの検出感度も同程度で、MEMRI造影剤として利用できることが判明した。

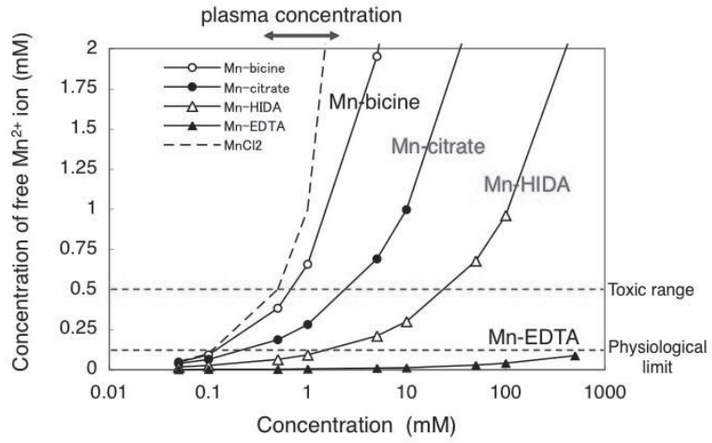


Fig. 2 Mn^{2+} concentration in Mn-chelates solution

文献
1) Morita H et al., Autonomic Neurosciences 113: 43-54 (2004)
2) Seo Y et al., Magnetic Resonance in Medicine 65:1005-1021 (2011)
3) Seo Y et al., Journal of Physiological Sciences 61: 259-266 (2011)
4) Seo Y et al., Mn-citrate and Mn-HIDA: Intermediate-affinity chelates for manganese-enhanced MRI. Contrast Media & Molecular Imaging (in press)

L11

平行型四重鎖ＤＮＡのG-カルテットに挟まれたヘムの電子構造

○山本泰彦[1], 太 虎林[1], 斉藤香織[1], 逸見 光[2], 小林長夫[3]
[1]筑波大院・数理物質
[2]農研機構・食総研
[3]東北大院理

Electronic Structure of Heme Sandwiched between All-parallel G-quadruplex DNAs

○Yasuhiko Yamamoto[1], Hulin Tai[1], Kaori Saito[1], Hikaru Hemmi[2], and Nagao Kobayashi[3]
[1]*Department of Chemistry, University of Tsukuba, Tsukuba, Japan.*
[2]*National Food Research Institute, National Agriculture and Food Research Organization, Tsukuba, Japan.*
[3]*Department of Chemistry, Graduate School of Science, Tohoku University, Sandai, Japan.*

We have demonstrated that heme(Fe^{3+}) is sandwiched between the 3'-terminal G-quartets of G-quadruplex DNAs formed from d(TTAGGG). In this unique complex, heme Fe^{3+} interacts with the eight carbonyl oxygen atoms of two G-quartets, and such an interaction provides a strong and axially symmetric ligand field surrounding the heme Fe^{3+} yielding a heme(Fe^{3+}) low-spin, *i.e.*, $S = 1/2$, species with a highly symmetric heme electronic structure. This finding provides new insights as to the design of the molecular architecture and functional properties of various heme(Fe^{3+})-DNA complexes.

INTRODUCTION A G-quadruplex DNA is composed of stacked G-quartets (inset of Figure 1), each of which involves the planar association of four guanine bases circularly connected through Hoogsteen type base-pairings. We have demonstrated that heme (inset of Figure 1) binds to G-quadruplex DNA formed from d(TTAGGG) to form a stable "heme-DNA complex", which exhibits spectroscopic and functional properties remarkably similar to those of hemoproteins.[1, 2] We found that heme is sandwiched between the 3'-terminal G-quartets of the G-quadruplex DNA.[2]

RESULTS AND DISCUSSION We first characterized the assembly of d(TTAGGG) by ^{1}H NMR. In the spectrum, three signals, a – c, due to the G4, G5, and G6 imino protons, respectively, were observed in the shift region characteristic of a G-quartet, *i.e.*, > 10 ppm (Figure 1A), confirming not only the formation of an all-parallel G-quadruplex DNA, but also the C_4 symmetry of its structure. Upon the addition of a 0.5 equivalent amount of heme(Fe^{3+}), many signals newly appeared in the spectrum (Figure 1B). When the solvent was changed to ^2H_2O, newly appearing signals a' – c', in addition to signals a – c, vanished almost completely (Figure 1C). Exchangeable proton signals a' – c' were assigned to the imino protons of G6, G5, and G4, respectively, on the basis of intramolecular NOEs. Consequently, the G4, G5, and G6 imino proton signals were found to exhibit heme(Fe^{3+})-induced shift changes ($\Delta\delta_{heme}$) of +1.73, +3.83, and +7.47 ppm, respectively. The largest $\Delta\delta_{heme}$ value observed for the G6 imino proton signal clearly indicated that heme(Fe^{3+}) stacks onto the G6 G-quartets in the complex. The $\Delta\delta_{heme}$ value could be interpreted mainly in terms of the shift induced by the ring current of the porphyrin moiety of heme (δ_{ring}) and the paramagnetic shift due to an unpaired electron of heme Fe^{3+} (δ_{para}), the δ_{ring} and δ_{para} contributions to the $\Delta\delta_{heme}$ value being

Heme, Paramagnetic shift, G-Quadruplex DNA

○やまもとやすひこ，たいこりん，さいとうかおり，へんみひかる，こばやしながお

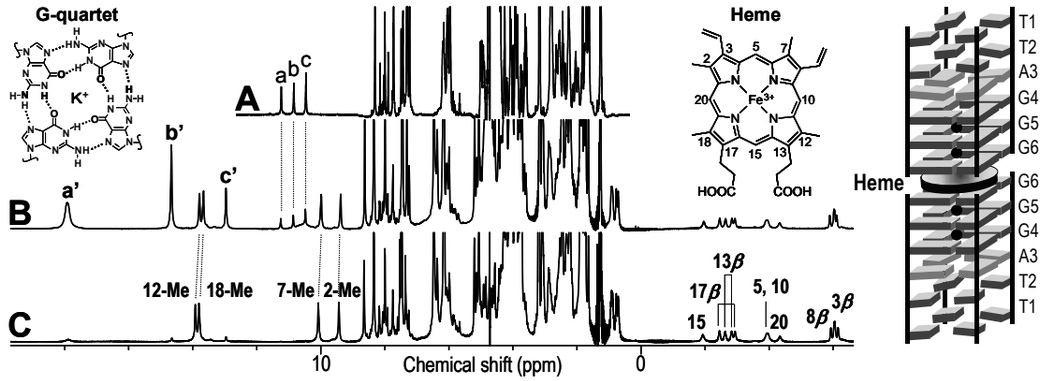


Figure 1. The 600 MHz ^{1}H NMR spectra of G-quadruplex DNA of d(TTAGGG) in the absence (A) and presence (B, C) of 0.5 equiv. of heme(Fe^{3+}) in (A, B) 90% ^1H_2O/10% ^2H_2O or (C) 2% ^1H_2O/98% ^2H_2O, with ~350 mM K^+ at pH 9.80 and 25 °C. The determined structure of a 1:2 heme-DNA complex is illustrated on the right.

negative and positive, respectively. Consequently, observation of positive $\Delta\delta_{heme}$ values for these imino proton signals indicated that the δ_{para} value is more important than the δ_{ring} one for determination of the $\Delta\delta_{heme}$ one.

The downfield-shifted portions of the ^{1}H NMR spectra of the heme(Fe^{3+})-DNA complex with various ^2H_2O contents are compared in Figure 2. In addition to disappearance of the G4 – G6 imino proton signals of both the free- and heme(Fe^{3+})-bound DNAs with increasing ^2H_2O content of the solvent, two features are noticeable as to the effect of the solvent $^1H/^2H$ isotope on the heme methyl proton signals. One is the progressive downfield shifts with increasing ^2H_2O content. The other is that the line widths of the heme methyl proton signals of the heme(Fe^{3+})-DNA complex were affected by the ^2H_2O content, being largest with ^2H_2O contents of ~50%. These subtle, but significant solvent $^1H/^2H$ isotope effects on the NMR spectral parameters of the heme methyl proton signals could be attributed to the effect of the $^1H/^2H$ replacement on the hydrogen bond networks of G6 G-quartets on the heme electronic structure. The heme Fe^{3+} in the present complex can interact with each of the eight carbonyl oxygen atoms of the G6 G-quartets. Simultaneous interaction of the heme Fe^{3+} with all the oxygen atoms possibly provides a strong and axially symmetric ligand field surrounding the heme Fe^{3+}, although the field due to each Fe^{3+}-O interaction may not be necessarily strong. Since the heme methyl proton shift of the complex is affected by the effect of the $^1H/^2H$ replacement on the hydrogen bond networks of the G6 G-quartets, the number of observed signals for a given heme methyl proton, and the deviation in the shifts and intensities of the signals are determined by the probability distribution of the $^1H/^2H$ replacement of the Hoogsteen type base-pairings associated with each G6 G-quartet. This could explain the largest line width of the heme methyl proton signals of the complex observed with ^2H_2O contents of ~50%.

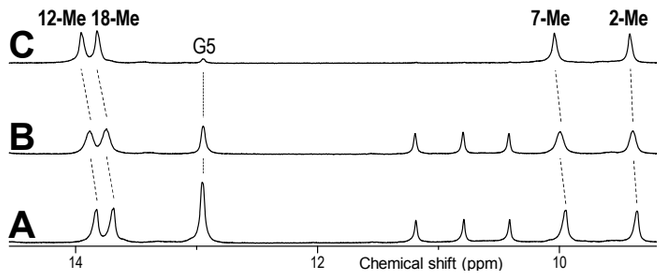


Figure 2. Downfield-shifted portions of the 600 MHz ^{1}H NMR spectra of G-quadruplex of d(TTAGGG) in the presence of 0.3 equiv. of heme(Fe^{3+}) in (A) 90% ^1H_2O/10% ^2H_2O, (B) 50% ^1H_2O/50% ^2H_2O, and (C) 2% ^1H_2O/98% ^2H_2O with ~350 mM K^+ at pH 9.80 and 25 °C. The shifts and line widths of all four heme side chain methyl proton signals were affected by the ^2H_2O content.

REFERENCES

[1] K. Saito *et al*., *J. Biol. Inorg. Chem*. 2012, 17, 437-445.
[2] K. Saito *et al*., *Inorg. Chem*. 2012, 51, 8168-8175.

IL12

New Developments in the ADEQUATE NMR Experiments

R. Thomas Williamson[1], Gary E. Martin[2], Alexei Buevich[3], Misha Reibarkh[1], and Wolfgang Bermel[4]

[1]*Merck & Co. Inc. Discovery and Preclinical Sciences, Process and Analytical Chemistry – Structure Elucidation, Rahway. NJ USA 07065*
[2]*Merck & Co. Inc. Discovery and Preclinical Sciences, Process and Analytical Chemistry – Structure Elucidation, Summit NJ USA 07901*
[2]*Merck & Co. Inc. Discovery and Preclinical Sciences, Process and Analytical Chemistry – Structure Elucidation, Kenilworth, NJ 07033*
[4]*Bruker BioSpin GmbH, Silberstreifen 76287 Rheinstetten Germany*

1. ADEQUATE experiments provide an alternative to the more commonly employed GHMBC experiment for the establishment of long-range heteronuclear connectivities. The 1,1-ADEQUATE experiment allows the unequivocal identification of both protonated and non-protonated carbon resonances adjacent to a protonated carbon. The 1,n-ADEQUATE experiment establishes correlations via an initial $^{1}J_{CH}$ heteronuclear transfer followed by an $^{n}J_{CC}$ out-andback transfer, most typically via three carbon-carbon bonds. Hence, the 1,n-ADEQUATE experiment allows the equivalent of $^{4}J_{CH}$ heteronuclear correlations to be probed when they are not observed in a GHMBC spectrum. Aside from the lower sensitivity of the 1,n-ADEQUATE experiment relative to GHMBC experiments, the interpretation of the former is also complicated by the "leakage" of $^{1}J_{CC}$ correlations into the spectrum that must be identified. A method for the inversion of $^{1}J_{CC}$ correlations to facilitate the interpretation of 1,n-ADEQUATE spectra is presented that allows a single experiment to be performed to access $^{1}J_{CC}$ and $^{n}J_{CC}$ correlation information.

2. The n,1-ADEQUATE experiment begins with an HMBC-type $^{n}J_{CH}$ magnetization transfer, which leads to inherently lower sensitivity than the 1,1- and 1,n-ADEQUATE experiments that begin with a $^{1}J_{CH}$ transfer. This property renders the n,1-ADEQUATE experiment less generally applicable and more difficult to interpret than the 1,n-ADEQUATE experiment, which can in principle afford the same structural information. Unsymmetrical and generalized indirect covariance processing methods can complement and enhance the structural information encoded in combinations of experiments e.g. HSQC-1,1- or 1,n-ADEQUATE. Another benefit is that covariance processing methods offer the possibility of mathematically combining a higher sensitivity 2D NMR spectrum with for example 1,1- or 1,n-ADEQUATE to improve access to the information content of lower sensitivity congeners. The covariance spectrum also provides a significant enhancement in the F_1 digital resolution. The combination of HMBC and 1,1-ADEQUATE spectra is shown here using strychnine as a model compound to derive structural information inherent to an n,1-ADEQUATE spectrum with higher sensitivity and in a more convenient to interpret single quantum presentation (Figure 1).

3. A relatively unexplored and unexploited means of establishing molecular structure, stereochemistry, and probing vicinal bond angles is through the use of long-range ^{13}C-^{13}C coupling constants. The measurement of these multifunctional, diagnostic $^{3}J_{CC}$ couplings has not been reported on sample amounts viable for the practicing organic chemist. We describe here a generalized protocol for the measurement of $^{1}J_{CC}$ and $^{3}J_{CC}$ couplings using a 4.6 mg sample of strychnine as a model compound and demonstrate the utility of DFT calculations for the calculation of these useful molecular descriptors and the congruence of the calculated and experimental data (Figure 2).

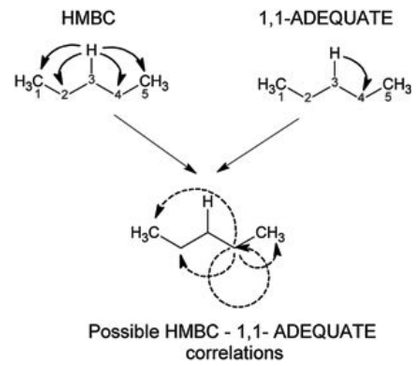


Figure 1. Full set of correlations possible from the $^{2}J_{CH}$ and $^{3}J_{CH}$ correlations in HMBC data that can be observed in the HMBC-1,1-ADEQUATE spectrum. Correlations associated with $^{4}J_{CH}$ HMBC couplings are not shown but are also possible.

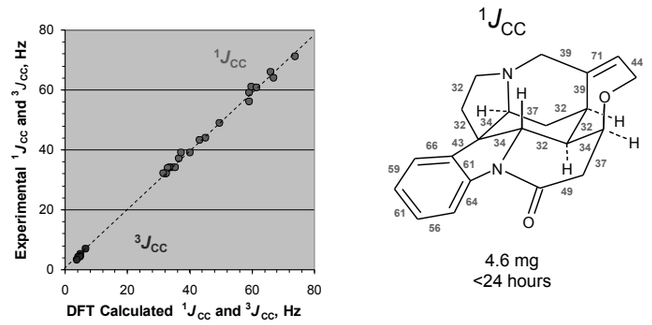


Figure 2. Comparison of the DFT calculated (B3LYP/6-311+G(d,p)) vs. measured $^{1}J_{CC}$ and $^{3}J_{CC}$ coupling constants for strychnine..

L12

^{1}H-^{14}N overtone HMQC above 110 kHz MAS

○Yusuke Nishiyama, Michal Malon, Takahiro Nemoto, Yuki Endo

JEOL RESONANCE Inc., Akishima, Tokyo 196-8558, Japan

We recently developed a very fast MAS system above 110 kHz. Such a very fast sample spinning is exclusively possible by using a brand new MAS probe accommodating sample tubes of outer diameter of 0.75 mm with a sample volume of 290 nL. The small diameter allows us to use a solenoidal micro-coil that achieves very strong rf-field strength of more than 600 kHz for ^{1}H and high sensitivity per unit volume.

In this contribution, we will present the ^{1}H-overtone ^{14}N HMQC correlation at very fast MAS with strong rf field irradiations (Figure 1). The pulse sequence is the same as standard ^{1}H-^{14}N HMQC [1, 2] but the ^{14}N pulses are irradiated with the frequency twice the ^{14}N Larmor frequency. The very fast MAS greatly enhances sensitivity in ^{1}H-overtone ^{14}N HMQC experiments (Figure 2a). This is due to elongated ^{1}H T_2 relaxation times at very fast MAS as previously shown at 70-80 kHz [3]. The long ^{1}H T_2 relaxation times greatly enhance sensitivity of ^{1}H echo-based experiments [4], such as ^{1}H-X HMQC and ^{1}H-^{1}H INADEQUATE [5]. The strong overtone ^{14}N rf-irradiation also contributes to sensitivity enhancement (Figure 2b). The ^{14}N DQ coherence is directly manipulated by these overtone ^{14}N irradiations. This transition is forbidden in first order but weakly allowed under the presence of quadrupolar interactions [6, 7]. Thus the overtone ^{14}N nutation is very slow, therefore strong rf-irradiation is required.

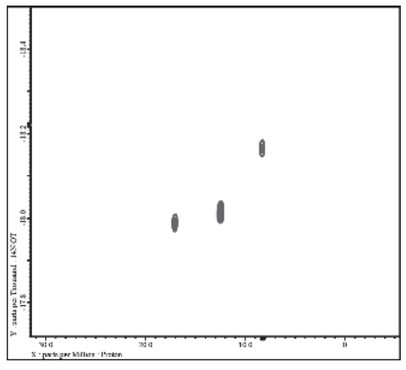


Figure 1 ^{1}H-overtone ^{14}N HMQC of L-histidine•HCl at 70 kHz MAS.

The ^{1}H-overtone ^{14}N HMQC at very fast MAS has several advantages over ^{1}H-double-quantum (DQ) / single-quantum (SQ) ^{14}N HMQC and direct overtone ^{14}N observation [8].

1) The overtone ^{14}N spectra are free from the first order quadrupolar broadening thus the fine adjustment of the magic angle is not required.
2) The indirect detection of overtone ^{14}N spectra does not show spinning frequency dependent shifts which is observed in the direct observation of overtone ^{14}N MAS spectra [7].
3) The ^{1}H-overtone ^{14}N HMQC gives higher sensitivity than ^{1}H-DQ ^{14}N HMQC.
4) The arbitrary spectral width of the overtone ^{14}N dimension can be used, since there is no need to synchronize the indirect dimension to sample spinning.
5) The very fast MAS greatly improves the efficiency of ^{1}H-overtone ^{14}N HMQC.

The 0.75 mm MAS system helps us to efficiently observe ^{1}H-overtone ^{14}N HMQC spectra with the help of microcoil system and very fast MAS above 110 kHz.

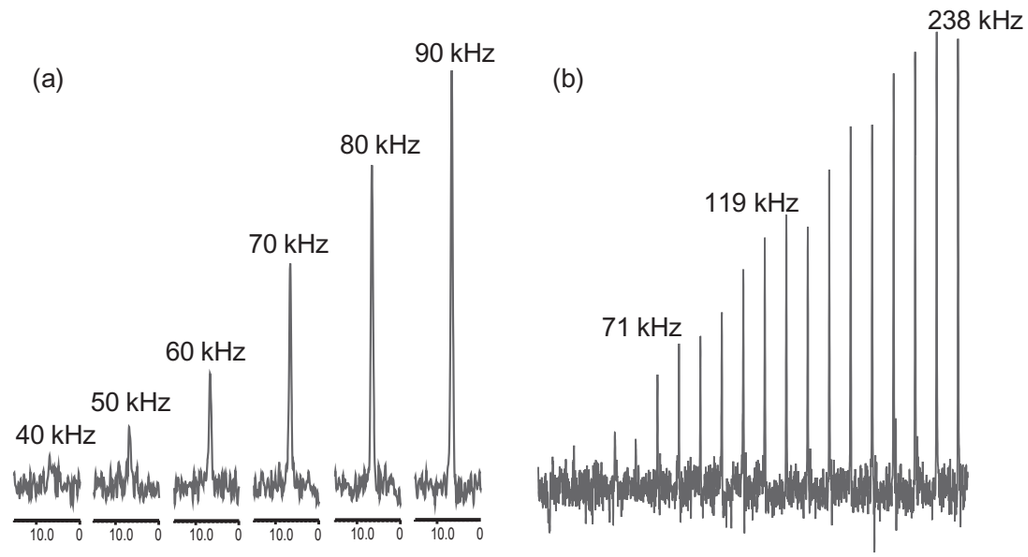


Figure 2 ^{1}H-overtone ^{14}N HMQC filtered ^{1}H NMR spectra of glycine at (a) various spinning frequencies and (b) various overtone ^{14}N rf-field strengths. The spectra were obtained with HMQC sequence with t_1=0. The nominal ^{14}N rf-field strengths are calibrated by ^{2}H NMR nutation experiments with $^{2}H_2O$.

References

[1] Z. Gan, *J. Am. Chem. Soc.* 128 (2006) 6040-6041.

[2] S. Cavadini, A. Lupulescu, S. Antonijevic, G. Bodenhausen, *J. Am. Chem. Soc.* 128 (2006) 7706-7707.

[3] Y. Nishiyama, Y. Endo, T. Nemoto, H. Utsumi, K. Yamauchi, K. Hioka, T. Asakura, *J. Magn. Reson.* 208 (2011) 44-48.

[4] Y. Nishiyama, X. Lu, J. Trebosc, O. Lafon, Z. Gan. P.K. Madhu, J.-P. Amoureux, *J. Magn. Reson.* 214 (2012) 151-158.

[5] M. Deschamps, F. Fayon, S. Cadars, A.-L. Rollet, D. Massiot, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 13 (2011) 8024-8030.

[6] R. Tycko, S.J. Opella, *J. Am. Chem. Soc.* 108 (1986) 3531-3532.

[7] R. Tycko, S.J. Opella, *J. Chem. Phys.* 86 (1987) 1761-1774.

[8] L.A. O'Dell and C.I. Ratcliffe, *Chem. Phys. Lett.* **514** (2011) 168-173.

very fast MAS, overtone 14N, micro coil

○にしやまゆうすけ、みはるまろにゅ、ねもとたかひろ、えんどうゆうき

L13

アルミノケイ酸塩の^{29}Si NMRの常識を破る：J分解法とCPMG測定からの情報

○薛　献宇，神崎　正美
岡大・地球物質研セ

Breakdown of a common notion for ^{29}Si NMR of aluminosilicates: Information from J-resolved and CPMG measurements

○Xianyu Xue, and Masami Kanzaki
Institute for Study of the Earth's Interior, Okayama University, Misasa, Tottori, Japan

Aluminosilicates like zeolites consist of tetrahedral Si/Al (T) each linked via oxygens to four other Si/Al (Q^4). Each crystallographically unique T site is commonly assumed to give at most five ^{29}Si MAS NMR peaks, corresponding to Si units linked to nSi and (4-n)Al (n=0-4), i.e. Si(nSi). Our study on (^{29}Si-enriched) K-cymrite ($KAlSi_3O_8 \cdot H_2O$) that has one unique T (Si/Al) site (Q^4), however, revealed eight ^{29}Si MAS NMR peaks. These peaks are attributable, via ^{29}Si J-resolved and CPMG experiments, to Si(nSi)(n=0-4), with two peaks each for n=1-3. The latter corresponds to different permutations of the nSi(4-n)Al over neighboring T sites of two distinct Si-O-T angles. Si-Al permutation over neighboring T sites of unequal Si-O-T angles, though neglected thus far, is another potential cause for multiple ^{29}Si NMR peaks. CPMG, with good sensitivity, is useful for revealing the J-multiplet patterns of weak peaks.

Introduction

^{29}Si MAS NMR is a well-established tool for quantitative characterization of Si-Al distributions in crystalline and amorphous aluminosilicates. For framework aluminosilicates such as zeolites, each tetrahedrally coordinated (T) Si/Al is linked to four other Si/Al (Q^4). It has commonly been assumed that each crystallographically unique T site gives at most five peaks with chemical shift spacing of ~ 5 ppm, corresponding to Si with nSi and (4-n)Al NNN (n=0 to 4; abbreviated as Si(nSi) hereafter). Recently, we have carried out a detailed one- and two-dimensional (2D) ^{29}Si MAS NMR study [2] on a high-pressure silicate mineral, K-cymrite ($KAlSi_3O_8.H_2O$) that possesses a double-layered structure with all Si/Al distributed in one crystallographic T site (Q^4) (Fig. 1). We have shown, for the first time, that more than five ^{29}Si MAS peaks are resolved despite of a single unique T site; these peaks can be attributed, through 2D J-coupling mediated through-bond NMR experiments (INADEQUATE and J-resolved spectroscopy), to Si(nSi)(n=0 to 4) in K-cymrite, with two peaks each (~2 ppm chemical shift difference) for n= 1 to 3 corresponds to different permutations of the nSi(4-n)Al over neighboring T sites of two distinct Si-O-T angles (139° and 180°)[2]. These results along with new information from additional ^{29}Si NMR measurements using CPMG and $SR26_4^{11}$ sequences will be described here.

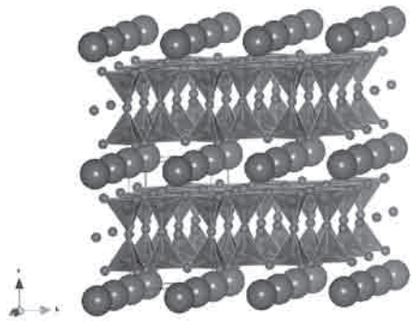


Fig. 1. Crystal structure of K-cymrite ($KAlSi_3O_8 \cdot H_2O$)[1], showing the tetrahedral double-layers that are linked together by K^+. H_2O molecules reside in the cages within the double-layers (H atoms not shown).

aluminosilicate, J-resolved spectroscopy, CPMG

○しゅえ　しゃんう，かんざき　まさみ

Experimental

95.65% ^{29}Si-enriched K-cymrite ($KAlSi_3O_8.H_2O$) was synthesized from a hydrous $KAlSi_3O_8$ glass (containing nominally 6.3 wt% H_2O) in a sealed Pt capsule at 5 GPa and 800°C for 2 hr. using a Kawai-type multi-anvil press. Phase identification has been confirmed by powder X-ray diffraction and NMR spectroscopy.

NMR spectra have been acquired using a 9.4 T Varian Unity-Inova spectrometer with a 1.6 mm T3 MAS probe at a spinning rate of 30 kHz. The ^{29}Si and ^{1}H chemical shifts are reported relative to TMS.

Results and Discussion

The ^{1}H→^{29}Si cross-polarization (CP) MAS NMR spectra acquired with contact times of 0.25 to 20 ms all show six main peaks at -108.8, -104.6, -102.5, -100.3, -98.2 and -94.1 ppm, and a weaker peak of comparable width near -90.6 ppm (peaks 1 to 7) (Fig. 2). There is also a very weak broad peak near -88 ppm (barely visible) that is likely due to minor coexisting hydrous phase (e.g. glass). To ascertain whether the main peaks all belong to the K-cymrite structure, 2D ^{29}Si through-bond and through-space double quantum (DQ) - single quantum (1Q) correlation experiments were also carried out using the refocused-INADEQUATE and $SR26_4^{11}$ sequence respectively, following ^{1}H→^{29}Si CP. Cross peaks among all six main peaks were clearly observed, suggesting that all of them belong to the same structure (K-cymrite). Differences in relative intensities were observed between the two spectra, reflecting different dependencies on structural parameters (e.g. Si-O-Si angles) for J couplings and dipolar couplings.

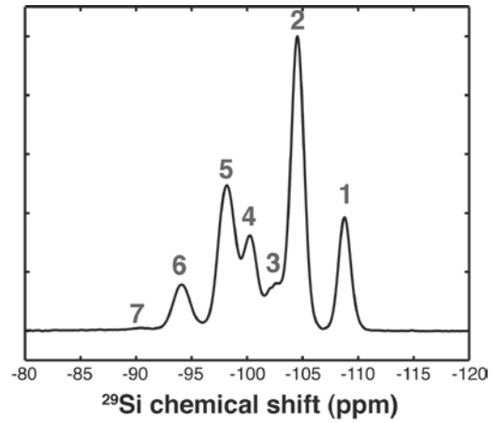


Fig. 2 {^{1}H}^{29}Si CPMAS spectrum (30 kHz MAS, 20 ms contact time).

Further peak assignment was made possible through 2D ^{29}Si homonuclear J-resolved experiment using a z-filtered spin echo sequence following ^{1}H→^{29}Si CP (Fig. 3). The observed multiplet patterns due to $^{2}J_{Si\text{-}O\text{-}Si}$ couplings are consistent with the assignment of the six main peaks in increasing frequency (peak 1 to 6) to Si linked (via oxygens) to 4Si ($3J_1+1J_2$), 3Si($2J_1+1J_2$), 3Si($3J_1$), 2Si($1J_1+1J_2$), 2Si($2J_1$) and 1Si(J_1) respectively, where J_1 = 8~9 Hz and J_2 = 13~15 Hz. Considering that each T site is linked to three T (within the same layer) of identical T-O-T angles (139°), and one T (across the double-layer) of larger T-O-T angle (180°), and that $^{2}J_{Si\text{-}O\text{-}Si}$ are in general known to increase with increasing Si-O-Si angle, the above observation can be unambiguously explained by the presence of two peaks each (~2 ppm difference) for Si(2Si) and Si(3Si), corresponding to different permutations of the nSi(4–n)Al among the four neighboring T sites (with/without all Si residing in the same layer). In principle, two peaks may also be expected for Si(1Si), although only one peak near -94.1 ppm with an estimated J_1 of 7.8 Hz, attributable to Si with one neighboring Si within the same layer, is observed. The lack of a separate peak of a larger J_2 coupling constant for Si(1Si) with

one neighboring Si cross the double-layer may be explained by the small population of Si(1Si) unit, coupled with smaller probability for the neighboring Si to be located across the double-layer than within the same layer (1:3 if randomly distributed).

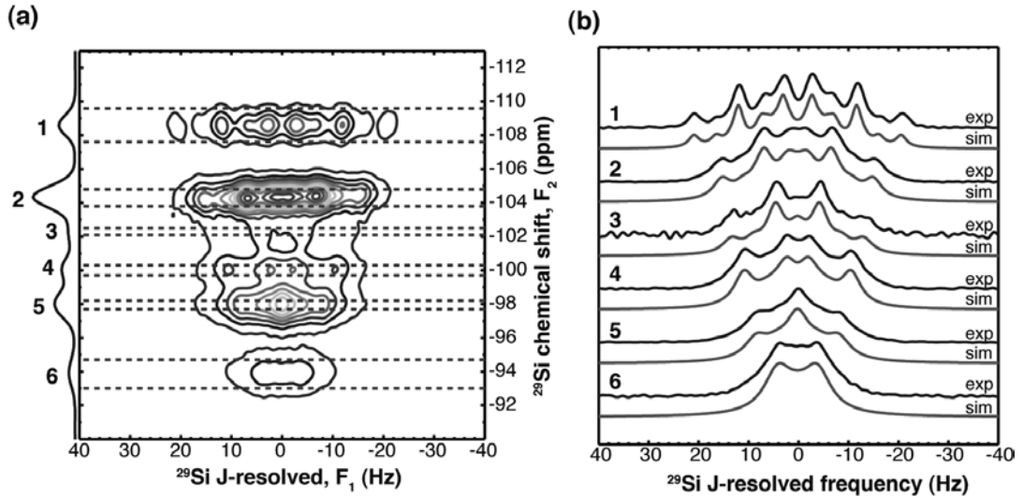


Fig. 3. $\{^1H\}^{29}Si$ CP-homonuclear J-resolved spectrum acquired with a z-filtered spin echo sequence (30 kHz MAS, 20 ms contact time, 20 μs z-filter)(left), and F1 partial projections for each F2 peak and the corresponding simulations underneath (right).

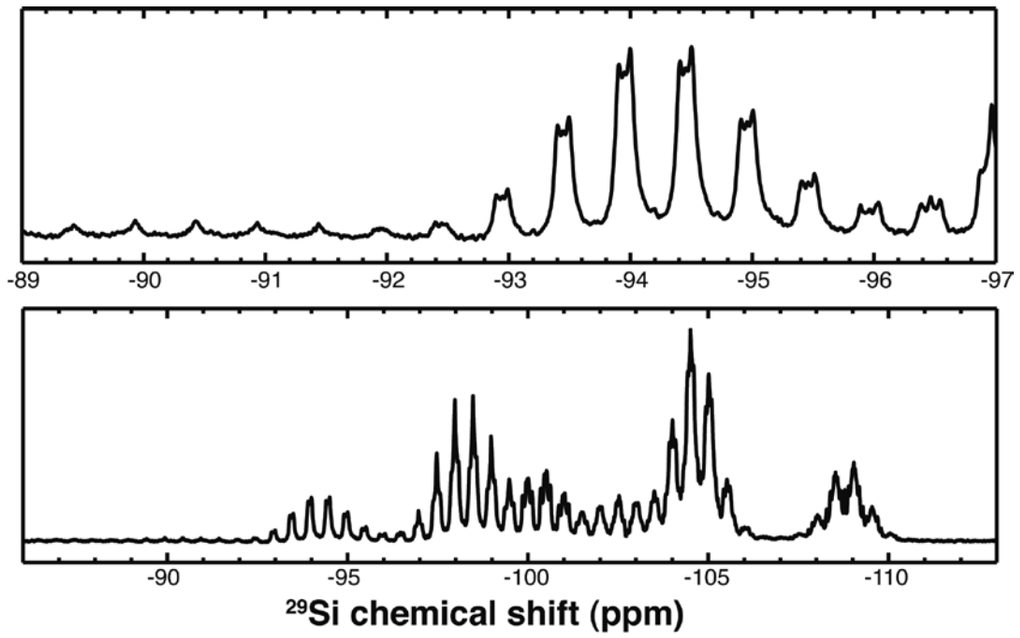


Fig. 4. $\{^1H\}^{29}Si$ CP-CPMG spikelet spectrum (30 kHz MAS, 20 ms contact time, 100 CPMG cycles with a length of 25 ms)(bottom). The multiplet patterns for individual spikelets are due to J couplings. Also shown at the top is the expanded view between -89 to -97 ppm. Note the larger peak splitting for the spikelet near -96 ppm than those near -94 ppm and the lack of splitting for spikelets near -90 ppm.

The $\{^1H\}^{29}Si$ CP-CPMG measurement confirmed the above inference. Shown in Fig. 4 is the 1D $\{^1H\}^{29}Si$ CP-CPMG spikelet spectrum. Individual spikelets show multiplet patterns due to ^{29}Si homonuclear J couplings. Of particular interest is the doublet pattern with a larger splitting (~ 12Hz) near the position (~ -96 ppm) expected for the weak peak of Si(1Si) J-coupled to another Si across the double layer (denoted peak 8) than those of the main Si(1Si) peak near -94 ppm. Also, the very weak spikelets near -90 ppm show no peak splitting, consistent with the assignment of peak 7 to Si(0Si).

The J multiplet patterns may also be viewed in the 2D $\{^1H\}^{29}Si$ CP-CPMG spectrum (Fig. 5) obtained by 2D Fourier transformation of the CPMG echo trains. Although the F1 spectral width is too narrow for the wider patterns of peaks 1 to 3, the multiplet patterns for peaks 4 to 6 as well as for the much weaker peaks 7 and 8 are clearly revealed. As the CPMG echo train is obtained in a 1D experiment and thus yields good S/N ratio, it is particularly useful for revealing J patterns for weak peaks like peaks 7 and 8.

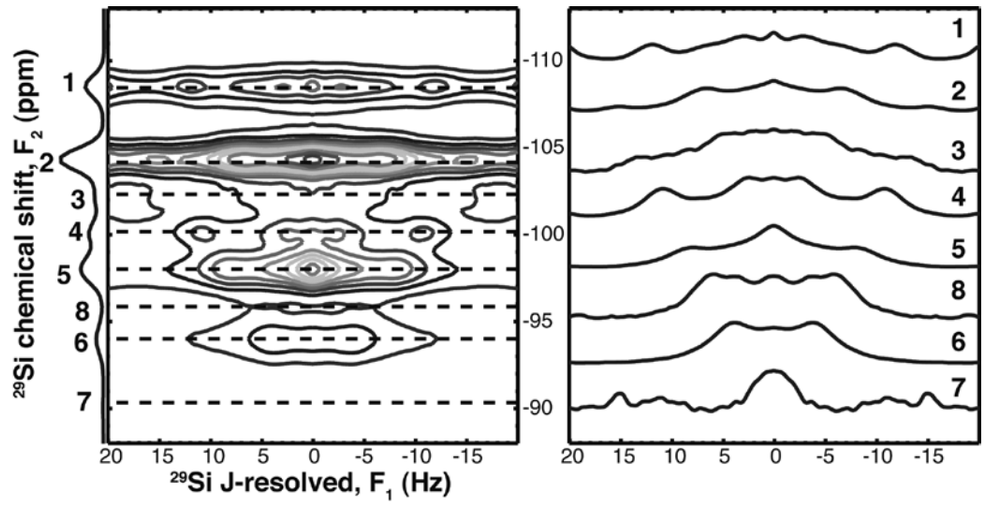


Fig. 5. 2D $\{^1H\}^{29}Si$ CP-CPMG spectrum (same data as Fig. 4)(left), and F1 cross sections (right). Note the larger J splitting for peak 8 than peak 6 and lack of splitting for peak 7.

Multiple peaks due to Si-Al permutation over neighboring T sites of unequal Si-O-T angles, has not been reported previously despite the extensive application of ^{29}Si MAS NMR to the study of Si-Al distribution in framework aluminosilicates (e.g. zeolites). It is only the more direct 2D homonuclear J-resolved experiments that rendered such unambiguously observation possible. This study has thus demonstrated for the first time that the variation in Si-O-T angles around a Si(nSi) unit not only affects its mean chemical shift, but may also result in multiple peaks. The phenomenon may be ascribed to different dependencies of ^{29}Si chemical shift on the Si-O-Si and Si-O-Al angles. Similar peak splitting for a given Si(nSi) in a single unique T site likely also occurs to other (framework, sheet or chain) aluminosilicate materials with markedly unequal T-O-T angles around the T site, and should be examined by direct J-coupling mediated NMR experiments to prevent misinterpretation.

References

[1] Fasshauer, D.W., Chatterjee, N.D., and Marler, B. (1997) Phys Chem Minerals, 24, 455-462.

[2] Xue, X.Y. and Kanzaki, M. (2012) J Phys Chem C, 116, 10714-10722.

IL13

Following Function in Real Time: New NMR and MRI Methods for Studying Structure and Dynamics in Batteries, Fuel Cells and Supercapacitors

Clare P. Grey[1,2]

[1]*Department of Chemistry, University of Cambridge, Cambridge, UK*

[2]*Department of Chemistry, Stony Brook University, Stony Brook, USA*

cpg27@cam.ac.uk

A full understanding of the operation of a battery, battery and fuel cell requires that we utilize methods that allow devices or materials to be probed while they are operating (i.e., *in-situ*). This allows, for example, the transformations of the various cell components to be followed under realistic conditions without having to disassemble and take apart the cell. To this end, the application of new *in* and *ex-situ* Nuclear Magnetic Resonance (NMR) and magnetic resonance imaging (MRI) approaches to correlate structure and dynamics with function in lithium-ion and lithium air batteries, fuel cells membranes and supercapacitors will be described. The *in-situ* approach allows processes to be captured, which are very difficult to detect directly by ex-situ methods. For example, we can detect side reactions involving the electrolyte and the electrode materials, sorption processes at the electrolyte-electrode interface, and processes that occur during extremely fast charging and discharging. Ex-situ NMR investigations allow more detailed structural studies to be performed to correlate local and long-range structure with performance in both batteries and fuel cell materials.

In this talk, I will describe the use of NMR spectroscopy to probe local structure changes in lithium ion batteries focusing on our work with the anode material Si, on lithium air cathodes, and to investigate Li dendrite formation in lithium metal batteries. Finally, the application of NMR to examine double layer formation in electrolytic double layer capacitors (supercapacitors) will be described.

L14 In-situ 光照射固体 NMR による光受容膜タンパク質の光反応サイクルと光励起構造変化の解析

○ 内藤　晶[1]，友永雄也[1]、日高徹郎[1]、宮佐亮太[1]、川村　出[1]、須藤雄気[2]、沖津貴志[3]、和田昭盛[3]、加茂直樹[4]
[1]横浜国大・院工、[2]名古屋大・院理、[3]神戸薬大、[4]松山大薬

Photo reaction cycle and photo-activated structural changes of photoreceptor membrane proteins as reveled by *in situ* photoirradiated solid-state NMR

○Akira Naito[1], Yuya Tomonaga[1], Tetsurou Hidaka[1], Ryota Miyasa[1], Izuru Kawamura[1], Yuki Sudo[2], Takashi Okitsu[3], Akimori Wada[3], Naoki Kamo[4]
[1]*Graduate School of Engineering, Yokohama National University, Yokohama, Japan.*
[2]*Graduate School of Science, Nagoya University, Nagoya, Japan.*
[3]*Department of Organic Chemistry for Life Science, Kobe Phamaceeutical University, Kobe, Japan.*
[4]*College of Pharmeutical Science, Matsuyama University, Matsuyama, Japan.*

A novel *in situ* photoirradiation system for solid-state NMR measurements is developed and demonstrated to successfully identify the M-photointermediate of pharaonis phoborhodopsin (*p*pR or sensory rhodopsin II) and the complex with transducer (*p*pR/*p*HtrII), and D96N mutant of bR. The ^{13}C NMR signals from [20-^{13}C]retinal-*p*pR and *p*pR/*p*HtrII revealed that multiple M-intermediates with 13-*cis*, 15-*anti* retinal configuration coexisted under the continuously photoirradiated condition and one of them turned out to be N-state. The M-intermediates were also detected in the system of [ε-^{15}N]Lys-D96N mutant of bR where the life time of the photointermediate is much longer than that of the wild type bR. Here, we demonstrated the detection of the photoactivated retinal in photoreceptor membrane proteins provide insights into the process of photo reaction cycles.

Introduction

Membrane proteins play important roles as transporter or signal transduction. Retinal proteins usually absorb photon to generate photo-isomerization, and consequently change the structure and dynamics of proteins. In order to generate retinal isomerization, we have developed the photo-irradiation system equipped to the solid-state NMR spectrometer (1).

Pharaonis phoborhodopsin (*p*pR or sensory rhodopsin II) is a negative phototaxis receptor of *Natronomonus* pharaonis and forms a 2:2 complex with the cognate transducer (*p*HtrII), which transmits the photosignal into cytoplasm. Light absorption of *p*pR initiates *trans-cis* photo-isomerization of the retinal chromophore followed by cyclic chemical reaction consisting of several intermediates (K, L, M and O). The M intermediate is thought to be an active state for signal transduction.

In-situ photoirradiated solid-state NMR、photoreceptor membrane proteins、photo cycle

○ないとうあきら，こうだだいすけ、ともながゆうや、ひだかてつろう、みやさりょうた、かわむらいずる、すどうゆうき、おきつたかし、わだあきもり、かもなおき

Photoirradiated solid-state NMR experiments have been reported by several groups. Most of the experiments have been done the photo-illumination outside of the probe and freeze the sample to measure the trapped photo-activated state in the probe (2, 3). *In situ* photo-illuminated solid state NMR system has been reported by illuminating the light by leading the light through photo fiber to the probe and illuminate the light from outside the rotor tube (4,5). On the other hand, in this present system, light illumination has been done from the inside the rotor tube though glass rod inserted into the rotor. This illumination system has been developed in the first time and allows us to illuminate the light to the sample with extremely high efficiency (1).

We have successfully trapped and observed the M intermediates of *p*pR, *p*pR/*p*HtrII and D96N-bR membrane proteins by using a newly developed photoirradiated solid-state NMR system because the life times of the M-intermediates are much longer than the other intermediates.

Materials and Methods

[15-^{13}C, 20-^{13}C]retinal-*p*pR with a His-Tag (6xHis) at the C-terminal was expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3) strain in M9 medium by induction with 1 mM isopropyl-1-thio-β-D-galactoside (IPTG) and 10 μM [15-^{13}C, 20-^{13}C] retinal. This protein was solubilized by using n-dodecyl-β-D-maltoside (DDM) and purified with a Ni-NTA column (QIAGEN, Hilden, Germany). The truncated transducer, *p*HtrII(1-159), was prepared by using the above method. Purified proteins in DDM micelles were incorporated into a lipid film of egg PC (*p*pR:eggPC molar ratio of 1:30), followed by gently stirring at 4 ºC for overnight. DDM was removed using Bio-Beads (Bio-RAD, Hercules, CA) to yield egg PC bilayers. Reconstituted suspensions were concentrated by centrifugation and suspended in 5 mM 2-[4-(2-Hydroxyethyl-1-piperizinyl) ethanesulfonic acid (HEPES), 10 mM NaCl buffer solution (pH 7). The pelleted samples of *p*pR and a complex of 1:1 mole ratio of *p*pR:*p*HtrII embedded in egg PC bilayers were placed in a 5.0 mm outer diameter (o.d.) zirconia pencil-type rotor for MAS solid-state NMR experiments.

We have developed an *in situ* photo-irradiation system for solid-state NMR measurements under MAS. *In situ* continuous photo-irradiation was made by an optical fiber from outside the magnet through a tightly sealed piece of cap made of glass rod glued to a zirconia rotor (Fig. 1).

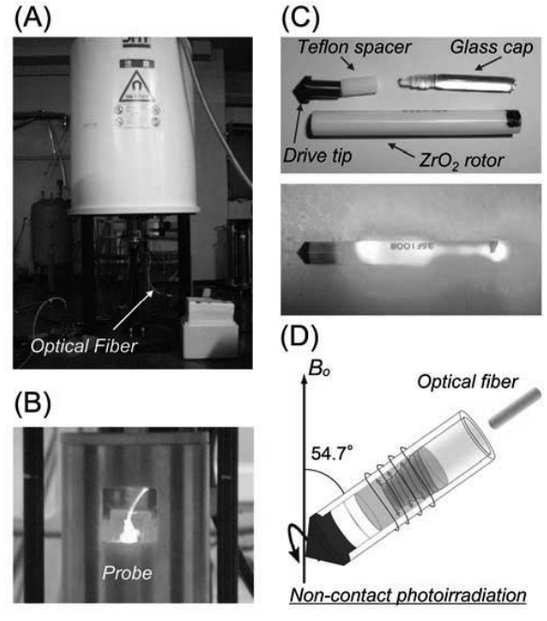


Fig. 1 *In situ* photoirradiated solid state NMR apparatus.

Photo-irradiation was performed from the top of the spinner without touching the optical-fiber to the cap of the spinner. In this system, fast MAS experiment is possible under photo-illumination (*in situ* experiments), leading to a high resolution solid-state NMR signal. Thus the MAS frequency was set to 4 kHz. Tip of the glass was ground to irradiate the light to random directions including the perpendicular direction to the glass rod. This is important for light to penetrate into the sample whose absorbance is quite large. Using CMX-400 infinity NMR spectrometer equipped with this photo-irradiation system, we could successfully irradiate green LED light (520 nm) of 50 mW to the sample in the rotor.

In the *in-situ* solid state NMR measurements, 100μL (50 mg) of *p*pR-Egg PC and *p*pR/*p*HtrII-Egg PC samples were put into the zirconia rotor and sealed with the glass rod as a cap. CP pulse sequence was used with the 1ms of contact time followed by the acquisition with 50 kHz of TPPM proton decupling pulses. MAS frequency was set to 4 kHz and the temperature was set to 0 and -20 ºC by using gas flow system. Typically, 20000 transients were accumulated for the dark and light experiments.

Results and Discussion

Trapping of M-intermediates in *p*pR/*p*HtrII

In situ photo-irradiated cross-polarization (CP) MAS solid-state NMR experiments were performed on a sample under near physiological condition such as [15-^{13}C, 20-^{13}C]retinal-*p*pR in egg PC at 0 ºC and -20 ºC (Fig. 2). In addition to the long lifetime for the M(390)-intermediate (1.7 s), relatively long lived O(560) intermediate (0.77 s) can be irradiated by 520 nm light. It is, therefore, expected for only M intermediate to be trapped under the continuous photo-irradiation condition. In the G-state, a peak of 20-C in retinal appeared at 13.5 ppm and the signal shifted to 22.4 ppm for the M-intermediate at 0 ºC (Fig. 2A). At least three distinct M intermediates appeared at 24.1, 22.5, and 21.7 ppm in *p*pR under the photo-irradiated condition at -20 ºC (Fig. 3C). The yields of overall M-intermediates were measured to be 40% and 80 % at 0 and -20 ºC, respectively. This difference in their yields can be attributed to a longer lifetime of the M-intermediate at a low temperature than that at a high temperature. It is important to point out that the single peak with a shoulder observed for the M-intermediate at 0 ºC,

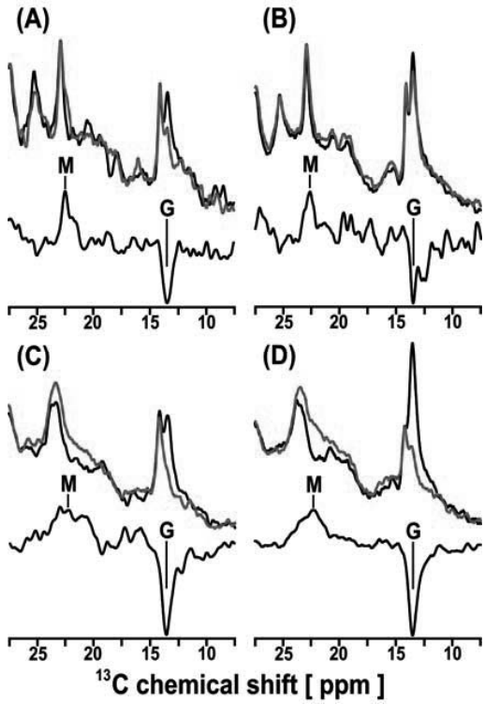


Fig. 2 ^{13}C CP-MAS NMR spectra of [20-^{13}C]retinal *p*pR (A and C) and *p*pR/*p*HtrII complex (B and D). (Top spectra) Data obtained from the light (brown) and dark (black) states of ppR (A and C) and *p*pR/*p*HtrII complex (B and D). (Bottom spectra) Difference between those of light (brown) and dark (black) spectra.

while multiplet lines were observed at -20 ºC. These multiplet signals can be attributed to the coexistence of several different interactions between the retinal and protein.

The M-intermediates were also trapped for the [15-^{13}C, 20-^{13}C] retinal-*p*pR/*p*HtrII complex that has a signal transduction function as revealed by the appearance of a CP MAS ^{13}C NMR peak at 22.6 ppm at 0 ºC (Fig. 2B) and three distinct peaks at 23.5, 22.3, and 21.3 ppm at -20 ºC. Thus multiple M-intermediates (M_1, M_2, M_3) were also observed in the *p*pR/*p*HtrII complex at -20 ºC (Fig. 2D). The chemical shift values of [20-^{13}C]retinal in the M-intermediate of *p*pR distribute more widely and lower field than those of *p*pR/*p*HtrII complex. This observation reveals that the interaction of retinal with sole *p*pR is different from that with the *p*pR/*p*HtrII complex.

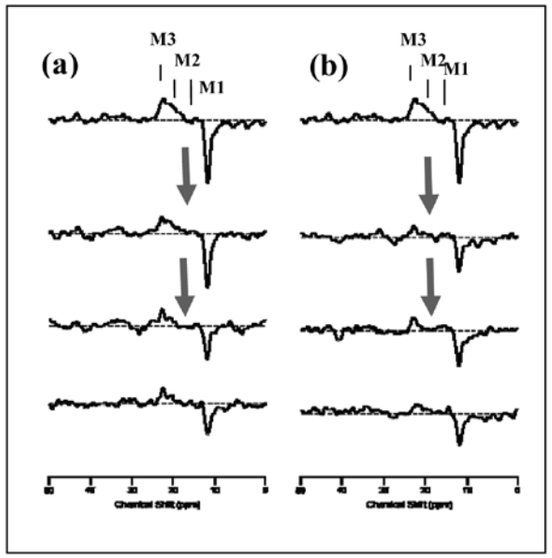


Fig. 3 Decay processes of M-intermediates under dark (a) and blue light illumination (b).

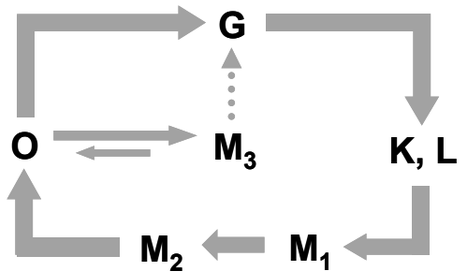


Fig. 4 New photo reaction cycle

After the M-intermediates were fully trapped, we have switched the light from 520 nm to 365 nm. Interestingly, M_1 and M_2 decayed rapidly, while M_3 decayed slowly (Fig. 3b). On the other hand, M_1 and M_2 did not decay rapidly under the dark condition (Fig. 3a). These results indicate that M_3 is not the family of M-intermediates, but most probably is N state as shown in the photo cycle of Fig. 4.

Trapping of M-intermediates in D96N-bR

We have also successfully trapped the M-intermediate in [ε-^{15}N]Lys-D96N-bR by observing the ^{15}N NMR signal of ε-^{15}N-Lys216 of D96N-bR at 300 ppm, because the life time of it is fairly long as compared to that of bR.

References

1.Tomonaga, Y., T. Hidaka, A. Naito (2011) Biophys. J. 101: L50-L52.
2. Farrar, M.R., K.V. Lakshmi, …, J. Herzfeld. (1993) *Biophys. J.* 65:310-315.
3. Crocker, E., M. Eilers, …, S.O. Smith. (2006) *J. Mol. Biol.* 357:163-172.
4. Hu, J.G., B.Q. Sun, …, J. Herzfeld. (1997). *Biochemistry.* 36:9316-9322.
5. Conciste, M., A. Gansmuller, M.H. Levitt. (2008) *J. Am. Chem. Soc*. 130:10490-10491.

L15

フラグメントアセンブリーに基づく固体NMRスペクトル再構成による非結晶タンパク質の自動信号帰属および二次構造決定

○池田恵介[1,2], 江川文子[1], 林こころ[3], 児嶋長次郎[1], 藤原敏道[1]
[1]阪大・蛋白研
[2]富大院・医薬
[3]奈良先端大・バイオ

Automated Signal Assignment and Secondary Structural Analysis of Non-Crystalline Proteins by Fragment-Based Solid-State NMR Spectral Reconstruction

○Keisuke Ikeda[1,2], Ayako Egawa[1], Kokoro Hayashi[3], Chojiro Kojima[1], and Toshimichi Fujiwara[1]
[1]*Institute for Protein Research, Osaka University, Suita, Japan.*
[2]*Graduate School of Pharmaceutical Sciences, University of Toyama, Toyama, Japan.*
[3]*Graduate School of Biological Sciences, Nara Institute of Science and Technology, Ikoma, Japan.*

Signal overlap in solid-state NMR spectra is a major obstacle for the structural analysis of uniformly isotope-labeled proteins especially in the non-crystalline state. We present a method for estimating ^{13}C chemical shifts of the proteins for the secondary structural analysis from unresolved spectra. A database of fragmented protein structures with chemical shifts was exploited for expressing a whole chemical shift of a target protein and calculating spectra. The simulated spectra were automatically optimized to quantitatively fit experimental spectra by searching a combination of the peptide fragments. Test simulations provided the accurate prediction of $^{13}C^{\alpha}$, $^{13}C^{\beta}$, and $^{13}C'$ chemical shifts and secondary structures as functions of amino acid residues. We applied the procedure to the spectra of lyophilized ubiquitin and *N. pharaonis* Halobacterial transducer II (*Np*HtrII) in lipid bilayers.

非結晶タンパク質の^{13}C-MAS固体NMRスペクトルでは、試料中に存在する不均一な分子間相互作用や構造を平均化する分子運動の抑制によって、^{13}C核で線幅が1～2 ppm程度に広がる。この信号の広幅化のよって起こるスペクトル上のピークの重なりのため、特に均一同位体標識タンパク質において信号帰属が困難になることが多い。これを解決するのに選択標識や試料の結晶化などが行われているが、試料調製のコストや結晶化しないタンパク質に不適であることなどが依然問題となる。本発表では、凍結乾燥粉末や脂質二重膜中の非結晶タンパク質の[^{13}C, ^{15}N]均一標識試料の測定で得られた分解能の低いスペクトルから、既知情報を利用して自動的に^{13}C核の信号帰属をおこなう方法を報告する。さらに、それに基づいてタンパク質二次構造をアミノ酸残基レベルで決定する。

ユビキチン、膜タンパク質、自動帰属

○いけだけいすけ，えがわあやこ，はやしこころ，こじまちょうじろう，ふじわらとしみち

［方法］
本研究では、実測スペクトルを計算によって定量的に再現し、ケミカルシフト値を得る。PDBに立体構造が登録されているタンパク質2438個について原子座標からSHIFTXによってC^{α}, C^{β}およびC'ケミカルシフト値を計算し、アミノ酸配列-構造-ケミカルシフトデータベースを作成した。このデータベースから、解析対象となるタンパク質の部分配列（9残基）に類似するペプチドフラグメントが検索される。類似度計算にはBLOSUM62アミノ酸置換行列を用いた。このような類似フラグメントを対象タンパク質の各部分配列について100個抽出し、これらの組み合わせでタンパク質全体のケミカルシフト空間を表現する。クロスピーク強度はスピン系の磁化の時間発展を計算して得た。計算スペクトルと実測スペクトルの信号強度差を変数とするエネルギー評価関数を定義し、モンテカルロ・シミュレーテッドアニーリング法によってエネルギーを最小化するフラグメントの組み合わせを探索した。この計算を異なる乱数種で独立に4500回おこない、得られた各スピンについてのケミカルシフト値を平均することで最終的なケミカルシフトを得た。この帰属結果に基づいて、二次構造をケミカルシフトインデックス法で決定した。

［結果・考察］
[^{13}C, ^{15}N]均一標識ユビキチン凍結乾燥粉末の^{13}C-MASスペクトルを測定した（figure 1）。スペクトル上に分離したピークはわずかしか観測されなかった。このスペクトルに対してフィッティングをおこなったところ、実測スペクトルとノイズレベルで一致する計算スペクトルが得られた。得られたケミカルシフト値は、エラーは線幅程度の大きさを持つが、ユビキチン微結晶の測定から得られた帰属結果と良い一致が見られた(Figure 2)。ケミカルシフト値より推定された二次構造は、ユビキチン結晶構造中の二次構造に一致しており、ユビキチンは凍結乾燥粉末中でもnative構造を保持していることが明らかとなった。また、立体構造・ケミカルシフト値が既知の46-214残基のタンパク質５つについて、計算スペクトルに対するテストシミュレーションをおこなった。ケミカルシフトの正解値に対するRMSD値は約1.5 ppm、二次構造の正解率は0.7-0.9であることを確認し、本法がさまざまなタンパク質に適用可能であることを示した。さらに、脂質二重膜中に再構成した膜タンパク質*Np*HtrII(1-159)の実測スペクトル解析をおこなった。得られた二次構造はこれまでに報告されている構造モデルとよく一致することが明らかとなった。以上の結果より、本解析法は、凍結乾燥試料や脂質二重膜中あるいは生細胞中など、非結晶状態のタンパク質の構造解析に広く適用可能であり、固体NMR試料に対する制約を大幅に緩和できることを実証した。

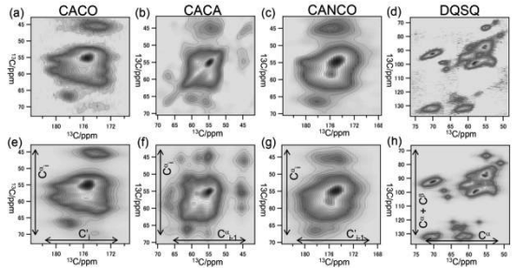


Figure 1. Observed (a-d) and simulated (e-h) ^{13}C-^{13}C spectra of lyophilized ubiquitin.

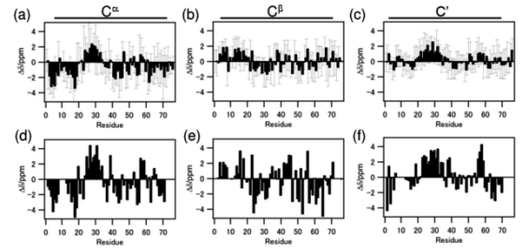


Figure 2. ^{13}C secondary chemical shifts of ubiquitin in lyophilized powder (a-c) and in microcrystals (BMRB: 7111) (d-f).

IL14

Interleaved CW irradiation and rf pulses for efficient re- and decoupling in solid-state NMR

Niels Chr. Nielsen

Center for Insoluble Protein Structures (inSPIN), Interdisciplinary Nanoscience Center (iNANO) and Department of Chemistry, Aarhus University, Gustav Wiedsvej 14, DK-8000 Aarhus C, Denmark

Biological solid-state NMR relies on samples with many combinations of ^{15}N, ^{13}C, and ^{2}H labelling in addition to varying amounts of ^{1}H spins. Combined with multiple-dimensional experiments such samples offer opportunities for assignments and establishment of structural constraints. The underlying experiments rely on numerous coherence transfer elements bringing magnetization from spin to spin. Also different spin species gives different possibilities to exploit polarization from different sources. With many elements involved, it is of fundamental importance that losses in the transfer processes are minimized as much as possible in each individual to maintain high sensitivity. Furthermore, optimum performance of the experiments requires the use of efficient decoupling methods which for the desired labelling strategy as efficiently as possible remove broadening from heteronuclear dipolar couplings during direct or indirect sampling.

In this presentation, we address attention to systematic design of re- and decoupling elements for biological solid-state NMR developed using optimal control and analytical methods. We present optimal control and analytical pulse sequences offering sensitivity-enhanced heteronuclear coherence transfer in ^{1}H-^{15}N, ^{1}H-^{13}C, ^{15}N-^{13}C spin-pair[1,2] and ^{2}H-^{13}C and ^{2}H-^{15}N spin-pair[2] systems. For homonuclear transfers, we address attention to resolution and sensitivity enhancements through spin-state-[4] and coherence-order selective[5] transfer. Furthermore, we demonstrate sensitivity enhancement by simultaneous[6] or interleaved[7] sampling of spectra provided through different polarization sources or different coherence transfer pathways. Finally, we address the use of CW irradiation combined with rotor synchronized refocusing and purging pulses to obtain efficient 1H and 19F heteronuclear decoupling in MAS NMR of solids.[8,9]

References:

1. 1. S. Jain, M. Bjerring, and N. C. Nielsen, *J. Phys. Chem. Lett*. **3**, 703-708 (2012).
2. N. M. Loening, M. Bjerring, N. C. Nielsen, and H. Oschkinat, *J. Magn. Reson.* **214**, 81-90 (2012).
3. D. Wei, U. Akbey, B. Paaske, H. Oschkinat, B. Reif, M. Bjerring, and N. C. Nielsen, *J. Phys. Chem. Lett.* **2**, 1289-1294 (2011).
4. C. Kehlet, J. T. Nielsen, Z. Tosner, and N. C. Nielsen, *J. Phys. Chem. Lett.* **2**, 543-547 (2011).
5. A. B. Nielsen, M. Bjerring, and N. C. Nielsen, in prep (2012).
6. A. B. Nielsen, K. Székely, J. Gath, M. Ernst, N. C. Nielsen, and B. H. Meier, *J. Biomol. NMR* **52**, 283-288 (2012).
7. M. Bjerring, B. Paaske, H. Oschkinat, U. Akbey, and N. C. Nielsen, *J. Magn. Reson.* **214**, 324-328 (2012).
8. J. M. Vinther, A. B. Nielsen, M. Bjerring, E. R. H van Eck, A. P. M. Kentgens, N. Khaneja, and N. C. Nielsen, Submitted (2012).
9. J. M. Vinther, N. Khaneja, and N. C. Nielsen, submitted (2012).

Acknowledgements: We acknowledge support from the Danish National Research Foundation and the FP7 BIONMR project.

HL1

Protein NMR before the dawn

Keiichi Kawano
Grad. Sch. Life Sci., Hokkaido University, Sapporo, Japan

I started my NMR career in 1971 in Professor Kyogoku's laboratory at the Institute for Protein Research, Osaka University, and attended the 11th Annual Meeting of the NMR Society of Japan in the next year at first. This is the 51st meeting held at Nagoya, so it is long time ago. The facility I used was JEOL 4H-100 with electromagnet, and which had poor ability for protein NMR. High field NMR equipments with superconducting magnet were already spreading in Europe and USA, but there was only Varian HR-220 with CW mode in Kyoto University at that time in Japan.

In 1980, I moved to Kyushu University Dental School through Nagoya University Medical School. We have no NMR equipment at Fukuoka for 7 years. As the proverb goes, "the darkest hour is always just before the dawn". In 1987, we obtained a Bruker AM-400, and started collaboration with some protein scientists in Kyushu University. In collaboration with Profs. Sadaaki Iwanaga and Shun-ichiro Kawabata, we studied solution structure of antimicrobial peptides of horseshoe crab. In invertebrates, which lack adaptive immune systems, Toll-like receptor (TLR) -mediated antimicrobial peptide production is prominent immune response. The concept of the conservation of immune response in insects and mammals is now invigorating the field of innate immunity. In particular, the discovery of human TLR represented a turning point in the study of the mammalian immune system and is awarded the 2011 Nobel Prize. Hemocytes of the horseshoe crab contain some antimicrobial peptides, tachyplesin, tachystatin A and B, tachycitin and big defensin, which are highly active against Gram-negative and -positive bacteria and fungi. We determined their β-rich amphipathic structures, which are closely associated with the bactericidal activity [1-3].

Seeing that hydroxyapatite is an important inorganic crystallite constituent in human calcified hard tissues such as bones and teeth, elucidation of the mechanism of protein-hydroxyapatite interaction has very important implications for understanding the role of proteins in biomineralization. There has been no method available to measure binding sites and conformation of the protein adsorbed on the solid surface. We reported the new method which combines protection of the bound protein by hydroxyapatite against hydrogen exchange labeling and 2D proton NMR [4].

In 1994, I moved to Grad. Sch. Sci. of Hokkaido University from Kyushu University, from south end to north end of Japan. My mission was to integrate the folding study by Prof. Katsutoshi Nitta and NMR study by Prof. Kunio Hikichi. Although NMR is a powerful tool for studying protein folding, low solubility and aggregation properties of proteins preclude the application of NMR to folding studies of a wide range of proteins. Modern NMR technology is applicable to marginally stable and low-populated intermediates that accumulate transiently during the folding process [5]. In the unusually slow refolding process of cysteine-free pyrrolidone carboxyl peptidase, the protein is trapped in the intermediate state D1. Recently, we investigated the structure of the D1 state using NMR techniques with amino acid selectively labeled protein and found that the non-native interaction between the α4- and α6-helices may be responsible for the unusually slow folding of the protein [6].

In 1998, I moved to Toyama Medical and Pharmaceutical University, and returned to Hokkaido University in 2004. We restarted from a small molecule, Growth-blocking peptide (GBP), which is an insect growth factor consisting of 25 amino acid residues. The structure contains a short segment of double stranded β-sheet and a type-II β-turn in the loop region. This is the first report of the three-dimensional structure of the peptidergic insect growth factor [7]. Then, we determined the solution structure of microtubule-associated protein light chain 3 (MAP-LC3) and found that it is divided into N- and C-terminal subdomains. Additional analysis using a home-built photochemically induced dynamic nuclear polarization equipment confirmed the structure [8]. We also analyzed the interaction between cytochrome c and cytochrome c oxidase with molecular weight of 210 kDa [9].

It is a great pleasure to acknowledge my teachers and colleagues for their guidance, advices, encouragements and collaborations.

References

1. Kawano K, Yoneya T, Miyata T, Yoshikawa K, Tokunaga F, Terada Y, Iwanaga S: Antimicrobial peptide, tachyplesin I, isolated from hemocytes of the horseshoe crab (*Tachypleus tridentatus*). NMR determination of the β-sheet structure. J. Biol. Chem., 265, 15365-7 (1990)
2. Fujitani N, Kawabata S, Osaki T, Kumaki Y, Demura M, Nitta K, Kawano K: Structure of the antimicrobial peptide tachystatin A. J. Biol. Chem., 277, 23651-7 (2002)
3. Kouno T, Fujitani N, Mizuguchi M, Osaki T, Nishimura S, Kawabata S, Aizawa T, Demura M, Nitta K, Kawano K: A novel beta-defensin structure: a potential strategy of big defensin for overcoming resistance by Gram-positive bacteria. Biochemistry, 47, 10611-9 (2008)
4. Nagadome H, Kawano K, Terada Y: Identification of the adsorbing site of lysozyme onto the hydroxyapatite surface using hydrogen exchange and ^{1}H NMR. FEBS Letters, 317, 128-30 (1993)
5. Mizuguchi M, Aizawa T, Kawano K, Demura M: NMR studies of protein folding: folding studies of calcium-binding lysozyme and α-lactalbumin. Ann. Rep. NMR Spec., 65, 53-76 (2009)
6. Mizuguchi M, Takeuchi M, Ohki S, Nabeshima Y, Kouno T, Aizawa T, Demura M, Kawano K, Yutani K: Structural characterization of a trapped folding intermediate of pyrrolidone carboxyl peptidase from a hyperthermophile. Biochemistry, 51, 6089-96 (2012)
7. Aizawa T, Fujitani N, Hayakawa Y, Ohnishi A, Ohkubo T, Kumaki Y, Kawano K, Hikichi K, Nitta, K: Solution structure of insect growth factor, growth-blocking peptide. J. Biol. Chem., 274, 1887-90 (1999)
8. Kouno T, Mizuguchi M, Tanida I, Ueno T, Kanematsu T, Mori Y, Shinoda H, Hirata M, Kominami E, Kawano K: Solution structure of microtuble-associated protein light chain 3 and identification of its functional subdomains. J. Biol. Chem., 280, 24610-7 (2005)
9. Sakamoto K, Kamiya M, Imai M, Shinzawa-Ito K, Uchida T, Kawano K, Yoshikawa S, Ishimori K: NMR basis for interprotein electron transfer gating between cytochrome *c* and cytochrome *c* oxidase. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 108, 12271-6 (2011)

HL2 A short essay on my NMR studies

Taro Eguchi (Trustee & Vice-President, Osaka University)

In 1966, I entered the Department of Chemistry, Faculty of Science, Osaka University. Then in 1969, I began to study molecular motion (also known as intermolecular interactions) in solids under the direction of Professor Hideaki Chihara. Prof. Chihara graduated from Professor Nitta's Lab. Prof. Nitta was called the father of X-ray crystallography in Japan. We, therefore, used the broad-line NMR technique to get useful information concerning the relation between crystal structure and molecular motion in solids. At that time we made a pulsed NMR instrument for ourselves and measured the temperature dependence of ^{1}H NMR spin-lattice relaxation times T_1 in various systems. Dr. Gen Soda introduced me to the NMR world.

First we were interested in the reorientation of methyl groups in simple molecular solids. I measured the temperature dependence of ^{1}H NMR spin-lattice relaxation times T_1 in methylchloride (CH_3Cl) and determined the temperature dependence of correlation times τ_c as well as the activation energy of the methyl-reorientaion. We found that T_1 assumes minimum value when τ_c is in nano-second order. An empirical relation between the activation energy and the temperature at which T_1 minimum appears was also found in the various organic materials[1].

Next I focused my attention on the isotropic reorientation of a globular molecule in the solid state. In other words, how fast the isotropic reorientation becomes in the plastic crystalline phase which assumes the closest packed structure (face centered cubic or hexagonal closest packing). I measured the temperature dependence of T_1 in silane (SiH_4). In the low temperature phase isotropic reorientation as well as the tunneling motion of molecules took place. In the high temperature phase (plastic crystalline phase), the self-diffusion of molecules mainly determined the relaxation process[2]. Dr. Gen Soda and his co-workers discovered an empirical relation that τ_c for reorientation of a whole molecule becomes nano-second order in the vicinity of the phase-transition temperature in many plastic crystalline materials.

In my Ph.D. work, molecular motions in the glassy crystalline phase were studied in detail. Professor Syuzo Seki and his co-workers found that the orientation of molecules can be frozen at random by rapidly cooling the plastic phase. For example, ethanol has such a glassy crystalline phase as a metastable phase. We measured T_1 for the various phases (polymorphic forms) of ethanol and compared the relaxation mechanism in each phase[3].

The first high-pressure NMR experiment using a superconducting magnet was performed in University of Illinois in 1980. At that time I worked with Professor Jiri Jonas as a Postdoctoral fellow for 17 months. We were able to determine experimentally the activation volume of cyclohexane in the chair – chair conformation change process[4]. I also collaborated with Professor Brian T. Heaton on the high-pressure experiments for metal-carbonyl cluster compounds[5].

According to those experiments described above I started high-pressure ^{129}Xe NMR studies for the adsorbed Xe in various porous materials. I found that the dynamical state of Xe molecules is very sensitive to the fine structure of micro- or meso-pores in the porous materials[6].

I am very thankful for my many co-workers and students throughout all of my 40 years of NMR studies. I really enjoyed my academic life. Thank you very much.

References

[1] Taro Eguchi and Hideaki Chihara, *J. Magn. Reson*., **76**, 143-148 (1988).

[2] Taro Eguchi and Hideaki Chihara, *J. Magn. Reson*., **26**, 409-419 (1977).

[3] Taro Eguchi, Gen Soda, and Hideaki Chihara, *Molec. Phys*., **40**, 681-696 (1980).

[4] Dennis L. Hasha, Taro Eguchi, and Jiri Jonas, *J. Am. Chem. Soc*., **104**, 2290-2296 (1982).

[5] David T. Brown, Taro Eguchi, Brian T. Heaton, Jonathan A. Iggo, and Robin Whyman, *J. Chem. Soc. Dalton Trans*., 677-683 (**1991**).

[6] Hironori Omi, Bunsow Nagasaka, Keisuke Miyakubo, Takahiro Ueda, and Taro Eguchi, *Phys. Chem. Chem. Phys*., **6**, 1299-1303, (2004).

IL15

Singlet NMR

Malcolm H. Levitt[1]
[1]*Southampton University, Southampton SO17 1BJ, UK*

Singlet nuclear spin states are quantum states of a nuclear spin-1/2 pair that are antisymmetric with respect to spin exchange, and which have total spin zero. They are therefore non-magnetic and protected against many important relaxation mechanisms. These states often exhibit long relaxation times which may exceed the normal relaxation time T_1 by an order of magnitude or even more. In the special case of the ^{15}N spin pair in ^{15}N-labelled nitrous oxide, the nuclear singlet lifetime can be as long as 25 minutes in solution.

I will discuss the phenomenon of singlet nuclear spin order in a variety of contexts - including gas-phase parahydrogen, small molecules in solution, and also some examples of nuclear singlet states in solids. I will discuss how nuclear singlet spin order may be generated from magnetization, how it is maintained, and how it is converted back into observable magnetization.

Our recent work in the field includes the generation of hyperpolarized nuclear singlet order using dynamic nuclear polarization. We have been particularly interested in the properties of nearly equivalent spin pairs, where the hyperpolarized singlet order is long-lived in high magnetic field, even without any external intervention. We have designed and demonstrated molecular systems that exhibit ^{13}C singlet lifetimes of more than 15 minutes. Some preliminary MRI and *in vivo* NMR experiments have been performed.

Another example of a nuclear singlet state is the water spin isomer *para*-water. Together with many collaborators, including the Kyoto groups of Murata and Komatsu, we have studied the nuclear singlet states of *ortho*- and *para*-water molecules trapped inside fullerene cavities, using neutron scattering and infrared spectroscopy, as well as low-temperature NMR. As an example, I will show cryogenic magic-angle-spinning NMR data of *ortho*-water trapped inside a fullerene cavity, at a temperature of 9.6 Kelvin.

第三日目
11月10日（土）
日本語セッション

Day 3 (Nov. 10, Sat)
(Japanese Session)

L16

SAIL-NMR法によるジスルフィド結合の立体配座決定と動態解析

○武田光広[1], 寺内勉[2,3], 甲斐荘正恒[1,2,4]
[1]名大・理学・構造生物学研究センター
[2]首都大・戦略研究センター
[3]SAILテクノロジーズ（株）
[4]阪大・蛋白研

SAIL-NMR studies on the disulfide bond conformation and dynamics in proteins

○Mitsuhiro Takeda[1], Tsutomu Terauchi[2,3] and Masatsune Kainosho[1,2,4]
[1]*Graduate School of Science, Nagoya University, Aichi, Japan.*
[2]*Graduate School of Science and Engineering, Tokyo Metropolitan University, Tokyo, Japan.*
[3]*SAIL Technologies, Inc, Kanagawa, Japan.*
[4]*Protein Research Institute, Osaka University, Osaka, Japan.*

NOEs between the β-protons of cystine residues across disulfide bonds provide direct information on the disulfide bond connectivities and their conformations. With conventional [U-^{13}C, ^{15}N]-proteins, however, fast spin diffusion processes among *geminal* β-protons prohibits the quantitative measurement of NOEs across disulfide bonds. To overcome this problem, we developed a new method using proteins selectively labeled with an equimolar mixture of (2*R*,3*S*)- and (2*R*,3*R*)-[β-^{13}C;α,β-^{2}H$_2$] Cys, but otherwise fully deuterated. Since either one of the *prochiral* methylene protons, namely β2 (*proS*) or β3 (*proR*), is always replaced with a deuteron, all four across-disulfide NOEs can be measured without any spin diffusion interferences. Based on analysis of the quantitative across-disulfide NOEs, both connectivities and the disulfide conformations, can readily be determined.

ジスルフィド結合は、$\chi^2(i)$, χ^3, $\chi^2(j)$で規定される二面角変化により特定の立体配座をとり、配座平衡状態にある場合もある（Fig. 1）。これらジスルフィド結合の配座および動態の情報は蛋白質の立体構造の形成・維持に加え、動態制御、更には機能発現機構の理解において重要な知見となるが、その有効な研究手法に欠けている。

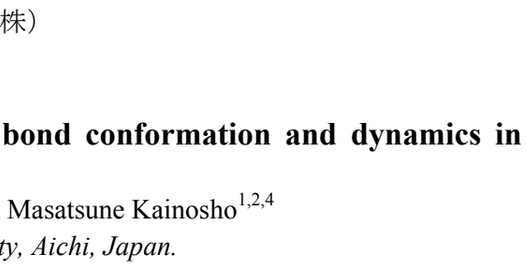


Fig. 1 Conformation of a disulfide bond

架橋された２つのシステイン残基間には４組のベータメチレンプロトン間 NOE（Hβ2(*i*)-Hβ2(*j*), Hβ2(*i*)-Hβ3(*j*) Hβ3(*i*)-Hβ2(*j*) Hβ3(*i*)-Hβ3(*j*)）が観測される。この４組のプロトン間距離は同結合の立体配座に依存するため、NOEから正確な距離を決定できれば立体配座を決定出来るはずである。しかし従来の均一 ^{13}C/^{15}N 標識試料では、ジェミナルプロトンや周りのプロトンとの間の磁気双極子相互作用に由来するスピン拡散のため、ジスルフィド結合を挟むベータプロトン間 NOE の解析から交差緩和定数を正確に見積もる事は難しい。そこで、我々は SAIL 法の応用技術として、Fig. 2 に示すように、^{13}C ベータ炭素のみ^{13}Cとし、同炭素に結合した、*pro*-Rあるいは *pro*-Sが1:1でモノ重水素化されたシステインを重水素化蛋白質に取り込ませて 定量的NOE を観測する方法を考案した。

同調製試料のジスルフィド結合では、ベータ位のモノ重水素化の立体選択性が異なる4種類の同位体異性体が形成される（Fig. 3）。いずれの異性体においてもモノ重水素化によりメチレン基内のジェミナルプロトン間相互作用は生じず、他の水素も完全に重水素化されているため、スピン拡散は全く生じない。一方で、目的の４組のNOEは、4種類の同位体異性体のいずれかにおいて観測される。

本法を3本のジスルフィド結合を持つ6.5 kDa のウシ膵臓由来トリプシン阻害剤蛋白質（BPTI）に適用した。同蛋白質のCys5とCys55との間のNOEに着目すると、ジェミナルNOEは観測されず、目的のジスルフィド結合を挟んだNOEのみが明瞭に観測された（Fig. ４）。同NOEの build up curveを調べると、均一標識体に比べてスピン拡散が大幅に抑えられており、その交差緩和定数を高精度に見積もることが出来た。同定数より算出された４組のベータプロトン間距離はBPTI 結晶構造における距離と良く一致した。

本発表では、ここに述べたNOEによるジスルフィド結合の立体配座決定に加えて、システイン残基のベータ炭素のシグナルの直接観測を利用した同結合の構造揺らぎの検出法について紹介する。

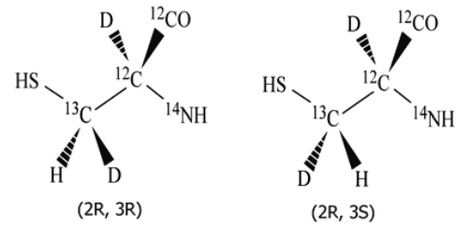


Fig. 2 Structures of (*3R*) and (*3S*)-[β-^{13}C;α,β-^{2}H$_2$] Cys

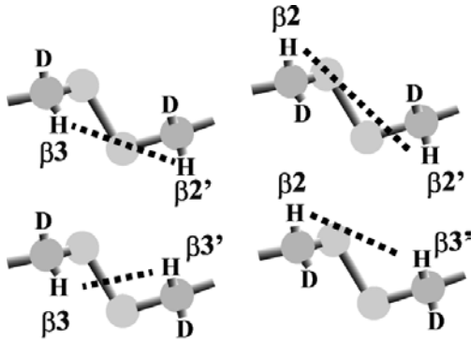


Fig. 3 NOEs across a disulfide bond in a (*3RS*)-[β-^{13}C;α,β-^{2}H$_2$] Cys-labeled protein

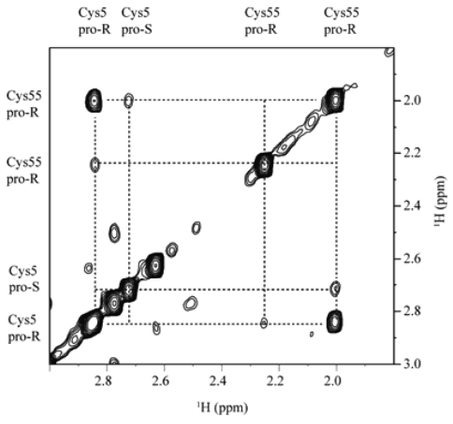


Fig. 4 [^{1}H, ^{1}H] NOESY spectrum of [(*3RS*)-[β-^{13}C;α,β-^{2}H$_2$] Cys, U-^{2}H]-labeled BPTI

[参考文献]
Mitsuhiro Takeda, Tsutomu Terauchi, and Masatsune Kainosho, *J. Biomol. NMR,* **52**(2), 127-139(2012).

SAIL, ジスルフィド結合, NOE

○たけだみつひろ，てらうちつとむ、かいのしょうまさつね

L17 高分子量機能性RNAの局所構造・状態解析のため部位特異的標識法

○田中好幸[1], 芦原悠太[1], 春田佳一郎[1], 河原郁美[1,2], 児嶋長次郎[2]
[1]東北大・院薬、[2]阪大・蛋白研

Site-specific stable-isotope-labeling techniques of RNA molecules for structural and mechanistic studies with NMR spectroscopy

○Yoshiyuki Tanaka[1], Yuta Ashihara[1], Kaichiro Haruta[1], Ikumi Kawahara[1,2], and Chojiro Kojima[2]
[1]*Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University, Sendai, Japan.*
[2]*Institute for Protein Research, Osaka University, Suita, Japan.*

Recently discovered non-coding RNAs are a novel class of functional RNA which regulates a gene expression. Many genes are under the control of the non-coding RNAs, synergistically with regulatory proteins. To reveal the function and regulatory mechanism of this emerging functional RNAs, the methodology for their structural and mechanistic analyses became more important. In NMR spectroscopy, resonance assignments are time-consuming. To skip this assignment step and access signals from functionally important residues in a pinpoint manner, we established site-specific stable-isotope-labeling techniques of RNA molecules. The labeling techniques are consists of two successive enzymatic reactions within a normal biochemical and genetic techniques. So far, we have prepared three different labeled RNA molecules (21, 43 and 76 nucleotides in length). Such site-specifically isotope-labeled RNA molecules can be used to detect RNA-protein interactions and to probe chemical features of functionally important residues with NMR spectroscopy and possibly vibrational spectroscopy and mass spectrometry.

近年、遺伝子発現の新たな制御分子としてmicro RNA等のnon-coding RNAが多数発見されている。遺伝子DNAの数十%がRNAにまでは転写されているという報告からすると、蛋白質並み、或は、蛋白質以上の数の機能性non-coding RNAが存在する可能性がある。このように機能性non-coding RNAは構造解析・機能解析の新大陸とも言うべき存在である。その一方でRNA分子のNMR分光法における構造解析および機構解析技術は蛋白質の技術革新と比べると遅れている。中でもRNA分子の活性残基あるいは蛋白質との相互作用残基の情報を素早く、かつ、確度を持って抽出する技術の開発が遅れている（機能発現機構解析）。その解決策として我々のグループではRNA分子の任意の一残基を安定同位体標識する技術を開発したので報告する。

RNA分子の調製法として汎用されているのはRNAポリメラーゼを用いたin vitro転写である。NMR解析用の標識RNA（全残基標識体、ヌクレオチドごとの標識体）はほぼこの手法で調製されている。ポリメラーゼを用いているため、プライマー伸長反応を逐次行うことで一残基標識体が調製できると思われるかもしれない。ところが、RNAポリメラーゼはプライマー伸長反応を行わないというのが通説であったため、本酵素ではRNA分子の一残基標識は行われてきていない。そこで確実な一残基標識法としては化学合成（RNA固相合成）が用いられてきた。しかし長鎖の機能性RNAでは合成収率の低さから、化学合成をNMRサンプル調製に用いることができなかった。そこで長鎖RNA分子にも適用可能な一残基標識法の開発に着手した。ところでRNA分子の一残基標識では、日本のグループの先駆的研究により化学反応と酵素（リガーゼ）反応を利用した標識法が開発されている（Ohtsuki, T., Kawai, G. and Watanabe, K. *FEBS Lett.* **2002,** *514*, 37-43.）。現在この技術はセグメント標識RNA分子の調製法に生かされている。

ところで我々のグループでは完全酵素合成による二つの一残基標識法を開発している（Figure 1）。最初に開発した方法は標識グアノシンの導入に酵素RNA分子（group I intron）を用いて、リガーゼによる非標識RNAとの連結で一残基標識体を得ている（Figure 1a）。二つ目の方法としては、近年報告されたRNAポリメラーゼのプライマー伸長能を利用した標識法である（Figure 1b）。これらの方法によりハンマーヘッド型リボザイム（43塩基）、XBP1 mRNAの一部（76塩基）、HAC1 mRNAヘアピン領域（21塩基）の一残基標識体作製を行った。これらの中で、ハンマーヘッド型リボザイムの一残基（G10.1）標識体の^{1}H-^{15}N HSQCスペクトルを示す（Figure 1c）。Figure 1に示す通り、グアノシンのイミノプロトン（H1）とN1窒素原子との相関ピークが一つだけ観測された。このことより、一残基のみが標識されたRNA分子（ハンマーヘッド型リボザイム）が調製できたことが示された（収率34%）。本法により76塩基のRNA分子においても20%程度の収率で標識体を得ており、長鎖機能性RNA分子の一残基標識法が確立できた。

このように我々の開発した標識法により一残基標識RNA分子が調製できたことで、RNA分子の有する触媒機能の機構解析が進むと期待される。また、蛋白質と協同的に働くnon-coding RNA分子の場合には、蛋白質との相互作用解析を通じた機能解明が進ものと思われる。なお安定同位体標識された分子はNMR分光法のみでなく、振動分光法におけるバンド帰属（同位体シフト）、質量分析等への応用も可能であり、RNA分子一残基標識法は構造生物学に広く寄与する方法論になるものと期待される。

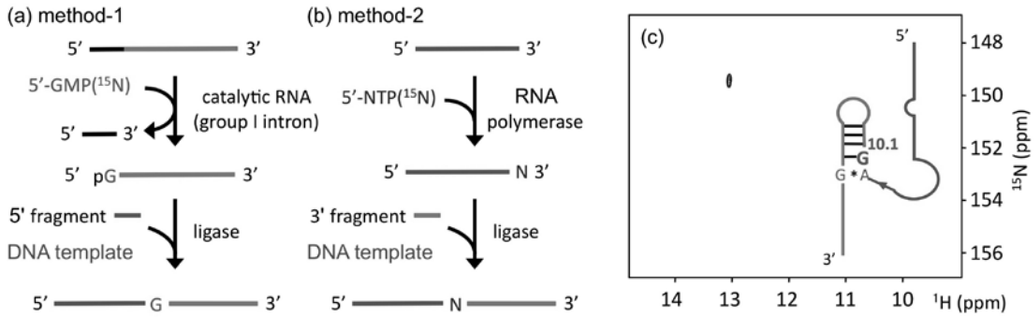


Figure 1. Labeling methods (a) and (b), and ^{1}H-^{15}N HSQC spectrum (c) of the single residue-labeled RNA (hammerhead riboyzme) (Kawahara, I., Haruta, K., Ashihara, Y., Yamanaka, D., Kuriyama, M., Toki, N., Kondo, Y., Teruya, K., Ishikawa, J., Furuta, H., Ikawa, Y., Kojima, C., Tanaka, Y. *Nucleic Acids Research* **2012**, *40*, e7.).

部位特異的安定同位体標識法，RNA

○たなかよしゆき，あしはらゆうた、はるたかいちろう、かわはらいくみ、こじまちょうじろう

L18

βラクトグロブリンの折り畳みストラテジー

○櫻井一正[1], 北山寛貴[1], 八木正典[2], 池上貴久[1], 西村千秋[3], 後藤祐児[1]
[1]阪大・蛋白研
[2]阪大・微研
[3]帝京平成大・薬

Folding Strategy of bovine β-Lactoglobulin

○ Kazumasa Sakurai[1], Hiroki Kitayama[1], Masanori Yagi[2], Takahisa Ikegami[1], Chiaki Nishimura[3], and Yuji Goto[1]
[1]Institute for Protein Research, Osaka University, Osaka, Japan
[2]Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, Osaka, Japan
[3]Faculty of Pharmaceutical Sciences, Teikyo Heisei University, Chiba, Japan

Hydrophobic elements stabilizing the native structure are simultaneously contributing to the formation of non-specific aggregations. Thus, the native polypeptide chains should fold with circumventing such aggregations. To obtain information about a circumventing mechanism, we investigated the folding process of bovine β-lactoglobulin (βLG). βLG has a folding intermediate with a non-native α-helical structure, although its native form is predominantly composed of β-structure. Our previous study with a couple of folding mutants indicated that the moderate α-helical propensity of the wild-type sequence likely causes the folding pathway to circumvent non-productive intermediates. In the present study, we analyzed the dynamics of the denatured βLG and performed H/D exchange pulse labeling experiments to investigate early events of the folding process. The results suggested that the βLG sequence is separated into three portions, A-strand, B to E-strands, and F to H-strands, and folding of these parts occurs sequentially from the C-terminal to the N-terminal portions. Probably, the order of folding of these parts is programed in the βLG sequence so that the hydrophobic elements can assemble to form the native structure with avoiding non-native aggregations.

球状蛋白質の天然構造は疎水相互作用と主鎖間の水素結合で保持されているが、これらはアミロイド線維などの凝集形成にも寄与するため、蛋白質はこれらの凝集を回避し折り畳まなければならない。天然蛋白質が持つと思われるその機構を調べるため、我々はβラクトグロブリン（βLG）を用いた。ウシβラクトグロブリン（βLG）は折り畳み初期に非天然αヘリックス構造を持つ中間体が現れることが知られている。βLGは9本のβストランドを持つβシートリッチな蛋白質だが、二次構造予測からはN末端側でα構造が好まれることがわかり、この性質が非天然構造形成の駆動力となっていると考えられる。しかし、折り畳みに対するこの中間体の寄与は明らかではなかった。そこで我々は先行研究で、N末端領域でα構造性及びβ構造性を上昇させた変異体（それぞれG17E、E44L）を作製し、折り畳みのキネティクスの変化を調べた。興味深い

Protein folding, pH pule labeling

○さくらいかずまさ、きたやまひろき、やぎまさのり、いけがみたかひさ、にしむらちあき、ごとうゆうじ

ことに、E44L の折り畳みにおいて、天然状態と同程度の β 構造が中間体形成相で形成されるものの、天然構造形成相は野生型に比べ 10 倍ほど遅くなっていることが分かった。この結果から、非天然 α ヘリックス構造形成は、以降に続く天然構造形成をスムーズに進行させる効果があると考えられる。

さらに中間体構造の情報をアミノ酸残基レベルで得るため、今回我々は変性状態の横緩和測定とpHパルスラベル実験を行った。8M尿素溶液中ではβLGは主に変性構造をとっているが、F-Hストランド付近で残余構造形成を示す横緩和速度の上昇が見られた。そして6M尿素溶液中では、その残余構造がB-Dストランドにも広がることが分かった。pHパルスラベル実験では、フォールディング開始後10msの時点で重水素交換を行い、どの領域が保護されているかを調べた。その結果、Aストランド以外の全ての領域で天然構造と同様の保護が見られた。これらの結果をまとめると、βLGの折り畳みは、F-Hストランド領域、B-Dストランド領域、Aストランド領域の順で起きていることが示唆された。このように、疎水エレメント間の会合が秩序的に進行することが、凝集回避につながると考えられる。

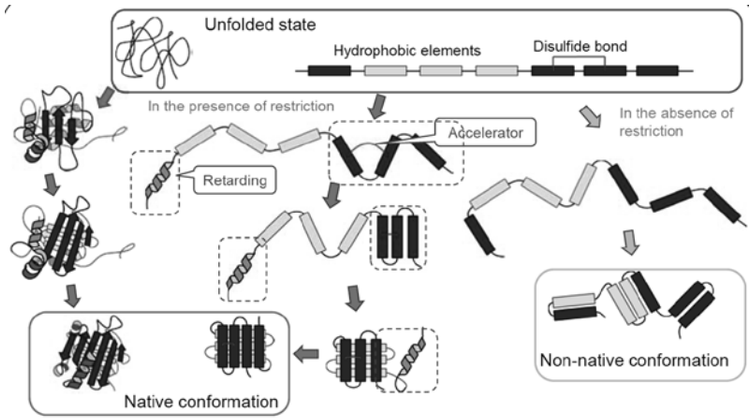


Fig. 1 Supposed mechanism of βLG folding.

それではこの疎水エレメント間の会合の秩序はどのようにもたらされているのか。それは、以下のようにエレメント間の会合を加速または遅延する機構が存在しているからではないかと提案する（図1）。加速機構は、G-Hストランド間のジスルフィドによってもたらされる。G、Hストランドは全アミノ酸配列の中で最も疎水性が高い領域であるため、初めに疎水性コアを形成する必要がある。C106－C119間のジスルフィド結合はふたつの疎水エレメントが他のエレメントと相互作用することを妨げているものと考えられる。遅延機構は、Aストランドにおける高いαヘリックス形成能によってもたらされる。Aストランドは天然構造中ではF-Hストランドと遠距離の相互作用を持つ。効率的な折り畳みのためには、F-Hストランドにおけるコア構造が形成した後に、これらの相互作用を形成することが望まれる。Aストランド領域で一時的かつ局所的にαヘリックスが形成されると、その領域内で疎水残基が埋もれるため、他の疎水エレメントとの相互作用が一時的に妨げられるのである。先行研究のE44L変異体で折り畳みの遅延が見られたのは、Bストランドの疎水性の上昇により、F-Hストランド間の疎水エレメントの会合に干渉し、間違った水素結合や側鎖パッキングが起こったためだと考えられる。

以上の結果から、βLG のアミノ酸配列には各部位の相互作用が理想的な順で起こるように工夫が施されているのではないかと考えられる。このように、比較的大きなタンパク質のアミノ酸配列は、天然構造の安定性の最適化だけでなく、折り畳み経路の最適化もされていると考えられる。

L19 Structure and dynamics of yeast calmodulin

○小椋賢治[1]，岡村英保[2]，久米田博之[1]，矢澤道生[3]，稲垣冬彦[1]
[1]北大・先端生命，[2]京大・エネ研，[3]北大・院理

Structure and dynamics of yeast calmodulin

○Kenji Ogura[1], Hideyasu Okamura[2], Hiroyuki Kumeta[1], Michio Yazawa[3], and Fuyuhiko Inagaki[1]
[1]Faculty of Advanced Life Science, Hokkaido University, Sapporo, Japan.
[2]Institute of Advanced Energy, Kyoto University, Kyoto, Japan.
[3]Graduate School of Science, Hokkaido University, Sapporo, Japan.

We determined the solution structures of yeast calmodulin (yCaM) in Ca^{2+}-bound state and the target peptide-bound state. In contrast to vertebrate CaM, The Ca^{2+}-yCaM showed a compact globular structure consisting of the EF1, 2 and 3 motifs excluding the disordered EF4 motif, while the target-bound yCaM closely resembled vertebrate CaM-peptide complex. The R_2-dispersion profiles of the Ca^{2+}-yCaM showed a conformational exchange in a boundary surface between the N-terminal domain and the EF3 motif. The results indicated the target recognition of yCaM is regulated by the open-close equilibrium.

【序論】 カルモジュリン（CaM）は真核生物においてカルシウム依存的に細胞機能を調節するタンパク質である．CaMはカルシウム結合タンパク質であり，単独ではカルシウムに結合しないタンパク質と結合することによって，細胞内カルシウムシグナルの伝達および細胞機能制御をおこなう．

CaMの立体構造はこれまでによく研究されている．CaMはN末端側とC末端側の両ドメインが独立して柔軟なリンカーで連結された構造をもち，両ドメインにカルシウムイオンを2個ずつ，合計4個のカルシウムイオンを結合することができる．カルシウム結合サイトはN末端側から順にEF–1，EF–2，EF–3，EF–4と呼ばれている．CaMは多くの真核生物種間でアミノ酸配列が高度に保存されており，その立体構造もほぼ共通である．しかし，出芽酵母カルモジュリン（yCaM）は，他の生物種由来CaMとアミノ酸配列が大きく異なりEF–4のカルシウム結合能が失われているため，カルシウムイオンを3個しか結合できないというユニークな特徴を有している．カルシウムを結合していないyCaMは他のCaMとよく似た立体構造を持つことが報告されている（1）．

本研究の目的は，yCaMのカルシウム結合状態および標的ペプチド複合体の立体構造を溶液NMR法により解析し，さらに，緩和分散法により，カルシウム結合状態のyCaMのダイナミクス解析をおこない，yCaMの分子機能を解明することである．

カルモジュリン，立体構造，緩和分散

○おぐらけんじ，おかむらひでやす，くめたひろゆき，やざわみちお，いながきふゆひこ

【実験】 NMR測定には，Varian Unity Inova 600および800 NMR分光計を使用した．立体構造解析のための，および，緩和分散測定のための試料は，それぞれ$^{13}C/^{15}N$ラベル体および$^{2}H/^{15}N$ラベル体を用いた．スペクトル解析と立体構造計算にはNMRPipe，Sparky，Talos，Cyanaを使用した．緩和分散解析には，Mathematica上で動作する自作プログラムを使用した（2）．X線小角散乱（SAXS）測定には，リガクNano-Viewerを使用した．

【結果と考察】 カルシウム結合状態におけるyCaMの立体構造は，N末端側ドメイン（EF–1，2）とC末端側ドメインのEF–3がそれぞれの標的ペプチド結合部位を塞ぐように相互作用しており，他のCaMでは見られない特異な自己阻害構造を形成していた．また，EF–4領域はディスオーダーしていた．さらに，出芽酵母カルシニューリン（CNA1）由来の標的ペプチドとyCaMの複合体は，他の生物種のCaM–CNA1複合体とよく似た構造を持っていた．これらの立体構造解析結果は，SAXSデータから得られた慣性半径，距離分布関数，および，低分解能構造とよく一致した．

カルシウム結合状態におけるyCaMの自己阻害構造の意義は不明であるが，CaMが標的タンパク質を結合する際に重要な役割を担うMetの多くがyCaMではLeuに置換されていることが関係しているのだろう．LeuはMetよりも疎水性が強いために，自己阻害構造を形成することで結合相手を限定する効果があると考えられる．また，yCaMの標的タンパク質は11種と脊椎動物のCaM（標的タンパク質100種以上）と比べて少ないことも自己阻害構造と関係があると考えられる（3）．

カルシウム結合状態におけるyCaMの自己阻害構造は，標的タンパク質の認識・結合の点からはエネルギー的に不利である．そのため，この構造はある程度の柔軟性を持つことが予想された．そこで，緩和分散測定・解析をおこなった．800および600MHzで得た^{15}Nおよび$^{1}H^{N}$の緩和分散プロファイルから，グローバルフィッティング計算をおこない，minor stateの存在比（P_b）は約10%，minor stateとmajor state間の交換速度（k_{ex}）は約250s^{-1}と算出された．また，各残基における両state間の化学シフト差（$\Delta\varpi$）は，N末端側ドメインとEF–3領域の相互作用面に位置する残基において顕著であった．さらに，N末端側ドメインとEF–3領域の相互作用面にて対向した位置にあるLeuをCysに置換してドメイン間ジスルフィド結合を導入した変異体では，緩和分散プロファイルはフラットになり，minor stateは消滅した．これらの結果は，カルシウム結合状態におけるyCaMの自己阻害構造は硬く閉じた構造ではなく，EF–3領域が開いた構造を10%程度含んでいることを示している．この柔軟な構造が，yCaMの自己阻害構造の解除と標的タンパク質の認識・結合という機能を実現させていると考えられる（4）．

(1) Ishida et al., *Biochemistry* **39**, 13660 (2000).
(2) Okamura et al., *Structure* **19**, 988 (2011).
(3) Ogura et al., *Genes to Cells* **17**, 159 (2012).
(4) Ogura et al., *FEBS Letters* **586**, 2548 (2012).

L20

準静的な内部/外部磁場勾配下でのNMR：固体高分子の輸送現象と磁気共鳴イメージング

○浅川直紀[1], 小畑命輝[1]
[1]群馬大・大学院工学研究科応用化学・生物化学専攻

A utilization of internal/external quasi-static magnetic field gradients: transport phenomenon and magnetic resonance imaging of solid polymers

○Naoki Asakawa[1], and Toshiki Obata[1]
[1]*Department of Chemistry and Chemical Biology, Graduate School of Engineering, Gunma University, Gunma, Japan.*

Two applications of quasi-static magnetic field gradients in nuclear magnetic resonance spectroscopy are discussed. The first application is conformon transport in the quasi-ordered π-conjugated polymer, poly(4-methylthiazole-2,5-diyl). With the assistance of proton longitudinal relaxation (R_1) dispersion measurements of the powdered polymer sample, which showed an $\omega^{-1/2}$ dependence because of one-dimensional fluctuations in its linear π-conjugation, one can determine the diffusion coefficient, characteristic transport length, and local magnetic field gradient using proton transverse relaxation (R_2) dispersion measurements under an internal magnetic field gradient and numerical simulations of the spin dynamics. The second application is to demonstrate the possibility for one-dimensional magnetic resonance imaging using an external static magnetic field gradient from a neodymium ferromagnet. High-order primary spin echoes were observed in three-layered thin films consisting of poly(dimethylsiloxane) [PDMS]/poly(tetrafluoroethylene)/PDMS, whereas a comb-like dip in the magnetization amplitude was observed in the quadrature echo spectrum, which means the NMR experiments using the static magnetic field gradient from the ferromagnet were successfully performed. This result could lead to low-cost magnetic resonance imaging instruments for thin films. The possibility of spectral density imaging is also discussed from the viewpoint of variable independence between the static and gradient magnetic fields.[1]

Nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy under an inhomogeneous magnetic field is a promising, noninvasive method for both the investigation of transport phenomena and magnetic resonance imaging (MRI). Several attempts to collect NMR measurements of ultra-slow diffusion in solids have been recently reported. Among these attempts, the pulse field gradient technique, which uses strong magnetic field gradients, has received a great deal of attention for detecting such diffusion. However, this technique suffers from some critical problems when the target system has a large internal gradient relative to its external and/or internal heterogeneous gradient. The diffusion coefficient of solids is often small, and a local internal gradient, which is, in some cases, heterogeneous and/or anisotropic, can remain,which is the limiting factor of the method. The effective gradient of a system with a large internal gradient (G_i) is not identical to the external one (G_e), which likely masks the

π-conjugated polymers, conformon, diffusion, magnetic field gradient, MRI, R_1/R_2-dispersion

○あさかわなおき，おばたとしき

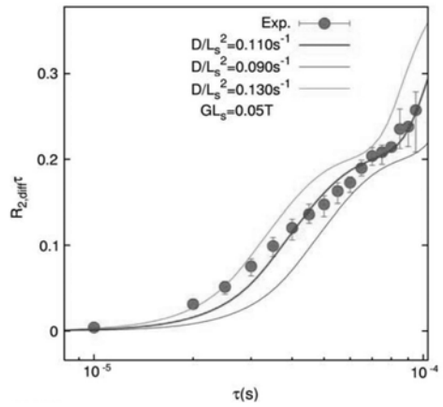


Fig.1 the diffusion portion of the transverse proton relaxation exponent *vs* the spin echo time at 295K. The transverse relaxation rate was measured using the CPMG spin echo. The numerical solution of the 1D Bloch-Torrey equation was obtained using the Fourier spectrum method.[2] This calculation was performed using the sinusoidal gradient (f (x)=-0.5cos(2πx); x:[-1/2:1/2]). The lowest eigen modes for up to 64th were taken into account. The thick line indicates the result of the best fit simulation, while the other lines are the maximum deviations from the experimental results tolerated for the

diffusion coefficient. If the root-mean-squared displacement of diffusion were much larger than the periodicity of the local gradient or the characteristic transport length (L_s), it would not be a problem because the local gradient is expected to average out during diffusion.

By contrast, the local gradient for systems with small diffusion coefficients can remain during the experiments, and the NMR spin echo trains can be further attenuated by the local gradient. Several approaches to remove the effect of local gradients have been developed so far, such as using an anti-Helmholtz superconducting magnet or the fringe field from a superconducting magnet to produce a large external gradient with the condition $G_e >> G_i$. With the former technique, a gradient of up to 200 Tm^{-1} can be obtained, while up to 60Tm^{-1} can be obtained with the latter. There are also alternative approaches that cancel the local gradient using bipolar gradients or rotary echos. By contrast, we pay attention to the local gradient, which is expected to be characteristic of the physical state of the substance, particularly solids, such as the molecular and electronic structure, particle size and shape, and heterogeneity in both density and composition.

In this presentation, we describe two topics that use quasi-static magnetic field gradients. The first topic is dedicated to measuring the transport properties of the quasi-particles that concern conformational disorder (‘conformon’) in the head-to-tail regioregular, π-conjugated polymer poly(4-methylthiazole-2,5-diyl)[P4MeTz] under an internal quasi-static magnetic field gradient(Fig.1). The second topic is the proton one-dimensional (1D) MRI (depth-profiling experiment) of threelayered poly(dimethylsiloxane) [PDMS]/ poly(tetra fluoroethylene) [PTFE]/PDMS thin films under an external static magnetic field gradient from a small neodymium ferromagnet. These results would be useful to fabrications and tests of polymer electronics devices such bio-inspired sensors and signal/information processing devices with ultra-low energy consumption.[3]

Reference

1) N.Asakawa and T.Obata, *Polymer J.*, **44**, 855-862(2012).
2) N.Asakawa, K.Matsubara, and Y.Inoue, *Chem.Phys.Lett.*, **406**, 215-221(2005).
3) N.Asakawa, Y.Inoue, T.Yamamoto, T.Shimizu, M.Tansho, and K.Yazawa, ACS Book:``NMR Spectroscopy of Polymers:Innovative NMR Strategies for Complex Macromolecular Systems”, 161-178(2011).

L21

ナノダイアモンドを用いた光検出磁気共鳴顕微鏡装置の開発と生物試料への応用

○森重之[1], 吉成洋佑[2], 五十嵐龍治[1], 外間進悟[1], 横田浩章[2], 栃尾豪人[1], 白川昌宏[1], 原田慶恵[2, 3], 池田和寛[4], 角谷均[4]
[1]京大・工学研究科
[2]京大・物質－細胞統合システム拠点
[3]京大・生命科学研究科
[4]住友電気工業(株)・エレクトロニクス・材料研究所

Development of a microscope optically detecting magnetic resonance in nanodiamond and application to observation of biological samples

○Shigeyuki Mori[1], Yosuke Yoshinari[2], Ryuji Igarashi[1], Shingo Sotoma[1], Hiroaki Yokota[2], Hidehito Tochio[1], Masahiro Shirakawa[1], Yoshie Harada[2,3], Kazuhiro Ikeda[4], and Hitoshi Sumiya[4].
[1]*Graduate School of Engineering, Kyoto University, Kyoto, Japan.*
[2]*Integrated Cell Material Sciences, Kyoto University, Kyoto, Japan.*
[3]*Graduate School of Biostudies, Kyoto University, Kyoto, Japan.*
[4]*Electronics & Materials R&D Laboratories, Sumitomo Electric Industries, Ltd., Hyogo, Japan.*

Nanodiamond particle contains fluorescent lattice defects called “Nitrogen-Vacancy Centers”. The energy levels of the ground state related to fluorescence emission also correlate with electron spin resonance and the emission process is known to be affected by the ground state spin configuration. Their quantum states are investigated by optically detected magnetic resonance (ODMR). We combine fluorescence imaging and ODMR for nanodiamond particle, and detect magnetic resonance signal induced by microwave irradiation at the resonant frequency as a change of the fluorescence intensity. In this talk, we present a development of the fluorescence ODMR microscope, which enables us to perform ODMR measurement of single nanodiamond. In order to improve time resolution, we introduced an avalanche photodiode together with a CCD camera for simultaneous tracking of the target position.

蛍光性ダイアモンドナノ粒子(FND: fluorescent nanodiamond)は、窒素―空孔中心(NVC: nitrogen-vacancy center)と呼ばれる格子欠陥を結晶内に持ち、532nmの光で励起すると600-800 nm の波長付近に蛍光を発する。このFNDは、蛍光の退色や明滅がない、細胞毒性が低い、表面修飾が容易であるといった、蛍光プローブとして非常に有用な性質を持っている。また、NVC の蛍光発光に関わる基底状態のエネルギー準位は、電子スピン共鳴(ESR: electron spin resonance)にも関与しており、蛍光遷移過程に影響を与えることが知られている。そのため、NVC の量子状態を光検出磁気共鳴(ODMR: optically detected magnetic resonance)によって読み取ることができる。我々はFND を蛍光プローブとして用い、蛍光イメージング手法と ODMR を組み合わせた新たな計測手法を開発した。これにより、共鳴周波数のマイクロ波を照射することで起きるNVC の磁気共鳴現象を蛍光強度の変化として検出でき、ダイア粒子の選択計測を高感度に行うことが可能となる。さらに、NVC に外部から静磁場を印加した状態では、N－V 結合方向と静磁場との角度に依存して、ODMR スペクトルに変化が現れる。この変化を解析することで、ダイア粒子の角度変化を詳細に知ることもできる。

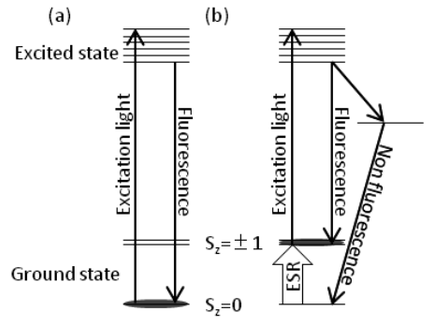


Fig. 1 The fluorescence emission process of NVC (a) without microwave irradiation, (b) with microwave irradiation

本発表では、FND を蛍光プローブに用いる新しい光検出磁気共鳴顕微鏡装置の開発について説明する。この装置では、CCD カメラを用いた視野観察によって目的粒子の位置を追跡しながら、アバランシェフォトダイオードによる高い時間分解能で輝点からの蛍光強度計測を行うことができる。また、開発した装置を用いて、生物試料の動態計測を行った。その実験結果についても報告する。

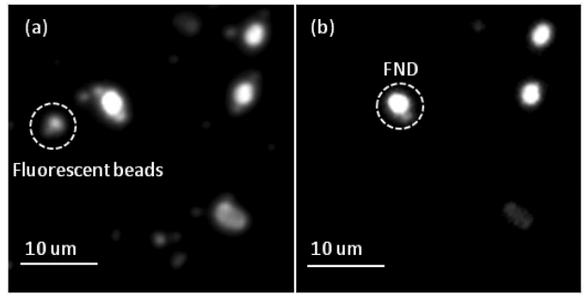


Fig. 2 Fluorescence images of fluorescent beads and FND (a) image taken by a conventional method, (b) FND selective image

Nitrogen-vacancy center in diamond, Optically detected magnetic resonance, Fluorescence imaging

○もりしげゆき，よしなりようすけ，いがらしりゅうじ，そとましんご，よこたひろあき，とちおひでひと，しらかわまさひろ，はらだよしえ，いけだかずひろ，すみやひとし

L22 固体 ^{43}Ca NMR によるガラス中のカルシウムの構造的役割の特定

○金橋康二
新日鐵住金・先端研

Probing the structural role of calcium in alkaline and alkaline-earth aluminosilicate glass by solid-state ^{43}Ca NMR

○Koji Kanehashi
Advanced Technology Research Laboratories, Nippon Steel & Sumitomo Metal Corporation

Structural role of calcium in aluminosilicate glasses has been investigated by solid-state ^{43}Ca NMR spectroscopy. In $15Al_2O_3$-$55SiO_2$-15CaO-15RO (R=Mg, Ca, Sr, Na_2) glass systems, with decreasing cation field strength in the order of $Mg^{2+} > Ca^{2+} > Sr^{2+} > Na^+$, ^{43}Ca isotropic chemical shift moves to higher frequency, indicating that the glasses with Na^+ and Sr^{2+} have shorter Ca-O distance and Ca^{2+} ion in these glasses plays a role of modifying network and creating non-bridging oxygen, whereas Ca^{2+} ion in the glass with Mg^{2+} of larger cation field strength than Ca^{2+} functions as a charge compensator of $(AlO_4)^-$ tetrahedral units. We have successfully distinguished two inequivalent calcium sites in a $15Al_2O_3$-$55SiO_2$-30CaO glass by ^{43}Ca 5QMAS NMR, which should be assigned to Ca^{2+} ion with a network modifier and a charge compensator.

はじめに

一般にアルミノシリケート融体に添加されたアルカリあるいはアルカリ土類金属イオンは、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 としての働きを有する。アルミノシリケート融体中に複数種のアルカリあるいはアルカリ土類金属イオンが共存する場合、どのカチオンが network modifier になるかによって、粘性や伝導性が変化することが予想される。すなわち、これらの役割を明らかにできれば、ガラスの高温物性をコントロールできる可能性があることから、ガラス中のこれらのカチオンの役割を特定することが重要である。

今回、地質学的にも産業的にも重要な成分系であるカルシウムアルミノシリケートに焦点を当て、これに電荷およびイオン半径の異なるいくつかのカチオンを添加した系におけるカルシウムの構造的役割について検討した。

実験

アルミノシリケートガラス、^{43}Ca MAS NMR、^{43}Ca MQMAS NMR

○かねはしこうじ

測定試料は、Al_2O_3, SiO_2, $^{43}CaCO_3$, MgO, $SrCO_3$ および Na_2CO_3 を所定比に混合し、片側を溶接した白金製チューブ内に入れ、900℃に脱炭酸した。その後、解放端を閉じて 1600℃で 1 時間溶融させた後、水中にクエンチすることによって、モル比で $15Al_2O_3$-$55SiO_2$-15CaO-15RO (R=Mg, Ca, Sr, Na_2)の組成を持つガラスを合成した。^{43}Ca MAS および MQMAS スペクトルの測定には、INOVA-500 (^{43}Ca: 33.64 MHz) および ECA-700 (^{43}Ca: 47.11 MHz) を用いた。^{43}Ca の化学シフト基準は、飽和 $CaCl_2$ 水溶液のピークを 0 ppm とした。

結果・考察

Fig. 1 に合成したカルシウムアルミノシリケートの ^{43}Ca MAS スペクトルを示す。第 4 元素として添加したアルカリあるいはアルカリ土類金属イオンの種類によってピークの重心値が変化しており、Ca^{2+}の環境が変化していることがわかる。ここで、カチオンの酸素イオンとの親和力を示す cation field strength（CFS=Z/r^2：Z は価数、r は R-O 間距離）に着目すると、それぞれ Mg^{2+}（6 配位）: 0.46、Ca^{2+}（6 配位）: 0.36、Sr^{2+}（8 配位）: 0.29、Na^+（6 配位）: 0.18 となり、CFS が大きいほど ^{43}Ca のピークの重心値が低周波数側にシフトしていく傾向が見られた。^{43}Ca NMR スペクトルの化学シフト値と Ca-O 距離にはほぼ直線の相関が成り立つため [1]、CFS が大きいカチオン種を含むガラスほど、Ca-O 距離が長くなることがわかる。これらの結果から、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、優先的に非架橋酸素と結びついて network modifier として作用するため、結果として Ca^{2+}は charge compensator になりやすいのに対し、Sr^{2+}や Na^+は Ca^{2+}と比べて CFS が小さいため、Ca^{2+}のほうが network modifier になりやすいと考えることができる。

R=Ca、すなわち $15Al_2O_3$-$55SiO_2$-30CaO の組成の場合、network modifier および charge compensator の役割を担うカチオン種は Ca^{2+}のみであるため、30 mol%の Ca のうち、半分が $(AlO_4)^-$の電荷補償を行い、残りの半分が非架橋酸素を作り出していると考えられる。そこで、^{43}Ca 5QMAS スペクトルによって役割の異なる Ca^{2+}の分離を試みた結果、MAS や 3QMAS スペクトルでは観測されなかった 2 つのピークトップが観測され、network modifier および charge compensator の Ca^{2+}を区別することに初めて成功した。

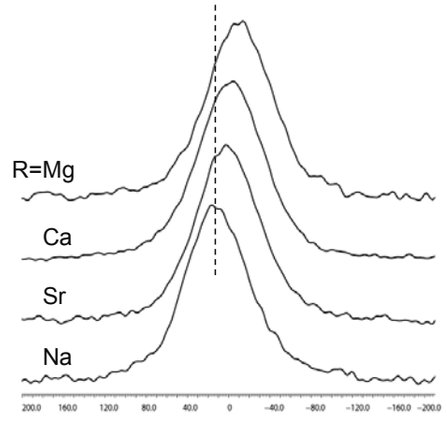


Fig. 1 ^{43}Ca MAS NMR spectra for $15Al_2O_3$-$55SiO_2$-15CaO-15RO (R=Mg, Ca, Sr, Na_2) glasses collected at 16.4 T. A dotted line is a guide for the eye.

文献

1) F. Angeli, M. Gaillard, P. Jollivet, T. Charpentier, *Chem. Phys. Lett.*, **440** (2007) 324-328.

L23 高磁場光ポンピングによるアルカリ金属イオンの核スピン偏極

○石川 潔
兵庫県立大学大学院 物質理学研究科

High-field optical pumping for nuclear spin polarization of alkali-metal ions

○ Kiyoshi Ishikawa
Graduate School of Material Science, University of Hyogo, Japan

Our project aims to achieve a comprehensive understanding of nuclear-spin dynamics such as spin transfer, spin transport, and spin accumulation in various phases of materials. We report hyperpolarization of alkali-metal ions achieved in alkali salts and in a glass material by optical pumping of alkali-metal vapor. The polarized gas mediates spin transferring from photons to alkali ions in the matters. If the polarized ions remain near the surface, it could lead to surface-sensitive NMR measurement of solid. When increasing the mobility of ions, we are able to hyperpolarize the macroscopic crystals. Laser heating is suitable for activating the ion movement. In addition to spin exchange where spin polarization is injected by nuclear dipole interaction between atoms and salt ions, we present the evidence of injection of polarized atoms into the glass.

我々は、光のスピン角運動量を物質に移し、輸送し、蓄え、使うことをめざしている。 光で核スピンを直接に操作できないので、電子を介す。 しかし、多くの場合、物質中の電子は緩和が速いので、孤立系であり汎用性のある原子を使う[1]。 光により核スピン偏極した Cs 原子が、固体 Cs 塩の表面に吸着すると、Cs 核間の磁気双極子相互作用により、原子から塩にスピン偏極が移る。 やはり双極子相互作用によりスピン偏極は固体中を拡散するが、スピン拡散長が短く、原子からもらった核スピン偏極は表面付近にとどまる。 これは、表面近傍の核スピンダイナミクスを調べるのに適する。 例えば CsCl の場合、スピン拡散長は $\sqrt{DT_1} \approx$ 数 10 nm と計算される。 表面からスピン偏極を注入し、スピン拡散させる時間を調整すれば、最表面を選択することもでき、表面敏感な NMR 計測が可能である。

一方、表面だけでなく、マクロな結晶内部まで核スピン偏極するためには、双極子相互作用には頼れない。 新たな輸送手段として結晶に持ち込むのは、イオンの併進運動である。 Cs 塩は、超イオン伝導体ではないが、加熱すればイオンの易動度が格段に増加する。 偏極イオンの拡散とともに、スピン角運動量も結晶中を速やかに拡散するはずである。 電場による運動の制御も期待できるので、イオンをキャリアとしたスピン偏極の輸送を調べることは重要である。 偏極(増大)ラベルした拡散計測は、通常の拡散 NMR 計測や、飽和(減少)ラベリング・拡散強調イメージングを補完する。

Hyperpolarization, Alkali-Metal Ions, Spin Diffusion

○いしかわ きよし

実験では、気体 Cs 原子を光ポンピングしながら、固体 Cs 塩(CsCl, CsI)をレーザー加熱し、Cs イオンの NMR 信号を増大させた[2]。 これまで、永久磁石(0.56T)による成果を報告してきた[3,4]。 併せて、今回は、超伝導磁石(9.4T)中で、同様に実験した。 我々の偏極法の重要な物理過程である、光ポンピング[5]、表面におけるスピン偏極移行[6]が、高磁場中で機能することを実験的に示すことができた[7]。 磁場が高く安定であるため、信号の増大率、線幅や化学シフトなどにより、固体中のスピン偏極の拡散についても詳しく調べることができた。

最後に、Cs 塩以外でも偏極 Cs イオンを観測できたことを報告したい。 ガラス容器には、Cs 金属と窒素ガスのみを封入し、Cs 塩を添加していない。 この容器に存在しうるイオンは、気体イオンあるいはガラス中のイオンである。 強力なレーザー光を照射するので原子がイオン化されることもあろうが、NMR 検出できるほど気体中のイオン数は多くない。 むしろ、観測された NMR 信号の線幅が広いので、ガラス中のイオンと考えられる。 しかし、ホウ珪酸ガラスに元々含まれる Cs イオンは、ごく僅かである。 したがって、気体からガラスに注入された偏極 Cs イオンが検出されたと考えるのが妥当である。 Cs 塩では、双極子相互作用によりスピン偏極が注入(Spin Exchange)されたので、角運動量を受け取る Cs 核が必要だった。 しかし、ガラスに偏極イオンが注入(Atom Exchange)されたのが事実だとすれば、他の物質にも応用可能な方法を手に入れたことになる。

[1] 結晶の吸収帯は紫外域にあるが、励起電子の位相緩和は速いから、スピン偏極には使えないだろう。 CsCl 結晶の格子欠陥である色中心の吸収帯は 600 nm 付近にある。 色中心の電子を光でスピン偏極できるだろうが、核へのスピン偏極移行のためには電子スピン緩和を長くする、つまり、結晶を低温にする必要がある。 それならば、初めから動的核偏極(DNP)をした方が良い。 我々の実験では、ポンピング光は原子だけでなく Cs 塩にも照射されているが、光波長が原子の吸収波長に一致したときにのみ、結晶中のイオンがスピン偏極する。 色中心については、次の論文参照。 H. Rabin and J. H. Schulman, **Color Centers in CsCl-Type Alkali Halides**, Phys. Rev. **125**, 1584 (1962).

[2] レーザー光を絞り込んでいるので、試料全体に比べ、加熱している体積は小さい。 高温になった試料のみのスピン偏極率は、試料全体で平均した観測値(0.1 %)より高いだろう。

[3] K. Ishikawa, **Spin polarization of salt nuclei by Optical pumping of Cs atoms and Laser heating of Cs salt**, ISNMR2011, L-20, Nov. 18 (2011) Yokohama.

[4] K. Ishikawa, **Hyperpolarization of ^{133}Cs nuclei enhanced by ion movement in a cesium salt**, Phys. Rev. A **84**, 061405R (2011).

[5] 高磁場光ポンピングでは、レーザー波長により原子の光学遷移を選択できるので、励起光の偏向は最重要ではない。 ランダム(無)偏光であっても良い。 詳しくは、次の論文参照。 K. Ishikawa, B. Patton, B. A. Olsen, Y.-Y. Jau, and W. Happer, **Transfer of spin angular momentum from Cs vapor to nearby Cs salts through laser-induced spin currents**, Phys. Rev. A **83**, 063410 (2011).

[6] 原子とイオンが同じ ^{133}Cs 核なので、双極子相互作用によるスピン移行レートは、あまり磁場に依存しない。

[7] 増大した Cs NMR 信号の符号など定性的な説明は可能だが、Cs 原子の光学遷移ごとの NMR 増大率など、定量的な議論には余地がある。

L24

固体NMRによるマジックサイズCdSeナノ粒子の表面構造解析

○野田泰斗[1,2]，水野敬[3]，武田和行[1]，竹腰清乃理[1]，粕谷厚生[4]
[1]京都大学大学院理学研究科
[2]JST・先端
[3](株)JEOL RESONANCE
[4]東北大学学際センター

Solid-State NMR Study of Surface Structure on Magic-Sized CdSe Nanoparticles

○Yasuto Noda[1,2], Takashi Mizuno[3], Kazuyuki Takeda[1], K. Takegoshi[1] and Atsuo Kasuya[4]
[1]Division of Chemistry, Graduate School of Science, Kyoto University, Kyoto, Japan.
[2]SENTAN/JST, JST-SENTAN, Tokyo, Japan.
[3]JEOL RESONANCE Inc., Akishima, Japan.
[4]Center for Interdisciplinary Research, Tohoku University, Sendai, Japan.

We report on synthesis of octylamine-capped 2 nm magic-sized CdSe nanoparticles and their characterization using ^{13}C, ^{77}Se, ^{113}Cd, and ^{15}N solid-state NMR, focusing on the structure at the interface of the nanoparticle and the surfactant. ^{1}H-^{77}Se/-^{113}Cd cross-polarization experiments suggest that the Se atoms bind the protonated amines via hydrogen bonding.

背景

半導体ナノ粒子では、量子閉じ込め効果により粒子の大きさを変えるだけで吸収と発光波長を制御できる。特にCdSeでは、バルクから2 nm程度のナノ粒子まで小さくしていくだけで近赤外から紫外まで可視光全領域をカバーできる[1]。この効果を詳しく調べ様々なデバイス等に応用するには、ナノ粒子の大きさと分布の制御が必須である。

最近になってCdSeナノ粒子を幾つかの異なる条件で作製する過程で、特定の波長に鋭い吸収ピークを示す試料が見出された。これは粒子が特定の大きさでのみ安定に成長することを意味し、マジックサイズナノ粒子とよばれた[2-4]。例えばトルエン中に脂肪族アミンの逆ミセルを用いて室温で大量合成されたCdSeナノ粒子は、鋭い吸光ピークを波長415 nmに示し、直径1.5 nmであるとAFMから、また $(CdSe)_{34}$であると質量分析から帰属されている[2]。この結果により原子数まで揃った単一なCdSeナノ粒子が作成可能になり、どのよう構造で安定しているかを調べることが急務となっている。

これまで、CdSeナノ粒子の溶液に界面活性剤として脂肪族アミンを添加することにより発光強度の増大[5]、化学エッチング[6]、マジックサイズナノ粒子への変化[7]が報告されている。このように、CdSeナノ粒子と脂肪族アミンとの相互作用が発光効率といった機能性と粒子の安定性に寄与していると考えられるが、結合状態を含んだ粒子

キーワード：ナノ粒子，表面，固体NMR

○のだやすと，みずのたかし，たけだかずゆき，たけごしきよのり，かすやあつお

の表面状態の詳細は不明である。数値計算では、アミノ基の窒素が孤立電子対を介して粒子表面のカドミウムに配位結合している予想がある[8]。一方で、我々は直径1 nmのマジックサイズナノ粒子では、セレンの方がカドミウムよりも粒子の外側に出ていることを示唆する結果を得ている[3]。今回、我々はオクチルアミンに覆われた2 nmのマジックサイズCdSeナノ粒子の表面状態を固体NMRにより解析した。

実験

オクチルアミンに覆われた$(CdSe)_{34}$粒子のトルエン溶液に多量のオクチルアミンを添加し60℃に保持すると、新たに波長450 nmに鋭い吸光ピークが成長する一方で、$(CdSe)_{34}$粒子を示す波長415 nmのピークは消滅した。これは、$(CdSe)_{34}$を原料としてより大きなマジックサイズナノ粒子が新たに得られたことを示している。吸光ピークの波長450 nmと粒径の経験式[9]を用いて2 nmと見積もった。

固体NMRは、磁場7 Tで^{13}Cと^{77}Se、^{113}Cd核の測定を,キャリア周波数75.32 MHz、57.09 MHz、66.46 MHzにて、磁場14 T で^{15}N核の測定を60.81 MHzでそれぞれ行った。

結果と考察

粒子の表面にはオクチルアミンが存在するため、^{1}Hから^{77}Seあるいは^{113}Cdへ分極を移せば粒子表面のみを選択的に観測できる。Figure 1に^{77}Seと^{113}CdのCP/MASスペクトルを示す。^{77}Seでは-501 ppm (P_{Se1})と-630 ppm (P_{Se2})、^{113}Cdでは563 ppmにそれぞれピークが観測された。ピークはこれまで観測されたCdSeナノ結晶の^{77}Se/^{113}Cd MAS NMR[10-12]と比べて極めて細い。その異方性を調べるために静止状態のCPにより測定したスペクトルとフィッティングカーブをFigure 2に示す。^{77}Seのスペクトルは1つのピークに1つのサイトとしてフィッティング可能だが、^{113}Cdの線形は1つのサイトだけではフィッティングできないため、等方化学シフト値は同一だが化学シフト異方性の違うサイトが2つあると仮定するとフィッティングできた。このため、^{113}Cdではより異方性の低い信号をP_{Cd1}、高い信号をP_{Cd2}と呼ぶことにする。フィッティングにより

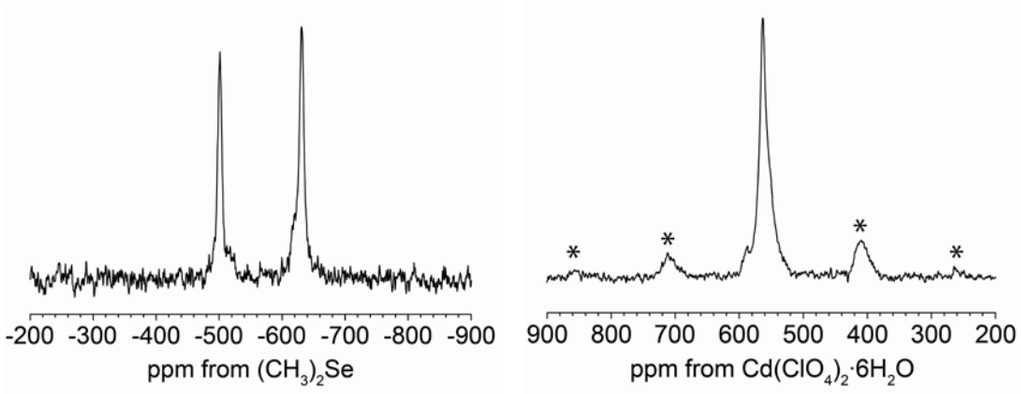


Figure 1. ^{1}H-^{77}Se (left) /-^{113}Cd (right) CP/MAS NMR spectra of octylamine-capped 2 nm magic-sized CdSe nanoparticles. The MAS frequency was 10 kHz. The asterisks indicate

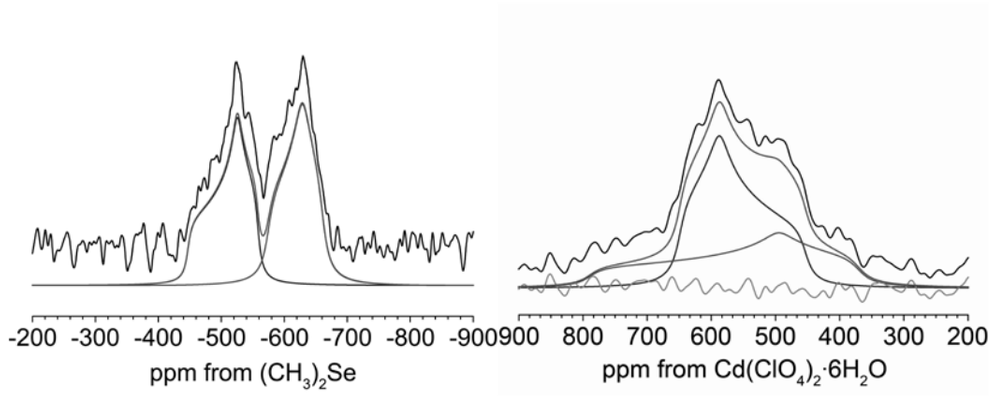


Figure 2. ^{1}H-^{77}Se (left) /-^{113}Cd (right) CP NMR spectra acquired in a static sample of the magic-sized CdSe nanoparticles.

得られた化学シフト異方性パラメータをTable 1にまとめている。

どのサイトがより粒子表面に近いか決定するために、表面の^{1}Hからの分極の移動時間T_{IS}を調べた。^{77}Seと^{113}Cdの異種核間でT_{IS}を比較するため、より正確に接触時間t_c依存性を測定する必要がある。T_{IS}はハートマン－ハーン条件からのずれと、回転座標系での縦緩和時間$T_{1\rho}$にも依存する。正確に接触時間t_c依存性を求めるために、静止状態で$T_{1\rho}$依存性を消すTORQUEシーケンス[13]を用いて測定した。得られたスペクトルをFigure 2で示したモデルカーブでフィッティングして面積強度を求め、プロットしたのがFigure 3である。Figure 3の立ち上がりのカーブから求めたT_{IS}の逆数は、磁気回転比の2乗に比例し、プロトンからの距離の6乗に反比例することを用いて、各サイトからプロトンまでの距離の比を求めた（Table 1）。P_{Se2}とP_{Cd2}がプロトンに近いことから外側のサイトを占め、P_{Se1}とP_{Cd1}はより内側のサイトを占めていることが判明した。また化学シフト異方性パラメータから、どのサイトもバルクCdSeで見られる一軸対称性を失っており、セレンでは外側を占めているサイトのほうが異方性が小さく、カドミウムでは大きい。これらのことから、SeのP_{Se1}とCdの両サイトは大きく歪んだ四面体にあり、SeのP_{Se2}がオクチルアミンと結合していることが示唆される。

Table 1. Parameters obtained from data fitting of the spectra in Fig. 2.

	δ_{iso} / ppm	Δ / ppm	η	T_{IS} / ms	$r/r_{H\text{-}Se2}$
P_{Se1}	-501	74	0.52	19.3	1.4
P_{Se2}	-630	54	0.68	3.1	1
P_{Cd1}	563	-110	0.56	12.5	1.3
P_{Cd2}	563	238	0.52	2.5	1

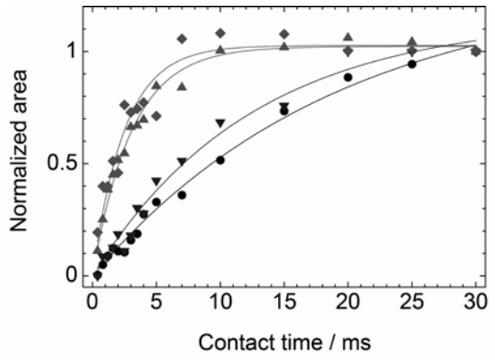


Figure 3. Contact time dependence of normalized peak areas obtained with static TORQUE CP measurements. The solid circles, triangles, inverse triangles, and diamonds correspond to the P_{Se1}, P_{Se2}, P_{Cd1}, and P_{Cd2} sites, respectively.

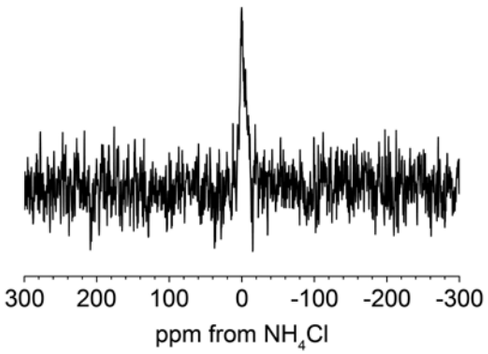


Figure 4. A ^{1}H-^{15}N CP/MAS NMR spectrum of 2 nm magic-sized CdSe nanoparticles capped with octylamines.

次に、そのセレンのサイトと界面活性剤がどのように結合しているか調べるために^{1}H-^{15}N CP/MASを測定した（Figure 4）。ピークは-10 ppmに1本のみ観測された。このピーク位置は、界面活性剤のアミノ基が水素化されてNH^{3+}となり、P_{Se2}サイトのSeと水素結合していることが示唆している。

以上の結果から、SeとCdはともに表面に2つのサイトをもち、SeのP_{Se2}サイトと界面活性剤がアミノ基の水素を介して結合していると結論した。

謝辞

本研究の一部はJST先端計測分析技術・機器開発プログラムの支援を受けて実施されました。ここに記し感謝申し上げます。

参考文献

[1] C. B. Murray et al., *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 8706-8715 (1993).
[2] A. Kasuya et al., *Nat. Mater.* **3**, 99-102 (2004).
[3] Y. Noda et al., *Eur. J. Phys. D* **57**, 43-47 (2010).
[4] K. Yu, *Adv. Mater.* **24**, 1123-1132 (2012).
[5] C. Bullen and P. Mulvaney, *Langmuir* **22**, 3007-3013 (2006).
[6] R. Li et al., *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 2524-2532 (2005).
[7] C. Landes et al., *Nano Lett.* **1**, 667-670 (2001).
[8] J. S. Son et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* **48**, 6861-6864 (2009).
[9] W. W. Yu et al., *Chem. Mater.* **15**, 2854-2860 (2003).
[10] M. G. Berrettini et al., *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 7063-7070 (2004).
[11] C. I. Ratcliffe et al., *Phys. Chem. Chem. Phys.* **8**, 3510-3519 (2006).
[12] D. D. Lovingood et al., *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 3344-3354 (2010).
[13] P. Tekely et al., *Solid State Nucl. Magn. Reson.* **4**, 361-367 (1995).

L25

常磁性により複雑化したMAS線形における選択励起 ：リチウムイオン電池正極材への応用

○村上美和[1],高澤信明[2],汐月大志[2],寺島純平[2],荒井創[1],内本喜晴[3], 小久見善八[1]
[1]京大･産連本部,[2]トヨタ自動車,[3]京大・人環

Selective excitation of a MAS sideband spectrum spreading widely by paramagnetic interaction: application to cathode materials of Li-ion battery

○Miwa Murakami[1], Nobuaki Takazawa[2], Taishi Shiotsuki[2], Junpei Terashima[2], Hajime Arai[1], Yoshiharu Uchimoto[3], and Zempachi Ogumi[1]
[1]*Office of Society-Academia Collaboration for Innovation, Kyoto University, Uji, Japan.*
[2]*Toyota Motor Corporation, Susono, Shizuoka, Japan.*
[3]*Graduate School of Human and Environmental Studies, Kyoto University, Kyoto, Japan.*

Most of cathode materials of the lithium ion battery include transition metals such as Mn or Fe, and their NMR spectra of ^{6}Li/^{7}Li become complicated by many spinning sidebands due to the anisotropic dipolar interaction between the electronic and nuclear moments. In this presentation, we examine an approach for selective observation of individual sideband manifold by using rotor-synchronized DANTE. Applicability of rotor-synchronized DANTE to crowded sidebands spreading over a few 100 kHz is examined. As for the sample, we used Li_2MnO_3 and showed that the ^{7}Li spinning sideband manifold observed by rotor-synchronized DANTE is most likely ascribed to Li in the 2c site.

[緒言] リチウムイオン電池の正極材料の多くはMnやFeなどの遷移金属を含み、その価数によって常磁性を示すことから、^{6}Li/^{7}Liの NMR スペクトルは常磁性相互作用によるシフト(フェルミ接触シフト)や電子との双極子相互作用による線幅のために複雑になる。多くの場合、MAS を行っても0～2000 ppmに及ぶ広い範囲に多数のサイドバンドが現れ、複数のLiがある場合は解析が困難になる。本研究では、3つの Li サイトが存在することが知られているLi_2MnO_3の複雑な多数のサイドバンドの集合に対して、回転同期 DANTE 法[1]による選択励起を用いて、各サイトのサイドバンドパターンを分離測定する方法を検討した。さらに、実際に正極材料として検討されている焼成温度450℃のLi_2MnO_3材料に適用し、得られたパターンをX線構造を元に求めたLi-電子間双極子相互作用から計算したパターンと比較して解析した。

[実験] 試料は所定量の$LiOH\cdot H_2O$とMnO_2を混合し、450℃で48時間焼成することにより合成した。^{7}Li NMR 測定には JEOL 社製 ECA600(14 T、^{7}Li の共鳴周波数は 233.24 MHz)を用いた。

リチウムイオン電池，常磁性相互作用，選択励起

○むらかみみわ，たかざわのぶあき，しおつきたいし，てらしまじゅんぺい，あらいはじめ，うちもとよしはる，おぐみぜんぱち

[結果および考察] 図 1a)にLi_2MnO_3のシングルパルスの測定結果を示す。0 ppmを中心に観測されているシャープな信号は合成時の副生成物のLi_2CO_3であり、それ以外のブロードな信号が試料のLi_2MnO_3に由来すると考えられる。Li_2MnO_3には4h、2c、2bの3つのリチウムサイトがあることが知られており(図 2)[2]、実際、$^{6/7}$Li NMR で3つのサイトの帰属が報告されている[3,4]。そこでまず、信号分離に有利な高温焼成試料(900℃)を用いて、3つのサイトのサイドバンドパターンの分離測定を回転同期 DANTE を用いて試み、良い分離を得た(ここでは示していない)。その照射rf条件を用いて、図 1a)に矢印で示した位置を照射して測定した回転同期 DANTE スペクトルを図 1b)に示す。Li_2CO_3の信号強度は小さくなり、Li_2MnO_3に由来する信号を分離観測することができた。

Grey らは結晶構造から求めた電子-^{6}Li の相極子相互作用テンソルが実測のサイドバンドパターンを良く再現することを示している[4]。そこで、我々も同様な計算を行い、結晶構造から3つのリチウムサイトについて ^{7}Li のサイドバンドパターンを計算し(Fig1c)-e))、回転同期 DANTE で得られたスペクトルと比較した。計算で得られたスペクトルと回転同期 DANTE 法で観測されたスペクトルを比較すると、今回測定した試料は2c サイトのリチウムを主な成分としているのではないかと考えられる。今後は他の 4h や 2b 成分も考慮した詳細な解析を行う予定である。

以上から、回転同期 DANTE 法によるサイドバンド分離観測と構造を元にした線形計算の比較というアプローチは Li 電池の正極剤の評価に有効であると考えている。

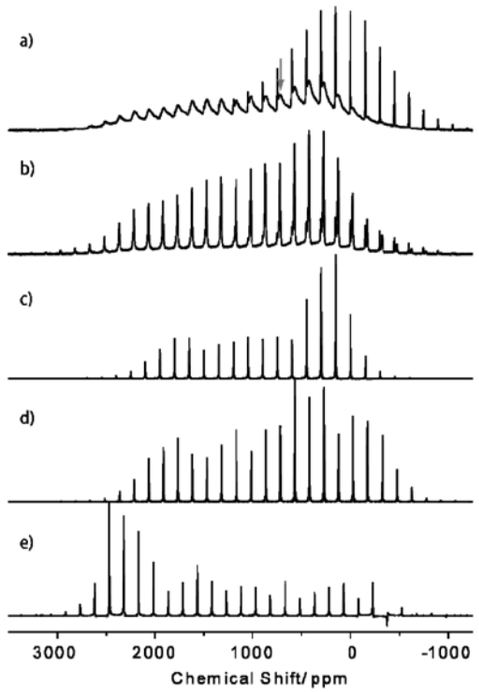


Fig. 1 ^{7}Li NMR spectra observed by a) single pulse, b) rotor-synchronized DANTE, and simulated ones for c) 4h, d) 2c, and e) 2b site.

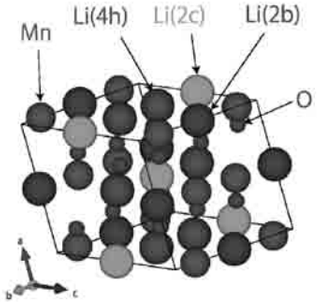


Fig. 2 Crystal structure of Li_2MnO_3

1. P. Caravatti, G. Bodenhausen, and R.R. Ernst, J. Magn.Reson., 55, 88-103(1983).
2. P. Strobel and B. Lambert-Andron, J. Solid State Chem., 75, 90-98(1988).
3. For example, M.R. Morgan et al, J. Chem. Soc. Commun., 1719-1720(1994).
4. Y.J. Lee and C.P. Grey, J. Phys. Chem. B 106, 3576-3582 (2002).

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。また、Fig. 2 は VESTA (K. Momma and F. Izumi, J. Appl. Crystallogr., 44, 1272-1276 (2011))で作成した。

L26 固体 ^{15}NNMR を用いた鉄含有ポリアニリン炭素化物の構造解析

○黒木重樹[1], 上口憲陽[2], 木村英昭[3], 山内一夫[4]

[1]東京工業大学院理工[2], (株)日産アーク,

[3]ブルカー・バイオスピン(株), [4]KAUST

^{15}N Solid State NMR Study of Iron-Containing Pyrolyzed Polyaniline

Shigeki Kuroki[1], Kazuhiro Kamiguchi[2], Hideaki Kimura[3], Kazuo Yamauchi[4]

[1]Department of Organic and Polymeric Materials, Tokyo Institute of Technology,

[2]NISSAN ARC, LTD. [3]Bruker BioSpin K. K.[4]KAUST

Iron-containing and iron-free ^{15}N labeled polyaniline is prepared as a precursor of N-doped carbon and is pyrolyzed at several different temperatures. The oxygen reduction reaction is evaluated, and solid-state ^{15}N NMR spectra of the samples are measured. The relationship between oxygen reduction activity and the chemical structure is discussed. Various contact time ^{15}N CP/MAS NMR experiments show iron-containing pyrolyzed polyaniline samples contain the paramagnetic spices in their systems, which will be Fe^{3+} or Fe^{2+} and neighbor ^{1}H $T_{1\rho}{}^{H}$ decrease dramatically by the presence of unpaired electrons.

[緒言] 固体高分子形燃料電池（PEFC）は，低温での発電が可能なため耐高温用断熱材などを使わなくても良いというメリットがあるが，高い触媒機能を有する高価な白金を使用しなければならないというコスト上の大きなデメリットがある．白金は，PEFC の燃料極及び空気極の両極で使用されているが，特に空気極において多量の白金が酸素還元（ORR）触媒として使用されている．このような状況下，新規白金代替酸素還元触媒の開発が，国内外で精力的に進められている．

これまで，いくつかの非白金 ORR 触媒が提案されている．1964 年，Jasinski が遷移金属ポルフィリンやフタロシアニンが ORR 特性示すことを報告して以来[1]，世界中の多くの研究者が，遷移金属(Co or Fe)，炭素，窒素含有前駆体の混合物を高温で熱処理することにより高活性の酸素還元触媒を得ることに成功している．我々も鉄を含んだポリピロールおよびポリアニリンを熱処理した試料（カーボンアロイ触媒と命名）が高い ORR 活性を示すことを報告した[2,3]．その ORR 活性点に関し，様々なモデル[4,5]が提案されているが，未だ結論に達していない．そこで，我々は鉄なしおよび鉄含有高分子ポリアニリンの熱処理物中の窒素原子に注目し，試料中の残存鉄の存在が，窒素の固体 NMR へどのような影響を及ぼすかを考察した．

[実験] ^{15}N ラベルアニリン/1N-HCl 溶液を 0°C に冷却後，酸化剤として過硫酸アンモニウムを加え，5°C で 1.5 時間攪拌し， PANI 塩酸塩を得た．その後， NH_4OH 水溶液中で 15 時間攪拌することにより， PANI を得た．さらに PANI を $FeCl_3$ 水溶液中で数時間攪拌することにより $FeCl_3$ ドープ PANI(PANIFe)を調製した．得られた PANI および PANIFe を窒素気流下で 700，800，900，1000°C で 1 時間熱処理することにより炭素化を行った．その後，濃塩酸で酸洗いすることにより試料を得た．試料はその熱処理温度を踏まえて，例えば PANIFe の 700°C 処理試料は，PANIFe700 と呼ぶことにする．

キーワード：固体 ^{15}N NMR，ポリアニリン，窒素ドープカーボン

○くろきしげき，かみぐちかずひろ，きむらひであき，やまうちかずお

固体 NMR 測定は Bruker Biospon 社製 CP-MAS ユニットを付属した Avance DSX 300 NMR 分光器を用いた．

[結果と考察] 回転ディスク電極法を用いて得られた熱処理された PANIFe および PANI の酸素還元（ORR）ボルタモグラムを Fig.1 に示す．得られた酸素還元開始電位 E_{onset} 及び電流密度，平均反応電子数から，鉄を含有する PANI の焼成によって得られた PANIFe が鉄を含まない PANI よりも高い ORR 活性を示すことがわかる．TEM 画像から, PANIFe には還元により生成すると予測される金属鉄の微粒子は観測されなかった．しかし，EDX 測定の結果，試料中に何らかの鉄種が存在することが明らかとなった．

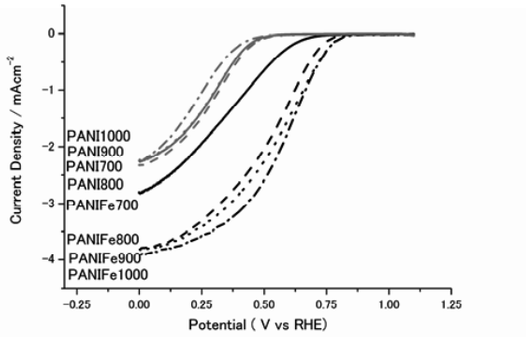


Fig.1 Oxygen reduction voltammograms of the pyrolyzed PANIs.

各々の試料の固体 ^{15}N CP/MAS NMR 測定から 110ppm および 270ppm 付近に 2 つの主ピークが観測された. 主に 110ppm はピロール型窒素，270ppm はピリジン型窒素に帰属される．

900°C の熱処理で得られた PANIFe900 と PANI900 の固体 ^{15}N CP/MAS NMR スペクトルをコンタクトタイムを変化させて測定し，コンタクトタイムに対する 110ppm のピロール型窒素および，270ppm のピリジン型窒素の信号強度の変化をプロットした結果を Fig.2 に示す．

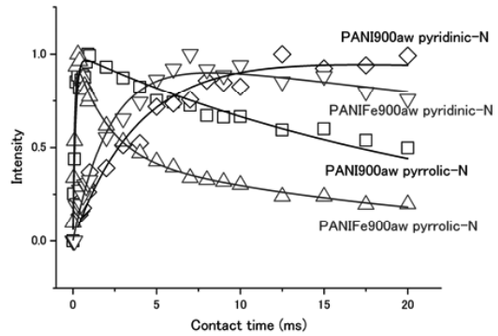


Fig.2 ^{1}H→^{15}N CP kinetics in PANIFe900 and PANI900.

これらの曲線から T_{NH} および $T_{1\rho}{}^{H}$ を求めると，ピロール型窒素において，鉄なし PANI900 は T_{NH} = 0.156 ms, $T_{1\rho}{}^{H}$ = 24.2 ms, 鉄含有 PANIFe900 は T_{NH} = 0.100 ms, $T_{1\rho}{}^{H}$ = 1.91 ms と T_{NH} = 0.098 ms, $T_{1\rho}{}^{H}$ = 20.7 ms の 2 成分が観測された．T_{NH} は両者ともほぼ同じ値を示した. PANIFe900 の後者の $T_{1\rho}{}^{H}$ の長い成分は鉄なし PANI900 とほぼ一致しているが，一方で極端に $T_{1\rho}{}^{H}$ の短い成分が存在していることがわかった．これは，鉄含有 PANIFe900 においては Fe^{3+} または Fe^{2+}イオンが系中に存在し，その電子スピンとの相互作用により，近傍の ^{1}H 核の緩和が促進されていると考えられる．さらなる詳細は講演で述べる．

[謝辞] 本研究は NEDO 産業技術研究助成事業により実施された．

[文献]

[1] Jasinski, R. *Nature* 1964, **201**, 1212-1213.

[2] Kuroki, S.; Nabae, Y.; Chokai, M.; Kakimoto, M.; Miyata, S. *Carbon*, 2012, **50**, 153-162.

[3] Kuroki, S.; Hosaka, Y.; Yamauchi, C.; Sonoda, M.; Nabae, Y.; Kakimoto, M.; Miyata, S. *J. Electrochem. Soc.* 2012, **159**, F309-F315.

[4] Lefevre, M.; Dodelet, J.P. ; Bertrand, P. *J. Phys. Chem. B* 2002, **106**, 8705- 8713.

[5] Ikeda, T.; Boero, M.; Fe, S.F.; Terakura, K.; Oshima, M.; Ozaki, J. *J.Phys Chem. C* 2008, **112**, 14706-14409.

ポスター発表要旨

Poster Abstract

P1

SAIL法による巨大蛋白質の新規立体構造解析法の開発

○宮ノ入洋平[1], 武田光広[1], 大熊宏昌[2,3], 小野明[2,3], 寺内勉[2,3],
甲斐荘正恒[1,2]
[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]首都大学東京・戦略研究センター
[3]SAILテクノロジーズ株式会社

Structural analysis for larger proteins using the relaxation optimized SAIL amino acids

○Yohei Miyanoiri[1], Mitsuhiro Takeda[1], Kosuke Okuma[2,3], Akira Mei Ono[2,3],
Tsutomu Terauchi[2,3] and Masatsune Kainosho[1,2]
[1]*Structural Biology Research Center, Graduate School of Science, Nagoya University.*
[2]*Center for Priority Areas, Tokyo Metropolitan University.*
[3]*SAIL Technologies Co., Inc.*

At present, the solution NMR spectroscopy of larger proteins (>50-60 kDa) relies exclusively upon the information obtained from the backbone NH and side-chain CH_3 signals, which are not sufficient for precise structural studies. In order to overcome this situation, we have been exploring further optimizations of the isotope labeling patterns for stereo-array isotope labeled (SAIL) amino acids and successfully observed extremely well-separated aromatic CH cross peaks, even for a 82 kDa *E. coli* malate synthase G (MSG). In this presentation, we describe various types of SAIL amino acids which have optimized relaxation properties for observing aliphatic CH signals in MSG.

[序] 分子量50-60kDaを超える高分子量蛋白質に関する蛋白質溶液NMR研究においては、これまで主鎖アミド基($^1H^{15}N$)やメチル基($^1H_3{}^{13}C$)に関する限定的な構造情報しか得ることができなかったため、高分子量蛋白質の生物機能を理解するうえで、十分な立体構造や動態情報をNMR法により得ることは困難であった。我々は、昨年度の年会において、立体整列同位体標識（stereo-array isotope labeling: SAIL）法により、SAIL芳香族アミノ酸[1-3]を利用することにより、高分子量蛋白質の芳香環シグナルのTROSY法による高感度に観測・帰属が可能であることを示し、分子量82kDaのリンゴ酸合成酵素（malate synthase G: MSG）の様々な芳香環シグナルの観測・帰属結果を報告した[4]。本年会では、これらの研究成果を踏まえたSAILアミノ酸の更なる改良、及び大腸菌高発現系を用いた選択SAIL標識蛋白質の汎用性の高い試料調製プロトコルの開発等を実施し、分子量80kDaを超える高分子量蛋白質においても、芳香環のみならず脂肪族側鎖を含めた全ての炭素に結合した$^1H^{13}C$相関シグナルの高感度測定・帰属が可能となったことを報告する。

SAIL法，脂肪族CHシグナル，二面角

○みやのいりようへい，たけだみつひろ，おおくまこうすけ，おのあきら，
てらうちつとむ，かいのしょうまさつね

[実験] 選択SAIL標識したMSGは、通常の大腸菌高発現系を用いて調製した。200mlのM9最少培地 (SAILアミノ酸, [U-^{2}H]-グルコース, [^{15}N]-塩化アンモニウム, 99.8% 重水) から、約5mg (0.2 mM / 300 ul)の試料が精製された。様々な培養条件下で、各SAILアミノ酸添加量と、得られた試料を加水分解後MS分析することにより定量的に得られる同位体標識率をプロットすることにより、標識率が90%を十分上回るために必要な最小添加量を測定した。その結果、蛋白質構成アミノ酸20種類の内で、約半数のアミノ酸に関しては培地中に、僅か1-2 mg/100ml 程度の添加量で十分な条件を見出すことができた。最適化した大腸菌発現系におけるSAILアミノ酸の添加量、標識率は無細胞蛋白質発現系を用いた場合とほぼ同等であり、選択SAIL法の汎用性、経済性を著しく高めることになる。このようにして調製した選択SAIL標識MSGの各種NMRスペクトルの測定には、cryoprobeを装着したBruker AV-III 600、900を使用した。

[脂肪族$^1H^{13}C$-シグナルの観測] 従来の[U-^{13}C,^{15}N]-標識した高分子量蛋白質においては、脂肪族$^1H^{13}C$-シグナルは双極子緩和等の影響で広幅化するために、それらの観測は実質上不可能とされてきた。我々は、フェニルアラニンを例としてFig.1に示すように、β-メチレンの緩和過程を最小限に保つSAILアミノ酸を種々合成し、それらを重水中で選択標識することにより、分子量82kDaのMSGにおいても、脂肪族$^1H^{13}C$-シグナルが高感度に観測する事ができることを見出した。このように緩和最適化SAILアミノ酸を用いることにより、芳香環のみならず、脂肪族炭素に結合した^{1}H-NMRシグナルを、分子量80 kDa超の高分子量蛋白質においても、観測・帰属できることが明らかとなった。プロキラルCH_2においては、何れか一方を立体選択的に重水素化するために、SAIL法の利点である立体帰属が高分子量蛋白質の精密構造解析にも有効に利用できる。SAILアミノ酸の標識パターンを適宜改良することにより、高分子量蛋白質側鎖の配列帰属、立体配座解析、動態解析等、従来の手法では困難であった様々な構造情報を入手することが可能となった。

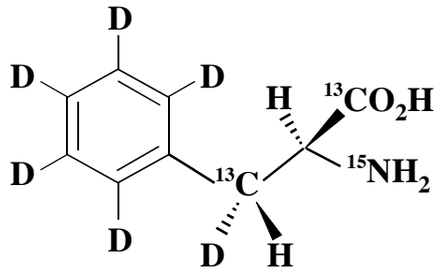


Fig. 1 Structure of [β-^{13}C, ^{1}H]-Phe.

[結論] SAILアミノ酸の標識パターンの更なる改良、緩和機構制御の徹底による線幅の先鋭化により分子量80kDaを超える高分子量蛋白質において、原理的には全てのCH, CH_2, CH_3, NHシグナルを観測・帰属できる手法の開発に成功した。これらに必要な標識試料の調製には、一般的な大腸菌高発現系が利用でき、また少量のSAILアミノ酸で十分であるためにSAIL法の経済性を著しく高め、SAIL法の実用化と普及にも大きく寄与することが期待される。

[文献]

[1] T. Torizawa, *et al*. (2005), *J. Am. Chem. Soc*. 127: 12620-12626.
[2] M. Takeda, *et al*. (2010), *J. Biomol. NMR*, 46: 45-49.
[3] Y. Miyanoiri, *et al*. (2011), *J. Biomol. NMR*, **51**: 425-435
[4] Y. Miyanoiri, *et al*. *ISNMR 2011*

P2

安定同位体標識セルロース系バイオマスの溶液および固体NMR法による構造解析

○小松功典[1]，菊地淳[1, 2, 3, 4]
[1]横市大院・生命ナノ，[2]理研PSC，[3]理研BMEP，[4]名大院・生命農

Structural Analysis for Stable-Isotope labeled Cellulosic Biomass using Solution and Solid-State NMR Spectroscopy

○Takanori Komatsu[1], and Jun Kikuchi[1,2,3,4]
[1]Grad. Sch. NonobioSci., Yokohama City University, Yokohama, Japan. [2]RIKEN Plant Science Center, Yokohama, Japan. [3]RIKEN Biomass Engineering Program, Wako, Japan. [4]Grad. Sch. Bioagri., Nagoya University, Nagoya, Japan.

Cellulosic biomass is a promising material, however effective uses have not come off yet, due to lack of understanding of its structure and analytical techniques. In this presentation, we introduce techniques to analyze structure of cellulosic biomass and its structure these was revealed using stable-isotope labeled lignocelluloses, solution and solid-state NMR spectroscopy. Additionally we also introduce a development of stable-isotope labeling technique of cellulosic biomass and its efficiency.

【緒言】

セルロースは，有望な資源として期待されているが，一方，天然にはヘミセルロースやリグニンなどとの難分解性複合体であるリグノセルロースとして存在していて いるため効率的な利用は妨げられている。そのため，セルロース系バイオマスからヘミセルロースやリグニンなどを様々な前処理によって取り除く試みがなされている。リグノセルロースは，セルロース，ヘミセルロース，リグニンなどが高次に構造を形成した超分子構造を持っているといわているが，効果的な構造解析法が存在しないことから，その構造は一部しか解明されていない。

NMR法は, 結晶または非晶性を問わず原子レベルの分解能において構造情報を取得できる分光法であり，蛋白質をはじめとする生体高分子の構造解析において用いられている。これまでに，NMR法によるセルロース系のバイオマスの構造解析は多数報告されている [1-8]。しかしながら， NMRにおいて欠かすことのできない安定同位体標識をリグノセルロースに対しておこなうことは困難であり，効率的な構造解析は達成されていない。他方，リグノセルロースを^{13}C核によって標識することができれば，タンパク質の側鎖および核酸の糖の解析に用いられているHCCH-COSYなどの$^{1}J_{CC}$を活用した構造解析によってC-C骨格に沿って網羅的に解析できる。また，固体NMRでの解析では，スピン拡散やリカップリングの実験によってリグノセルロース超分子内での^{13}C核間距離情報を取得できる。

本会では，^{13}C標識化リグノセルロースに対する各種溶液および固体パルスシーケンスを適用した構造解析法を報告する。また，我々が 開発している独自のセルロース系バイオマス標識技術およびその有用性に関しても討論したい。

biomass, stable-isotope labeling, mixture analysis

○こまつたかのり，きくちじゅん

【実験，結果，および考察】

市販の^{13}C均一標識化リグノセルロース試料をボールミルによって微粉化し，4:1 DMSO-d_6/pyridine-d_5混合溶媒に溶解させ，溶液NMRでの解析試料を調製した。一方，固体NMRの解析には処理をおこなわずローターに充填し計測をおこなった。また，植物細胞壁の安定同位体標識技術を開発した。

溶液NMRでの解析手法

糖残基内でのシグナル帰属にはHCCH-COSYなどの$^{1}J_{CC}$を活用したパルス系列を用いた (**Fig. 1(a)**)。HCCH-COSYは，蛋白質のNMRにおいては，脂肪族側鎖のシグナル帰属などで用いられ，また，核酸のNMRにおいては，糖のシグナル帰属に用いられている。リグノセルロースなどのセルロース系バイオマスも^{13}C核によって標識することによって，同様に3次元NMRによる分離能の優れたシグナル帰属をおこなうことが可能である。例として **Fig. 1(a)** に示すようにセルロースを構成する 1-4)-β-D-glucopyranose，ヘミセルロースを構成する 1-4)-β-D-xylopyranose，3-1)-α-L-arabinofranoseの残基内の^{1}Hおよび^{13}C化学シフトを網羅的に帰属できた。

一方, 糖残基間でのシグナル帰属にはNOEをベースにした解析を適用した。**Fig. 1(b)** に 1-4)-β-D-glucopyranose主鎖に 3-1)-α-L-arabinofranose側鎖が分岐した構造をもつarabinoglucronoxylanの^{13}C-HSQC-NOESYスペクトルを示す。5.60/107.0 ppm (δ_{1H}/δ_{13C}) および 5.71/105.9 ppm (δ_{1H}/δ_{13C}) はそれぞれ3-1)-α-L-arabinofranoseおよびxylopyranoseが結合した3-1)-α-L-arabinofranoseの1位の^{1}H-^{13}Cの相関を示している。さらに5.60および 5.71 ppm (δ_{1H}) に 3-1)-α-L-arabinofranose および xylopyranose が結合した3-1)-α-L-arabinofranoseの1位の^{1}H核と残基内他位および隣接した1-4)-β-D-xylopyranoseとのNOE相関が検出された。蛋白質のNMRでは，^{13}C/^{15}N/(^{2}H) 標識をおこない，ペプチド結合間での^{1}Jを介して連鎖的に磁化が移動するようにデザインされた^{1}H/^{13}C/^{15}Nの三重共鳴のパルス系列を適用することによって，残基間でのシグナル帰属が容易に達成される。しかしながら，糖やリグニンでは，NMRにおいて不活である^{16}O核を介して結合しているため蛋白質のように^{1}Jを介して磁化移動させ残基間のシグナル帰属をすることはできない (^{17}Oは天然存在比0.037%，なおかつ四重極核である)。

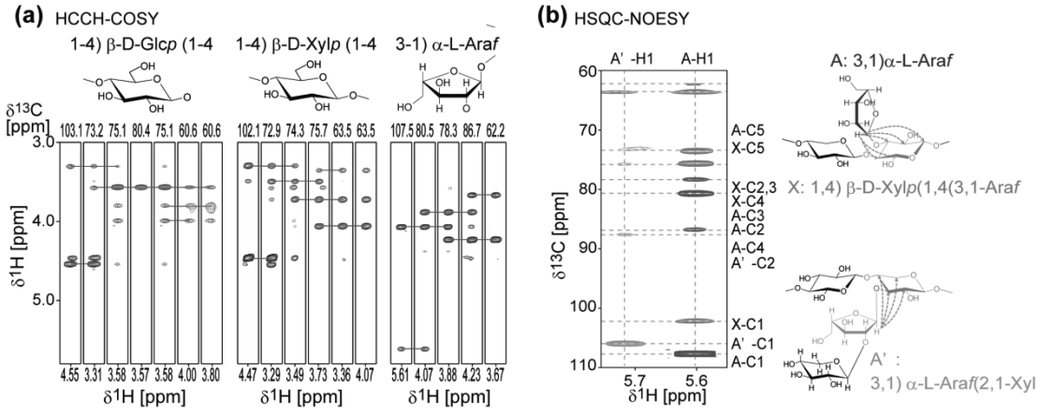


Fig. 1 Approaches for signal assignments of polysaccharide in solution NMR. (a) Method for inner residues signal assignments using HCCH-COSY *J*-based pulsesequence. (a) Method for inter residues signal assignments of glucronoarabinoxylan using ^{13}C-HSQC-NOESY NOE-based pulsesequence.

前述の解析をおこなった結果，20の構成単位107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。本研究で帰属されたシグナルと既往の溶液NMRによるリグノセルロース解析をおこなった24報における帰属情報との比較を**Fig. 2**に示す。ここで24の既報における帰属情報はカーネル密度推定法を用いて評価した。既報ではリグニン芳香族や脂肪族の帰属が多数報告されているが，多糖の帰属はあまり報告されていない。一方，本研究では，多糖に対して新たな帰属をあたえた。リグニンの化学シフトは，主にダイマーやトリマーなどのモデル化合物を合成することによって帰属してきた [10]。一方，リグニンと比較して多糖はその構造の類似性から化学シフト間が密集しているため，合成的アプローチや単離精製的アプローチによって信頼性のある化学シフトの帰属をおこなうことは困難である。本研究では，安定同位体標識と多次元NMR法によって組み合わせることで多糖の効果的な解析を実現した。

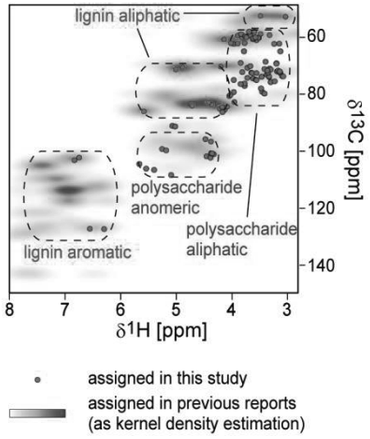


Fig. 2 The comparison of signal assignments in this study and previous 24 reports. Assignments in previous reports were evaluated by kernel density estimation.

固体NMRでの解析手法

^{13}C均一標識化リグノセルロース試料のCP-MASスペクトルを**Fig. 3(a)**に示す。^{13}C均一標識によってINADEQUATEやDARRなどの^{13}C-^{13}C相関スペクトルを計測することが可能である (**Fig. 3(b)**)。INADEQUATEにおいて，Iβ結晶セルロース中の磁気的に非等価な二つの1-4)-β-D-glucopyranose残基および非晶セルロースの1-4)-β-D-glucopyranose残基のC1からC6の化学シフトを帰属することができた。結晶構造は，溶液NMR法では検出することができないため，同時に固体NMR法で計測する必要がある。セルロースのシグナルを網羅的に検出することができた一方, ヘミセルロースおよびリグニンのシグナルを検出することができなかった。

パルスシーケンスを最適化することによってヘミセルロースおよびリグニンのシグナルの検出を試みた。 **Fig. 4(a), (b)** にそれぞれCPNQS，CPNQSDARRのスペクトルおよびパルスシーケンスを示す。CP-MASでは，前述のように結晶および非晶セルロースのシグナルが支配的であり，ヘミセルロースおよびリグニンのシグナルは検出できない。CPNQSでは，T_2緩和の短い非4級炭素のシグナルをディフェーズさせることで，ヘミセルロースのカルボニル炭素やリグニンの芳香族4級炭素のシグナルを検出することができた。さらに，NQSの後にDARRのスキームを導入したCPNQSDARRでは，双極子相互作用の復活によって4級炭素と構造的に近位に存在するヘミセルロースおよびリグニンの非4級炭素のシグナルを検出できた。CPNQSDARRを2次元に展開した^{13}C-^{13}C相関スペクトルを**Fig. 4(c)** に示す。カルボニル炭素との相関として，アノメリック炭素 (C1) やアリファティック炭素のシグナルを，また，芳香族4級炭素との相関としてアリファティック炭素および芳香族非4級炭素のシグナルを検出できた。

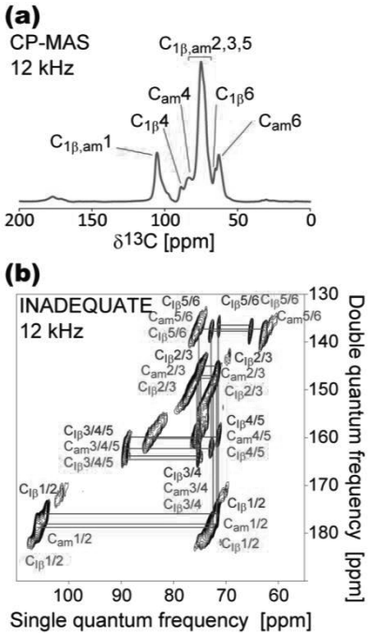


Fig. 3 Analysis of lignocellulose using conventional ^{13}C solid-state NMR pulsesequence. (a) CP-MAS (b) INADEQUATE spectra of ^{13}C labeled lignocellulose.

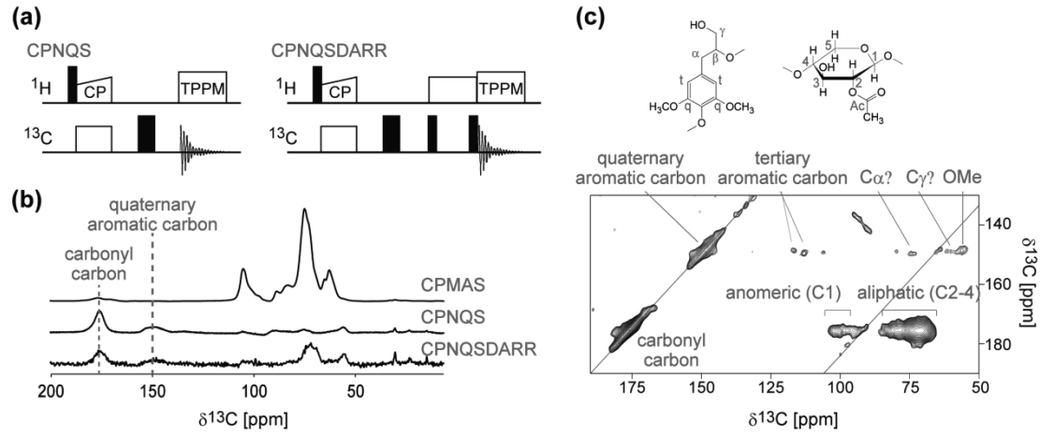


Fig. 4 Optimization of pulsesequence to detect hemicellulose and lignin in solid-state NMR. (a) pulsesequences to detect hemicelluloses and lignin. (b) Comparison of optimized and conventional pulsesequence. (c) Signal assignment of hemicellulose and lignin using optimized ^{13}C-^{13}C correlation spectroscopy.

【引用文献】

[1] Kim H. and Ralph J., *Org. Bio. Chem.* **8** (2010) 576-591.
[2] Okushita K. Komatsu T. Chikayama E., Kikuchi J., *Polymer J.* **44** (2012) 895–900.
[3] Okushita K., Chikayama E., Kikuchi J., *Biomacromolecules* **13** (2012) 1323-1330.
[4] Mori T., Tsuboi Y., Chikayama E., Ishida N., Shisa N., Noritake M., Moriya S., Kikuch J., *Carbohydr. Polm.* **90** (2012) 1197-1203.
[5] Kikuchi J., Ogata Y., Shinozaki K., *J.Ecosys. Ecogr.* **S2** (2011) 001
[6] Ogata Y., Chikayama E., Morioka Y., Everroad RC., Shino A., Matsushima A., Hiruma H., Moriya S., Toyoda T., Kikuch J., *PLoS ONE* **7** (2012) e30263
[7] Watanabe T., Shino A., Akashi K. Kikuchi J., *Plant Biotechnol* **29** (2012) 163-170.
[7] Date Y., Sakata K., Kikuchi J., *Polymer J.* **44** (2012) 888-894.
[8] Yamamura M., Nada S., Hattori T., Shino A., Kikuchi J., Takabe K., Suzuki S., Shibata D., Umezawa T., *Plant Biotechnol*. (*in press*)
[10] Ralph SA., Ralph J., Landucci LL., *NMR Database of Lignin and Cell Wall Model Compounds.* (2004) Available at http://ars.usda.gov/Services/docs.htm?docid=10491

P3

酵母*K. Lactis*発現系を用いた高分子量蛋白質の重水素化およびメチル選択標識

宮沢−大浪　真由美[1]，○竹内　恒[2]，杉木　俊彦[1]，高野　等覚[1]，嶋田　一夫[2,3]，高橋　栄夫[2,4]
[1]バイオ産業情報化コンソーシアム，[2]産業技術総合研究所・バイオメディシナル情報研究センター，[3]東京大学大学院・薬学系研究科，[4]横浜市立大学・生体超分子システム科学専攻

Perdeuteration and methyl selective $^{1}H/^{13}C$-labeling using *Kluyveromyces lactis* expression system

Mayumi Miyazawa-Ohnami[1], ○Koh Takeuchi[2], Toshihiko Sugiki[1], Toshiaki Takano[1], Ichio Shimada[2,3], and Hideo Takahashi[2,4]
[1]Japan Biological Informatics Consortium, [2]National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Biomedicinal Information Research Center [3]Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo, [4]Department of Supramolecular Biology, Yukohama City University

NMR structural analyses of proteins require production of a significant amount of isotopically enriched proteins. Recently, we reported a cost effective protein expression using hemiascomycete yeast, *Kluyveromyces lactis*. Here, we showed that a high-level uniform deuteration (>90%) is achieved in the yeast system. We also examined the methyl selective $^{1}H/^{13}C$-labeling of Ile, Leu, and Val, by the commonly-used amino-acid precursors. Ile showed a high-level incorporation while the $^{1}H/^{13}C$-labeling rates of Val and Leu were low. This would be due to the mitochondrial localization of amino-acid-biosynthesis enzymes and the lack of transporter for α-ketoisovalerate in the mitochondrial membrane. In line with this notion, the overexpression of branched-amino-acid aminotransferases in cytosol improved the incorporation rates of the amino acid precursors.

NMRによる立体構造解析においては安定同位体標識した蛋白質を大量に得ることが必要である。蛋白質の安定同位体標識には一般に大腸菌発現系が用いられるが、目的蛋白質の発現が困難である場合には、真核生物である酵母を用いた発現が有効となる。近年、我々は酵母株*K.Lactis*に注目し、本酵母が真核生物を用いた安価な安定同位体標識に有効であることを示してきた。本研究においては*K.Lactis*を用いた蛋白質の重水素化および重水素化背景における選択的メチル標識をmaltose-binding protein (MBP)を用いて検討した。その結果、他の酵母株を用いた既報の結果と比較し、高い重水素化率を達成することに成功した。一方メチル選択標識の効率はアミノ酸合成酵素の細胞内局在やミトコンドリア上のトランスポーターの有無に大きく左右されたが、アミノ酸合成酵素の共発現により標識効率を向上させることに成功した。

キーワード：高分子量蛋白質、酵母、安定同位体標識

みやざわ−おおなみ　まゆみ, ○たけうち　こう, すぎき　としひこ, たかの　としあき, しまだ　いちお, たかはし　ひでお

<u>*K.Lactis*を用いた蛋白質の重水素化</u>

*K.Lactis*を用いた蛋白質の重水素化を、重水素化グルコースを炭素源としたD_2O YNB最小培地を用いて検討した。検討は複数の培養条件にて行った。具体的には、培養中に新たな培地を徐々に加える“Fed-Batchの有無”、前培養における“D_2O馴化の有無”である。比較検討を行った結果、“Fed-Batch有”、“D_2O馴化有”の条件で最も蛋白質発現が良好であることを見出した。特に“Fed-Batch”を行うことで、最終的な菌体量は減少するものの、蛋白質発現量は劇的に改善することがわかった。また最適条件にて発現したMBPの^{1}H 1Dスペクトルを測定した結果、側鎖の非交換性プロトンが高度にかつ均一に重水素化されていることが確認され、NMRシグナル強度から重水素化率は約95%と算出された。*K.Lactis*における重水素化率は、*Pichia pastoris*においてMorganらによって達成された平均重水素化率80%を大きく凌駕し、かつより均一であったことから、本酵母の重水素化における有用性を示すことができた。

<u>*K.Lactis*を用いた蛋白質のメチル選択標識</u>

上記の重水素標識法を用いて、重水素化条件下におけるIle, LeuおよびValのメチル選択$^{1}H^{13}C$標識を検討した。大腸菌におけるメチル選択標識において一般的に用いられる[methyl-^{13}C, 3,3-D2] α-ketobutyrate および [3-methyl-^{13}C, 3,4,4,4- D4] α-ketoisovalerateを培地中に添加し、^{1}H-^{13}C HMQC測定を行ったところ、Ile δ1は50%以上のラベル化率を示したのに対し、Leu δおよびVal γのラベル化率は極めて低いことが判明した（Fig. 1A）。これは、分岐アミノ酸の生合成に関わる酵素のほとんどがミトコンドリア内に局在すること、およびα-ketoisovalerate に対するトランスポーターがミトコンドリア上に存在しないこと、を反映すると考えられた。実際100 mg/Lの[u-^{13}C] Valを培地中に添加した場合、LeuおよびValは85%以上の$^{1}H/^{13}C$標識率を示した。そこで我々はさらに大腸菌由来（Fig. 1B）および*Saccharomyces cerevisiae*由来（Fig. 1C）の分枝アミノ酸アミノ転移酵素を細胞質内に共発現させ、Leu δおよびVal γのラベル化率改善を試みた。その結果、これらアミノ酸合成酵素の共発現により標識効率を向上させることに成功した。

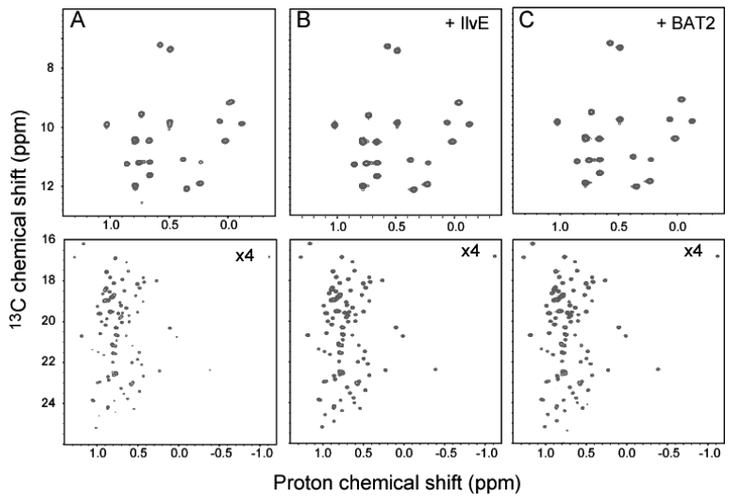


Figure 1. ^{1}H-^{13}C HMQC spectra of $^{1}H/^{13}C$-ILV-methyl-labeled, deuterated MBP from various expression conditions. The labeled MBP were produced with (A) wild type *K.lactis* cells, (B) IlvE and (C) Bat2 overexpression cells.

P4

ヒト主要組織適合複合体の安定化機構に関する解析

○谷中冴子[1], 菅瀬謙治[2], 上野貴将[3], 津本浩平[1]
[1]東大・新領域
[2]（財）サントリー・生有研
[3]熊大・エイズ研

The analysis on stabilization mechanism of Human Leukocyte Antigen

○Saeko Yanaka[1], Sugase Kenji[2], Takamasa Ueno[3], Tsumoto Kouhei[1]
[1]The Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo, Tokyo, Japan.
[2]Bioorganic Research Institute, Suntory Foundation for Life Sciences, Osaka, Japan.
[3]Center for AIDS Research, Kumamoto University, Kumamoto, Japan.

In the first step of human infection defense, human leucocyte antigens (HLA) present foreign peptides, which are recognized by cytotoxic T lymphocytes (CTL), resulting in the activation of CTLs to kill infected cells. Previous CD experiments showed that the thermal stability of HLA in cells is closely related to the CTL activity, and considerably depends upon the presented peptides. Although many crystal structures of HLA with different peptides were determined, they are almost identical to each other. DSC experiments showed that denaturation enthalpy cannot explain the HLA stability, while suggesting the structural difference in solution. Therefore, the stabilization mechanism of HLA is still unclear. Here we have studied the stabilization mechanism of HLA from the viewpoint of conformational flexibility, using NMR relaxation dispersion spectroscopy. We focused on two HLAs presenting peptides, VY8-5A, and RY11-8A, which have the same sequence except that RY11-8A has three additional amino acids in the N-terminus. VY8-5A is known to activate CTL much longer than RY11-8A, and HLA in complex with VY8-5A has a higher temperature midpoint. NMR relaxation dispersion experiments revealed that the peptide recognition site in HLA is fluctuating in solution. Interestingly, HLA with VY8-5A, which is more thermostable, is more flexible, and is prone to form low-populated minor conformation. This suggests that the flexibility is essential for the HLA stability.

ヒト主要組織適合複合体（HLA）は抗原蛋白質から切り出された様々な抗原ペプチドと結合し、それぞれに特異的な細胞傷害性 T 細胞を活性化する抗原提示に重要な蛋白質である。既に HLA は様々なペプチドとの複合体構造が明らかにされているが構造的に大きな差異はない。しかし、活性持続時間に重要であると考えられる HLA の溶液中での安定性については、様々なペプチド複合体間で異なるという報告がある。一方で、活性持続時間と HLA の安定性の関連、および HLA の安定性が決定されるメカニズムは未だ明らかにされていない。我々は、細胞での活性持続時間が異なる二つの HLA ペプチド VY8-5A と RY11-8A に着目し、HLA の構造揺らぎに関する研究を行った。二つの HLA について、活性持続時間と物性の関係がすでに明らかとなっている。円偏光二色性（CD）は HLA の変性中点温度と細胞中での活性持続時間との間に相関がある事を示している。また示差走査型熱量測定（DSC）の結果は溶液中での構造の違いを示唆する一方、安定性の指標の一つとされる変性エンタルピーと活性持続時間に相関がないことを示している。上記２つの HLA それぞれに対して NMR 緩和分散測定による動的構造解析を行った結果、ペプチドと HLA 重鎖の結合部位に揺らぐ残基が特に多く見られ、ペプチドの認識に重要である残基が揺らいでいることが明らかとなった。また、非常に興味深いことに、２つの HLA を比較するとより低存在比の中間体構造を取りやすく、揺らぎやすい HLA の方が安定である事が明らかとなった。以上は HLA の安定性における揺らぎの重要性を強く示唆するものである。

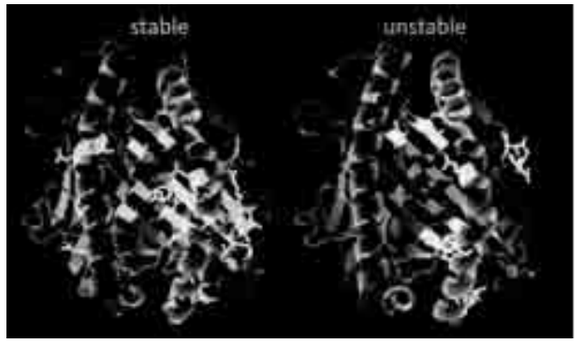


Fig. 1 Fluctuation profile of stable/unstable HLA

	stable	unstable
intermediate ratio	3.04 %	0.82 %
energy of fluctuation	2.01 kcal/mol	2.79 kcal/mol
k_f	12.9 /s	8.38 /s
k_b	411 /s	1015 /s

Table. 1 Fluctuation parameters

Relaxation dispersion, HLA, stability

○やなかさえこ，すがせけんじ、うえのたかまさ、つもとこうへい

P5

特徴的なリピート構造を有するカイコ由来DNA結合ドメインSTPRの解析

○柚原光佑、西野明理沙、横山卓也、相沢智康、神谷昌克、熊木康裕、滝谷重治、菊川峰志、出村誠、河野敬一
北大・院生命

NMR analysis of the novel DNA-binding domain STPR of the silkworm

○Kosuke Yuhara, Arisa Nishino, Takuya Yokoyama, Tomoyasu Aizawa, Masakatsu Kamiya, Yasuhiro Kumaki, Shigeharu Takiya, Takashi Kikukawa, Makoto Demura, and Keiichi Kawano
Graduate School of Life Science, Hokkaido University, Sapporo, Japan

The STPR domain has been originally identified as a DNA-binding domain of FMBP1, a transcription factor regulating heavy-chain fibroin gene expression in the silkworm. The STPR domain consists of four tandem repeats of a 23-amino acid characteristic sequence. The homology search showed that the STPR domain is a novel DNA-binding domain that generally exists in the animal kingdom. The structural analysis of repeat unit by CD and NMR has been performed but the structure and dynamics of the entire STPR domain with or without DNA are almost unknown. Here, to investigate its structure and dynamics, we prepared the ^{15}N, ^{13}C-labeled samples and assigned the backbone resonances of the STPR domain. We successfully assigned over 70% of the backbone resonances in spite of high sequence similarity between the repeat units and analyzed the secondary structure of the STPR domain.

【背景】

カイコの絹糸の主成分であるfibroin H鎖の転写因子FMBP1は、DNA結合ドメインとしてSTPRドメインを持つ。STPRドメインは、23アミノ酸が4回繰り返すタンデムリピート配列であり、リピート間の配列相同性は80%以上にもなる。このような特徴的な配列は既知のDNA結合ドメインでは他に例が無いことから、STPRドメインは新規のDNA結合ドメインであると考えられる。この配列を持つタンパク質は、真核生物に広く存在することが知られているが、これらのタンパク質の機能はほとんど分かっていない。



Fig.1 Sequence of STPR domain

STPRドメインの構造について、NMRによる各リピート単体での構造解析や、CD測定等の結果から、次のことが明らかとなっている。(1)STPRドメインは、DNAと相互作用していない状態では各リピートの前半30%程度がαヘリックス、残りの部分がランダムコイル状態である。(2)DNAと相互作用することによりαヘリックス形成が誘起され、ヘリックス含量が76%まで増加し、DNAとリジッドな複合体を形成する。

リピート配列、DNA結合ドメイン、STPR

○ゆはら こうすけ、にしの ありさ、よこやま たくや、あいざわ ともやす、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、でむら まこと、かわの けいいち

本研究では、STPRドメイン全長での構造や動態を明らかにするために、DNA非存在状態での主鎖のNMRスペクトルの帰属を行い、化学シフトから構造に関する考察を行った。

【実験】

^{15}N、^{13}C標識したSTPRドメインを用いて、DNA非存在条件でのNMR測定を行い、主鎖の連鎖帰属を行った。NMR測定用サンプルは、リン酸ナトリウム 50 mM、NaCl 50 mM、タンパク濃度 0.5 mM、D_2O 10%、pH 7となるように調整した。測定は、Bruker DRX 800を用いて、温度293Kで行った。

帰属結果をもとに、炭素の二次化学シフト、および、SSPスコア(secondary structure propensity score)を計算した。

【結果・考察】

NMRスペクトルでは、ほぼ全残基数分のピークが確認できた。非常に相同性の高いリピート配列であるために、ピークの重なりが大きく、信号の帰属が困難であった。しかし、最終的に主鎖のピークの7割以上の帰属に成功した。残基の特定に至らなかったピークについても、対応するアミノ酸残基の候補が絞り込めている。

帰属の結果から、C^{α}, C^{β}の二次化学シフト、およびSSPスコアを算出した。これまでSTPRドメインの各リピートのC末端側は、DNA非存在条件において、ランダムコイル状態であると考えていた。しかし、二次化学シフトは、各リピートともN末端側へ向かうにしたがって徐々にランダムコイル値に近づいていくという、特徴的なパターンを示した。このことから、各リピートのC末端側も過渡的なヘリックスを形成していると考えられる。

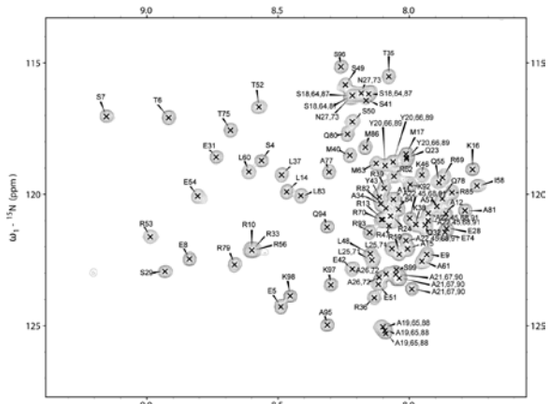


Fig.2 ^1H-^{15}N HSQC spectrum of STPR domain

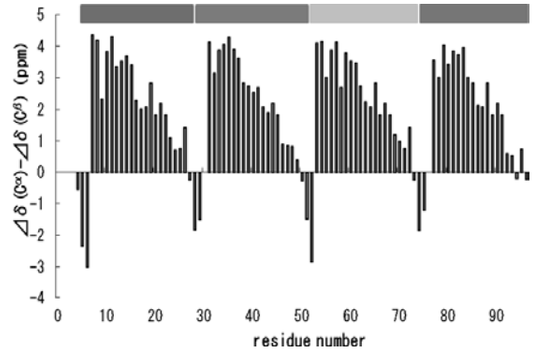


Fig.3 Secondary chemical shift of STPR domain

今後は、RDCや重水素交換などの実験を行い、DNA非存在条件でのSTPRドメインの構造や動態について解析を進めるとともに、DNAとの相互作用を、NMRを用いて解析するための条件検討を行う予定である。

P6

ＮＭＲとシミュレーションによるとクルクミンのカルシトニン線維形成阻害機構の解明

○竹内健[1], 渡邊ひかり[1], ナムスライ　ジャブクラントゃクス[1], 廣田洋[2], 内藤晶[1]
[1]横浜国立大学大学院工学研究院, [2]理化学研究所
●横浜国立大学

Interaction of human calcitonin with curcumin as an inhibitor of fibrillation as revealed by NMR and docking simulation.

○*Ken Takeuchi[1] , Hikari Watanabe[1] , Javkhlantugs Namsrai[1] , Hiroshi Hirota[2] , Akira Naito[1]*
[1] Yokohama National University Graduate School of Engineering, [2] Riken

Human calcitonin (hCT) is known to form an amyloid fibril precipitate in concentrated aqueous solution. Therefore, CT has been studied as a model peptide to clarify the fibrillation process and mechanism of amyloid fibril formation. TOCSY NMR was measured right after the mixing of the sample with the solution. This result indicates that the core part of hCT does not form fibril. It is therefore expected that Phe16, Phe19, His20 signal will disappear after the fibril formation. Thus, it is concluded that curcumin interacts with hCT to inhibit the fibril formation. The interactions of curcumin tautomers with hCT peptide were revealed by using docking simulation. The structures of curcumin tautomers and hCT were first determined in water solution and used for the initial conformations of the docking simulation until the stabilized structures were obtained.

【序】

甲状腺から分泌されるヒトカルシトニン（hCT）は32アミノ酸残基からなるペプチドホルモンであり、その分子量は3418 Daである。破骨細胞に作用して血中Ca^{2+}濃度を低下させる働きがある。過去に骨粗鬆症の治療薬として利用されていたが、水溶液中でアミロイド線維を形成し、甲状腺髄様癌を誘発すると考えられるため、現在は使用されていない。カルシトニン線維形成過程とそのメカニズムを理解することで、アルツハイマー病等を誘発するアミロイド線維病の発症の原因究明、予防薬、治療薬開発につながる重要な研究である。これまでの研究からhCTの水溶液中における線維形成機構は明らかになっており、次の段階として本研究室ではクルクミン(Cur)等による線維形成阻害効果を研究してきた。この阻害機構の解明のため、生体に近いリン酸緩衝液下での溶液NMR測定により、hCTとクルクミンの阻害作用部位を解明することを目的とした。

【実験】

hCT は Fmoc アミノ酸を使って固相法により合成した。脱保護、HPLC による分取、空気酸化を経て再び HPLC で精製した。空気酸化は、N 末端でジスルフィド結合を形成するためであり、弱アルカリ pH 条件で行った。はじめに UV 分光器を用いて、5% DMSO

NMR, カルシトニン, クルクミン

○たけうちけん，わたなべひかり，なむすらいじゃぶくらんとぅす，ひろたひろし，ないとうあきら

と 100 mM NaOH を含む 20 mM リン酸緩衝液でのクルクミンの飽和濃度を求めた。次に阻害剤クルクミンとの相互作用を、TOCSY NMR で観測した。hCT 0.5mM と hCT 0.5 mM ＋Cur 0.05 mM となる溶液を比較した。この溶液は、凍結乾燥した試料にリン酸緩衝液を加える方法で調製した。混ぜ合わせた直後に TOCSY NMR を観測した。

【結果と考察】

クルクミンによるカルシトニンの線維形成速度の阻害

UV分光器を用いてhCTとhCTにクルクミンを加えた場合の線維形成速度を散乱光の増加曲線から求めた。カルシトニンの線維形成はk_1（核形成反応）、k_2（線維伸長反応）の速度定数からなる二段階自己触媒反応機構をとるとして速度定数を解析した。実験の結果、クルクミンを添加するとk_1が遅くなり核形成が阻害されることが明らかになった。

TOCSY NMRによるクルクミンとカルシトニンの相互作用部位の解析

TOCSY NMRを観測した結果、クルクミンを添加することにより、Phe16、Phe19、His20のピークが消えない点に着目した。 線維形成においてコアーとなるアミノ酸残基としてPhe16、Phe19は知られている。したがって、線維化が進むにつれ運動性が下がり、Phe16、Phe19の信号が消えたと予想される。この結果は、クルクミンがhCTとPhe16、Phe19、His20近傍で相互作用するために線維形成が阻害されたため運動性が下がらず信号は消えなかったと考えられる。

MDシミュレーションによるクルクミンとカルシトニンの相互作用部位の解析

また、分子レベルでのクルクミンとhCTの相互作用部位を分子動力学シミュレーションによって明らかにした。MD計算の結果はPhe16、Phe19、His20において結合エネルギーが強く、クルクミンとhCTの結合構造を安定化する。この結果はクルクミンがhCTのPhe16、Phe19、His20と相互作用することを示しており、TOCSYの結果と一致した。

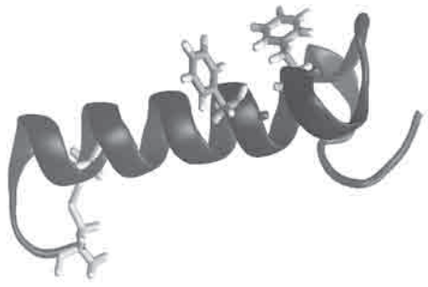


Fig. 1　Human Calcitonin

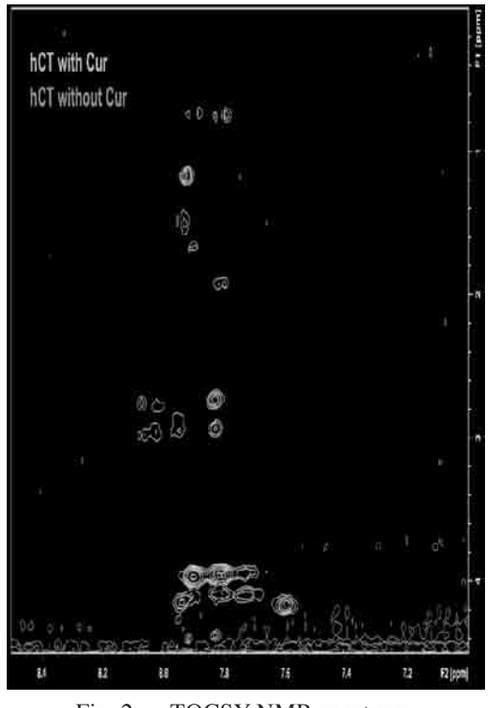


Fig. 2　TOCSY NMR spectrum

P7

カブトガニ由来抗菌ペプチドTachyplesin Iとキチンの相互作用解析

○櫛引崇弘[1], 神谷昌克[1], 相沢智康[1], 熊木康裕[2], 菊川峰志[1], 出村誠[1], 川畑俊一郎[3], 河野敬一[1]
[1]北大・院生命
[2]北大・院理
[3]九大・院理

Analysis of interaction between tachyplesin I, an antimicrobial peptide derived from horseshoe crab, and chitin

○Takahiro Kushibiki[1], Masakatsu Kamiya[1], Tomoyasu Aizawa[1], Yasuhiro Kumaki[2], Takashi Kikukawa[1], Syunichiro Kawabata[3], Keiichi Kawano[1]
[1]Graduate School of Life Science, Hokkaido University, Hokkaido, Japan.
[2]Graduate School of Science, Hokkaido University, Hokkaido, Japan.
[3]Faculty of Science, Kyusyu University, Fukuoka, Japan.

Tachyplesin I (TP I), an antimicrobial peptide found in hemocytes of horseshoe crab, adopts antiparallel beta sheet strucuture, having a broad antimicrobial activity against Gram-negative and Gram-positive bacteria and fungi. Although it has been already known that TP I can bind to chitin which is a component of cell wall of fungi, structural knowledges about the interaction between them are insufficient. In order to clarify the key structural factor for chitin-binding of TP I, we investigated the binding ability and binding site of TP I and its mutants for chitin. Consequently, antiparallel beta sheet structure was not essential for chitin-binding and it was suggested that aromatic residues and cationic residues of TP I are involved in binding to chitin.

【緒言】カブトガニから発見された全ての抗菌ペプチドは、抗真菌活性およびキチン結合能を保持することが知られている。中でもTachyplesin I(TP I)は抗真菌活性・キチン結合能を保持するだけでなく、グラム陰性菌・陽性菌に対しても強い抗菌活性を示し、近年医療・創薬の分野でも注目されている[1,2]。

キチンは真菌細胞壁を構成する主成分であることから、抗菌ペプチドのキチン結合能は、抗真菌活性を保持することと関連していると考えられるが、実際にはキチン結合能と抗真菌活性の相関の有無は明らかにされていない。両者の相関を明らかにする上で、抗菌ペプチドとキチンの相互作用を詳細に理解することは必要不可欠であると考えられるが、研究例は少なく、両者が結合する際の構造的な知見は乏しい。TP Iにおけるキチン結合能に重要な構造的要因および相互作用の詳細を明らかにすべく、本研究ではTP Iおよびその変異体を用いて、キチンに対する結合能を確認した。さらに、キチンとの相互作用に関与する残基の予測も行った。

Tachyplesin I, chitin

○くしびきたかひろ, かみやまさかつ, あいざわともやす, くまきやすひろ, きくかわたかし, でむらまこと, かわばたしゅんいちろう, かわのけいいち

【実験】TP Iは17アミノ酸残基から成り、C末端はアミド化されている。2本のジスルフィド結合を持ち、水中では2本のベータストランドがターンで繋がった逆平行ベータシート構造を形成することが明らかにされている(Fig. 1)。TP Iが持つ全てのCysをAlaまたはTyrへ置換(それぞれTP I-A4、TP I-Y4)、もしくは欠損させた変異体(TP I-CD)や、C末端をアミド化していない変異体(TP I-COOH)を用い、キチン結合能を評価した。さらに、キチンを構成する糖鎖であり、水溶性を示す糖鎖の中でも最長のN-アセチルキトヘキサオースをペプチド溶液に加え、NMR測定により相互作用部位の予測を行った。



Fig. 1 The structure of TP I in aqueous solution

【結果・考察】TP Iおよびその変異体を用いたキチン結合アッセイから、全てのペプチドがキチン結合能を持つことがわかった。このことから、キチン結合にはC末端のアミド化やターン構造、逆平行ベータシート構造は必須でない、ということが示唆された。用いるキチン鎖長の変化が、ペプチドのキチンに対する結合に影響を与えるということもわかった。また、Cysを全て欠損させた変異体は、他のペプチドに比べキチン結合能が低いことが明らかとなった。

キチンに対するペプチドの結合部位を予測するため、N-アセチルキトヘキサオースの有無によるペプチドのスペクトル変化を観察した。TP Iにおいては、N-アセチルキトヘキサオースの有無により、F4、R9、Y13、R17のアミドプロトンの化学シフトが著しく変化していた(Fig. 2)。これらの残基はTP Iのベータシート構造の片面に局在しており、F4、Y13といった芳香族残基は疎水性相互作用に、R9、R17は糖鎖の極性部分との相互作用に関与していることが予想される。

同様の実験をTP I-Y4、TP I-A4、TP I-CDに対しても行った。その結果、全てのペプチドで、芳香族残基と塩基性残基がN-アセチルキトヘキサオースとの相互作用に関与していることが示唆された。

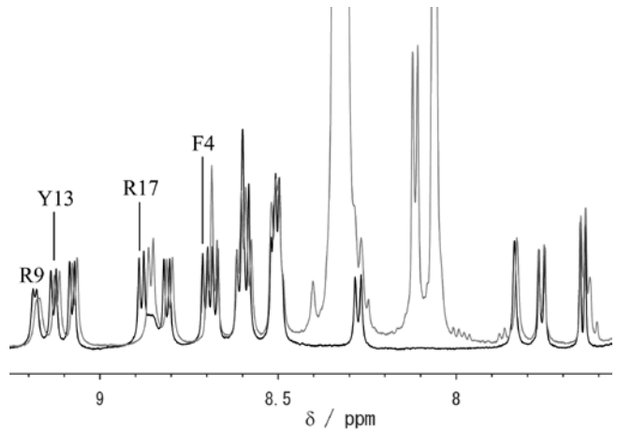


Fig. 2 1D ^{1}H NMR spectra of TP I with or without N-acetyl-chitohexaose

【謝辞】本研究の一部は、生研センターのイノベーション創出基礎的研究推進事業の補助により進められた。

【参考文献】

[1] Nakamura, *et al. J. Biol. Chem.*, **1988**, 293, 16709-16713.
[2] Rao, *et al. Arch. Biochem. Biophys.*, **1999**, 361, 127-134.

P8

DNA修復蛋白質MutLの核磁気共鳴法による解析

○水島良太[1,2]　高井朋代[2]　福井健二[3]　李 映昊[2]
[1]阪大・生命機能
[2]阪大・蛋白研
[3]理研・SPring - 8

NMR study on DNA repair protein MutL

○Ryota Mizushima [1, 2], Tomoyo Takai [2] , Kenji Fukui [3] , Young-Ho Lee [2]
[1]Graduate School of Frontier Biosciences, Osaka University
[2] Institute for Protein Research,, Osaka University.
[3] RIKEN SPring-8 Center, Harima Institute.

DNA mismatch repair (MMR) is the process of repairing post-replicative errors in newly - synthesized DNA strands, enhancing the DNA replication fidelity up to 100 - 1000 folds. Familial non-polyposis colon cancers called Lynch-Syndrome (LS) caused by mutations of genes coding MMR proteins occupy 2 - 5 % of total colon cancers. I am currently studying one of the MMR proteins called **MutL** by the method of solution-state NMR. MutL is comprised of three parts: dimerized and endonuclease-active C-terminal domain (CTD), ATPase N-terminal domain transiently dimerized thorough ATP-binding and hydrolytic cleavage (NTD) and the linker region connecting CTD and NTD. In this presentation, I have analyzed isolated CTD and NTD focusing on their interaction with ATP and metal ions. Preliminary results on CTD-NTD interaction will also be discussed.

ミスマッチ塩基対修復（MMR）はDNA複製後の新生鎖の複製エラーを修復し、DNA複製の精度を２～３桁程度高めている。MMR蛋白質をコードする遺伝子の変異を原因とする遺伝性大腸がんはリンチ症候群と呼ばれ全大腸がんの２−５％程度がリンチ症候群によるとされる。この変異の保有者の約８０％が生涯にがんを発症する。リンチ症候群は他の消化器や子宮、腎臓などの臓器のがん発症リスクも高めるとされ、医学的に重要である。私は現在、このMMR蛋白質のうち、MutLの構造生物学的な解析を、NMRを中心として、行なっている。MutLには、大腸菌型とヒト型の２つがあり、前者はエンドヌクレアーゼ活性を持たず（MutHがエンドヌクレアーゼ活性を担う）、後者はエンドヌクレアーゼ活性を持つ。私が研究しているのは、あるバクテリア由来の、後者のMutLである。MutLは、溶液中で安定な二量体を形成するC末端ドメイン（CTD）と、ATPと結合することで二量体を形成し、ATP加水分解活性を持つN末端ドメイン（NTD）,それらをつなぐリンカーで構成される蛋白質である。ATPの結合と加水分解によって、CTDとNTDのドメイン間の相対配置が変化すると考えられており、先行研究の結果から、このドメイン間相互作用が、エンドヌクレアーゼ活性や他のMMR蛋白質との相互作用を制御していることが示唆されている。

溶液NMR, DNA repair, Hub Protein

○ みずしま りょうた，たかい　ともよ，ふくい　けんじ，り　よんほ

本研究は、NMR により、CTD/NTD と、金属イオン、ATP、DNA との相互作用やCTD-NTD ドメイン間相互作用を解析することで、MutL のエンドヌクレアーゼ活性の制御機構の一端について明らかにすることを目的とする。

本研究では、まず CTD と NTD を分離してドメインごとに発現、精製し、^{15}N,^{13}C,^{2}Hで安定同位体ラベルしたサンプルによって、主鎖の帰属を行った。CTD については、HNCO,HNCACO, HNCACB, CBCACONH の３次元スペクトルによる主鎖連鎖帰属と、選択的アミノ酸残基アイソトープラベリング法により、97%まで、主鎖を帰属することに成功した。(Fig.1) NTD についても、同様に主鎖の帰属を行なっており、現在 80%程度の帰属率であるが、現在さらに帰属作業が進行中である。(Fig.2) これまでに、先行研究の X 線結晶構造（M.C. Pillon et al. *Mol. Cell*, 2010）を鋳型として、homology modeling（SWISS-MODEL）により、現在研究している種由来 MutL の立体構造モデルを作成し、これと CTD の主鎖の帰属結果を用いて、CTD と金属イオンの結合について解析した。マンガンイオンやマグネシウムイオンなどの二価の金属イオンは、これまでの先行研究の in vitro の活性実験の結果から、CTD のエンドヌクレアーゼ活性に必須であることがわかっているが、マンガンイオンが常磁性金属であり、結合するアミノ酸残基の HSQC スペクトル上のピーク強度が減少することを利用して、マンガンイオンの結合部位についてアミノ酸残基レベルで同定することができた。また、亜鉛イオンは、CTD と NTD との相互作用に必須であることがわかっており、X 線結晶構造解析の先行研究より、システイン残基とヒスチジン残基が亜鉛との結合に重要であることが示されている。化学シフト摂動法による解析により、亜鉛との結合によって、CTD 二量体の疎水性相互作用による結合が不安定化していることが示唆された。CTD と NTD との相互作用については、CTD/NTD の一方を安定同位体ラベルし、もう一方をノンラベルとして混合したサンプルを準備し、異なる条件下で、HSQC スペクトルを測定することで、CTD と NTD の相互作用が起きる条件や、相互作用部位の同定を目指して実験を行なっている。また、DNA と CTD/NTD との相互作用の親和性が、異なる条件下でどのように変化していくかについても、実験を行なっていく予定である。

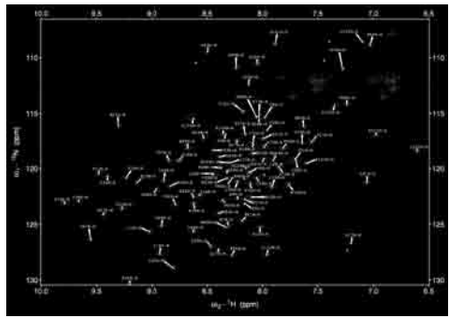


Fig1. ^{1}H-^{15}N HSQC spectrum of MutL-CTD.

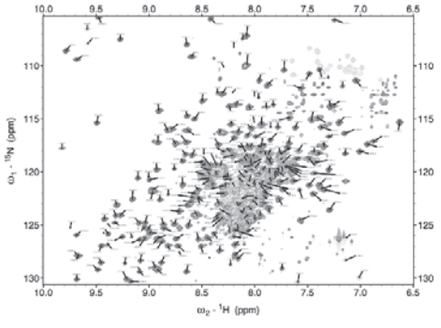


Fig.2　TROSY-HSQC spectrum of MutL-NTD

P9 マウス由来の新規低分子RNAの構造的特徴の解析

○奥居沙弥[1], 牛田千里[2], 清澤秀孔[3], 河合剛太[1]
[1]千葉工大・工・生命環境科学
[2]弘前大・農学生命科学・分子生命科学
[3]高知大・医・環境医学

Structural analysis of novel small RNA from mouse

○Saya Okui[1], Chisato Ushida[2], Hidenori Kiyosawa[3], Gota Kawai[1]
[1]Dept. of Life Env. Sci., Fac. of Eng., Chiba Inst. of Tech., Chiba, Japan.
[2]Dept. of Biochem. Mol. Biol., Fac. of Agri. Life Sci., Hirosaki Univ., Aomori, Japan.
[3]Dept. of Env. Medicine, Kochi Medical School, Kochi Univ., Kochi, Japan

Novel small RNAs, which were not classified into miRNA nor other known RNAs, were found during the analysis of the sense-antisense transcript (SAT) in mouse. The novel small RNA candidates are 50-100 nt length and their expression from SAT locus was identified by Northern hybridization. Secondary structure predictions of three of the novel small RNA candidates by vsfold5 revealed that these small RNA candidates possibly form pseudoknot. This suggested that pseudoknot formation is a characteristic for small RNAs from SAT locus. The pseudoknot formation was supported by the NMR analysis with selectively stable-isotopic labeled RNAs.

[はじめに]

哺乳類においてタンパク質をコードする領域はゲノム全体の１～2%と考えられていた．しかし，cDNAによるトランスクリプトーム解析などが進められ，タンパク質をコードする転写産物に対して，その10倍もの種類の転写産物が存在することが分かってきた．さらに，それらの解析から，ゲノムDNA上の同じ遺伝子座において，プラス鎖とマイナス鎖両方から転写されるセンス-アンチセンス転写産物(SAT)が多く存在することも明らかとなった（Fig. 1）．SATの役割についてはいまだ不明であるが，その遺伝子座から低分子RNAが発現していることが見出されており，現在様々な研究が進められている．本研究では，マウス低分子RNAの網羅的な解析の一環として，SAT遺伝子座から発現している低分子RNAの構造機能解析を進めている．

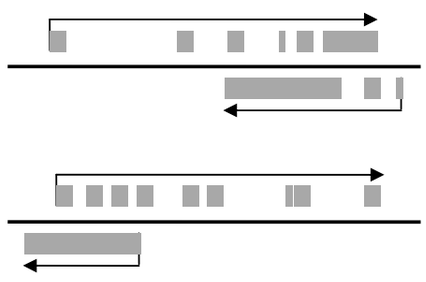


Fig. 1. SAT遺伝子座からの発現パターンの例
２つの例が示してある．それぞれ中央の太線はゲノムDNA，矢印が転写の方向，灰色の四角はエキソンを示している．いずれの転写産物についてもcodingあるいはnon-codingの可能性がある．

低分子RNA, conformation

○おくいさや，うしだちさと，きよさわひでのり，かわいごうた

[解析対象の新規低分子RNA候補]

SAT遺伝子座に対してプローブDNAを作成し，ノーザン解析することによって，低分子RNAの発現を検出することができる．今回は，3-oxoacid CoA transferase遺伝子座からの発現が確認されている新規RNA候補（3CoA）[1]，prdx2遺伝子座のマイナス鎖からの発現が確認されている新規RNA候補（ASprdx2）[2]に加え，新たに見出されたP2-1遺伝子座より発現する新規RNA候補（P2-1）を解析対象とした．

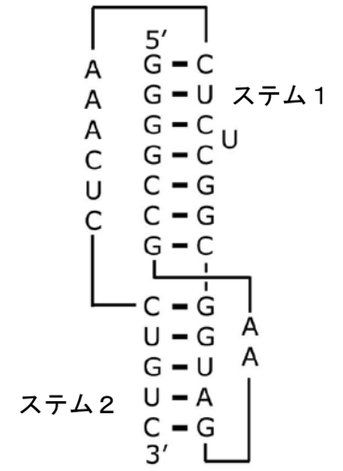


Fig. 2. 新規低分子RNAの候補である3CoAの推定二次構造

[二次構造形成領域の推定]

ノーザン解析に用いたプローブ配列を含む塩基配列についてプログラムvsfold5による二次構造予測を行った．Fig. 2は3CoAの予測結果であり，シュードノットの形成が示唆された．ASprdx2およびP2-1についても，シュードノット構造が予測されたことから，SAT遺伝子座から発現している低分子RNAはシュードノットを形成することで安定な構造を維持している可能性が示唆された．

[NMR法による二次構造の解析]

実際にシュードノット構造を形成するかどうかを検証するため，発現が推定されている領域に相当するRNA試料を調製し，NMRスペクトルの測定を行った．Fig. 3は，軽水中において測定した3CoAのNMRスペクトルである．イミノプロトンシグナルの数から，２つのステムがともに形成されていることが示唆され，さらに，安定同位体標識アミダイトユニット（大陽日酸社）を用いて，ステム２のU12を選択的に安定同位体標識した3CoA を化学合成し，^{15}N-^{1}H HMQCスペクトルを測定したところ，G:U塩基対の形成を示唆するクロスピークが観測された．これらのことから，3CoAがシュードノットを形成することが強く示唆された．

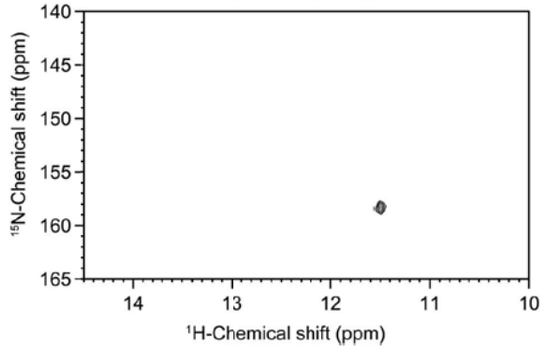


Fig. 3. U5およびC12残基を選択標識した3CoAの^{15}N-^{1}H HMQCスペクトル

[今後の展望]

今後は，解析中の新規RNA候補について，予測された二次構造をNMR法により確認すると共に，立体構造の決定を進める．さらに，他の新規候補についても，同様な解析を行い，その構造上の特徴を明らかにしたいと考えている．

References
1. Kiyosawa, H., et al., *Genome Res.* **15**, 463-474 (2005).
2. Chiba. M., et al., *Cytogenet. Genome Res.* **121**, 222-231 (2008).

P10

NMR structure and dynamics of chromatin remodeling component BAF155

Sunjin Moon, Sooho Choi, Weontae Lee*
Structural Biochemistry & Molecular Biophysics Lab, Department of Biochemistry, College of Life Science and Biotechnology, Yonsei University, Seoul, 120-740, Korea

Chromatin remodeling or rearrangement is an essential process in maintenance of the eukaryotic genome stability and integrity. Maintenance and rearrangement of chrormatin structure are carried by various covalent modifications of the flanking tails of the core histones, such as acetylation, methylation, phosphorylation or alteration of nucleosome structure by enzymatic catalyzed reactions. This process is mediated by huge, multiple protein complexes composed of various proteins, which have one or more enzymatic activities. Although many proteins related to chromatin remodeling complexes and their biological functions in genetic processes are identified and reported, their molecular structures, detailed functions and mechanisms are still remained to elucidate.

The mammalian SWI/SNF complexes are evolutionary conserved ATP-dependent chromatin remodeling complexes. They use the energy of ATP hydrolysis to rearrange and remodel chromatin structure. These complexes have roles in chromatin remodeling and are controlling its related diverse processes, including transcriptional regulation, cell differentiation, cell death and tumorigenesis. The mammalian SWI/SNF complexes are multiprotein complexes that consist of invariant core protein components and variable protein components. The core components of complexes are BRG1 or hBRM, SNF5/INI1/BAF47, BAF155/SRG3, and BAF170. BRG1 or BRM is DNA-dependent ATPase corresponding to yeast SWI2/SNF2 (Wang et al, 1996b). Although BRG1 or BRM alone shows remodeling activities of nucleosomal rearrangement, the other components, such as BAF155, BAF170 and INI1/SNF5 to BRG1 or BRM can increase the remodeling rates of entire chromatin remodeling process in vitro.

SRG3(swi3-related gene), a murine homologue of yeast Swi3, Drosophila Moira and human BAF155, was firstly identified and isolated in mouse thymus. It is a core component of mouse SWI/SNF complex and required for the various cellular process associated with transcriptional regulation, develelopment, differentiation and proliferation. Previous report shows that expression level of SRG3 is down regulated after positive selection of developing thymocytes and this is critical in determining glucocorticoid sensitivity in T-cells. And also T-cell receptor and NotchI signaling inhibits glucocorticoid induced apotosis of developing

chromatin remodeling complex, SWI/SNF complex, NMR spectroscopy

thymocytes by down regulating the SRG3 expression. However as a component of SWI/SNF complex, the function of SRG3 has not elucidated yet. SRG3 is 1,100 amino acids long and has 33-47% identity with SWI3 protein. It contains several high conserved domains such as the SANT domain, the SWIRM domain and the leucine zipper domain. It was reported that each domains of the SRG3 homologues is important to the interaction with other components of the SWI/SNF complex.

The SWIRM domain is a globular module of about 85-95 residues that was named after the proteins SWI3, RSC8 and MOIRA in which it was first recognized by computational analysis of eukaryotic genome. This protein is present in many different chromatin interactive or modifying proteins, including Swi3/SMARCC1/SMARCC2, Rsc8, histone demethylase1 (LSD1), transcriptional adaptor ADA2 of the SAGA histone acetyl transferase complexes (Barlev et al, 2003; Forneris et al, 2005). The roles of the SWIRM domain are still unknown but structural and biochemical analysis of the some kinds of the SWIRM domain suggested that these modular domains could mediate protein-protein or protein-DNA interactions during chromatin remodeling process. For example, the SWIRM domain of the ADA2a and SMARCC2 bind to double stranded and nucleosomal DNA, and the Swi3 SWIRM domain can also weakly interact with DNA. However, the SWIRM domain of the LSD1 does not interact with DNA, but it is assumed to mediate the protein-protein interactions.

To approach this problem, we have determined the high resolution nuclear magnetic resonance (NMR) structure of the SRG3 SWIRM domain (Ile446-Met543) using NMR spectroscopy, and studied DNA/protein, protein/protein interactions using biophysical and biochemical approaches.

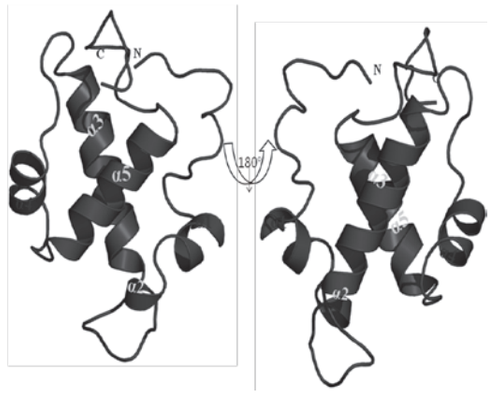


Figure 1. NMR structures of the SRG3 SWIRM domain. Ribbon representation of the lowest energy conformer of the SRG3 WIRM domain. H1 to H5 refer to helix 1-5

P11

ナガガジ由来III型不凍蛋白質の不活性型および活性型変異体の溶液構造解析

○久米田博之[1], 小椋賢治[1], 西宮佳志[2], 三浦愛[2], 稲垣冬彦[1], 津田栄[2]
[1]北海道大学先端生命科学院　構造生物学研究室
[2]産業技術総合研究所　生物プロセス研究部門

NMR structure of a defective isoform and its activity-improved variant of type III antifreeze protein form *Zoarces elongates Kner*

○Hiroyuki Kumeta[1], Kenji Ogura[1], Yoshiyuki Nishimiya[2], Ai Miura[2], Fuyuhiko Inagaki[1], Sakae Tsuda[2]
[1]*Department of Structural Biology, Faculty of Advanced Life Science, Hokkaido University, Sapporo, Japan.*
[2]*Bioproduction Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Sapporo, Japan.*

Antifreeze proteins (AFPs) can specifically bind to ice crystals and inhibit their growth. The ice-binding ability of AFP caused the thermal hysterical (TH) gap between the freezing and melting temperature. AFPs also modify the shape of an ice crystal into a hexagonal bipyramid in cooling temperature. Recently, it has been reported that some type III AFPs do not follow these rules in sole solution. A defective isoform nfeAFP11, which is originally isolated from *Zoarces elongates Kner* (notched-fin eelpout) has only ice-shaping activity, while its triple mutant nfeAFP11-tri has both activities. In this presentation, we determined the solution structures of nfeAFP11 and nfeAFP11-tri, and discussed the AFP-ice binding mechanism with surface water location in the AFP ice-binding surface by NMR experiments.

［序論］ 不凍蛋白質（AntiFreeze Protein: AFP）は様々な低温適応生物により生産されている．AFPは氷表面に結合することでその成長を阻害し氷温下における体液凍結を防いでいる．AFPが氷表面に結合することによって溶液の凝固点は下がる．その一方で融点は変わらない．この凝固点と融点の解離を熱ヒステリシス（Thermal Hysteresis: TH）という．また，AFPが結合した氷はその成長過程において重六角錐状の氷結晶（hexagonal bipyramidal ice-crystal）を形成する．この二つの性質がAFP活性の指標となっている．最近の研究により，魚類type III AFP群において単一状態でのAFP活性を欠失したアイソフォームが見つかっている．

魚類type III AFPは，イオン交換樹脂の結合能から２種類のファミリーに分類され（QAE, SP），ファミリー間で約50%の配列相同性を持っている．ナガガジ（*Zoarces elongates Kner*, notched-fin eelpout）は６種類のSP（nfeAFP1-6），７種類のQAE（nfeAFP7-13）の計１３種類のtype III AFPを産生しており，アミノ酸配列およびAFP活性の違いからQAEはさらにQAE1（nfeAFP7-10）とQAE2（nfeAFP11-13）に分類された．QAE1は，TH活性および氷結晶観察においてAFP活性が見られたが，他のQAE2およびSPにおいては，TH活性は見られず重六角錐氷結晶のみ観察された．QAE2のアミノ酸配列は，QAE1と比較して氷結合面（Ice-Binding Surface: IBS）を構成する残基のうち，９，１９，２０番目の残基が異なっている（Fig.1）．そこでQAE2であるnfeAFP11中のそれら残基をQAE1様とした変異体（nfeAFP11-V9Q/V19L/G20V; nfeAFP11-tri）を作成したところ，QAE1同様にTH活性を示した．しかしながら，IBSを構成するこれら残基の分子レベルにおけるAFP活性への影響はよくわかっていない．本発表では，nfeAFP11およびnfeAFP11-triの溶液構造を決定すると共に、AFP-iceの結合に関与すると考えられている表面水（surface water）に関する新たな知見について報告する．

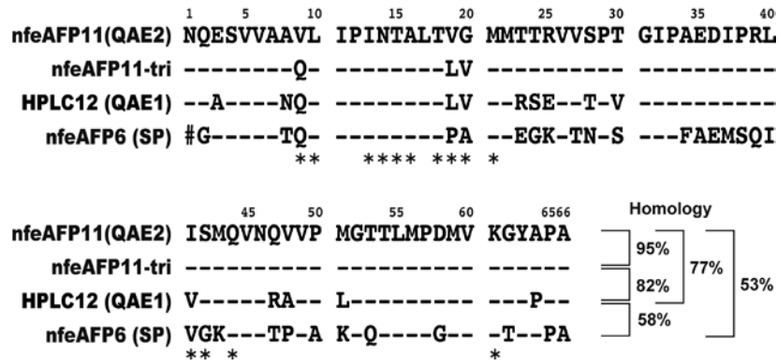


Figure 1. Sequence alignment of type III AFPs

[結果・考察]

$^{13}C/^{15}N$ラベル体を用いた各種NMR測定を行い，nfeAFP11およびnfeAFP11-triの溶液構造を決定した(Fig.2).両構造ともに一般的なtype III AFPと同じ主鎖骨格を有していた．nfeAFP11-tri変異導入により，IBS上に大きな疎水性側鎖が導入されておりvan der Waals力による氷との結合への寄与が考えられた．また，nfeAFP11とnfeAFP11-triのNOESYスペクトルの比較により，nfeAFP11-triにおいてのみThr^{18}の側鎖OHプロトンが観測された．Thr^{18}の側鎖OHプロトンは近傍のVal^{20}の側鎖メチルとの間にもNOEが観測されており，G20Vの変異導入によって溶媒中の水との交換がおさえられたために観測できたと考えられた．このThr^{18}の側鎖OHプロトンは，代表的なtype III AFPであるHPLC12の構造解析により表面水と水素結合を形成することが知られている．nfeAFP11-tri変異導入により，このThr^{18}の側鎖OHプロトンと表面水の水素結合が安定化したことが推測された.またnfeAFP11-triの立体構造上，Thr^{18}の側鎖OHを底部の中心とした窪みがLeu^{19}，Val^{20}により形成されているが，nfeAFP11には形成されていない．これらの結果から、nfeAFP11-triにのみ形成される窪みの中に配置された表面水が同分子の強い氷結晶結合をもたらすと推察された．

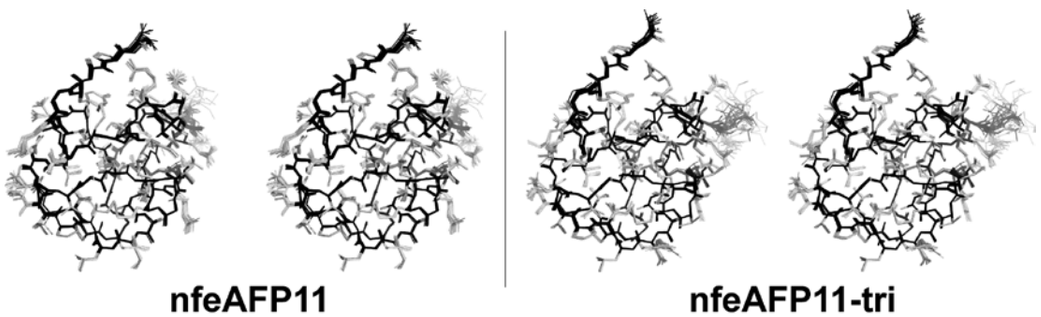


Figure 2. Ensemble NMR structures of nfeAFP11s.

Antifreeze protein, ice-binding, surface water

○くめた　ひろゆき，おぐら　けんじ，にしみや　よしゆき，みうら　あい，いながき　ふゆひこ，つだ　さかえ

P12

β_2-アドレナリン受容体のefficacy決定機構の解明

○幸福裕[1, 2], 上田卓見[1], 奥出順也[1], 白石勇太郎[1], 近藤啓太[1], 前田正洋[3], 辻下英樹[3], 嶋田一夫[1, 4]
[1]東大・院薬系
[2]日本バイオ産業情報化コンソーシアム
[3]塩野義製薬・創薬研究所
[4]産総研・バイオメディシナル情報研究センター

Efficacy of the β_2-adrenergic receptor is determined by conformational equilibrium in the transmembrane region

○Yutaka Kofuku[1, 2], Takumi Ueda[1], Junya Okude[1], Yutaro Shiraishi[1], Keita Kondo[1], Masahiro Maeda[3], Hideki Tsujishita[3], and Ichio Shimada[1, 4]
[1]Graduate School of Pharmaceutical Sciences, the University of Tokyo, Tokyo, Japan.
[2]Japan Biological Informatics Consortium (JBIC), Tokyo, Japan.
[3]Shionogi Co., Ltd., Discovery Research Laboratory, Osaka, Japan.
[4]Biomodeicinal Information Research Center (BIRC), National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Tokyo, Japan.

Many drugs that target G-protein-coupled receptors (GPCRs) induce or inhibit their signal transduction with different strengths, which affect their therapeutic properties. However, the mechanism underlying the differences in the signalling levels is still not clear, although several structures of GPCRs complexed with ligands determined by X-ray crystallography are available. Here we utilized NMR to monitor the signals from the methionine residue at position 82 in neutral antagonist- and partial agonist-bound states of β_2-adrenergic receptor (β_2AR), which are correlated with the conformational changes of the transmembrane regions upon activation. We show that this residue exists in a conformational equilibrium between the inverse agonist bound states and the full agonist-bound state, and the population of the latter reflects the signal transduction level in each ligand-bound state. These findings provide insights into the multi-level signalling of β_2AR and other GPCRs, including the basal activity, and the mechanism of signal transduction mediated by GPCRs.

【序】Gタンパク質共役型受容体（GPCR）は、共通の7回膜貫通構造をもつ、膜タンパク質ファミリーの1つであり、創薬のターゲットとして注目されている。GPCRに結合するリガンドは、Gタンパク質などのエフェクターを介したシグナル伝達を活性化または不活性化するが、その程度はリガンドによって異なる。これをefficacyと呼び、リガンドはefficacyによって、full agonist、partial agonist、neutral antagonist、inverse agonistに分類される。このようなefficacyの違いは薬効に影響することが知られており、例えば、β_2-アドレナリン受容体（β_2AR）の場合には、full agonistはpartial agonistよりも急性の喘息に対してより有効である。

Gタンパク質共役型受容体，構造平衡，昆虫細胞発現系
○こうふくゆたか，うえだたくみ，おくでじゅんや，しらいしゆうたろう，こんどうけいた，まえだまさひろ，つじしたひでき，しまだいちお

これまでに様々なリガンドに結合したGPCRの結晶構造が明らかになっているにもかかわらず、リガンドごとにefficacyが異なる機構は明らかではない。そこで、我々は、β_2ARを解析対象とし、シグナル伝達に直接関与する膜貫通領域の構造を、様々なリガンド存在下で解析することで、efficacyの違いが生じる機構を明らかにすることを目的として、研究をおこなった。

【方法】β_2ARは、バキュロウイルス発現系を用い、昆虫細胞expresSF+ により発現した。メチオニンmethyl選択的^{13}C標識は、バキュロウイルス感染直前にメチオニン不含培地に交換し、感染後16時間で200 mg/Lの[methyl-^{13}C]メチオニンを添加することによりおこなった。膜画分を調製した後、ドデシルマルトシドに可溶化し、コバルトアフィニティーカラムおよびリガンドアフィニティーカラムにより精製した。このようにして調製した[methyl-^{13}C-Met] β_2ARを用いて、inverse agonist（carazolol）、neutral antagonist（alprenolol）、partial agonist（tulobuterol、clenbuterol）、full agonist（formoterol）存在下で、^{1}H-^{13}C SOFAST-HMQCスペクトルを測定した。

【結果】1. β_2ARの調製

上述のように調製したβ_2ARを、SDS-PAGEにより解析したところ、精製度は95 %以上、RIリガンド結合アッセイにより解析したところ、活性割合は80 %以上であった。β_2ARには、9残基のメチオニンが広く分布しており、そのうち、M82、M215、M279は活性化にともない大きく構造変化することから（Fig. 1）、メチオニンmethyl基をプローブとしてNMR解析をおこなうこととした。昆虫細胞発現系において、90 %程度の標識率でメチオニンのmethyl基を選択的に^{13}C標識する方法を確立した。

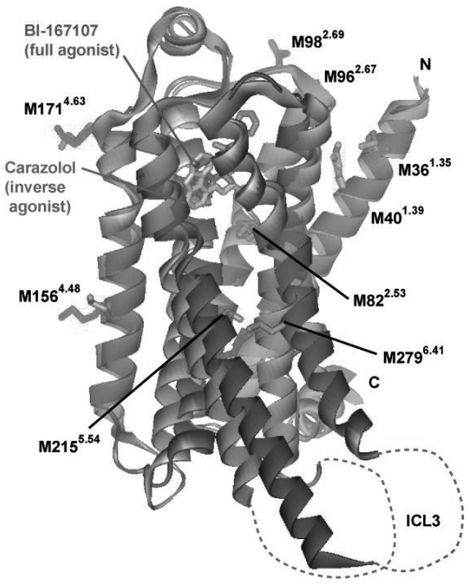


Fig. 1 Distribution of the methionine residues in the overlaid crystal structures of β_2AR bound with an inverse agonist (PDB code: 2RH1) and bound with a full agonist and a G-protein (PDB code: 3SN6).

2. inverse agonistおよびfull agonist結合状態のβ_2ARのスペクトル

carazolol（inverse agonist）結合状態のスペクトルでは、概ねメチオニン9残基に対応する数のシグナルが観測された（Fig. 2）。このことは、β_2ARのメチオニンが、膜貫通領域を含めて観測可能であることを示している。一方、formoterol（full agonist）結合状態のスペクトルでは、carazolol結合状態と比較して、いくつかのシグナルの化学シフト変化および消失が観測された（Fig. 2）。

著しいシグナルの重なりを解消するため、溶媒または膜に面した4残基のメチオニンを同時に変異した、4Met変異体を作成した。この4Met変異体では、強度の大きい4個のシグナルが消失し、スペクトルが大きく簡略化された（Fig. 2）。シグナルの帰属は、4Met変異体をベースに、さらにメチオニンを変異することによりおこなった。

帰属の結果、M82、M215、M279でリガンド依存的に大きな化学シフト変化、またはシグナルの広幅化が観測されることがわかった。このことは、活性化にともなうβ_2ARの構造変化を観測できたことを示している。このうち、M82 は formoterol 結合状態でも、高感度でシグナルが観測されたことから、これ以降、特にM82に注目することとした。M82はcarazolol結合状態で、2個のシグナルを与えており、これらを$M82^D$および$M82^U$と呼ぶ。一方、formoterol結合状態では、carazolol結合状態とは異なる化学シフトに、1個のシグナルが観測されており、これを$M82^A$と呼ぶ。

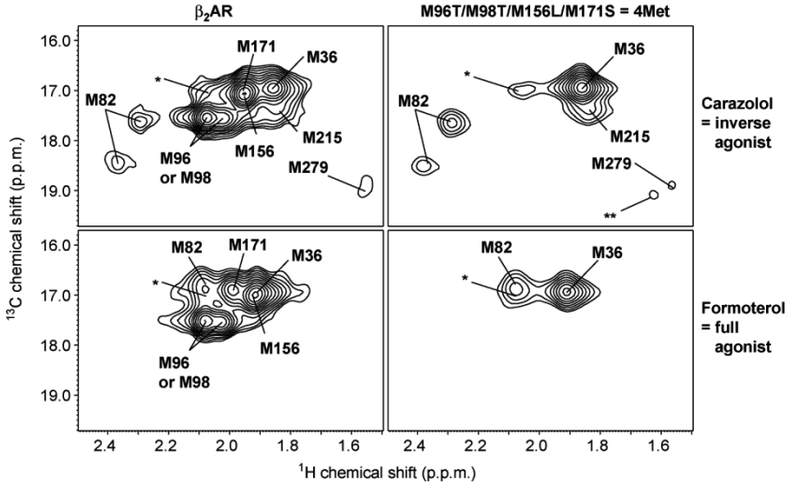


Fig. 2 ^{1}H-^{13}C SOFAST-HMQC spectra of [methyl-^{13}C-Met] β_2AR and their assignments.

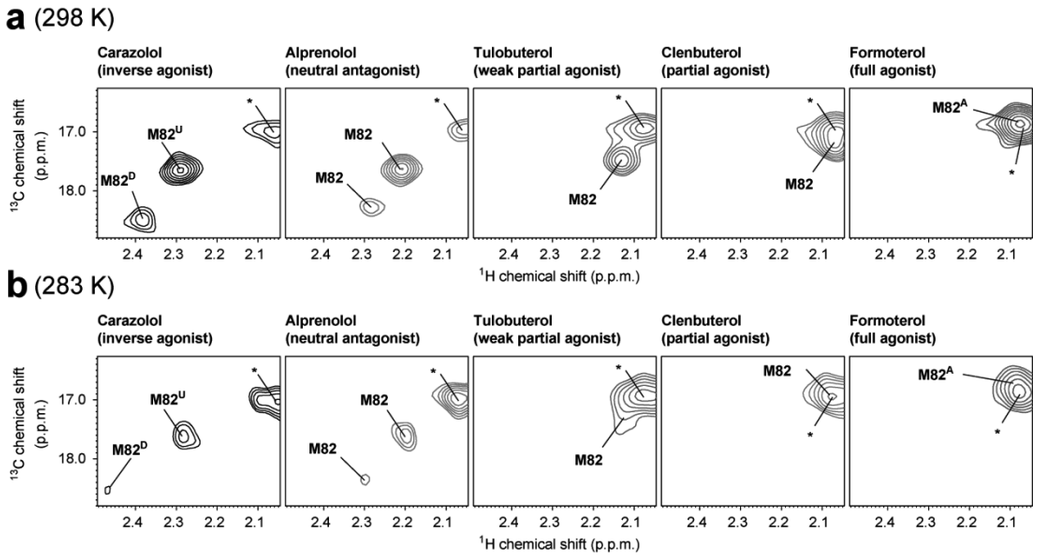


Fig. 3 The regions of M82 resonances in the ^{1}H-^{13}C SOFAST-HMQC spectra of [α,β,β-$^2H_3$-, methyl-^{13}C-Met] β_2AR/4Met at 298 K (a) and at 283 K (b) in the states with various efficacies.

3. neutral antagonistおよびpartial agonist結合状態のM82由来シグナルの変化

リガンドによりefficacyが異なる機構を明らかにするため、さらにalprenolol（neutral antagonist）、tulobuterol、clenbuterol（いずれもpartial agonist）結合状態について、M82のシグナルの変化を解析した（Fig. 3）。その結果、これらの状態では、carazolol結合状態とformoterol結合状態の中間的な化学シフトに、シグナルが観測された。

さらに、これらのシグナルが、異なる状態の間を交換しているかを明らかにするため、測定温度を298 Kから283 Kに下げて、測定をおこなった。その結果、partial agonist結合状態について、温度依存的なM82の化学シフト変化が有意に観測された（Fig. 3）。

【考察】メチオニンmethylの^{1}Hと^{13}Cの化学シフトは、それぞれ、環電流効果を含む周囲の環境と、χ^3-二面角に強く依存することが知られている。今回、観測されたM82の化学シフトの特徴を、既知の結晶構造と比較すると、$M82^D$および$M82^U$がinverse agonist結合状態の結晶構造に、$M82^A$がfull agonistおよびGタンパク質結合状態の結晶構造に対応することがわかった。このことから、$M82^D$および$M82^U$はGタンパク質を活性化できない不活性化状態に、$M82^A$はGタンパク質を活性化できる活性化状態に対応すると結論した。

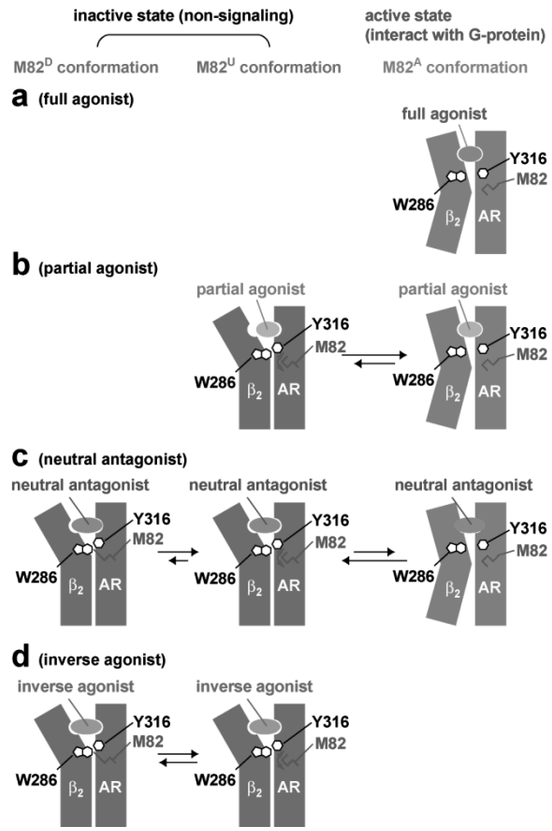


Fig. 4 A proposed mechanism for the differences in the efficacy of β_2AR for full agonists (a), partial agonists (b), neutral antagonists (c), and inverse agonists (d).

今回、解析したefficacyの異なる5種類のリガンドについて、M82のmethylシグナルの化学シフトは、efficacy依存的に連続的に変化した（Fig. 3）。また、partial agonist結合状態について、温度依存的な化学シフト変化が観測された。このことを考え合わせると、$M82^D$、$M82^U$、および$M82^A$に対応する3つのconformationの間を交換しているといえる。

以上のことから、各リガンド結合状態において、β_2ARは、$M82^D$、$M82^U$に対応する不活性化状態と、$M82^A$に対応する活性化状態の間の平衡にあり、inverse agonist、neutral antagonist、partial agonist、full agonistの違いは、活性化状態の割合の違いに起因することが示された（Fig. 4）。GPCRにおいて、シグナル伝達に関わる、膜貫通領域の構造変化様式は共通しており、本研究の解析結果は、β_2ARを含む多くのGPCRのシグナル制御機構を解明する上で、普遍的な知見を与える。

【参考文献】

Kofuku Y. *et al.*, *Nat. Commun.* 3:1045 doi: 10.1038/ncomms2046 (2012)

P13

ヘテロクロマチンタンパク質HP1αセリンリン酸化クロモドメインのＮＭＲ構造解析

○川口 あゆみ[1]，下條 秀朗[1]，濱田 京子[2]，中山 潤一[2]，西村善文[1]
[1]横浜市大院・生命ナノ
[2]理研・発生・再生科学総合研究センター

NMR structure of the HP1-α chromodomain phosphorylated at N-terminal serine residues

○Ayumi Kawaguchi[1], Hideaki Shimojo[1], Kyoko Hamada [2], Jun-ichi Nakayama[2] and Yoshifumi Nishimura[1]
[1] Department of Supermolecular Biology, Graduate School of Nanobioscience, Yokohama City University, Kanagawa, Japan
[2] Laboratory for Chromatin Dynamics, Center for Developmental Biology, RIKEN, Kobe, Japan

In eukaryotic cells, DNA is stored stably in a highly ordered structure, chromatin. Its fundamental repeating structural unit is a nucleosome core, which is comprised of a histone octamer and 147bp DNA. HP1 is a conserved chromosomal protein and plays important role in chromatin packaging. The chromodomain of HP1 recognizes a methyllysine at residue9 of histoneH3 tail (H3K9me),causing epigenetic silencing. Recently it was revealed that HP1α chromodomain phosphorylated at N-terminal four serine residues(S11-14) enhances its affinity for H3K9me. This suggests that the phosphorylation of HP1α is essential for heterochromatin formation. Here, we have determined the NMR structure of the phosphorylated HP1α chromodomain to reveal its interaction mode with the metylated histone tail.

【背景・目的】

真核細胞核内でDNAはヒストンに巻きついたクロマチン構造を形成しその構造変化が遺伝子転写発現を制御する。HP1(heterochromatin protein-1)のクロモドメイン(CD)は相互作用部位である3つの芳香環残基から成るaromatic cage (20Y,41W,44F) を介して、ヒストンH3テールの9番目のメチル化リジン(H3K9me)へ特異的に結合しヘテロクロマチンを形成する。このクロマチン構造の凝縮により遺伝子発現は不活化する。

すでにHP1αCD(Drosophila)は構造決定されているが、カゼインキナーゼ-2(CK2)によりHP1αCD のN末端側にある連続したセリン4残基をリン酸化することでH3K9meとの結合が強まることが新たに示された。そこで我々はHP1αCD に対するセリンリン酸化修飾の構造的寄与を明らかにするため、HP1αセリンリン酸化クロモドメイン(HP1αCDsep)のNMRによる構造解析を行った。

HP1, heterochromatin, chromodomain

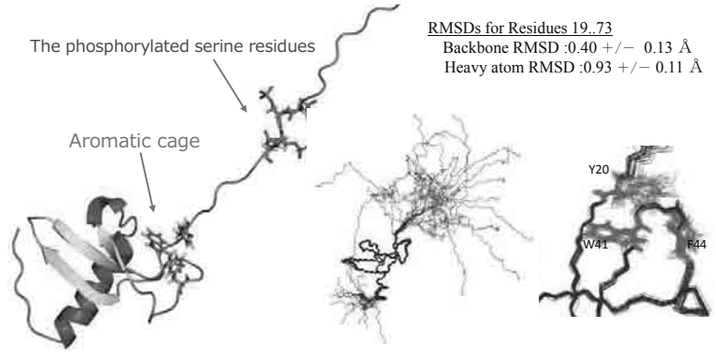
○かわぐちあゆみ，しもじょうひであき，はまだきょうこ，なかやまじゅんいち，にしむらよしふみ

【実験・結果】

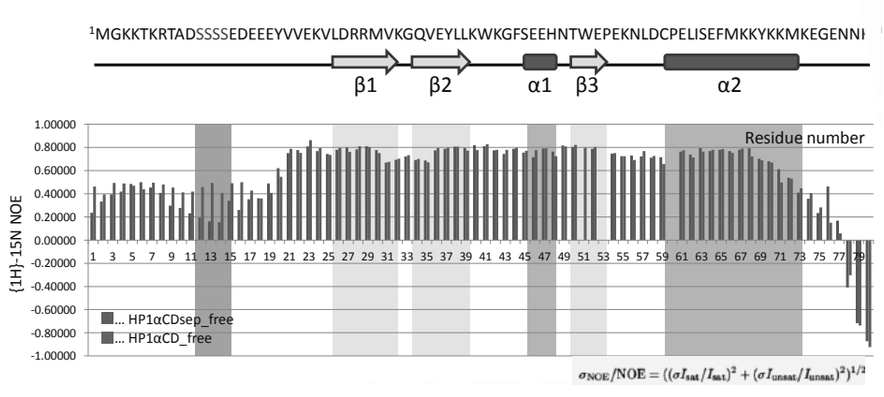
大腸菌発現系でHP1αCDとCK2を共発現させ、安定同位体(13C, 15N)標識したHP1αCDsepを得た。Niアフィニティークロマトグラフィーで夾雑物を分離後、Thrombin Proteaseで6×His-Tagを切断し、ゲル濾過クロマトグラフィーで最終精製を行った。HP1αCDsepとH3K9meとの相互作用を検討するため HP1αCDsep単体とH3K9meペプチドとの複合体を調製し各種異核種多次元NMR測定を行った。単体・H3K9meペプチド複合体、両方の主鎖帰属を終え、HP1αCDsep単体の立体構造を決定した。

【考察】

構造決定したHP1αCDsep単体の全体構造は他のHP1ファミリーと類似した典型的なクロモドメイン構造であった。しかしHetero-NOEによる動的構造解析からHP1αCDsepのN末端配列はセリンリン酸化に伴い構造が固くなることが分かった。HP1αCDsepのN末端には連続セリン残基に続いて酸性残基が存在し、セリンがリン酸化修飾されることで負電荷のまとまりができる。これがN末端構造が固くなる理由だと考えられる。今後H3K9meペプチド複合体の解析と同時に、ITCによるH3K9meとの相互作用解析とSAXSによる構造解析を併用しながら、HP1αCDに対するセリンリン酸化の寄与について明らかにする。



[Fig.1] Solution structure of the phos-HP1αCD (left) schematic ribbon diagram, (right) Best-fit superposition of the final 20 NMR structure of the aromatic cage of phos-HP1αCD



[Fig.2] Hetero_noe (red)HP1αCDsep_free (blue)HP1αCD_free

REFERENCES : Hiragami-Hamada,K.,et al. N-terminal phosphorylation of HP1α promotes its chromatin binding. Mol. Cell. Biol. 31, 1186-200 (2011)

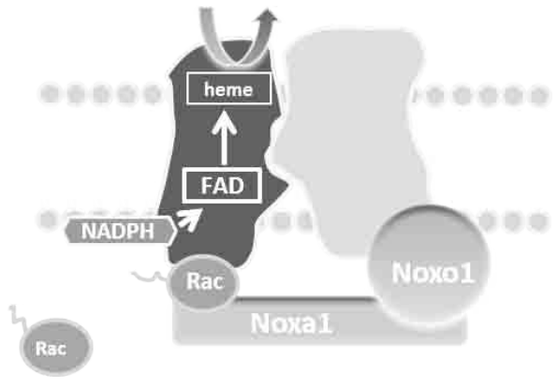
P14

NMR Studies on NOX Activator 1(NOXA1)

Pravesh Shrestha[1], Ji-Hye Yun[1], Yun Soo Bae[2] and Weontae Lee[1*]

[1]*Structural Biochemistry & Molecular Biophysics Laboratory, Department of Biochemistry, College of life Sciences & Biotechnology, Yonsei University, Seoul, 120-749, Republic of Korea*

[2]*Laboratory of Cellular Signal Transduction and Drug Discovery, Department of Life Science, Ewha Woman's University, Seoul 120-750, Republic of Korea*



S. Hideki et. al. Molecular mechanism underlying activation of superoxide-producing NADPH Oxidase : Roles for Their Regulatory Proteins. Jpn. J. Infect. Dis., 57,2004

Fig.1 Activation of Nox1 complex

NOX1 (NADPH oxidase), similar to phagocyte NADPH oxidase, expressed mainly in colon epithelium and is responsible for host defense against microbial infections by generating ROS (Reactive Oxygen Species). NOX1 is activated by two regulatory proteins namely, NOXO1 (NOX organizer1) and NOXA1 (NOX activator 1) hetero-dimerization. Both NOXA1 and NOXO1 are cytosolic proteins having one and two SH3 domain respectively. However SH3 domain of SH3YL1, a hypothetical protein, has tendency to bind NOXO1 with more affinity then NOXA1 thereby functioning as negative regulator of NOXA1-NOXO1 dimerization.

NOX1 (NADPH Oxidase), NOXA1 (NADPH Oxidase Activator 1), SH3YL1 (SH3 domain-containing YSC84-like protein 1)

NOXO1 domains, SH3 domain of SH3YL1 and NOXA1 were cloned in pET32a and pGEX vectors. Optimization of induction and solubility test for NOXO1 and SH3 domain of SH3YL1 and NOXA1 were successfully performed using pET32a construct. Here, we determined the solution structure of SH3 domain of NOXA1 and how the intra-molecular interaction between SH3 domain of SH3YL1 and NOXA1 differs with NOXO1. $^{15}N/^{13}C$ labeled SH3 domain of both SH3YL1 and NOXA1 were purified for NMR experiments (HNCACB, CBCACONH, HNCA, HNCO and HSQC). Data from pull-down assay between the His tagged NOXO1 and SH3 domain of both NOXA1 and SH3YL1 showed that SH3 domain of both NOXA1 and SH3YL1 were able to interact with NOXO1 full. Furthermore, domains of NOXO1 (PX, Prr, Prr_SH3 and SH3_SH3) and SH3 domain of NOXA1 and SH3YL1 showed intermolecular-interaction between the Prr(NOXO1) domain and SH3(SH3YL1 & NOXA1) domain. Additionally, we performed NMR titration between SH3 domain of NOXA1 and SH3YL1 with the Prr motif of NOXO1 to characterize the binding between these proteins. Currently we are working on the complex crystal structure between the SH3 domain of NOXA1 and SH3YL1 and Prr of NOXO1. Our result will help us to understand their binding affinity and molecular level interaction providing an insight for their cytoplasmic activity mediated functioning.

Reference:

1. Takeya,R. and Sumimoto, H. (2003): Molecular mechanism for activation of superoxide-producing NADPH oxidase s. Mol. Cells, 16, 271-277.

2. Ago, T., Kuribayashi, F., Hiroaki, H., Takeya, R., Ito, T., Kohda, D. and Sumimoto, H.(2003):Phosphorylation of P47phox directs phox homology domain from Sh3 domain toward phosphoinositides, leading to phagocyte NADPH oxidase activation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100, 4474-4479.

3. Banfi, B., Clark, R.A., Steger, K. and Krause, K.H. (2003): Two novel proteins activates superoxide generation by the NADPH oxidase NOX1. J. Bioll Chem, 278, 3510-3513.

4. Geiszt, M., Lekstrom, K., Witta,J. and Leto, T. L. (2003):proteins homologous to p47phox and p67phox support superoxide production by NAD(P)H oxidase 1 in colon epithelial cells. J. Biol. Chem., 278, 20006-20012-

5. Takeya, R., Ueno, N., Kami, K., Taura, M., Kohijima,M., Ixaki,T., Nunoi, H and Sumimoto, H. (2003):Novel human homologous of p47phox and p67 phox participates in activation of superoxide-producing NADPH oxidase. J. Biol. Chem. 278, 25234-25246.

6. Cheng, G., Ritsick, D. and Lambeth ,J.D(2004):NOX1 regulation by NOXO1, p47phox and p67phox. J. Biol. Chem., 279, 34250-34255.

P15

ヘテロクロマチン構造形成因子Swi6クロモドメインとヒストンH3K9me3ペプチドの複合体の構造解析

○中村紗里[1],下條秀朗[1],中山潤一[2],西村善文[1]
[1]横浜市立大学院　生命ナノシステム科学研究科
[2]理化学研究所　発生・再生科学総合研究センター

Structural analysis of heterochromatin-related protein, Swi6 chromodomain bound to histone H3K9me3 peptide

○Sari Nakamura[1], Hideaki Shimojo[1], and Jun-ichi Nakayama[2], Yoshifumi Nishimura[1]
[1]*Graduate School of Nanobioscience, Yokohama City University.*
[2]*Center for Developmental Biology, RIKEN, Kobe, Japan.*

Heterochromatin protein 1 (HP1) family proteins bind to methylated lysine 9 of histone H3 (H3K9me) forming heterochromatin. HP1 family is evolutionarily conserved from fission yeast to human.
Swi6 in fission yeast, one of HP1 family proteins, containing chromodomain binds to H3K9me. Here, we have determined the chromodomain structure and compared with Swi6, Chp1 and HP1α chromodomain structures.

【背景・目的】

真核生物のDNAは核内においてクロマチン構造をとり高度に折りたたまれて存在している。クロマチン構造はコアヒストンH2A、H2B、H3、H4のそれぞれ2分子から8量体で構成されるヒストンオクタマーの周りにDNAが巻きつけているヌクレオソームという単位から成る

ヌクレオソーム中のヒストンは8量体の形成に関わるヒストンフォールドとN末端側に自由度の高いテールに構成されている。ヒストンテールは20～30のアミノ酸からなり、メチル化、アセチル化やリン酸化などの翻訳後修飾のターゲットとなっている。修飾の組み合わせは、転写の活性化やクロマチン動態に影響を及ぼすことがわかっており、ヒストンコードと呼ばれている。

このクロマチン構造の変化が塩基配列の変化を伴わない後成的（エピゲノム）な作用による遺伝子の発現調節の役割をもっている。転写抑制状態は転写因子群の近づけない高度に凝縮したヘテロクロマチン構造をつくっている。ヘテロクロマチン構造では、HP1ファミリータンパク質がヒストンH3のN末テールの9番目のリジン残基のメチル化部位にクロモドメインが結合している。また、メチル化の個数（モノ、ジ、トリメチル化)によって作用が異なる。H3K9のメチル化では特にトリメチル化(H3K9me3)がヘテロクロマチンを制御する中心的な修飾と考えられている。

Swi6, クロモドメイン, ヘテロクロマチン

○なかむらさり，しもじょうひであき，なかやまじゅんいち，にしむらよしふみ

HP1ファミリータンパク質はアミノ基末端側のクロモドメインとカルボキシル基末端側のクロモシャドウドメインと両ドメインをつなぐヒンジ領域からなる。H3K9meとクロモドメインとの関係は分裂酵母からヒトに至るまでよく保存されている。その中でも分裂酵母は高等真核細胞と共通で単純なヘテロクロマチン形成機構をもち優れたモデル生物として用いられている。本研究でとりあげたSwi6は分裂酵母でのHP1ファミリータンパク質のひとつである。分裂酵母においてクロモドメインをもつタンパク質はSwi6の他にH3K9のメチル化酵素Clr4，同じくHP1ファミリーのChp2やRNA干渉に関するChp1があり、分裂酵母以外にも多くのタンパク質がある。

ショウジョウバエのHP1のクロモドメインは立体構造が解析され、クロモドメイン中の24番目のチロシン(Y24)、45番目のトリプトファン(W45)と45番目のチロシン(Y48)の芳香環によってH3K9me3のメチル化を認識し保持することが知られている。このことが分裂酵母Swi6クロモドメインにおいても同じことが観察できるか、またタンパク質の機能は立体構造に関わることからクロモドメインをもつ他のタンパク質との機能の差を、立体構造を解析することで明らかにすることが目的である。
NMRは生理的な条件に近い溶液状態で動的な構造の測定が可能であり、局所的な構造並びに分子間相互作用を見ることができるという利点がある。本実験は上記の点からNMRを用いて測定した。

【方法・結果】

Swi6クロモドメインの遺伝子配列及び精製に必要なthrombin認識配列・Hisタグを組み込んだ大腸菌を大量培養し、タンパク質を発現させた。次にタンパク質を抽出し、Niアフィニティークロマトグラフィーや HPLCで精製し、MALDI－TOF　MS等によって目的タンパク質を確認した。また、等温滴定型カロリメトリー(ITC)により複合体の挙動を測定することで安定なSwi6クロモドメインとH3K9me3ペプチドとの1：1での結合を確認した。複合体の各種NMR測定して得たデータをもとに解析を行った。Swi6クロモドメインの主鎖と側鎖の帰属を終えクロモドメイン側の構造を決定した(Fig.1)。現在は、H3K9me3ペプチド側の帰属も完了し、複合体全体における構造を解析している。今後、より精密な構造を導き類似するタンパク質との構造の比較を行うことを目指している。



Fig.1 NMR structure of Swi6 chromodomain bound to histone H3K9me3 peptide

P16

100残基を超える機能性RNAのNMR法による立体構造解析

○大山 貴子[1]， 河合 剛太[1]
[1]千葉工大・工

Structural analysis of functional RNA longer than 100 nt by using NMR

○Takako Ohyama[1], and Gota Kawai[1]
[1]*Department of Life and Environmental Sciences, Chiba Institute of Technology*

Long RNAs, such as the long non-coding RNAs and mRNAs, are often contains unique structural domains consisting of 50-300 resides. For structural studies of RNA by using NMR, longer RNA that has unique structure was often broken down to structure units consist of ~ 50 nt to determine their structures in most of previous works. However, to elucidate the structures and functions of the newly found functional RNA domains, it is fundamental to develop a new method for structural analysis of long RNA on atomic resolution by intact form. Thus, we are trying to develop a new method for determination of the structure and dynamics of longer functional RNAs. In the present study, a riboswitch found in *Thermus thermophilus* was subjected to NMR analysis.

近年，miRNA や snoRNA さらには mRNA 様の長鎖 non-coding RNA（ncRNA）など，タンパク質に翻訳されない ncRNA が生体中において転写や翻訳の制御に重要な役割を担っているという報告が数多くされている．これらの ncRNA は 20 残基程度から数千残基にわたり，その作用機構は配列や鎖長に応じて様々である．また，mRNA の非翻訳領域にも特定の構造を形成し，その機能を制御している領域がいくつも見つかっている．一般に，生体高分子の立体構造と機能には密接な相関があり，立体構造解析は生体高分子の作用機構解明のために必須である．これまでの RNA の立体構造解析の多くは，ヘアピンループなど実際に機能を果たす RNA の部分構造を切り出して行われていることが多い．このため，部分構造を組み合わせることで全体の機能を類推する研究が多数であった．そこで本研究では，特定の立体構造を形成する 100 塩基程度の機能性 RNA について機能構造を断片化することなく立体構造解析する手法を開発し，機能と構造の相関を解明することを目的としている．

本研究において，100 塩基程度の機能性 RNA のモデルとして *Thermus thermophilus* HB8 において発見されたリボスイッチを解析対象とした．この配列は，*Thermus thermophilus* HB8 のマイクロアレイ解析にて，特定の栄養状態の時にこの領域の下流に存在する代謝系の遺伝子群の mRNA 転写量が増大することから発見され，これまでに知られているコンセンサス配列との比較から，リボスイッチであると推定された．これまで，さまざまなリボスイッチについて，X 線結晶構造解析によってリガンド分子との複合体の立体構造解析がなされているが，リガンド未結合の状態での立体構造はいまだ決定されていない．そこで本研究では，100 塩基程度からなる RNA の立体構造

Functional RNA, selective isotope labeling, riboswitch

○おおやまたかこ，かわいごうた

解析のみでなく，リガンドの bound/unbound によるリボスイッチの立体構造変化の詳細な解析を試みている．さらに，このリボスイッチは高度好熱菌由来であり，RNA のみで機能を果たすリボスイッチが 70℃以上の高温下において動作するメカニズムを明らかにすることも重要な課題である．

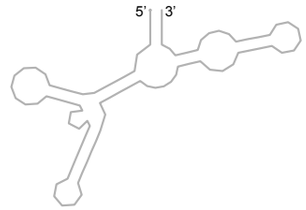


Fig. 1 Schematically drawing of TtRNA91 predicted by vsfold5.

二次構造予測プログラム vsfold5 で予測されたリボスイッチの二次構造の模式図を Fig. 1 に示す．この予測結果に基づき，NMR 法による構造解析のための 91 残基の RNA（TtRNA91）をデザインした．次に我々は，*Thermus thermophilus* HB8 のゲノム DNA より TtRNA91 に対応する DNA 断片をクローニングし，それをテンプレートとして RNA を酵素合成した．得られた TtRNA91 について，Mg^{2+}存在下でゲルシフト解析を行ったところ，リガンドの添加に伴い，TtRNA91 のみの場合よりも泳動度の高い新たなバンドが検出された．このことからリガンドの結合により，TtRNA91 に構造変化が起こり，リガンドを結合していない状態よりもコンパクトな構造になることが示唆された．

より詳細な構造変化の解析のため，^{1}H-NMR スペクトルによって TtRNA91 のリガンド滴定実験を行った．その結果を Fig. 2 に示す．リガンドの添加量の増加にともない，イミノプロトンが観測される領域に複合体由来と考えられる新たなシグナルが観測された．また，一部のシグナルはリガンドの添加にともない消失した．[リガンド]/[TtRNA91]<1 のとき RNA 単体とリガンド-RNA 複合体由来の両方のシグナルが同時に観測されたことから、リガンドの交換速度は NMR のタイムスケールよりも遅いことが分かった．また，TtRNA91 に対しリガンドを 1 等量添加したところで化学シフト変化が終了したことから，TtRNA91 とリガンドは 1 対 1 で複合体を形成していることが示唆された．また，リガンド非存在下と結合時を比較して，結合状態でイミノプロトンシグナルの数が増加していることから，リガンドの結合によって，複数の新たな水素結合が形成されることが示唆された．したがって，この RNA は，100 残基程度の RNA の構造解析のターゲットとして適していることがわかった．

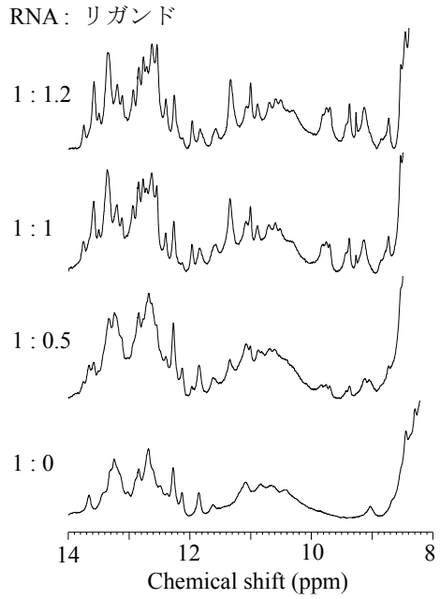


Fig. 2 The ligand induced chemical shift perturbation to TtRNA91.

現在，TtRNA91 の NMR シグナルの帰属を行うため，位置特異的な安定同位体標識あるいはスピンラベルの導入を進めている．超高分解能の分光計の利用と組み合わせることによって，この RNA のシグナルの効率よく解析し，立体構造が決定できることを示したいと考えている．

P17

テロメアDNAとhTRF2塩基性ドメインの相互作用解析

○鈴木啓介[1]，下條秀朗[1]，岩沢佳尚[1]，村井元気[1]，西村善文[1]
[1]横浜市立大学大学院・生命ナノシステム科学研究科・生体超分子システム科学専攻

Analysis of telomere DNA - hTRF2 basic domain interactions

○Suzuki Keisuke[1], Shimojo Hideaki[1] , Iwasawa Yoshinao[1], Murai Motoki[1], and Nishimura Yoshifumi[1]
[1]*Department of Supermolecular Biology, Graduate School of Nanobioscience, Yokohama City University, Kanagawa, Japan.*

Telomeres are the end of chromosome. TRF2 constitutes a part of shelterin complex which is important for telomere stability. The components of shelterin complex have a variety of functions. The dimer of TRF2 forms the T-loops by stimulating strand invasion of the 3' overhang into duplex DNA with their basic domains. However it is not known how basic domain interacts with telomere DNA. Here we have examined the role of basic domain of TRF2 for stabilization of t-loop.

背景・目的

真核生物の染色体末端のテロメアは、細胞分裂のたびに短くなる。テロメアの短縮が繰り返されると、細胞分裂ができなくなってしまうことが分かっており、テロメアは細胞の維持に重要な要因として、盛んに研究が行われている。ヒトのテロメアDNAはTTAGGGの繰り返し配列であり、ここにテロメアの維持と保護に重要なシェルタリン複合体が結合する。そのなかのテロメアDNA結合タンパク質hTRF1、hTRF2は、テロメア末端部位のt-loop形成に関わっている。t-loop構造によってテロメアがDNAの損傷と区別して認識され、染色体末端を保護している(Fig. 1)。hTRF1とhTRF2はともにC末端にDNA結合ドメインを保持している。当研究室の西川や花岡らは、hTRF1とhTRF2のDNA結合ドメインが非常にコンパクトな3本のヘリックスからなる1個のMybドメイン構造をとっていること及び3番目のヘリックスがテロメア二重鎖DNAの大きな溝で特異的に塩基配列を認識していることをNMRによる解析で明らかにした[1, 2]。

また、hTRF2のN末端に存在する塩基性ドメインは一本鎖3'突出末端のt-loop鎖侵入部位に結合することやt-loop形成によりできる2本鎖と1本鎖のDNAジャンクション部位に結合するなど、テロメアDNAと相互作用しt-loopの安定化に寄与していることが報告されている。しかし、塩基性ドメインがどのような機構で相互作用し機能を果たしているのかは明らかにされていない。

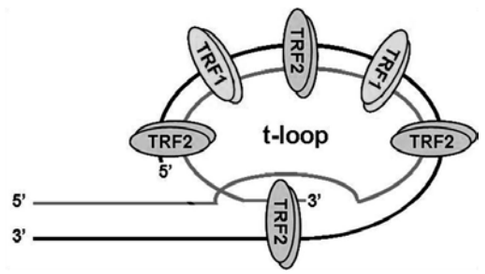


Fig. 1 Schematic of t-loop formation

TRF2, テロメア, t-loop

○すずきけいすけ，しもじょうひであき，いわさわよしなお，むらいもとき，にしむらよしふみ

そこで、本研究ではNMR法を用いて、hTRF2塩基性ドメインがテロメアのt-loopの安定化に寄与する仕組みを明らかにすることを目的とした。

方法

塩基性ドメインはN末端側から45残基あり、46番目のアラニンをシステインに置き換えて46番～55番までを二量体形成ドメインとしたhTRF2 塩基性ドメインを作成した(A46C)。このシステイン変異は、TRF2が二量体でテロメアに結合して作用している為、変異を加えエアレーションによるシステイン酸化を行うことで、ジスルフィド結合による二量体を形成させることを目的としている。

また、塩基性ドメインとの相互作用に用いる一本鎖突出3'末端部位をモデルにしたヘアピンDNA27merは、オリゴDNAを緩衝溶液に溶解し、95℃で5分間反応後、緩やかに冷却しアニーリングを行った。この^{15}N標識したhTRF2塩基性ドメインとヘアピンDNAを用いてNMR滴定実験を行い、相互作用の解析を行った。

結果・考察

TRF2 塩基性ドメインA46C二量体のフリーの状態でのNMRスペクトルと二量体とヘアピンDNAの濃度比が1対1の時のNMRスペクトルを比較すると、ヘアピンDNAを加えた際に新たなシグナルが現れた(Fig. 2)。このことから、塩基性ドメインの二量体がヘアピンDNAに対してフリーの状態とは異なる構造で相互作用している部位があることを示唆している。

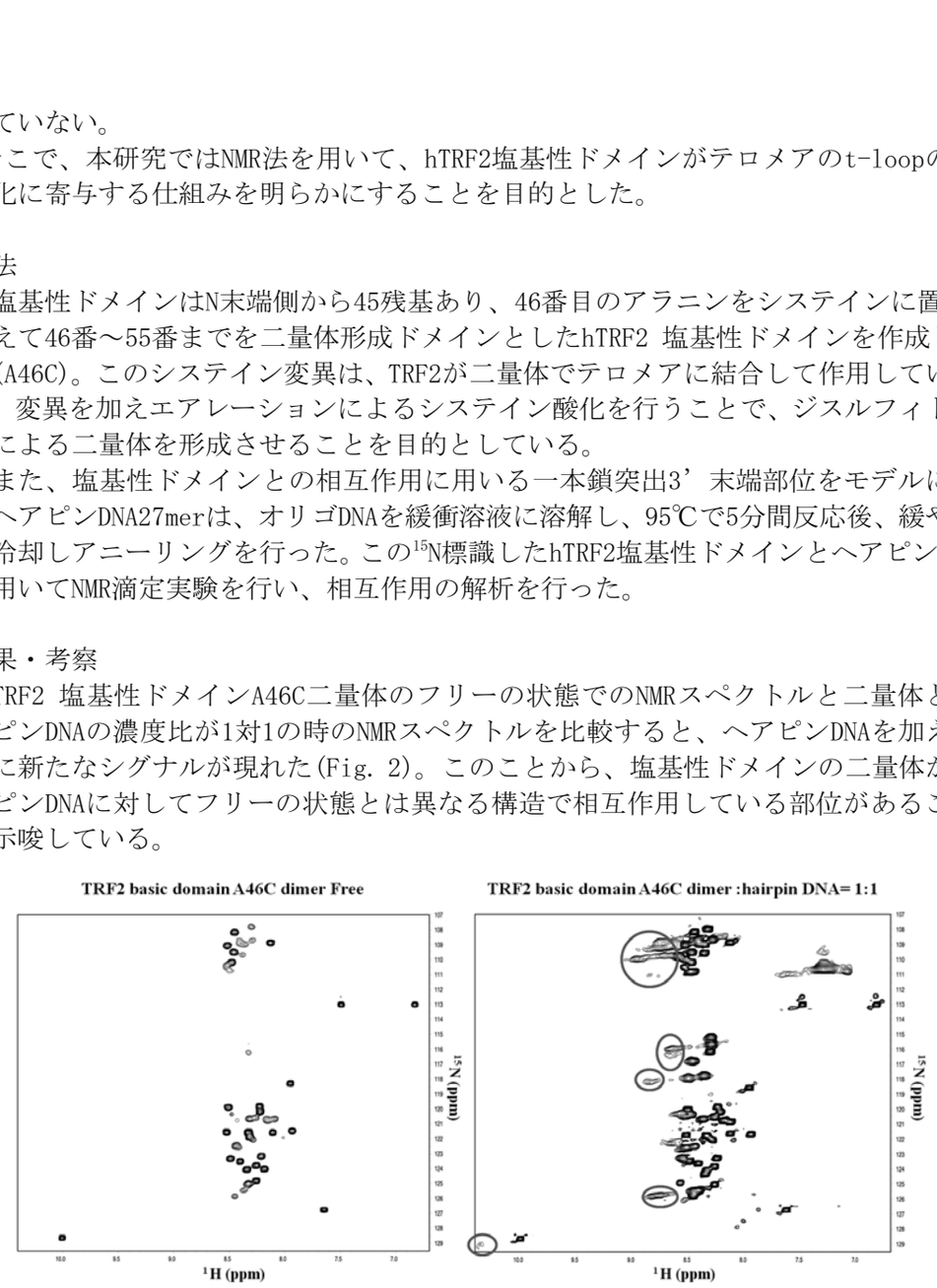


Fig. 2 Right: ^{1}H, ^{15}N HSQC spectrum of TRF2 basic domain dimer free
Left: ^{1}H, ^{15}N HSQC spectrum of 1:1 mixture of TRF2 basic domain dimer and hairpin DNA

参考文献

1. Nishikawa T, Okamura H, Nagadoi A, Konig P, Rhodes D, and Nishimura Y. (2001). Solution structure of a telomeric DNA complex of human TRF1. Structure. 9, 1237-51
2. Hanaoka S, Nagadoi A, Nishimura Y. (2005). Comparison between TRF2 and TRF1 of their telomeric DNA-bound structures and DNA-binding activities. Protein Sci. 14, 119-30.

P18

NMRに基づく白血球遊走抑制因子FROUNT—抗炎症薬候補化合物の相互作用解析

○日隈　達也[1]，吉永　壮佐[1]，江崎　芳[1]，寺島　裕也[2]，
遠田　悦子[2]，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

NMR analyses of the interaction between the chemotaxis-regulating factor FROUNT and an anti-inflammatory compound

○Tatsuya Higuma[1], Sosuke Yoshinaga[1], Kaori Esaki[1], Yuya Terashima[2], Etsuko Toda[2], 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.

Chemotaxis of leukocytes is induced when chemokines bind to their receptors. We identified the chemotaxis-regulating factor, FROUNT, which binds to the chemokine receptor CCR2. We also obtained a compound, named No.33, which has an anti-inflammatory effect and inhibits the binding of CCR2 and FROUNT. The purpose of this study is to clarify the inhibition mechanism by No.33, based on the structure of the CCR2-binding domain of FROUNT (FNT-C). Analyses of the saturation transfer difference spectra revealed that No.33 binds to FNT-C. We found wide-ranging signal changes of FNT-C upon titration of No.33, suggesting the large conformational change of FNT-C. We discuss the inhibition mechanism of the FROUNT–CCR2 interaction by No.33, together with the results of the cross saturation analysis of the No.33-binding site on FNT-C.

【目的】白血球の遊走は、白血球が血管内から組織内へ浸潤し、炎症局所に移動・集積する現象である。この現象は、生体内で炎症が起きた際に炎症部位から産生されるケモカインが、細胞膜上に存在するケモカイン受容体に結合することで誘起される。白血球の遊走は、生体を防御する免疫機構に重要な役割を果たす現象であるとともに、動脈硬化症・関節リウマチ・感染症などの様々な疾患の発症にも密接に関与している。

我々は、ケモカイン受容体 CCR2 と細胞内で結合することで白血球遊走を制御するタンパク質 FROUNT を見出した [1]。また、FROUNT 上の CCR2 結合領域が C 末端領域 (FNT-C) であることを明らかにし、 FNT-C の立体構造を決定した。さらに、化合物ライブラリーのスクリーニングにより、 FROUNT と CCR2 の結合を阻害し、かつ、マウス腹膜炎モデルにおいて抗炎症効果をもつ化合物 (No.33) を取得した。

本研究は、NMR を用いて、No.33 と FNT-C の結合様式を解明し、立体構造に基づいて No.33 の化学構造を最適化することを目的としている。

飽和移動差スペクトル，ケモカイン，創薬

○ひぐまたつや，よしながそうすけ，えさきかおり，てらしまゆうや，とおだえつこ，まつしまこうじ，てらさわひろあき

【方法】飽和移動差スペクトルの実験は、Meyer らの方法 [2] に基づいて行った。100 μM の No.33 に 10 μM の FNT-C を混合し、No.33 の ^{1}H NMR シグナルと化学シフトの重複しない FNT-C の ^{1}H NMR シグナルをラジオ波照射することで、 FNT-C を選択的に飽和させた。FNT-C からの飽和の転移による No.33 のシグナル強度の減弱を指標として、No.33 と FNT-C の結合を検出した。

FNT-C に対する No.33 の滴定実験では、50 μM の ^{15}N 標識 FNT-C に 0.5、1、2、4、10 当量の No.33 を順に滴定し、滴定に伴う FNT-C 由来の NMR シグナルの変化を ^{1}H–^{15}N HSQC スペクトルに基づいて検出した。

【結果・考察】飽和移動差スペクトルの実験において、まず No.33 のみの試料に対して、ラジオ波の照射中心、飽和パルスの種類、および、強度を変えて照射し、No.33 を直接飽和しない条件を決定した。次に、No.33 に FNT-C を添加した試料に対して同様の実験を行い、飽和パルスの条件を検討した。また、No.33 を直接飽和しない条件内で、 FNT-C が十分飽和される条件を見出した。飽和移動の効率の最も良い条件では No.33 のすべての ^{1}H のシグナルに 34%～45% の強度の減弱が見られた。これは、No.33 が、FROUNT と CCR2 の結合を阻害する上で FROUNT 側に結合することを示している。また、No.33 に存在する ^{1}H はそれぞれ十分に離れていることから、スピン拡散の影響は少ないと考えられるため、No.33 の分子全体が FNT-C との結合に重要であると推定される。

^{15}N 標識 FNT-C への No.33 の滴定実験において、FNT-C 単体由来のシグナルが消失し、No.33 との複合体に由来するシグナルが出現した。No.33 の化学構造と比較して、FNT-C の立体構造上において変化を生じた部位は顕著に広かった。これは、No.33 との結合に伴って FNT-C が大きな立体構造変化を起こしていることを示している。また、変化した部位は、以前我々が FNT-C への CCR2 の細胞内領域 (Pro-C) の滴定実験を行った際に、FNT-C の立体構造上において変化した部位を含んでいた。FNT-C 上の No.33 と Pro-C それぞれが直接結合する部位を正確に同定するために、現在 ^{2}H^{15}N 標識 FNT-C を調製し、交差飽和法 [3] を用いて解析を進めている。

以上の解析結果に基づいて、No.33 による FROUNT—CCR2 相互作用の阻害機構について議論する。

【展望】今後は、FNT-C—No.33 複合体の立体構造に基づいて No.33 の FROUNT 阻害機構を明らかにし、No.33 の化学構造を最適化することで特異性の高い抗炎症薬の創薬に貢献する。

【参考文献】

[1] Terashima, Y., *et al*., *Nature ImmuNo..l.* **6**, 827–35 (2005)
[2] Mayer, M. and Meyer, B., *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 6108–6117 (2001)
[3] Shimada, I., *et al*., *Prog. Nuc. Magn. Reson. Spect.* **54**, 123–140 (2009)

【謝辞】

本研究の一部は、文部科学省ターゲットタンパク研究プログラム、および、科学研究費補助金・若手研究 (B) (19790064) の助成を受けて行われた。

P19

NMR and Native-PAGE analyses of the phospholipase C-δ1 pleckstrin homology domain

○Michikazu Tanio, and Katsuyuki Nishimura
Institute for Molecular Science

The phospholipase C (PLC)-δ1 pleckstrin homology (PH) domain has a characteristic short α-helix (α2) from residues 82-87. The contributions of the α2-helix toward the inositol 1,4,5-triphosphate (IP_3) binding activity of the PLC-δ1 PH domain were investigated by Native PAGE and solution NMR methods. Native PAGE analyses indicated that the helical conformation of the α2-helix and the phenyl ring of Phe-87 play important roles in IP_3-binding activity and thermal stability. The ^{1}H-^{15}N HSQC NMR study of the selectively [α-^{15}N]Lys-labeled PLC-δ1 PH domain indicated that the conformation of the α2-helix couples with the ligand-binding activity of the protein.

Introduction

Phospholipase C (PLC) binds to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP_2) in the cell membrane through the pleckstrin homology (PH) domain, and hydrolyzes PIP_2 to produce two second messengers, diacylglycerol and inositol 1,4,5-triphosphate (IP_3), by the catalytic domain. PH domains consist of about 120 residues and are found in many proteins involved in cellular signaling. Although most PH domains bind weakly and non-specifically to phosphoinositides, the PLC-δ1 PH domain was the first to be shown to stereospecifically recognize a phosphoinositide ligand with high affinity. Unlike other PH domains, the PLC-δ1 PH domain has a characteristic short α-helix (α2) from residues 82-87, which does not make direct contact with the ligand. Although the roles of the α2-helix in the protein activity are unclear, solid-state ^{13}C NMR studies of the PLC-δ1 PH domain indicated that conformational changes of α2-helix are induced in the protein bound to PIP_2 embedded in the membrane, suggesting that the α2-helix non-specifically interacts with the hydrophobic layer of the membrane due to the membrane localization of the protein [1,2]. In the present study, we investigate the contributions of the α2-helix toward the IP_3-binding activity of the PLC-δ1 PH domain using Native PAGE and solution NMR methods.

Materials & Methods

The wild type and mutant proteins of the PLC-δ1 PH domain, corresponding to residues 1-142 of human PLC-δ1, were expressed as GST-fusion proteins by *E. coli* BL21(DE3), and purified by affinity and size exclusion chromatography [3]. For Native PAGE, 4 μl of the protein solution with 0-300 μM IP_3 was run on a SuperSep Ace 5-20% gel (Wako) in Native-PAGE running buffer (pH 7.4) at 4˚C [3]. All NMR experiments were carried out using a JEOL JNM ECA600 spectrometer equipped with an HCN triple resonance inverse probe. Two-dimensional ^{1}H-^{15}N HSQC NMR spectra were acquired at 20˚C with resonance frequencies of 600.2 and 60.8 MHz for ^{1}H and ^{15}N nuclei, respectively.

pleckstrin homology domain, Native PAGE

○たにお　みちかず，にしむら　かつゆき

Results & Discussion

Native-PAGE analyses indicated that IP_3 binding to the PLC-δ1 PH domain results in a marked migration shift on the gel (Fig. 1) and in an increased thermal stability with an aggregation temperature shift of +19.1˚C. In addition, we found that disruption of the α-helical conformation by replacement of Lys-86 with proline resulted in reduced affinity for IP_3 and in thermal destabilization of the IP_3-binding state. Although the mutant protein with replacement of Lys-86 with alanine showed a slight reduction in thermal stability, the IP_3-binding affinity was similar to that of the wild-type protein. Replacement of Phe-87 with alanine, but not with tyrosine, also resulted in reduced affinity for IP_3 and in thermal instability. These results indicated that the helical conformation of the α2-helix and the phenyl ring of Phe-87 play important roles in the IP_3-binding activity and thermal stability of the PLC-δ1 PH domain [3].

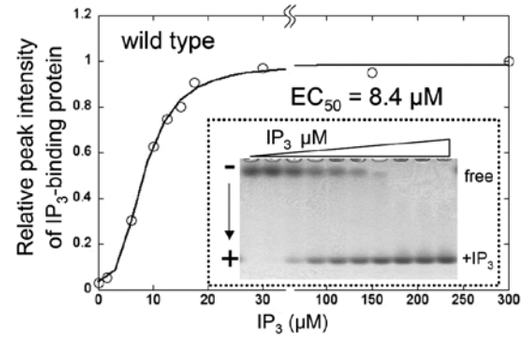


Fig. 1 IP_3 titration analysis of the wild type PLC-δ1 PH domain on Native PAGE.

The ^{1}H-^{15}N HSQC NMR study of the selectively [α-^{15}N]Lys-labeled PLC-δ1 PH domain indicated that IP_3 binding induces chemical shift displacement of all lysine signals (Fig. 2). Interestingly, although the ^{1}H-^{15}N NMR signal of Lys-86 located on the α2-helix showed only a slight change in chemical shift due to IP_3 binding, its α-^{15}N signal line width was markedly affected (Fig. 2, inset). Although the α-^{15}N signal line width of Lys-86 in the ligand-free form was about two-fold broader than those of the other lysine signals, the broad line width of the [α-^{15}N]Lys-86 signal converts to a narrow line width with addition of IP_3 (Fig. 2, inset). These findings provide evidence that the conformation and/or dynamics of the α2-helix couple with the ligand-binding activity of the PLC-δ1 PH domain. These results also suggest that the conformational changes of the α2-helix induced by membrane binding [1,2] result in conversion of the stereospecific ligand-binding site to a weak-affinity site and in protein instability [3].

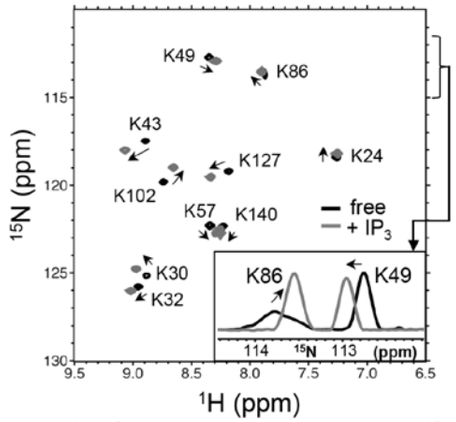


Fig. 2. ^{1}H-^{15}N HSQC NMR spectra of [α-^{15}N] Lys-labeled PLC-δ1 PH domain in the absence (black) and presence (gray) of IP_3.

References

[1] Tuzi, S., Uekama, N., Okada, M., Yamaguchi, S., Saito, H., and Yagisawa, H. (2003) *J. Biol. Chem.* 278, 28019-28025.
[2] Uekama, N., Aoki, T., Maruoka, T., Kurisu, S., Hatakeyama, A., Yamaguchi, S., Okada, M., Yagisawa, H., Nishimura, K., and Tuzi, S. (2009) *Biochim. Biophys. Acta*. 1788, 2575-2583.
[3] Tanio, M and Nishimura, K., (2012) *Anal. Biochem.* doi: 10.1016/j.ab.2012.09.012.

P20

ユビキチンの高エネルギー状態N_2の立体構造解明

○北沢 創一郎[1], 亀田 倫史[2], 矢木 真穂[3,4], 菅瀬 謙治[5], Nicky Baxter[6], 加藤 晃一[3,4], Williamson Michael P.[6], 北原 亮[1]
[1]立命館大学薬学部, [2]産総研・生命情報工学研究センター, [3]岡崎統合バイオサイエンスセンター, [4]名古屋市立大学院薬学研究科, [5]サントリー生命科学財団, [6]シェフィールド大学・分子生物バイオテクノロジー学科

Solution stucture of the alternatively folded state of ubiquitin

○Soichiro Kitazawa[1], Tomoshi Kameda[2], Maho Yagi[3,4], Sugase Kenji[5], Nicky Baxter[6], Koichi Kato[3,4], Williamson Michael P.[6] Ryo Kitahara[1]
[1]College of Pharmaceutical Sciences, Ritsumeikan University, [2]Computational Biology Research Center, Advanced Industrial Science and Technology, [3]Okazaki Institute for Integrative Bioscience and Institute for Molecular Science, National Institutes of Natural Sciences, [4]dGraduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University, [5] eNMR Group, Division of Organic Chemistry, Bioorganic Research Institute, Suntory Foundation for Life Sciences, [6]Department of Molecular Biology and Biotechnology, The University of Sheffield

We have previously shown that ubiquitin populates a high-energy conformer N_2 at high pressure. Here, we show that the mutation Q41N favors N_2: high-pressure NMR shows that N_2 is ~70% populated in Q41N but only ~20% in the wild type at ambient pressure. This allows us to characterize the structure of N_2, in which the α_1-helix, the following loop, β_3 and β_5 change their orientations relative to the remaining regions. The N_2 conformers produced by high pressure and by the Q41N mutation are closely similar in both structure and dynamics. The conformational change to produce N_2 is orthogonal to that seen when proteins containing a ubiquitin interacting motif (UIM) bind at the hydrophobic patch of ubiquitin, but matches changes seen on binding to the E2 conjugating enzyme. We propose that Q41N is a model for structural changes required for ubiquitin conjugation.

【研究の背景と目的】

水溶液中で蛋白質は、天然状態から変性状態までの広い構造空間を構造変化し、熱力学的平衡状態にある。特に天然状態よりわずかにギブスエネルギーが高い状態(高エネルギー状態)との構造揺らぎは、分子認識など蛋白質の機能発現に関わっているといわれている。高圧力NMR法は、存在比が低く観測するのが困難な高エネルギー状態の分布率を、加圧により分布率を増加することで解析する方法である。

高圧力NMR法により、ユビキチンは2つの中間状態(準安定構造 N_2, 局所変性構造 I)の存在が明らかになった。N_2状態は、ユビキチンのα_1-helixとβ_3-strand, β_5−strandの配向が変化し、関連酵素群(E1,E2)との相互作用部位が開いた構造をしていることが、

高エネルギー状態, 立体構造解析

○きたざわ そういちろう, かめだ ともし, やぎ まほ, すがせ けんじ, にっきー ばくすたー, かとう こういち, うぃりあむ まいける, きたはら りょう

3000気圧下における立体構造解析により分かっている。面白いことに高ギブスエネルギー状態はE1-E2-E3カスケードを有するホモログ群で進化的に保存されていることがわかっており、ユビキチンの機能発現における重要性が示唆されている。本研究では高エネルギー状態の構造転移に関わる相互作用を特定し、高エネルギー状態を模倣した変異体の作成とその立体構造解析・ダイナミクス・安定性の解明に成功した。

【方法】

最安定なN_1構造（1 bar）と準安定なN_2構造（3000 bar）の構造比較により構造転移に関わる相互作用を特定し、これら相互作用を減弱した変異体(K11A,E34A,Q41A,Q41N)を作成した。最もN_2状態へ平衡が傾いたQ41N変異体について距離情報 (NOE)と角度情報 (RDC, TALOS+) を基に立体構造解析を行い、高圧力NMR法により、N_2状態の分布率を求めた。各種緩和解析(R_1,R_2,hnNOE)により構造転移を明らかにし、水和NMR法 (CLEANEX-PM NMR) により構造安定性について明らかにした。

【結果と考察】

変異体の$^{15}N/^1$ HHSQCスペクトルを測定し、アミノ酸変異による化学シフトの変化と圧力(3000 – 30 bar)による化学シフトの変化の間に相関があることから、アミノ酸変異によってN_2状態の安定化が示唆された。高圧力NMR法により、最も化学シフト変化量の大きいQ41NN_2状態の分布率は約70%であることが示された。また、変異による化学シフト変化は、ほとんどの残基でK11≈E34A<<Q41A<Q41Nであり、Q41とI36COの水素結合がN_1構造の安定化に大きな寄与があることが分かった。Q41Nについて、距離情報(NOE)と角度情報(RDC, TALOS+)を基に精密な立体構造解析を行った。Q41Nは、3000気圧下で決定されたWTN_2構造と同様に、α_1-helix, following loop, β_3-strand, β_5-strandの配向が変化していることが分かった。また主成分解析から、N_2構造は、これまでに報告されているユビキチンのnative sate ensemble構造(DER, EROS, ERNST)を逸脱した新しいコンフォメーションであることが分かった。このQ41Nの立体構造において、Ubiquitin Interacting Motif (UIM)を含む多くのubiquitinリガンドの共通の相互作用部位である疎水性パッチ(L8-I44-V70)の構造変化は見られなかった。

さらにQ41Nの緩和解析からα_1-helix, following loop, β_3-strand,β_5-strand 領域でR_2値に増加が観測された。このus-ms域の構造揺らぎは、高圧力下でも観測されており、緩和解析からもN_1-N_2間の構造転移が増幅されたことが分かった。構造変化が大きいI36周辺部分はE2との相互作用面であることから、N_1-N_2構造揺らぎはE2との相互作用に必要な相互作用の可能性がある。

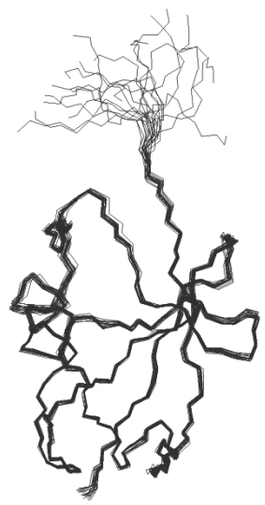


Fig.1. Solution structure of Q41N

P21

PDZドメインに群特異的に相互作用する低分子化合物の探索

○天野剛志[1,2], 合田名都子[1,2], 岩谷奈央子[1], 木下賢吾[2,3,4], 太田元規[2,5], 廣明秀一[1,2]
[1]名大・院・創薬科学
[2]JST・BIRD
[3]東北大・院・情報科学
[4]東北大・加齢研
[5]名大・院・情報科学

Screening of small molecules specifically interacting with PDZ domains

○Takeshi Tenno[1,2], Natsuko Goda[1,2], Naoko Iwaya[1], Kengo Kinoshita[2,3,4], Motonori Ota[2,5], Hidekazu Hiroaki[1,2]
[1]Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya University, Aichi, Japan.
[2]JST BIRD
[3]Graduate School of Information Sciences, Tohoku University, Miyagi, Japan.
[4]Institute of Development, Aging and Cancer, Tohoku University, Miyagi, Japan.
[5]Graduate School of Information Science, Nagoya University, Aichi, Japan

We searched protein surfaces similar to known interfaces between protein and small molecule by using eF-seek program. As a result, 2095 interaction models were obtained from 709 model structures. To verify the result, 14 PDZ domains and 10 small molecules were selected from interaction models and analyzed their interaction by NMR titration experiments.

11 of 14 PDZ domains provided highly dispersed spectra. Of them, 9 and 11 spectra were observed chemical shift changes by the addition of water-soluble and DMSO-soluble molecules, respectively. Moreover, 3 of 10 small molecules interacted with multiple PDZ domains, when each molecule was mixed with 5 PDZ domains. We will discuss important residues of PDZ domain to interact with small molecules.

我々は、相同性検索や立体構造予測プログラムを実装し、アミノ酸配列から立体構造や分子機能について自動アノテーションを行うシステムを構築した。そして、そのシステムを用いてヒトゲノム由来のすべてのアミノ酸配列について解析を行い、結果をSAHG（Structural Atlas of Human Proteins ; http://bird.cbrc.jp/sahg/）データベースにて公開している。

SAHGデータベース構築の一環として、予測した立体構造モデルをeF-seekプログラムにかけて、既知の低分子化合物-タンパク質複合体の相互作用面と類似した表面をもつ、すなわち、低分子化合物と結合する可能性があるタンパク質を探索した。

PDZドメイン，低分子化合物，群特異性

○ てんのたけし，ごうだなつこ， いわやなおこ， きのしたけんご、 おおたもとのり、ひろあきひでかず

その結果、709 個のモデル構造から 2095 組の相互作用モデルが得られた。この探索結果を検証するために、2095 組の相互作用モデルから 14 種類の PDZ（PSD-95/Dlg/ZO-1）ドメインと 10 種類の低分子化合物を選択し、相互作用の有無を NMR により検証した。

10 種類の化合物を水溶性の化合物（6 種類）と DMSO 可溶性の化合物（4 種類）に二分して、^{15}N ラベルを導入した PDZ ドメインとそれぞれ混合して ^{1}H-^{15}N 相関スペクトルを測定した。14 種類の PDZ ドメインのうち 11 種類について、シグナルの分離がよい相関スペクトルが得られた。このうち、水溶性の化合物では 9 種類、DMSO 可溶性の化合物については 11 種類の PDZ ドメインにおいてシグナルの変化が観察された。

次に、どの化合物が相互作用しているのか調べるために、5 種類の PDZ ドメイン（rhophilin2、harmonin PDZ2, 3、InaDL PDZ6, 8）について、各化合物（10 種類）との滴定実験を行った。50 組の組み合わせのうち、eF-seek により相互作用を予測した組み合わせは 5 組あったが、この中の 2 組において相互作用を確認した。驚いたことに、3 種類の化合物について複数の PDZ ドメインと相互作用していることが明らかとなり、全く予想外の結果が得られた。

3 種類の化合物が PDZ ドメイン群特異的に相互作用していたので、当研究室で帰属情報をもっているマウス ZO-1 の PDZ1 ドメインを使って化合物の相互作用部位を調べた。その結果、いずれの化合物についてもβ–ストランド 2 とα–ヘリックスの間のポケット周辺で相互作用していることが明らかとなった。

このポケットに位置する残基を各 PDZ ドメインで比較すると、α-ヘリックスの中央部に疎水性残基、カルボキシ末端側に塩基性残基が保存されていた。したがって、これら化合物との相互作用に重要な残基はこの 2 残基であると予想し、マウス ZO-1 PDZ1 ドメインに変異を導入したタンパク質を用いて NMR 滴定実験を行った。その結果、化合物を加えてもシグナルの変化はほとんど観察されなかったことから、PDZ ドメインと化合物との相互作用にはα-ヘリックスに位置するこれら残基との疎水性相互作用と静電的相互作用が重要であると考えられる。

今回の検証実験においては、予測の精度としてはまだ改善の余地を残しているものの、従来予想もされなかった組み合わせの低分子化合物-タンパク質間相互作用を新たに見いだすことができた。同定した PDZ ドメイン上の低分子化合物の相互作用部位は、他のタンパク質との主要な相互作用部位でもあり、多くの場合、相互作用パートナーのカルボキシ末端を認識して相互作用している（Fig.）。PDZ ドメインはヒトの 150 以上のタンパク質において、250 以上確認されており、細胞内でタンパク質-タンパク質相互作用の足場として機能している。PDZ ドメインに相互作用する低分子化合物が PDZ ドメインをもつタンパク質にどのような影響を与えるか、非常に興味深い。

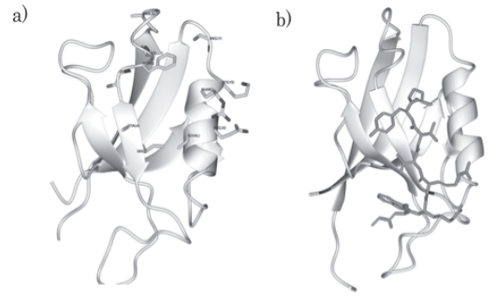


Fig. interfaces on ZO-1 PDZ1 domain
a) residues observed NMR signal change by titration of small compounds
b) PDZ-peptide complex (PDB: 2H2B)

P22

メチル基選択的プロトン標識を用いたHeLa細胞中のin-cell NMR解析

○晴桧 貴洋[1]，濱津 順平[1]，Dambarudhar Shiba Sanker Hembram[1]，
池谷 鉄兵[1]，三島 正規[1]，白川 昌宏[2]，伊藤 隆[1]
([1]首都大院・理工，[2]京大院・工)

Methyl group as probes for proteins in NMR experiments in HeLa cells

○Takahiro Haremaki[1], Junpei Hamatsu[1], Dambarudhar Shiba Sanker Hembram[1],
Teppei Ikeya[1], Masaki Mishima[1], Masahiro Shirakawa[2] and Yutaka Ito[1]
[1]Department of Chemistry., Tokyo Metropolitan University
[2]Deptartment of Molecular Engineering, Kyoto University

In-cell NMR spectroscopy of human cultured cells have the potential for providing a powerful tool not only for biological but also for medical and pharmaceutical researches. However, the low intracellular concentration of target proteins prevents us from performing detailed NMR analyses such as resonance assignments and structure determination.

Selective $^{1}H/^{13}C$-labelling at methyl groups has proved to be very effective for protein structure determination in living *E. coli* cells. In this study, we used human calbindin-D_{9k} as a model system, and introduced selective methyl-protonation to in-cell NMR in HeLa cells. The advantage of this approach in collecting structural information will be discussed.

【序】

In-cell NMR[1]は，生細胞内蛋白質の動態を原子分解能で観測可能な手法として近年開発され注目されている．当研究室ではin-cell NMRを用いて，高度好熱菌TTHA1718遺伝子産物[2]および連鎖球菌protin G B1ドメインの生きた大腸菌細胞内における立体構造決定に成功している．

In-cell NMRは，ドラッグスクリーニング，ドラッグデリバリーシステムなどの医学・薬学分野への適用が期待されるため，高等真核生物由来の細胞におけるin-cell NMR測定系の確立が求められている．これまでに，アフリカツメガエル卵母細胞[3,4]やヒトやサル由来の培養細胞[5,6]を用いてNMR測定を行った例が報告されているが，測定感度やサンプル寿命の短さの問題から，高次構造決定を行うために十分な構造情報の取得には至っていない．

本研究では，大腸菌のin-cell NMR解析で極めて有用であったメチル基選択的プロトン標識に注目し，標識蛋白質をHeLa細胞内に導入してin-cell NMR測定を行うことで，有用性の検証を試みた．

【実験，結果および今後の展望】

京大の猪俣らが報告した方法では，HeLa細胞を用いてin-cell NMRを測定するために，細胞膜透過ペプチド(cell-penetrating peptides，CPP)と呼ばれる塩基性ペプチドを，標的蛋白質と化学的あるいは遺伝子工学的に結合させることで，細胞内に標的蛋白質を導入している．今回は，ヒトcalbindin-D_{9k}(75 a.a.)蛋白質をモデル試料として用い，CPPとジスルフィド結合させるためにC末端に新たにシステイン残基を変異導入した．大腸菌内の大量発現系を用いて調製した^{15}N標識calbindin-D_{9k}にCPPを結合させた後，HeLa細胞中へと導入して，2D ^{1}H-^{15}N SOFAST-HMQCスペクトルの測定を行った．測定の際には間接観測軸(^{15}N軸)にnonlinear samplingを適用し，1次元のmaximum entropyの手法を用いてスペクトルを再構築することで，細胞の生存時間の限界である3時間以内で良好なスペクトルを得ることに成功した．Figure1には，生きたHeLa細胞内のcalbindin-D_{9k}と，単離精製したcalbindin-D_{9k}のスペクトルを比較して示した．

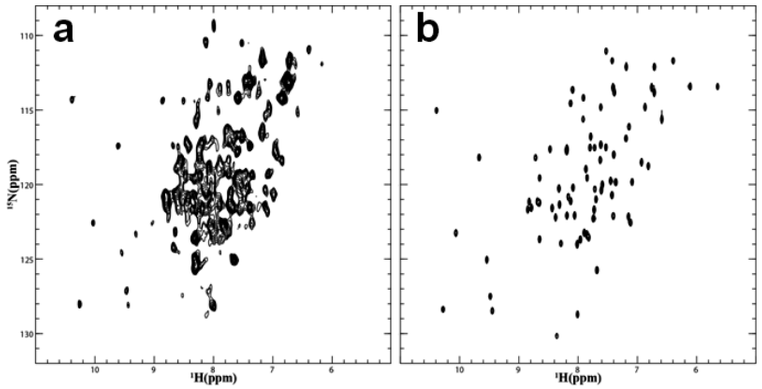


Figure1. The 2D ^{1}H-^{15}N SOFAST-HMQC spectra of calbindin-D_{9k} in living HeLa cells (**a**) and *in vitro* (**b**). The indirectly acquired dimension (^{15}N) was measured with employing a nonlinear sampling scheme, and processed with 1D maximum entropy using Azara v2.8 software (W. Boucher, www.bio.cam.ac.uk/azara).

次に，HeLa細胞中での2D ^{1}H-^{13}C HMQC測定を行うために，Ile残基のδ位のメチル基，およびLeu/Val残基の2つのメチル基のうち一方のメチル基が$^{1}H/^{13}C$標識され，他が$^{2}H/^{12}C$標識されているcalbindin-D_{9k}を調製した．この試料を用いて，まずは*in vitro*における2D ^{1}H-^{13}C HMQC測定を行い，良好なスペクトルを得た(Figure2)．現在このメチル基選択的プロトン標識試料を用いてin-cell NMR測定を行なっており，HeLa細胞中における，^{1}H-^{13}C HMQC測定とメチル基間のNOE由来の距離情報の取得を試みる予定である．

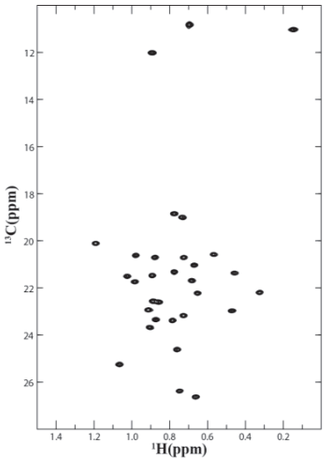


Figure 2. The 2D ^{1}H-^{13}C HMQC spectrum of ILV methyl$^{1}H/^{13}C$-labelled (^{2}H-background) calbindin- D_{9k} *in vitro*.

【参考文献】

(1) Serber, Z. et al. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 2446-2447 (2001).
(2) Sakakibara, D. et al. *Nature* **458**, 102-105 (2009).
(3) Selenco, P. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 11904-11909 (2006).
(4) Sakai, T. et al. *J. Biomol. NMR* **36**, 179-188 (2006).
(5) Inomata, K. et al. *Nature* **458**, 106-109 (2009).
(6) Ogino, S. et al. *J. Am. Chem.Soc.* **131**, 10834-10835 (2009).

in-cell NMR, protein structure, selective methyl protonation

○はれまきたかひろ，はまつじゅんぺい，だんばるだるしばさんかるへんぶらむ，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

P23

ミミズ由来R型レクチンC末端ドメインの異なったラクトース結合状態での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・食総研
[2]産総研・糖鎖医工学研究センター
[3]産総研・幹細胞工学研究センター

NMR analysis of the C-terminal domain of R-type lectin from earthworm in different lactose-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]Research Center for Medical Glycoscience, 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.

The C-terminal domain of an R-type 29-kDa lectin (EW29Ch) from the earthworm *Lumbricus terrestris* has two sugar-binding sites (α and γ). Our recent paper[1] showed that the Kd value of the α sugar-binding site were approximated to 0.01-0.07mM for lactose, whereas that of the γ sugar-binding site was 2.66mM for lactose. Although the crystal structure of the complex between EW29Ch and lactose was reported, it is still unclear why the α sugar-binding site binds to lactose more strongly. In the present study, the NMR relaxation experiments for the backbone of EW29Ch in the sugar-free state and in the three lactose-bound states ([Protein]/[Sugar]=1/1, 1/8, and 1/80) showed that the differences in the conformational exchange between subdomains α and γ may be associated with the difference of the sugar-binding modes between the two sugar-binding sites.

分子量が29-kDaのミミズ由来レクチン（EW29）は、２７％アミノ酸配列が同一の２つのドメインからなり、さらに、そのアミノ酸配列中に“Gly-X-X-X-Gln-X-Trp”と言うモチーフ構造を持つ[2]。このモチーフ構造は、これまで多くの糖認識タンパク質で発見されており、R-typeレクチンファミリーを形成している。さらに、このレクチンの特徴として、R-typeレクチンファミリーに属する他のタンデムリピートタンパク質がドメイン毎に一つの糖結合部位しか持たないことから単独のドメインでは赤血球凝集活性を持たないと考えられているが、EW29においてC末端ドメイン単独(EW29Ch)でもEW29に比べ10倍程度低い活性ではあるが赤血球凝集活性を持つことが知られている。また、最近EW29 Chと糖との結晶構造が解析され、分子内に2つの糖結合部位（α結合部位とγ結合部位）が存在することがわかった[3]。さらに、我々は最近、EW29Chと各種糖との相互作用について、NMR滴定実験法を用いて解析を行い、α結合部位がγ結合部位に比べて約100倍高い糖結合能をもつことを報告した[1]。今回、我々は、遊離状態での^{15}Nラベル体EW29Ch、及びラクトースとの結合状態として、[^{15}Nラベル体EW29Ch]/[非ラベル体ラクトース]＝１/１、１/８、１/８０の各試料を調製した。それらの試料を用いて、Bruker社製Avance600MHzにより、25℃で^{15}N 核緩和（R_1, R_2, 及び{^{1}H}-^{15}N NOE）の測定を行い、遊離状態及びラクトースとの結合状態におけるEW29Chの分子内運動性の解析を行ったので、その結果について報告する。

Lectin, Sugar, Interaction

○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

［結果と考察］
X線結晶構造解析での糖との複合体解析において、２つの糖結合部位（αとγ）での糖との相互作用についてほとんど同じ相互作用を示すことが報告されているにも関わらず、我々のNMR滴定実験においてα結合部位がγ結合部位に比べラクトースに対して約100倍高い結合能を持つことから、その結合能の違いの解明の一環として、今回、遊離状態及びラクトース結合状態におけるそれぞれの分子内運動性の解析を、^{15}N核の緩和測定法を用いて行った。特に、今回、α結合部位とγ結合部位での分子内運動性の違いをより詳細に解析するため、[EW29Ch]/[ラクトース]のモル比を１/１、１/８、１/８０で調製した試料について、それぞれ測定を行った。その結果、{^{1}H}-^{15}N NOE及びR_1のデータにおいて、遊離状態及びラクトース結合状態で大きな違いが見られなかった。一方、R_2においては、α結合部位においてのみ、遊離状態とラクトース結合状態間で顕著な違いが見られた。これらの結果より、遊離状態とラクトース結合状態間での分子内運動性の違いは、α結合部位のみで見られること、さらに、その違いは、Rex（化学交換の速度定数）によるものと示唆された。

次に、残余双極子カップリングを用いて、遊離状態でのEW29ChのNMR構造を精密化し、すでに報告されているラクトース－EW29Chの複合体結晶構造と比較した。その結果、γ結合部位においては、ラクトースとの結合により、ループ領域以外ほとんど構造変化が見られなかったが、α結合部位においては、糖結合近傍領域でも有意な構造変化が見られた。

以上の結果から、２つの糖結合部位（α及びγ）の糖結合活性の違いは、遊離状態とラクトース結合状態間での構造変化及び分子内運動性の違いが関係していることが示唆された。

References

1. Hemmi, H., Kuno, A., Ito, S., Suzuki, R., Hasegawa, T., and Hirabayashi, J. (2009) FEBS J. 276, 2095-2105.
2. Hirabayashi, J., Dutta, S. K., and Kasai, K. (1998) J. Biol. Chem. 273, 14450-14460.
3. Suzuki, R., Kuno, A., Hasegawa, T., Hirabayashi, J., Kasai, K., Momma, M., and Fujimoto, Z. (2009) Acta Crystallogr D 65, 49-57.

P24

リジン ^{13}C メチル化法のタンパク質・タンパク質相互作用解析への適用

○服部良一[1]、古板恭子[1]、大木出[2]、池上貴久[1]、深田はるみ[3]、白川昌宏[4]、藤原敏道[1]、児嶋長次郎[1,2]
[1] 大阪大学 蛋白質研究所
[2] 奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科
[3] 大阪府立大学大学院 生命環境科学研究科
[4] 京都大学大学院 工学研究科

Utilization of lysine ^{13}C-methylation NMR for protein-protein interaction studies

○Yoshikazu Hattori[1], Kyoko Furuita[1], Izuru Ohki[2], Takahisa Ikegami[1], Harumi Fukada[3], Masahiro Shirakawa[4], Toshimichi Fujiwara[1], Chojiro Kojima[1,2]
[1]*Insititute for Protein Research, Osaka University*
[2]*Graduate School of Biological Sciences, Nara Institute of Science and Technology (NAIST)*
[3]*Graduate School of Life and Environmental Sciences, Osaka Prefecture University*
[4]*Graduate School of Engineering, Kyoto University*

The reductive ^{13}C-methylation of the amino group of the lysine side-chain by ^{13}C-formaldehyde is a post-modification and is applicable to most proteins since this chemical modification specifically and quickly proceeds under mild conditions. ^{13}C-methylation has been used for NMR to study the interactions between the methylated proteins and various molecules, such as small ligands, nucleic acids and peptides. Here 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 using chemical-shift perturbation experiments via the ^{1}H-^{13}C HSQC spectra of the ^{13}C-methylated-lysine methyl groups.

タンパク質の化学修飾法は、非標識タンパク質へ安定同位体標識を導入する上で容易な方法である。リジン残基の側鎖アミノ基は、還元的環境下でホルムアルデヒドと反応し、メチル基が付加する。この反応に ^{13}C 標識されたホルムアルデヒドを用いると、^{13}C メチル基を導入することができる（Figure 1）。

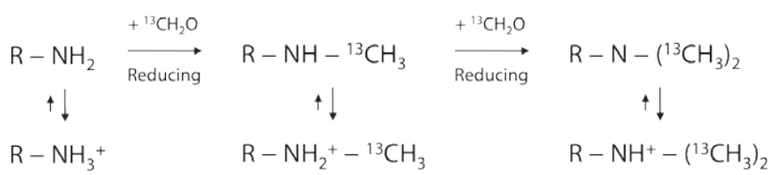


Figure 1 ^{13}C-methylation of the amino group.

タンパク質・タンパク質相互作用、メチル化リジン、低濃度サンプル

○はっとりよしかず、ふるいたきょうこ、おおきいずる、いけがみたかひさ、ふかだはるみ、しらかわまさひろ、ふじわらとしみち、こじまちょうじろう

還元的メチル化として知られるこの化学修飾法は、例えば pH 6.8、4℃および 12 時間という穏やかな条件で進行するため、ほとんどのタンパク質に適用が可能である。^{13}C メチル化されたタンパク質は、NMR 法によって、低分子リガンド、核酸およびペプチドといったさまざまな分子との相互作用が解析されてきた。本研究では、リジン ^{13}C メチル化法を、タンパク質・タンパク質相互作用解析へ適用し、その有効性を明らかにした。

ユビキチンのリジンに導入された ^{13}C メチル基を、^{1}H-^{13}C HSQC 測定により検出した。帰属はリジンをアルギニンに置換した変異体を用いて完了した。^{13}C メチル化ユビキチンに、ユビキチンの C 末端加水分解酵素として知られる YUH1 を添加すると、特異的なスペクトル変化が観測された。有意な化学シフト変化を示したリジン残基の側鎖アミノ基は、ユビキチン YUH1 複合体の結晶構造の相互作用面に位置していた。さらに、YUH1 の添加量とリジンに導入された ^{13}C メチル基の化学シフト変化量の解析から、両者の解離定数が 5.6 μM として算出され、ITC での測定値 5.7 μM と良く一致した。また、ユビキチンと YUH1 の相互作用は、ITC 測定および ^{1}H-^{15}N HSQC 測定による解析から、メチル化によってほとんど変化しないことが示された。

ユビキチン結合タンパク質 Dsk2 および p62 のユビキチン結合（UBA）ドメインを ^{13}C メチル化ユビキチンに添加すると、YUH1 と同様に相互作用に関与する残基が有意な化学シフト変化を示した。YUH1、Dsk2 および p62 について、^{13}C メチル化ユビキチンとのタンパク質・タンパク質相互作用にともなうリジン ^{13}C メチル基の化学シフト変化と主鎖 ^{15}N アミド基の化学シフト変化を比較したところ、リジン ^{13}C メチル基は主鎖 ^{15}N アミド基では検出できないタンパク質側鎖間の相互作用による化学シフト変化を示すことが明らかとなった。リジン側鎖は主鎖から離れて溶媒側に露出している場合がほとんどであり、リジンに導入された ^{13}C メチル基はタンパク質・タンパク質相互作用を検出するための優れたプローブであるといえる。

メチル基は高感度な NMR プローブとして知られており、リジン ^{13}C メチル基についても同様の高感度測定が期待される。そこで極めて低濃度（0.2 μM）の ^{13}C メチル化ユビキチンについて YUH1 結合によるスペクトル変化の検出を試み、950 MHz NMR を用いたおよそ 10 時間の測定で検出に成功した（Figure 2）。

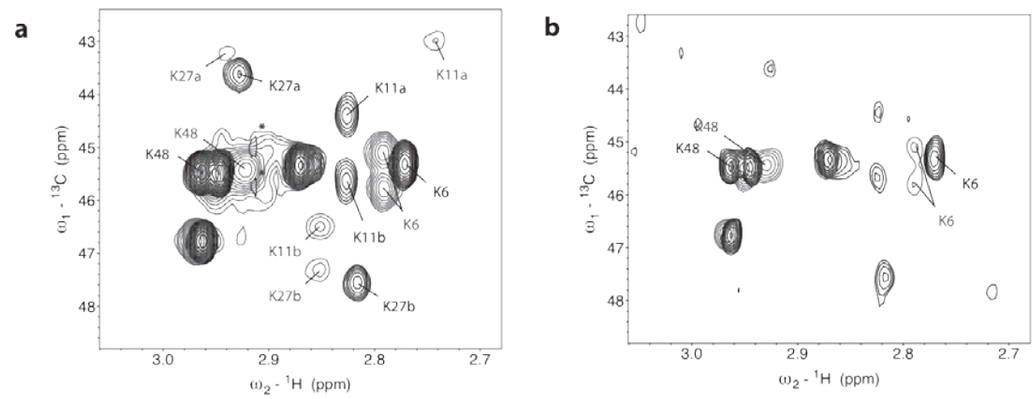


Figure 2 (a) The overlay of the ^{1}H-^{13}C HSQC spectra of 2 μM methylated ubiquitin (black) and methylated-ubiquitin with 10-fold YUH1 (gray). * indicates K29. (b) Same as (a) with 0.2 μM methylated-ubiquitin.

P25

ヒトストマチンSPFHドメインの溶液構造とその多量体形成に関する研究

後藤俊介[1,2]，岩谷奈央子[1,2]，亀川亜希子[3]，合田名都子[1,2]，濱田大三[1]，天野剛志[1,2]，藤吉好則[3]，○廣明秀一[1,2,4]

[1] 神戸大学医学研究科構造生物学分野

[2] 名古屋大学創薬科学研究科構造分子薬理学分野

[3] 名古屋大学細胞生理学研究センター

[4] 神戸大学G-COE統合的膜生物学の国際教育研究拠点

Study of the solution structure of human stomatin SPFH domain and its mechanism of oligomer formation.

Shunsuke Goto[1,2], Naoko Iwaya[1,2], Akiko Kamegawa[3], Natsuko Goda[1,2], Daizo Hamada[1], Takeshi Tenno[1,2], Yoshinori Fujiyoshi[3] and ○Hidekazu Hiroaki[1]

[1]Divison of Structural Biology, Graduate School of Medicine, Kobe University, Kobe, Fukuoka, Japan.

[2]Laboratory of Structural Molecular Pharmacology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya University, Nagoya, Japan.

[3]Laboratory of Structural Molecular Pharmacology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya University, Nagoya, Japan.

[4]Global Center for Education and Research in Integrative Membrane Biology, Kobe University, Kobe, Japan.

Stomatin, a 288-residue membrane-anchored protein, is a component of the membrane skeleton of red blood cells (RBCs). Stomatin has a stomatin/prohibitin/flotillin/HflK (SPFH) domain at the center of its polypeptide chain. SPFH domain proteins are known to oligomerize at membranes and have been implicated in ion channel as well as glucose transporter regulation. Some of SPFH domains are known to form ring-shaped oligomers. Here we report the NMR solution structure of the SPFH domain of human stomatin [hSTOM(SPFH)] determined by a standard multi-dimensional NMR method. During the course of the study, we found that hSTOM(SPFH) forms insoluble fibrous polymers under some artificial conditions. This finding may clue the mechanism of protein oligomerization and the molecular function of the SPFH domains.

膜骨格とは，生体膜表面で重合して膜の形状ならびに機能を制御するための骨格としての役割を持つタンパク質の総称である．例えば，クラスリン被覆ベシクルにはクラスリンが，カベオラにはカベオリンが，リサイクルエンドソームなどの筒状エンドソームにはF-BARドメインタンパク質が，後期エンドソーム膜陥入部位やウイルスの出芽部位にはESCRT-III複合体

SPFH domain, Membrane skeleton, Fiber formation

ごとうしゅんすけ，いわやなおこ，かめがわあきこ，ごうだなつこ，はまだいぞう，てんのたけし，ふじよしよしのり，○ひろあきひでかず

が，というように，多くの特徴的な膜構造には特徴的なタンパク質の重合体が，その構造と機能維持にかかわっている．赤血球膜において，その膜の裏打ち骨格成分としては，アクチンの他にスペクトリン・アンキリン・ストマチンなどが知られている．このうちストマチンについては，タンパク質が遺伝性貧血の一である有口赤血球症の患者の赤血球では著しく減少していることが知られているものの，構造科学的にどのように膜構造の維持に関わっているのかは研究されていない．我々は，これまでにストマチンの古細菌のホモログの物理化学的研究を行い，ストマチンの立体構造に隠されていた膜骨格として機能するための基本的な分子機構（＝ストマチンドメインの多量体形成機構）を解明した（文献1）．古細菌由来ストマチンのSPFHドメイン(PH0470(SPFH))は，大腸菌を用いた試料調製中に，単量体の他に，2量体～5量体の熱的に準安定なオリゴマーを生じ，また，電子顕微鏡で観測可能なサイズのリング状のオリゴマーを生ずる．今回，我々らは，ヒトストマチンの分子中央部にあるSPFHドメイン，hSTOM(SPFH)について，溶液NMRの方法を用いて，その単量体の立体構造を決定した．その過程で，hSTOM(SPFH)が再溶解しにくい線維状の凝集体を形成することを見だしたので報告する．

【方法】

（試料） ^{13}C, ^{15}Nで標識した，ストマチンSPFHドメインは，大腸菌を安定同位体を含むM9培地を用いてGST―ストマチン融合タンパク質として発現させた．-80℃で保存されていた菌体を，50mM Tris-HCl, 150mM NaCl (pH 7.5)を含む緩衝液中で超音波により破砕し，沈殿を遠心分離で取り除いた．上清をDEAE sepharoseを充填したカラムに添加し自然落下にてカラムを通過させ，得られた溶液をGSH sepharoseに吸着させた．タグ部分（GST）とストマチンSPFHドメイン部分を，融合タンパク質を吸着させた樹脂に，スロンビンを添加してリンカー部を切断することで取り除き，その後Benzamidine Sepharose 6B（スロンビン阻害剤）を充填したカラムに通すことで混入するプロテアーゼを除去した．試料を濃縮後，ゲル濾過クロマトグラフィーを行った．該当するフラクションを，遠心濃縮装置MicroSep (Pall社)を用いて濃縮した．最終的に，ストマチンSPFHドメインの濃度が0.33mMになるまで濃縮を行い，15mlチューブに入れ凍結乾燥した．

（NMR測定と構造決定） NMR信号の帰属は通常の三重共鳴NMR法に準じて行った．具体的には，主鎖アミドグループの帰属については，^{15}N-HSQC, CBCACONH, HNCACB，HNCA, HNCOCA，HNCO, HNCACOを用いて主鎖シグナルを帰属し，CCCONH, HCCCONH, HBHACONH, HCCH-TOCSYを用いて側鎖シグナルを帰属した．立体構造計算のための水素結合情報の取得のためには，後述する理由のため凍結乾燥を利用したH/D交換法が適用できなかった．そこで，混合時間500msのCLEANEX-FHSQCを用いて易交換性のアミドプロトンをまず同定した．次に，難交換性のアミドプロトンの中から，構造計算の途中経過を参考にしながら，二次構造・主鎖NOEネットワークから判断して，水素結合に関与しているアミドプロトンを決定した．スペクトルの解析には，NMRPipeおよびSparkyを用いた．構造計算と精密化はCYANA(2.1)を用いた．現在CNS(1.2)による最終精密化中である．

（ストマチンSPFHドメインの難溶解性成分の解析） この実験中に，hSTOM(SPFH)の精製品が限外濾過膜濃縮中に過渡的に凝集体をつくることと（図1），凍結乾燥させたhSTOM(SPFH)粉末を再溶解すると，再溶解に時間がかかる（低温では数日）かかることがわかった．PH0470(SPFH)との配列・構造の類似性から，hSTOM(SPFH)の線維形成能を疑い，



図1：限外濾過濃縮中に生じるhSTOM(SPFH)の凝集体

凍結乾燥試料を緩衝液で懸濁し，ネガティブステイン後，透過型電子顕微鏡で観察を行った．また，凍結乾燥試料を再溶解させた試料のゲル濾過による会合状態の観察や，再溶解途中の上清成分についてのグルタルアルデヒドによる化学架橋実験も行った．

【結果と考察】

（構造決定と構造の比較）ヒトストマチンのSPFHドメインの立体構造は以前に我々が決定した古細菌由来ストマチンSPFHドメインPH0471(SPFH)の溶液構造，ならびに共同研究者らが決定した古細菌のもう一つのストマチンドメインパラログ由来PH1511(SPFH)の結晶構造とよく類似していた（図2）．SPFHドメインは，3本のα-helix部分と3本のβ-sheet部分とが2本のループをヒンジとして向かい合わさっている，α/β-foldの形をしていた．3本のαヘリックスはそれぞれα1 (58-66)，α2 (71-74)，α3 (78-91)，であり，3本のβシートはβ1 (10-12)，β2 (29-36)，β3 (99-108)，であった．これとは別に，310-helix (94-96)も見られた．図には示さないが，SPFHドメインの表面には，α1-helixを中心とする領域に疎水性のパッチが見られる一方で，β1，2からなるsheetを中心とする領域は負電荷を帯びていて親水性であった．ストマチンのSPFH ドメインは，膜貫通部位に続いた部分に存在することから細胞膜のすぐ近くに存在すると考えられており，疎水性の部分を細胞膜側に，負電荷を帯びて親水性である部分を細胞質側に向けて存在していることが示唆された．

（マウスストマチン結晶構造との比較） 本研究の最中に，Daumke(独・マックスデルブリュック研)のグループがマウスストマチン由来SPFHドメインの二量体ならびに三量体の結晶構造を報告した（Brand *et al., 2012, EMBO J.*）．その論文によれば，mSTOM(SPFH)はC末端にほどちかい3番目のβシートの末端で二量体を形成しており，そこでは分子間の水素結合が観測されている．また，論文においては，β1とα1の間に疎水的ポケットのような構造が観測されていた．結晶中では，SPFHドメインのコンストラクトのN末端部分が隣接する分子の，この疎水ポケットに入りこんでいる．そのため，著者らは標的分子との分子間相互作用をミミックしていると推測している．Daumkeらは， mSTOM(SPFH)の二量体・多量体の存在の証拠として，ゲル濾過の溶出位置が，分子量から予測されている位置よりもVoid側に偏っていることを挙げている．しかし，我々の試料の精製過程では，Daumkeらよりも高分解能のゲル濾過を使用しているが，少なくともpH 7.5では，理論的に単量体に近い位置でのピークが主成分として観測された．一方，我々の決定した溶液構造においては， (1) C末端部分での分子間水素結合は観測されていない，(2) 溶液中で単量体：二量体の平衡を示すようなスペクトルの挙動もなかった， (3) 前述の疎水ポケットは閉じた構造であり，ポケットそのものが存在しなかった．このことは，溶液中の単量体構造と結晶中の二量体構造においての特筆すべき差異として，興味深い．

（溶液中の会合状態）hSTOM(SPFH)試料を遠心式限外濾過膜で濃縮すると，濃縮中にフィルム状の重合体が形成されて沈殿した．そのまま濃縮を中断し，沈殿を懸濁させると，ゆっくりと再溶解することを見出した．この，沈殿→再溶解を経た^{15}N標識ストマチンSPFHドメインの試料と，精製後濃縮操作を行わなかった試料の，HSQCスペクトルが一致したことから，ここで形成される沈殿は，可逆的な一過性のものであることがわかった．

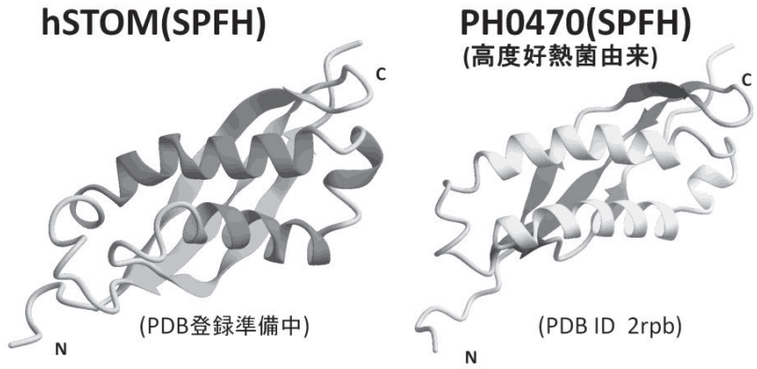


図2：hSTOM(SPFH)（左）の溶液構造。右は、古細菌*P. horikoshii* PH0470由来SPFHドメインの溶液構造。両者のアミノ酸相同性は59%である。

また，凍結乾燥→再溶解を行った際に，試料はゆっくりとしか溶解しない．^{15}N標識ストマチンSPFHドメインの試料について，凍結乾燥→再溶解を経たのち測定したHSQCスペクトルは，その操作を行っていない単量体のスペクトルと一致した．すなわち，線維が溶解したあとにできてくるものは，正しくフォールディングしたhSTOM(SPFH)であることがわかった．

そこで，ゲル濾過により単量体の分子量に相当する画分のみを集め，凍結乾燥→再溶解した試料を再びゲル濾過を行うと，1%以下とごくわずかではあるが，2量体の分子量に相当するhSTOM(SPFH)を観測することができた．一方で，凍結乾燥→再溶解した試料の上清を，化学架橋実験で解析したところ，2量体，3量体が多く（併せて全体の5割以上）含まれていた．しかしこの結果は，大部分が単量体として溶出されるというゲル濾過の結果とは矛盾する．

（電子顕微鏡解析） 凍結乾燥線維を再溶解した直後のサンプル上清を電子顕微鏡で観察したところ，針のような線維状のものがたくさん見られた．これらの線維は，長さも太さもまちまちではあるが，その微細構造には細い線維が束ないし薄いシート状になっている様子が観測された．その後，この溶液は，見かけ上は1日で9割以上が溶解したように見えたが，上清には，電子顕微鏡で観察可能な線維上のものがまだ残っていた．その線維は，時間経過とともに減っていった．一方，粒系の小さい不定形のアグリゲーション状の粒子はむしろ増えた．

（ドメインスワップオリゴマー形成の可能性） 我々は、Daumkeらが示した表面接触型の二量体は、化学架橋実験で見られた一過性のものであると考えている。一方、ゲル濾過でも単離可能なほど寿命の長い、別の種類の二量体も存在していることを明らかにした。後者は、PH0470(SPFH)に見られたのと同じ、ドメインスワップによるものであると考えられる。

（謝辞） 本研究の中心部分を成すNMR解析と構造計算を推進してくれた神戸大学医学部学生，鶴田賀之氏に感謝する．

（文献）

1. Kuwahara Y, Unzai S, Nagata T, Hiroaki Y, Yokoyama H, Matsui I, Ikegami T, Fujiyoshi Y, Hiroaki H. Unusual thermal disassembly of the SPFH domain oligomer from Pyrococcus horikoshii. Biophys J. 2009; 97(7):2034-2043.
2. Tsuruta T., Goda N., Umetsu Y., Iwaya N., Kuwahara Y., and Hiroaki H. ^{1}H, ^{13}C, and ^{15}N resonance assignment of the SPFH domain of human stomatin.. Biomol NMR Assign. 2012;6(1):23-25.

P26

高圧NMR法によるc-Myb DNA結合ドメインの動的構造に関する研究

○稲葉 理美[1], 前野 覚大[2], 金折 賢二[3], 赤坂 一之[2], 織田 昌幸[1]
[1]京都府立大学・大学院生命環境科学研究科
[2]近畿大学・高圧力蛋白質研究センター
[3]京都工芸繊維大学・大学院工芸科学研究科

High-Pressure NMR Study on Structural Dynamics of c-Myb DNA-Binding Domain

○Satomi Inaba[1], Akihiro Maeno[2], Kenji Kanaori[3], Kazuyuki Akasaka[2], and Masayuki Oda[1]
[1]Graduate School of Life and Environmental Sciences, Kyoto Prefectural University
[2]High Pressure Protein Research Center, Kinki University
[3]Graduate School of Science and Technology, Kyoto Institute of Technology

High-pressure NMR technique is useful for analysis of protein dynamics at atomic resolution. We applied this method to the analysis of cavity-dependent dynamics of c-Myb R2R3 which has a large internal cavity. The previous studies have shown that the cavity is important for its function. In this study, $^{15}N/^{1}H$ HSQC spectra of wild-type R2R3 and its cavity-filling mutant, V103L showed that some of crosspeaks were shifted and disappeared as pressure is increased. The proteins would be still folded but extensively hydrated at 250 MPa. The pressure-dependent changes of wild-type R2R3 were different from those of V103L mutant, indicating that large conformational fluctuations are occurred around the cavity.

≪研究背景・目的≫

本研究対象であるc-Mybは、造血細胞の分化・増殖に関与する転写調節因子で、DNA結合領域（DNA-binding domain: DBD）、正の転写活性化、負の転写制御の3つの機能ドメインを有する、分子量約70kの蛋白質である。DBDはアミノ酸配列の異なる51ないし52残基から成る3つのリピートより構成され（N端側からR1、R2、R3）、このうちR2R3が、P_yAACNG配列を含むDNAと特異的に結合する最小単位である[1]（Figure 1）。各リピートは、3つのTrp残基を中心とした疎水性コアを有し、その立体構造は非常に類似しているが、役割や物性は大きく異なる。中でもR2は、R1やR3と比べ熱安定性が著しく低いことが報告されており、R2のコア内部に存在するキャビティの影響によると考えられている。このキャビティはR2 103位のValに大きく起因し、同キャビティを小さくしたV103L変異体では、熱安定性が増加することが示されている[1-2]。一方、我々の表面プラズモン共鳴バイオセンサーを用いたDNAとの相互解析により、R2R3 V103L変異体は解離速度定数に依存して結合定数が低下することを明らかにした。これらの結果から、DNA結合に伴う大きなコンフォメーション変化が、特異的認識に必須であると考えられる。本研究では、主に高圧NMR法を用いて、機能に重要なキャビティのダイナミクスを解析し、キャビティによる揺らぎの詳細解明を目的とした。

DNA結合蛋白質, 高圧NMR, キャビティ

○いなばさとみ, まえのあきひろ, かなおりけんじ, あかさかかずゆき, おだまさゆき

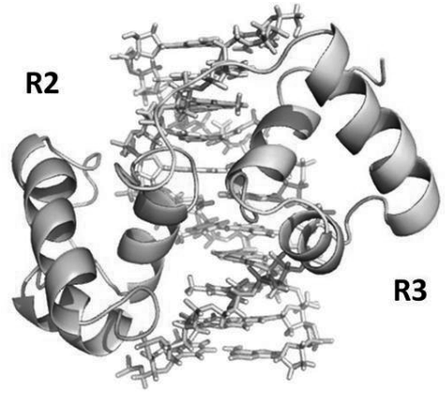


Figure 1　The DNA-complexed structure of the c-Myb DBD (PBD code, 1MSE)

≪方法≫

蛋白質試料として、R2R3に存在する唯一のCys残基をIleに置換したC130Iと、キャビティを小さくしたC130I/V103L変異体の各^{15}Nユニフォームラベル化試料を調製した。なおC130I変異により、安定性やDNA結合能はほぼ変わらないことが報告されており[4]、以降ではこれを標準型としてR2R3*と表記し、C130I/V103L変異体をV103L変異体と表記する。NMR解析として、R2R3*のTOCSY-HSQC、およびNOESY-HSQCを測定し、先行研究の帰属情報を基に、主鎖アミノ酸の帰属を行った。次に、R2R3*、およびV103L変異体のHSQCスペクトルを常圧下で測定し、変異による主鎖構造への影響を解析した。さらに、オンライン型高圧NMR法により、3-250 MPaの圧力下における^{1}H、および$^{15}N/^{1}H$-HSQCスペクトルを測定した。

≪結果・考察≫

R2R3*、およびV103L変異体のNMRスペクトルの比較から、いくつかのクロスピークにおいて化学シフトの違いが認められた。これら各残基は、R2のキャビティ周囲に集中していることが明らかとなった。

次に、3-250 MPaの各圧力下におけるスペクトルを測定したところ、圧力に依存した化学シフトの変化が観測され、さらに興味深いことに、250 MPaにおいてもフォールド構造を有していることが明らかとなった。また、R2R3*とV103L変異体、いずれのスペクトルにおいても、圧力に依存したシグナル強度の減少が認められた。特にR2R3*では、100 MPa付近からいくつかのピークの消失が見られ、これら該当残基は、R2のキャビティ周囲に局在することが明らかとなった。一方、R2を用いた高圧NMRの研究において、高圧下で蛋白質全体が水和しているものの、フォールド構造を有することが報告されており[5]、本研究で得られた結果と併せると、キャビティ周囲の水和が優先的に起こり、全体としてはエネルギー準位の高い別の安定な構造へと転移したと考えられる。さらにキャビティを小さくしたV103L変異体では、この水和の程度が小さく、揺らぎの程度も小さいことが示唆された。これはDNA結合に必要な構造変化を制約する要因と考えられ、高圧下で観測される励起構造が、機能構造である可能性を示唆する。

≪参考文献≫

[1] Ogata *et al*. (1994) *Cell*, 79, 639-648
[2] Ogata *et al*. (1996) *Nature Struct. Biol*., 3, 178-187
[3] Morii *et al*. (1999) *J. Mol. Biol.*, 292, 909-920
[4] Oda *et al*. (1998) *J. Mol. Biol.*, 276, 571-590
[5] Puthepurackal *et al*. (2012) *Biophys. J.*, 102, L08-L10

P27

好熱性水素細菌シトクロムc_{552}におけるヘリックス接触界面への構造化学的摂動がヘム活性部位の電子構造に及ぼす影響の解析

○利根川健[1]、太虎林[1]、逸見光[2]、山本泰彦[1]
[1]筑波大院・数理物質
[2]農研機構・食総研

Structural and Functional Consequences of Perturbations on Interhelical Interaction in *Hydrogenobacter thermophilus* Cytochrome c_{552}

○Ken Tonegawa[1], Hulin Tai[1], Hikaru Hemmi[2], and Yasuhiko Yamamoto[1]
[1]*Department of Chemistry, University of Tsukuba, Tsukuba, Japan*
[2]*National Food Research Institute, National Agriculture and Food Research Organization, Tsukuba, Japan*

H. thermophilus cytochrome c_{552} (HT) is composed of 80 amino acid residues and heme coordinated to axial His14 and Met59 side chains. A unique long polypeptide loop composed of residues at positions 50 – 64, which acts as a “lid” of the heme, is known to be important for functional control of the protein. The long polypeptide loop intervenes two helices, and such a helix-loop-helix structural motif has been known to be conserved in various cytochromes *c*. Ala73 is located at an interface between these two interacting helices of HT. In this study, Ala73 in HT was replaced by Val, Ile, or Leu and then the effects of the amino acid replacements on the protein structure and function have been characterized. We found that although Ala73 residue is relatively far away from the heme, alterations of the interhelical interaction induced by the mutations are transmitted to the heme active site.

序論

好熱性水素細菌（*Hydrogenobacter thermophilus*）由来の電子伝達タンパク質シトクロムc_{552}（HT、Fig. 1）は、アミノ酸80残基と軸配位子としてHis14とMet59の側鎖をもつヘムからなる。ヘムは50‐64番目のアミノ酸の長いペプチドループに覆われており、この長いループはタンパク質の機能の調節に重要であることが知られている。この長いループの両末端にはαヘリックスが存在し、これら2つのヘリックス間の相互作用がこのループの立体構造とその安定性を調節していると考えられている。このヘリックス‐ループ‐ヘリックス構造は様々なシトクロム*c*で保存されており、HTの場合には、Ala73が2つのヘリックスの接触界面に位置している。本研究では、Ala73をVal、Ile、およびLeuに置換して接触界面の構造変化を通してヘリックス間相互作用に摂動を与え、それらの摂動がHTの機能と構造に及ぼす影響を解析した。

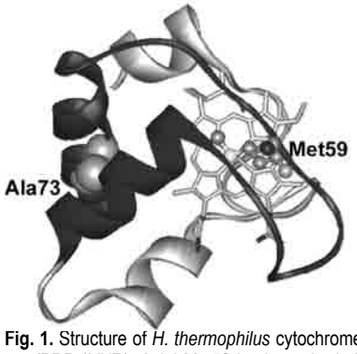


Fig. 1. Structure of *H. thermophilus* cytochrome c_{552} (PDB:1YNR). Axial Met59 is shown by ball and stick model, and the mutation site (A73) by space-filling model.

常磁性NMR、シトクロム*c*、ヘム

○とねがわ けん，たい こりん，へんみ ひかる，やまもと やすひこ

結果・考察

^{1}H-^{15}N HSQCによる構造解析より、本研究で導入したアミノ酸置換はタンパク質のフォールディングにはあまり大きな影響を与えないことが明らかになった。一方、ヘム鉄がⅢ価である酸化型タンパク質で常磁性シフトして観測されるヘム側鎖プロトンに由来するシグナルの解析から、ヘムの電子構造はアミノ酸置換の影響を受けていることが示された（Fig. 2）。常磁性コンタクトシフト（δ_{con}）の解析から、軸配位子Met59の側鎖のコンフォメーションが、アミノ酸置換によりHTにおける*R* formから*S* formに変化したことが示唆された（Fig. 3）。ヘム鉄がⅡ価である還元型のHTとA73V変異体のNOESYスペクトルで、Met59の$C_{\varepsilon}H_3$シグナルは、HTではヘムの5位と20位のメソプロトンシグナルとの間にNOEを生じるのに対し、A73V変異体では15位と20位のプロトンシグナルとの間にNOEが生じていることから（Fig. 4）、Met59側鎖のコンフォメーション変化が確認された。他の変異体においても、同様にMet59側鎖のコンフォメーション変化が確認された。

HTおよびA73V、A73I、A73L変異体の酸化還元電位（E_m）は、それぞれ245.0、265.3、274.1、279.7 mVと求められ、アミノ酸置換で導入した側鎖の大きさの増大に伴いE_mは高くなる傾向を示した。また、円二色性の温度依存性の解析から求めた変性温度（T_m）の比較から、いずれの変異体でもHTに比べてT_mが低下することが示された（Table 1）。酸化型と還元型のT_mの差、すなわち2つの酸化状態の熱力学的安定性の差がアミノ酸置換により増大することから、両酸化状態の熱力学的安定性の差で決まるE_mはHTよりも変異体で高いことは、変異体のT_mから予想される結果と一致した。

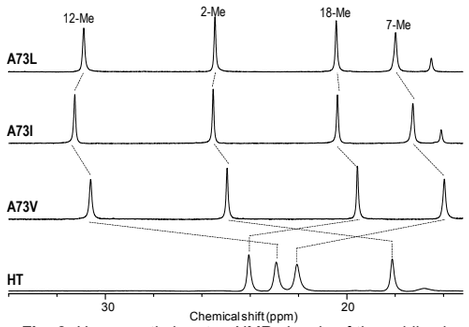


Fig. 2. Heme methyl proton NMR signals of the oxidized HT and A73 mutants at 25 °C and pH 7.0.

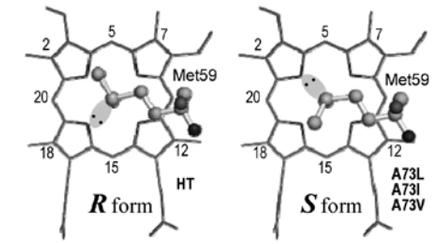


Fig. 3. *R* (left) and *S* (right) forms of the axial Met59 side-chains with respect to heme.

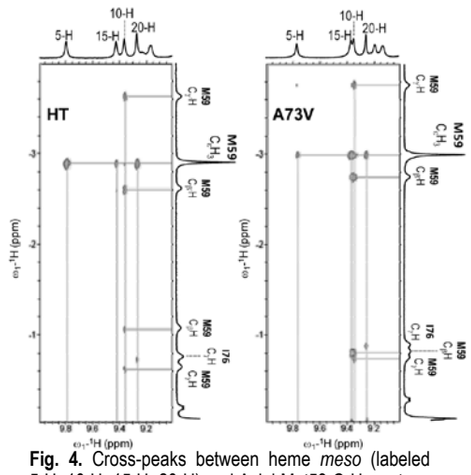


Fig. 4. Cross-peaks between heme *meso* (labeled 5-H, 10-H, 15-H, 20-H) and Axial Met59 $C_{\varepsilon}H_3$ protons in NOESY spectra of the reduced HT (left) and A73V mutant (right) at 25 °C and pH 6.0.

Table 1. Redox potentials (E_m) at 25 °C and pH 7.0, denaturation temperatures (T_m), and the difference in the T_m value between the two redox forms(ΔT_m) of HT and A73 mutants.

	E_m (mV)	T_m (°C)		ΔT_m
		Oxidised form	*Reduced form*	
HT	245.0	109.8	129.7	19.9
A73V	265.3	101.8	126.8	25.0
A73I	274.1	101.8	124.2	22.4
A73L	279.7	98.2	121.3	23.1

結論

多くのシトクロム*c*で保存されているヘリックス‐ループ‐ヘリックス構造のヘリックス間相互作用は、シトクロム*c*の機能の調節に関与していることが明らかとなった。

P28

Large amplitude interface dynamics in FKBP-ligand complexes revealed by the aromatic ring flipping and hydroxyl proton exchange rates for the interfacial tyrosine residues

Chun-Jiun Yang[1], Mitsuhiro Takeda[2], JunGoo Jee[3], Akira M. Ono[4], Tsutomu Terauchi[4], and Masatsune Kainosho[1, 2, 5]

[1]Graduate School of Science and Engineering & Center for Priority Areas, Tokyo Metropolitan University, Tokyo, Japan; [2]Structural Biology Research Center, Graduate School of Science, Nagoya University, Nagoya, Japan; [3]College of Pharmacy, Kyungpook National University, Daegu, Korea; [4]SAIL Technologies Inc., Yokohama, Japan; [5]Protein Research Institute, Osaka University, Osaka, Japan

Abstract

FKBP-ligand systems have often been used as models for developing structure-based drug design methodologies. The interface structures between the FKBP's and each of their ligands are well-defined and almost identical in the crystalline states. However, in contrast to these static structures, we actually found that large amplitude motions occur in the FKBP-ligand interfaces in solution, with different interface dynamics for the distinct pairs of complexes. In this study, such motions were manifested by quantitative measurements of the aromatic ring flipping and hydroxyl proton exchange rates for the tyrosine residues (Tyr26 and Tyr82) in the FKBP-ligand interfaces, by using the stereo-array isotope labeling (SAIL) method. The variations of the rate parameters between the different FKBP-ligand complexes revealed that the interface dynamics will provide novel clues about the protein-ligand interactions.

The side-chain moieties on protein surfaces often play pivotal roles in their specific interactions with ligands. Although such moieties are inherently flexible in the *free* state, their conformations and dynamics become drastically altered upon ligand binding. Among the various types of amino acids, aromatic residues are frequently locating at the binding interfaces of proteins, and play important and versatile roles in interactions with biomolecules and small chemical compounds. Therefore, aromatic rings would serve as useful probes and indicators to correlate the side-chain dynamics and ligand binding interactions. The FK506 binding proteins 12 (FKBP12) and 12.6 (FKBP12.6) are highly homologous, and form tight complexes with the immunosuppressive drugs FK506 and rapamycin (Rap) (Figure 1), mainly through the hydrophobic interaction between aromatic residues and ligand molecules. With the aid of SAIL amino acids (Figure 2), dynamic process of ring-flipping motion and hydroxyl proton (OH) exchange for FKBP-ligand interfacial tyrosine (Tyr) residues can be successfully captured, which is quite difficult to be obtained by traditional NMR method due to the relatively complex spin system of aromatic rings.



Figure. 1 (A) Crystal structure of FKBP12-Rap complex. Tyr residues and Rap were showed as stick mode.

Key Words: SAIL Method, Binding Interface Dynamics, Large-amplitude Motion

By using FKBP12 or 12.6 labeled with various type of SAIL Tyr in the *free* and ligands bound forms, considerable reductions of the ring-flipping rate (k_{flip}) and the OH exchange rate (k_{ex}) constants were observed in the binding interface upon ligands association, either FK506 or rapamycin, due to the restrictions originating from the ligand molecules, as compared to the *free*, solvent-exposed state. We also noticed that the k_{flip} and k_{ex} with slow dynamic processes determined here is much faster than the dissociation constant (k_{off}), indicating large-amplitude motion takes place in the FKBP-ligand interface to permit the aromatic ring rotation and probably the entrance of water molecules in the complex state.

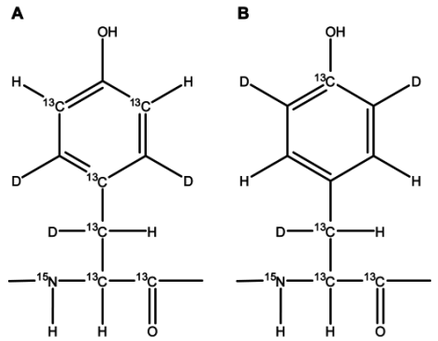


Figure 2. Chemical structures of ε-SAIL Tyr (A) and ζ-SAIL Tyr (B). ^{12}C atoms are not shown in the figure.

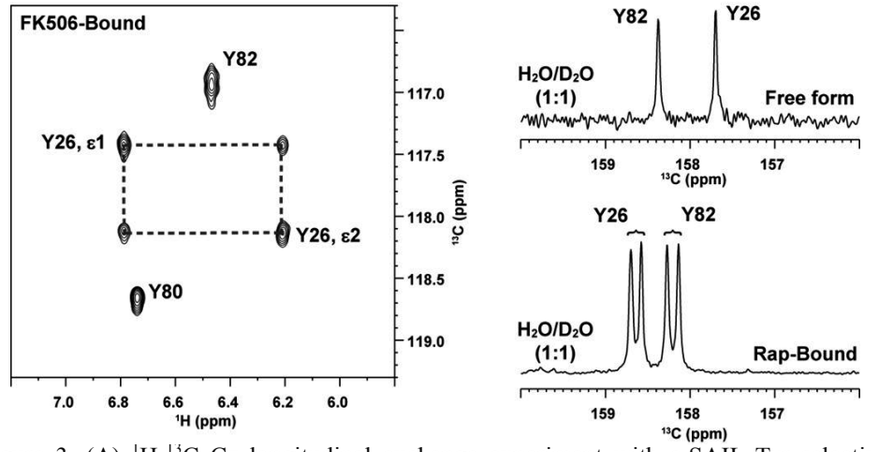


Figure 3. (A) ^{1}H-^{13}C Cz longitudinal exchange experiment with ε-SAIL Tyr selectively labeled FKBP in the complex with FK506. Two signals for Tyr26 are due to slow flipping motion and link with exchange peaks (without assignment) by dashed line. (B) 1D ^{13}C spectra for C_ζ resonances are acquired on FKBP labeled with ζ-SAIL Tyr in the free (upper) and rapamycin bound (lower) states, in the H_2O/D_2O 1:1 mixture solution.

REFERENCES

1. Kainosho, M. et al. (2006) *Nature,* 440, 52-57.
2. Takeda, M., Ono, A. M., Terauchi, T. & Kainosho, M. (2009) *J Biomol NMR,* 46, 45-49.
3. Takeda, M., Jee, J., Ono, A. M., Terauchi, T. & Kainosho, M. (2009) *J Am Chem Soc,* 131, 18556-18562.

P29

アメロジェニンの自己集合の性質

○熊木康裕[1]、相沢智康[2]、神谷昌克[2]、出村誠[2]、河野敬一[1,2]
[1]北大・理、[2]北大・先端生命

Self-assembly properties of amelogenin

○Yasuhiro Kumaki[1], Tomoyasu Aizawa[2], Masakatsu Kamiya[2], Makoto Demura[2] and Keiichi Kawano[1,2]
(*[1]Graduate School of Science, Hokkaido University, [2]Graduate School of Life Science, Hokkaido University*)

Amelogenin is a major component of enamel matrix proteins. The self-assembly of the amelogenin is believed to play an essential role in regulating the growth and organization of enamel crystals during enamel formation. Recently, it was reported that the self-assembly of the amelogenin is sensitive to the C. The elucidation of the amelogenin assembly process is indispensable for the understanding of the mechanisms of enamel formation. Assemblies of the amelogenin in themselves are not suitable for NMR measurement because of their apparent molecular size and pure solubility in water. Therefore, in order to obtain the structural information at a residue-specific level, DMSO-quenched H/D exchange experiments were performed.

The self-assembly of the amelogenin depends on pH [1,2]. Under acidic condition such as pH 3, the amelogenin molecule exists as a monomer. Previous biophysical study using CD and NMR revealed that under this condition this molecule exists in an extended, unfolded state [3]. On the other hand, the amelogenin molecules self-assemble into a nanosphere under neutral or basic condition. The radius of this nanosphere depends on pH, temperature, and ionic strength of the solution. This nanosphere is believed to play an essential role in regulating the growth and organization of enamel crystals during enamel formation. The elucidation of the amelogenin assembly process is indispensable for the understanding of the mechanisms of enamel formation. However, assemblies of the amelogenin in themselves are not suitable for NMR measurement because of their apparent molecular size (nano-order radius) and pure solubility in water.

Recently, the combined use of quenched hydrogen/deuterium (H/D) exchange and solution NMR spectroscopy has proven to be extremely valuable in investigating the structural characteristics of amyloid fibrils at a residue-specific level [4]. We think this method is also suitable for obtaining the structural information of the self-assembly of the amelogenin. We made sure that even after one week of H/D exchange period under pH 8 the most of the amide protons of the amelogenin were not replaced with deuterium (Fig.1). This preliminary result indicates that most of the molecules are highly protected from the water by forming the self-assembly. We will present the detail of this study at this poster session.

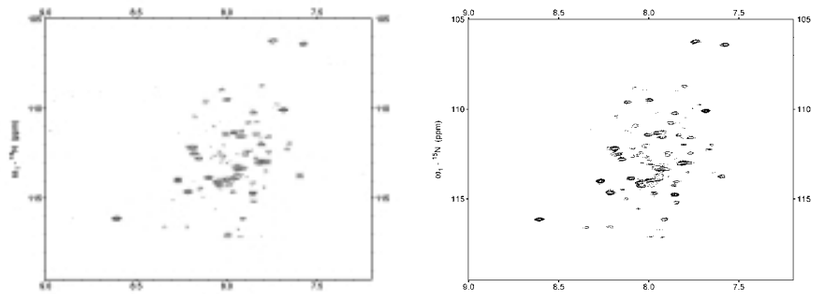


Figure. 1 ^{1}H-^{15}N HSQC spectra of ^{15}N-labeled recombinant porcine amelogenin in DMSO-d_6 at 300 K after H/D exchange period of zero hour (left) and one week (right). 2 mM amelogenin dissolved in H_2O at pH 3.0 (in this pH, amelogenin molecules exist as monomers) were diluted with 10-fold D_2O at pH 8.0 (at this pH, amelogenin molecules occur self-assembly) and incubated at 283 K for H/D exchange. After H/D exchange period, the samples were frozen with liquid nitrogen and lyophilized. Lyophilized proteins were dissolved in 95 % DMSO-d_6 (5% D_2O, 0.03% TFA) at pH 5.

Reference
[1] Moradian-Oldak J, Leung W, Fincham AG. *J. Struct. Biol.* **122**:320-327, 1998.
[2] Petta V, Moradian-Oldak J, Yannopoulos SN, Bouropoulos N. *Eur. J. Oral Sci.* **114** (Suppl. 1): 308-314, 2006.
[3] Delak K, Harcup C, Lakshminarayanan R, Sun Z, Fan Y, Moradian-Oldak J, Evans JS. *Biochemistry*, **48**, 2272-2281, 2009.
[4] Hoshino M, Katou H, Hagihara Y, Hasegawa K, Naiki H, Goto Y, *Nat. Struct. Biol.* **9,** 332-336, 2002.

amelogenin　self-assembly　DMSO-quenched H/D exchange

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

P30

αラクトアルブミンのモルテン・グロビュール状態と生物機能

○中村敬[1, 2], 真壁幸樹[1, 2, 3], 相沢智康[4], 河野敬一[4], 出村誠[4], 桑島邦博[1, 2, 3]
[1]分子研
[2]岡崎統合バイオ
[3]総研大・物理・機能分子科学
[4]北大院・先端生命

The molten globule state and its biological function in α-lactalbumin

○Takashi Nakamura[1, 2], Koki Makabe[1, 2, 3], Tomoyasu Aizawa[4], Keiichi Kawano[4], Makoto Demura[4], and Kunihiro Kuwajima[1, 2, 3]
[1]Institute for Molecular Science, Aichi, Japan.
[2]Okazaki Institute for Integrative Bioscience, Aichi, Japan.
[3]Department of Functional Molecular Science, The Graduate University for Advanced Studies, Aichi, Japan.
[4]Division of Life Science, Graduate School of Life Science, Hokkaido University, Hokkaido, Japan.

Svensson *et al.* reported that human α-LA-fatty acid complex, named HAMLET (human alpha-lactalbumin made lethal to tumor cells), induces apoptosis-like death in tumor cells. HAMLET is stable in the MG-like conformation, but the structural details are not fully understood. Peterson *et al.* reported that GAMLET (goat alpha-lactalbumin made lethal to tumor cells) also induces apoptosis in tumor cells. We also identified the oleic-acid binding site in the anti-tumor complexes by NMR, and found that the oleic acid binding site of GAMLET is different from that of HAMLET in spite of their structural similarities and the similar anti-tumor functions. The oleic acid binding site of the α-LA-fatty-acid complex corresponds to the structured regions of α-LA in the MG state. This result suggests that the oleic acid recognizes a loose hydrophobic core organized in the MG state.

HAMLETと呼ばれるヒトαラクトアルブミン(αLA)とオレイン酸の会合体が腫瘍細胞を細胞死に導くことが報告された。このαLA複合体の蛋白質部分はモルテングロビュール(MG)状態類似の立体構造を持つことがわかっているが、その構造、物性、機能ともに未だ不明な点が多い。我々は、NMR及び抗腫瘍細胞活性測定からMG状態と細胞死誘導活性発現の分子機構との関係を明らかにしようと試みた。2次元HSQCスペクトルからαLA-オレイン酸複合体のオレイン酸結合部位が、αLAのフォールディング開始部位に相当しており、オレイン酸は蛋白質のフォールディング中間体中で不完全なコアを形成している疎水性領域に結合すると考えられた。

Molten globule sate

○なかむらたかし，まかべこうき，あいざわともやす，かわのけいいち，でむらまこと，くわじまくにひろ

P31

家蚕液状絹の特異構造-Silk I-の構造解析

○鈴木悠[1]、山崎俊正[2]、朝倉哲郎[1]
[1]農工大院工
[2]生物研

Observation of Silk I conformation in *Bombyx mori* liquid silk

○Yu Suzuki[1], Toshimasa Yamazaki[2] and Tetsuo Asakura[1]
[1]Department of Biotechnology, Tokyo University of Agriculture and Technology, Tokyo, Japan.
[2] National Institute of Agrobiological Sciences, Tsukuba, Japan.

The conformation of *Bombyx mori* liquid silk extracted from the middle silkgland was analyzed with solution NMR. The chemical shifts of repeated motifs in silk fibroin primary sequence, GAGAGS, GAGAGY, GAAS were obtained from 2D and 3D solution NMR measurements. The dihedral angles of these motifs were proposed with talos+ program which predicts the dihedral angles from chemical shifts. The dihedral angles of GAGAGS and GAGAGY showed repeated type II β-turn structure although that of GAAS showed random coil. The NOE signals between (i)Hα and (i+2)HN also support the type II β-turn structure for these two motifs. This is the first time that the generation of Silk I structure in the native *B.mori* liquid silk was detected and confirmed.

［緒言］家蚕*(Bombyx mori)*絹フィブロインは、蚕体内で25%程度の高濃度水溶液の状態で中部絹糸腺中に一旦保存され、前部絹糸腺を経て吐糸管圧糸部でのずり応力により繊維化が起こり、β-sheet構造に富んだ絹繊維が形成される。液状絹を取り出し、穏やかな条件で乾燥させた絹フィブロインは、典型的な二次構造であるα-helixやβ-sheetと異なるX線回折パターンを示すことが報告され、Silk I構造と名付けられた[1]。その後、固体NMRの手法を駆使してSilk I構造はType II β-turn繰り返し構造が決定された [2]。中部絹糸腺中に蓄えられた家蚕絹は、ランダムコイルから徐々にこのSilk I構造を形成していくと予想されるが、CDやORD測定ならびにラマン分光を用いて研究された時点では、silk I型構造が特定されていないこともあって、α-helix様パターンとのみ結論されてきた。一方、溶液^{13}C NMRでは、液状絹の化学シフトはランダムコイルと一致する[3]。そこで本研究では、溶液NMR測定により、中部絹糸腺に蓄えられた液状絹中のSilk I構造の発現に関する構造解析を行った。

[実験]試料調整： 5齢5-7日の*B.mori*から中部絹糸腺を取り出した。蒸留水中でピンセットを使って絹糸腺を取り除くとともに、十分洗浄することによって絹セリシンを取り除き、絹フィブロインを得た。最終濃度12.5%w/wの絹フィブロインをNMR管に詰めて測定まで4℃で保存した。NMR測定：^{1}H-^{1}H NOESY, ^{1}H-^{1}H TOCSY, HNCO, HCACO, ^{15}N HSQCをBruker 750MHzにおいて10℃で測定を行った。

絹フィブロイン, NOE, Silk I

○すずきゆう, やまざきとしまさ, あさくらてつお

［結果・考察］家蚕絹フィブロインはジスルフィド結合でつながれたH鎖(390kDa)とL鎖(28kDa)からなる。H鎖が主要構成成分である。H鎖の主要構成アミノ酸はGly(46%), Ala(30%), Ser(12%), Tyr(5%), Val(2%)であり、その一次構造は、親水性アミノ酸を多く含むN末端及びC末端領域と、その間に疎水性アミノ酸に富む結晶部と親水性アミノ酸に富む非晶部が繰り返されている。一次構造の90%以上を占める結晶部にはGAGAGX(X=Ser, Tyr, Ala)およびGYGAGVGAGYA、GAASというモチーフが規則的に繰り返されている。(Figure1)

家蚕液状絹の帰属は、TOCSY, NOESY, ^{15}N HSQC, HNCO, HCACOスペクトルを用いて行い、GAGAGS, GAGAGY, GAASモチーフについて、各残基の^{1}H, ^{13}C, ^{15}Nの化学シフトが得られた。そこで、二面角値予測プログラムtalos+[4]を用い、化学シフトから各モチーフの二面角値を求めた。その結果、Figure 2(left)に示すように、GAGSGAGA配列において、type II β-turnの二面角値と極めて近い値が繰り返される結果となった。二面角値の平均値を用いて作成したモデル構造はFigure2(right)のようになり、Ser残基周辺でゆがみがあるものの、type II β-turn繰り返し構造が得られた。GAGYGAGA配列でも同様の結果が得られた。一方、GAASモチーフはランダムコイルと推定された。

さらに、^{1}H-^{1}H NOEピークによりモデル構造の検証を行った結果、SerとAla残基間、すなわちHα-HN(i, i+2)間にNOEピークが確認された。同様のピークは、Ala-Tyr間においても確認された。これらはType II β-turn構造に特徴的なピークであり、家蚕液状絹においてGAGAGSおよびGAGAGYモチーフはtype II β-turn構造を形成していることが示された。

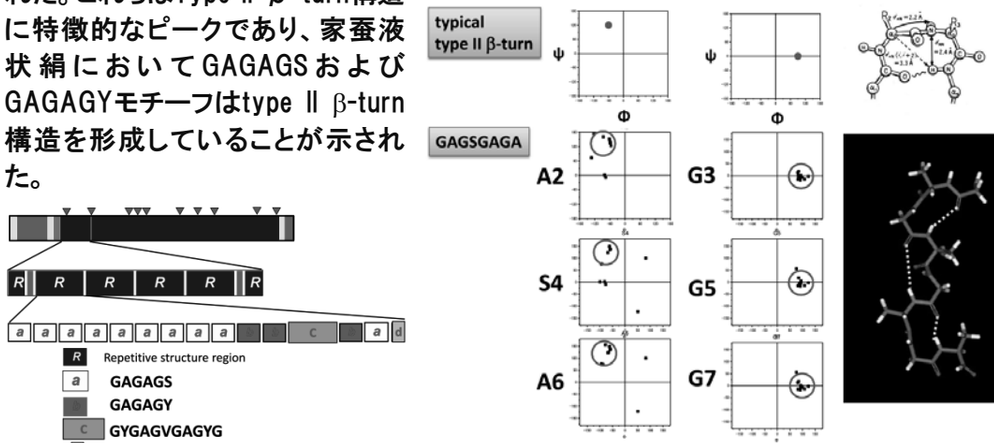


Figure 2 Dihedral angles (ϕ,ϕ) of typical β-turn and GAGSGAGA which was obtained from talos+. (left) The model structure of GAGSGAGA with dihedral angles determined in this work.(right)

Figure 1 Primary structure of *Bombyx mori* silk fibroin H chain

[謝辞] 本研究は一部、平成23年度科研費補基盤A(課題番号23245045)および農林水産省「アグリ・ヘルス実用化研究促進プロジェクト」(平成22-26年度)により実施された。

[References]

[1] Marsh RE, Corey RB and Pauling L. *Biochim Biophys Acta*. **1955** ,16, 1-34.
[2] Asakura T, Ashida J, Yamane T, Kameda T, Nakazawa Y and Ohgo K, *J Mol Biol*. **2001,** 306, 291-305.
[3] Asakura T, Watanabe Y, Uchida A and Minagawa H. *Macromolecules*. **1984** ,17,1075-81.
[4] Y. Shen, F. Delaglio, G. Cornilescu, A. Bax, *J. Biomol. Nmr* **2009**, 44, 213.

P32

MAPキナーゼp38αの活性および基質選択性のアロステリックな調節機構の解明

○徳永裕二[1, 2]，竹内恒[2]，高橋栄夫[2, 3]，嶋田一夫[2, 4]
[1]JBIC・研究開発
[2]産総研・BIRC
[3]横市大・生体超分子システム科学
[3]東大・院薬

Allosteric enhancement of enzymatic activity and substrate selectivity of MAP kinase p38α by the docking interaction

○Yuji Tokunaga[1,2], Koh Takeuchi[2], Hideo Takahashi[2,3], and Ichio Shimada[2,4]
[1]*Research and Development Department, Japan Biological Informatics Consortium, Tokyo, Japan*
[2]*Biomedicinal Information Research Center, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Tokyo, Japan*
[3]*Graduate School of Nanobioscience, Yokohama City University, Kanagawa, Japan*
[4]*Graduate School of Pharmaceutical Sciences, the University of Tokyo, Tokyo, Japan*

Mitogen-activated protein kinases (MAPKs) anchor their specific partners through so-called “docking interactions”, which utilize the sites distal from the reaction center. However, the structural basis of the “reaction complex” formation at catalytic center and the contribution of the docking interaction to these steps remains elusive. In this report, we analyzed interaction between active p38α and C-terminal fragments of a native substrate, MK2, by solution NMR technique. We showed that (1) there is a compulsory order in the formation of the reaction complex and, (2) unlike the conventional recognition as a simple anchor, the docking interaction has a distinct function to allosterically enhance enzymatic activity and substrate specificity. These findings would contribute to the understanding of the precise regulation of MAPK cascades in the cellular environment, which is crowded with various macromolecules.

【序論】

p38α は広く真核生物に保存された MAP キナーゼの一種であり、ストレス応答としての細胞死の誘導、炎症性刺激に応答した炎症性サイトカイン産生促進など、多様な生命現象を支配する重要なシグナル伝達分子である。p38α の立体構造はタンパク質キナーゼ間に高度に保存された特徴を保持しており、ATP を結合する N ローブと基質リン酸化部位を結合する P+1 サイトを有する C ローブがヒンジにより連結されている。N, C ローブの間にはリン酸化により活性を制御する活性化ループが存在する。p38α はカスケード上流の MAPKK により活性化ループ上の TGY モチーフを二重リン酸化されることで活性化され、N, C ローブが近接した閉構造を形成できるようになる。活性化 p38α は下流の基質をリン酸化することでシグナル伝達を達成する。p38α は基質を活性中心とは異なる構造領域で認識することで結合の特異性と親和性を保障する。この機構はドッキング相互作用と呼ばれる。一方、p38α による基質リン酸化機構の詳細な理解には、ドッキング相互作用に加えて、活性部位である p38α P+1 部位に対して基質リン酸化部位が結合し、かつ ATP からのリン酸基転移が起こる閉構造を形成した反応複合体の構造状態および形成機構を解明する必要がある。既報の唯一の MAP キナーゼ – 基質複合体構造である p38α – MK2 複合体結晶構造では、ドッキング部位が主な結合面を担い、活性中心でのコンタクトは見られない。したがって反応複合体の形成機構は依然として不明である。本研究では、活性化構造を形成しうるリン酸化 p38α を用い、溶液 NMR 法を駆使して ATP および基質との相互作用解析を行うことにより反応複合体形成機構を解明し、その過程におけるドッキング相互作用の寄与を定量することを目的とした。

【結果】

1. p38α は活性化ループの二重リン酸化と ATP 結合により閉構造へ移行する

まず p38α の立体構造に対する活性化ループのリン酸および ATP 結合の寄与を解析した。この結果、活性化ループのリン酸化のみでは p38α の立体構造の変化は小さく、ATP の結合に伴い初めて構造全体におよぶ変化が誘起された。したがって、ATP 結合部位と P+1 サイトが近接した閉構造の形成には、活性化ループのリン酸化と ATP 結合の両方が必要であることが示唆された (Figure 1)。以下では、リン酸化 p38α を単に p38α と表記する。

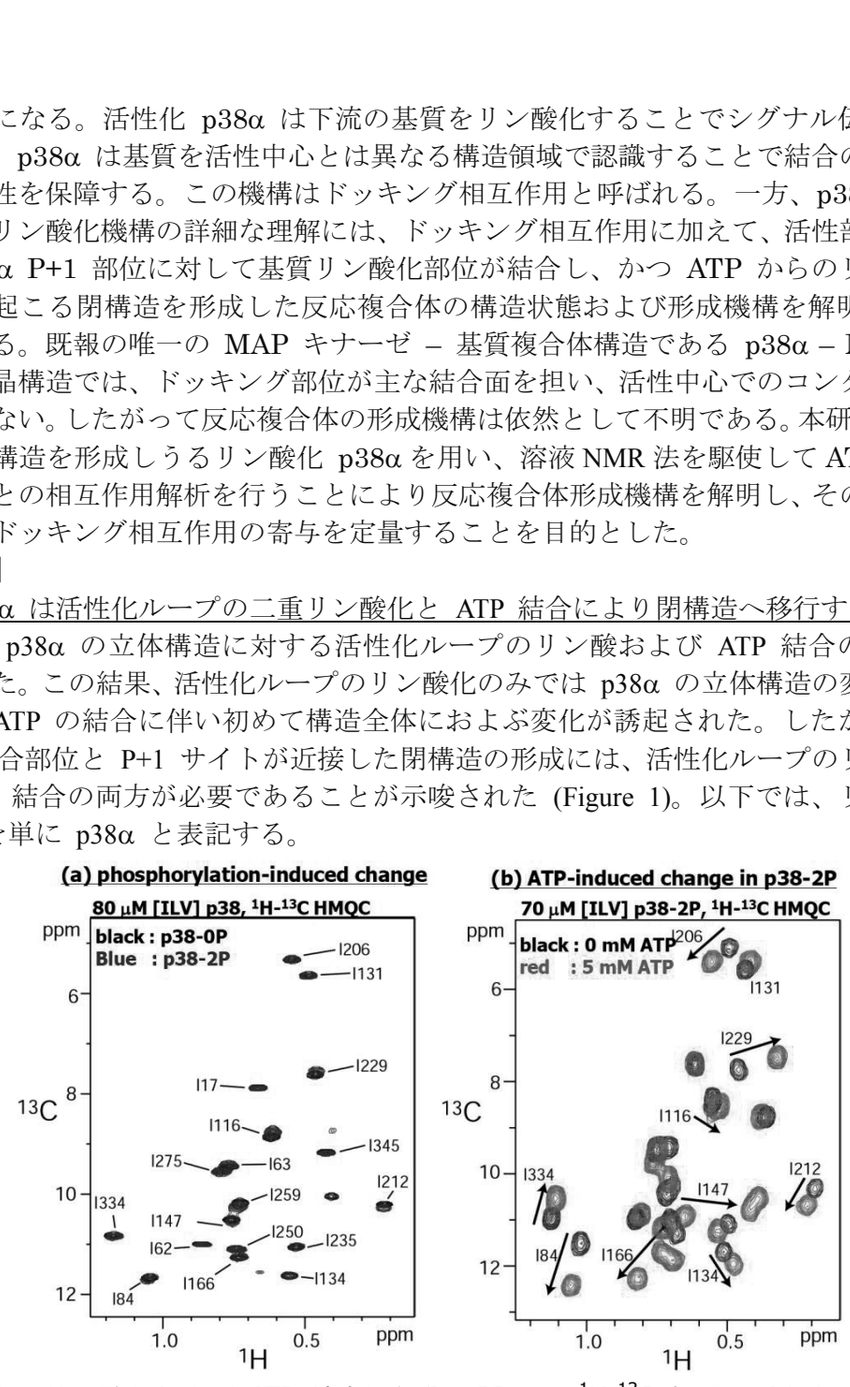


Figure 1. リン酸化および ATP 結合に伴う p38α の ^{1}H-^{13}C 相関スペクトルの変化 (a) ATP 非存在下、リン酸化前 (黒) とリン酸化後 (青) のスペクトルの重ね合わせ。(b) リン酸化 p38α について ATP 非存在下 (青) と ATP 存在下 (赤) のスペクトルの重ね合わせ。

2. p38α の反応複合体は ATP 、基質リン酸化部位の順序での結合により形成される

次に p38α の反応複合体形成要件を解明する目的で、p38α に対して基質 MK2 の被リン酸化残基 Thr334 および C 末端ドッキング配列を含む 334/D ペプチドの添加実験を行った。この結果、ATP アナログの有無によらず p38α のドッキング相互

MAP キナーゼ p38α, 反応複合体, アロステリック調節

○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

作用部位に 334/D ペプチド添加に伴う化学シフト変化が観測された一方、ATP アナログ結合状態の p38α にのみ P+1 部位の化学シフト変化が観測された (Figure 2)。したがって、p38α と 334/D ペプチドは ATP アナログの有無によらずドッキング相互作用を介して結合できる一方、基質リン酸化部位が p38α の P+1 サイトに結合するためには、p38α に対する ATP アナログの結合が必要であることが明らかとなった。即ち、p38α – 基質 –ATP の反応複合体の形成過程において、ATP アナログの結合と基質リン酸化部位の p38α P+1 サイトへの結合の順序がこの順番に厳密に制御されることが初めて見出された。

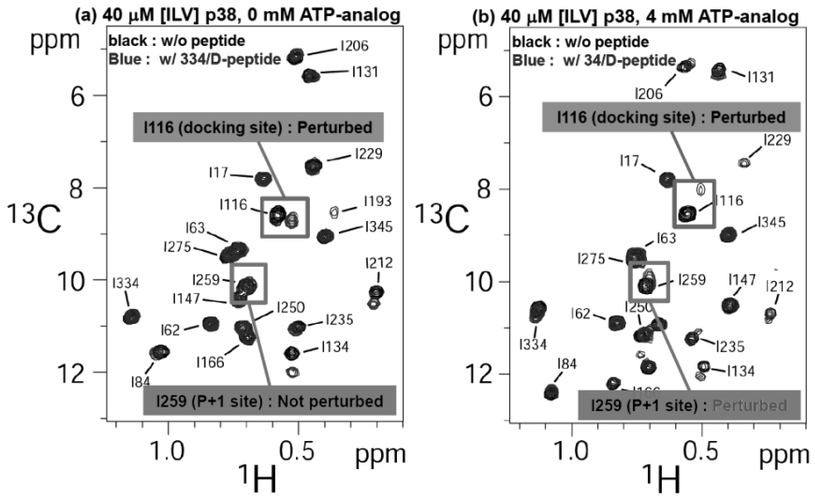


Figure 2. 334/D ペプチド添加に伴う p38α の ^{1}H-^{13}C 相関スペクトルの変化
(a) ATP アナログ非存在下、(b) ATP アナログ存在下。334/D ペプチド非添加条件を黒、添加条件を青のスペクトルにてそれぞれ示した。ドッキング相互作用部位の I116 のシグナルをマゼンタ、P+1 部位近傍の I259 のシグナルをシアンの四角にて囲った。

2. ドッキング相互作用は反応複合体形成およびキナーゼ反応を正に調節する

さらに、MAP キナーゼ間で高度に保存されたドッキング相互作用が、基質のアンカリングだけではなく、反応複合体の形成を促進する付加的な役割を持つことを期待し、p38α の ATP アナログに対する結合親和性、基質リン酸化部位のペプチド (334 ペプチド) に対する結合親和性、および 334 ペプチドをリン酸化する活性の解析を、ドッキング配列ペプチド (D ペプチド) の有無の条件で比較した。この結果、ドッキング相互作用は p38α の ATP アナログに対する結合親和性を約 10 倍に、334 ペプチドに対する結合親和性を約 2 倍に、334 ペプチドリン酸化反応における代謝回転率を約 1.5 倍に増強した (Figure 3, Table 1)。一方、ATP の結合がドッキング相互作用の強さに与える影響を調べる目的で、ATP アナログの有無で p38α の D ペプチドに対する結合親和性を ITC にて決定し両者を比較した。この結果、ATP アナログの結合に伴い p38α の D ペプチドに対する結合親和性は約 1.5 倍に増強された (data not shown)。以上の結果から、ATP 結合とドッキング相互作用の間には協同性があることが示された。

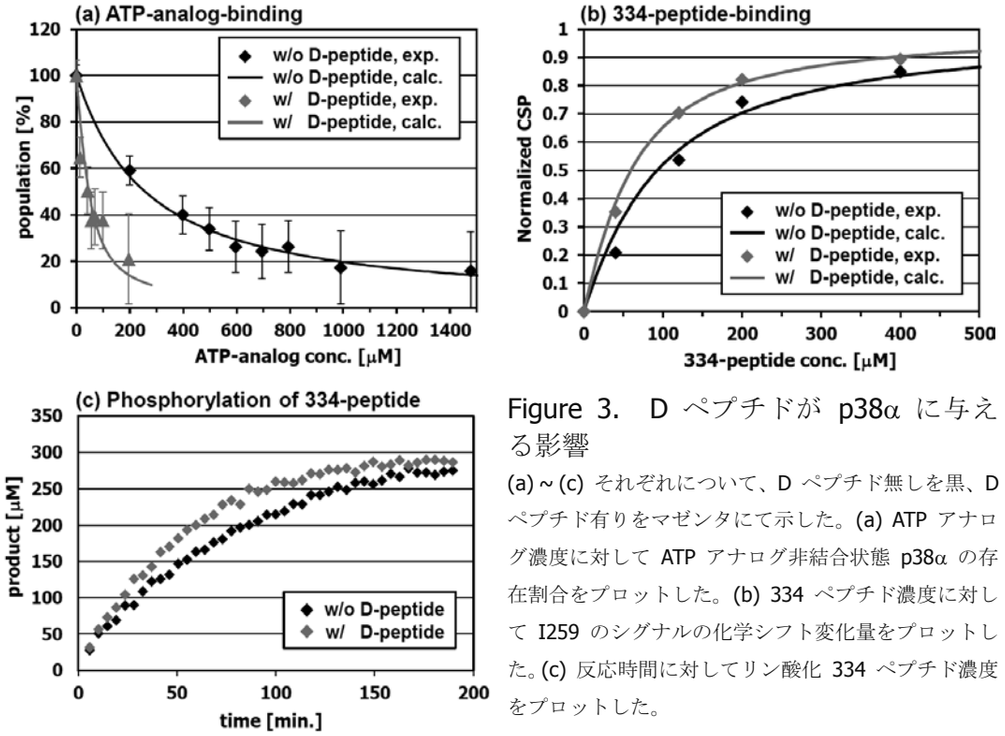


Figure 3. D ペプチドが p38α に与える影響
(a) ~ (c) それぞれについて、D ペプチド無しを黒、D ペプチド有りをマゼンタにて示した。(a) ATP アナログ濃度に対して ATP アナログ非結合状態 p38α の存在割合をプロットした。(b) 334 ペプチド濃度に対して I259 のシグナルの化学シフト変化量をプロットした。(c) 反応時間に対してリン酸化 334 ペプチド濃度をプロットした。

Table 1. D ペプチドの有無における p38α の ATP アナログ親和性、334 ペプチド親和性および基質リン酸化活性

D-peptide	unbound	bound
K_d for ATP-analog [μM]	237	27
K_d for 334-peptide [μM]	73	39
k_{cat} of 334-peptide phosphorylation [/sec]	17.3	24
K_m of 334-peptide phosphorylation [μM]	420	410

【結論】

リン酸化 p38α を用いた p38α – 基質 – ATP の反応複合体形成機構の解析を行った。この結果、反応複合体はリン酸化 p38α に対してまず ATP が結合し、次に P+1 サイトに対して基質リン酸化部位が結合する過程によって形成されることが明らかとなった。この過程において、基質のドッキング相互作用が p38α に対する ATP および基質リン酸化部位の結合を増強し、かつリン酸化反応の代謝回転率を増加させることが示された。ドッキング相互作用に伴い p38α の ATP 結合部位および P+1 サイトにアロステリックな化学シフト変化が誘起されており、ドッキング相互作用に伴う分子内構造変化の伝播が上述の p38α の活性制御に寄与している可能性が強く示唆された。以上の知見は、p38α の反応複合体の形成要件およびその過程に対するドッキング相互作用の正の寄与を、初めて明確かつ定量的に見出したものである。本知見は、様々なタンパク質が混在する細胞内環境において、MAP キナーゼ経路を介した特異的なシグナルが適切な強度、速度および持続時間で伝達されることにより正しい細胞応答を達成する機構の理解に寄与すると考えられる。

P33

Chp1クロモドメインの立体構造解析

○下條秀朗[1], 石田真由美[2,3], 中山潤一[2,3], 西村善文[1]
[1]横浜市大・院生命ナノシステム
[2]理研CDB
[3]関学大・院理工

Solution structure of the Chp1 chromodomain

○Hideaki Shimojo[1], Mayumi Ishida[2,3], Jun-ichi Nakayama[2,3], and Yoshifumi Nishimura[1]
[1] Department of Supramolecular Biology, Graduate School of Nanobioscience, Yokohama City University.
[2] Laboratory for Chromatin Dynamics, RIKEN Center for Development Biology
[3] Department of Bioscience, Graduate School of Science and Technology, Kwansei-Gakuin University

Assembly of heterochromatin at centromeric DNA regions in the fission yeast requires the RNAi pathway. Chp1, a chromodomain protein, forms the Ago1 containing RNA-induced transcriptional silencing (RITS) complex and recruits siRNA - bound RITS to metylated histone H3 lysine 9 via its chromodomain.

Chromodomains, originally identified in heterochromatin-associated factors, are considered as modules used to target proteins to specific chromosomal loci. The chromodomain family display a range of activities, including methyl lysine recognition, and RNA / DNA binding.

【序論】真核細胞において、ヘテロクロマチンと呼ばれる高次のクロマチン構造形成は様々な染色体プロセスで重要な役割を果たしている。このヘテロクロマチン領域では転写や組み換えが抑制されており、その基本的な構造は酵母からヒトに至るまで非常に保存されている。サイレントクロマチンは密接にヒストンテールの翻訳後修飾の変化と連動している。ヘテロクロマチンの特徴であるメチルトランスフェラーゼによるヒストンH3の9番目のリジン（H3K9me）のメチル化は進化的に保存された heterochromatin protein1(HP1)を含むクロマチンタンパク質の結合部位として機能する。
分裂酵母においてヘテロクロマチンは、セントロメア、接合型領域、およびテロメアなどといった機能性染色体ドメインを形成するために不可欠である。分裂酵母のヘテロクロマチンは哺乳類SUV39Hのホモログである Clr4 による H3K9 メチル化によって特徴づけられる。このメチル化は2つの HP1 タイプのタンパク質、Swi6 と Chp2 の結合部位であり、抑制的なクロマチン構造を形成するクロマチンタンパク質をリクルートする。セントロメアのヘテロクロマチンの構築やメンテナンスが直接 RNA 干渉（RNAi）経路にリンクされている。現在提案されている分裂酵母ヘテロクロマチン形成モデルでは、Argonaute タンパク質 Ago1 はセントロメアに由来する siRNA を取り込み、Chp1、Tas3 を含む RNA-induced transcriptional silencing (RITS)複合体を形成している。RITS 複合体は Ago1 が持つ siRNA の RNA-RNA 相補性による相互作用と Chp1 のクロモドメイン(CD)と H3K9me への相互作用の両方を利用し、クロマチンへターゲッティングする。この相互作用は、H3K9 をメチル化する Clr4 複合体および H3K9me に結合する Swi6 と、RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ Rdp1、RNA ヘリカーゼ Hrr1、および PolyA ポリメラーゼファミリータンパク質 Cid12 が含まれている RNA-dependent RNA polymerase complex（RDRC）のリクルートにつながる。RDRC はその後二本鎖 RNA を合成し、ダイサー（DCR1）によって siRNA に分解され、RITS 複合体へ受け渡される。このようにセントロメアヘテロクロマチンが H3K9me と RNAi 経路が関与する self-enforcing loop によって維持されると考えられる。
分裂酵母には4つのクロモドメインを持つタンパク質 Chp1、Chp2、Swi6、Clr4 はヘテロクロマチン形成に機能的役割があることが知られている。これらのタンパク質のクロモドメインは同じ H3K9me をターゲットしている。これら異なった機能タンパク質のクロモドメインが H3K9me をどのようなメカニズムで認識しているかを理解することは大変重要である。
【方法】大腸菌による大量発現系を用いて安定同位体ラベルを行い、カラムを用いて精製した。各種多次元多重共鳴 NMR 測定を行った。スペクトル解析には NMRPipe, Olivia、構造計算にはプログラム CYANA, CNS を用いた。ヒストンペプチドおよび RNA 滴定実験を NMR および ITC で行った。
【結果と考察】ヒストンH3トリメチル化リジン9 ペプチド（H3K9me3）とChp1クロモドメインの複合体のNMR構造を決定した。全体的なコア構造は既に報告されている結晶構造と同じであったが、結晶構造と比較してN末側に長いコンストラクトを使用したNMR構造では新たに短い3^{10}ヘリックスの形成が明らかとなった。このヘリックスはヒストンペプチドと相互作用しており、変異体の実験からH3K9me3との結合能に影響していた。またこの領域はChp1フリーでは天然変性状態であるが、ヒストンH3と結合することにより構造を形成することも明らかになった。NMR滴定実験から同定したChp1クロモドメインとセントロメアのncRNAとの結合面はN末とC末のヘリックスで形成されており、この結合面はH3K9me3とは異なっており、複合体・単体ともに結合した。in vivoサイレンシングアッセイからNMRで同定したRNA結合部位がChp1の機能に重要であり、クロモドメインのH3K9me3結合とRNA結合が協調的にサイレンシングに関与していると考えられる。H3K9meと核酸に結合することができるChp1クロモドメインは同じターゲットに結合する他のクロモドメインタンパク質と異なる機能をサポートするための重要な特性であるのかもしれない。

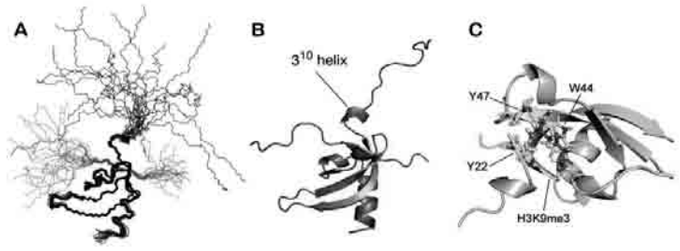


Figure. Structure of the Chp1-CD / H3K9me3 complex
(A) Superimposition of 20 representative structures (B) A ribbon diagram of the Chp1-CD complex structure. (C) Arrows indicate the Tri-methylated K9 residue and three hydrophobic residues that recognize H3K9me3 peptide.

Reference
Mayumi Ishida, Hideaki Shimojo, Aki Hayashi, Rika Kawaguchi, Yasuko Ohtani, Koichi Uegaki, Yoshifumi Nishimura, Jun-ichi Nakayama (2012), Mol Cell, 47, 228-241.

クロモドメイン、Chp1

○しもじょうひであき、いしだまゆみ、なかやまじゅんいち、にしむらよしふみ

P34

少数の標識体を用いてアミノ酸を判別する組み合わせ選択標識法

○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・生命分子システム・NMRパイプライン高度化研究チーム
[2]横浜市大・生命ナノシステム科学・生体超分子システム科学
[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・知能システム科学

Novel Combinatorial Selective Isotope Labeling Method to Discriminate Amino-acids with a Small Number of Labeled Samples

○Takuma Kasai[1], Seizo Koshiba[1,2], Jun Yokoyama[1,3,4], Takanori Kigawa[1,3,5]
[1]*NMR Pipeline Methodology Research Team, RIKEN Systems and Structural Biology Center*
[2]*Department of Supramolecular Biology, Graduate School of Nanobioscience, Yokohama City 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*

Various combinatorial amino-acid selective isotope labeling methods had been proposed for improving efficiency of the main-chain assignment process of proteins. We developed a novel effective combinatorial labeling method, by which 19 amino acids can be distinguished with as few as 3 samples, using a cell-free protein synthesis system with a quantitative, scramble-suppressed labeling technology.

＜背景＞
アミノ酸選択的にタンパク質を安定同位体標識し、各主鎖アミドシグナルがどのアミノ酸に由来するかを判別する方法は、低溶解度や高分子量のタンパク質など、三重共鳴などのみでは主鎖帰属が困難である場合に有用である。単純にアミノ酸の種類の数だけ標識体を用意するのではなく、複数のアミノ酸を組み合わせて標識することにより、必要な標識体の数を減らす「組み合わせ選択標識法(Combinatorial Selective Labeling)」が提案されているが、いずれも未だ多くの種類の標識体を用いたり、一部のアミノ酸について情報を得られなかったりといった問題がある。例えば、5種類の標識体を用いて16種類のアミノ酸を判別する方法が提案されている(Parker *et al*. JACS, 2004, 126:5020)。より少ない標識体数でアミノ酸を判別することができれば、(1)三重共鳴法などと組み合わせてより効率的に主鎖帰属をおこなうことができる、(2)連鎖帰属をおこなわなくともある程度の主鎖帰属ができるため、化学シフト摂動法などで他分子との相互作用部位を効率的に絞り込める、(3) 測定時間・作業量・コストが軽減される、また相互作用解析の場合にはもう一方の分子の消費量も軽減される、(4)相互作用がslow exchangeであった場合にも化学シフト変化したアミノ酸残基のシグナルの追跡を効率的におこなえる、といったメリットがある。

Amino-acid selective labeling, Combinatorial selective labeling, Cell-free protein synthesis system

○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

＜今回開発した方法の特徴＞
従来の組み合わせ選択標識の方法は、いずれもシグナルの有無、あるいは強弱といった言わば2進法的な標識パターンを利用していた。今回新たに開発した手法では、大腸菌無細胞タンパク質合成系により定量的に、かつアミノ酸間のスクランブルを抑制しながらアミノ酸選択的にタンパク質を安定同位体標識する技術を用い、シグナルの強・弱・無、あるいは強・中・弱というように言わば3進法的に標識することとした。これによりわずか3種類の選択標識体についてそれぞれ^{15}N-HSQCと2D HN(CO)スペクトルを測定することで、各アミドシグナルのアミノ酸(i位)およびひとつN末端側のアミノ酸(i-1位)が、プロリンを除く19種類のアミノ酸のいずれであるかの判別をおこなうことができるようになった。

＜結果＞
Smoothelin CHドメイン(116残基)について、設計したアミノ酸標識パターンに従って3種類の標識体を調製し、^{15}N-HSQCスペクトルおよび2D HN(CO)スペクトルを測定した(Fig.1)。これら6枚の2次元スペクトルのシグナル強度比を解析することによって、^{15}N-HSQCスペクトル上で重複していない主鎖のシグナル89個すべてについて、正しくi位およびi-1位のアミノ酸を判別することができたので、その詳細について報告する。

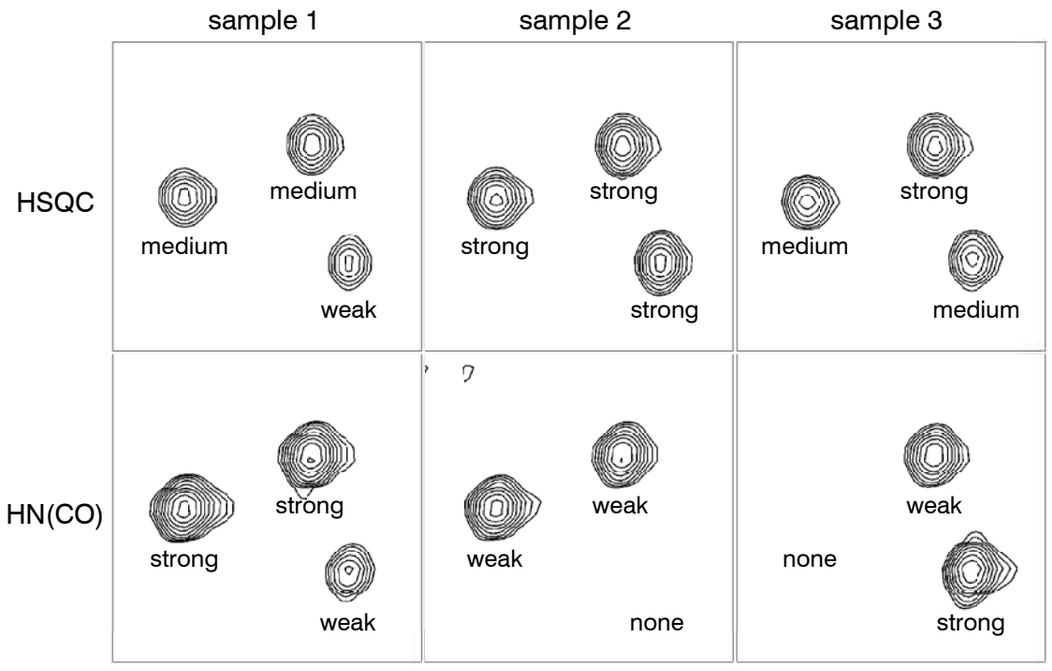


Fig. 1. ^{15}N-HSQC (top) and 2D HN(CO) (bottom) spectra of three differently labeled Smoothelin CH domains. The selective labeling pattern is designed so that each amino acid reveals different intensity pattern.

P35

好熱性水素細菌シトクロムc_{552}のヘム軸配位子Metと環状水素結合ネットワークを形成するアミノ酸側鎖の性質とレドックス機能の関係

○伊豆本幸恵、三上真一、太虎林、山本泰彦
筑波大院・数理物質

Roles of Gly50 Residue Forming a Unique Loop Hydrogen Bond Network with Axial Met59 in Functional Control of *Hydrogenobacter thermophilus* Cytochrome c_{552}

○Yukie Izumoto, Shin-ichi Mikami, Hulin Tai, and Yasuhiko Yamamoto
Department of Chemistry, University of Tsukuba, Tsukuba, Japan

Hydrogenobacter thermophilus cytochrome c_{552} (HT) is an electron transfer monomeric *c*-type hemoprotein composed of 80 amino acid residues, with side chains of His14 and Met59 coordinated, as axial ligands, to heme Fe. Met59 NH and CO are hydrogen-bonded to CO and NH of Gly50, respectively, and these unique hydrogen bonds are thought to contribute to stabilize the coordination of Met59 to heme Fe. In this study, Gly50 of the protein has been replaced by a series of aliphatic amino acid residues, i.e., Ala, Val, or Ile, in order to investigate the functional role of the 50th residue. The proteins were ranked as G50I < G50V < G50A < wild-type protein, in order of increasing the redox potential, demonstrating that the redox function depends upon the size of the 50th residue.

[序論] 好熱性水素細菌(*Hydrogenobacter thermophilus*)シトクロムc_{552} (HT) は補欠分子族としてヘムをもつ電子伝達タンパク質である。ヘム鉄には軸配位子として、His14とMet59がそれぞれ配位している[1]。Met59はヘムを覆う長いペプチドループにあり、Gly50と主鎖間でユニークな水素結合ネットワークを形成し、ループを束ねている[1] (Fig. 1)。従来の研究から、これらの水素結合やヘム周辺の疎水性環境はタンパク質の機能調節に重要であることが明らかになっている[2,3]。本研究では、Gly50をAla、Val、Ileに置換した変異体 (G50A、G50V、G50I) を調製し、Met59の主鎖とユニークな水素結合を形成する50番目のアミノ酸残基のサイズがタンパク質の酸化還元電位 (E_m) と構造に与える影響を解析した。

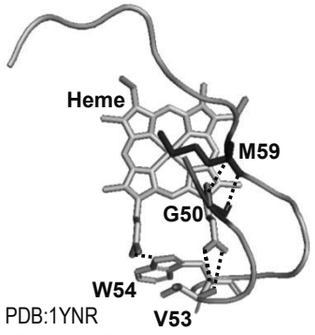


Fig. 1. Orientation of a long peptide loop composed of residues at positions 49 through 66, with respect to heme, in HT.[1] G50, V53, W54, and M59 are also illustrated.

[結果・考察] 還元型タンパク質の^{1}H NMRスペクトルの10－14 ppmに観測されるアミドプロトンシグナルVal53N_pH、Trp54N_pH、および側鎖プロトンシグナル Trp54$N_\varepsilon H$、Trp75$N_\varepsilon H$は、タンパク質の構造変化を鋭敏に反映する (Fig. 2)。アミノ酸置換により

シトクロム *c*、ヘム、酸化還元電位

○いずもと ゆきえ、みかみ しんいち、たい こりん、やまもと やすひこ

Val53N_pHとTrp54$N_\varepsilon H$が低磁場シフトすることから、これらプロトンが関与するヘムプロピオン酸基との水素結合 (Fig. 2の模式図参照) が変異体で強くなると共に、Met59を含むループのコンフォメーションが変化することが示唆された。一方、Trp75$N_\varepsilon H$のシフト値はアミノ酸置換の影響を受けないことから、Met59を含むループ以外のタンパク質の構造はアミノ酸置換の影響をあまり大きく受けていないことが示唆された。

Gly50のペプチド主鎖のコンフォメーションを規定する二面角 ϕ、ψ はそれぞれ 155º、177º であることから[1]、Gly50を他のアミノ酸に置換した場合には、アミノ酸置換部位のペプチド主鎖のコンフォメーションが変化し、その構造変化がMet59を含むループ全体の構造に影響を与えていることが考えられる。

円偏光二色性スペクトルの温度依存性の解析から得られたタンパク質の変性温度 (T_m) は、アミノ酸置換により低下した (Table 1)。また、酸化型と還元型のタンパク質のT_mの差 ($\Delta T_{m(Red\text{-}Ox)}$) は、50番目のアミノ酸側鎖のサイズの増加に伴い、小さくなった。タンパク質のE_mは酸化型と還元型の熱力学的安定性の差により決まるので、$\Delta T_{m(Red\text{-}Ox)}$が酸化状態の異なる２つのタンパク質の安定性の差を反映する指標であると考えると、E_mはG50I < G50V < V50A < HTの順で高くなることが予想された。HTおよび変異体のE_mは予想通りの大小関係を示し、G50I変異体のE_mはHTの値に比べて90 mV低下した (Table 1)。Gly50のアミノ酸置換によるE_mの36−90 mVの低下をMet59を含むループのコンフォメーション変化で説明するためには、ループの構造変化によるヘムの溶媒への露出度の増大も要因の一つとして考える必要があると思われる。

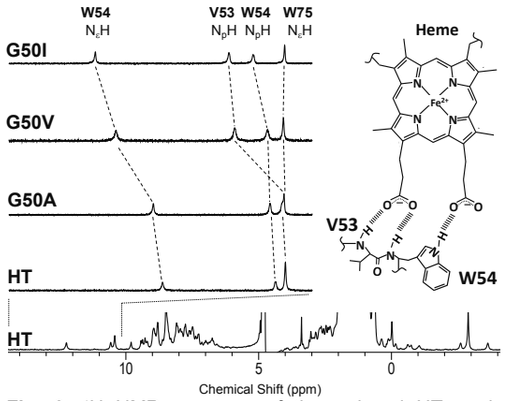


Fig. 2. ^{1}H NMR spectrum of the reduced HT, and portions of the spectra (14.5－10.0 ppm) of the reduced HT, G50A, G50V, and G50I at 25 ºC and pH 6.0. The hydrogen bonds between W54 and V53 residues and heme propionic acid side chains of the protein is schematically illustrated in the inset.

Table 1. Denaturation temperatures (T_m) and redox potentials (E_m) of HT, G50A, G50V, and G50I.

Protein	T_m[a] (ºC) Oxidized	T_m[a] (ºC) Reduced	$\Delta T_{m\,(Red\text{-}Ox)}$[b] (ºC)	E_m[c] (mV)
HT	109.8	129.7	19.9	244.7
G50A	105.1	124.8	19.7	208.2
G50V	105.4	120.2	14.8	166.7
G50I	99.5	109.9	10.4	154.7

[a] At pH 7.0. Errors are ±0.5 ºC.
[b] Difference in the T_m value between the two redox forms.
[c] At 25 ºC and pH 6.0. Errors are ±2 mV.

[結論] 好熱性水素細菌シトクロムc_{552} において軸配位子Met59と主鎖同士の水素結合を形成するGly50は、Gly特有の主鎖のコンフォメーションにより、Met59を含むループの構造の安定化を通して、このタンパク質の高い酸化還元電位の維持に寄与していることが明らかになった。

[参考文献]

[1] C. Travaglini-Allocatelli *et al*., ***J***. ***Biol***. ***Chem***., 280, 25729-25734 (2005).
[2] H. Tai *et al*., ***Biochmistry***, 50, 3161-3169 (2011).
[3] H. Tai *et al*., ***J***. ***Inorg***. ***Biochem***., 108, 182-187 (2012).

P36

Solution structure and dynamics of C-ter100 domain of Vibrio extracellular metalloprotease derived from *vibrio vulnificus*

Ji-Hye Yun[1], Heeyoun Kim[1], Jung Eun Park[2], Jung Sup Lee[2] and Weontae Lee[1]

[1]*Department of Biochemistry, College of Life Science and Biotechnology, Yonsei University, Republic of Korea.*

[2]*Department of Biotechnology, College of Natural Sciences, Chosun University, Republic of Korea.*

Extracellular matalloprotease (vEP) secreted by *vibrio vulnificus* ATCC29307 is a 45-kDa proteolytic enzyme having pro-thrombin activation and fibrinolytic activities during the infection. It could lead a rapid build-up of fibrin mess that can serve to protect the bacteria from the host defense machinery. Although structural studies of vEP are essential for understanding the mechanism of wound infection and septicemia, so far there is no structural information known. C-ter100 region is a distinctif part existing in metalloprotease series of vibrio bacteria, a genus of Gram-negative bacteria, in most of cases.To understand how C-ter100 region modulates proteolytic activities of vEP, structural studies on it were carried out using NMR spectroscopy. Heteronuclear NMR experiments for backbone resonances and NOE assignments were executed on a Bruker DRX 900MHz with Cryoprobe^{TM}. NOE constraints derived from ^{15}N-edited and ^{13}C-edited NOESY together with angle constraints based on TALOS analysis were used for structure calculation.

According to the solution structure and protein dynamics result, C-ter 100 of vEP consists of eight anti-parallel β-strands which is a novel fold with unique β-barrel and reveals quite rigid structural properties. Using DALI server, we found that C-ter 100 of vEP had very similar structure with collagen binding domain of collagenase although low sequence homology between them. C-ter domain of vEP could bind collagen because the structure might have two metal ion (Ca^{+2} or Li^{+2}) binding sites similar to collagen interacting proteins.

Vibrio Extracellular Metalloprotease (vEP), Wound infection and septicemia, Anti-parallel β-Sheets.

Our structure proposes that C-ter100 region of vEP could interact with collagen during the modulating a process of proteolytic activities in the infect pathway systematically.

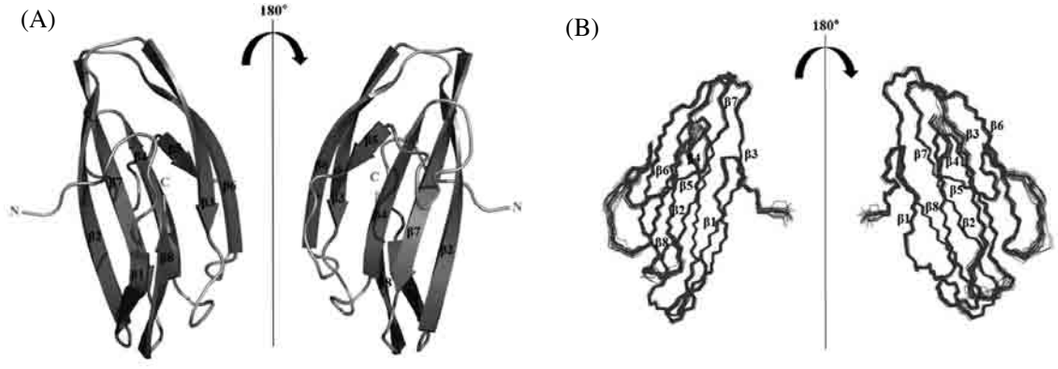


Figure 1. NMR structures of vEP C-ter100 (A) Overall topology of vEP C-ter100 represented by ribbon diagram shows secondary structures. Structures are drawn by program Pymol. Eight β-strands are represented complementary polar interaction between near two β-strands (B) The backbone superposition of final 20 structures over the energy-minimized average structure. The NMR structures were overlapped on the basis of the backbone atoms C_α, CO and NH.

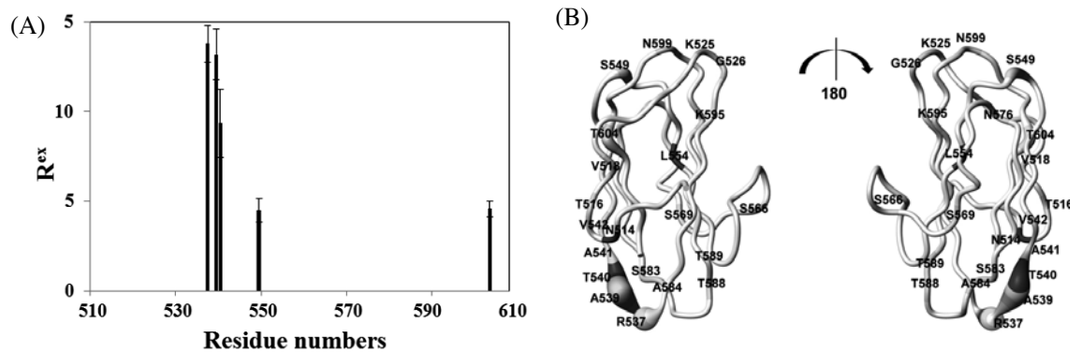


Figure 2. Backbone dynamic profile of vEP C-ter100. (A) Optimized values of the generalized exchange parameters and (B) Dynamic regions are annotated in blue on the structure of C-ter100.

P37

キャビティが決める蛋白質構造の揺らぎ：T4 リゾチームの ^{13}C-, ^{15}N-, ^{1}H-高圧 NMR

○前野覚大[1,2],北原亮[2,3], 横山茂之[4,5],F.W.Dahlquist[6], F.A.A.Mulder[7], 赤坂一之[1,2]
[1]近大・高圧蛋白研センター、[2]理研・SPring-8、[3]立命大・薬、[4]東大・院理、[5]理研・生命分子システム基盤、[6]カリフォルニア大サンタバーバラ・生化、[7]オーフス大・化

Crucial roles of cavity in the conformational fluctuation of a protein: A high pressure ^{13}C-, ^{15}N-, ^{1}H-NMR study of T4 lysozyme

○Akihiro Maeno[1,2], Ryo kitahara[2,3], Shigeyuki Yokoyama[4,5], F.W.Dahlquist[6], F.A.A.Mulder[7], Kazuyuki Akasaka[1,2]
[1]High Pressure Protein Research Center, Kinki University, [2]RIKEN SPring-8 center, [3]College of Pharmaceutical Sciences, Ritsumeikan University, [4]Graduate School of Science, University of Tokyo, [5]RIKEN, Systems and Structural Biology Center, [6]Department of Chemistry and Biochemistry, University of California Santa Barbara, USA, [7]Department of Chemistry, University of Aarhus, Denmark

In order to understand a role of internal cavities for conformational fluctuation, we have investigated pressure effects on the cavity enlarged protein, L99A mutant of T4 lysozyme by high pressure NMR spectroscopy (3-300 MPa). Below 150 MPa, the ^{1}H-^{13}C resonance intensities were preferentially reduced at side-chain methyl groups lying enlarged core cavity, indicating that local disorders of core cavity with water penetration. Above 150 MPa, the peak reduction was extended to the periphery region of all cavities, indicating that conformational transition into the high energy intermediate conformers accompanying an internal hydration of molecule. Interestingly, this intermediate conformer has closely similar structural characteristics to exited-state conformer characterized by NMR R_2 dispersion technique, in which aromatic ring of Phe114 is flipped into core cavity along with a reorientation of F-helix. These results reveal that internal cavity of a protein has a crucial role to produce the unique conformational fluctuation for individual molecules coupled with its hydration.

緒言： 多くの球状タンパク質はその内部に不十分なパッキングにより形成される大小様々な空隙（キャビティ）を有している。その存在がタンパク質の安定性や動的構造に影響を及ぼす事は古くから知られているが、タンパク質構造揺らぎにおけるキャビティの役割については十分に理解されていない。我々は、T4リゾチーム野生型（WT）及び分子内コアのキャビティを肥大化させた変異体L99Aをモデルとして、タンパク質の動的構造における分子内キャビティの関わりを多次元高圧NMR法により調べた。

キーワード：構造揺らぎ，分子内キャビティ，高圧NMR

○まえのあきひろ，きたはらりょう，よこやましげゆき，F.W.ダルクィスト，F.A.A.ムルダー，あかさかかずゆき

実験： ^{13}C, ^{15}N同位体標識したT4リゾチーム pseudo wild type(C54T/C97A)とその変異体L99Aを作成し、それぞれの試料について30から3000気圧までの範囲で^{15}N-TROSY測定、^{13}C-HSQC測定を行った。(25℃, pH6.0)

結果と考察：

コアキャビティの選択的水和とカップルした側鎖揺らぎ

^{13}C-HSQCと^{15}N-TROSY測定において得られた信号強度の圧力依存性をWTとL99A変異体で比較解析した。得られた各相関信号は加圧に伴い連続的なシフト変化を示したが、低圧領域（<1500気圧）において、L99Aの大きな疎水キャビティを囲む側鎖メチル基の信号強度が選択的に消失した。これら信号消失に伴う典型的な変性信号の出現は認められないことから、残基側鎖の不均一性が圧力下で増したことに因る高度な信号の広幅化と考えられる。他方、同圧力範囲では、コアキャビティ周辺のTyr88とLeu97を除いた主鎖アミド基の信号強度に関して明確な変化は認めらなかった。このことは、分子全体では最安定なfold構造（いわゆる天然構造）が維持されていることを示しており、分子内キャビティ周辺領域が局所的に弱くフォールドした構造多形の存在が示唆される。また、L99Aの大きなキャビティに対する選択的な水和が2000気圧までの間で段階的に生じることがこれまでの高圧X線結晶構造解析と分子動力学計算によって示されており（Collins et al., *PNAS* (2005)）、これら低圧領域で観測された著しい側鎖揺らぎは、コアキャビティの選択的な水和とカップルして生じると考えられる。

内部水和を伴う高エネルギー構造への転移

1500気圧を超える圧力範囲では、多くの主鎖アミド基および側鎖メチル基で顕著な信号強度の減少が観測されたが、それらの相関信号は共通して分子内に散在するキャビティ周辺の残基に由来していた。このことは、低圧領域で観測されたコア領域に限定的なfold構造の揺らぎが、内部水和の進行と共に増大していく状況を示している。

興味深いことに、3000気圧下で顕著な強度減少を示したアミノ酸残基の立体構造上における分布が、これまでの横緩和分散法によって特徴づけられた励起構造のそれと酷似していた。L99Aの励起構造では、Phe114の芳香環がコアキャビティに対してフリップ・インするが、その影響により環電流シフトが大きく変調を受けた残基と高圧力下で顕著な強度減少を生じた側鎖の間に高い相関が認められた。このことから、高圧下で安定化された高エネルギー構造アンサンブルにこの様な構造的特徴を持つ励起状態の構造が含まれており、それらは状態間をμs-msタイムスケールで遅く揺らいでいると考えられる。

WTから保存されたL99Aのfold構造アンサンブル内の揺らぎ

また、WTにおいても、規模は小さいながらL99Aと酷似した信号強度の圧力応答が観測された。このことから、優先的に生じるコアキャビティの選択水和を伴う周辺側鎖に特異的な揺らぎと、その後のfold構造の揺らぎが内部水和の促進と共に増大していく過程はWTから保存されている事が示され、L99Aでは変異の効果により構造揺らぎが強調されて見えたと考えられる。これらの結果より、タンパク質の動的構造におけるキャビティは重要な因子であり、自身の水和/脱水和とカップルしながらそのタンパク質構造に特有の揺らぎを連続的に作り出していることが明らかとなった。

P38

気孔密度を調節するペプチドホルモンの構造と機能

○大木進野[1]，竹内誠[1]，森正之[2]
[1]北陸先端科学技術大学院大学
[2]石川県立大学

Structure-function relationship of peptide hormones regulating stomatal density

○Shinya Ohki[1], Makoto Takeuchi[1], and Masashi Mori[2]
[1]*Japan Advanced Institute of Science and Technology (JAIST), Ishikawa, Japan.*
[2]*Ishikawa Prefectural University, Ishikawa, Japan.*

Gas exchange in land plants is mediated by stomata, small pores formed by guard cells in the epidermal tissues on the surface of leaves and stems. Stomatal density is regulated by cysteine-rich secretory hormone peptides categorized as EPIDERMAL PATTERNING FACTORs (EPFs). Among them, only stomagen is the positive regulator, while EPF1, EPF2, and possibly others are negative regulators. To understand why homologous peptides in the same family exert opposite functions, we determined the solution NMR structure of stomagen. Stomagen adopts a novel fold composed of a 14-residue loop and a scaffold containing three disulfide bonds. Moreover, activity measurements using stomagen/EPF2 mutants designed with the structural information suggested that the loop confers the function of EPFs.

【はじめに】　植物の葉の表面にはガス交換のために気孔という穴がある。この気孔の数（密度）はEPF（epidermal patterning factor）ファミリーと呼ばれる一連の分泌性ペプチドホルモンによって制御されていることが近年明らかにされつつある。シロイヌナズナにはSS（ジスルフィド）結合を多く持つ11種類のEPFペプチドが存在する。そのうちストマジェンと呼ばれるペプチドのみが気孔密度を増加させ、おそらく他の全てのEPFペプチドは気孔密度を減少させることが2010年に報告された。同一のEPFファミリーに属するペプチドが全く逆の生理活性をどのように発現しているのかという構造-機能の関係に大きな関心が寄せられるようになった。そこで本研究では、ストマジェンの立体構造を溶液NMR法で決定し、その結果をもとにした変異体の実験を通して機能を担う部位の特定を行った。

【実験方法】　ストマジェンは分子内に3組のSS結合を持っており、大腸菌を利用した試料発現と巻き戻しの方法では必要十分な質と量の試料が調製できなかった。そこで我々は、光合成をしない植物培養細胞に誘導可能なウイルスベクターを組み込んだ独自の系を用いてストマジェンとその変異体を調製した。^{15}N標識されたKNO_3とNH_4NO_3、^{13}C標識されたシュークロースもしくはグルコースをそれぞれ窒素・炭素源に利用して均一安定同位体標識を達成した。試料の立体構造形成と精製に有利なように小胞体移行シグナル配列とHisタグを酵素切断配列に連結してN末端に付加した分子を発現し、アフィニティカラムと酵素によるタグの切断でストマジェンおよびその変異体を精製した。NMR測定、データ解析、立体構造決定は定法に則って行った。

peptide hormones, structure-function relationship, stomata

○ おおきしんや、たけうちまこと、もりまさし

【結果と考察】　液体培地100mL程度で培養した細胞から1～数ミリグラムの試料を得ることが出来た。質量分析で確認したところ、標識試料の標識率は＞95％と見積もられた。また、酵素消化と質量分析のデータから、全ての試料においてSS結合が均一に形成されていることが示された。^{1}H-^{15}N HSQCスペクトル（図1b）は、この方法で調製されたストマジェンがひとつのコンフォメーションをとることを強く示唆していた。さらに、シロイヌナズナの葉に試料ストマジェン溶液を振りかけると気孔の数を増やす働きを示すことも確認できた。以上のことから、SS結合を多く含む試料を巻き戻し操作なしで調製できたと判断した。

ストマジェンの立体構造を図1cに示す。ストマジェンは、1組のβストランドから成るβシートが1回転の3_{10}ヘリックスで裏打ちされた土台構造と、そこから伸びた14残基のループを持っていることが明らかになった。土台部分には3組のSS結合があり、これらのおかげで立体構造が安定化されていることがSS欠損変異体を用いた実験から明らかになった。EPFファミリーのアミノ酸配列のアラインメントでは、土台部分の相同性が非常に高く、ループ部分に多様性が見いだされた。よって、ループ部分が機能を担っているのではないかと予想された。

そこで、気孔の数を増やすストマジェンと気孔の数を減らすEPF2のループ部分を交換したキメラを作製して活性を測定した。その結果、ストマジェンのループを持つキメラは気孔の数を増やし、EPF2のループを持つキメラは気孔の数を減らすことがわかった（図1d）。従って、EPFファミリーのペプチドホルモンはループ部分が機能部位であると結論づけられた。

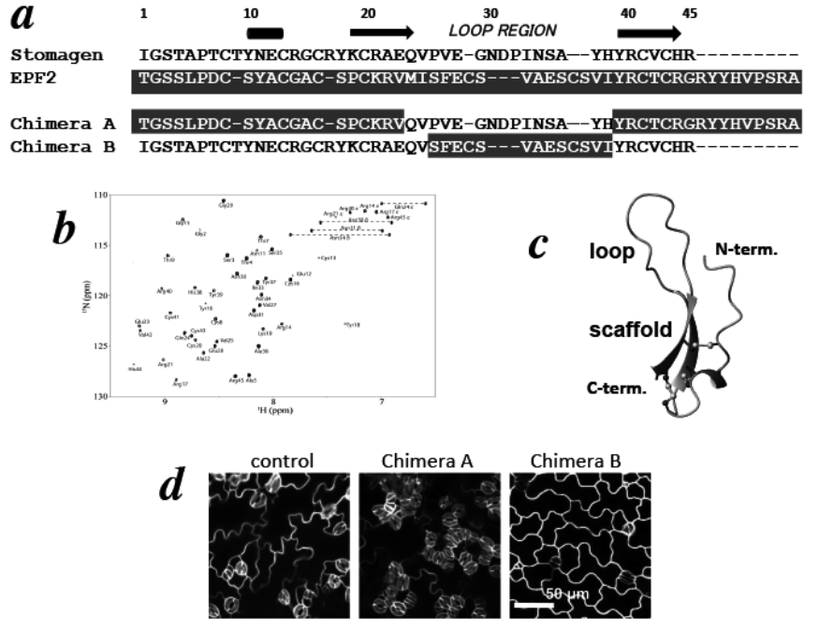


Figure 1. structure-function relationship of stomagen. (a) amino acid sequences of stomagen and its related peptides, (b) ^{1}H-^{15}N HSQC of stomagen, (c) a ribbon model of stomagen, and (d) results of external application experiments of the stomagen/EPF2 chimera peptides.

P39

ヒストンシャペロンhNap1のC末酸性ドメインとヒストンH2A/H2Bの相互作用

○森脇義仁[1]，奥脇暢[2]，永田恭介[2]，戸所泰人[1]，佐藤昌彦[1]，長土居有隆[1]，西村善文[1]
[1]横浜市大・生命ナノシステム・生体超分子システム科学
[2]筑波大院・人間総合科学研究科

Interaction between H2A/H2B heterodimer and the acidic domain of histone chaperone hNap1

○Yoshihito Moriwaki[1], Mitsuru Okuwaki[2], Kyosuke Nagata[2], Yasuto Todokoro[1], Msahiko Sato[1], Aritaka Nagadoi[1] and Yoshifumi Nishimura[1]
[1]Grad. Sch. of Nanobioscience, Yokohama City Univ.
[2]Grad. Sch. of Comprehensive Human Sciences, Univ. of Tsukuba

Human nucleosome assembly protein 1 (hNap1) is one of histone chaperones which is closely related to dissociation and association of histones in chromatin. Although it is shown that hNap1 interacts with H2A/H2B, the interaction mechanism has not yet been solved. Here, we showed that the isolated C-terminal acidic domain (CTAD) of hNap1 can bind to H2A/H2B. We found that the N-terminal and C-terminal helices of H2A in nucleosome core (NCP) are disordered in the isolated H2A/H2B by NMR. However, after the binding to CTAD of hNap1 the N-terminal α-helix is induced in H2A. Furthermore, we revealed that CTAD binds to two separate regions of H2A/H2B ; one is a basic amino acid rich region (BP) bound by an aspartic amino acid segment of CTAD, and the other is a rather hydrophobic region (HP) recognized by a proline and tyrosine containing segment of CTAD.

真核生物の遺伝子の発現はクロマチン構造の再構成によって制御されている。クロマチン構造の単位であるヌクレオソームコア（NCP）は147塩基対のDNAと4種類のヒストンH2A、H2B、H3、H4の二量体からなるヒストン八量体で形成されている。遺伝子発現が行われている領域ではNCPは解離しており、発現が抑制されている領域ではNCPが形成されている。NCPの形成は、最初にH3/H4四量体がDNA上に配置し、次に二つのH2A/H2Bヘテロ二量体がDNA－$(H3/H4)_2$複合体に結合する。NCPの解離は逆の過程で進む。NCPの形成と解離にはヒストンシャペロンの助けが必要である。ヒトのヒストンシャペロンであるhuman nucleosome assembly protein 1 (hNap1) はH2A/H2Bと相互作用することが示されているが、そのメカニズムは未解明である。我々はプルダウン実験によりhNap1の天然変性領域であるC末酸性ドメイン(CTAD)が欠損するとH2A/H2Bとの相互作用が低下することを示した。同時にCTADは直接H2A/H2Bと相互作用することも示した。次に我々はNMRを用いたH2A/H2BとCTADとの相互作用解析を行った。H2A/H2Bの溶液構造解析により、NCPから解離したH2A/H2BはH2AのN末のαヘリックスとC末の二次構造が失われていることを明らかにした。そのH2AのN末領域はCTADが結合することで再びαヘリックスを形成することが分かった(Fig. 1)。さらにCTADの認識領域をコアドメインに二か所特定した。塩基性アミノ酸に富む領域（BP）と少し疎水的な領域（HP）で、それぞれ静電的相互作用と疎水性相互作用により結合する(Fig. 2)。一方CTAD側の結合領域も特定し、アスパラギン酸が連続する領域とチロシン/プロリンを含む領域がH2A/H2Bとの特異的結合に重要であることを明らかにした。これらの結果はhNap1のヒストンシャペロンとしての機能を解明する上で重要な知見である。

H2A/H2B, Nap1, ヒストンシャペロン

○もりわきよしひと，おくわきみつる，ながたきょうすけ，とどころやすと，さとうまさひこ，ながどいありたか，にしむらよしふみ

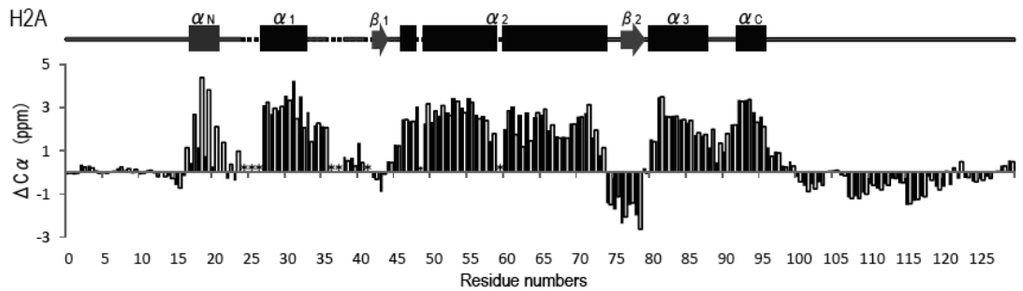


Fig. 1 The chemical shift indexes of H2A in H2A/H2B heterodimer in its free (black bar) and CTAD-bound state (white bar) based upon Cα chemical shifts. Asterisks indicate unassigned residues. The secondary structure of H2A in H2A/H2B bound to CTAD was indicated on the upper side. Boxes, arrows, and dashed line represent α-helices, β-strands, and unassigned residues, respectively.

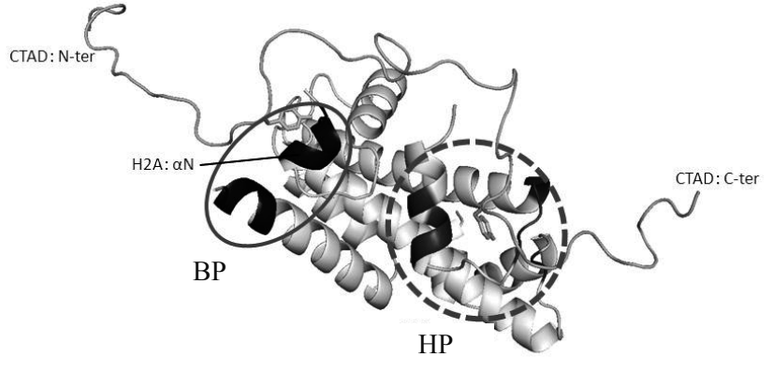


Fig. 2 The proposed structure of H2A/H2B core bound to CTAD. BP and HP regions are shown in closed and dashed circles, respectively.

P40

Structural Studies of plant telomere binding proteins and their binding mechanism to telomeric DNA

Inhwan Lee[1], Ji-Hye Yun[1], Myeon Haeng Cho[2], and Weontae Lee[1]
[1]*Department of Biochemistry, Yonsei University, Seoul, Korea.*
[2]*Department of Biology, Yonsei University, Seoul, Korea.*

Telomeres are crucial for keeping chromosome integrity during cell cycle. They consist of tandem repeats of TTAGGG in vertebrates or TTTAGGG in higher plants. Telomere binding proteins in many organisms have been extensively identified and characterized. The myb-like domain is a conserved DNA binding domain to bind telomeric DNA repeats. The DNA binding domains of telomere binding proteins recognize specific telomere DNA repeats and make DNA complexes which may modulate the length of telomere. The telomere DNA binding specificity is determined by a well conserved DNA binding myb-like domain. Most mammalian myb-like domains consist of three α-helices while most plant myb-like domain structures determined so far have additional C-terminal extension.

We started NMR studies of myb-like domain of two plant telomere binding proteins, AtTRB2 (*Arabidopsis thaliana* telomeric repeat binding factor 2), and AtTRF1 (*Arabidopsis thaliana* telomeric repeat binding factor 1). Secondary structure prediction based on the sequence information suggests that the myb-like domains of AtTRF1 and AtTRB2 have no C-terminal extension thus has only three α-helices. This is similar to that of human TRFs (hTRF1 and hTRF2) which also lack the c-terminal extension. However, our NMR chemical shift perturbation and other data indicate these two plant telomere binding proteins may have different DNA binding mechanisms. The data show that while AtTRF1 binds only to plant telomeric DNA sequence repeat (TTTAGGG), AtTRB2 has higher affinity to human DNA sequence.

To determine the solution structure of AtTRB2, 13C/15N labled AtTRB2 was over-expressed in *E.coli* and the conventional backbone and NOE experiments were performed. NOE and TALOS were used for distance constraints and angle constrain, respectively. CYANA 2.2.1 version was used for structure calculation and PROCHECK.

Structure of AtTRB2 reveals three α-helices lacking additional myb-extension as predicted. Myb-like domain structures of other plant telomere binding proteins published so far (AtTRP1, NgTRF1 and RTBP1) have c-terminal myb-extension unlike to human telomere binding proteins. Electro mobility shift assay (EMSA) and Isothermal titration calorimetry (ITC) data show that AtTRB2 binds to human telomeric DNA with higher affinity than to plant DNA, thus suggests similar binding mechanism of this protein and human TRFs. Moreover, in the solution structure of AtTRB2, the side chain conformations of the residues Leu16, Val20, and Ile31, which are the three of highly conserved hydrophobic core resides in human and plant TRFs, are more similar to those of human telomere proteins than to those of plant telomere proteins.

Telomere binding proteins, myb-like domain, AtTTRF1, AtTRB2

In contrast, AtTRF1, which is another telomere protein in Arabidopsis predicted to have three α-helices, was found to interact with only plant DNA (TTTAGGG) by our EMSA data. We started NMR studies on AtTRF1, to elucidate the different DNA binding mechanism with AtTRB2. Purification and the results of backbone and side chain NMR experiments will be presented.

From our results of NMR and other biophysical experiments of two plant telomere proteins which lack the c-terminal extension region, the unique features of the DNA binding mechanisms of these plant telomere binding proteins will be elucidated and this could help in understanding the differences of DNA binding mechanisms in various species in terms of the evolution.

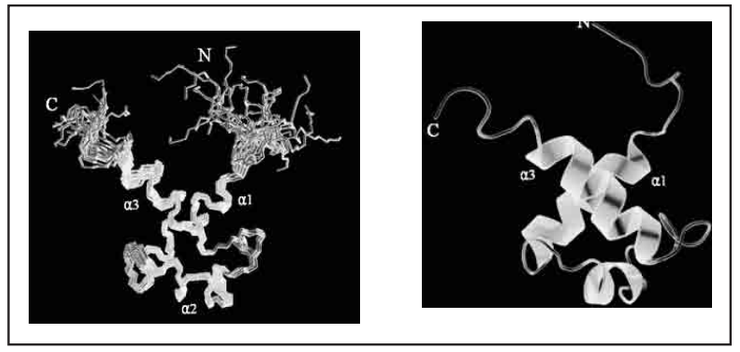


Figure 1. Solution structure of AtTRB2

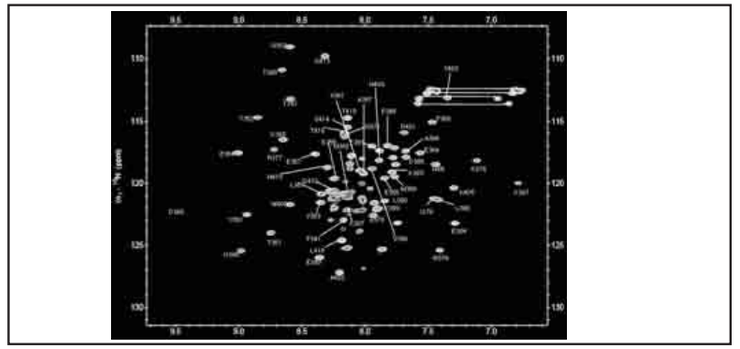


Figure 2. Backbone resonance assignment of AtTRF1

P41

NMRによるマルチドメインタンパク質PKCの構造解析

秋吉　克昴[1]、金場　哲平[1]、前崎　綾子[1,2]、宮崎　健介[1]、
伊藤　隆[1]、○三島　正規[1]
[1]首都大・理工、[2]奈良先端大・バイオ

NMR studies of the multidomain protein PKC

○Katsutaka Akiyoshi[1], Teppei Kanaba[1], Ryoko Maesaki[1,2], Kensuke Miyazaki[1], Yutaka Ito[1] and Masaki Mishima[1]
[1]*Graduate School of Science and Engineering, Tokyo Metropolitan University, Tokyo Japan*
[2]*Graduate School of Biological Science, Nara, Japan.*

Structural determination of a multidomain protein consists of inter-domain flexible linkers and weak intramolecular interactions is an interesting issue but it is often technically difficult. Protein kinase C alpha (PKCα), a multidomain protein, locates at cytoplasm in an auto-inhibited state by inter domain interactions. When PKCα is activated by second messengers, Ca^{2+} and diacylglycerol (DAG), PKCα adopts a large conformation change and localizes at plasma membrane, and thus phosphorylates cognate substrates. As a first step of obtaining structural information of full length PKCα, we have prepared each domain. We plan to reconstitute full length PKCα by ligation reaction, and will also discuss usage of PRE derived from spin labeling to obtain long-range distance information.

マルチドメインタンパク質は各ドメインが柔軟なリンカーで結合していることや、ドメイン間の相互作用が過渡的で弱いなどの点から、しばしば、結晶構造解析が困難である。本研究ではタンパク質連結反応や NMR による常時性緩和効果の観測によって、マルチドメインタンパク質の全体構造の解析することを目的としている。

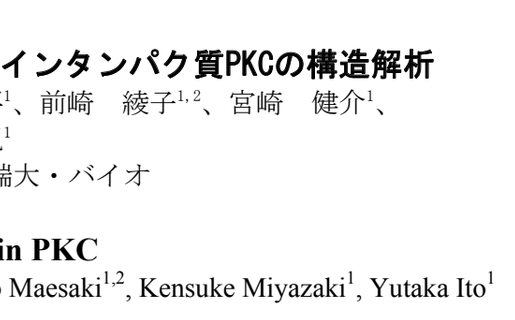


Fig.1 4.0 Å Crystal structure of PKCβII[(1)]
Protruded C2 domain by crystal packing is indicated by an arrow.

対象の一つとして、Protein kinase C (PKC)の構造解析を試みている。PKCαでは N 末端の調節領域に存在する偽基質領域による自己阻害のため不活性化状態で細胞質に存在し、セカンドメッセンジャーである Ca^{2+}やジアシルグリセロール(DAG)によって活性化されると、細胞膜に移動し基質をリン酸化する。調節領域には 3 つのドメイン、C1A および C1B ドメイン(DAG 結合ドメイン)と C2 ドメイン(Ca^{2+}結合ドメイン)が存在し、C 末端領域にキナーゼドメインがある。

2011 年 PKCβII の結晶構造が発表されたが、C1A ドメインの電子密度は観測されず、C2ドメインはパッキングにより飛び出していた。

常磁性緩和効果、マルチドメインタンパク質、PKC
あきよしかつたか，かなばてっぺい、まえさきりょうこ、みやざきけんすけ、いとうゆたか、○みしままさき

【結果と考察】

我々は、溶液中での全長の構造解析を目指し、各ドメインである C1A、C1B、C2、kinase、また、タンデム C1BC2、タンデム C1A-C1B-C2 領域の精製を行った。溶解性を向上させる変異を導入することで、従来、大腸菌の発現系では調製ができなかった C1A ドメインの NMR 測定に成功した。また Cho らによって[(2)]、モデリングや間接的なデータから提唱されていた C1A と C2 ドメインの相互作用を NMR を用いて実際に検出することに成功した(Fig. 2)。Leonard T.A.らの結晶構造では[(1)]、この相互作用は見られておらず、溶液状態では結晶構造とかなり異なるドメイン配置である可能性が高い。今後、他のドメイン間相互作用の検討も行い、さらにタンパク質連結反応をもちいて全長 PKC を再構成し、常時性緩和効果による距離情報の取得を行っていきたい(Fig. 3)。

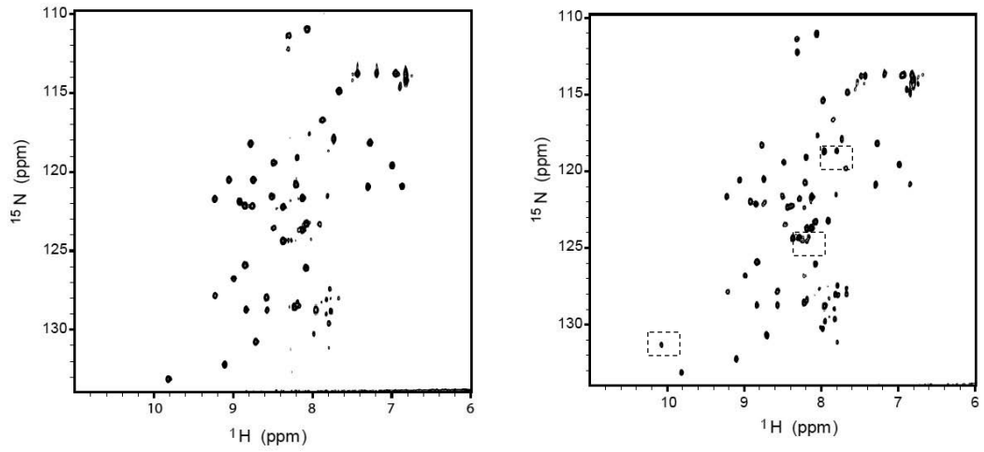


Fig.2 Binding analysis of C1A domain with C2 domain
^{1}H-^{15}N HSQC spectra of C1A domain (left panel) and C1A domain with C2 domain (1:1) (right panel). Appeared signals upon binding are boxed in the right panel.

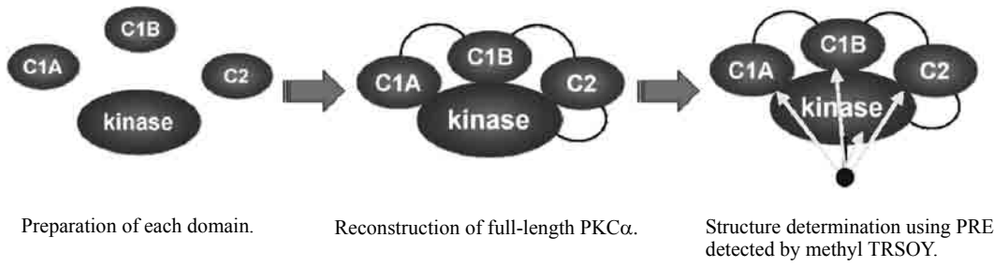


Fig.3 Strategy of structural determination of full length PKC

(1) Leonard, T.A., et al. Cell (2011) 144 55-66
(2) Stahelin, R.V. et al. J. Biol. Chem. (2005) 280 36452-36463

P42 ケモカインシグナル制御因子 FROUNT の構造生物学的研究

○吉永壮佐[1]，辻辰一朗[1]，薗田晃弘[1]，石田規人[1]，土屋祐輔[1]，
江崎芳[1]，寺島裕也[2]，遠田悦子[2]，齊藤貴士[3]，神田大輔[3]，
嶋田一夫[4]，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]東京大学大学院薬学系研究科

Structural analyses of FROUNT, the regulator of chemokine signaling.

○Sosuke Yoshinaga[1], Tatsuichiro Tsuji[1], Akihiro Sonoda[1], Norihito Ishida[1], Yusuke Tsuchiya[1], Kaori Esaki[1], Yuya Terashima[2], Etsuko Toda[2], Takashi Saitoh[3], Daisuke Kohda[3], Ichio Shimada[4], 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]Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo, Tokyo, Japan.

Chemokine-dependent migration of the leukocytes to sites of inflammation is essential for immune defense, but also causes autoimmune inflammatory diseases. We previously identified a regulator of the chemokine signaling, FROUNT, which specifically binds to the C-terminal regions (Pro-Cs) of chemokine receptors CCR2 and CCR5. The aim of this study is to elucidate the Pro-C recognition mechanism of FROUNT. We report here the identification of the structural domain of FROUNT (FNT-C), retaining the CCR2-binding activity. We also revealed the three-dimensional structure of FNT-C and its CCR2-binding sites by NMR. We built a docking model of FNT-C and CCR2 Pro-C, using our previous results on the CCR2 Pro-C structure. Current studies of the FROUNT–CCR2 interaction provide a structural basis to develop anti-inflammatory agents with high specificity.

【背景・目的】

白血球はケモカインに誘引され、炎症部位へ速やかに集積する。白血球の遊走は、重要な生体防御反応である一方で、自己免疫性の炎症性疾患を誘発する。我々は、ケモカイン受容体 CCR2 に結合する遊走制御因子 FROUNT を見出した[1)]。さらに、FROUNT が、約２０種類の受容体のうち CCR2 と CCR5 の C 末端細胞膜近傍領域（Pro-C）に高い選択性をもって結合することを明らかにした[2)]。FROUNT―ケモカイン受容体の相互作用は、炎症性疾患治療薬の創薬ターゲットとして極めて有力である。

（キーワード）ケモカイン，GPCR，分子認識

（著者ふりがな）○よしながそうすけ，つじたついちろう，そのだあきひろ，いしだのりひと，つちやゆうすけ，えさきかおり，てらしまゆうや，とおだえつこ，さいとうたかし，こうだだいすけ，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、FROUNT の CCR2 結合ドメイン（FNT-C）の立体構造を決定し、ケモカイン受容体認識機構を解明することで、ケモカインシグナルの制御、および、炎症性疾患治療薬の開発における構造学的基盤を確立することを目的とする。

【方法】大腸菌の大量発現系において、安定同位体標識した栄養源を含む M9 最少培地を用いることで FNT-C の安定同位体標識体を得た。定法に従って、^{1}H, ^{13}C, ^{15}N 核の多次元 NMR スペクトルを用いたシグナル帰属を行い、NOE 情報に基づいて立体構造計算を行った。スペクトル解析には Olivia、立体構造計算には CYANA を用いた。また、FNT-C―CCR2 Pro-C の結合能は、HTRF (homogeneous time resolved fluorescence) 法にて測定した。

【結果・考察】CCR2 Pro-C 結合を担う FROUNT 上の構造ドメインを同定するため、CCR2 結合領域を含む FROUNT の C 末端領域について ^{13}C^{15}N 標識体を調製し、主鎖のシグナル帰属を完了した。{^{1}H}-^{15}N NOE に基づく運動性の解析から、N 末端に３０残基程度のフレキシブルな領域を含むことを明らかにし、構造ドメインを同定した。フレキシブル領域を欠損したコンストラクトを調製し、溶解度が向上していること、および、CCR2 Pro-C 結合能を保持することを確認した。次に、^{13}C^{15}N 標識体を用いて主鎖および側鎖のシグナル帰属を完了し、FNT-C の立体構造決定に成功した。FNT-C は、５本のαヘリックスからなるヘリカルバンドル構造をもつことを明らかにした。

FNT-C 上の CCR2 Pro-C 結合部位を同定するため、^{15}N 標識 FNT-C に対して CCR2 Pro-C を滴定し、^{1}H–^{15}N HSQC スペクトルのシグナル変化を解析した。その結果、４本目と５本目のαヘリックス上のアミノ酸残基において、化学シフトおよびシグナル強度の変化が見られた。これらのアミノ酸は、FNT-C の立体構造上、疎水性パッチを形成していることを明らかにした。

我々は、昨年度の年会において、FROUNT 結合時の CCR2 Pro-C の立体構造、さらには、転移交差飽和法を用いた CCR2 Pro-C の FROUNT 結合面の同定について報告した。これらの結果と今回の FNT-C の構造解析結果に基づき、FNT-C と CCR2 Pro-C の複合体モデルの構築を行った。FNT-C―CCR2 Pro-C 相互作用において、疎水性相互作用が主であること、および、静電相互作用が一部関与していることが示唆された。

以上の解析結果に基づいて、FROUNT による CCR2 活性化機構について議論する。

本結果は、ケモカインシグナルを制御する新規の細胞内タンパク質の立体構造とそのケモカイン受容体認識機構を明らかにしたものであり、特異性の高い炎症性疾患治療薬の論理的設計等への応用・展開が期待される。

【参考文献】 1) Terashima Y. *et al.*, *Nature Immunology*, **6**, 827–835 (2005)
2) Toda E. *et al.*, *Journal of Immunology*, **183**, 6387–6394 (2009)

【謝辞】本研究の一部は、文部科学省ターゲットタンパク研究プログラム、および、科学研究費補助金・若手研究（B）（19790064, 21790082）の助成を受けて行われた。また、大阪大学蛋白質研究所の超高磁場 NMR（950 MHz）共同利用研究のもとで行われた。

P43

タンパク質リンカー変異を用いた残基特異的化学シフト異方性テンソル決定技術

○玉利　佑[1], 徐 宇[1], 楯　真一[1]
[1]広島大・院理・数理分子生命理学

Determination of the residue-specific ^{15}N chemical shift anisotropy by using the loop length variant mutants

○Yu Tamari[1], Ning Xu[1], and Shin-ichi Tate[1]
[1]Department of Mathematical and Life Sciences, Hiroshima University, Hiroshima, Japan

Chemical shift anisotropy (CSA) of nuclear spin contains profound structural information more than that expected from an isotropic chemical shift. CSA sensitively changes according to the electron re-distribution around the nuclear spin, which is caused by forming chemical bonds, conformational change, and the other chemical environmental changes. In protein, the amide ^{15}N CSA is the sensitive source to see the local conformational changes and the re-arrangement of the chemical bonds according to the intra- and inter-molecular interactions. The full utilization of the ^{15}N CSA derived information requires the residue specific values. Determination of ^{15}N CSA tensor in a residue specific manner is not a trivial work; it requires multiple aligned states having the different orientation angles against the magnetic field. In this work, we propose an approach for achieving different aligning states to allow the ^{15}N CSA determination, in which a series of di-domain proteins having different inter-domain linker length. This approach would give a general way to determine the residue-specific ^{15}N CSA tensors and thus pave the way to use the values as general structural sources in protein structure analysis.

Determining the residue-specific ^{15}N CSA tensor requires achieving the multiple aligning states, in which protein differently orient relative to the external magnetic field. There are reported various aligning media to align protein to measure the residual dipolar couplings, RDCs. Each medium has different mechanism to achieve protein alignment, thus, allowing different aligning states. However, the combined use of the existing media does not allow the enough variations in the aligning states required for the ^{15}N CSA tensor in a residue specific manner; in general, it may allow just two or three different aligning states. The minimal required number of the different aligning states is five, which is the number of independent elements in the Saupe order matrix.

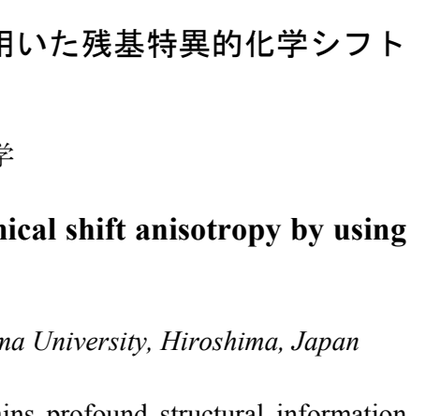


Fig.1: Pin1 protein, which comprises two domains linked by a flexible linker

chemical shift anisotropy, protein structure, residual dipolar coupling

○たまり　ゆう，じょ　にん，たて　しんいち

The limited ability of the aligning media in achieving multiple aligning states should be overcome by modifying the protein architectures. In our approach, we used a series of mutants having two domains, each of which has different linker length. In this work, we used Pin1 protein that has two domains linked by a flexible linker. The variation to the linker length in this protein should alter the overall molecular shape, thus lead to the different aligning state for each linker mutant.

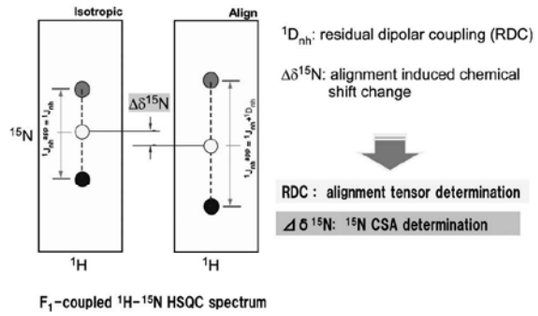


Fig.2: ^{15}N CSA tensor determination from a set of IPAP-HSQC spectra collected for the isotropic and aligned protein samples.

In respect to the chemical shift reading, which is sensitive to solution conditional change, we used the stretched acrylamide gels to align the protein. For recoding the isotropic data, the non-stretched gel was used to reduce the biases in the chemical shift changes caused by the protein contact to the media; the combined use of the isotopic and stretched gels allows the isotropic chemical shift changes caused solely by the weak alignment. The isotropic chemical shift for each ^{1}H-^{15}N correlation signal was measured from a pair of split peaks on a IPAP-HSQC spectrum, which makes the alignment tensor and the ^{15}N CSA tensor determined simultaneously, Fig. 2.

In the present work, we have achieved17 variations of the aligning states using seven variant proteins and three different gel compositions; some of the conditions showed apparently the same aligning states or did not align to an appropriate extent.

We also refined the PPIase domain of Pin1 using over 2,000 distance restraints, three types of RDC restraints, hydrogen bonding data base restraints, and experimental and chemical shift based backbone torsion angle restrains, which was essential to get the accurate ^{15}N CSA values because of the their sensitivities of the peptide plane orientations to the magnetic field.

In the poster presentation, we are going to report the residue specific ^{15}N CSA tensor values obtained in this work. We will also discuss how the ^{15}N CSA tensor values represent the local structural environments.

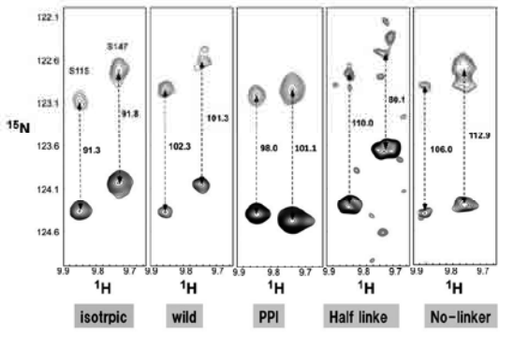


Fig.3: Representative data to show the spectral changes according to the variation in the linker length.

Acknowledgement
We thank Dr. N. Kobayashi in Osaka Univ. for allowing us to use Kujira in the spectral analyses of Pin1 protein.

P44 ^{19}F NMR を用いた精確な定量分析法の開発

○山﨑　太一[1]、齋藤　剛[1]、井原　俊英[1]
[1]産業技術総合研究所　計測標準研究部門

Development of accurate quantification method by using ^{19}F NMR

Taichi YAMAZAKI[1], Takeshi SAITO[1], Toshihide IHARA[1]
[1]National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), National Metrology Institute of Japan (NMIJ)

Abstract

Recently, nuclear magnetic resonance (NMR) spectrum has used for quantitative analysis with using ^{1}H NMR. We discussed accurate quantitative analysis using with ^{19}F NMR previously. One of the most attractive and challenging properties of ^{19}F NMR for the quantification is its wide chemical shift dispersion. It is expected that off resonance effects of an excitation pulse is important to reveal the accuracy of the quantitative analysis. We proposed new measurement method to overcome the off resonance effect. However, analytical method is important to more accurate quantitative analysis. In this work, we discussed the influence for quantitative result based on integral range. Full-width of half maximum (FWHM) was used for standard of integral range. To regulate integral range about 30-40 times to FWHM, accurate quantitative results for which does not depend on FWHM between signals were obtained.

Introduction

近年、NMR 法の定量性が注目され、^{1}H NMR を用いた定量分析についての報告が多数行われているが、精確な定量分析についての報告例は知られていない。また、^{19}F はスピン量子数が ^{1}H と同じ 1/2 で共鳴周波数も大きな差がないことから、^{1}H と同等の検出感度を持ち、天然存在比 100 %と同位体の影響を考慮する必要がないため、定量核種としては有用であると期待される。しかし、検出されるシグナルの周波数範囲が広い上に、シグナル形状が多様な核種であることが高精度の定量測定の実用化の障害となっている。当研究室ではこれまでに ^{19}F NMR スペクトルの定量性について検討し、適切な励起周波数を設定することで

キーワード：^{19}F NMR, quantitative analysis, off resonance effect

○やまざきたいち、さいとうたけし、いはらとしひで

^{19}F NMR におけるオフレゾナンス効果を低減することができる手法を見出し、^{19}F NMR を利用した定量分析の精度を大きく向上させることに成功した[1)]。一方で ^{19}F NMR では化合物によりシグナルの半値幅が大きく異なることがあり、積分範囲の設定は NMR で定量する際に課題となる。そこで本研究では、さらなる高精度化を目指すために、シグナルの半値幅の影響を受けにくい解析法について検証を行い、多様なシグナルに対応した解析法について検討した。

Experimental

内標準物質(IS)にはクロルフェナピル（0.996 kg/kg±0.005 kg/kg)、測定対象にはフルスルファミド（0.995 kg/kg±0.006 kg/kg）及びジフルベンズロン（0.998 kg/kg±0.008 kg/kg）を用いた。各シグナルの半値幅はクロルフェナピルで約 2 Hz、フルスルファミドで約 2 Hz、ジフルベンズロンで約 27 Hz だった。調製溶媒にはアセトン-d_6 を用い、IS 及び測定対象がそれぞれ約 1000 ppm に調製した。測定には ^{1}H 共鳴周波数 599.9 MHz の NMR 装置（Varian Inc.製　VNS 600A）を用い、データ解析には MestReNova （ver.6.1.1-6384）を用いた。各スペクトルは Table 1 に示した測定条件で測定し、スペクトルの測定中心周波数(off set)を IS のシグナルと測定対象のシグナルの中心に設定して測定を行った。

Table 1 Analytical parameter in ^{19}F qNMR

temperature	: 25 ºC
spectral width	: 131578.9 Hz　(233.1 ppm)
acquisition time	: 1 s
delay time	: 60 s
pulse width	: 14.4 μs
pulse angle	: 90º
number of scan	: 32

Results and Discussions

積分範囲はシグナル形状に依存した解析法としてシグナルの半値幅(FWHM)の倍数(10 倍, 20 倍, 30 倍, 40 倍, 50 倍)及びシグナル形状に依存しない解析法として固定値(100 Hz, 200 Hz, 300 Hz, 400 Hz, 500 Hz)でそれぞれ解析を行った。面積値は最も広い範囲で積分した際の面積値を 1 として規格化した面積値を基準に評価した。フルスルファミドの解析結果を Figure 1-A,B に、ジフルベンズロンの解析結果を Figure 2-A,B に示した(□：IS、●：測定対象)。

Figure 1 の結果からは、積分範囲の拡大に伴い多少面積値の増加は確認されたが、ほとんど全ての解析法で同等の面積値が得られ、半値幅が狭いシグナルでは面積値に与える影響は小さいことが示唆され、同等の半値幅を持つシグナル間では面積値の挙動も同様の結果が見られた。また、積分範囲を広くするとベースライン形状の影響で定量結果が影響を受けることが予想されたが半値幅の小さな(約 2 Hz)シグナルについては過剰(500 Hz：約 250 倍)に積分範囲を設定し

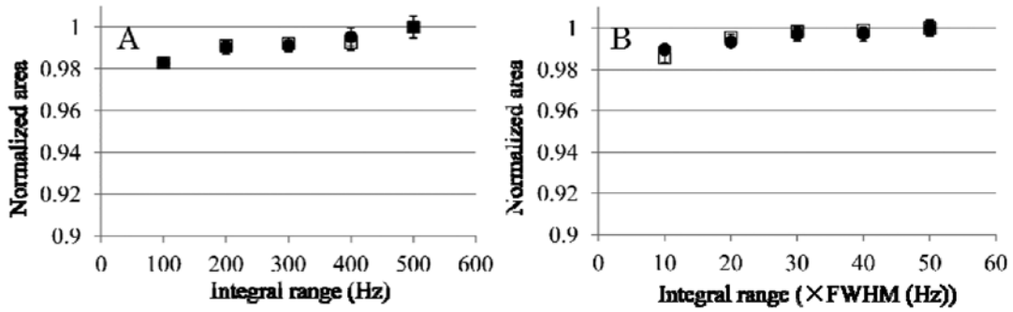


Figure 1 Dependence by the analysis method with Flusulfamide.

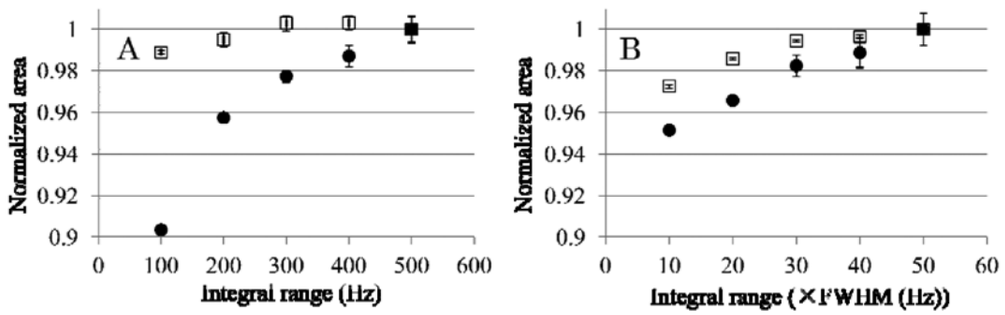


Figure 2 Dependence by the analysis method with Diflubenzuron

た場合でも面積値の大きな変化は確認されなかった。一方で積分範囲を広く設定すると測定のばらつきは若干大きくなり、これは広範囲で積分することで各スペクトルにおけるベースラインノイズの影響を受けたためと考えられる。

Figure 2 の結果からは半値幅の広いシグナルで面積値の大きな減少が確認された。これはブロードなシグナルであるために面積値が過小評価される傾向があるためと考えられる。特に固定の積分範囲で解析した際にはブロードなシグナルの面積値の低下が顕著に確認され、定量分析に適さない解析法と考えられる。また、半値幅を基準に解析した際には比較的シグナル間差は小さいものの、半値幅の 10 倍や 20 倍で解析した場合には 1 %以上の面積値の差が確認され、積分範囲としては不十分であると考えられる。また、積分範囲を広くすると、フルスルファミドと同様に測定再現性が低下する傾向も確認され、ベースラインの影響も示唆されたが、解析時にリニアプレディクションを行い、ベースをフラットにしたスペクトルを解析した場合でも同様の結果が得られたことから、ベースラインの影響のみではなく、ベースラインノイズの影響も受けていることが示唆された。

さらに各積分区間での解析条件におけるフルスルファミド及びジフルベンズロンの純度測定結果を Table 2 に示した。フルスルファミドの測定結果はほとんど全ての積分条件で参照値と一致し、同等の半値幅のシグナル間で定量分析する際には十分に広い積分範囲を設定することで積分範囲設定が定量結果に与える影響は小さいことを確認できた。一方で半値幅の異なるジフルベンズロンの測定結果からはシグナルの半値幅を基準とし、半値幅に対して約30～40倍の積分区間を用いた場合のみ、参照値と一致する結果が得られ、半値幅を基準に積分することが精確な定量測定には必要であると考えられる。

Table 2 Purity mesurement results of flusulfamide and diflubenzuron with several integral range.

	flusulfamide		diflubenzuron	
integral range	purity	SD	purity	SD
reference value	**0.995**	**0.006**	**0.998**	**0.008**
100 Hz	**0.995**	**0.002**	0.897	0.002
200 Hz	**0.996**	**0.002**	0.944	0.004
300 Hz	**0.996**	**0.000**	0.956	0.006
400 Hz	**0.992**	**0.005**	0.966	0.003
500 Hz	**0.995**	**0.007**	0.981	0.011
10 times to FWHM	0.988	0.001	0.986	0.001
20 times to FWHM	**0.995**	**0.000**	0.987	0.001
30 times to FWHM	**0.994**	**0.002**	**0.996**	**0.005**
40 times to FWHM	**0.994**	**0.002**	**1.000**	**0.008**
50 times to FWHM	**0.992**	**0.006**	1.008	0.007

Conclusions

本研究ではシグナルの半値幅が類似した成分間での定量分析では、解析による大きな影響は確認されなかった。また、積分範囲を広くすることで、ベースラインの影響を受け、測定の再現性が低下する結果も得られた。一方で、シグナルの半値幅に差がある成分間で定量分析を行う際には半値幅の約 30～40 倍程度の積分範囲で評価した際に最も妥当な値が得られた。この条件ではシグナル形状の依存性はなく、良好な結果がそれぞれ得られたため、妥当性の高い解析法と考えられる。この結果から NMR を用いた定量分析では半値幅を基準とした積分範囲の設定を行うことで、より高精度に評価することができることが分かった。

Reference

1) T. Yamazaki, T. Saito, The 50th Memorial Annual Meeting of the NMR Society of Japan.148-151 (2011).

P45

新規重水素標識コリンの合成と^{15}N DNP-NMRスペクトル

○熊谷慶子[1]，赤壁麻依[1]，川島一泰[1]，津田雅之[1]，阿部孝政[2]，
津田正史[3]
[1]高知大・総合研究センター
[2]オックスフォード・インストゥルメンツ株式会社
MRI/Biotools事業本部
[3]高知大・海洋コア総合研究センター

Synthesis and ^{15}N DNP-NMR profile of a new perdeuterated choline

○ Keiko Kumagai[1], Mai Akakabe[1], Kazuyasu Kawashima[1], Masayuki Tsuda[1], Takamasa Abe[2], and Masashi Tsuda[3]
[1]Science Research Center, Kochi University, Kochi, Japan.
[2]MRI/Biotools Division, Oxford Instruments KK
[3]Center for Advanced Marine Core Research, Kochi University, Kochi, Japan

Choline plays a key role in several biological processes, and hyperpolarized choline by DNP has been attracted as a new MR tool for metabolic analyses using nitrogen-15. We synthesized a new perdueterated choline, ^{15}N-choline-d_{13}, and investigated the spectroscopic profiles for ^{15}N DNP-NMR compared with those of ^{15}N-choline. Hyperpolarized ^{15}N-choline-d_{13} showed the marvelously long lifetime for nitrogen-15.

1. 緒論

超偏極技術の一つである動的核偏極法（DNP: Dynamic Nuclear Polarization）は、電子スピン偏極を核スピン系に移動させることにより、短時間で磁気共鳴感度を飛躍的に向上する手法として注目されている[1)]。とりわけ比較的長い縦緩和時間T_1を持つ^{13}C核や^{15}N核では、S/N比で1万倍あるいはそれ以上に感度が増幅し、1回測定(2秒)にてシグナルの観測が可能である。そのため、生体での化合物代謝のリアルタイムモニタリングが可能となり、^{13}C化学シフトイメージング（CSI）により1-^{13}C-ピルビン酸の代謝を可視化することで前立腺がん診断への臨床応用が期待されている[2)]。

^{15}N核では、リン脂質や神経伝達物質の合成基質であるコリンが、有用な超偏極基質として期待される。Gabellieriらは、^{15}Nラベル化したコリン（^{15}N-Choline）に高い偏極能と長い超偏極寿命を報告しており[3)]、一方、Sarkarらは、トリメチル基を全て重水素化したコリン（Choline-d_9）が^{15}N-Cholineよりさら長い超偏極寿命をもつことを見出している[4)]。我々は、独自に分子中の炭素結合性水素を全て重水素にすることで10倍程度の超偏極シグナル寿命の延長を見出してきた。そこで、炭素結合性水素を完全に重水素標識したコリン（^{15}N-Choline-d_{13}）を合成し、^{15}N DNP-NMRにおける超偏極特性を検討した。

Keywords：Dynamic Nuclear Polarization, DNP

○ くまがいけいこ，あかかべまい，かわしまかずやす，あべたかまさ，つだまさし

2. 方法

^{15}N-Choline-d_{13}は、市販の重水素標識エチレングリコールより5工程、総収率43%で合成した。対照実験として用いた^{15}N-CholineならびにCholine-d_9（窒素は天然存在比）は市販品を用いた。各試料1mg（Choline-d_9は100mg）を15mM OX63偏極誘発剤を含む各種ガラス化溶媒に溶解し、核偏極装置（Oxford Instruments製）において3.5 mbar圧力下1.4 K　で3時間偏極を行った。加圧昇温したEDTA含有緩衝液を加えて固体試料を溶解し、すばやくNMR装置中にセットした10mmサンプル管に移送したのち、10度パルスでの1スキャン^{15}N NMR測定を10秒おきに80回繰り返した。また、比較として熱平衡状態での^{15}N NMR測定を行った。

超偏極^{15}Nシグナルの経時的な強度の減衰より、縦緩和時間T_1を求め、また、超偏極状態初回スペクトルと熱平衡状態スペクトルのシグナル強度を比較することで超偏極によるシグナル増幅効果ならびにスピン分極率を求めた。さらに、^{15}N-Choline-d_{13}およびに^{15}N-Cholineについては超偏極した後、30秒間隔の180回分の^{15}N NMRアレイデータより超偏極シグナル寿命を検討した。

3. 結果

^{15}N-Choline-d_{13}に関して、超偏極状態と熱平衡状態でのシグナル強度を比較したところ、超偏極時の^{15}Nシグナルは約7,500倍シグナル強度が増幅されており、スピン分極率は2.5%に達することが分かった。縦緩和時間T_1に関して、^{15}N-Cholineが225秒であったのに対して、^{15}N-Choline-d_{13}では同条件にて580秒と、T_1がおよそ2.6倍延長するがわかった。Choline-d_9のT_1は420秒であったことから、窒素原子に隣接する水素原子を完全に重水素へ置換することで、窒素原子の超偏極がより一層安定化されることが示唆された。^{15}N-Choline-d_{13}では超偏極シグナルが１時間後にも観測され、重水素化は超偏極状態の持続に効果を示すことが明らかとなった。

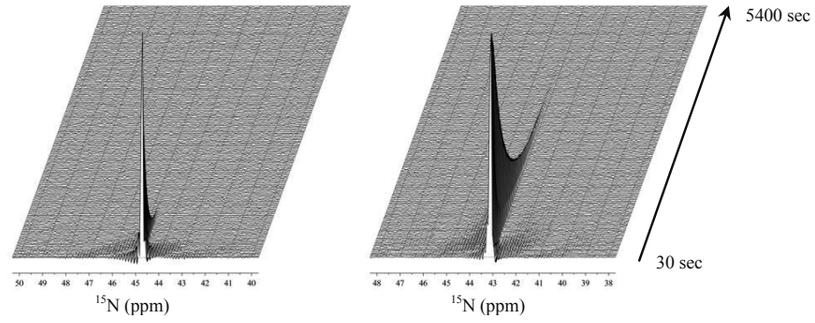


Fig.1 ^{15}N DNP-NMR spectra of ^{15}N-choline and ^{15}N-choline-d$_{13}$

参考文献
1) Abragam A., Goldman M., *Rep. Prog. Phys.*, 41, 395-467 (1978)
2) Golman K., *et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA,* 103, 11270 (2006)
3) Gabellieri C., *et al., J. Am. Chem. Soc.,* 130, 4598-4599 (2008)
4) Sarkar R., *et al., J. Am. Chem. Soc.,* 131, 16014-16015 (2009)

P46

重水素化グルコースを用いたDNP-13C-NMRスペクトル

○赤壁麻依[1]，　熊谷慶子[1]，　津田雅之[1]，津田正史[2]，　市川和洋[3]，
阿部孝政[4], 福士江里[5]，　川端潤[5]
[1]高知大・総合研究セ，　[2]高知大・海洋コア，　[3]九大・先端融合医療レドックスナビ研究拠点，　[4]高オックスフォード・インストゥルメンツ株式会社，　[5]北大・院農

^{13}C-NMR Spectra of Hyperpolarized Deuterated Glucoses by DNP

○Mai Akakabe[1], Keiko Kumagai[1], Masayuki Tsuda[1], Masashi Tsuda[2], Kazuhiro Ichikawa[3], Takamasa Abe[4], Eri Fukushi[5], and Jun Kawabata[5]
[1]Science Research Center, Kochi University, Kochi, Japan. [2]Center for Advanced Marine Core Research, Kochi University, Kochi, Japan. [3]Innovation Center for Medical Redox Navigation, Kyusyu University, Fukuoka, Japan. [4]Oxford Instruments KK, Tokyo, Japan. [5]Reserch Faculty of Argriculture, Hokkaido University, Hokkaido, Japan.

Dynamic nuclear polarization (DNP) has enabled hyperpolarized ^{13}C NMR spectroscopy and MR spectroscopic imaging studies with extremely large enhancements of signals. Nevertheless, glucose hyperpolarized by liquid state DNP was reported to reveal weak enhancement and relatively rapid decay of the signal due to very short T_1 relaxation, although glucose is one of the most important probes for glycolytic metabolisms. We have measured ^{13}C NMR spectra of several deuterated glucoses hyperpolarized by DNP, and have found that hyperpolarized *C*-perdeuterated glucose showed the larger enhancement and slower decay of signals than those of *C*-protonated glucose.

１．はじめに

DNP は、NMR の感度を飛躍的に高めることができる技術である。とりわけ、^{13}C 核の検出では 1 万倍あるいはそれ以上の増幅をもたらし、物質代謝のような生体内反応のリアルタイム観測に応用可能である [1)]。

グルコースは、生体内の様々な代謝における主要な前駆体分子であり、また、腫瘍細胞ではグルコース代謝が活性化することが知られている。そのため、in vivo での代謝イメージング基質として期待されているが、シグナル強度が弱く、縦緩和時間 T_1 が極端に短いため偏極基質としては不向きとされてきた [2)]。そこで、重水素が T_1 の延長に効果があると考えて、グルコースの炭素結合水素を重水素に置換されたグルコース数種類、^{13}C 標識グルコース、^{13}C, ^{2}H 二重標識グルコースについて、DNP 装置により超偏極し、1 スキャン ^{13}C NMR スペクトルを経時的に測定し、シグナル強度とその減衰を検討し、 重水素が DNP-NMR に与える効果を置換位置の影響も含めて検討した。

DNP，緩和時間，重水素化

○あかかべまい，くまがいけいこ，つだまさゆき，つだまさし，いちかわかずひろ，あべたかまさ，ふくしえり，かわばたじゅん

２．実験方法

グルコースとして、glucose, glucose-1-*d*, glucose-2-*d*, glucose-6,6-d_2, glucose-*C*-d_7 を重水素位置が超偏極に与える効果を判定する実験基質として選択した。核偏極装置は Oxford Instrument 社製 HyperSense を用いて超偏極化を行った。各基質 10mg を 15 mM ラジカル試薬を含む H_2O/glycerol (3:2)のガラス化溶媒に溶解し、HyperSense にサンプルをセットし、1.4K に冷却し 1 時間偏極を行った。偏極した冷凍固体試料を加圧昇温した EDTA 水溶液 3 mL にて溶解し、直ちに NMR 装置（JEOL JNM-ECX300）中に設置した 5mm サンプル管に輸送後、60 度パルス、1 回スキャンの ^{13}C NMR スペクトルを 1 秒おきに 60 回測定した。一方、$^{13}C_6$-glucose, $^{13}C_6$-glucose-*C*-d_7 を実験基質として、上記の条件で超偏極 ^{13}C NMR スペクトルを 120 回経時的に測定した。各々の縦緩和時間 T_1 は、Bruker AMX-500 を用いて反転回復法により測定した。

３．結果および考察

4 種の重水化グルコースを超偏極後 ^{13}C NMR アレイスペクトルを測定し、シグナル強度とその時間変化を比較したところ、重水素化位置の炭素シグナルに強度の増強が認められた。シグナル強度の時間変化に関しては、glucose ではシグナル消失が 2 秒 (C-1)であったが、glucose-1-*d*, glucose-2-*d*, glucose-6,6-d_2 では、重水素置換位置での数秒の延長が認められた。glucose-*C*-d_7 の全炭素については、^{13}C シグナル消失に顕著な遅延が認められた。このことから、グルコースの炭素結合性水素を重水素置換は、炭素シグナルの超偏極を延長する効果があり、特に炭素結合性水素を全て重水素置換すると相加的にシグナル強度の減衰が遅延することがわかった。

超偏極した $^{13}C_6$-glucose, $^{13}C_6$-glucose-*C*-d_7 の ^{13}C NMR アレイスペクトル(Fig. 1)より、シグナル強度とシグナル減衰をより詳細に検討した。$^{13}C_6$-glucose-*C*-d_7 の C-1 のシグナル強度は、$^{13}C_6$-glucose のそれの約 600 倍で、$^{13}C_6$-glucose-*C*-d_7 は $^{13}C_6$-glucose に対して 10 倍程度シグナル観測時間が延長された。反転回復法測定された T_1 (C-1)は、$^{13}C_6$-glucose-*C*-d_7 は $^{13}C_6$-glucose に対して約 10 倍であったことから、T_1 の延長は、シグナル観測時間に相関関係があると思われる。

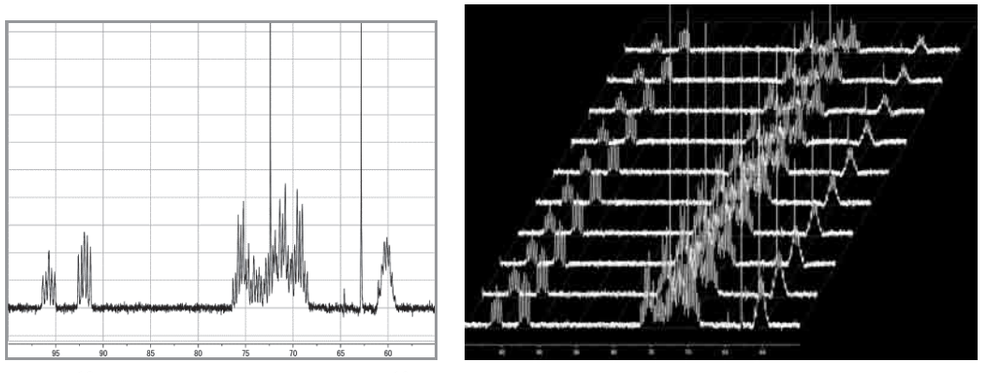


Fig. 1 ^{13}C NMR of hyperpolarized $^{13}C_6$-Glucose-*C*-d_7

参考文献
1) Ardenkjaer-Larsen J. H. *et al.*, *PNAS*, 100, 10158-10163 (2003)
2) Harada M. *et al.*, *Jpn. J. Radiol.*, 28, 173-179 (2010)

P47

長い縦緩和時間を利用した高感度溶液NMR測定法の開発と^{13}C直接観測への応用

○古板恭子、服部良一、池上貴久、藤原敏道、児嶋長次郎
阪大・蛋白研

Development of a novel high-sensitivity solution NMR measurement method utilizing long longitudinal relaxation time and the application to ^{13}C direct detection.

○Kyoko Furuita, Yoshikazu Hattori, Takahisa Ikegami, Toshimichi Fujiwara and Chojiro Kojima
Institute for Protein Research, Osaka University, Osaka, Japan.

In the case of NMR measurements of molecules that have long longitudinal relaxation time (T_1), long repetition delays, i.e., long measurement time, are required. We have developed a novel sensitivity-enhancement method that utilizes such long T_1. In this method, free induction decay signals are acquired twice within a single scan as in-phase (IP) and anti-phase (AP) signals. We previously applied this method to ^{1}H-^{13}C HSQC and ^{1}H-^{15}N HSQC experiments. In this study, this method was applied to a ^{13}C direct-detected CACO experiment. IP and AP spectra of CACO were successfully acquired by using this method with valine and ubiquitin, and the sensitivity was improved. In addition, peak splitting by ^{13}C'-^{13}C$^{\alpha}$ J coupling in the direct dimension was successfully removed by the virtual decoupling procedure using IP and AP spectra obtained by this method.

【導入】　長い縦緩和時間（T_1）を持つ分子、例えば低分子や超高磁場下の高分子のNMR 測定は、十分なシグナル強度を得るために長い繰り返し時間が必要とされる。そのため、時間当たりの感度が低い。私たちは、長い T_1 を反対に有効利用することで、溶液 NMR 測定の感度向上及び測定時間を短縮する手法を開発してきた。この手法は、2008 年に固体 NMR の分野で開発された、１スキャンにつき２回のデータ取り込みを行う double-acquisition 法[1]を一般化したものである。開発した手法では、１スキャンで in-phase (IP) 及び anti-phase (AP)の信号を取得する。これまでに私たちは、この手法を ^{1}H-^{15}N 及び ^{1}H-^{13}C HSQC に適用し、その感度を向上させることに成功している。今回、この手法を ^{13}C 核の直接観測に応用した。

【材料と方法】　全ての測定には、Bruker 社製の 950 MHz NMR 装置（AVANCE III）を使用した。データ処理には TOPSPIN 2.1 及び NMRPipe を使用した。データ解析には、NMRPipe 及び Sparky 3.115 を使用した。^{13}C/^{15}N 標識バリンのサンプルは濃度約 1.6 mM、100% D_2O 中で調製した。^{13}C/^{15}N 標識ユビキチンのサンプルは、濃度 2.5 mM、90/10% H_2O/D_2O 中で調製した。

縦緩和、感度向上、^{13}C 直接観測

○ふるいた　きょうこ、はっとり　よしかず、いけがみ　たかひさ、ふじわら　としみち、こじま　ちょうじろう

【結果と考察】　double-acquisition 法を ^{13}C' 観測 ^{13}C'-^{13}C$^{\alpha}$ 相関（CACO）実験に適用した。この測定法をここで dCACO と呼ぶ。CACO 実験では、直接観測軸において、^{13}C'-^{13}C$^{\alpha}$ 同種核 J カップリングがスペクトル上にピークの分裂として現れる。dCACO 実験では、１スキャンにつき２回のデータ取り込みを行うが、１回は直接観測軸の ^{13}C'-^{13}C$^{\alpha}$ J カップリングによるピークの分裂に関して IP、もう１回は AP のデータを取り込む。

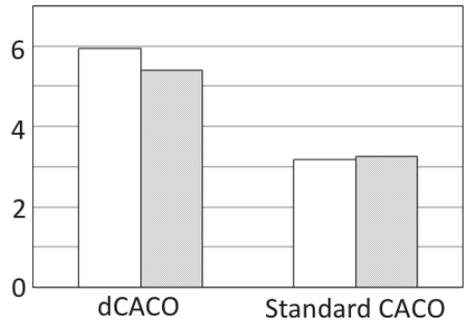


Fig 1. Average peak intensities in dCACO and standard CACO spectra of valine (open bars) and ubiquitin (gray bars).

^{13}C/^{15}N 標識バリン対し、dCACO 実験を行った。直接観測軸の J カップリングによるピークの分裂に関して IP 及び AP スペクトルを得ることに成功した。CACO 実験に応用した double-acquisition 法の効果を調べるため、バリンの dCACO スペクトルを標準的な CACO スペクトルと比較した（Fig 1）。その結果、標準 CACO と比較しておよそ 1.9 倍のピーク強度の向上が見られた。

次に、^{13}C/^{15}N 標識ユビキチンに対し、dCACO 実験を行った。直接観測軸の J カップリングによるピークの分裂に関して IP 及び AP スペクトルを得ることに成功した。dCACO スペクトルを標準的な CACO スペクトルと比較したところ、およそ 1.7 倍のピーク強度の向上が見られた（Fig 1）。ユビキチンよりバリンにおいて、より大きい感度向上が得られた理由は現時点では明確ではないが、ひとつには double-acquisition 法はサンプルの T_1 が長いほど有利な感度向上法であり、バリンの T_1 がユビキチンよりも長いことが考えられる。

^{13}C 直接観測スペクトルにおいて、直接観測軸に現れる J カップリングによるピークの分裂を取り除くために、virtual decoupling 法がよく用いられている。この方法は IP と AP など, 位相の異なるスペクトルを取り, それらの組み合わせることでマルチプレットを分離したのち, 中心へとシフトさせて足し合わせることでデカップリングを行うというものである。dCACO 測定により得られたユビキチンの IP 及び AP スペクトルを用い、この virtual decoupling を行ったところ、J カップリングによるピークの分裂を効果的に除去することができた（Fig 2）。Double-acquisition 法を用いれば、IP と AP のデータが従来法の約半分の時間で得られる。従って、測定感度が十分であれば、dCACO パルス系列を用いることで CACO スペクトルを得るために要する測定時間を大幅に短縮できると考えられる。

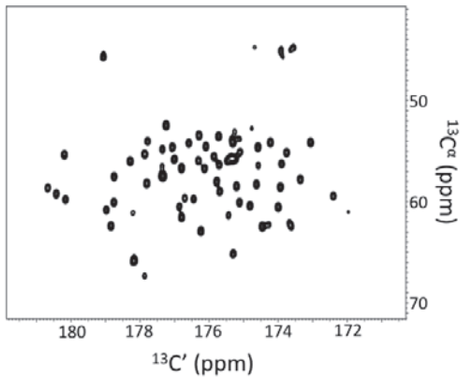


Fig 2. ^{13}C' direct-detected dCACO spectrum of ubiquitin. Peak splitting in the direct dimension was removed by the virtual decoupling procedure.

P48

Sf9 細胞の in-cell NMR:シグナル帰属と構造解析の試み

○濱津　順平[1], 田中　孝[1], 白井　隆弘[1], 池谷　鉄兵[1],
三島　正規[1], 白川　昌弘[2], 伊藤　隆[1]
[1]首都大院・理工・化；[2]京大院・工・分子工

In-cell NMR in Sf9 cells: strategies for resonance assignments and structural analyses

○Jumpei Hamatsu[1], Takashi Tanaka[1], Takahiro Shirai[1], Teppei Ikeya[1], Masaki Mishima[1], Masahiro Shirakawa[2], and Yutaka Ito[1]
[1] *Department of Chemistry, Tokyo Metropolitan University, Tokyo, Japan.*
[2] *Department of Molecular Engineering, Kyoto University, Kyoto, Japan.*

The protocols for eukaryotic in-cell NMR experiments require a large quantity of purified and concentrated stable-isotope enriched proteins, thus restricting the studies on proteins which are unstable and/or difficult to purify. The alternative approaches utilising protein expression systems in host cells are therefore awaited for extending the range of applications.

Here, we show a demonstration of in-cell NMR experiments using the sf9/baculovirus system. High-resolution 2D ^{1}H-^{15}N correlation NMR spectra were observed on *Streptococcus* protein G B1 domain and others expressed in sf9 cells. Further, with employing a nonlinear sampling scheme and an improved MaxEnt processing, we observed 3D triple resonance NMR spectra with sufficient sensitivity for backbone resonance assignments. Our results open new avenues for the structural analyses of proteins in eukaryotic cells.

【序論】

In-cell NMR 法は生きた細胞内において原子分解能で蛋白質の高次構造や動態を解析できる唯一の手法である．これまでに真核細胞を利用した in-cell NMR により，細胞内における蛋白質のリン酸化，薬剤との相互作用，ダイナミクスなどの解析例が報告されている[1-3]．これらの報告例で用いられた手法は，いずれもあらかじめ単離・精製した蛋白質を外部から細胞内に導入する手法をとっている．そのため，十分な感度の NMR シグナルを観測するためには，観測対象となる蛋白質を大量に調製する必要があり，精製が困難，あるいは精製後の安定性が極めて低い蛋白質への適用が困難となることが考えられる．一方でごく最近，真核細胞蛋白質発現系として知られる，Pichia 酵母を利用し，真核細胞内で直接発現させたユビキチンの 2D ^{1}H-^{15}N HSQC スペクトルを観測した例も報告された[4]．蛋白質発現系を利用した in-cell NMR では，細胞内に発現させた目的蛋白質を直接観測するため，蛋白質を精製する必要が無く，in-cell NMR の適用範囲を拡げる手段として期待される．しかしながら，非常に強いバックグラウンドをともなっており，すべてのシグナルの化学シフトを詳細に解析することは難しいように思われる．また，細胞内と細胞外において，化学シフトに大きな変化があった場合，細胞内から得られたデータをもとに，新たに帰属を行うことが不可欠となるが，これまでに報告されているいずれの手法でも，in-cell NMR により得られたデータに基づいて帰属を行った例は報告されていない．そこで，本研究では，真核細胞の蛋白質発現系として知られる sf9 細胞を利用した in-cell NMR 測定法の開発を行い，真核細胞を利用した in-cell NMR としては，未だ報告例の無い，3 次元 3 重共鳴 NMR スペクトルによる NMR シグナルの帰属，さらに真核細胞内における蛋白質の高分解能な立体構造解析法の確立を目指した．

In-cell NMR, 異種核多次元 NMR, nonlinear sampling

○はまつじゅんぺい，たなかたかし，しらいたかひろ，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

【実験･結果】

本研究では，*Streptococcus* protein G B1 domain （以下GB1と略）を観測対象として実験を行った．GB1の遺伝子をコードしたバキュロウイルスをBac-to-Bac system により作製し，sf9細胞による目的蛋白質の蛋白質大量発現系を構築した．Sf9細胞に作製したバキュロウイルスを感染させ，細胞内に目的蛋白質を発現したsf9細胞を測定試料とし，in-cell NMR による 2D ^{1}H-^{15}N HSQC 測定を行った．測定試料の安定同位体標識には Bioexpress 2000 培地を使用した．

GB1 を発現させた sf9 細胞を試料とし，2D ^{1}H-^{15}N HSQC 測定を行った結果，sf9 細胞内から目的蛋白質由来の NMR シグナルの観測に成功した （Figure 1a）．単離・精製した GB1 の HSQC スペクトルと比較したところ（Figure 1b），各クロスピークの化学シフトがほぼ一致していることから，sf9 細胞内においてもフォールドしている GB1 を観測できていると考えられる．

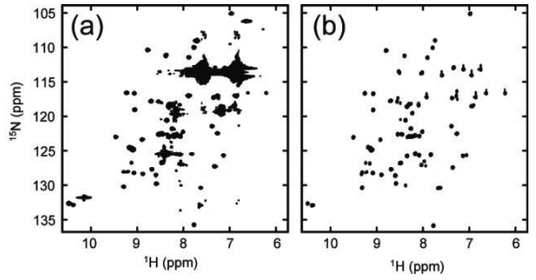


Figure 1
Comparison of the 2D ^{1}H-^{15}N HSQC spectrum of G B1 in living sf9 cells (a) and purified G B1 sample (b). In-cell HSQC spectrum was acquired at 301K with 64 number of scans.

Sf9 細胞を利用した in-cell NMR では，細胞そのものを安定同位体標識する必要がある．したがって，目的蛋白質と同時に sf9 細胞の内在性蛋白質由来の NMR シグナルがバックグラウンドとして観測されてしまうため （Figure 2a），高品質なスペクトルを得るためには，試料調製法の最適化を行う必要がある．Sf9/バキュロウイルス蛋白質発現系において，目的蛋白質の発現は，ウイルス感染後のおよそ 20 時間後（Very late phase）より顕著になることが知られている[5]．そのため，sf9 細胞へのウイルス接種直後より一定時間は引き続き通常の培地で培養し，その後安定同位体標識用の培地に交換することで，バックグラウンドを効率的に軽減することができる（Figure 2c）．培地交換のタイミングは，SDS-PAGE や 1D ^{1}H-^{15}N HSQC スペクトルにより目的蛋白質の発現量の経時変化を測定することで，最適なタイミングを決定した．

なお残るバックグラウンドについては，バキュロウイルスを感染させたことによる，副産物由来のシグナルが寄与していると考えられる．そこで，ポリヘドリンプロモーターと SV40 polyA signal の間に，蛋白質の遺伝子をコードしていないバキュロウイルスを調製し（以下 reference baculovirus とする），このウイルスを感染させた sf9

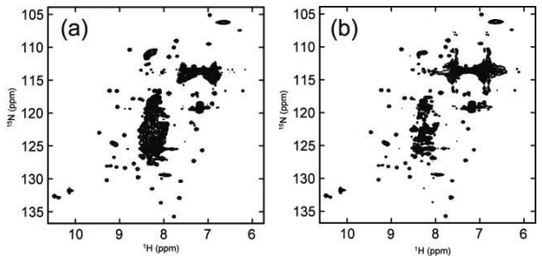


Figure 2 2D ^{1}H-^{15}N HSQC spectra of G B1 in-cell sample which prepared with (b) and without (a) optimized sample preparation protocol.

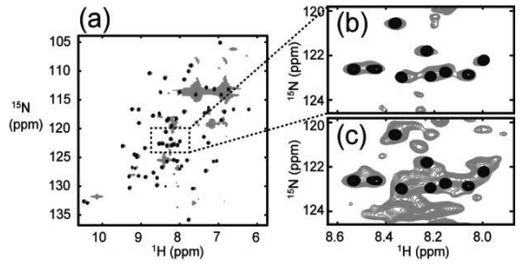


Figure 3. Overlay of the 2D HSQC spectra of G B1 *in vitro* (black) and the difference spectrum (gray) of the original in-cell HSQC spectrum of G B1 and HSQC spectrum of sf9 cells which were infected by “reference baculovirus” (See text) were shown (a). Close-up views of the overlaid HSQC spectra (b) and overlay with original in-cell HSQC spectrum (gray) of G B1 in living sf9 cells (c).

細胞で 2D ^{1}H-^{15}N HSQC 測定を行ったところ，試料調製法を最適化した GB1 の in-cell NMR スペクトルで観測されたバックグラウンドとほぼ同様のスペクトルが得られた．さらに，これら二つのスペクトルの差スペクトルをとったところ，目的蛋白質とバックグラウンドとのオーバーラップが解消され, 非常に高品質なスペクトルを得ることに成功した（Figure 1a, Figure 3a）．

つづいて，蛋白質主鎖の化学シフトの帰属を行うため，^{13}C/^{15}N 標識を施した試料を調製し，3D HNCA および HN(CO)CA の測定を行った．実験では，より多くの積算を重ねるため nonlinear sampling により観測データポイントを間引いて測定を行った．さらに，スペクトルの再構成においては，MaxEnt 法を改良した Quantitative Maximum Entropy（以下 QME と略）法を適用した．従来法では，各スペクトルにおける最適なラグランジュ乗数 λ をユーザーが設定する必要があり，シグナル強度のダイナミックレンジが広いスペクトルに対しては，全領域について最適な λ の値を決定することが困難であった．一方，QME 法では，あるλが与えられたときの条件つき確率分布を計算し，その確率分布が最大となるλの値を自動で探索するため，スペクトルの全領域における最適な値を見つけることができ，より高い品質でスペクトルを再構成することができる．蛋白質発現系を利用した in-cell NMR では，非常に強いバックグラウンドを完全に除去することは困難で，シグナル強度のダイナミックレンジが広いスペクトルとなってしまう．大腸菌細胞を利用した in-cell NMR により得られた ^{13}C NOESY スペクトルに対して適用した際のデータを示す（Figure 4）．従来法で再構成したスペクトルでは，よりシグナル強度の弱い目的蛋白質由来のシグナルが消失してしまう一方で, QME 法を適用することで，強度の弱いシグナルであっても，より正確に再構成することが可能となる．

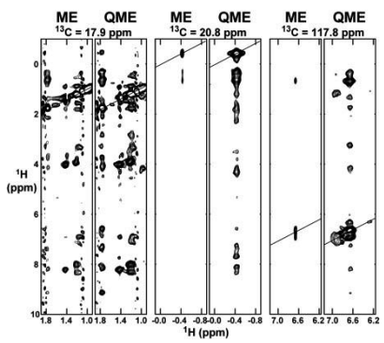


Figure 4 Strip plots of the 2D MaxEnt (ME) and quantitative MaxEnt (QME) Reconstructions of the 3D ^{13}C-separated NOESY-HSQC experiment of ^{13}C/^{15}N-labelled GB1 in living E. coli. For each reconstructed spectrum, three ^{1}H (F1) - ^{1}H (F3) slices corresponding to the ^{13}C(F2) chemical shifts of 17.9, 20.8 and 117.8 ppm.

上記の手法を取り入れた結果, 3D HNCA，HN(CO)CA ともに解析可能なスペクトルの観測に成功し，HNCA からは約 70 %の残基内相関ピークと約 23 %の残基間相関ピークが観測され，HN(CO)CA では約 44 %の残基間相関ピークが得られた (Figure 5)．これらの二つのスペクトルを用いて連鎖帰属を行った結果，これまでに GB1 の主鎖シグナルの約 78 %の帰属に成功した．真核細胞を利用した in-cell NMR により 3 次元 3 重共鳴 NMR シグナルを測定し解析した例は，本研究結果が初めての例となる．

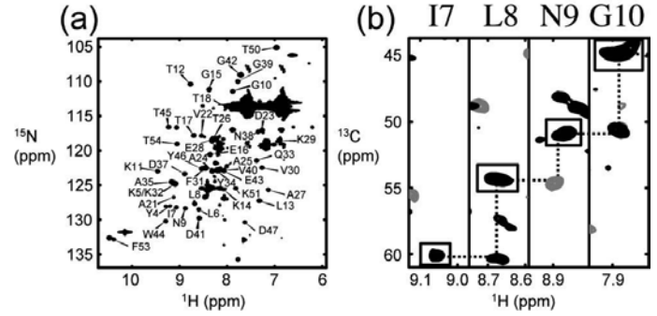


Figure.5.
2D ^{1}H-^{15}N HSQC spectrum of GB1 in living sf9 cells (a). Cross-peaks are labeled with their corresponding backbone assignments. (b) Overlaid $^{1}H^{N}$-$^{13}C^{\alpha}$ cross-sections of the 3D HNCA (black) and the HN(CO)CA (grey) spectra corresponding to the ^{15}N frequencies of residues from Ile7 to Gly10. Sequential connectivities are represented by dashed lines. Square boxes indicate intra-residual correlation peaks of HNCA.

【展望】

今後は，蛋白質主鎖，および側鎖シグナルの帰属を完了し，sf9 細胞を利用した in-cell NMR による，高分解能な高次構造解析の実現を目指す．主鎖シグナルの帰属のための測定法では，さらに BEST-TROSY 法を導入することで，より高感度にシグナルが得られることが期待され，より多くの残基を帰属することができると考えられる．一方，蛋白質側鎖の化学シフトを帰属するための測定法は，主鎖帰属のための測定法に比べ，測定感度が低いことから，観測が困難であることが予想される．しかし，ごく最近，本研究室の池谷らが報告した^{13}C-NOESY，^{15}N-NOESY により化学シフトの帰属を行う計算科学的手法[6]を導入することにより，側鎖の化学シフトの帰属も可能であると考えられる．また，立体構造計算に有効な距離制限情報の取得のため，アミノ酸選択的安定同位体標識試料や，メチル基選択的プロトン標識試料の調製法の検討を行っていく．

Acknowledgements
QME; Daniel O’Donovan, Wayne Boucher and Ernest Laue
CCPN & Department of Biochemistry, University of Cambridge, UK

【参考文献】

(1) Selenko, P. et al. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2008**, *15*, 321. (2) Inomata, K. et al. *Nature* **2009**, *458*, 106. (3) Ogino, S. et al. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 10834. (4) Bertrand, K. et al. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 12708. (5) O'Reilly, D. R. et al. Baculovirus expression vectors : a laboratory manual; Oxford University Press: New York, 1994. (6) Ikeya, T. et al. *J. Biomol. NMR* **2011**, *50*, 137.

P49

天然変性蛋白質PQBP1のセグメント標識

○水口峰之，鍋島裕子
富山大・薬

Segmental labeling of the intrinsically disordered protein PQBP1

○Mineyuki Mizuguchi and Yuko Nabeshima
Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Toyama, Toyama, Japan.

We successfully prepared segmentally labeled PQBP1, in which the C-terminal domain is ^{15}N-labeled. Two fragments of PQBP1 were highly expressed in *E. coli* with the cold-shock vector, and ligated by the expressed protein ligation method. Our results will be applicable to the segmental labeling of other intrinsically disordered proteins.

天然変性蛋白質（IDP; intrinsically disordered protein）は、生理的条件下において単独では特定の立体構造を形成しない一連の蛋白質である。これまでに報告されたIDP研究の多くは、IDPのドメインを断片化して立体構造解析を行っている。しかしながら、断片化によって蛋白質は不安定化する可能性があり、そのような場合には断片化した蛋白質は全長の立体構造を反映していない。したがって、IDPの立体構造や機能について研究するには、蛋白質を断片化せずに解析する必要がある。ところが、断片化しないでNMRスペクトルを測定すると、disorder領域のシグナルが重なってしまうため解析が非常に困難となる。

上述した実験的な困難を克服するために、本研究では、近年に開発されたセグメントラベル法（蛋白質分子の観測したいセグメントだけを安定同位体で標識する方法）をIDPに適用した。セグメントラベル法は、これまで高分子量蛋白質の立体構造解析で威力を発揮してきた。この方法では、蛋白質スプライシングの機能を有するインテインを利用し、安定同位体標識したフラグメントと非標識のフラグメントを連結させる（Fig. 1）。これにより、IDPを断片化することなく、観測したいセグメントだけをNMRで解析することができる。

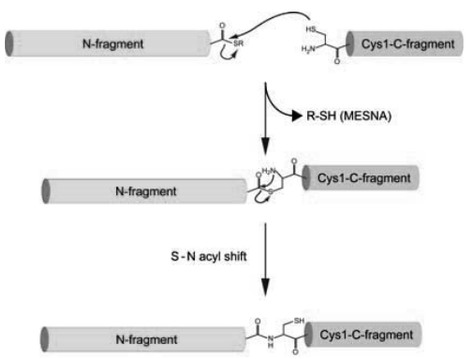


Fig. 1 Segmental labeling of PQBP1.

本研究では天然変性蛋白質PQBP1について研究した。PQBP1は、RNAポリメラーゼII（Pol II）やスプライソソームの機能を調節する核内蛋白質である。PQBP1はWWドメイン（WWD）、極性ドメイン（PRD）、C末端ドメイン（CTD）を有しており、PRDとCTDはdisorder領域であることがわかっている。

Segmental labeling, Expressed Protein Ligation, Stable isotope labeling

○みずぐちみねゆき，なべしまゆうこ

本研究では、Expressed Protein Ligation (EPL)法によって、PQBP1のCTDセグメントを安定同位体標識した（Fig. 1）。これにより、全長PQBP1のCTDが、断片化したときと同じ特徴を示すのかどうかを調べることができる。

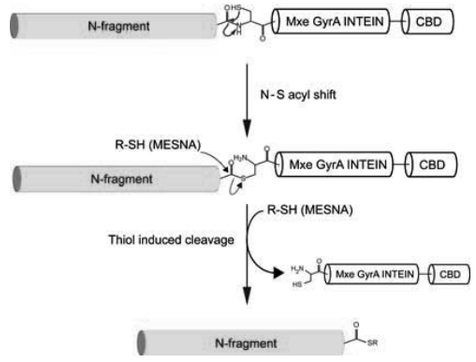


Fig. 2 Preparatin of N-fragment of PQBP1.

PQBP1の1-219残基をコードするDNAの3’側にMxe GyrA INTEINとchitin-binding domain (CBD)のDNAを連結した（Fig. 2）。このDNAをコールドショックベクターのpCold Iに挿入し発現ベクターを得た。発現ベクターで大腸菌C43(DE3)を形質転換し、37°Cで振とう培養した。600 nmのODが0.4～0.5になった時点で培養液を15°Cに冷却し、終濃度が0.5 mMとなるようにIPTGを加え、15°Cで24時間培養した。大腸菌を超音波破砕した後、PQBP1(1-219)-INTEIN-CBDを含む可溶性画分をChitin Beadsに加えた。Chitin Beadsをカラムに入れ、20 mM HEPES, 500 mM NaCl (pH 8.0)を十分量流した。その後、50 mM MESNA (sodium 2-sulfanylethane sulfonate)を含む20 mM HEPES, 500 mM NaCl (pH 8.0)を加えた。これにより、融合蛋白質からINTEIN-CBDが切断され、C末端がチオエステル化されたPQBP1(1-219)を得ることができた。これをN-fragmentとした（Fig. 2）。

PQBP1の220-265残基のフラグメントにGly220Cys変異を導入した。このフラグメントをコードするDNAの5’側にCBDとSSp DnaB INTEINのDNAを連結した（Fig. 3）。PQBP1(1-219)の場合と同様に、連結したDNAをpCold Iベクターに挿入し発現ベクターを得た。CBD-INTEIN-PQBP1(220-265)は、発現ベクターで形質転換したBL21(DE3)を^{15}N標識CHL培地で培養して発現させた。大腸菌を超音波破砕した後、可溶性画分をChitin Beadsに加えてCBD-INTEIN-PQBP1(220-265)を結合させた。Chitin Beadsをカラムに入れ、20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl (20°C, pH 8.5)を十分量流した。その後、100 mM DTT (dithiothreitol)を含む20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl (4°C, pH 8.5)を加えて融合蛋白質からCBD-INTEINを切断し、N末端がCysのPQBP1(220-265)を得た（Fig. 3）。得られた蛋白質溶液を十分に濃縮した後、20 mM HEPES, 100 mM NaCl, 5 mM MESNA (pH 8.0)に対して透析した。これをCys1-C-fragmentとした（Fig. 3）。

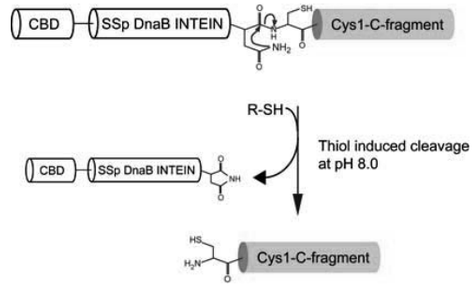


Fig. 3 Preparatin of Cys1-C-fragment.

EPL反応は、Cys1-C-fragmentとN-fragmentを10:1のモル比で混合し37°Cで行った。混合直後の濃度は、Cys1-C-fragmentが0.31 mM、N-fragmentが0.031 mMである。この混合溶液を20 mM HESPES, 100 mM NaCl, 5 mM MESNA (pH 8.0)に対して37°Cで透析し、16.5時間反応させた。反応後に終濃度が10 mMになるようにDTTを加え、37°Cで2時間インキュベーションした。EPL反応後のサンプルをSDS-PAGEとMALDI-TOF-MSで分析したところ、N-fragmentとCys1-C-framgmentが連結された全長PQBP1を確認できた。

P50

緩和分散差スペクトル法による混みあったNMRスペクトルの緩和分散データの解析

○小沼剛, 菅瀬謙二
（公財）サントリー生科財団・生有研

Extracting information on protein dynamics from crowded NMR spectra using relaxation dispersion difference

○Tsuyoshi Konuma, and Kenji Sugase
Bioorganic Research Institute, Suntory Foundation for Life Sciences

Relaxation dispersion spectroscopy is one of the most powerful tools to elucidate protein dynamics. The method can produce many unprecedented results regarding protein dynamics, but it is difficult to apply it to large proteins or intrinsically disordered proteins because many NMR signals of these proteins are often highly overlapped due to the existence of a large number of signals or less signal dispersion. Signal overlap precludes an accurate quantification of signal intensities, which are converted to effective R_2 relaxation rates. In this study, we have developed a new method called relaxation dispersion difference (RDD) that can leave the signals showing relaxation dispersions from crowded NMR spectra. The RDD method was validated by comprehensive simulation and actual NMR experiments with a sample that is known to show relaxation dispersions.

緩和分散法は、タンパク質のダイナミクスを解明するための最も強力なNMR測定法の一つである。この方法から、ミリ秒からマイクロ秒のタイムスケールにおけるアミノ酸残基特有の熱力学、動力学的パラメータ、およびタンパク質の状態間の化学シフト差を定量することができる。また、ほとんどの生物物理学的方法では観測できない低存在比状態まで調べることが可能である。しかし、分子量の大きなタンパク質や天然変性タンパク質に対しての緩和分散法の適用は困難となる。なぜなら、その様なタンパク質のNMRシグナルは重なることが多く、横緩和速度定数(R_2)を得るためのシグナル強度を正確に測定することができないからである。この問題を改善する方法の一つは選択的に同位体標識したサンプルを用いることである。しかし、限定された標識のためにNMRによって得られる情報が減少し、さらに、均一標識よりも高価な同位体標識化合物が必要となるデメリットがある。そこで本研究では、均一標識サンプルの混みあったNMRスペクトルにおいて、緩和分散を示すシグナルのみを残す緩和分散差スペクトル（Relaxation dispersion difference; RDD）法と呼ぶ新しい解析法を開発した。

RDD法の原理は非常に単純である。緩和分散測定したスペクトルにおいて、全く緩和分散を与えないアミノ酸残基のシグナル強度は全ての τ_{CP} で一定である。一方で、緩和分散を与えるアミノ酸残基のシグナル強度は τ_{CP} に応じて異なる。そこで、最も

緩和分散法，ダイナミクス

○こぬまつよし，すがせけんじ

大きな $1/\tau_{CP}$ の緩和分散スペクトルから各スペクトルを減算することで、緩和分散を与えるアミノ酸残基のシグナルのみが残る（Fig. 1）。

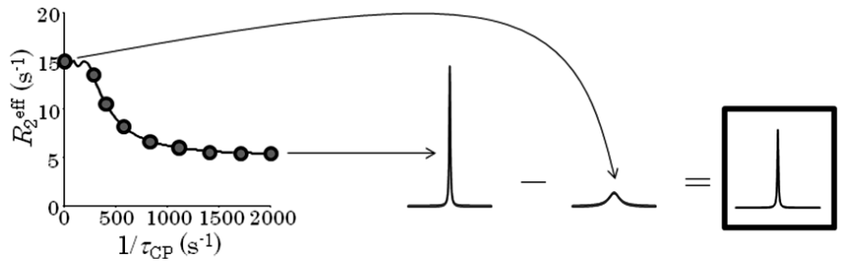


Fig. 1 The principle of RDD. Subtraction of each relaxation dispersion spectrum from the one with the largest $1/\tau_{CP}$ leaves a peak with the relaxation information.

まず我々は本研究で開発したRDD法の有効性を検証するため、包括的なシミュレーションを行った。RDD法において変数となるパラメータ（$\Delta\omega$，k_{ex}，p_b）を系統的に変化させ、τ_{CP} に応じて強度データを生成した。さらにその強度データに対して1%～2%のエラーを加えた（Fig. 2）。それらのデータに対してフィッティングを行い、データ生成に用いたパラメータと比較することで、RDD法によって解析可能なパラメータの範囲を確認した（Fig. 3）。

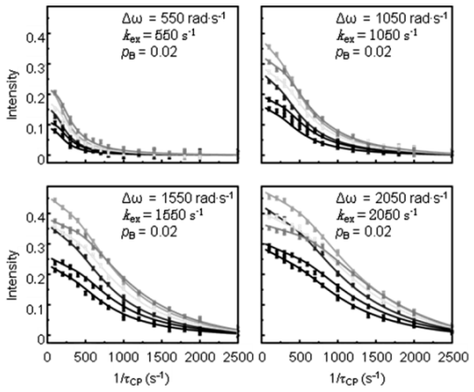


Fig. 2 Fitting Simulation of RDD at magnetic field of 600 and 750 MHz.

さらに我々は、いくつかのシグナルが重なった高分子量タンパク質を実際に測定し、RDD法を用いて解析を行った。そして、今までは重なりにより解析不可能であったシグナルから構造情報を抽出することに成功した。

RDD法は、特に選択標識サンプルやパルスプログラムのさらなる変更を必要としないため簡単に適用可能であり、分子量の大きなタンパク質や天然変性タンパク質など、より多くのタンパク質の構造情報が得られることが期待できる。

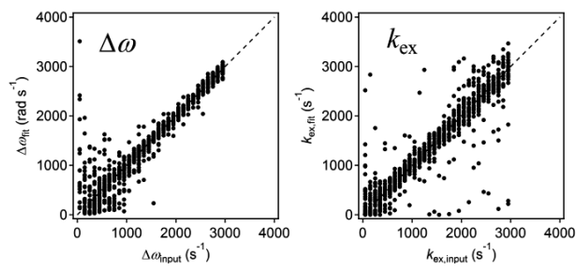


Fig. 3 Comparative of input and fitting parameters in $\Delta\omega$ and k_{ex}.

P51

対流の影響を抑制した^{13}C観測DOSY

○松原康史
日本ポリケム株式会社　研究開発部

^{13}C-Detected DOSY with Convection Compensation

○Koshi Matsubara
Research and Development Division, Japan Polychem Corporation

A convection compensation scheme was incorporated into an INEPT-DOSY pulse program to perform ^{13}C-detected DOSY experiments of polyolefins at 130 ˚C. The pulse program consists of DOSY and INEPT sections. In the DOSY section a double-stimulated-echo technique compensates the effect of convection, and protons encode diffusion information. Next, the refocused INEPT transfers the magnetization from protons to ^{13}C for signal detection during which protons are broadband decoupled. The diffusion coefficient measured at 130 ˚C for a size-fractionated polyethylene in solution was almost constant even though diffusion time was varied in the range of 100－700 ms; this indicates that the effect of convection was considerably compensated.

Diffusion Ordered NMR Spectroscopy（DOSY）は、分子の拡散速度の差を利用してNMRシグナル強度に分子サイズの情報を反映させる手法である。磁場勾配の増加と共に拡散の速い低分子成分はシグナルが優先的に減弱するが、拡散の遅い高分子成分はシグナルが緩やかに減弱する。混合物試料の多数のNMRシグナルを個々の化合物のシグナル群にグループ分けするだけでなく、分子間相互作用の有無の判別、エマルジョンの粒子径の測定、そして合成高分子の分子量分布の評価などにDOSYを応用することができる。

ポリオレフィンは安価、軽量で、機械特性に優れるために構造材料として幅広く使用されている。多くのポリオレフィンは100℃以上で溶解する。そして高温ではNMR試料管中で対流が起こり、対流はDOSYの測定を妨害する。拡散速度に対して対流の速度が小さい場合は、観測される拡散係数は対流分の“下駄を履く”。対流がより速くなれば、拡散係数の誤差はより大きくなり、ついにはDOSYスペクトルの測定自体が困難になる。^{1}H観測DOSYでは対流の影響を抑制する方法がすでに発表されている[1]。対流の速度が一定であれば、double stimulated echoにより対流の影響はキャンセルされる。しかし、一般にポリオレフィンの^{1}H NMRスペクトルはシグナルの重なりが厳しいために、^{1}H NMRスペクトルから得られる化学構造の情報は限られる。そこでポリオレフィンの詳細な化学構造すなわちモノマー連鎖、立体規則性、異種結合、末端基などは通常^{13}C NMRにより解析される。本研究ではDOSYをポリオレフィンへ応用するために、対流の影響を抑制した^{13}C観測DOSYのパルスシーケンスを作成した。

^{13}C観測DOSY，対流，ポリオレフィン

○ まつばらこうし

^{13}C観測DOSYのパルスシーケンスを図-1に示す。磁気回転比の小さい^{13}C核での拡散実験は不利である。そこで、^{1}H核に対してdouble stimulated echoで対流の影響を抑制した拡散実験[1]を実行したあと、リフォーカスINEPTで^{1}H核から^{13}C核に磁化を移し、^{13}C NMRスペクトルを観測する。10mmφプローブを装着したBruker BioSpin製AVANCE III NMR分光計を使用して、130℃の溶液における分子量分布の小さいポリエチレンの拡散係数を^{13}C観測DOSYで測定した。対流の影響を抑制しない場合と抑制した場合の拡散時間Δと拡散係数D の関係を図-2示す。対流の影響を抑制しない場合、拡散時間とともに拡散係数が急激に減少し、対流の影響が極めて大きいことを示している。一方、対流の影響を抑制した場合は、100－700msの拡散時間でほぼ一定の拡散係数が得られており、対流の影響がかなり抑制されていることを示している。

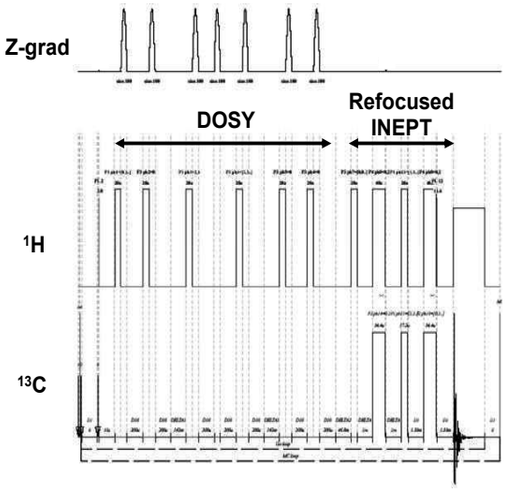


Fig. 1. Pulse sequence for ^{13}C-detected DOSY experiment with convection compensation.

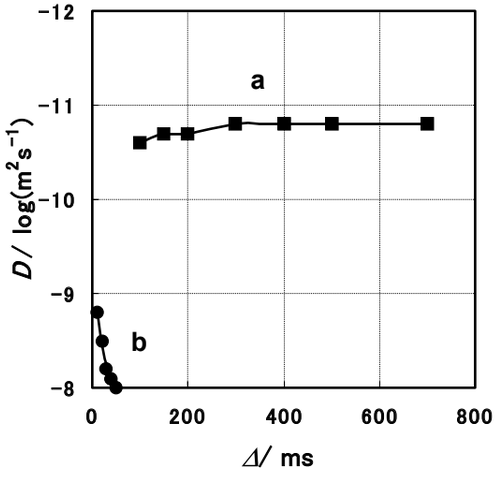


Fig. 2. Relationship between diffusion coefficient and diffusion time measured at 130 ˚C for a size-fractionated polyethylene in solution using ^{13}C-detected DOSY (a) with and (b) without convection compensation.

参考文献

[1] A. Jerschow and N. Müller, *J. Magn. Reson.* **1997**, *125*, 372－375.

P52

ポリ乳酸の物性を左右する立体規則性とそのNMRピークの起源

○菅沼こと[1,2],堀内健[2],松田裕生[2],右手浩一[3],朝倉哲郎[1]
[1]農工大院・工
[2]帝人・構造解析研究所
[3]徳島大院・STS

The Chemical Shift Origin of Stereoregularity of Poly Lactic Acid controlling the Physical Properties.

○Koto Suganuma[1,2], Ken Horiuchi[2], Hironori Matsuda[2], Koichi Ute[3], and Tetsuo Asakura[1]
[1]Department of Biotechnology, Tokyo Univ. of Agriculture and Technology, Tokyo, Japan.
[2]Material Analysis Research Laboratories, Teijin Ltd.,Tokyo, Japan.
[3]Chemical Science and Technology, Univ. of Tokushima, Tokushima, Japan

In order to clarify the origin of NMR peak splitting due to the stereoregularities of poly lactic acid (PLA), the model compounds (dimer and trimer) with different tacticities were synthesized. The ^{1}H and ^{13}C chemical shifts of the model compounds were calculated quantum-chemically on the basis of both the fraction of the time-averaged conformations in solution and the chemical shift of each conformation. The tacticity splitting of the dimers showed no significant difference among the solvents used here, which means that the splitting is due to difference in the inherent electric states of the molecules. The good agreement was obtained for all the calculated and observed ^{1}H and ^{13}C chemical shifts of dimer model compounds with different tacticities. This approach was extended to trimer model compounds to reproduce the tacticity splitting of the trimers and also PLA polymer.

＜諸言＞

ポリ乳酸（PLA）は、近年、環境を重視したポリマーとして、特に着目されるようになった。しかしながら、その欠点は耐熱性が低い点である。それを向上させる有力な方法として、立体規則性を制御したPLAの合成と、そのステレオコンプレックス(sc)結晶を生成させる方法がある[1]。従って、PLAについて立体規則性やその連鎖分布を把握することは大変重要である。溶液NMRは、ポリマー中の微細構造を理解する上で極めて有効な方法である。これまでに、PLAの構造解析にも溶液NMRが適用され、CH水素、及びCH炭素ピークは、PLA中の4連子を反映すること、さらに、カルボニル炭素ピークは、6連子を反映して分裂することが報告されてきた[2,3]。本研究では、この立体規則性によるピーク分裂の起源を明らかにするため、まず、立体規則性の異なるPLAのモデル化合物を合成してNMR測定を行い、立体規則性が化学シフトに及ぼす影響を明らかにした。また、量子化学的計算の手法を用いて、内部回転角の関数としてコンフォメーションエネルギーとNMR化学シフトを計算し、立体規則性毎に平均化することによって、実測の立体規則性ピークとの比較を行った。

Poly lactic acid, Stereoregularity

○すがぬまこと，ほりうちけん，まつだひろのり，うてこういち，あさくらてつお

＜実験・計算＞

PLAの1量体，ならびに立体規則性の異なる2量体および3量体モデル化合物を合成し、NMR測定を行った。NMR装置はJEOL製 ECA600を用い、溶媒を変えて、室温で^{1}H及び^{13}C NMRスペクトルを測定した。また、Gaussian09を用いてコンフォメーションエネルギーと化学シフトの計算を行った。

＜結果・考察＞

(1) ポリ乳酸2量体モデル化合物の合成とNMR測定

ポリ乳酸の2量体モデル化合物（Fig.1）について立体規則性の異なる化合物（アイソタクチックとシンジオタクチック）を合成して^{1}H及び^{13}C NMR測定を行った。さらに、HMBC測定によって全てのピークの帰属を行い、化学シフトの実測値を得た。NMR測定は3種の溶媒（$CDCl_3/CCl_4$ (20/80 v/v), $CDCl_3$, DMSO-d_6）用いて行った。測定溶媒の違いによる化学シフトの比較をFig.2 (^{1}H NMR) とFig.3 (^{13}C NMR) に示す。今回測定溶媒に用いた溶媒は、$CDCl_3/CCl_4$ (20/80 v/v) ＜ $CDCl_3$ ＜ DMSO-d_6 の順に溶媒効果が大きいと考えられるが、Fig.2,3でアイソタクチック(i)とシンジオタクチック(s)の序列を比較すると、全ての原子で測定溶媒に関わらず同じ序列であることがわかる。つまり、これらの溶媒を用いた場合、立体規則性ピークの序列を議論する上で溶媒効果は極僅かであることがわかった。

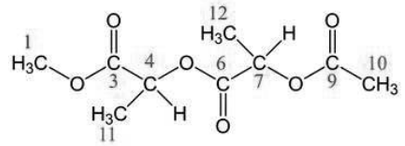


Fig.1 dimer model compound (**1**) of poly lactic acid

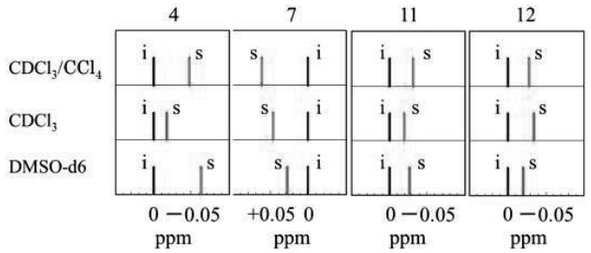


Fig.2 Comparison of the observed ^{1}H chemical shifts (in ppm) of PLA dimer model compound (**1**) shown as stick spectra.

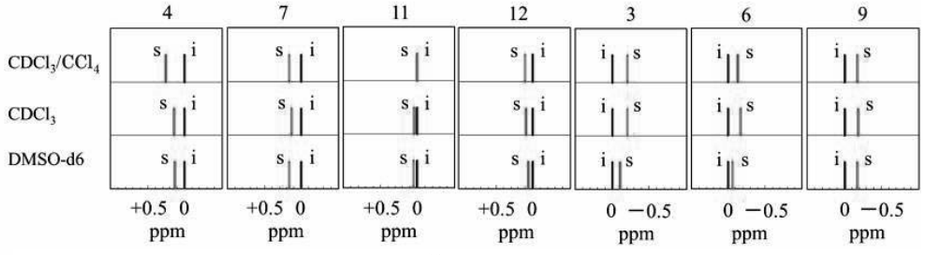


Fig.3 Comparison of the observed ^{13}C chemical shifts (in ppm) of PLA dimer model compound (**1**) shown as stick spectra.

(2) ポリ乳酸2量体モデル化合物の化学シフト計算と実測値の比較

ポリ乳酸1量体モデル化合物のラマチャンドランマップで得られた2つの安定なコンフォメーション[4]の組み合わせによって得られた4つの2量体モデル化合物のコンフォメーションについて量子化学計算による構造最適化を行い、さらに、エネルギー計算に基づく存在確率を算出した。さらに、各コンフォメーションについて全ての原子の化学シフトを計算し、各コンフォメーションの存在確率を基に平均化して化学シ

フトの計算値を得た。構造最適化と化学シフト計算には、2つの計算手法（HFとB3LYP）を用い、また、基底関数には3つの関数（6311+G*, TZVP, cc-pVTZ）を用いて計算結果を検討した[5]。その結果、基底関数に関わらず、構造最適化にB3LYP、化学シフト計算にHFを用いた時、アイソタクチックとシンジオタクチックの序列において、^{1}H及び^{13}Cの全ての原子にで、化学シフトの計算値が実測値を再現することがわかった（Fig.4,5）。以上より、計算結果が妥当であることが確認できた。

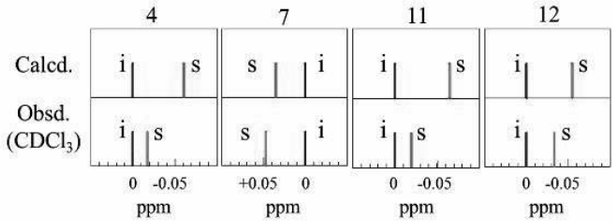


Fig.4 Comparison of the observed ^{1}H chemical shifts (in ppm) of PLA dimer model compound (**1**) shown as stick spectra.

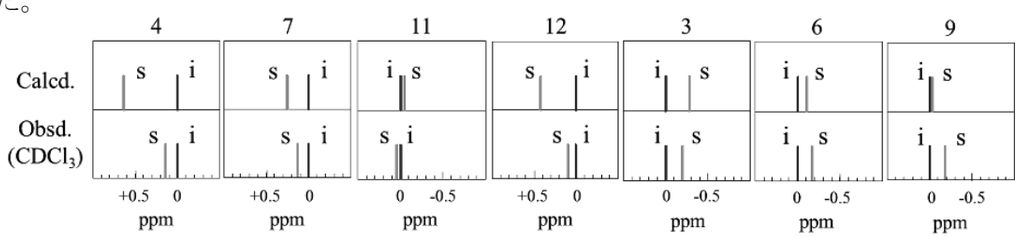


Fig.5 Comparison of the observed ^{13}C chemical shifts (in ppm) of PLA dimer model compound (**1**) shown as stick spectra.

(3) ポリ乳酸3量体モデル化合物の合成とNMR測定

立体規則性の異なるポリ乳酸の3量体モデル化合物（ii, is, si, ss）を合成した。合成方法をFi.g6に示す。合成した3量体モデル化合物4種それぞれについて^{1}H及び^{13}C NMR測定を行った。さらに、HMBC測定によって全てのピークの帰属を行い、化学シフトの実測値を得た。

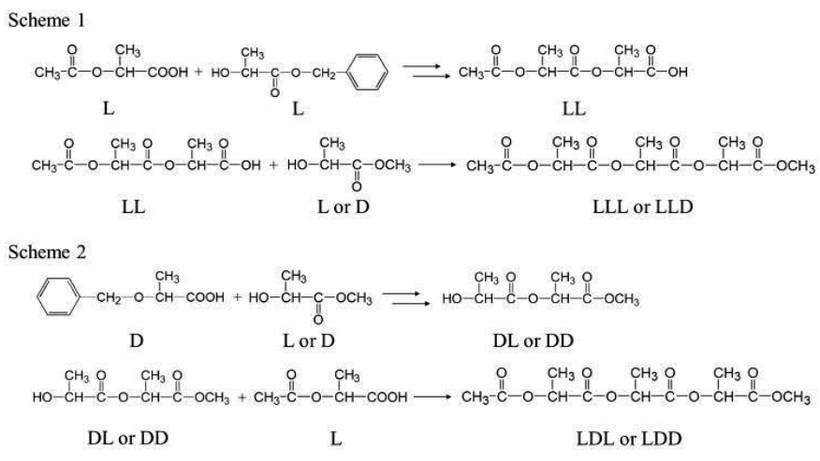


Fig.6 Experimental scheme of trimer model compounds (**2**) synthesis. Scheme 1 is synthesis of LLL (ii) and LLD (is), and scheme 2 is synthesis of LDL (ss) and LDD (si).

(4) ポリ乳酸3量体モデル化合物とポリマーの化学シフト実測値の比較

ポリマー（PLA）のNMRスペクトルにおいて、CH水素とCH炭素は4連子を反映してピーク分離をし、全てについて帰属されており、カルボニル炭素は6連子を反映してピーク分離をし、一部について帰属されている（Fig.7）。このうち、全てのピークが帰属されているCH水素とCH炭素について、ポリマーと3量体モデル化合物の化学シフト実測値の比較を行った。尚、ポリマーにおいてCH水素とCH炭素は、4連子を反映してピーク分離しており、3量体モデル化合物と比較するため、tetradピークをtriadに変換して比較した（Fig.8）。

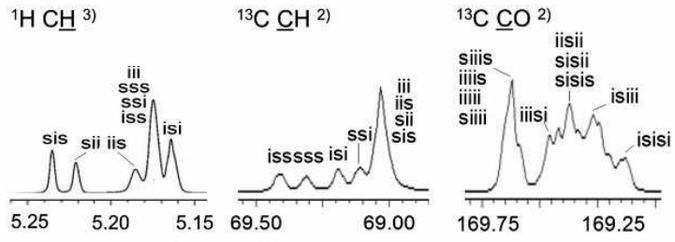


Fig.7 ^{1}H and ^{13}C NMR spectrum of PLA.

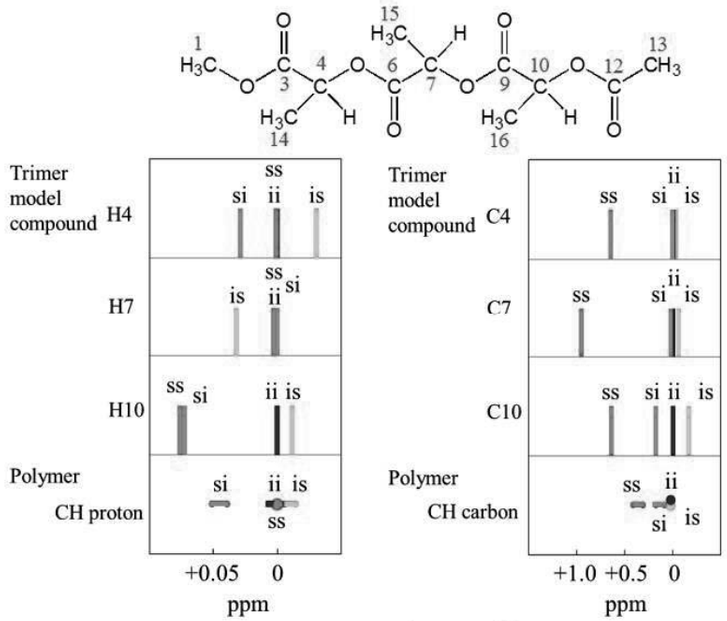


Fig.8 Comparison of the observed ^{1}H and ^{13}C chemical shifts (in ppm) of PLA dimer model compound (**2**) and PLA shown as stick spectra.

Fig.8より、立体規則性ピークの序列を比較すると、CH炭素とCH水素共に、ポリマーにおける各々の観測中心を考慮することで、3量体モデル化合物とポリマーで良好な相関が得られた。今後、3量体モデル化合物の化学シフト計算を行い、各コンフォメーションとの関係を明確にすることによって、立体規則性ピークの起源を明らかにする。

＜謝辞＞

ポリ乳酸2量体モデル化合物を合成いただいた帝人ファーマ 生物医学総合研究所 研究員 小宮山真人氏に感謝いたします。

＜参考文献＞

[1] Fukushima, K. *et al. J. Polym. Sci. Chem..Ed.,* **2008**, *46*, 3714.

[2] Bero, M.*et al. Makromol. Chem*. **1990**, *191,* 2287.

[3] Zell, M. T. *et al. Macromolecules* **2002**, 35, 7700.

[4] Suganuma, K. *et al. Macromolecules*, **2011**, *44*, 9247.

[5] Suganuma, K. *et al. Polymer J*., **2012**, *44*, 838.

P53 マンノースオリゴ糖鎖の配座解析に有益な NMR測定法

○鵜澤 洵[1,2]、関 宏子[2]、山口芳樹[1]
[1]理研・糖鎖構造[1]、千葉大・分析センター[2]

Useful NMR methods for the conformational analysis of the oligomannose chains

○ Jun Uzawa[1,2], Hiroko Seki[4] and Yoshiki Yamaguchi[1]
[1]RIKEN, Structural Glycobiology, [2]Chemical Analysis Center, Chiba University

Abstract

NMR spectroscopy is a very important and useful method for the structural analysis of oligosaccharides. We here introduce a novel technique called DPFGSE-Double-SPT-Difference and DPFGSE-NOE/ROE-SPT-Difference spectroscopy. Even if the signals in the NMR spectra overlap, each signal can be accurately assigned. In particular, the DPFGSE-NOE/ROE-SPT-Difference is very useful for identifying sugar connectivity. The 1,6-glycoside conformation in a D_2O solution of mannose pentasaccharide is described.

序論

全蛋白質の半数以上には糖鎖が結合していると言われており、また、薬品など汎用されている有機化合物には糖の構造を含むものも多く存在する。糖鎖の一連の NMR 解析方法はこれまでにほぼ確立しているものの、まだ取り残されている課題も多い。特に糖鎖の NMR スペクトルは、高磁場化した現在でも構造の類似性から信号の重なりが多く、詳細な解析の障害となっている。しかしながら糖鎖の溶液中における立体配座や立体構造を決定し得る NMR は、糖鎖の機能や作用機序の解明において重要な役割を果たす。演者らはすでにアスパラギン型糖鎖の基本構造を有する合成糖鎖を用いてすべての NMR シグナルを帰属し、その立体配座について考察した [1)]。この報文において使用した測定法の多くは本討論会において発表した DPFGSE-TOCSY/NOE/ROE-HSD 法（第 42 回）、DPFGSE-SPT 法（第 43 回）、DPFGSE-NOE /ROE-SPT-Difference 法（第 49 回）を駆使した。スピン結合定数の利用は、糖鎖解析の鍵となるが、マンノースの場合 H-1 と H-2 間の値が小さく、スカラー結合を利用した帰属が困難である。演者らは ^{13}C-selective HSQC-TOCSY などを測定することにより、H-1 から H-6 までの帰属に成功した。この結果を基に、マンノースが 5 個結合したオリゴ糖鎖の alpha1-6 結合の配座に関する情報を得た。また、糖鎖のダイナミクスを解析するために温度可変測定を行い、興味深い結果を得た。これらの結果と使用した測定法について述べる。

キーワード：
マンノースオリゴ糖鎖、DPFGSE-NOE/ROE-SPT-Difference、立体配座解析

うざわ じゅん、せき ひろこ、やまぐち よしき

結果と考察

典型的なハイマンノース型糖鎖の構造式を **Figure 1** に示す。これは蛋白質の品質管理や HIV の感染等で役割を果たしていることが知られている。四角で囲んだマンノース５個からなる糖鎖（**M5**）を化学合成して、糖鎖解析のモデル化合物とした。

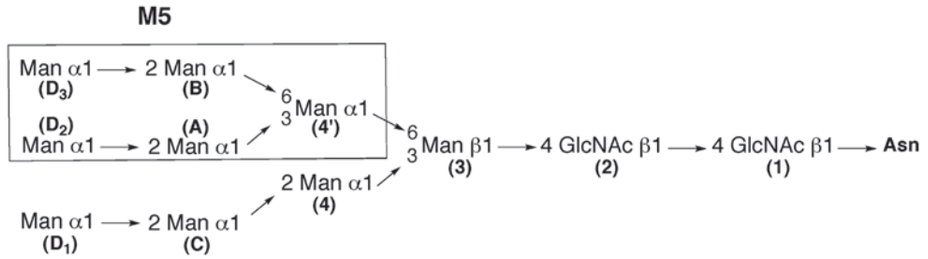


Figure 1. Structure of asparagine-linked high-mannose-type sugar chain.
A pentasaccharide unit (**M5**) is shown within the rectangle.

M5 およびこれを構成する２～３糖の解析は、最初に ^{1}H、^{13}C、DEPT など一次元スペクトルおよび DQF-COSY、HSQC、HMBC など二次元スペクトルを測定して解析した。スペクトルの込み合った部分については、DPFGSE-SPT、DPFGSE-ROE-HSD および Carbon selective HSQC-TOCSY により解析した。これらの測定法はマンノースオリゴ糖鎖のように、アノメリックプロトンを鍵とした解析が難しい場合には有益であった。上記パルス系列については **Reference** を参照されたい。

1-6 結合部位は自由度が高いので詳細な解析は困難を伴う。今回は以下により解析した。結果を **Figure 2** に示す。（２）は（１）に示される通常の ROE で観測される 4’-H-6 に由来する２本のピークを SPT 条件で照射した差スペクトルである。このパルスシーケンスは二つのピークを個々に測定して差をとるのではなく、連続的に測定するシーケンスとして作製し DPFGSE-Double-SPT-Difference 法と名付けた。（３）は DPFGSE-ROE-SPT-Difference 法により、通常の ROE による結果を確実に帰属するために測定した結果である。このパルスシーケンスでは、ROE 照射は一つのピークを選択的に照射し、ここで出てきた信号の２ピークを SPT 照射して差をとるように作製した。あくまでも ROE 照射で発生した磁化を SPT で磁化移動している。（２）と（３）を比べると、（２）では 4’-H-6 に重なったシグナルがあるため、関係の無いピークも現れているが、（３）には 4’-H-6 の２つのプロトン以外は無くなっている。しかし、これは ROE で出た磁化強度を見ているので、S/N は（２）より悪くなっている。（２）と（３）の測定法は既存の一次元の測定法から得た結果を補強し、新たな情報を得ているが、多次元に展開する測定法に比べ、測定時間は圧倒的に短いことが大きな特徴である。

次に、糖鎖のダイナミックな構造変化を見るために、293 K と 323 K で HSQC を測定して比較検討した。その結果、(4’)と(A)の結合部位と(4’)と(B)の結合部位のプロトンとカーボンに大きな化学シフト変化が観測された。

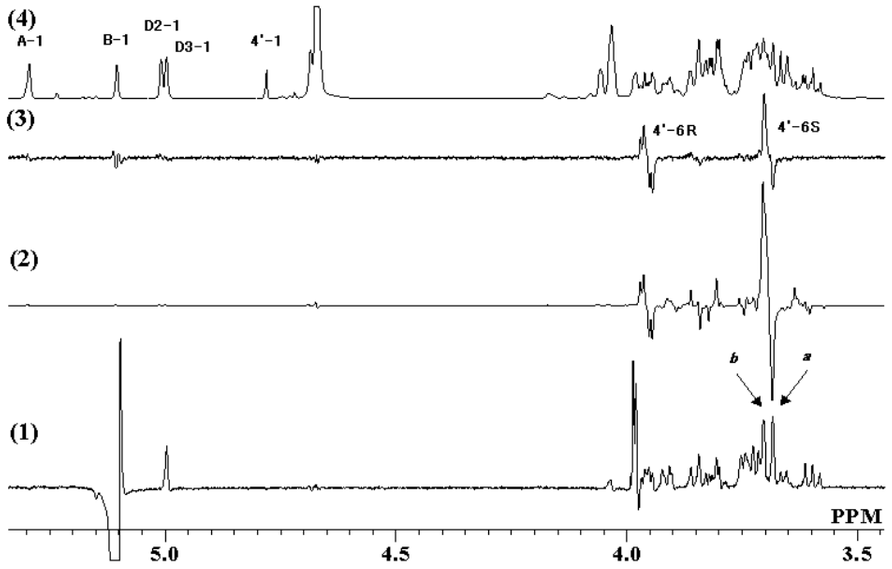


Figure 2. DPFGSE-ROE-SPT-difference and DPFGSE-Double-SPT-Difference spectra of **M5** (5 mg in D_2O;0.6 ml). (1) DPFGSE-ROE spectrum. Irradiation at 5.10 ppm. 64 scan. (2) DPFGSE-Double-SPT- Difference; SPT irradiation at 3.70 and 3.68 ppm (indicated by arrows *a* and *b* in (1)). 32 scan. (3) DPFGSE-ROE-SPT-difference spectrum. ROE irradiation at 5.10 ppm and SPT irradiation at 3.70 and 3.68 ppm (same as (2)). 128 scan. (4) ^{1}H 1D spectrum of M5. 8 scan.

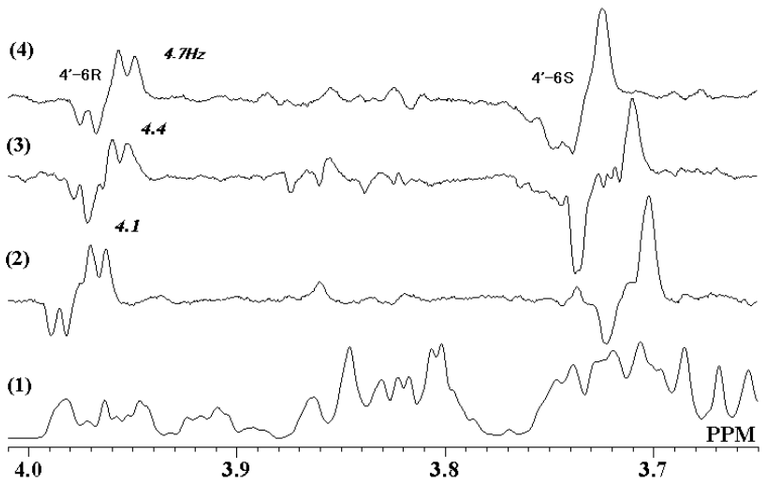


Figure 3. DPFGSE-ROE-SPT-difference spectra of **M5** at different temperature. Spin coupling constant of H5-H6proR is indicated in italics. (1) ^{1}H 1D spectrum of M5. (2) DPFGSE-ROE-SPT-Difference spectrum at 303 K. (3) 313 K. (4) 323 K. (2)-(4) 128 scan

さらに、この運動の変化を詳細に見るために温度可変による DPFGSE-ROE-SPT-difference を測定し、(4')- H-6proR の信号のスピン結合定数($^3J_{H5,H6}$)の変化を読み取った。これを **Figure 3** に示す。この結果を **Figure 4** で検討すると、ω について、*gg* と *gt* の存在割合に微妙な変化があることが読み取れた。 これらは先に述べた 293 K と 323 K で測定した HSQC スペクトルからはデジタル分解能の限界から読み取ることはできなかったことである。以上の結果を **Figure 5** に示す。

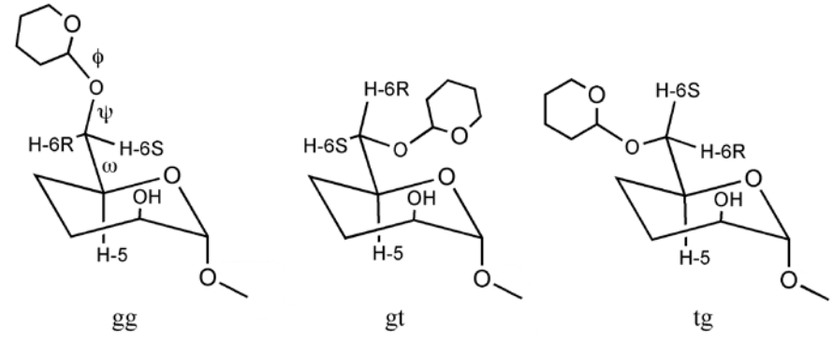


Figure 4. Three torsion angles (ω, ψ, ϕ) used to express the conformation of the (1-6) linkage and three rotamers defined by the ω angle, *gg*, *gt* and *tg*.

結語

1　安定同位体ラベルをしない糖鎖の構造解析には二次元 NMR ばかりでなく、この報告で述べたような一次元の測定法も適切に組み合わせることが肝要と考える。

2　天然有機化合物の解析で活躍する HMBC 法は糖鎖間の結合情報を得るのに有益である。ROE/NOE 情報と組み合わせることによって、糖鎖間の配座を絞り込むことができる。

3　DPFGSE を使う Double-SPT-Difference 法と NOE/ROE-SPT-Difference 法は重なり合ったスペクトルの解析に有益である。この測定法のポイントは照射パワー強度と照射ピークの設定である。

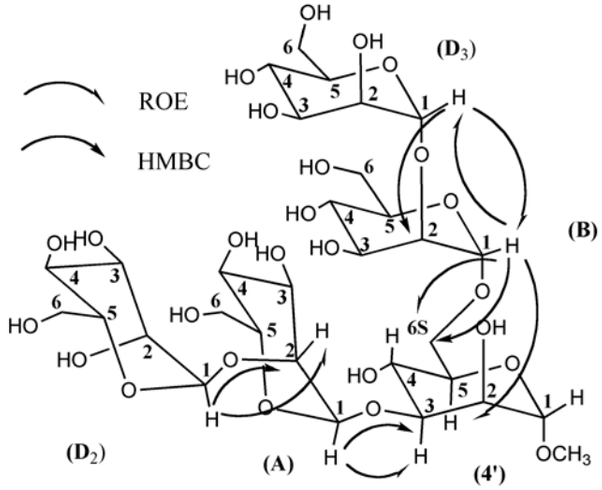


Figure 5. Chemical structure of **M5** with ROE and HMBC connectivities.

Reference

1. Y. Kubota, H. Hori, R. Sawa, H. Seki and J. Uzawa, *Magn. Reson. Chem.,* in press. DOI 10.1002/mrc_3859.

P54

エピガロカテキンガレート（EGCg）誘導体の合成とNMRによる構造解析

○梅原将洋，西村栄作，斎政彦，伊藤建比古
森永製菓・ヘルスケア事業部

Synthesis and structure analysis using NMR of (-)-epigallocatechin gallate (EGCg) derivatives

○Masahiro Umehara, Eisaku Nishimura, Masahiko Sai, and Tatsuhiko Ito
Health Care Division, Morinaga & CO., LTD., Yokohama, Japan.

Catechins, the major polyphenolic constituents of green tea, have many biological activities. Among them, (-)-epigallocatechin gallate (EGCg) have reported high biological activities, such as antioxidative, antimicrobial and antitumor activities. In addition, a type of EGCg derivative, methylated catechin, was reported and its methyl group has an influence on its bioactivities. In this study, we tried to synthesize EGCg derivatives and analyze their structure using NMR (700 MHz) and investigated structure-activity relationships.

【背景・目的】

緑茶に多く含まれるカテキン類は、様々な生理活性を示すことが報告されており、そのカテキン類の中でもエピガロカテキンガレート(EGCg)（Fig.1）は特に強い生理活性を示す。この化合物の類似体としては、非ガレート型であるエピガロカテキン(EGC)、立体異性体であるガロカテキンガレート(GCg)やメチル化誘導体である3”Me-EGCgなどが報告されており、ガレート基やメチル基が活性に及ぼす影響などが検討されている。本研究では、各環(A、B、およびD)にジメチルアリル基を導入した誘導体を合成し、NMR(700 MHz)による溶液中での構造解析を行い、各種生理活性を測定することで、その構造と活性との相関について検討を行った。

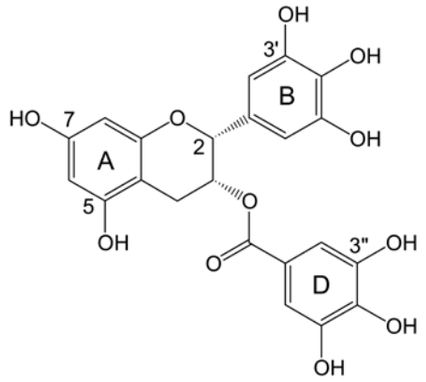


Fig. 1 Epigallocatechin gallate (EGCg)

Catechin, Epigallocatechin gallate, Structure-activity relationships

○　うめはら，まさひろ

【方法】

出発物質としてテアビゴ™(EGCg≧94%)を用い、1-bromo-3-methyl-2-buteneと反応させることで数種のジメチルアリル化誘導体を得た。これらをHPLCにより精製し、^{1}H-NMR、^{13}C-NMRおよび各種二次元NMR(^{1}H-^{1}H COSY、^{1}H-^{13}C HSQC、^{1}H-^{13}C HMBC)により構造解析を行ったところ、各環にそれぞれジメチルアリル基が導入された誘導体(8-ジメチルアリル-EGCg、2’-ジメチルアリル-EGCg、2”-ジメチルアリル-EGCg)であることがわかった。

【結果・考察】

合成した化合物について、DPPAラジカル消去活性、SOD様活性、およびアンジオテンシン変換酵素(ACE)阻害活性を測定したところ、A環にジメチルアリル基を導入した誘導体が、いずれにおいても最も高い活性を示した。一方、グルクロン酸抱合阻害活性を検討したところ、B環にジメチルアリル基が導入された誘導体は、その抱合体が確認されなかった。これらのことより、A環におけるジメチルアリル誘導体化は、EGCgの生理活性を向上させる上で有用であり、また、B環におけるジメチルアリル誘導体化は、抱合阻害に大きく関与することが考えられた。本討論会では、これらの詳細について報告する。

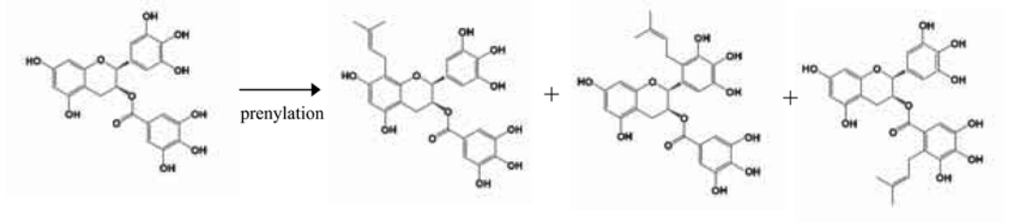


Fig. 2 Structure of synthesized dimethylally EGCg derivatives

P55

GM-1ガングリオシドがクラスター化したナノ表面の自己組織化

○佐藤宗太[1], 吉正　泰[1], 藤田大士[1], 矢木真穂[2], 加藤晃一[2, 3], 藤田誠[1, 3]

[1]東大院工

[2]岡崎統合バイオサイエンスセンター

[3]JST-CREST

Self-Assembly of Nano-Surface Decolated with Ganglioside GM-1 Clusters

○Sota Sato[1], Yutaka Yoshimasa[1], Daishi Fujita[1], Maho Yagi-Utsumi[2], Koichi Kato[2, 3], and Makoto Fujita[1, 3]

[1]Department of Applied Chemistry, School of Engineering, The University of Tokyo, Tokyo, Japan.

[2]Department of Life and Coordination-Complex Molecular Science, Institute for Molecular Science and Department of Bioenvironmental Science, Okazaki Institute for Integrative Bioscience, National Institutes of Natural Sciences, Aichi, Japan.

[3]JST-CREST

On cellular membrane, the cluster of ganglioside GM-1 controls the accumulation process of amyloid, which is known to be an origin of Alzheimer disease. At the initial stage of the accumulation of amyloid, the sugar moiety of GM-1 should specifically interact with amyloid Abeta, but the mechanism has been understood only partially. A model study using the sugar clusters with a precise structure will reveal the details based on molecular structures.

A self-assembled spherical metal-organic molecule with a well-defined structure in hand, we expected that the skeleton can be used as a structural basis to construct the sugar cluster. In this presentation, we decollated 24 sugar moieties of GM-1, which was obtained by the cleavage of ceramide chain of ganglioside GM-1, on the surface of the spherical complex. Further process to exchange the solvent enabled us to prepare the solution of the sugar cluster and to examined the interaction with Abeta in mild and biocompatible conditions.

細胞膜上では、GM-1ガングリオシドはクラスター化し、アルツハイマー病の原因であるアミロイドの蓄積を制御する。この蓄積の最初期過程において、GM-1の糖鎖部分とアミロイドAbetaとの特異的な相互作用が生じるが、その機構は未解明の部分が多く、精密な構造のクラスターモデルによる検討が必要である。我々は、直径数nmの球状錯体を自己組織化によって精密合成しており、今回、セラミド鎖を切断して糖鎖部分だけを切り出したGM-1を、この錯体表面に24個だけ均等配置できた。さらに、溶媒置換するとこのGM-1クラスターの水溶液を調製でき、生体内に近い条件でAbetaとの相互作用を検討できることを確認した。

Self-Assembly, Spherical Complex, Ganglioside GM-1

○さとうそうた, よしまさゆたか, ふじただいし, やぎまほ, かとうこういち, ふじたまこと

これまでに、折れ曲がった二座の配位子(L)と、Pd(II)イオンやPt(II)イオンなどの遷移金属イオン(M)とを、溶媒中で混合するだけで$M_{12}L_{24}$組成の球状錯体が得られることを見いだしている。この錯体は、直径が数ナノメートルにも及び、分子量が1万を超すにもかかわらず、その分子構造は精密に定まっており、構造に分布が無いという特徴を持つ。この錯体上にGM-1を化学修飾すれば、精密構造を有するGM-1クラスターを調製できると期待される。

予備的検討として、GM-1を配位子に共有結合で連結し、配位子の数と同じ24個のGM-1で修飾した球状錯体を合成したが、GM-1のセラミド鎖による相互作用の阻害が問題であった。そこで、今回、セラミド鎖を切断したGM-1を修飾した配位子**1**を、還元的アミノ化とオゾン酸化の反応を経由して合成した。次にCa^{2+}イオン存在下で、Pd^{2+}イオンを配位子**1**とを2:1の比で混合し、DMSO中70℃で10時間加熱撹拌した。この錯形成反応により、表面に24個のGM-1由来の糖鎖を有する球状錯体**2**が定量的に得られた（図1）。錯体**2**の構造は各種NMRにより決定した。また、合成反応においてはDMSOを用いたが、溶媒置換をすることで、水溶液系溶媒に置換することができ、錯体**2**が水中で安定であることを確認できた。

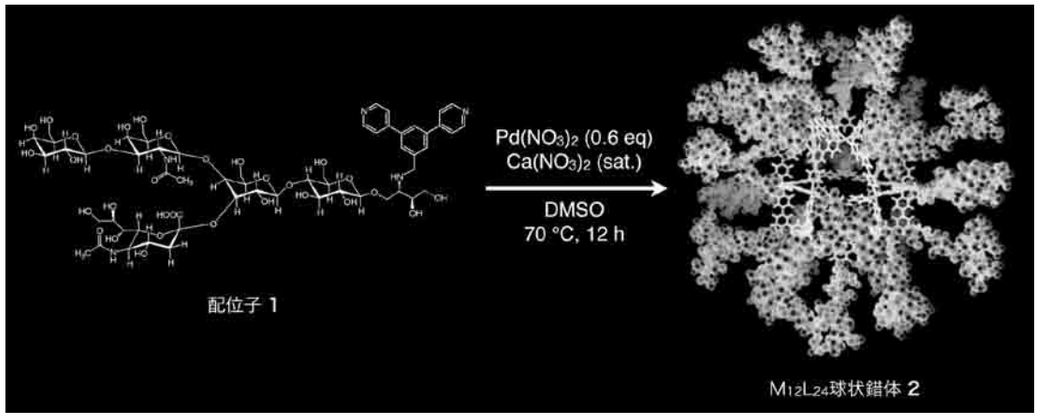


Fig. 1. 24個のGM-1糖鎖部位を均等に表面修飾した$M_{12}L_{24}$球状錯体の合成。

GM-1の糖鎖クラスターを人工的に調製する試みとしては、加藤グループがセラミド鎖の疎水性であることを利用したGM-1のミセルの調製を報告している。このクラスターにAbetaを作用させると、セラミド鎖が形成する脂質膜部位にAbetaが部分的にαヘリックス構造をとって埋没した構造が観測され、初期の蓄積機構が解明された。しかし、GM-1とAbetaとの相互作用は観測されず、どのように特異的な認識が生じるのか未解明である。本検討による、球状錯体の表面に構築したGM-1クラスターは、脂質部位がないために、GM-1とAbetaとの最初期過程における特異認識の解明に特化したモデルだと考えられる。

この錯体**2**とAbetaとを水溶液中で混合し、その相互作用を各種NMR測定によって評価した。Abetaの特定部位が相互作用に強く関与していることがわかってきており、これらの知見を報告する。

P56

溶液NMRを用いたポリカーボネート樹脂中の難燃剤の定量

○古川諒一[1]，兼崎隆[1]
[1]出光興産株式会社

Quantitative analysis of fire retardants in polycarbonate by NMR

○Ryoichi Furukawa[1], and Takashi Kanezaki[1]
[1]Idemitsu Kosan Co., Ltd., Chiba, Japan.

Synthetic polymer is used as mixture with various additives to invest functionally. In the viewpoint of quality control, one of the most important concerns is a management of dosage of the additives. A usual procedure for analysis of fire retardants in polymer includes extraction process and multiple measurements for qualitative and quantitative analysis of the additives. This complicated procedure sometimes causes problems due to human error. On the other hand, recently, the method for qNMR has attracted much attention. The method has expected to provide a quick and easy method for quantitative analysis of the additives. However, few methods for quantitative analysis of the additives by multinuclear qNMR have been reported. Here, we report the simple method for qualitative and quantitative analysis of fire retardants in polycarbonate polymer by ^{19}F and ^{31}P NMR.

【序論】

合成高分子には機能性を付与するために様々な添加剤が添加されている。これら添加剤の添加量を管理･把握することは､品質管理の観点で極めて重要である｡従って、合成高分子生産において添加剤が処方通りに添加されていることを確認する必要がしばしば生じる。

一般的な合成高分子中の添加剤の定量法は、添加剤を溶剤分別で抽出後、IR､GC/MS等で定性分析を行った後、GCやHPLC、蛍光X線等で定量分析を行うという非常に煩雑で時間を必要とする方法である。また、複雑な作業であることから分析者の力量によってばらつきがでることも避けられない。

一方、近年注目を集めている定量NMRの手法を用いれば、これまでよりも迅速で簡便に添加剤の定量ができる可能性がある。定量NMRにおいて、多核NMRを用いた手法は例が少ない。そこで、今回は多核NMR(^{19}F,^{31}P)を用いて、比較的添加量が多い難燃剤の定性・定量方法を開発したので紹介する。

定量分析，qNMR，多核

○ふるかわりょういち，かねざきたかし

【実験】

装置はJEOL RESONANCE社製 ECA500を使用した。

1. ソルト系難燃剤の定性・定量実験

ポリカーボネート試料をクロロホルムで溶解後、メタノールを加えて再沈殿する。上澄み液を採取・濃縮後、DMSO-d_6＋内部標準物質入り$CDCl_3$で溶解し、^{1}H、^{19}F-NMR測定を行う。(分析時間40分)

2. リン系難燃剤の定性・定量実験

ポリカーボネート樹脂約300mgを、内部標準物質を含む重クロロホルム3mlで溶解後、^{13}C、^{31}P-NMR測定を行う。(分析時間100分)

【結果】

1. ソルト系難燃剤の定性・定量実験

代表的なソルト系難燃剤2種(KFBS:パーフルオロブタンスルホン酸カリウム塩、KSS:ジフェニルスルホン-3-スルホン酸カリウム塩)を同時に定性・定量できる方法を開発した。通常、これらは蛍光X線(硫黄元素に着目)を用いて定量しているが、NMRで定量した値と非常に良い相関が得られた。また、NMRによる定量は難燃剤のシグナルを直接検出しており、硫黄のコンタミ等の影響もない。

2. リン系難燃剤の定性・定量実験

ポリカーボネート樹脂の構造解析を行う条件に内部標準物質を加えるだけで、リン系難燃剤の定量を行える方法を開発した。これまで、リン系難燃剤の定性・定量は前処理に必要な試料量が多く(約2.0g)、結果が出るまでに2～3日を要していたが、NMR法であれば少ない試料量(約0.3g)と短時間(約2時間)で実施できる。また、共重合組成やブレンド比などの算出も可能である。

今回開発した方法は検量線法であるため、内部標準物質と目的成分のピーク強度比に再現性があれば、あらかじめ作成しておいた検量線から容易に含有量の定量ができ、詳細な測定条件の検討は不要である。

P57

植物代謝活性の評価技術高度化の試み

○大石梨紗[1], 渡辺太二[1], 篠阿弥宇[2], 菊地淳[1,2,3,4]
[1]横市院生命ナノ, [2]理研PSC, [3]理研BMEP, [4]名大院生命農

Evaluating plant metabolic activity by advanced NMR method

○Risa Oishi[1], Taiji Watanabe[1], Amiu Shino[2], Jun Kikuchi[1,2,3,4]
[1]RIKEN PSC, Kanagawa, Japan., [2]Yokohama City Univ., Kanagawa, Japan., [3]RIKEN BMEP, Kanagawa, Japan., [4]Nagoya Univ., Aichi, Japan.

Jatropha curcas has been focused for a new energy source due to the oil from the seed. In this study we used Jatropha seed of different varieties and storage conditions to characterize them using NMR techniques. It is possible to verify the difference in the varieties from the NMR spectra and from the PCA analysis. Next, we will proceed the analysis for better assignment of the peaks and characterization using ^{1}H -^{13}C HSQC techniques.

【序論】

植物系試料はその利用に即した品質評価方法の確立が望まれており、そのポテンシャルを評価する際に最初の試料となるのは種子である。本研究では、荒漠地域でも生育可能で食糧生産と競合せず、その種子からバイオディーゼルやその他石油代替候補としての各種化学資源の供給が期待されるヤトロファを最初の品質評価試料として選択した。特に代謝活性を評価する技術構築を試み、その手法を他の植物系試料にも適用していく構想を展開している。

【試料と方法】

品種及び保管状況の異なるヤトロファ種子サンプル (Table 1) を、カーネル部分と種皮部分とに分け、各サンプルをヘキサン処理、乾燥、粉砕した後に、水、メタノール可溶性画分を抽出した。両溶媒への不溶画分はボールミル処理し、DMSO-d_6/pyridine-d_5 (4:1) に溶解し得る難溶性画分として、それぞれNMRスペクトルを測定した。

Table 1　List of sample information.

sample	stock temperature (℃)	variety	crop year	name
1	-4	IP-1P	2012	1p4
2	-4	IP-2P	2012	2p4
3	-30	IP-2P	2012	2p30
4	-4	IP-3P	2012	3p4
5	-30	IP-3P	2012	3p30
6	-4	IP-2P	2008	2p08
7	-4	IP-2P	2011	2p11
8	-4	—	2009	Ryukyu

【結果及び考察】

カーネルの水溶性画分では、特に 2P4、3P4 において他とは明らかに異なるパターンの 1D スペクトルが得られた(Fig.1) 。2P4 と 3P4 はスコアプロットで PC1 正方向に他と大きく離れており (Fig. 2a)、スペクトルパターンの違いが、PCA スコアプロットおよびローディングプロットでも大きな違いとして見られているのではないかと考えられた。

種子品質　代謝プロファイリング　安定同位体
○おおいしりさ、わたなべたいじ、しのあみう、きくちじゅん

ローディングプロットで特に突出してみられたピークをPC1 について 1～3、PC2 について①～③とし、当チームで開発してきたプログラム「SpinAssign[1,2)]」を用いてアノテーションを試みた。その結果、PC1 の 1 は α,α-trehalose, 1F-β-D-fructosylsucrose, D-Arabitol、2 はMaltose, 2-Methylserine, D-Xylulose、3 はPanose, D-Glucuronate, L-Phenylalanine 、 PC2 の ① は α,α-trehalose, 1F-β-D-fructosylsucrose, D-Arabitol、② は Panose, D-Glucuronate, L-Phenylalanine 、 ③ は L-Leucine, Pantohenate, L-Isoleucineといった候補物質が上げられた。

今後は、^{1}H -^{13}C HSQC等の多次元データと合わせて帰属を行い、種子保管状況等による組成変化を明らかにする。さらに討論会当日はこれらの解析結果に加え、種子を休眠打破した際に現れる代謝活性の顕著な差を、安定同位体標識技術により反応場の違いを増長させて観測可能かどうか[3 4)] を報告したい。

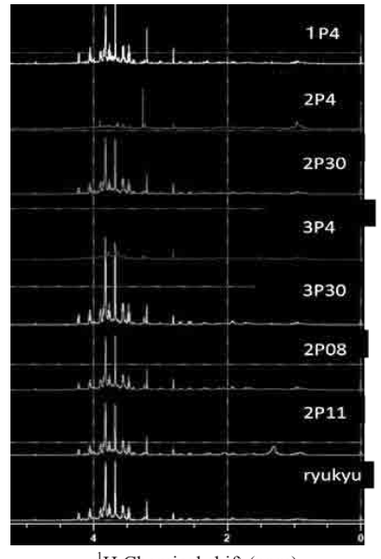


Fig.1　Stack plot of Jatropha kernel water-soluble fractions.

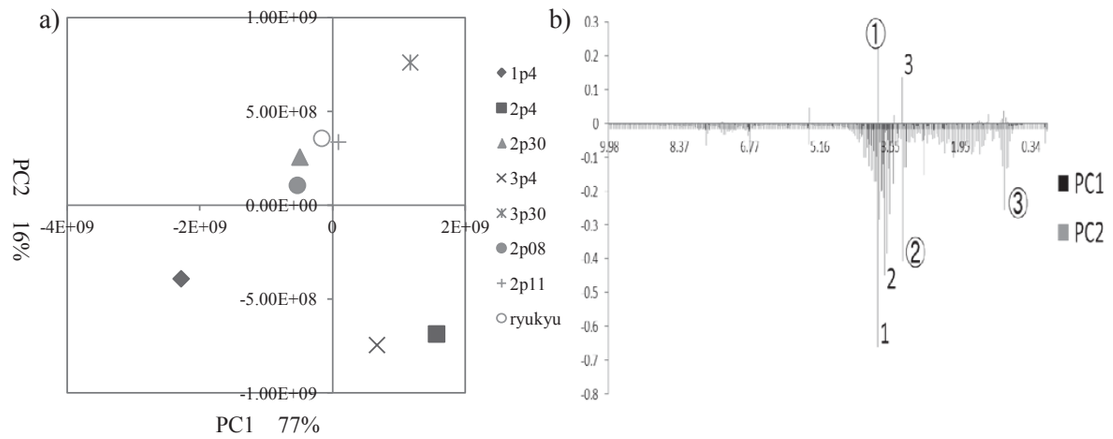


Fig.2　PCA of Jatropha kernel water-soluble fractions. a) Score plot. b) Loading plot.

【参考文献】

1) Chikayama, E., Suto, M., Nishihara, T., Shinozaki, K. and Kikuchi, J., *PLoS ONE* **3**, e3805 (2008).
2) Chikayama, E., Sekiyama, E., Okamoto, M., Nakanishi, Y., Tsuboi, Y., Akiyama, K., Saito,K., Shinozaki, K. and Kikuchi, J., *Anal. Chem*. **82**, 1653-1658 (2010).
3) Kikuchi, J., Shinozaki, K. and Hirayama, T., *Plant Cell Physiol*. **45**, 1099-1104 (2004).
4) Sekiyama, Y and Kikuchi, J., *Phytochemistry* **68**, 2320-2329 (2007).

P58

^{19}F NMRによる液相析出法の反応機構の評価

○ 奥村雄三，牧　秀志，水畑　穣
神戸大・院工

Evaluation of the reaction mechanism for Liquid Phase Deposition (LPD) method by ^{19}F NMR.

○Yuzo Okumura, Hideshi Maki, and Minoru Mizuhata
Graduate School of Engineering, Kobe University, Hyogo, Japan

Liquid Phase Deposition (LPD) reaction mechanism for the formation of titanium oxide thin films has been investigated by ^{19}F NMR. $BF_3(OH)^-$ and BF_4^- were observed by the reaction of F^- with H_3BO_3 in the LPD reaction solutions. We also discussed the variation in amount ratio of the dissolved species against reaction time. NMR spectra indicated that the formation of $BF_3(OH)^-$ was observed within a short reaction time, and the amount ratio of $BF_3(OH)^-$ was much higher than that of BF_4^- during the LPD reaction. Hence instead of BF_4^-, the film synthesis is possible if there is the formation of $BF_3(OH)^-$ by the F^- scavenging reaction.

【緒言】

液相析出法（以下、LPD法）は、金属フッ化物錯体の加水分解平衡反応を利用して、酸化物薄膜を水溶液から基板上に直接合成する方法である。現在主流である気相法に比べ、凝縮系である水溶液中における膜の析出反応であり、微小なエネルギー差を利用する酸化物薄膜製膜法であると言える。その原理及び反応機構は以下のように考えられている。金属フッ化物錯体（$MF_x^{(x-2n)-}$）が溶存する水溶液中で生じる下式（1）のような加水分解平衡反応を、（2）式に示されるようにホウ酸（H_3BO_3）やアルミニウムイオン（Al^{3+}）等のような、安定なフッ化物錯体（BF_4^-, AlF_6^{3-}）を形成する捕捉剤を添加することで、酸化物（MO_n）析出側へ平衡をシフトさせる。

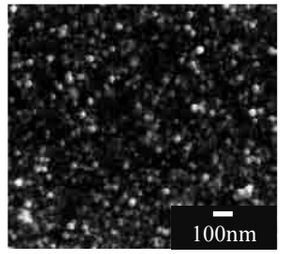


Fig. 1 SEM image of TiO_2 film deposited by LPD method.

$$\text{析出平衡反応}\quad MF_x^{(x-2n)-} + nH_2O \rightleftarrows MO_x + xF^- + 2nH^+ \qquad \cdots (1)$$

$$\text{析出駆動反応}\quad H_3BO_3 + 4F^- \rightarrow BF_4^- + 3OH^- \qquad \cdots (2a)$$

$$Al^{3+} + 6F^- \rightarrow AlF_6^{3-} \qquad \cdots (2b)$$

その結果、Fig. 1に示すようなガラス基板上に合成された酸化チタン（TiO_2）薄膜が形成されることが知られている。合成された薄膜の結晶性・緻密性をはじめとする物性の向上や、新規薄膜合成時の溶液条件の最適化の際には、LPD反応の本質的な反応機構及び、それが薄膜の物性に及ぼす相関関係に関する知見は有用である。そこで本研究では、これまで十分に行われていなかった反応溶液中の溶存種の正確な構造決定を目的とし、最も基本的なLPD反応系であるTiO_2薄膜合成系におけるLPD反応機構の評価を^{19}F NMRにより行った。

液相析出法, ^{19}F NMR, 薄膜

○おくむら ゆうぞう, まき ひでし, みずはた みのる

【実験方法】

フッ化チタン酸アンモニウム（$(NH_4)_2TiF_6$）水溶液及びH_3BO_3水溶液を、それぞれ0.5 mol L^{-1}になるよう調製し反応母液とした。 $(NH_4)_2TiF_6$濃度を0.025, 0.1, 0.2 mol L^{-1}, H_3BO_3濃度を0.2 mol L^{-1}となるよう、この2つの水溶液を希釈混合した後、アルカリ脱脂を施したガラス基板を垂直懸下し、30°Cの恒温槽中で所定時間反応させた溶液をVarian Unity INOVA 400（^{19}F共鳴周波数: 376.326 MHz）により測定した。化学シフト基準は二重管を用い、フッ化カリウム（KF）水溶液（-125.3 ppm）を外部基準とした。

【結果・考察】

Fig. 2には、$(NH_4)_2TiF_6$濃度0.1 mol L^{-1}の条件における、H_3BO_3水溶液を混合してから1, 24, 96時間反応後の^{19}F NMRスペクトルを示した。いずれのスペクトルにも見られる67 ppm付近のピークはTiF_6^{2-}に帰属される。また反応開始1時間後のスペクトルには-149 ppmに4本に分裂したピークが、さらに反応時間の増加に伴い-156 ppmに2本に分裂したピークが観察された。これらの特徴的なピーク分裂パターンは、ホウ素とフッ素のカップリング及び、天然存在比の異なるホウ素の同位体（^{10}B= 19.6 %, ^{11}B= 80.4 %）の存在によるものであり、各ピークはともに析出駆動反応（（2a）式）の進行により生成した$BF_3(OH)^-$, BF_4^-に帰属されることが分かった [1]。この2種類のイオンの存在は、他の2つの濃度条件におけるLPD反応溶液においても同様に確認された。Fig. 3には、今回観察されたピークの積分強度から算出した各溶存種の存在比の反応時間依存性を示した。この結果から反応開始後、短時間にTiF_6^{2-}の消費及び$BF_3(OH)^-$の生成が起こり、以後、平衡反応を利用するLPD法に特有な、長時間にわたる穏やかな反応の進行が観察された。また、これまで析出駆動反応による主生成物であり、同反応の平衡状態に大きく影響すると考えられていたBF_4^-よりも$BF_3(OH)^-$の方が高い割合で存在することから、下式（3）のH_3BO_3による逐次的なフッ素捕捉反応のうち、BF_4^-の生成は必須ではなく、$BF_3(OH)^-$の生成があれば薄膜形成が可能であることが明らかとなった。

$$B(OH)_3 + nF^- \rightarrow BF_n(OH)_{4-n}^- + (n\text{-}1)OH^- \quad 1 \ll n \ll 4 \qquad \cdots (3)$$

本発表では、温度、pHの変化に伴う薄膜形成と溶液内平衡状態の変化についても報告する。

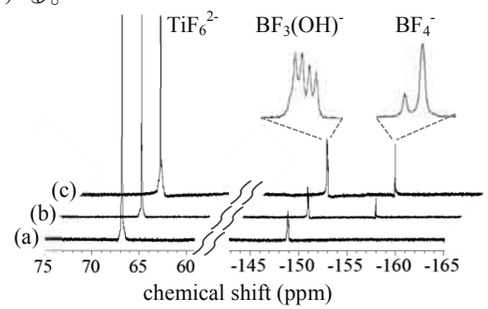


Fig. 2 ^{19}F NMR spectra of LPD reaction solutions.
$(NH_4)_2TiF_6$ aq. : 0.1 mol L^{-1} H_3BO_3 aq. : 0.2 mol L^{-1}
Reaction time : (a) 1hr (b) 24hr (c) 96hr

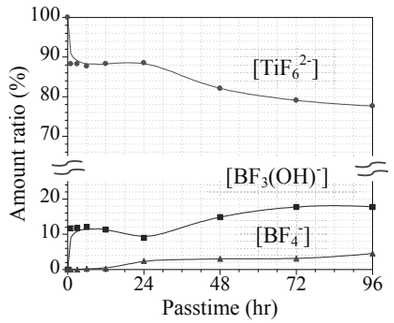


Fig. 3 Variation of the dissolved species amount ratio in LPD reaction solutions against reaction time.

【引用文献】

1) R. E. Mesmer, A. C. Rutenberg, *Inorg. Chem.*, **12**, 699-702 (1973)

P59

常磁性効果を応用した糖鎖の動的立体構造解析

○山口拓実[1,2,3]，Zhang Ying [1,2,3]，山本さよこ[1,3]，亀田倫史[4]，加藤晃一[1,2,3]
[1]分子研，[2]総研大・物理，[3]名市大・院薬，[4]産総研・生命情報工学研究センター

Paramagnetic-tagging approaches for exploring conformational dynamics of oligosaccharides

○Takumi Yamaguchi[1,2,3], Ying Zhang[1,2,3], Sayoko Yamamoto[1,3], Tomoshi Kameda[4], and Koichi Kato[1,2,3]
[1] Institute for Molecular Science, Natural Institutes of Natural Sciences, Okazaki, Japan.
[2] School of Physical Sciences, The Graduate University for Advanced Studies, Okazaki, Japan.
[3] Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University, Nagoya, Japan.
[4] The Computational Biology Research Center, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Tokyo, Japan.

Oligosaccharides play crucial roles in a variety of biological events. To gain insights into molecular basis of their functions, it is essential to describe the conformational dynamics of oligosaccharides in solution at atomic level. We herein report paramagnetic NMR approaches to characterize conformational dynamics of oligosaccharides. In the method, the reducing terminal of oligosaccharides is chemically modified with spin-label or lanthanide-chelating tag. By inspecting paramagnetic relaxation enhancement effects and pseudocontact shifts in conjunction with molecular dynamics simulations, atomic pictures of dynamic conformational ensembles were successfully provided for the oligosaccharides of biological interest.

糖鎖は生命現象の様々な局面で重要な働きをしている。例えば、糖鎖はタンパク質を修飾することにより、それらの高次機能の制御と生体内運命の決定に寄与していることが明らかとなりつつある。また、細胞膜上に存在する糖脂質は、細胞間接着やシグナル伝達など、細胞間のコミュニケーションを媒介する機能を担っている。このような糖鎖の生物機能の分子科学的基盤に関する理解を深めるためには、その動的な３次元構造について精密な情報を収集することが不可欠である。しかしながら、糖鎖は、複雑な分岐構造を持つことに加え、内部運動の自由度に富み、水溶液中では一定のコンフォメーションをとっていない。そのため糖鎖に対して分子科学的なアプローチを行うことはこれまで困難であった。私たちはこの問題の解決に向け、溶液NMRによる糖鎖の立体構造およびダイナミクス解析のための新規手法の開発に取り組んでいる。本研究では、常磁性効果を活用したNMR法と分子動力学（MD）計算を組み合わせ、糖鎖の動的立体構造解析を行った[1,2]。

常磁性効果，糖鎖，分子動力学計算

○やまぐちたくみ，ちゃんいん，やまもとさよこ，かめだともし，かとうこういち

はじめに、糖タンパク質の細胞内品質管理に関わる高マンノース型糖鎖について、PREによる3次元構造情報の収集を行った。高マンノース型糖鎖M9は、マンノース9残基を含む11糖であり、その非還元末端に3本の分岐鎖を有する（Fig.1）。酵母変異株を利用して調製したM9糖鎖の還元末端にニトロキシドラジカルを導入し、^{1}Hの緩和時間測定を通じて各マンノース残基の空間配置に関する情報を反映したPREを観測した。解析の結果、3本の分岐鎖のコンフォメーションは有意に異なり、一部の枝を還元末端側に向けたフォールドバック構造を取り得ることが示された。

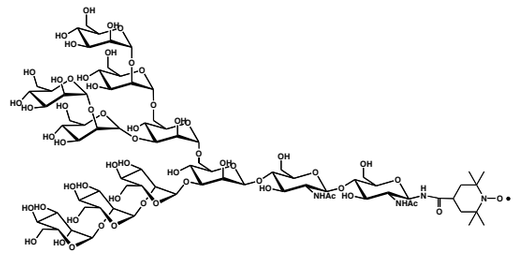


Fig. 1 Paramagnetic-tagged M9.

一方、神経細胞膜上に存在する糖脂質ガングリオシドGM2およびGM3の糖鎖構造についても、PCS計測とMD計算を組み合わせた動的構造解析を行った。ガングリオシドGM2の糖鎖構造は、シアル酸残基（NeuAc）を含む4糖からなり、直鎖型3糖であるGM3糖鎖にアセチルガラクトサミン残基（GalNAc）が連結した分岐構造を有している。各ガングリオシド糖鎖の還元末端にフェニレンジアミン四酢酸誘導体を連結した後、常磁性ランタニドイオンを添加して^{1}H-^{13}C HSQC測定によるPCS値の計測を実施した。錯形成に伴ってNMRスペクトル変化が確認され、糖鎖の各水素および炭素原子の化学シフト変化からPCS値を求めた。続いてMD計算によって得られた複数のコンフォマーを考慮した立体構造モデルからPCSの理論値を算出し、実験値との比較を行った。その結果、主要なコンフォメーションのみならず、存在割合の低い安定構造を考慮することでPCSの実験値と理論値がよりよく一致することが判明し、MD計算により得られた構造サンプリングの適切さを評価することができた。これにより、GM3とGM2糖鎖に共通するシアル酸残基のコンフォメーション空間は、両者の間で有意に異なることが示された（Fig.2）。すなわち、GM2糖鎖のシアル酸残基が限定された配向を示すのに対し、分岐のないGM3糖鎖では対応する部位の内部運動の自由度が大きいため、より多様な立体構造を示した。さらにGM2糖鎖の安定構造を詳細に解析したところ、糖残基間の水素結合によって取り得る構造が制限されることが示唆された。以上のように、常磁性効果の応用によって、水溶液中の糖鎖の動的立体構造解析のための体系的な方法論を構築することができた。

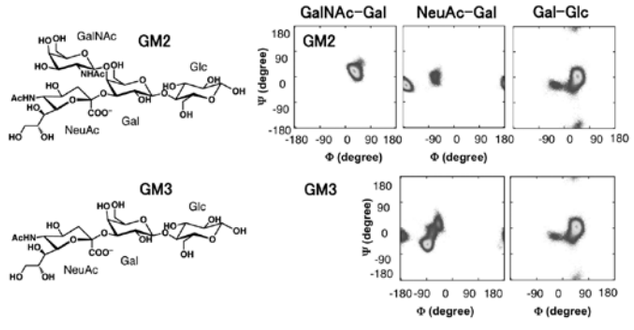


Fig. 2 Torsion angle density maps of the MD trajectories of GM2 and GM3 oligosaccahrides.

[1] Yamamoto, S., Zhang, Y., Yamaguchi, T., Kameda, T., and Kato, K., *Chem. Commun.*, **48**, 4752-4754 (2012).
[2] Zhang, Y., Yamamoto, S., Yamaguchi, T. and Kato, K., *Molecules*, **17**, 6658-6671 (2012).

P60

チオリン酸イオン群の酸解離および加水分解挙動の多成分同時解析

○ 牧　秀志，植田佳樹，成相裕之，水畑　穣

神戸大・院工

Simultaneous multicomponent analysis of the protonation equilibria and stepwise hydrolysis behavior of a series of thiomonophosphate anions by ^{31}P NMR.

○Hideshi Maki, Yoshiki UEDA, and Minoru Mizuhata

Graduate School of Engineering, Kobe University, Hyogo, Japan

The protonation processes of all thiomonophosphate anions have been evaluated accurately without any previous purification despite the remarkably fast hydrolysis rates of these anions, because the NMR signals corresponding to thiomonophosphate anions and hydrolyzed residues are well resolved. The stepwise protonation constants of the series of thiomonophosphate anions decrease “linearly” with an increase in the number of sulfur atoms in the anions. The intrinsic ^{31}P NMR chemical shifts due to orthophosphate and tetrathiomonophosphate anions show upfield shifts upon successive protonations of the anions, whereas the shifts of mono-, di-, and trithiomonophosphate anions move downfield relative to the anions upon protonation.

【緒言】

直鎖状及び環状構造のポリリン酸イオンやイミドポリリン酸イオンの酸解離平衡については、多くの研究例があるが、チオリン酸イオンの錯生成挙動に関する研究例は少ない。これはチオリン酸塩が水溶液中で急速に加水分解するためである。特にテトラチオリン酸イオン、$H_nPS_4^{(3-n)-}$(n=0-3)、は酸性溶液中では容易にトリチオリン酸、$H_nPOS_3^{(3-n)-}$(n=0-3)、ジチオリン酸、$H_nPO_2S_2^{(3-n)-}$(n=0-3)、モノチオリン酸、$H_nPO_3S^{(3-n)-}$(n=0-3)の及びオルトリン酸に分解される（Fig. 1）。本研究では、急速な加水分解により測定が困難なモノ、ジ、トリ、テトラチオリン酸イオンの逐次酸解離定数及び種々の逐次プロトン錯体の固有化学シフトを、^{31}P NMR法により求めた。

チオリン酸エステルなどのチオリン酸誘導体は、核酸代謝や酵素反応などへの生物化学的応用や制ガン剤などの医薬品への応用が期待されているが、その水溶液中での不安定性が製品開発への障壁となっている。チオリン酸誘導体の分解抑制の手段を開発する上で、まずチオリン酸イオン自体の酸解離や加水分解機構を明らかにすることは有用である。さらにチオリン酸の酸解離挙動についての研究は、チオリン酸イオンの錯生成挙動に関する有力な情報を与え、チオリン酸イオンのオリゴマー、ポリマー、および各種誘導体の錯平衡研究に関してのモノマーアナログとしての情報を与える。

チオリン酸, ^{31}P NMR, 加水分解

○まき　ひでし，うえだ　よしき，なりあい　ひろゆき，みずはた　みのる



Fig. 1 Successive hydrolyses of a series of thiomonophosphate anions.

【実験】

モノ（$Na_3PO_3S・12H_2O$）およびテトラチオリン酸ナトリウム（$Na_3PS_4・8H_2O$）は文献に従って合成し、それぞれ^{31}P NMRにて100％の純度であることを確認した。Bruker社製 DPX-250 NMR測定装置を用い，観測周波数101.25MHz, 25.0±1.0℃にて^{31}P NMR測定を行った。0.02 mol L^{-1}のモノおよびテトラチオリン酸ナトリウム各試料水溶液にHNO_3あるいはNaOH水溶液をマイクロシリンジで順次添加してpH 0～14の範囲で^{31}P NMRを測定した。用いた全ての溶液は0.10 mol L^{-1}の$NaNO_3$を含み，溶液内のイオン強度はほぼ一定に保たれている。なお、本研究は全て水溶媒系にて実験を行っているが、溶媒純度を保つため、あえて重水を添加せず磁場 - 周波数ロックを行わずに^{31}P NMR測定を行った。

【解析】

NMR 法は分子の構造決定といった化学結合論的情報のみならず、酸解離定数のような熱力学的情報についても定量的な情報を与える。今回測定を行った系においては、テトラチオリン酸イオンがトリ、ジ、モノチオリン酸イオンへと急速に加水分解が進行するため、滴定法のような一般的な溶液化学的測定法では個々のイオン種の酸解離定数の決定は甚だ困難である。ところが、溶存化学種の認識力が高い ^{31}P NMR 法を用いると、個々の加水分解生成物が独立したシグナルとして観測されるため、個々の酸解離平衡を独立して観測でき、それぞれのシグナルの化学シフトの pH 依存性から、全ての溶存種の酸解離定数を同時に決定できる（多成分同時定量）。本研究では、これを応用してモノ、ジ、トリ及びテトラチオリン酸イオンの酸解離定数値及び各化学種の固有ケミカルシフト値を決定した。

H_nL 酸解離系において次の平衡状態を考える(各イオンの電荷は省略)。

$$H + L \rightleftharpoons HL \qquad K_1 = \frac{[HL]}{[H][L]} \tag{1}$$

$$H + HL \rightleftharpoons H_2L \qquad K_2 = \frac{[H_2L]}{[H][HL]} \tag{2}$$

$$\vdots \qquad\qquad \vdots$$

$$H + H_{n-1}L \rightleftharpoons H_nL \qquad K_n = \frac{[H_nL]}{[H][H_{n-1}L]} \tag{3}$$

酸解離平衡においては通常、溶存種に対するプロトンの付加や脱離が NMR 観測の時間スケールに比べて充分に高速であるため、個々の溶存種の NMR シグナルは平均化された状態で観測される。すなわち、測定される化学シフト値δ_Pは各溶存種の存在分率 f と固有化学シフト値δ の積の和で表される。

$$\delta_P = f_L\delta_L + \Sigma f_{HiL}\delta_{HiL} \qquad (i \geqq 1) \tag{4}$$

ここで各溶存種の存在分率 f は酸解離定数 K_i と水素イオン濃度 $[H^+]$ によって一義的に示されるので、δ_P は K_i と $[H^+]$ およびδ_L、δ_{HiL}を用いて次式のように表される。

$$\delta_P = \frac{\delta_L + \sum(K_1K_2\cdots K_i[H]^i\delta_{H_iL})}{1+\sum(K_1K_2\cdots K_i[H]^i)} \qquad (i \geqq 1) \qquad (5)$$

従ってδ_P vs. -log[H$^+$] プロットを作成し、非線形最小二乗法を用いることにより酸解離定数 K_i および各溶存種のδ_L、δ_{HiL}が決定可能となる。

【結果と考察】

テトラチオリン酸イオン水溶液の代表的なpHにおけるスペクトルをFig. 2に示す。Moeddrittzerらの報告[1]に従い(a)を $H_nPS_4^{(3-n)-}$ (n=0-2)、(b)を $H_nPOS_3^{(3-n)-}$ (n=0-2)、(c)を$H_nPO_2S_2^{(3-n)-}$ (n=0-2)と同定した。各チオリン酸イオンの^{31}P NMR化学シフトのpH依存性をFig. 3に示す。非線形最小二乗法を用いて、各チオリン酸イオン、PO_3S^{3-}、$PO_2S_2^{3-}$、POS_3^{3-}、PS_4^{3-}の逐次酸解離定数と各逐次プロトン錯体の固有化学シフトを決定した。得られた逐次酸解離定数の硫黄原子数、n_S、に対するプロットをFig. 4に示した。アミドリン酸イオンやイミドポリリン酸イオンではNHおよびNH_2基の数の増加にほぼ比例してイオンの塩基性が増大し、逐次酸解離定数値が増大することが報告されている[2,3]が、チオリン酸イオン系においては、HSAB理論で予測されるようにハードな酸素原子数の減少とソフトな硫黄原子数の増加に比例して、逐次酸解離定数が減少することが分かった。

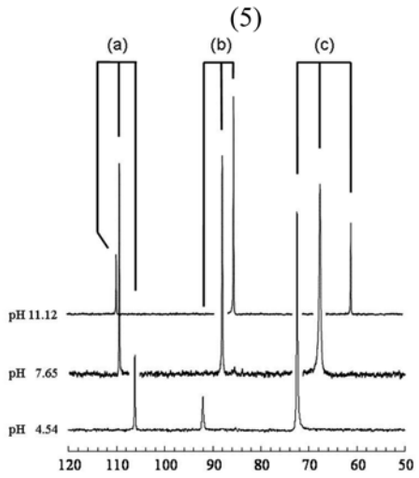


Fig. 2 Representative ^{31}P NMR spectra of a 0.01 mol L^{-1} Na_3PS_4 aqueous solution.

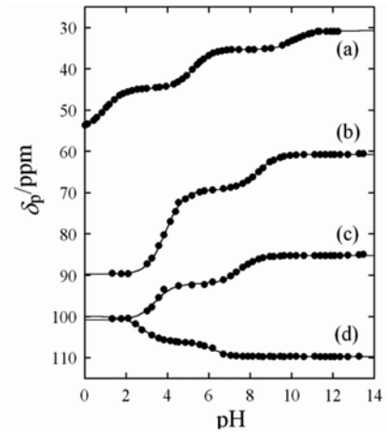


Fig. 3 ^{31}P NMR chemical shifts of various thiomonophosphate anions as a function of pH. (a); $H_nPO_3S^{(3-n)-}$ (n = 0–3), (b); $H_nPO_2S_2^{(3-n)-}$ (n = 0–2), (c); $H_nPOS_3^{(3-n)-}$ (n = 0–2), (d); $H_nPS_4^{(3-n)-}$ (n = 0–2).

次に逐次的な酸解離による^{31}P NMR固有化学シフトの変化のプロットをFig. 5に示す。プロトン付加による電荷「z」の増大に伴って、オルトリン酸イオンおよび全てのチオリン酸イオン群の全ての逐次プロトン錯体の固有化学シフトが直線的に変化し、逐次プロトン錯体のプロトン付加数(「z+3」)と固有化学シフトとの間に加成則が成立していることが分かった。一方、オルトリン酸イオン(a)とテトラチオリン酸イオン(e)では、プロトネーションの進行に伴って固有化学シフトが高磁場シフトしているのに対し、モノ(b)、ジ(c)、トリチオリン酸イオン(e) では低磁場シフトしていることが分かる。一般的に^{31}P NMR化学シフト、δ_P、の変化、$\Delta\delta_P$、 は

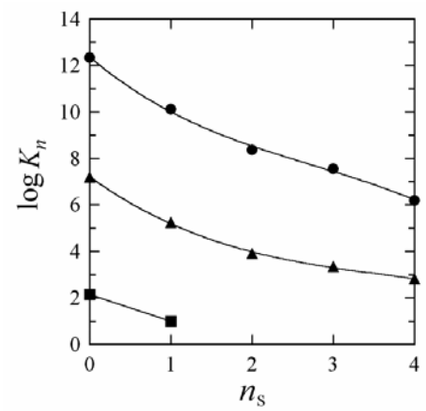


Fig. 4 Variation of the logarithmic stepwise protonation constants of thiomonophosphate anions(ex. n_S=2 ; dithiomonophosphate anion and n_S =4 ; tetrathiomonophosphate anion) . (●) log K_1 ; (▲) log K_2 ; (■) log K_3

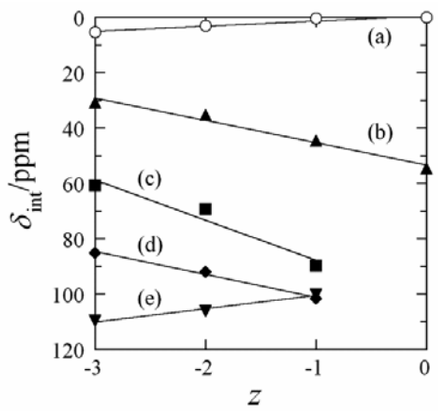


Fig. 5 Correlation of the intrinsic ^{31}P NMR chemical shifts of various thiomonophosphate anions and electric charge of the anions.
(a); $H_nPO_4^{(3-n)-}$, (b); $H_nPO_3S^{(3-n)-}$, (c); $H_nPO_2S_2^{(3-n)-}$, (d); $H_nPOS_3^{(3-n)-}$, (e); $H_nPS_4^{(3-n)-}$.

$$\Delta\delta_P = C\Delta\chi_0 - 147\Delta n_\pi - A\Delta\theta \qquad (6)$$

で近似的に表されることが知られている[4]。$\Delta\chi_0$は隣接する非架橋原子の電気陰性度の変化を、Δn_πはP-X結合のπ結合性の変化を、$\Delta\theta$はX-P-Y結合角の変化を表す。酸解離平衡においては、Δn_π、すなわちプロトン付加によるP-X結合のπ結合性の変化はほぼ0であり無視できる。一方、オルトリン酸イオンやテトラチオリン酸イオンのようなほぼ完全な対称構造をもつイオンのプロトネーションにおいては、分子中に1種類の配位原子（酸素原子や硫黄原子）しか存在せず、その交換速度はNMR時間スケールに比べて充分に速いため、^{31}P NMR観測においては,プロトンは4個の配位原子全てと同時かつ等価に結合していると見なされる。そのため,対称的な構造をもつイオンの場合はプロトン付加によってO-P-OおよびS-P-S結合角θ はほとんど変化しないため、$\Delta\theta$の項が化学シフトに与える影響は小さく、$\Delta\chi_0$、すなわち隣接原子の電気陰性度の変化の影響が支配的であり、このような系ではプロトネーションによる負電荷の中和によって高磁場シフトを示す。一方、2種類の配位原子をもつモノ、ジ、トリチオリン酸イオンでは、分子構造の対称性が低いため、プロトネーションによって生じる結合角の変化（$\Delta\theta$）が顕著であり、これが低磁場シフトをもたらすと考えられる。

【引用文献】

1) Moedritzer, K. *Inorg. Chem.* **1967**, *6*, 936.
2) Irani, R. R.; Callis, C. F. *J. Phys. Chem.* **1961**, *65*, 934.
3) Miyajima, T.; Maki, H.; Sakurai, M.; Watanabe, M. *Phosphorus Res. Bull.* **1995**, *5*, 149.
4) Haake, P.; Prigodich, R. V. *Inorg. Chem.* **1984**, *23*, 457.

P61

^{9}Be NMRによる環状イミドリン酸イオン群の微視的錯生成平衡の定量解析

○ 牧　秀志，辻戸正彦，山田哲司，成相裕之，水畑　穣

神戸大・院工

^{9}Be NMR analyses on Be^{2+} microscopic complexation with a series of *cyclo*-μ-imido triphosphate anions in aqueous solution.

○Hideshi Maki, Masahiko Tsujito, Tetsuji Yamada, and Minoru Mizuhata

Graduate School of Engineering, Kobe University, Hyogo, Japan

Microscopic information on complexation of Be^{2+} with *cyclo*-μ-imido triphosphate anions, $cP_3O_6(NH)_n^{3-}$ (n = 1-3), in aqueous solutions have been gained by both ^{9}Be NMR technique at -2.3°C. Separate NMR signals corresponding to free and complexed species have been observed in the ^{9}Be NMR spectra. Based on an empirical additivity rule, *i.e.*, proportionality observed between the ^{9}Be NMR chemical shift values and the number of coordinating atoms of ligand molecules, the ^{9}Be NMR spectra have been deconvoluted. By the precise equilibrium analyses, the formation of $[BeX(H_2O)_3]^+$ and $[BeX_2(H_2O)_2]^0$ (X = non-bridging oxygen donor as coordination atoms in phosphate groups) has been verified, and the formation of complexes coordinating with nitrogen atoms of the cyclic framework in the ligand molecule has been excluded. Instead, the formation of one-to-one (ML) complexes, one-to-two (ML_2), together with two-to-one (M_2L) complexes(L = $cP_3O_6(NH)_n^{3-}$ (n = 1-3)) has been disclosed, whose stability constants have been evaluated.

【緒言】

アザクラウンエーテルやクリプタンド等、酸素原子および窒素原子を配位原子として持つ環状アザ配位子の錯生成挙動および配位構造に対する側鎖のイオン基および環サイズの影響についてはよく知られている。しかし、架橋原子の置換が合成上困難なために、架橋配位原子の錯体安定度に与える影響に関する研究はほとんど行われていない。

本研究で取り上げた環状トリイミド三リン酸イオン(Fig. 1)は3個のリン酸基をイミノ基で架橋した構造を持ち、加水分解によって環骨格中の3個の架橋窒素原子を順次酸素原子へ置換させ、一連の環状イミド三リン酸イオン群 ($cP_3O_6(NH)_n^{3-}$ (n = 1-3)) を生成する。そのため、架橋窒素原子が配位子の酸解離及び錯生成挙動に与える影響を詳細に解明することが可能となる。

従来の研究により、Al^{3+}-$cP_3O_6(NH)_3^{3-}$錯生成系において、HSAB理論による単純な予想に反するAl-N間直接配位構造をもつクラウン状分子内三座錯体の形成(Fig. 2)が明らかとなっている。そこで本研究では荷電/半径の値（約6.5）がAl^{3+}イオンと近く、

^{9}Be NMR, 微視的錯体, ピーク分離

○まき ひでし, つじと まさひこ, やまだ てつじ, なりあい ひろゆき, みずはた みのる

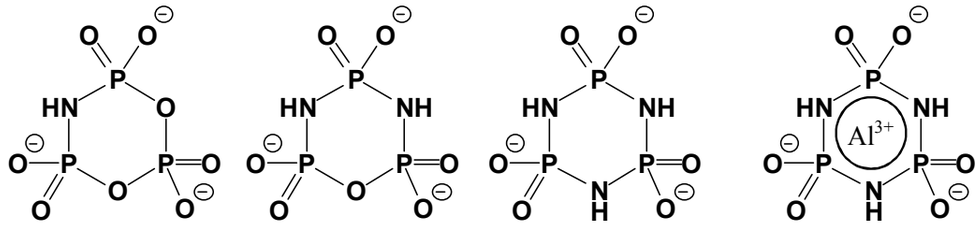


Fig. 1 Structures of *cyclo*-μ-imido triphosphate anions.

Fig. 2 Intramolecular tridentate complex in Al^{3+}-$cP_3O_6(NH)_3^{3-}$ mixture solution.

HSAB尺度ではAl^{3+}イオンと同じく最もハードな金属イオンに分類される等、溶液化学的類似性が期待されるBe^{2+}イオンについて、環状イミドリン酸イオン, $cP_3O_6(NH)_n^{3-}$ (n = 1-3)の微視的錯平衡挙動とその熱力学的安定度の決定を目的とし、^{9}Be NMRピーク分離法による微視的錯平衡解析を行った。

【実験】

各環状トリイミド三リン酸ナトリウム、$Na_3cP_3O_6(NH)_n$ (n = 1-3)、は文献に従って合成し、それぞれ^{31}P NMRにて98%以上の純度であることを確認した。^{9}Be NMRスペクトルは Bruker社製 DPX-250 NMR測定装置 (Ref. 0.1 mol L^{-1} $BeCl_2$ + 10% D_2O)を用い、配位子交換速度を遅くするために -2.3℃で測定を行った。試料溶液は C_{Be}^{2+} = 0.005, 0.01 mol L^{-1}の各$BeCl_2$水溶液に$cP_3O_6(NH)_n^{3-}$ (n = 1-3)各水溶液を添加することにより調整した。用いた全ての溶液は0.10 mol L^{-1}の$NaNO_3$を含み, 溶液内のイオン強度はほぼ一定に保たれている。またBe^{2+}イオンの加水分解防止のため HCl または NaOHでpH 4.5に調製した。なお、本研究は全て水溶媒系にて実験を行っているが、溶媒純度を保つため、あえて重水を添加せず磁場 - 周波数ロックを行わずに^{9}Be NMR測定を行った。なお、それによる^{9}Be NMRピーク面積強度への影響は無視できる。

【結果と考察】

分子中のイミノ基数が最も多く、配位子と最も安定な錯体の生成が期待されるBe^{2+}-$cP_3O_6(NH)_3^{3-}$錯生成系の代表的な^{9}Be NMRスペクトルをFig. 3に示す。化学シフトの配位数に対する加成則に基づき、低磁場側から遊離のBe^{2+}イオン、単座錯体、二座錯体のシグナルと同定した。通常、配位数の増大に伴って半値幅も増大し、またシグナルの化学シフト値は対応する化学種の濃度変化にあまり影響されないのが一般的傾向であるが、単座錯体の半値幅が全シグナル中最大であり、また単座錯体の化学シフト

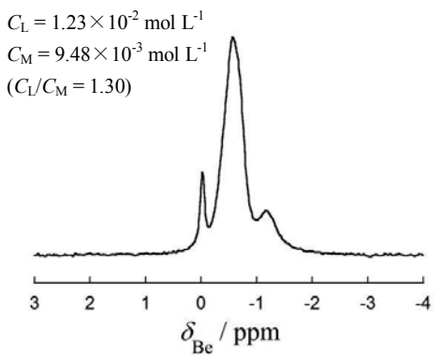


Fig. 3 Representative ^{9}Be NMR spectrum of Be^{2+}-$cP_3O_6(NH)_3^{2-}$ mixture solution at -2.3°C and I = 0.10(NaCl).

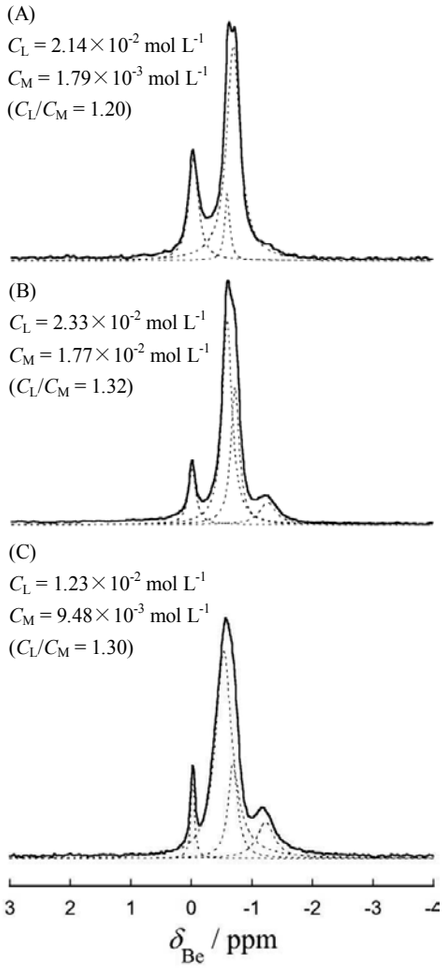


Fig. 4 Representative peak deconvolutions by assuming two complexation modes for monodentate complexes. (A); Be^{2+}-$cP_3O_6(NH)^{2-}$, (B); Be^{2+}-$cP_3O_6(NH)_2^{2-}$, (C); Be^{2+}-$cP_3O_6(NH)_3^{2-}$.

値だけが金属イオンおよび配位子濃度に顕著に依存した。これは単座錯体のシグナルが複数の微細なシグナルからなる可能性を示唆している。溶液の凍結防止のため大過剰のNaClを添加して-8.0℃にて測定した結果、今回得られた単座錯体のシグナルは、2本の微細なシグナルからなることが分かった。以上の結果より、今回得られたBe^{2+}- $cP_3O_6(NH)_n^{3-}$ (n = 1-3)錯生成系の全ての^{9}Be NMRスペクトルの個々のシグナル強度を算出するため、ローレンツ型曲線を用いた

非線形最小二乗法によるピーク分離解析を行った（Fig. 4）。全てのスペクトルは、遊離のBe^{2+}イオン、2種類の単座錯体、二座錯体の合計4本のシグナルの和として表現できた。

前述のAl^{3+}-$cP_3O_6(NH)_3^{3-}$錯生成系においては、Al^{3+}イオンが配位子の非架橋酸素原子と架橋窒素原子のどちらにも配位するが、この場合、単座O配位錯体と単座N配位錯体間の平衡は分子内反応と見なせるため、その存在比は濃度条件によらずほぼ一定となる。一方、本研究のBe^{2+}- $cP_3O_6(NH)_n^{3-}$ (n = 1-3)錯生成系では、2種類の単座錯体のピーク面積比が配位子と金属イオンの総濃度比、C_L/C_Mに大きく依存することが分かった。これは2種類の単座錯体間の平衡が分子間反応であること、すなわちML型錯体（低磁場側）とM_2L型錯体（高磁場側）であることを示唆している。同様に2種類の単座錯体と二座錯体のピーク面積比もC_L/C_Mに大きく依存し、二座錯体がML_2型錯体であることが明らかとなった。さらにピーク分離されたシグナルの化学シフト値から、Be^{2+}イオンは架橋窒素原子には配位せず、全て非架橋酸素原子に配位することが分かった。結晶構造パラメータによれば、Al^{3+}イオンの水和イオン半径は$cP_3O_6(NH)_3^{3-}$イオンの環サイズに近く、Al^{3+}-$cP_3O_6(NH)_3^{3-}$錯生成系ではAl^{3+}イオンと配位子内の3個の架橋窒素原子の立体的適合性によってクラウン状分子内三座錯体の形成(Fig. 2)が可能となる。Be^{2+}イオンは荷電/半径比がAl^{3+}イオンと近く、溶液化学的類似性が知られているが、Be^{2+}イオンのイオン半径は0.35 ÅとAl^{3+}イオン（0.51 Å）よりも小さいため、同様の立体的適合性が存在せず、架橋窒素原子に対する直接配位が発生しないと考えられる。

以上の結果に基づき、架橋窒素原子の存在による配位子の塩基性の増大が錯体安定度に与える影響を解明するため、各錯体の安定度定数を決定した。ML型、M_2L型およびML_2型の各錯体安定度定数は、得られた^{9}Be NMRスペクトルのピーク面積比を用いて以下のように表現できる。

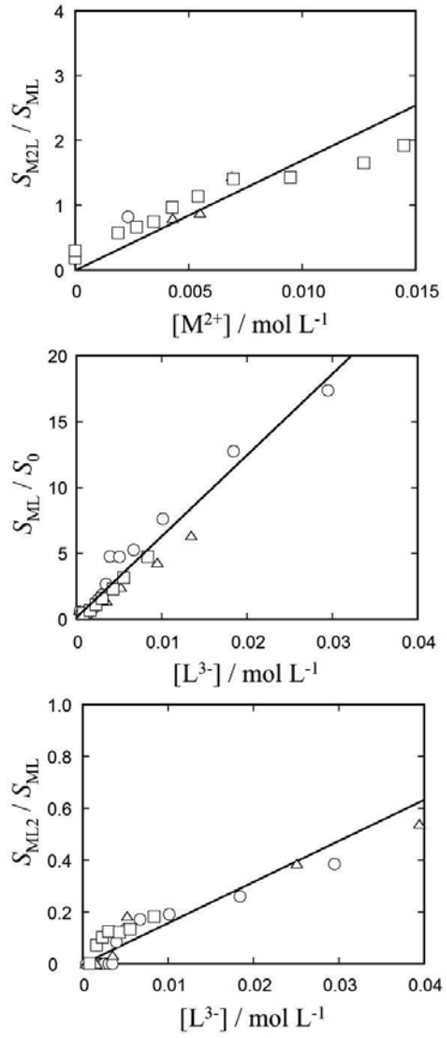


Fig. 5 Plots for the determination of the stability constants of the respective complexes. (○); C_{Be}^0 = 0.005 mol L^{-1}, (△); C_{Be}^0 = 0.01 mol L^{-1}, (□); C_{Be}^0 = 0.02 mol L^{-1}.

Table 1 Logatithmic stepwise stability constants of the Be^{2+} complexes with $cP_3O_6(NH)_n^{3-}$ (n = 1-3) evaluated by ^{9}Be NMR, T = -2.3±1.0°C, I = 0.10 (NaCl).

	$cP_3O_6(NH)^{3-}$	$cP_3O_6(NH)_2^{3-}$	$cP_3O_6(NH)_3^{3-}$
ML^-	1.76±0.06	2.78±0.02	3.87±0.05
M_2L^+	2.20±0.06	2.23±0.04	2.43±0.03
ML_2^{4-}	1.08±0.03	1.16±0.03	1.30±0.02

$$K_{ML} = \frac{[ML^-]}{[M^{2+}]\cdot[L^{3-}]} = \frac{S_{ML}}{S_0}\cdot[L^{3-}]^{-1}$$

$$K_{M_2L} = \frac{[M_2L^+]}{[M^{2+}]\cdot[ML^-]} = \frac{S_{M_2L}}{S_{ML}}\cdot[M^{2+}]^{-1}$$

$$K_{ML_2} = \frac{[ML_2{}^{4-}]}{[ML^-]\cdot[L^{3-}]} = \frac{S_{ML_2}}{S_{ML}}\cdot[L^{3-}]^{-1}$$

ここで、

$$[L^{3-}] = C_L - C_M\left(\frac{S_{ML}}{\sum S} + \frac{S_{M_2L}}{2\sum S} + \frac{S_{ML_2}}{\sum S}\right)$$

$$[M^{2+}] = C_M\cdot\frac{S_0}{\sum S}$$

である。すなわち、S_{ML}/S_0, S_{M2L}/S_{ML}, S_{ML2}/S_{ML}をそれぞれ[L^{3-1}, [M^{2+}], [L^{3-}]に対してプロットすると傾きがK_{ML}, K_{M2L}, K_{ML2}の直線となる。Fig. 5に各プロットを示した。初期Be^{2+}イオン濃度、C_{Be}^0、の違いにもかかわらず各プロットは単一の直線性を示した。直線の傾きから各錯体の安定度定数を決定し、Table 1に示した。架橋窒素原子の存在による配位子の塩基性の増大によって、各錯体安定度が直線的に増大することが明らかとなった。

P62

COSY 法の新しい応用測定----BASHD-J-resolved COSY 法について

○降旗一夫[1]，田代 充[2]
東大院農・応生化[1]，明星大・理工[2]

BASHD-J-Resolved-COSY: A New Method for Measuring Proton-Proton Spin Coupling Constants of Multiplet Signals

K. Furihata[a)] and M. Tashiro[b)]
a) Division of Agriculture and Agricultural Life Sciences, University of Tokyo
b) Department of Chemistry, College of Science and Technology, Meisei University,

Natural products very often possess several spin systems consisting of a methine group directly linked to a methyl group (-CH-CH(CH3)-CH-). The methine proton splits into a broaden multiplet by coupling with several vicinal protons rendering analysis difficult of JH-H cross peaks of said methine proton in DQF-COSY or E-COSY.

In order to overcome this problem, we have developed a new technique named BASHD-J-resolved-COSY. This method incorporates BASHD (BAnd Selective Homo Decoupled pulse) and J-scaling pulse into COSY. In this method, high resolution cross peaks can be observed in the F1 dimension by J-scaling pulse, and BASHD pulse collapses multiplet signals to simplified signals. Observation of JH-H values of multiplet signals becomes easy by introducing these two methods into COSY.

天然有機化合物の相対立体構造解析において、プロトンープロトン J_{HH} を如何にして効率よく観測するかが重要な課題の一つである。すでに、COSY 法を利用したプロトンープロトンのスピン結合定数を観測する方法として DQF-COSY、E-COSY といった方法が既に報告されている。しかし、multiplet に分裂した複雑なクロスピークではプロトンープロトンのスピン結合の解析は非常に困難である。たとえば、ポリケタイド抗生物質には -CH-CH(CH_3)-CH-といったメチル基を多く含んだ化合物が存在する。このメチル基の付け根のメチンプロトンは隣接プロトンと multiplet に分裂しブロードなシグナルとなるため、このメチンプロトンのスピン結合の解析は困難となる。また、メチル基の付け根のメチン炭素はアシメ炭素であることが多く、この炭素に結合した置換基の相対立体配置の解析には、この炭素に結合した隣接プロトンからのスピン結合の観測は重要なポイントになる。

このメチンプロトンのスピン結合を解析する方法として、COSY 法に homo-decoupling を導入し、プロトンープロトンスピン結合を観測する方法を検討し、新しく BASHD-J-resolved COSY 法を開発した。

図 1 に pulse 系列を示す。BASHD-J-resolved COSY法は J-resolved COSY[1),2)]法に BASHD(Band Selective Homo Decoupled pulse)[4),5)]を導入した方法である。この方法のポイントは COSY スペクトルにおいて、目的とするシグナルを decoupling し multiplet シグナルを単純化すること、また、スピン結合を解析するために、resolution を高めることである。COSY 法での homo-decoupling は t1 の展開時間の中心に選択的 180° pulse を導入し、目的のプロトンを反転させ、t1 の展開期の終わりで refocus させる。その結果、180° pulse を受けたプロトンと 180° pulse を受けないシグナルとの間で decoupling される。一方、t1 の展開期につづく J-resolved 法での homo-decoupling は、(n-1)t1 の展開期の中心に hard 180° pulse と選択的 180° pulse を同時に導入する。この選択的 180° pulse は t1 の展開期の pulse と共通である。選択的 180° pulse と hard 180° pulse を受けたプロトンは 0° pulse となり、defocus する。一方 180° pulse を受けたプロトンは J-moduration を受ける。その結果、0° pulse を受けたプロトンと 180° pulse を受けたプロトンの間で decouple される。このようにして、t1 および(n-1)t1 の展開時間の間で、選択的 180° pulse を受けたプロトンは homo-decoupling が実行される。

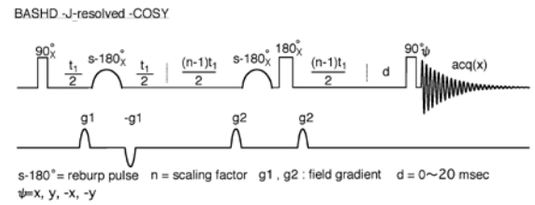


Fig.1 BASHD-J-resolved COSY

一方、multiplet シグナルを単純化しても分解能が不足しており、そのままではスピン結合を観測するには至らない。通常 COSY 法では t1max は 200～300msec ぐらいまでしか展開していない。スピン結合を観測出来るまで分解能を上げるためには、t1max を 400～800mec まで高める必要がある。しかし、実際はこのような値まで展開することは実際的でない。そこで、スピン結合に対しては t1max が 400～800msec まで展開できるように、J-scaling pulse((n-1)t1-180-(n-1)t1-)を導入した。2D-J-分解法の t1 の設定では t1max は観測するスピン結合 1/J のオーダーを超えるように設定しなければならない。このオーダーよりも小さな値で測定した場合はスペクトルのサンプリング定理が満たされず、スピン結合定数は観測できない。例えば J=2Hz を観測するためには digital resolutionが 2Hz 以下 t1max が 500msec 以上になるように設定しなければならない。BASHD-J-resolved COSY 法においても、J-分解法と同様に nt1max がスピン結合定数 1/ J を超えるように scaling factor(n)を設定する。その結果、スピン結合定数は実際の値よりも n 倍の値として観測される。

選択的 180° pulse としては、複数のメチル基を同時に励起してもスピン結合にも、化学シフトにも影響されず、位相が揃い、なおかつ、シグナルの選択性が高いことが重要である。ここでは、e-burp を使用した。この e-burp を使用するにあたっては、pulse 巾を短くなるように、出来るだけ広い範囲を励起するように設定することが重要である。

図 2 に threonine の H3 のプロトンについて、BASD-Jresolved -COSY の cross peak を示す。

a)は通常の COSY、b)は J-resolved

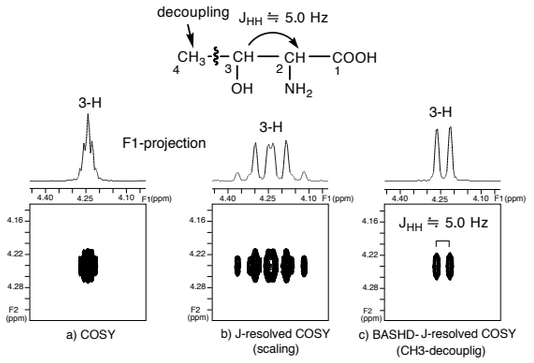


Fig.2 BASHD-J-resolved COSY spectra of 3-H of threonine
a),COSY,b)J-resolved COSY, c)BASHD-Jresolved COSY
scaling factor=5

BASHD、 BASHD-J-resolved COSY、 J-resolved COSY

○ふりはたかずお、たしろみつる

COSY,そして、c)は 4 位の -CH_3 を decouple した BASHD-J-resolved COSY を示す。また、f1 軸に projection スペクトルを示す。

a). 通常の COSY では f1 軸の resolution が不足しているが multiplet であるため、スピン結合を観測することはできない。b). J-resolved COSY の cross peak はスピン結合を観測するまでの resolution を高めているが、スピン結合の解析は困難である。c). BASHD-J-resolved COSY では、4 位-CH3 を decouple することにより、doublet の cross peak が観測され、なおかつ、スピン結合は scale up される。

このように、multiplet の cross peak を単純化することにより H2 と H3 のスピン結合は容易に観測される。

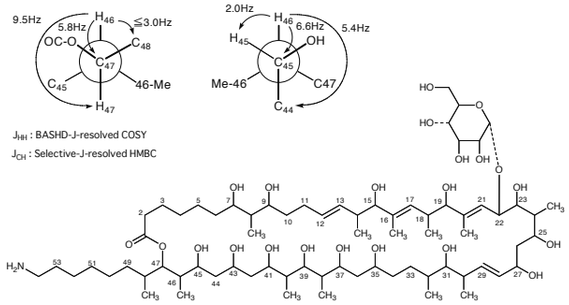


Fig. 3 The structure of monazomycin and its Newman projections along the C45-C46 and C46-C47 bonds.

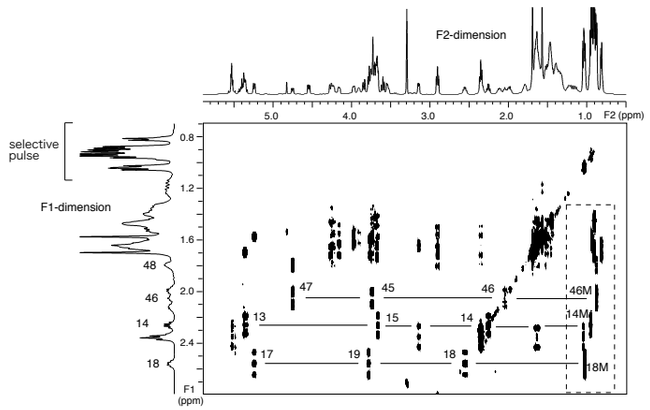


Fig.4 BASHD-J-resolved COSY spectra of Monazomycin
F1 x F2 = 2850 x 2850(Hz) t1 x t2 = 512 x 1024(point) scans = 16
re-burp 180 pulse = 11.3 ms (0.3ppm - 1.15ppm) scaling factor=5 nt1max=900 ms

図 3 には monazomycin の構造と C45-C46, C46-C47 bond について New man の投影図による相対立体配置を示す。

図 4 は monazomycin の BASHD-J-resolved COSY スペクトルである。Monazomycin は重なりあったメチル基を多く有し、しかも、メチル基と結合したメチンプロトンはブロードな multiplet を与える。そのため、そのメチンプロトンのスピン結合定数の解析は困難である。そのメチンプロトンを解析するために、BASHD-J-resolved COSY を測定した。メチル基をターゲットにして、0.3ppm から 1.15ppm の領域を励起した。Re-burp の pulse 幅は 11.3msec であった。

図 5.に monazomycin の a)COSY, b)J-resolved COSY,c)BASHD-J-resolved COSY のスペクトルを示す。f1 軸のメチンプロトンと f2 軸のメチル基の cross peak の領域である。COSY スペクトルでは f1 軸の分解能が足りず、ブロードな multiplet の coss peak を与えているが、スピン結合の解析は困難である。J-resolved COSYスペクトルでは f1 軸の分解能を十分上げることが出来たが、cross peakが複雑なため、スピン結合の解析には至らない。BASHD-J-resolved COSYでは、メチル基を decoupling した結果、cross peakは単純化され、スピン結合の解析も容易であった。

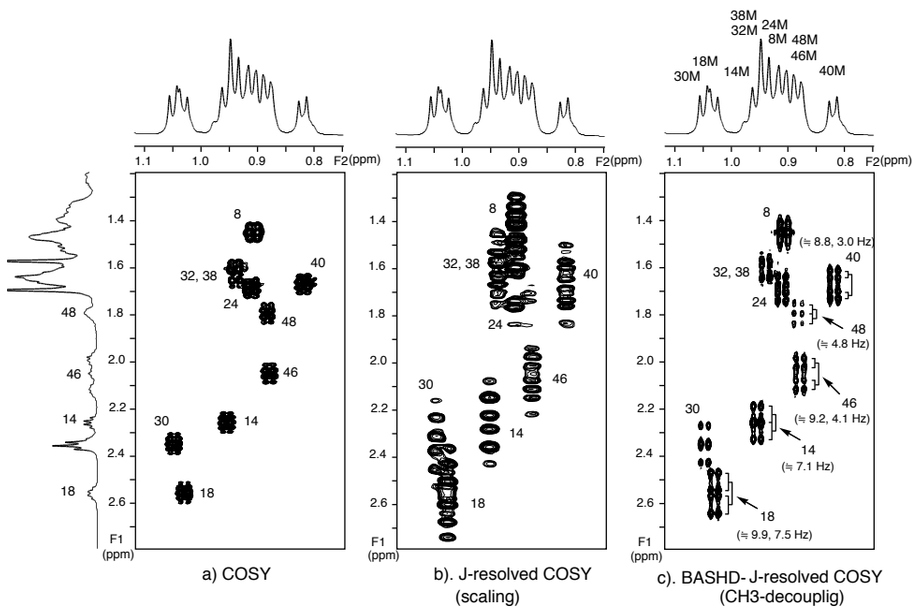


Fig. 5 The expanded box region spectra of monazomycin
a) COSY, b) J-resolved COSY and c) BASHD-J-resolved-COSY

monazomycin のメチル基(0.3ppm～1.15ppm)を decouple した結果、f2 軸のメチル基領域で、メチル基に結合したメチンプロトン全部を観測し、6 個の triplet(8, 14, 30, 32, 38, 48)と 4 個の double-doublet のクロスピーク(18, 24, 40,46)を与えた。このクロスピークから、ほとんどの隣接プロトン間のスピン結合を解析可能になった。32, 38 のクロスピークは重なり、このクロスピークからは解析できないが、H31 のクロスピークから、また、38 は H39 のクロスピークから triplet のクロスピークを確認できた。

H46 のメチンプロトンは 9.2Hz と 4.1Hz の double doublet の分裂を示す。この H46 と H45 は 4.1Hz でスピン結合し、gauche の関係にあるが、45-OH と C44 は、H46 に対してどちらが anti で、どちらが gauche であるかを判別することは出来ない。しかし、スペクトルから、H46 と C44 の間で long-range J_{CH} が 5.5Hz と決定されたことから、H45 と C44 は anti の関係にあることが容易に判明した。また、C44、C47、C48 の間のスピン結合定数は $^2J_{C44H46}$=5.6Hｚ、$^2J_{C47H46}$=5.８Hｚ、$^3J_{C48H46}$=3Hz 以下であることから、H44 位のプロトンに対して gauche の相対配置をとっていることが判明した（図３）。なお、long range J_{CH} は selective COSY-J-resolved HMBC[6] スペクトルからのデータである。

1). R. V. Hosur, M. Ravikumar, A. Sheth, J. Magn. Reson. 1985, 65, 375-381.
2). V. V. Krishnamurthy, J. Magn. Reson. A 1996, 121, 33-41.
3). K. Furihata, H. Seto, Tetrahedron Lett. 1999, 40, 6271.
4). R. Brüschweiler, C. Grisinger, O. W. Sørensen, R. R. Ernst, J. Magn. Reson., 1988, 78, 178-185
5). V. V. Krishnamurthy, Magn. Reson. Chem., 1997, 35, 9.
6). K. Furihata, M. Tashiro. Magn. Reson. Chem. 2012, 50, 409–414

P63

^{1}H-NMR 法による親水性有機化合物水溶液中における水分子周辺のミクロ構造の考察

○ 春木健作[1]，長谷部亨[2]

[1]福島大学大学院理工学研究科

[2]福島大学共生システム理工学類

Study on microstructure of water-clusters in aqueous solutions of hydrophilic organic compounds by the method of ^{1}H-NMR technique

○ Kensaku Haruki[1], and Tooru Hasebe[2]

1. *Graduate School of Symbiotic Systems Sciencs and Technology, Fukushima University.*
2. *Facuity of Symbiotic Systems Sciencs, Fukushima University.*

Spin-lattice relaxation times, line-widths and chemical shifts on 1D− and 2D− ^{1}H-NMR were measured at ambient temperatures for various concentrations of aqueous solutions of methanol, ethanol or acetone. The line widths of water's protons increased with increasing molar fractions（0 to 0.1）of ethanol or acetone. It suggests us that water-clusters in the aqueous solutions may be broken by adding ethanol or acetone as a destroyer. Other interested results were obtained, and detailed results and discussions will be reported at the symposium.

《序論》　水は，融点と沸点が分子量に比べて異常に高く，液体から固体への状態変化に伴い体積が膨張するといった水素結合によるとされる特異な性質を持つ。水の液体構造については，ＮＭＲはもちろん，Ｘ線回折や中性子散乱などの実験法，分子動力学によるシミュレーションなどによる構造解明への挑戦が数多く報告されている。これら報告されている構造としては，時間スケールが 10^{-12} 秒から 10^{-15} 秒と非常に短く瞬間的なものが多い。

我々は，^{1}H-NMR 法を用いて NMR の測定時間スケールでみる水の液体構造について解析を試みてきた。水の ^{1}H-NMR 吸収線は線幅の狭い単一のピークだけであるので，純水のみの測定では構造推定に限界がある。そこで，水の構造を少しずつ破壊して吸収線の変化や緩和時間の変化を測定する方法を試みた。そこで，水に親水性有機化合物（メタノール，エタノール，アセトン）を少量ずつ加えた試料を準備した。これらの試料について，脱ガスしないものと脱ガスしたものを作製し，それぞれの一次元，二次元 ^{1}H-NMR スペクトルの吸収線幅や化学シフト，また緩和時間の濃度依存性を測定し，その結果から親水性有機化合物水溶液中の水分子周りのミクロ構造について検討した。

《実験》　水はイオン交換水（pH　7 ±0.5，電気伝導度 0.06　μS）を，また親水性有機化合物試薬には，メタノールとアセトン（いずれも Aldrich の純度 99 %以上のもの），さらにエタノール（Wako，純度 99.5 %以上）を用いた。各試料は重量法によって目安の濃度を作製し，十分な攪拌混合後，外形 5mm（内径 4mm）の NMR 測定試料管に入れた。さらに超音波攪拌器を用いて試料全体の濃度を均一にした。NMR の測定は，Bruker 製 AVANCE 200 を用い，観測周波数 200.230 MHz で行った。化学シフトの基準は，試料に TMS を入れずに固定した観測周波数（純 TMS の共鳴周波数）を用いた。この周波数は，そのつど試料と純 TMS を交互に測定して確認した。脱ガス試料は，試料を NMR 試料管に入れ，真空中にて freeze-pump-thaw 法によって脱ガスをした後封じ切った。試料の濃度は，測定したピーク面積と校正用標準試料の値との比較から決定した。

《結果》　水溶液試料の特に水の信号に関して，Fig.1 に水－エタノール系水溶液における吸収線の半値幅の濃度依存性，Fig.2 には水－アセトン系水溶液における吸収線の半値幅の濃度依存性を示した。水－エタノール系水溶液，水－アセトン系水溶液ともに，脱ガスしていない試料と脱ガスした試料で，メチル基の吸収線幅に大きな差はみられなかった。しかし，水－エタノール系水溶液では，水の吸収線の最大幅をとる濃度が異なった(Fig.1)，また，水－アセトン系水溶液では，脱ガスした水の吸収線幅の方が狭くなる結果（Fig.2）を得た。溶存ガスの影響を含む半値幅の変化も興味ある結果である。吸収線幅は，どの有機化合物試料においても，純水からモル分率の 0.1 くらいまでに顕著な濃度依存性に伴う増加が見られた。これは濃度依存性の全体の変化の様子からみると，加えた有機化合物による磁化率の影響と考えるよりも，水のある種の構造が徐々に破壊されることによって，水由来プロトンの化学的環境が複雑さを増すために起こるものと考えるのが妥当である。なお，詳細については，「討論会ポスター発表」にて報告する。

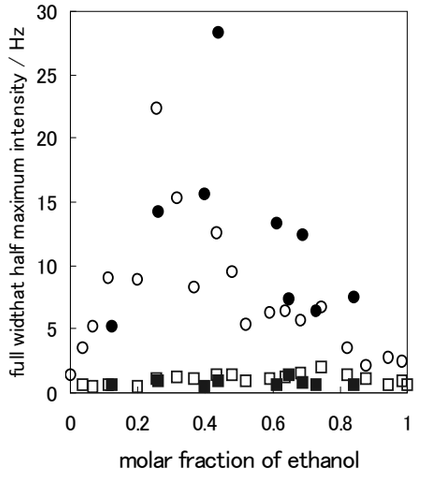


Fig.1 Concentration dependence of line-width of water and methyl group protons in water-ethanol solutions.
● ,water (degassing); ■ ,methyl group (degassing) ; ○,water; □,methyl group

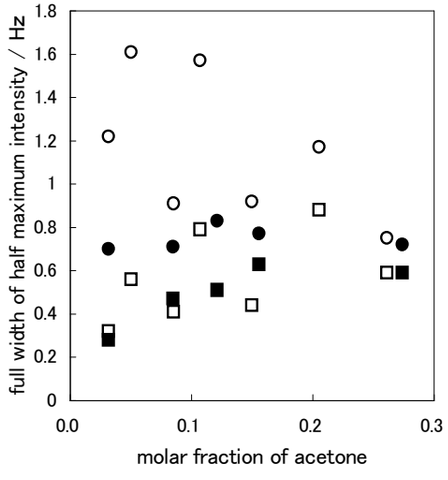


Fig.2 Concentration dependence of line-width of water and methyl group protons in water-acetone solutions.
●,water (degassing) ;■,methyl group (degassing); ○,water ; □,methyl group

---

^{1}H-NMR，希薄親水性有機化合物水溶液，水分子周辺のミクロ構造

○ はるき　けんさく，　はせべ　とおる

P64

*In-situ*マイクロ波照射NMRによる物質の非平衡加熱状態の観測

○田制侑悟[1]，藤戸輝昭[2]，川村出[1]，内藤晶[1]
[1]横浜国立大学大学院工学府
[2]プローブ工房

Non-equilibrium heating state of substances as observed by in-situ microwave irradiated solid-state NMR

○Yugo Tasei[1], Teruaki Fujito[2], Izuru Kawamura[1]and Akira Naito[1]
[1]*Graduate school of Engineering, Yokohama National University, Yokohama, Japan.*
[2]*Probe Laboratory Inc.*

Microwave heating is extensively used in the activation of organic reaction as well as activity enhancement of the enzymes. These effects are considered to exist an non-equilibrium heating state by microwave irradiation. However, detailed molecular mechanism of microwave heating effect on the chemical reaction has not well understood yet. In this study, we investigated the microwave effect to the material by *in-situ* microwave irradiated solid-state NMR.^{1}H NMR signals of liquid crystal sample, MBBA, were measured under microwave irradiated condition. We have observed an non-equilibrium heating state appearing as new peaks and change of the chemical shit value.

【序論】

マイクロ波は波長が1 mmから3 mの電磁波であり、多くの物質はマイクロ波を照射すると加熱される。さらに、近年ではマイクロ波照射効果には有機合成の反応速度の上昇や酵素の働きに変化が生じていることが多く報告されている。これらの現象は温度上昇だけでは説明できず、マイクロ波照射による特有な非平衡状態が存在することが考えられている。しかし、この非平衡状態を分子レベルで観測する実験法は数少ない。本研究では、試料に対してマイクロ波を照射しながらNMR測定が行える*In-situ*マイクロ波照射NMR固体分光器を用いて、マイクロ波照射下で現れる非平衡加熱状態を分子論的に解明することを目的としている。

【実験】*In-situ*マイクロ波照射NMR分光器

*In-situ*マイクロ波照射固体NMR装置はマイクロ波加熱2D NMR分光器[1, 2]に基づいて開発している。このシステムは固体NMR分光器とマグネトロンマイクロ波発信機（東京電子 1.3 kW, 2.45 GHz）とラジオ波およびマイクロ波共振回路を組み込んだプローブで構成されている(Fig.1)。プローブ内でラジオ波コイルの内側にマイクロ波コイルを巻き、両方の周波数を同時に同調させた。分光器外部から発生させたマイクロ波を導波管を通してNMRプーブに導入することによって、マイクロ波照射中にNMR信号を観測する*in-situ*測定が可能になった。

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，ふじとてるあき、かわむらいずる、ないとうあきら

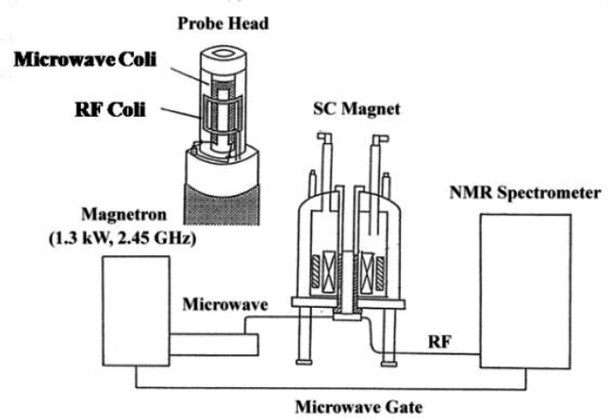


Fig.1 *In-situ* マイクロ波照射 NMR の模式図

NMR測定

マイクロ波照射下での加熱過程のNMRスペクトルを観測するために、液晶分子として相転移点が40˚CのMBBA(N-(4-Methoxybenzylidene)-4-butylaniline)を試料に用いて連続波(CW)による*in-situ*マイクロ波照射NMR測定を行った。Fig.2にMBBAの化学構造式、Fig.3に50˚C（等方相）の^{1}H NMRスペクトルを示した。構造式の水素に標識している記号はピーク上部の記号に対応している。NMR測定は、Chemagnetics CMX infinity-400 NMR分光器を用いて、400MHzの^{1}Hの共鳴周波数で、90˚パルスは2.0 μsで測定した。また、試料管はガラス管を使用した。まず、マイクロ波加熱の経時変化をみるために初期条件を35˚Cに設定してから測定開始から測定終了までCWによるマイクロ波照射を行った。また、通常の加熱効果と比較するために温度可変装置（空気加熱）を利用し、35˚C（液晶相）から50˚C（等方相）に相転移する様子も同様に測定した。それぞれ、繰り返し時間は0.1 秒で6 秒間積算を行った。次に、NMR信号の変化が大きい相転移付近を観測するために温度可変装置で25˚Cに設定した状態で*in-situ*マイクロ波照射NMR測定した。繰り返し時間は1.0秒で行った。

【結果と考察】マイクロ波照射加熱の経時変化測定

温度可変装置による35˚Cから50˚Cへの昇温過程の経時変化のNMRスペクトルをFig.4に示す。35˚Cに設定してCWによるマイクロ波照射を行った加熱の経時変化のNMRスペクトルをFig.5に示す。表示時間は空気加熱あるいはマイクロ波照射を開始sしてからの経過時間である。空気加熱では50秒までほとんど液晶相であったが、55秒(Fig.4(a))や60 秒(Fig.4(b))では一部の液晶相が等方相に相転移を起こし線幅が狭い溶液の信号の強度が上がっていく。そして70秒(Fig.4(c))ではほとんどが等方相になり、50˚Cのスペクトル(Fig.3)と同一になった。

マイクロ波加熱では、35秒(Fig.5(a))で相転移が開始されるがピーク位置は等方相のスペクトル位置より高磁場シフトした。40秒、45秒、50秒(Fig.4(b))の測定でも同様のスペクトルが得られた。55秒になるとそれぞれの^{1}Hの信号の低磁場側に新たに信号が現れて2本にわかれ、60秒(Fig(c))になると新しいピークが顕著になる。それぞれの2本の化学シフト値は低磁場側が50˚Cのスペクトル(Fig.3)、高磁場側がマイクロ波加熱による初期の相転移のスペクトル(Fig.5(a))と同一であることがわかった。そして時間経過によって低磁場側のピーク強度が高まり、80秒ではほとんど低磁場側のピークになった。

２つの方法によるNMRスペクトルを比較すると、空気加熱では等方相のピーク位置を中心とした幅広い信号から線幅が狭くなっていき、等方相に相転移する。それに対してマイクロ波加熱は等方相のピーク位置とは異なる高磁場シフトした先鋭な信号から等方相の信号に転移し、相転移が起こる。この傾向は他の液晶分子でも見ることができた。高磁場シフトした先鋭な信号が通常の液晶相や等方相とは異なるマイクロ波特有の状態であることを示唆している。またマイクロ波の電力を変えずに、マイクロ波特有の状態を示すピークは時間経過によって強度が変わらないことからマイクロ波で励起された非平衡加熱状態を観測した可能性が高いといえる。

マイクロ波照射による液晶 - 等方相共存状態の^{1}H NMRスペクトル

25˚Cに温度を設定したMBBAの*in-situ*マイクロ波照射NMRスペクトルをFig.6に示す。Fig.5(a)やFig.5(c)と同様のピーク位置になり、液晶相とマイクロ波励起状態が共存したスペクトルである。さらに帰属できない新しいピーク(＊)も観測することもできた。これらのピークは空気加熱では全く観測されなかったためマイクロ波照射による新たに生じた非平衡加熱状態が観測されたことを示唆している。

参考文献

[1] A. Naito et al, Thermotropic Liquid Crystals, (2007) 85-116, *Springer*

[2] A.Naito et al, Materials Science ＆ Technology, (2010) 2886-2894

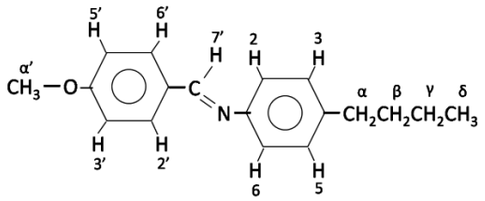


Fig.2 MBBA の構造式

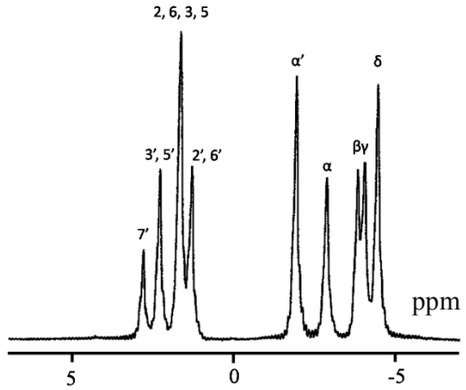


Fig.3 MBBA(50˚C)の ^{1}H NMR スペクトルの帰属

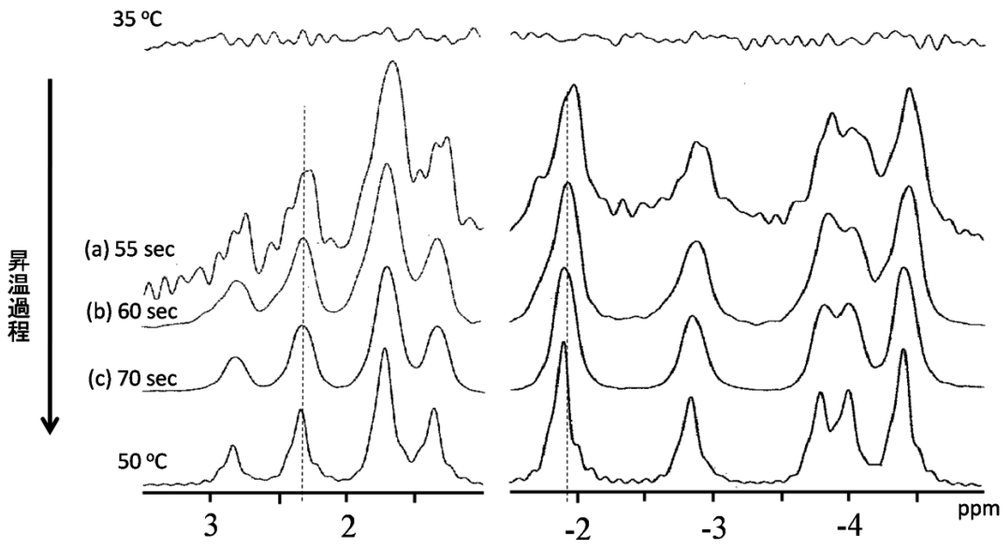


Fig.4　温度可変装置による ^{1}H NMR スペクトルの経時変化

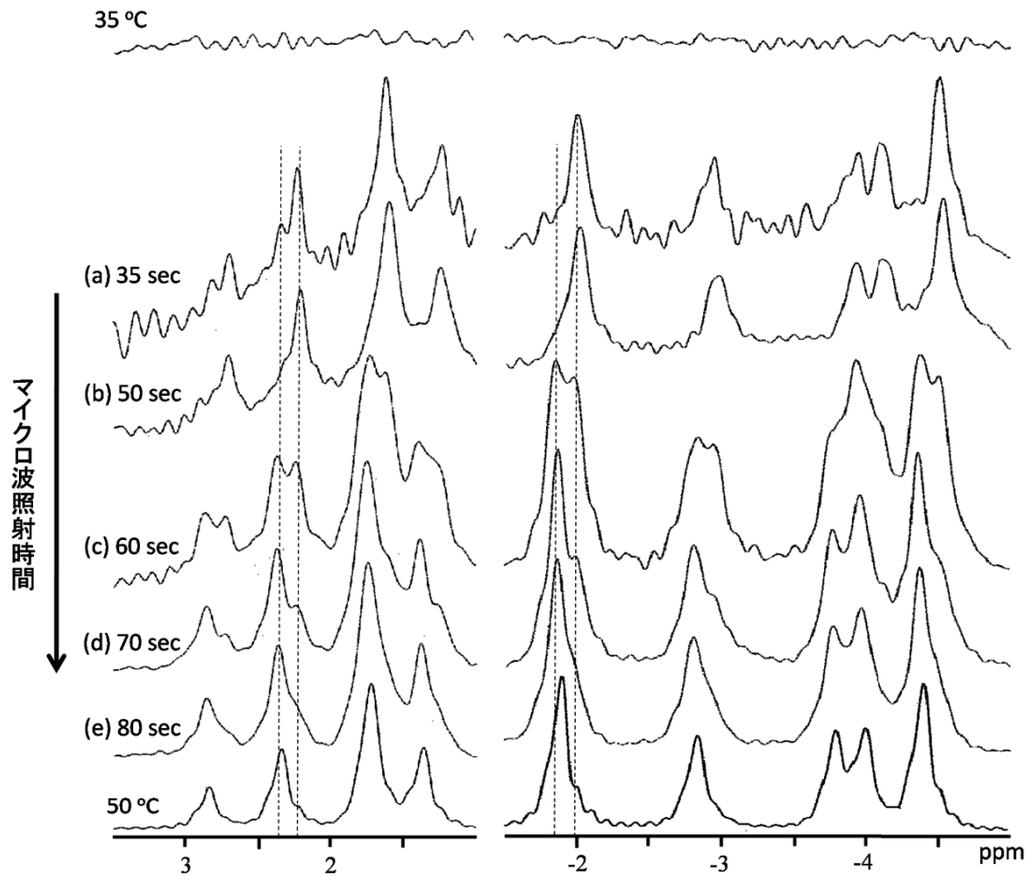


Fig.5　35˚C に温度設定した in-situ マイクロ波照射 ^{1}H NMR スペクトルの経時変化

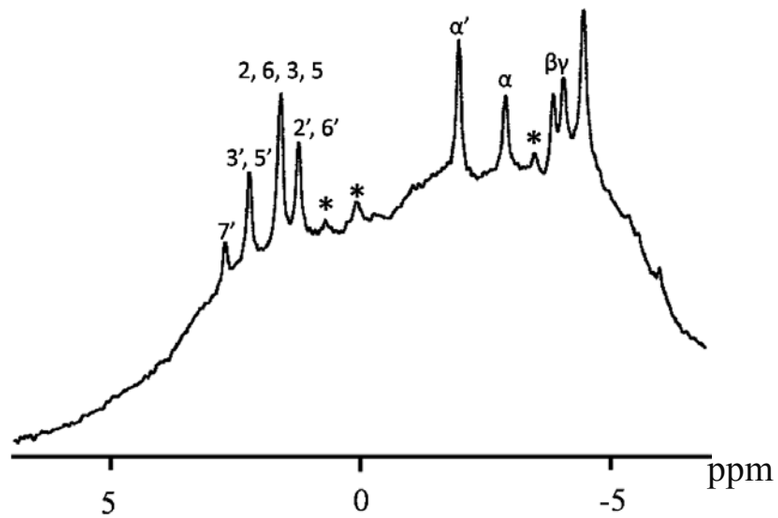


Fig.6　25˚C に温度設定した in-situ マイクロ波照射 ^{1}H NMR スペクトル

P65 多量子NMRによる^{1}H配列の次元性の研究

○最上祐貴[1]，石川洋人[1]，竹腰清乃理[1]
[1]京都大学大学院理学研究科

Dimensionality in Solid Materials studied by Multiple Quantum NMR

○Yuuki Mogami[1], Hiroto Ishikawa[1], and Kiyonori Takegoshi[1]
[1]Department of Chemistry, Graduate School of Science, Kyoto University

We applied solid-state ^{1}H MQNMR to examine dimensionality of solid materials. We show that the development of the size of the MQ coherence depends not only on the size of the ^{1}H clusters but also on their arrangement (dimensionality). We propose a simple statistical approach to explain how the observed intensity $I(n)$ for a n-th MQ coherence reflects dimensionality of spins. As for the samples having typical ^{1}H distribution of 1~3D, we chose n-alkane enclathrated in deuterated urea as an 1D sample, magnesium hydroxide and adamantane as a 2D and a 3D sample, respectively.

MQ NMR は構造解析をする上でとても有効な測定手段の一つである。これまでにも MQ NMR を用いて液晶[1]や有機物[2]・アモルファスシリコン[3]で水素の分布構造を求めたという報告がある。また、次元性の違いによって MQ コヒーレンスの大きさの成長にも違いが表れ、1D よりも 2D、2D よりも 3D のほうが育ち方が早いという報告がある[4]。本研究の目的は ^{1}H 核の空間分布（次元性）を MQ NMR で決める際に適用することが可能な簡単な統計モデルを確立することである。以下では、MQ counting NMR による MQ コヒーレンスの育ち方の違いと次元性の関係について簡単な統計モデルを用いて表すことができないかを検討した。

用いた MQ counting のパルスシークエンス[5]を Fig.1 に示す。初めの excitation パルス間の平均ハミルトニアンは（H_{yy}-H_{xx}）であらわされ、偶数の多量子コヒーレンスを励起する。その後時間反転パルスを照射することで観測可能な横磁化にして観測を行う。励起された MQ は、位相 φ を変化させ φ で FT することで量子数ごとに分離され、$I(n)$（n 量子コヒーレンスがどれだけ生成したか）を得ることができる。excitation の時間 τ=m×{4(Δ′+Δ)+8t_p}の増加に伴い大きな多量子コヒーレンスが観測されるようになる。

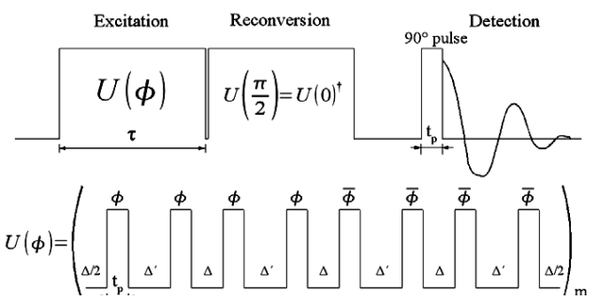


Fig.1: The pulse sequence for MQNMR[1]. We measured a amplitude of magnetization with the phase of pulse, φ, varied from 0 to 2π.

多量子 NMR, クラスター, 次元数

○もがみゆうき，いしかわひろと，たけごしきよのり

今回の研究ではおよそ ^{1}H が 1 次元に並んだサンプルとして n-$C_{20}H_{42}$ を 100%重水素化した尿素 (d-urea) で包接した試料 (n-$C_{20}H_{42}$/d-urea)、1H が平面内に並んだ 2D サンプルとして水素が蜂の巣格子状に並んでいる水酸化マグネシウム、3D のサンプルとしてアダマンタンを用いた。

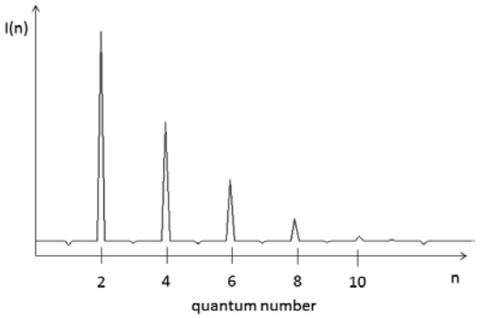


Fig.2: ^{1}H MQ counting spectrum of adamantine. Δ=2.5μ, Δ′=6.5μ, t_p=1.5μ ,m=6

Fig.1 のパルスシークエンスを用いてアダマンタンを測定した結果を Fig.2 に示す。左から 2・4・6…量子のピークが得られ、各ピーク強度はその MQ コヒーレンスの生成量を表す。今回用いたパルスシークエンスは偶数の量子数のみがあらわれるため、奇数の量子数に出ているピークはノイズである。

ここで用いた3つの試料の各々の^{1}H-^{1}Hの双極子相互作用の大きさが違うためMQコヒーレンスの育つ速さは異なる。そこで比較のために2量子と4量子の強度比$I(2)/I(4)$を使った。1～3Dの次元性を持つと考えられている上記のサンプルについてMQの励起シークエンスの繰り返し回数mを変えて求めたI(2)/I(4)を比較したものがFig.3である。これら3つのカーブを比較すると1Dが2Dや3Dに比べて立ち上がりが遅いのがわかる。このカーブの形状の違いを簡単な統計モデルを用いて説明できないかと考えた。

Fig.3: plot of I(2)/I(4) for 1D, 2D,and 3D at various repeat cycle m

まず、個々の ^{1}H を格子点にした格子モデルを考える。格子点(^{1}H）は双極子相互作用で近くの格子点(^{1}H)と結ばれるが、ここでは簡単のために最近接の双極子相互作用だけを考える。以下では、1 次元として格子点が直線的に並んだ格子(straight）を、2 次元格子としては、蜂の巣格子(honey comb)と正方格子(square）を、3 次元格子としては立方格子(cube)を考えた。

MQ の励起時間が長くなる(MQ の励起シーケンスの繰り返し回数 m が大きくなる)ほど大きな MQ コヒーレンスが生じることが知られている。そこで、0~1 の値をとるパラメータ α を用いて、各格子点がつながる（各格子点の ^{1}H 間にコヒーレンスが生じる）確率 P が $P=1-\alpha^m$ で与えられると仮定した。上記の格子モデルに対して格子点

として 1 万～100 万点を考え、与えられた確率でつないで出来た格子点の集団（クラスター）をコンピュータでシミュレートして求めた。x 個の格子点がつながっているクラスターに含まれる n 量子コヒーレンスの数は $_{2n}C_{x-n}$ で与えられるとし、上記の格子モデルにおいて、比 I(2)/I(4)の m 依存性を求めた。

アダマンタンについて行った実験結果とシミュレーションの結果との比較を Fig.4 に示す。m=11 の時の実験結果とシミュレーション結果が一致するようにパラメータ α を調整した。アダマンタンの実験結果は 3D 格子である立方のシミュレーション結果によく一致している。

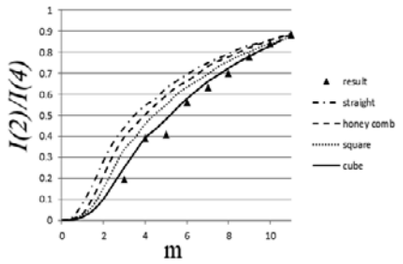


Fig.4: “m”-dependence of *I(2)/I(4)* for adamantine with simulation of straight, honeycomb, square, and cube

^{1}Hが2D分布していると考えられる水酸化マグネシウムについての測定と計算の比較をFig.5に示す。m=8で規格化している。1D（straight）や3D(cube)より、2D(honey comb, square)の結果とよい一致を示しており、我々の解析法で^{1}Hの次元性を評価できることが示唆された。

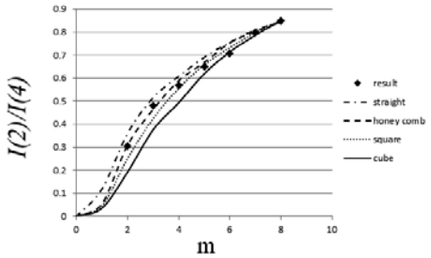


Fig.5 “m”-dependence of *I(2)/I(4)* for $Mg(OH)_2$ with simulation of straight, honeycomb, square, and cube

最後に一次元の試料とした*n*-$C_{20}H_{42}$/d-ureaの実験結果との比較を行った。まずm=10で規格化をおこない比較を行ったものがFig.6である。実験結果はどのシミュレーションとも一致をしていない。その理由として先に考えた格子モデルが実際の*n*-$C_{20}H_{42}$/d-ureaの^{1}H分布をうまく表現していないからだと考えた。

n-$C_{20}H_{42}$/d-ureaは尿素の管の中に$C_{20}H_{42}$が直線状に入った構造である。また分子軸に垂直な方向のH-H間距離は隣り合ったCH_2の^{1}H-^{1}H間距離より6倍以上長い。したがって、ここではn-$C_{20}H_{42}$をCH_2の2スピン系がはしご格子上に並んでいるものとした(Fig.7)。また、$C_{20}H_{42}$において同じ炭素原子に結合した2つの^{1}H間の距離はCH_2間の距離の約2分の1

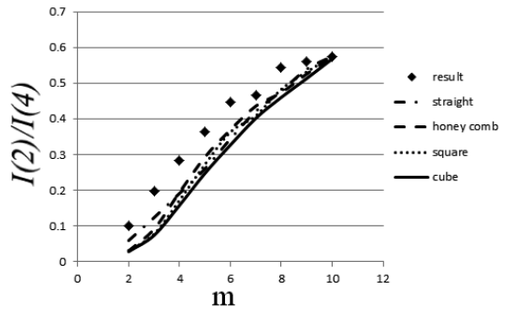


Fig.6 “m”-dependence of *I(2)/I(4)* for *n*-$C_{20}H_{42}$/d-urea with simulation of straight, honeycomb, square, and cube

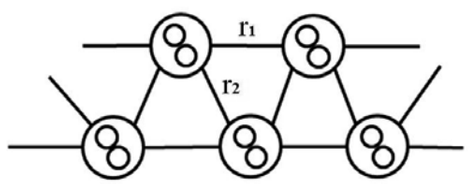


Fig.7 The form which we use in simulation as *n*-$C_{20}H_{42}$

である。そこで同じCH_2の^{1}H間には2量子コヒーレンスが常にあるとして、mの増加により隣り合う2量子間にコヒーレンスができていくと仮定した。ここで、最近接および第二最近接の水素間の距離(r_1,r_2)はほぼ同じためどちらもつながる確率は同じであるとした。

シミュレーション結果と実験結果の比較をしたものがFig.8である。1分子中のH原子の数は42であるがアルカン同士の分子軸方向の距離は比較的近く分子間の双極子相互作用によって2つ以上のアルカン分子間でもMQコヒーレンスがつくられると考えられる。そこで格子の大きさを変えてシミュレーションを行い比較を行った。また、m=2の時には1分子内でしかクラスターを作っていないと考え、m=2で実験結果と^{1}Hの数を42個(1分子)で行ったシミュレーションの結果を同じになるようにαを決め、^{1}Hの数を150・300について計算した。mが増えるにつれてだんだんと大きなクラスターが形成されるがm=5以上は150で行ったシミュレーションとほぼ一致しているのがわかる。

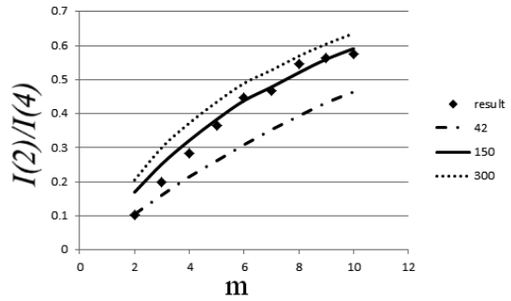


Fig.8 “m”-dependence of I(2)/I(4) for n-$C_{20}H_{42}$/d-urea with simulation.

spin counting実験の結果に対して簡単な統計モデルを用いてシミュレーションを行った。1D・2D・3Dともよくシミュレーションで再現することができた。

reference

(1) J. Baum, A. Pines, *J. Am. Chem. Soc.* 108 (1986) 7447
(2) J. Baum, M. Munowitz, A. N. Garroway, A. Pines, *J. Chem. Phys.* 83 (1985) 2015
(3) J. Baum, K. K. Gleason, A. Pines, A. N. Garroway, J. A. Reimer, *Phys. Rev. Lett.* 56 (1986) 1377
(4) D. H. Levy, K. K. Gleason, *J. Phys. Chem.* 96 (1992) 8125
(5) D. N. Shykind, J. Baum, S. B. Liu, A. Pines, *J. Magn. Reson.* **76** (1988) 149

P66

デュアルレシーバシステムを用いた同種核及び異種核間２次元相関 covariance NMR

○日下部寧[1],野田泰斗[1],福地将志[2],武田和行[1],竹腰清乃理[1]
[1]京都大学大学院理学研究科
[2]京都大学化学研究所

Homo- and Heteronuclear two-dimensional covariance solid-state NMR spectroscopy with a dual-receiber system

○Yasushi Kusakabe[1], Yasuto Noda[1], Masashi Fukuchi[2], Kazuyuki Takeda[1], and K. Takegoshi[1]
[1]Division of Chemistry, Graduate School of Science, Kyoto University.
[2]Institute for Chemical Research, Kyoto University.

Two-dimensional (2D) covariance NMR spectroscopy, which has originally been developed for homonuclear correlation (HOMCOR) type experiments, is extended to include heteronucler correlations (HETCOR). In a $^{13}C/^{15}N$ chemical shift correlation experiment, ^{13}C and ^{15}N signals are acquired simultaneously with a dual-receiver NMR system. The data sets are arranged for the covariance data processing, and ^{13}C-^{15}N HETCOR is obtained together with ^{13}C-$^{13}C/^{15}N$-^{15}N HOMCOR. As in the case of the original covariance HOMCOR, much fewer amounts of data suffice to obtain a well-resolved 2D-spectrum compared to the conventional 2D-Fourier transformation scheme, saving the experimental time.

１. 序論

２次元相関 NMR 法は核間の距離情報をもたらす有用な構造解析法である。しかし間接次元において磁化が十分に減衰するまで発展時間を増やしつつ測定を繰り返す必要があるため、一般に長い実験時間を要する。最近、相関実験において測定時間を短縮するために、２次元 covariance（共分散）NMR 法が確立された[1,2]。covariance NMR 法の実験手順は従来の２次元相関 NMR 法のそれと同一である。ただし、covariance を用いた統計的なデータ処理により、従来法に比べてずっと少ない間接次元のデータポイント数 (N_1) で距離情報を判定するのに足る２次元スペクトルを得ることができる。

２次元 covariance の分解能は、その数学的性質上、N_1 には依らず、間接・直接次元ともに直接次元のデータ長 (N_2) で与えられ、データ配列は $N_2 \times N_2$ の対称な行列となる。そして、従来 covariance NMR は、スペクトルが対称であると期待される同種核相関 (HOMCOR) 実験にのみ適用されてきた。しかし、実験時間の短縮は異種核相関 (HETCOR) にとっても重要である。ここで我々は、covariance NMR 法を Fig. 1 に示す ^{1}H-^{1}H 双極子相互作用媒介 $^{13}C/^{15}N$ 化学シフト相関実験 (通称 CHHC, NHHN, CHHN, NHHC 相関実験[3]) に適用し、^{13}C-^{15}N 間の HETCOR が取得できることを示す[4]。なおこの手法では covariance ^{13}C-^{13}C,及び ^{15}N-^{15}N HOMCOR も同時に得られる。また

covariance NMR, dual receiver, HETCOR

○くさかべやすし,のだやすと,ふくちまさし,たけだかずゆき,たけごしきよのり

covariance データ処理には ^{13}C,^{15}N 両者の信号が必要となる。測定時間短縮の観点から、デュアルレシーバ NMR システムを用いて ^{13}C.^{15}N の信号を同時に取得することで 、covariance 実験の本領が発揮される。

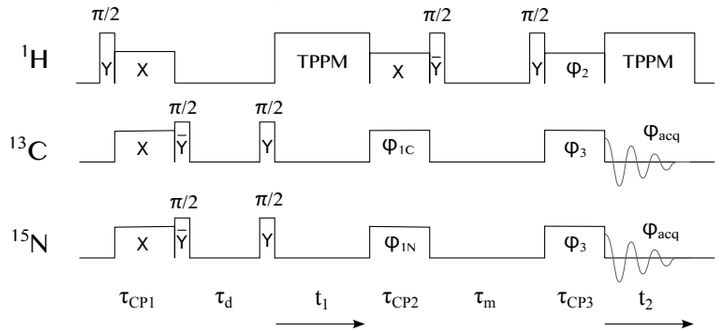


Fig. 1 A pulse sequence for ^{1}H-^{1}H dipolar-coupling mediated $^{13}C/^{15}N$ chemical shift correlation experiments.

２. 原理

２組の複素変数 $X=\{x_1,...,x_N\}, Y=\{y_1,...y_N\}$ についてのcovariance (共分散) $C(X,Y)$ は、

$$C(X,Y)=\langle (X-\langle X\rangle)(Y-\langle Y\rangle)^*\rangle = \langle XY^*\rangle-\langle X\rangle\langle Y^*\rangle \quad (1)$$

と定義される。ただし、〈 〉と*はそれぞれ標本平均と複素共役を表す。

２次元実験において、スピン I (^{13}C) とスピン S (^{15}N) の信号はそれぞれ $s^I(t_1,t_2), s^S(t_1,t_2)$ と表される。まず、それぞれ t_2 についてのフーリエ変換を行い、N_1 個の１次元スペクトルを得る：

$$S^I(t_1,\omega_{2I})=\int s^I(t_1,t_2)\exp(-i\omega_{2I}t)\,dt_2$$
$$S^S(t_1,\omega_{2S})=\int s^S(t_1,t_2)\exp(-i\omega_{2S}t)\,dt_2 \quad (2)$$

従来の2D-FT法では、式 (2) の $S^I(t_1,\omega_{2I}), S^S(t_1,\omega_{2S})$ を t_1 についてフーリエ変換し、２次元スペクトル $S^I(\omega_1,\omega_{2I}), S^S(\omega_1,\omega_{2S})$ を得る。一方、covariance 法では式(2) の S^I と S^S から covariance $C^{II}, C^{IS}, C^{SI}, C^{SS}$ を以下のように計算する：

$$C^{II}(\omega_{2I},\omega_{2I}')=\langle S^I(t_1,\omega_{2I})S^I(t_1,\omega_{2I}')^*\rangle-\langle S^I(t_1,\omega_{2I})\rangle\langle S^I(t_1,\omega_{2I}')^*\rangle$$
$$C^{IS}(\omega_{2I},\omega_{2S}')=\langle S^I(t_1,\omega_{2I})S^S(t_1,\omega_{2S}')^*\rangle-\langle S^I(t_1,\omega_{2I})\rangle\langle S^S(t_1,\omega_{2S}')^*\rangle$$
$$C^{SI}(\omega_{2S},\omega_{2I}')=\langle S^S(t_1,\omega_{2S})S^I(t_1,\omega_{2I}')^*\rangle-\langle S^S(t_1,\omega_{2S})\rangle\langle S^I(t_1,\omega_{2I}')^*\rangle$$
$$C^{SS}(\omega_{2S},\omega_{2S}')=\langle S^S(t_1,\omega_{2S})S^S(t_1,\omega_{2S}')^*\rangle-\langle S^S(t_1,\omega_{2S})\rangle\langle S^S(t_1,\omega_{2S}')^*\rangle \quad (3)$$

これらのcovariance のセットはFig. 2のように正方対称行列 **C** を形成し、４つの領域にそれぞれ *I-I*,*S-S*,*I-S* 間の相関が現れる。

なお、ここで式 (3)の〈 〉は『t_1についての』時間平均を示す。

ここで、Parsevalの定理（$F(\omega), G(\omega)$はそれぞれ$f(t), g(t)$のフーリエ変換）

$$\int_{-\infty}^{\infty} dt\, f(t)g^*(t) \propto \int_{-\infty}^{\infty} d\omega F(\omega)G^*(\omega) \quad (4)$$

から、covariance行列 **C** はs^I,s^Sを 2D-FT して得られるスペクトル **F** の２乗に対応する：

$$\mathbf{C} = \mathbf{F}^{\mathrm{T}}\mathbf{F} \quad (5)$$

よって、**C**の根行列$\mathbf{C}^{1/2}$を計算すれば、2D-FT 法に相当するスペクトルを得ることができる。

従来の2D-FT 法では、間接次元の分解能はN_1 で与えられる。一方、covariance スペクトルでは直接次元の測定ポイント数N_2 で与えられる。

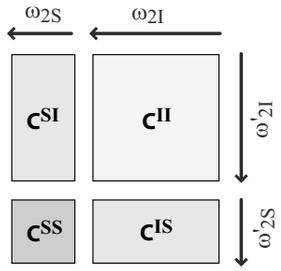


Fig. 2 A covariance matrix. The four regions carries *I-I*, *I-S*, *S-I*, and *S-S* correlations.

３. 実験と結果

本実験は、磁場 9.4 T で 3.2 mm MAS プローブを用いて行った。また、自作分光計を２台同期操作することによりデュアルレシーバシステムを構築した。サンプルには 、^{13}C/^{15}Nについてフルラベルされたヒスチジンを用いた。Fig.3 にヒスチジンの構造式と、CPMAS 法 で測定した^{13}C/^{15}Nの１次元スペクトルを示す。

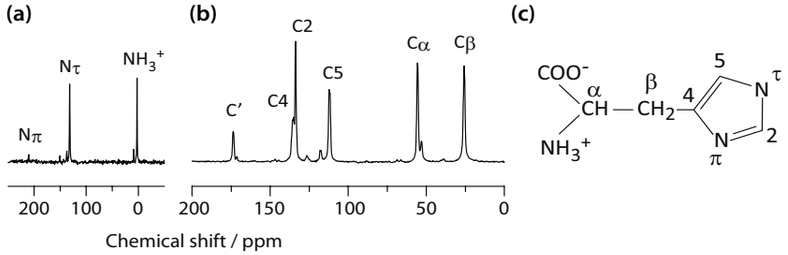


Fig. 3 (a),(b) ^{15}N,^{13}C CPMAS spectra of uniformly ^{13}C-^{15}N labeled histidine. The contact time was 200 μs, and the signals were accumulated over 40 times under MAS at 23 kHz. (c) The structure of histidine. The carbon and the nitrogen sites are labeled according to IUPAC nomenclature.

Fig. 4 (a) には、Fig.1 のパルスシーケンスによって得られた ^{13}C と ^{15}N の FIDから式 (3) を用いて計算した covariance 行列 **C** を示す。また、**C** の根行列$\mathbf{C}^{1/2}$を (b) に示す。ここで、間接次元の時間増分 Δt_1 は 33 μs, ポイント数 N_1 は32 とした。

(a),(b) では間接測定時間 t_1 を$\Delta t_1 \times N_1$ = 1.024 ms までしか取っていないにも関わらず、良いスペクトルが得られた。一方、同じデータを従来の2D-FT 法で処理した (c) には間接次元に沿って多くのリップルが発生した。これは、1.024 ms の間に磁化が減衰していないためである。そこで、N_1 を 8 倍の 256 として、正味の実験時間を固定するために積算回数を 1/8 にして再測定を行い、2D-FT 法で処理したスペクトルをFig. 4 (d) に示す。^{15}N 領域にはなおリップルが残っており、積算回数の減少によるS/N 比の低下が見られた。一方 covariance スペクトルにリップルは見られず、^{13}C-^{13}C,^{15}N-^{15}N HOMCOR と共に^{13}C-^{15}N HETCOR も明瞭に観測できた。また、ピーク強度比に着目すると2D-FT 法のスペクトル (d) を良く再現しているのは 根行列 (b) である。これから、共分散行列の根行列が従来の2D-FT 法によるスペクトルに相当することが裏付けられる。

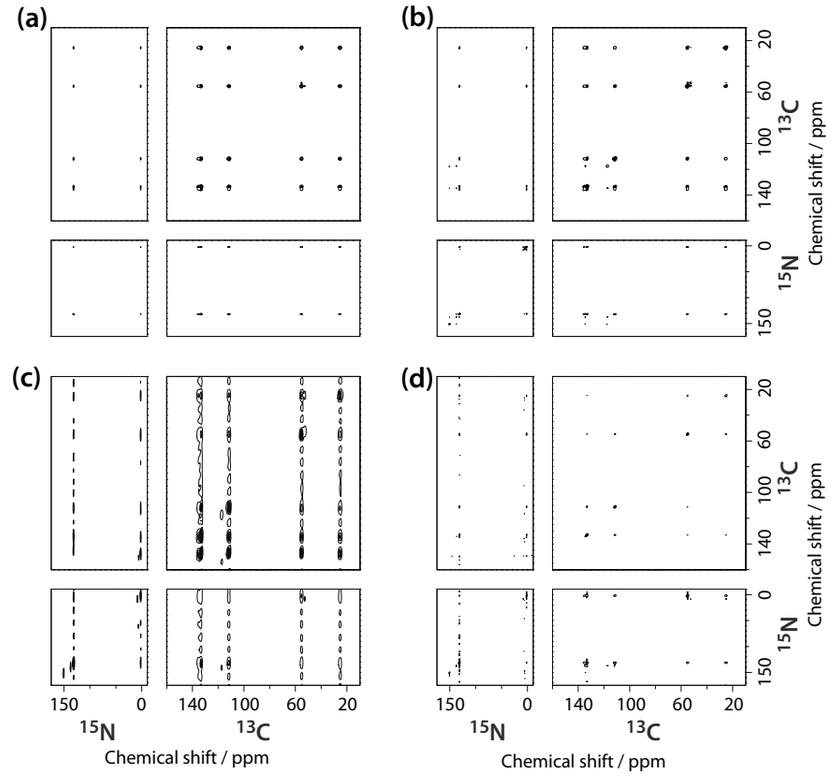


Fig. 4 2D spectra of ^{13}C,^{15}N-labeled histidine with a pulse sequence described in Fig.1. (a) and (b) are a covariance spectrum and its square root. (c) and (d) are conventional 2D-FT spectra. Experiment parameters for (a) ~ (c) were as follows : $\tau_{CP1} = \tau_{CP2} = \tau_{CP3}$ = 200 μs, t_d = 3 ms, τ_m = 200 μs, Δt_1 = 33 μs, N_1 = 32, and N_A = 320. For (d), N_1 was 256, and N_A was 40.The other parameters were identical with those in (a) ~ (c). The experiments were carried out in a magnetic field of 9.4 T and under MAS at 23 kHz.

４. まとめ

- ここで提案したアプローチにより、covariance HOMCOR だけでなく HETCOR も取得することができる。
- 従来の covariance HOMCOR の利点はそのまま引き継がれており、実験時間を大幅に短縮できる。あるいは同じ時間でより多く積算して大幅に感度を向上できる
- 異種核の信号を同時に取得するために、デュアルレシーバが必要である。

[引用文献]

[1] R. Brüshcweiler and F. Zhang, *J.Chem.Phys.*, 2004, **120**, 5253-5260.
[2] R. Brüshcweiler, *J.Chem.Phys.*, 2004, **121**, 409-414.
[3] C. Herbst, K. Riedel ,Y. Ihle, J .Leppert, O. Ohlenschläger, M. Görlach and R. Ramachandran, *J. Biomol. NMR*, 2008, **41**, 121-125.
[4]K. Takeda, Y. Kusakabe,Y. Noda, M. Fukuchi, K. Takegoshi, *Phys.Chem.Chem.Phys*. 2012, **14**, 9715-0721.

P67 二重および三重回転照射を用いた異種核^{1}Hデカップリング

○脇坂朝人[1], 武田和行[1], 竹腰清乃理[1]
[1]京都大学大学院 理学研究科

Heteronuclear ^{1}H-Decoupling using Double / Triple Nutation

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

We propose a new heteronuclear ^{1}H-decoupling sequence using simultaneous nutation around two or three axis. In this technique, refered to as double nutation decoupling (D-DEC) or triple nutation decoupling (T-DEC), the rf Hamiltonian is derived from the target propagator with an arbitrary set of nutation frequencies. The peformance of D-DEC and T-DEC is examined in ^{13}C CPMAS NMR in a powder sample of glycine.

［はじめに］

固体NMRにおける^{1}Hデカップリングは，これまでに連続照射(cw)の他にXiXやTPPMなどの手法が確立されている。今回我々は二重および三重回転照射を用いた新しい手法(Double nutation Decoupling: D-DEC および Triple nutation Decoupling T-DEC)を提案し，その効果を検証する。

［原理］

D-DECでは,^{1}Hスピンに対し次式の時間推進演算子を作用させることを意図している。

$$U_{rf}(t) = U_y(t)U_x(t) \quad \text{ただし} \quad U_\phi(t) = \exp(-2\pi i \nu_{1\phi} I_\phi t) \qquad (1)$$

この$U_{rf}(t)$により，スピンをX軸とY軸まわりに同時に任意の周波数の組み合わせで回転させる事ができる。また，時間推進演算子$U(t)$について，これを作用させるハミルトニアンは次の式で求める事ができる。

$$H = i\frac{dU}{dt}U^{-1} \qquad (2)$$

よって，D-DECのハミルトニアンは，(1)式と(2)式より求める事ができる。

$$\begin{aligned} H_{rf} &= i\frac{dU_{rf}}{dt}U_{rf}^{-1} \\ &= \nu_{1y}I_y + \nu_{1x}\left[I_x\cos(2\pi i\nu_{1y}t) - I_z\sin(2\pi i\nu_{1y}t)\right] \\ &= \nu_s(t)I_{\phi(t)} + \Delta\nu_f(t)I_z \end{aligned}$$

ただし

$$\nu_s(t) = \sqrt{\nu_{1y}^2 + \nu_{1x}^2\cos^2(2\pi i\nu_{1y}t)}$$

$$\phi(t) = \arctan\left(\frac{\nu_{1y}}{\nu_{1x}\cos(2\pi i\nu_{1y}t)}\right)$$

$$\Delta\nu_f(t) = -\nu_{1x}\sin(2\pi i\nu_{1y}t)$$

実験的には，強度$\nu_s(t)$位相$\phi(t)$のラジオ波をキャリア周波数から$\Delta\nu_f(t)$だけずらして照射する事でこのハミルトニアンが実現できることになる。
また，T-DECでは^{1}Hスピンに対して次の時間推進演算子を作用させる。

$$U_{rf}(t) = U_y(t)U_x(t)U_y(t)$$

キーワード: デカップリング

○わきさかあさと，たけだかずゆき，たけごしきよのり

この場合のハミルトニアンも，D-DECと同様に(2)式を用いて求める事ができる。

［実験手法］

実験は9.4T磁場とChemagnetics社製3.2mm MAS T3プローブ，OPENCORE NMR分光計を用いて，^{1}Hと^{13}Cのキャリア周波数はそれぞれ400.2409MHz，100.6505MHz，MASの回転速度は10 kHzで行った。9.5% 2-^{13}Cラベルグリシンの^{1}H-^{13}C CPMAS測定を様々なデカップル条件下で行い，^{13}CスペクトルのCH_2ピークの高さによってデカップル効果を検証した。
D-DECにおけるラジオ波の変調パラメータは，約1us間隔で更新した。

［結果と考察，今後の展望］

1. D-DECデカップリングの有効性の検証

$\nu_{1y}=\nu_{1x}$=50 kHzのD-DECと，ν=50, 60 kHzのTPPMデカップリングを用いてNMR測定を行った。Fig.1にCH_2基のピーク高さを示す。これより$\nu_{1y}=\nu_{1x}$=50 kHzのD-DECは,デカップル効果が強度50kHzのTPPMより高く,強度60kHzのTPPMより低いことが分かった。

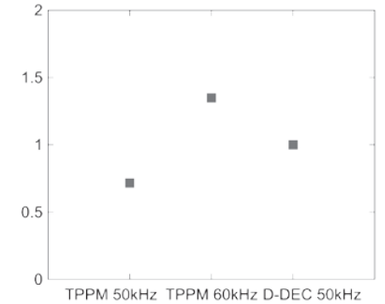


Fig.1 Peak heights of the methylene carbon in 2-^{13}C labeled glycine obtained with TPPM decoupling and D-DEC. The data are normalized with that of D-DEC with $\nu_{1y} = \nu_{1x}$ = 50 kHz.

2. デカップル効果のν_{1y}およびν_{1x}依存性

1.の実験では$\nu_{1y}=\nu_{1x}$の条件下でデカップル効果を測定した。つぎに，ν_{1y}を20kHzから70kHzまで，ν_{1x}を0kHzから70kHzまでそれぞれ変化させて実験を行い,CH_2ピークの高さを調べた。Fig.2にその結果を示す。

これより,ν_{1y}とν_{1x}の2つのパラメータに関して，ν_{1y}は本実験の範囲内のほぼ全領域で，ν_{1x}についてはν_{1x}<50kHzの範囲内で，概ねデカップル効果と正の相関が得られた。また，2つのパラメータと効果の相関は対称的ではないことが得られた。

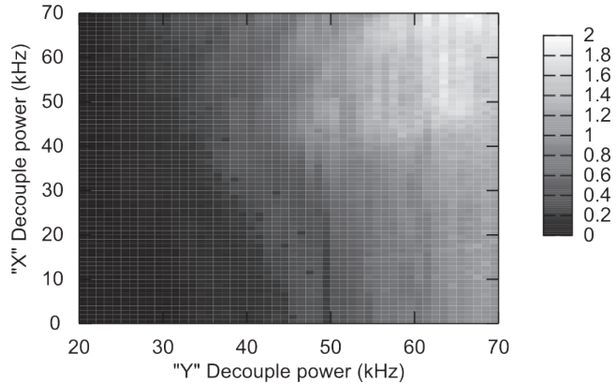


Fig.2 CH_2 peak heights of 2-^{13}C labeled glycine with various sets ν_{1y} and ν_{1x} of the nutation frequencies. The data are normalized with that of 70 kHz cw decoupling.

現在，本実験の設定範囲外のパラメータについても測定を行っている。また，これらのD-DECのパラメータ依存性をもとに，T-DEC 実験も進行中である。

P68

DARR照射下での ^{13}C-^{13}C 交換速度の計算

○大橋　竜太郎[1]、笹川　匡裕[1]、水野　元博[1]

1．金沢大学大学院　自然科学研究科

^{13}C-^{13}C Exchange Rate under DARR

○ Ryutaro Ohashi[1], Masahiro Sasagawa[1], and Motohiro Mizuno[1]

1. Natural Science and Technology, Kanazawa University

A 2D homonuclear exchange NMR spectrum in solids often shows an asymmetric cross-peak pattern, which disturb quantitative determination of cross-peak intensities. Especially, a 2D homonuclear exchange NMR spectrum using dipolar assisted rotational resonance (2D DARR spectrum) shows remarkable asymmetry of a cross-peak pattern. In order to explain the source of the asymmetric cross-peak pattern in 2D DARR spectrum, transition probability under DARR irradiation, which are related to exchange rates and cross-peak intensities in 2D exchange NMR, are calculated in three spin system, one proton (I) and two carbon thirteen (S_1, S_2).

２次元交換ＮＭＲでは、クロスピークが非対称となることがしばしばあり、定量的な解析を行うためには、この非対称性を考慮する必要がある。非対称性の一因にはＣＰ法の影響が考えられるが、ＤＡＲＲ法を用いた２次元交換ＮＭＲではこの非対称性が強く出ることが多いため、ＤＡＲＲ照射が非対称性を強めていることが考えられる[1]。そこで、本研究では、３スピン系（１つの水素と、２つの炭素）におけるＤＡＲＲ照射下での遷移確率を計算し、それをもとに交換速度、及びクロスピーク強度の計算を行い、実験によるピーク強度との比較を行う。本要旨では、遷移確率の計算結果の一部を示し、２次元交換ＮＭＲの非対称性の原因について考察する。

ここでは、１つの水素と２つの炭素の３スピン系を考え、それぞれ I_1, S_1, S_2 と表す。また、系全体のハミルトニアンを

$$H_{total} = H_Z(t) + H_D^{IS}(t) + H_D^{SS}(t) \tag{1}$$

キーワード：ＤＡＲＲ法、２次元交換ＮＭＲ、構造情報

発表者：○おおはし　りゅうたろう、ささがわ　まさひろ、みずの　もとひろ

とおく。ここで、$H_Z(t)$ はＤＡＲＲ照射の項を含む、ゼーマン相互作用ハミルトニアン、$H_D^{IS}(t)$ は I_1, S_1 間の異種核間の双極子相互作用ハミルトニアン、$H_D^{SS}(t)$ は ^{13}C 間の同種核間の双極子相互作用ハミルトニアンを表す。簡単のため、I_1, S_2 間の異種核間の相互作用、及び他の相互作用は無視する。

ここで、I_1, S_1, S_2 の持つ状態が l, m, n $(l, m, n = \frac{1}{2}\text{or} - \frac{1}{2})$ で表されるとき、系の状態関数を $|lmn\rangle$ と表す。このとき、$|ijk\rangle$ から $|lmn\rangle$ への遷移確率は、

$$P_{ijk\to lmn} = \frac{1}{\hbar^2} \cdot \frac{1}{t} \left| \int_0^t \langle ijk|H'(t')|lmn\rangle e^{i\omega_{ijk\to lmn}t'} dt' \right|^2 \tag{2}$$

と表される。ここで、$\omega_{ijk\to lmn}$ は遷移前後の周波数差を表す。また、$H'(t')$ には摂動ハミルトニアンが入るが、S_1, S_2 間の交換について考える場合は、H_D^{IS*} の相互作用系での S_1, S_2 間の双極子相互作用、

$$H_D^{SS**}(t) = U_{IS*}^{-1}(t) H_D^{SS}(t) U_{IS*}(t) \tag{3}$$

のみ考えれば良い。ここで、H_D^{IS*} はＤＡＲＲ照射のゼーマン相互作用系での I_1, S_1 間の双極子相互作用、U_{IS*} は H_D^{IS*} による時間発展演算子を表す。I_1 の交換を無視し、$i = l$ とすると、Eq. (2) の積分の中が

$$\begin{aligned} &\langle ijk|H_D^{SS**}(t)|lmn\rangle e^{i\omega_{ijk\to lmn}t} \\ &= -\frac{1}{4} d_{SS}(t) \exp\left[it(\omega_{ijk\to lmn} - 2\pi G_{11}\cos\gamma_1 \mathbf{lm})\right] \left[\cosh\left(2\pi \frac{G_{11}\sin\gamma_1}{8} t\right)\right]^2 \end{aligned} \tag{4}$$

となる。記号の詳細は文献 [2] にあるが、$d_{SS}(t)$ は S_1, S_2 間の双極子相互作用由来の S_1, S_2 間の距離と角度に依存する関数、G_{11}, γ_1 は I_1, S_1 間の双極子相互作用由来の I_1, S_1 間の距離と角度に依存する関数である。$\exp\left[it(\sim)\right]$ の乗数が０となれば時間積分しても値が残り、遷移が起こる。Eq. (4) の指数関数の乗数をみると、遷移確率が lm の正負によって、乗数が０となる条件が異なる。すなわち、粉末中で $d_{SS}(t)$, G_{11}, γ_1 に含まれる角度が同じ分子同士であっても、lm の値によって交換速度が異なる。この交換する前後の状態の違いによる交換速度の違いが、ＤＡＲＲ法などの ^{1}H driven を利用する２次元交換ＮＭＲの非対称性の一因と考えている。ポスターでは、10% [1,2-^{13}C U-labeled] l-leucine / 90% l-leucine の粉末試料による測定結果と計算から得られたピーク強度を比較し、^{13}C 間の距離、^{1}H-^{13}C の角度などの構造情報についての解析を行う。

[1] R. Ohashi, et al., J Chem. Phys. **125**, 214503 (2006).

[2] K. Takegoshi, et. al., J. Chem. Phys. **118**, 2325 (2003).

P69

In operando 固体ＮＭＲ測定システムの開発とそれを用いた分子クラスター電池の電池特性の解明

○山田哲也[1,2]、藤田将史[3]、吉川浩史[3]、阿波賀邦夫[1,2]
[1]名古屋大学　物質科学国際研究センター
[2]ＣＲＥＳＴ
[3]名古屋大学大学院　理学研究科

Development of *in operando* solid-state NMR system and its application to high-performance molecular cluster batteries

○Tetsuya Yamada[1,2], Shoji Fujita[3], Hirofumi Yoshikawa[3], Kunio Awaga[1,2]
[1]Research Center for Materials Science, Nagoya University, Japan.
[2]CREST, Japan.
[3]Graduate School of Science, Nagoya University, Japan.

We have studied molecular cluster batteries (MCBs), which are made of molecular clusters as a cathode active material and a lithium metal as an anode, and found that MCBs show high battery performances due to multi-electron redox reactions of molecular clusters. In this presentation, we report development of *in operando* solid-state NMR measurement system and real-time measurement of ^{7}Li NMR spectra for MCBs during charge/discharge.

【はじめに】固体NMRは固体物性における局所構造や動的挙動を知る有用な手段の１つである。なかでも近年、電池材料に関する固体NMR測定の研究が数多くなされ、特にリアルタイムで電池反応を追跡する*in situ* もしくは*in operando* 測定が注目されている。しかし、これらの測定はその困難さから、研究例はごくわずかで、真の電池反応中のイオン等の動的挙動を知る上で測定法の確立が必要不可欠である。

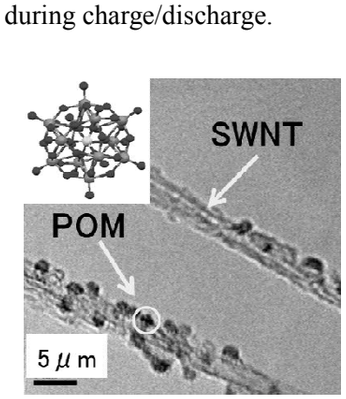


Fig. 1 TEM image of nanocomposite between POM and SWNT (Inset: molecular structure of POM)

我々はこれまでにMn12などの分子クラスターを正極活物質とする、リチウム電池「分子クラスター電池」(MCBs)を作成し、MCBが高い電池性能を持つことを明らかにしてきた。例えば$[PMo_{12}O_{40}]^{3-}$の組成式を持つポリオキソメタレート(POM)(Fig.1(a))を正極活物質とするPOM-MCBは、電池反応時に分子あたり24電子の酸化還元を起こすため高容量が確認されている[1]。一方で、このPOMと単層カーボンナノチューブ(SWNT)(Fig.1(b))からなるナノ複合体を正極活物質とした電池では、POMの酸化還元による容量とSWNTのキャパシタンス容量の単純な和を超える大きな電池容量が見られたものの、その原因は不明であった[2]。

そこで本研究では、*in operando* 固体NMR測定システムの開発を行い、電池反応に大きく関与するリチウムイオンの動的挙動の*in operando* 観測を行うことでPOM-MCBとナノ複合体電池の電池反応の追跡と高容量の原因解明を試みた。

【実験】Figure 2に*in operando* 固体NMR測定システムの模式図を示す。NMRプローブに挿入可能な極小の石英製電池セル(2.8×2.8×18mm)を開発し、この中に負極の金属リチウムと活物質のPOMもしくはPOM/SWNTナノ複合体を含む正極からなるMCBの作製を行った。この電池をプローブに挿入後、外部の充放電装置と接続して充放電中のNMRが*in operando* 環境で測定できるようにした。具体的には定電流による電池の充放電中に広幅固体 ^{7}Li NMR測定を連続的に行った。

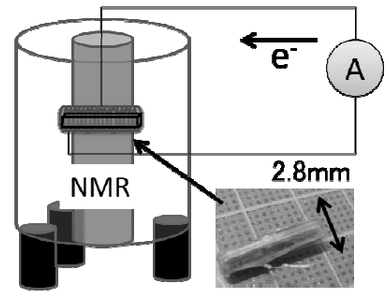


Fig. 2 *In operando* solid-state NMR measurement system

【結果】Figure 3にPOM-MCBの*in operando* ^{7}Li NMR測定結果(左、中央図)と電池特性(右図)を示す。ここで電池特性は充放電による電圧(横軸)の時間変化(縦軸)を表しており、NMR測定中に充放電が進行していることがわかる。次にFig.3 左のNMRスペクトルより、0 ppmと260 ppm付近に充放電時間に依存して変化する2種類のピークが観測された。0 ppm付近のピークはPOMに近接したリチウムイオン由来であり、充放電による化学シフト、強度の可逆的な変化が見られた。この結果は、POM周辺に存在するリチウムイオンが電池反応と密接に関わっていることを意味している。一方で、260 ppm付近のピークは金属リチウム由来であるが、充電時にはリチウムデンドライトに由来するピークが270 ppm付近に新たに出現した。このピーク強度は放電時の減少を経て再充電時に更に大きくなり、電池の劣化の様子を示すものと思われる。

Figure 4に充放電前のPOM-MCB(Fig.4(a))とナノ複合体電池(Fig.4(b))の*in situ* ^{7}Li NMRスペクトルを示す。どちらも0 ppm付近にリチウムイオン由来のピークが観測されたが、POM-MCBに比べてナノ複合体電池は非常に幅広いピークを示した。このような幅広いピークはPOMとSWNTを単に混合して作った電池では観測されなかった。この結果はPOMとSWNTのナノ複合化により、SWNTのバンドルがほどけ、多くのリチウムイオン吸着サイトが新たに出現したためと考えられる。現在、この吸着サイトの増加とナノ複合体電池に見られる電池容量の増大との関連性について検討している。

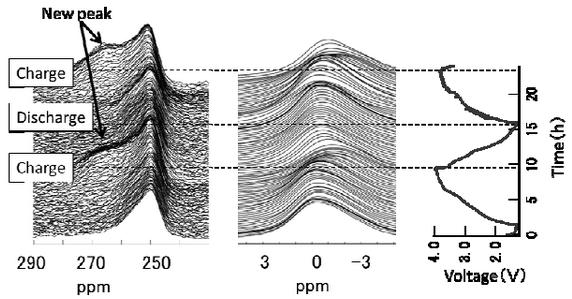


Fig. 3 *In operando* ^{7}Li NMR spectra of POM-MCBs during charge/discharge

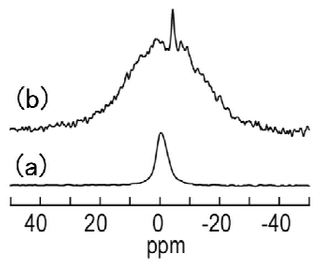


Fig. 4 *In situ* ^{7}Li NMR spectra of (a) POM- and (b) POM/SWNT nanohybrid-MCBs

[1] H. Wang, et al., *J. Am. Chem. Soc*., **2012**, 134, 4918
[2] N. Kawasaki et al., *Angew. Chem. Int. Ed*. **2011**, 50, 3471

In operando 固体ＮＭＲ、リチウム電池、分子クラスター

○やまだてつや、ふじたしょうじ、よしかわひろふみ、あわがくにお

P70

超偏極^{129}Xe NMRによる多孔質上吸着相の解析

○服部　峰之[1]
[1]産業技術総合研究所　電子光技術研究部門

Adsorption Property of Xenon Gas on Mesoporous Materials using Hyperpolarized ^{129}Xe Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy

○Mineyuki Hattori [1]
[1] *National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (esprit), Tsukuba, Japan.*

^{129}Xe Nuclear Magnetic Resonance (NMR) techniques have been applied to probe porosity of mesoporous materials and the pore size is known to relate with the chemical shift. Since the Van der Waals radius of Xe is known to be 0.216 nm, the possible pore size to adsorb xenon should be larger than 0.4 nm in diameter. Then the mean pore diameters ranging from 0.4 to 300 nm are the possible target to show the relationship experimentally. We have developed an apparatus to produce the laser induced hyperpolarized (HP) Xe gas continuously and tried to apply it to mesoporous materials.

【序論】^{129}Xe NMR法は、多孔質材料のポロシティの測定に応用されており、化学シフトがポアサイズと相関があることが知られている。Xeのファン・デル・ワールス半径は、0.216 nm であり、直径は、0.396 nmであるので、直径 0.4 nmより大きなポアには吸着されることが可能である。この相関が適用可能な平均ポア直径は、0.4～300 nm程度である。超偏極により1万倍以上の感度向上が得られ、積算なしでも十分な検出感度が得られる。数十msから1秒程度の時間分解で、リアルタイム測定が可能になった。多孔質材料に吸着しているXeの^{129}Xe NMRの化学シフトと線幅は、細孔径とXeと細孔との相互作用の大きさに依存する[1]。今回は、超音波画像診断用に気体を吸着させられる有機物多孔質材料をとりあげ、室温以下Xeの凝固点直下(-130℃)までの温度範囲において^{129}Xe NMRスペクトルの取得を行った。

【超偏極^{129}Xe生成装置と狭帯域化光源による高効率化】^{3}He, ^{129}Xeの核スピンが1/2の希ガスは、RbのD$_1$線 ($5^2S_{1/2}$-$5^2P_{1/2}$) を光ポンピングしたアルカリ金属とのスピン交換を行って、NMR信号を飛躍的に増強できる。簡便なバッチ式の超偏極キセノンガス製造装置(東横化学：HPXE2105)[2]が、既に利用されているが、今回は、連続フロー生成モードでの運用を行えるように構成を変更した。また、セルや配管等の内壁と衝突によるスピン緩和の発生を抑制して、3～5mの長距離を送給しても超偏極^{129}Xeの信号強度を低下しないように、生成セルの下流に内径0.1～1.25mmの極細キャピラリー管を利用してNMR試料管への導入を行った[3]。一方、照射するレーザー光の光パワー密度が充分に生かせる範囲の照射面積を有する平面型フローセルの隙間に希ガスと光ポンピング用触媒(Rb)の混合気体を流通させることを考案し、40W狭帯域化LDAを4個

超偏極, ^{129}Xe, 吸着

○はっとりみねゆき

製作し（線幅 0.1nm 以下、40W×2×2＝160W)、このセルに適用して、40～100ccm の流速で、偏極率約 20%の超偏極キセノンガスの生成に成功している[3]。円筒型セルと薄型セルでは、混合ガスの励起セルの滞在時間に違いがあるが、常圧のガスと共存している Rb の吸収線幅は、通常の LDA に比較すると 20 倍程度狭いという状況であり、LDA の発振線幅を、常圧における Rb の吸収線幅程度まで狭帯域化し、波長の長時間安定性も向上が必要である。今回、AR コートを施した LDA を採用し、体積グレーティング(VHG)による波長ロックの性能を向上した。1.5mm 厚の VHG を採用すると線幅 0.06nm まで、12mm 厚の VHG によると線幅 0.01nm まで狭線化に成功した。1.5mm 厚の LDA を 2 個搭載しビームを大面積の照射用に均一化、拡大した光学系を組込んでシステム化し、これを連続フロー方式の生成装置に適用した。励起光源：狭帯域化レーザー（794.7nm ±0.06nm, 54W, アウレアワークス製、Figure 1, 2 参照）

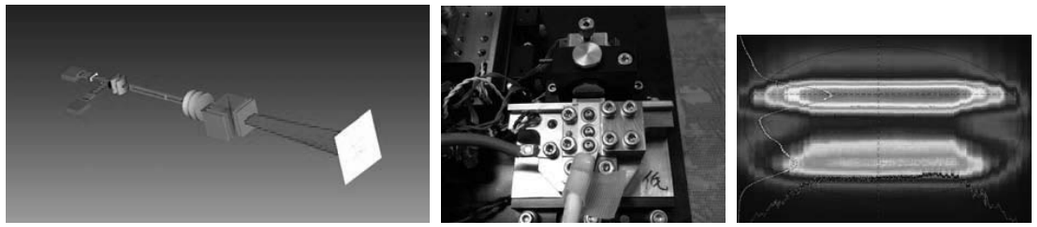


Figure 1. [left] Scheme of the line-narrowed LDA system, [center] Picture of the LDA, [right] Beam profile from the LDA system.

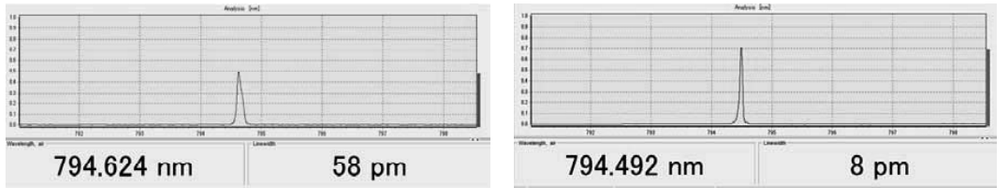


Figure 2. [left] Emission spectra of line-narrowed LDA with 1.5mm thickness VHG (Central wave length:794.624nm, line width:0.058nm FWHM), [right] Emission spectra of line-narrowed LDA with 12mm thickness VHG (Central wave length: 794.492nm, line width: 0.008nm FWHM). We can set the central wave length of emission spectra at any wave length within ±0.15nm by changing temperature of VHG element.

【超音波画像診断用有機物多孔質材料】名称:Levovist®、code name:SH/TA-508、製造元:Schering（独）、国内販売元:日本シエーリング、平均径:2～4μm、殻材質:なし（パルミチン酸）、気体:空気 [5]

【超偏極^{129}Xe NMR実験】^{129}Xe NMR スペクトルは、6.3T（^{129}Xe：74.747MHz）で、tecmag Apollo Spectrometerにより得た。Levovist® 約0.3gを10mm径NMR試料管に入れ、マニュホールドを用いて試料管内をロータリーポンプにより真空引きして、水分等の吸着物を除いた後に、キャピラリーチューブつきのマニュホールドに付け替え、超偏極Xeガスを大気圧下で連続フロー導入した。流速20sccmで、超偏極^{129}Xe含有混合ガス(Xe:N_2:He混合比,1%:5%:94%)を流通させながら、吸着したXeの^{129}Xe NMRスペクトルを143～303 Kの温度変化を取得した。1回積算で20回連続励起収集(FA=90°、Tr=10s, NEX=20)で測定した。^{129}Xeの化学シフト、線幅を1番目のスペクトルから解析した。

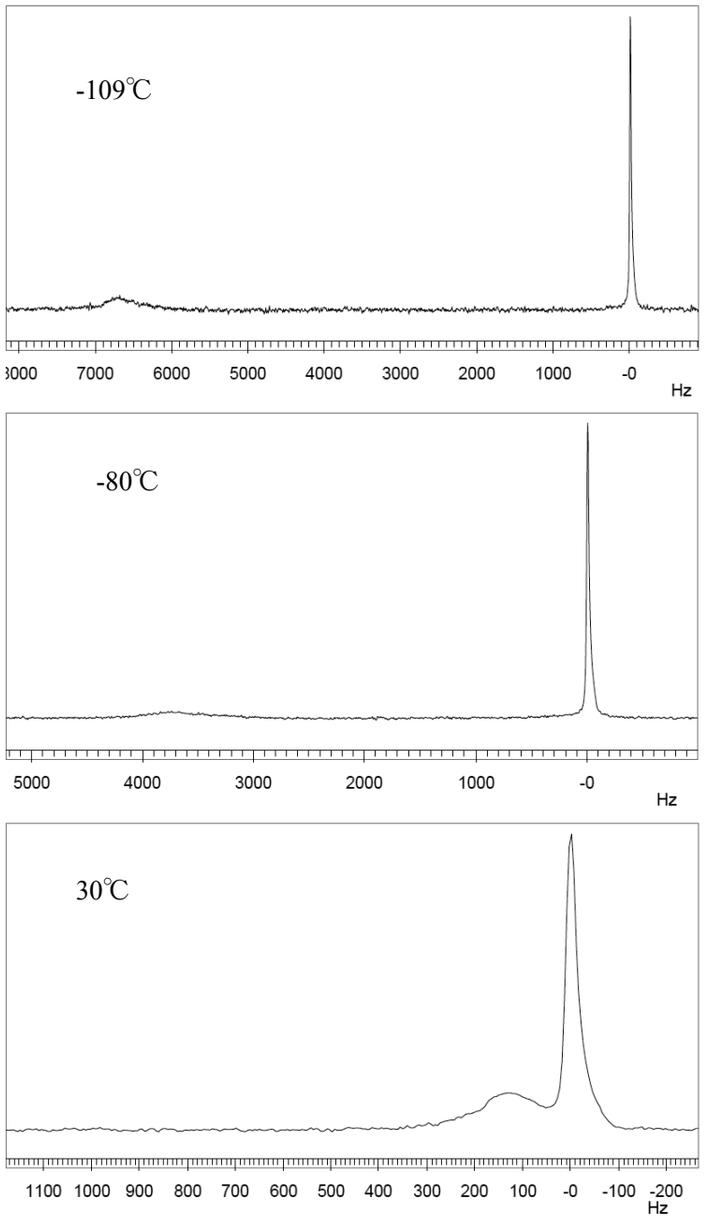


Figure 3.　Temperature dependence of ^{129}Xe NMR Spectrum of adsorbed on Levovist® pore.

【結果】Figure 3.に測定した、^{129}Xe NMRスペクトルを示す。室温付近では、狭い線幅のガスピークの脇に広幅の吸着したXeガスの信号が観測された。これは、ポアの大きさは2～4μmと一致している。温度を下げていくと、シフト値が大きい方に吸着相ピークがシフトしていくのがわかる。Xeが液化する、165.03 K (-108.12 ℃)以下の-109℃では、さらにシフトして90ppmとなった。さらに、Xeの凝固点161.4 K (-111.7℃)以下の-129℃では、126ppmとなり、ガス相の信号減少が観測された。

【考察】^{129}Xe NMR線形は、それぞれの測定温度でのXeガス相と吸着相のメソポアーへの滞在時間と数密度による平均を観測する。これらは、温度と圧力により変化し、^{129}Xe NMRの各種パラメータに影響を与える。超偏極^{129}Xeを連続フローで流通させた状態で、時間分解測定を行うことにより、Xeの振る舞いに関する知見を反映した化学シフトと線幅の解析からポアのサイズと分布および、Xeガス吸着と交換に関する情報を得られることが期待される。

【参考文献】

[1] A ^{129}Xe Nuclear Magnetic Resonance Study on Xenon Trapped in Fully Dehydrated Mesoporous Silica, Referred to as Molecular Sieves 5A and 13X under Atmospheric Pressure,服部 峰之、秦 信宏、高田 省三、山本 典孝、平賀 隆、早水 紀久子,Japanese Journal of Applied Physics, **48**-12, pp.125001-1～125001-6、(2009).
[2] 大竹紀夫、村山守男、平賀隆、服部峰之、本間 一弘, 特開2004-262668号公報；服部峰之, 超偏極キセノンガス生成装置実用機の研究開発, 工業材料, **52**(3), 86-89 (2004).; M. Hattori, et. al., Proc. ISMRM, 1264 (2007).
[3] 服部峰之、平賀隆、浅沼達哉, 特開2006-322802号公報
[4] 服部峰之、平賀隆、村山守男,特開2003-245263号公報;M. Hattori, et. al., Proc. ISMRM, 2577 (2010).
[5] 森安史典、飯島尋子、映像情報Medical, 5月号, 570-578 (2006).

P71

MAS下の^{19}F-^{13}C交差分極における^{19}F化学シフト異方性の影響

○神原孝之、武田和行、竹腰清乃理
京都大学大学院理学研究科

The effect of ^{19}F chemical shift anisotropy on ^{19}F-^{13}C cross-polarization under magic angle spinning (MAS)

○Takayuki Kamihara, Kazuyuki Takeda, and K. Takegoshi
Division of Chemistry, Graduate School of Science, Kyoto University, Kyoto, Japan.

We show that, in a perfluoropolymer sample, efficient ^{19}F-^{13}C cross-polarization (CP) requires higher RF irradiation at the ^{19}F spin than that for the ^{1}H spins in ^{1}H-^{13}C CP in typical organic solids. The different CP behaviors are accounted for in terms of the ^{1}H/^{19}F chemical shift anisotropies.

1. 序論

交差分極(Cross Polarization, CP)は、固体試料中の２つの核種間の磁化移動によって、低感度核の信号強度を増大させる手法である。一般に、Hartmann-Hahn 条件を満たすラジオ波の照射を行っても、その強度が不十分である場合、CP 効率が低下する。本研究で我々は、MAS 下のフッ素樹脂中の ^{19}F-^{13}C 間の CP において ^{13}C の偏極効率を保つためには、^{19}F スピンに対して、非フッ素化樹脂中の ^{1}H-^{13}C 間の CP で ^{1}H に必要とされるよりも高い強度のラジオ波照射を要することを示す。

フッ素樹脂における ^{19}F と ^{13}C との位置関係は、非フッ素化樹脂における ^{1}H と ^{13}C のそれと近く、また、^{1}H と ^{19}F はともにスピン 1/2 核で磁気回転比もほぼ等しく、天然存在比もほぼ 100%であるため、双極子相互作用の大きさも ^{1}H-^{13}C 間と ^{19}F-^{13}C 間で大差はないと考えられる。一方で、^{1}H と ^{19}F では一般に化学シフト異方性にかなりの差があることが知られている。そこで本研究では、CP における振る舞いの違いを化学シフト異方性の観点から説明することを試みる。

2. ^{19}F-^{13}C 間と ^{1}H-^{13}C 間の交差分極における Hartmann-Hahn matching profile の比較

テフロン$(\text{-CF}_2\text{-})_n$とポリエチレン$(\text{-CH}_2\text{-})_n$の粉末試料を用いて、^{19}F-^{13}C および ^{1}H-^{13}C 間の CP 効率を様々なラジオ波強度に対して測定した。実験は磁場 7 T、MAS 周波数 24 kHz で行った。^{1}H、^{19}F、^{13}C の共鳴周波数はそれぞれ 300.439 MHz、282.663 MHz、75.548 MHz であった。

Fig. 1 に、得られた CP 効率のラジオ波強度依存性を示す。^{1}H-^{13}C 間の CP の場合(Fig. 1(a))、Hartmann-Hahn 条件 $\nu_{1H} = \nu_{1C} \pm n\nu_R$ (ν_{1H}、ν_{1C} は ^{1}H、^{13}C の照射強度、ν_R は MAS 周波数、$n = 1, 2$)を満たしていても ν_{1H} が 40 kHz 以下のときに CP 効率が低下した。一方 ^{19}F-^{13}C 間の CP の場合(Fig. 1(b))、60 kHz 以下の ^{19}F 照射強度で CP 効率の低下が見られた。

キーワード：交差分極、化学シフト異方性、^{19}F

○かみはらたかゆき、たけだかずゆき、たけごしきよのり

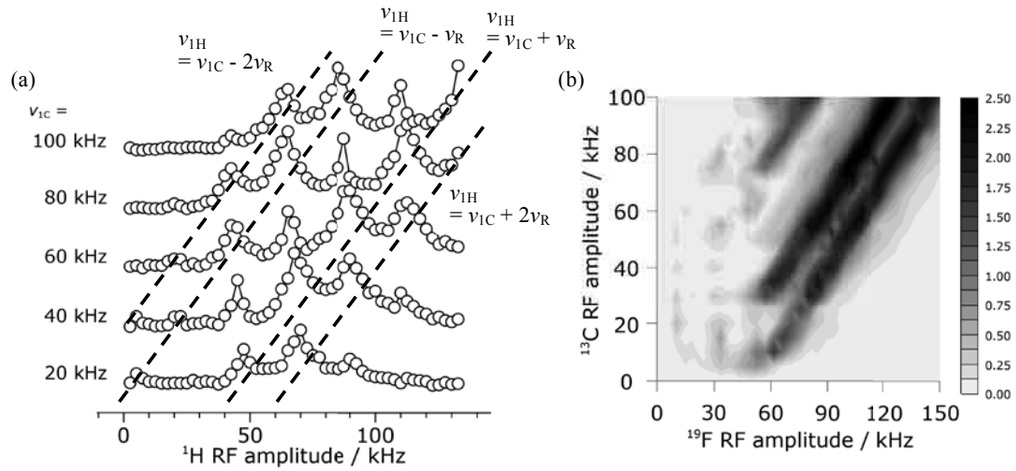


Fig. 1 Hartmann-Hahn matching profiles measured in (a) polyethylene and (b) poly(tetrafluoroethylene).

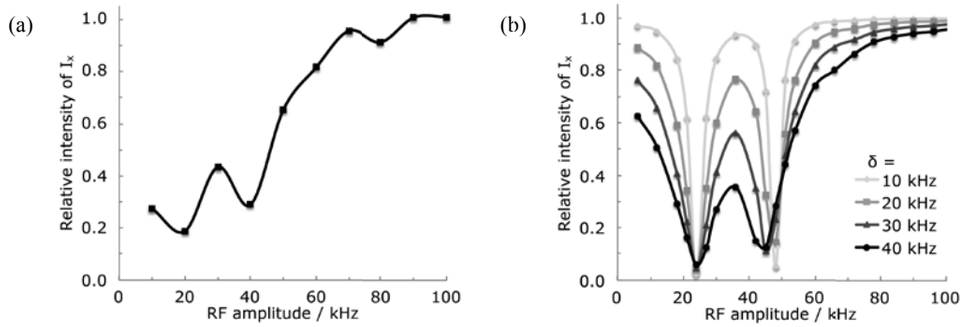


Fig. 2 ^{19}F spin lock efficiencies under MAS at 24 kHz. (a) Experimental RF power dependence in poly(tetrafluoroethylene). (b) Simulated RF power dependence for various chemical shift anisotropies (δ) ranging from 10 to 40 kHz. The spin lock duration was 10 ms for both (a) and (b).

3. ^{19}F スピンロック効率

Fig. 2(a)に、テフロンの ^{19}F に対して照射強度を変えながら 10 ms の間スピンロックを行った後に観測された信号強度を示す。60 kHz 以上の照射強度でスピンロック効率が良好であった。CP とスピンロック実験における ^{19}F のラジオ波強度の下限値が一致したことは、CP 効率の低下がスピンロック効率の低下によるものであることを示している。

次に、シミュレーションにより ^{19}F スピンロック効率の化学シフト異方性(δ)依存性を調べた(Fig. 2(b))。R3 条件($\nu_{1F} = n\nu_R$, $n = 1, 2$)においてスピンロック効率の極小が見られ、δ が大きくなると効率が低下する領域が広くなった。また 7 T においてテフロンの ^{19}F の δ 値は約 30 kHz であり、δ = 30 kHz のシミュレーション結果は Fig. 2(a)の実験結果を再現している。

4. まとめ

MAS 下でフッ素樹脂中の ^{19}F-^{13}C 間で十分な CP 効率を得るためには、非フッ素化樹脂中の ^{1}H-^{13}C 間の CP よりも大きな照射強度が必要である。これは、^{19}F の化学シフト異方性が ^{1}H のそれよりも大きく、^{1}H と比べて ^{19}F のスピンロックにより強い照射が要求されるためである。

P72

重水素固体NMRによる脂質ラフトにおけるスフィンゴミエリンの運動性解析

○安田智一[1], 山口敏幸[2], 土川博史[1], 松森信明[1], 村田道雄[1,2]
[1]阪大院理
[2]JST‐ERATO

^{2}H Solid State NMR Studies on the Mobility of Sphingomyelin in Lipid Rafts

○Tomokazu Yasuda[1], Toshiyuki Yamaguchi[2], Hiroshi Tsuchikawa[1], Nobuaki Matsumori[1], and Michio Murata[1,2]
[1]Department of Chemistry, Osaka University, Osaka, Japan.
[2]JST ERATO, Lipid Active Structure Project, Osaka, Japan.

Lipid rafts are sphingomyelin (SM) and cholesterol (Chol)-rich microdomains, which are thought to have significant functional roles in membrane-associated processes. However, their motional properties are not fully understood despite numerous studies. Here we report the accurate segmental motions of entire SM molecule, which were captured by measuring quadrupole couplings of 19 kinds of site-specifically deuterated SMs. The results show that Chol prominently increases the order at the middle parts of SM alkyl chains. Comparison with phosphocholine membrane further suggests the deeper location of Chol in SM membrane. In ternary mixtures including the unsaturated glycerophospholipid, we observed two pairs of splittings from SMs probably distributed in raft and non-raft phases. By ^{2}H NMR spectral simulation, we quantitatively determined ratios of SM and Chol distributed in each phase.

脂質ラフト (Fig. 1) は細胞膜上に存在するマイクロドメインであり、スフィンゴミエリン (SM) やコレステロール (Chol) などの特定の脂質によって構成されている。脂質ラフトは、シグナル伝達のプラットホームとして機能していると考えられているが、常に集合と離散を繰り返しているため、ラフト形成の分子基盤についてほとんど明らかとなっていない。これまで脂質ラフトにおける動的挙動解析は、アシル鎖の水素を全て重水素に置換したSMを用いた重水素固体NMR (^{2}H NMR)[1] や分子動力学計算によって行われてきたが、矛盾した結果が得られていた。そこで、本研究ではSMの運動性を詳細に解析することを目的として、位置選択的に重水素標識したSMを合成し、膜状態における^{2}H NMR測定を行った。これにより、SM各部位の運動性を詳細に評価でき、ラフト形成の分子基盤にアプローチできると期待される。

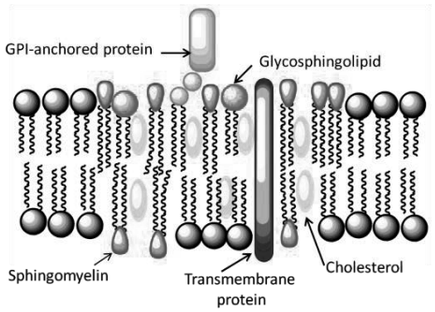
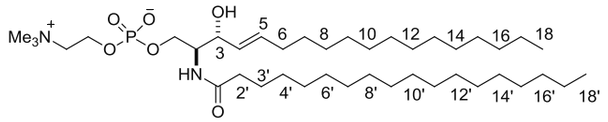


Fig. 1　Lipid Rafts

^{2}H Solid State NMR, lipid rafts, sphingomyelin

○やすだともかず，やまぐちとしゆき，つちかわひろし，まつもりのぶあき，むらたみちお

本研究では、SM分子全体に渡る動的挙動を解析するため、SMのアシル鎖およびスフィンゴシン鎖に重水素を選択的に導入した計19種類のSM (Fig. 2) を合成した。これらの重水素標識SMを用いて^{2}H NMRを測定した結果、非ラフト膜 (SM100%) ではアルキル鎖の末端にいくにつれて四極子分裂幅が減少するのに対し、ラフト膜 (SM:Chol=1:1) では非ラフト膜に比べて分裂幅は全体的に増加し、アルキル鎖中央部における分裂幅が最大値を示すことが明らかとなった (Figs. 3,4)。これはCholの平面で堅固なステロイド骨格と相互作用することによって、SMアルキル鎖中央部の揺らぎが減少したためであると推定している。


Fig. 2　Resioselectively deuterated positions of SM

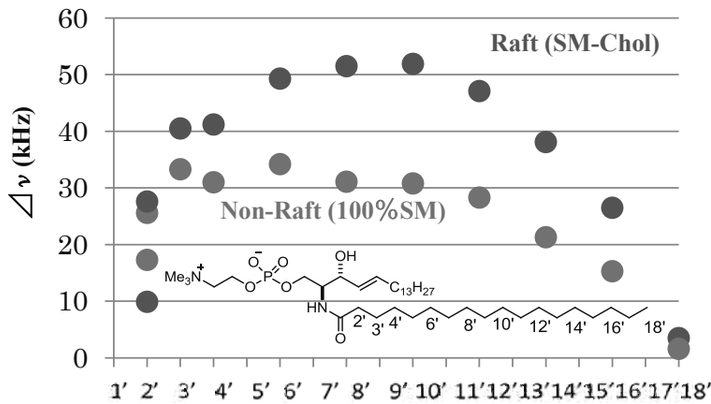


Fig. 3　Quadrupolar coupling profiles of SM acyl chain (45 ℃)

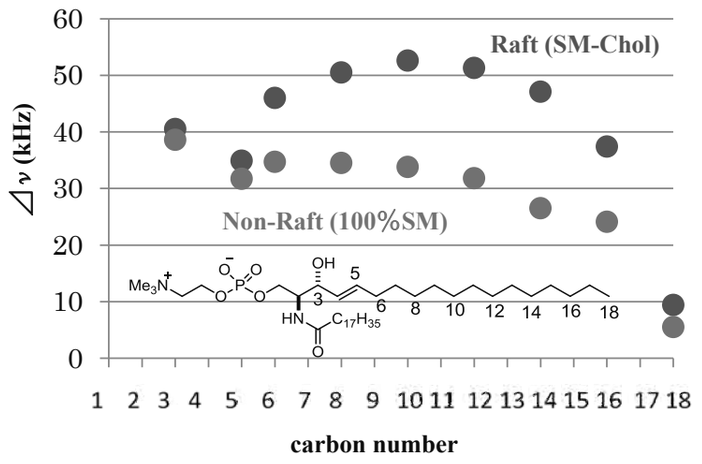


Fig. 4　Quadrupolar coupling profiles of SM sphingosine chain (45 ℃)

さらに、SMと同じアシル鎖を有するグリセロリン脂質 (PSPC) についても選択的重水素標識体を合成し、^{2}H NMR より観測された四極子分裂幅のプロファイルを比較した。その結果、PSPC膜よりもSM膜においてCholが深い位置に分布することが示唆された。このようにSM膜ではCholの位置が深いことで、膜の上部でのSM分子間の水素結合形成が促進され、安定なラフト相が形成されると考えられる。

次に、生体膜に近い環境で SM の運動性を評価するために、アシル鎖に不飽和結合を有するリン脂質である DOPC (1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine) を加えた 3 成分系 (SM/Chol/DOPC=1/1/1) についても ^{2}H NMR を測定した結果、2 組の四極子分裂が観測された (Fig. 5)。この 3 成分系では、SM を豊富に含むラフト相と DOPC を豊富に含む液晶相が相分離していることから、外側の分裂幅はラフト相、内側の分裂幅は液晶相に分配された SM 由来と考えられる。同様に SM アシル鎖の他の部分についても ^{2}H NMR を測定し、ラフト相および液晶相に分配された SM の四極子分裂幅のプロファイルを明らかにした (Fig. 6)。それぞれの相の分裂幅を SM/Chol 膜や SM/DOPC 膜の分裂幅と比較したところ、SM 豊富なラフト相の四極子分裂幅は SM/Chol 膜の分裂幅とほぼ等しいことが示された。これは、3 成分系における SM 豊富相には DOPC がほとんど分配されず、大部分が SM と Chol で占められているためと考えられる。一方、3 成分系における DOPC 豊富な液晶相は、SM/DOPC 膜の分裂幅よりも大きい値を示した。これは、DOPC 豊富相にも Chol がある程度分配されるため、SM のオーダーが SM/DOPC 膜よりも増加していることを示唆している。

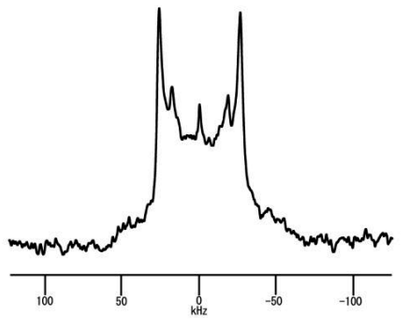


Fig. 5 ^{2}H NMR spectrum of 10',10'-d_2-SM in SM/Chol/DOPC (1/1/1) at 30 °C
51.5 kHz (outer peak), 36.0 kHz (inner peak)

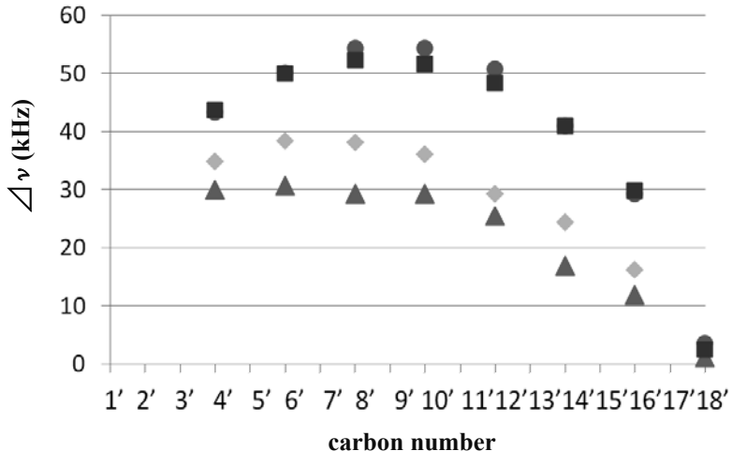


Fig. 6 Quadrupolar coupling profiles of SM acyl chain in SM/Chol/DOPC (1/1/1) at 30 ℃
● : SM/Chol, ■ : SM rich phase in SM/Chol/DOPC
◆ : DOPC rich phase in SM/Chol/DOPC, ▲ : SM/DOPC

CholがDOPC豊富な液晶相にも分配していることは、同じ3成分系において3位重水素化Cholの^{2}H NMRスペクトルが2組の分裂幅を示すことからも支持される。このように3成分系においては、重水素化SMおよび重水素化Cholいずれも2組の四極子分裂幅を示すことから、2組のピークの面積比からラフト相と液晶相のそれぞれに分配されたSMとCholの割合を決定することにも成功したので、併せて報告する。

以上のように位置選択的に重水素標識したSMを用いて^{2}H NMRを測定することで、各相状態におけるSM分子の局所的な運動性を詳細に評価することが可能となり、さらに各相に存在する脂質分子の割合を決定することもできた。本研究によって得られた知見は、ラフト形成の分子基盤の解明につながると期待される。

＜Reference＞

1) Bartels, T.; Lankalapalli, R. S.; Bittman, R.; Beyer, K.; Brown, M. F.; *J. Am.Chem. Soc.* **2008**. *130*. 14521-14532.

P73

固体 NMR 法を用いた 生理的環境での膜蛋白質 *p*HtrII の構造解析

江川文子[1]、池田恵介[1,2]、Lili Mao[3]、林こころ[4]、児嶋長次郎[1]、
井上正順[3]、藤原敏道[1]
[1]大阪大学蛋白質研究所
[2]富山大学大学院医学薬学研究部
[3]ニュージャージー医科歯科大学
[4]奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科

Solid-state NMR structural analysis of transmembrane halobacterial transducer *p*HtrII under physiological environment

○Ayako Egawa[1], Keisuke Ikeda[1,2], Lili Mao[3], Kokoro Hayashi[4], Chojiro Kojima[1], Masayori Inouye[3] and Toshimichi Fujiwara[1]
[1]Institute for Protein Research, Osaka University
[2]Graduate School of Pharmaceutical Sciences, University of Toyama
[3]Department of Biochemistry, UMDNJ-Robert Wood Johnson Medical School
[4]Graduate School of Biological Sciences, Nara Institute for Science and Technology

Transmembrane protein *p*HtrII from *N. pharaonis* is a transducer that binds to phoborhodopsin. We studied uniformly ^{13}C, ^{15}N labeled 159-residues *p*HtrII by high-resolution solid-state NMR. We have assigned ^{13}C signals of immobile regions by using spin diffusion at –10°C. Signal assignments of mobile protein segments were performed by *J*-coupling-based CC TOCSY experiments for the NOE enhanced initial ^{13}C polarization. Intermolecular information was confirmed by ^{13}C-depeted $^{15}N/^{13}C$ labeled *p*HtrII. Furthermore, we performed solid-state NMR experiments of *p*HtrII in overexpressed *Escherichia coli* cells by using condensed single-protein-production (cSPP) systems.

【序】高度好塩菌ナトロバクテリウムファラオニス（*N. pharaonis*）はフォボロドプシン *p*pR (pharaonis phoborhodopsin)というレチナールタンパク質をもち、500nm 付近の光に対して負の走行性を示す。この光センサータンパク質である *p*pR は、共役タンパク質であるトランスデューサー*p*HtrII (halobacterial transducer)と結合している。この複合体は、レセプター*p*pR 中のレチナールが光を吸収すると、トランスデューサー*p*HtrII の HAMP ドメインの構造が変化して、光情報の伝達が行われる。X 線結晶解析では、２つのロドプシンとその間にある Gly23－Leu82 のトランスデューサーの複合体構造が出ている（pdbID:1H2S）[1]。しかし、情報伝達に関わる Leu82 以降のトランスデューサーの構造はわかっていない。そこで、モデル系として、脂質二重膜に再構成された HAMP ドメインを含む 159 残基の *p*HtrII を対象にして高分解能固体 NMR で構造解析を行うことにした。さらに、生理的環境に近い細胞中の構造を捉えるために、目的蛋白質のみを効率的に発現する大腸菌 Single Protein Production (SPP) システムを使って、細胞中 *p*HtrII の構造解析を行うことにした。

【方法】^{13}C, ^{15}N 安定同位体標識した M９培地で *E. coli* BL21 (DE3)を培養し、*p*HtrII を大量発現した。得られた菌体は超音波破砕し、Ni^{2+}-NTA アガロースカラムで精製した [2]。精製 *p*HtrII は重水素化 DMPC 二重膜に再構成し、超遠心で得られたペレットを固体 NMR 試料とした。細胞中 *p*HtrII 試料は、ACA 配列非含有の *p*HrtII 発現用プラスミドと ACA 配列を認識して切断する酵素 MazF 発現プラスミドで大腸菌を形質転換し、培養した。測定試料は 3.2mm ローターに超遠心機を用いて詰めた。固体 NMR 実験は、Chemagnetic Infinity-plus 700 分光計を用いた。2D ^{13}C-^{13}C スピン拡散スペクトルと ^{13}C-^{13}C NOE-TOCSY スペクトルは試料回転数 12.5 kHz、設定温度－10°C と 10°C で行った。残基間帰属のために 2D $(C^{\alpha}C^{\beta})_{i+1}$-$(C'C^{\alpha})_i$ 測定は設定温度－60°C で行った。

【結果と考察】帰属のために（1）－60°C で双極子結合由来 ^{13}C-^{13}C スピン拡散法、(2) 10°C で *J* 結合由来 ^{13}C-^{13}C NOE-TOCSY 法、(3) －10°C で ^{13}C-^{13}C スピン拡散法の実験を行った。その結果、ほぼ全てのアミノ酸の炭素原子について帰属をすることができた。－60°C では *p*HtrII の全領域が観測されるが、室温では測定方法によって観測される領域が異なる。*J* 結合由来 C-C スペクトルでは膜外領域の運動性の高い部分、双極子結合由来 C-C スペクトルでは膜内領域と膜外領域の構造を保持している運動性の低い部分が観測される。分離されている Ala と Gly の CO-Cα 信号強度解析の結果は、－10°C の ^{13}C-^{13}C スピン拡散スペクトルでは膜内領域と HAMP ドメインが観測されていることを示唆していた。また、^{13}C-^{13}C NOE-TOCSY スペクトルの信号強度から、運動性の高いアミノ酸は Val,Thr,Glu,Leu,Arg で、それは HAMP ドメイン構造を特徴づける領域であることが確認された。分子間情報を得るために、^{15}N 標識 *p*HtrII と ^{13}C 標識 *p*HtrII の１：１混合試料を使って１次元$(^{15}N)^{1}H$-$^{1}H(^{13}C)$スピン拡散法の測定を行った。Af1503 HAMP ドメイン構造[3]に基づいて作成したモデル構造を使って、スペクトルシミュレーションを行い、膜内領域だけでなく膜外領域の HAMP ドメインが二量体を形成していることを示唆する結果が得られた。

cSPP システムを使った細胞中 *p*HtrII の実験は、最初に、非発現誘導菌の膜画分試料 ^{13}C スペクトルで大腸菌由来の膜タンパク質が完全に抑制されていることを確認した。次に、膜画分試料で ^{13}C-^{13}C NOE-TOCSY と ^{13}C-^{13}C スピン拡散測定を行い、DMPC 二重膜中 *p*HtrII の化学シフト値とほぼ一致していた。最後に、－70°C で細胞実験を行い、膜画分同様、*p*HtrII 由来信号にほぼ重なることから標識蛋白質を同定した。

【参考文献】

1. Gordeliy, V.I. *et al.* (2002) *Nature*, **419**:484-487.
2. Hayashi, K. *et al.* (2007) *Biochemistry*, **46**:14380-14390.
3. Ferris, H.U. *et al*. (2011) *Structure*, **19**:378-385.

固体ＮＭＲ、膜蛋白質、細胞

○えがわあやこ、いけだけいすけ、りりぃまお、こじまちょうじろう、いのうえまさより、ふじわらとしみち

P74

生体分子の[1]H精密位置決定～超高速MAS[1]H固体NMRによる[1]H DQMAS測定とGIPAW化学シフト計算～

○矢澤宏次[1], 鈴木不律[2], 西山裕介[3], 西村勝之[4], 梶弘典[2], 朝倉哲郎[1,4]
[1]農工大・工, [2]京大・化研 [3]JEOL RESONANCE, [4]分子研

Determination of precise ^{1}H geometry in Biomolecules. -^{1}H solid state NMR analysis by ^{1}H DQMAS under ultra high speed MAS and GIPAW chemical shift calculations.-

○Koji Yazawa[1], Furitsu Suzuki[2], Yusuke Nishiyama[3], Katsuyuki Nishimura[4], Hironori Kaji[2] and Tetsuo Asakura[1,4]
[1]*Department of Biotechnology, Tokyo Univ. of Agriculture and Technology, Tokyo, Japan.*
[2]*Institute for Chemical Research, Kyoto University, Uji, Japan.*
[3]*JEOL RESONANCE, Akishima, Japan.*
[4]*Institute for Material Science, Okazaki, Japan.*

The well-resolved ^{1}H solid state NMR spectra of alanine tripeptide (Ala_3) with anti-parallel and parallel β sheet structures are assigned by using double-quantum magic-angle-spinning (DQMAS) measurements under ultra high field with ultra fast MAS NMR. The observed ^{1}H chemical shifts are in excellent agreement with the ^{1}H chemical shifts calculated by first principles gauge-including projector augmented wave (GIPAW) method for ^{1}H geometry optimized structures, indicating that the accurate ^{1}H positions of the structure was obtained by ^{1}H DQMAS and GIPAW calculation. The chemical shifts of the amide protons are described by the inverse third power of inter-molecular NH…OC direct hydrogen bond distance. This relationship can be used to evaluate inter-molecular NH…OC direct hydrogen bond distance of peptides and proteins in the solid state from the amide proton chemical shifts.

【緒言】 ^{1}H 核は天然存在比ほぼ 100%で感度が非常に高く、また分子表面に存在するため、分子間近接に敏感である。ペプチドやタンパク質の溶液 NMR 構造解析において、アミドプロトン化学シフトの値は、アミド基が直接関わる水素結合間距離と密接に関わることから、その化学シフトと水素結合距離との相関式が提案され、構造研究に利用されてきた。一方、固体中では ^{1}H-^{1}H 核間の強い双極子相互作用によってスペクトルが広幅化するため、化学シフトを得ることが難しく、これまで構造解析にはほとんど利用されてこなかった。

本研究の流れをFig.1にまとめた。本研究では、ペプチド、タンパク質等生体分子の新規固体構造解析法として、これまでスペクトルの広幅化のために同定できなかった^{1}H固体NMR化学シフトを用いた、^{1}H精密位置決定法を開発することを目的とした。そこで、まず単結晶X線回折によって構造が既知であるアラニン3量体$(Ala)_3$について、超高磁場と超高速試料回転の組み合わせによって先鋭化した^{1}H固体NMRスペクトル

Biomolecules, ultra high speed MAS, ^{1}H solid state NMR

○やざわこうじ，すずきふりつ， にしやまゆうすけ，にしむらかつゆき，
かじひろのり，あさくらてつお

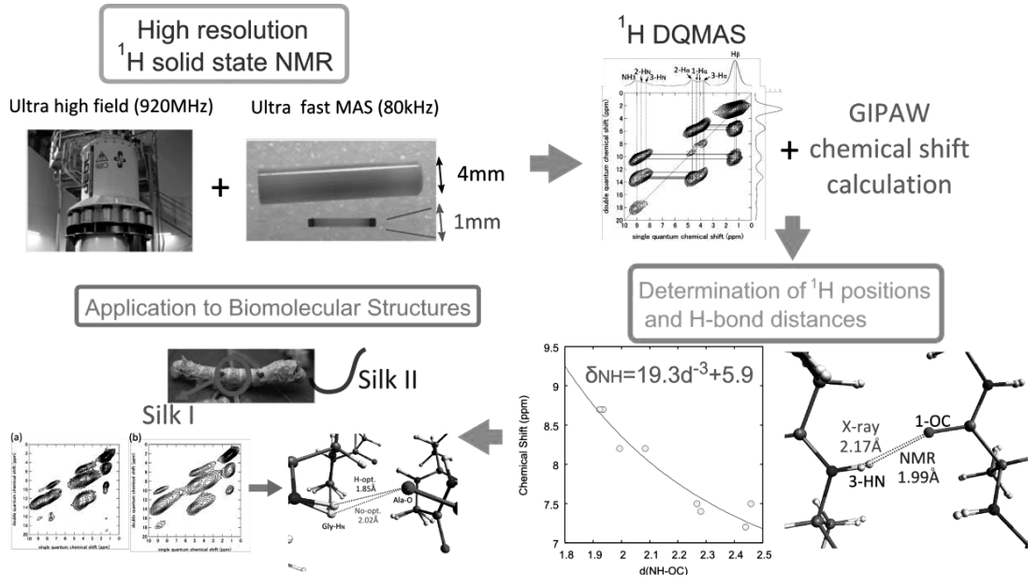


Fig.1 Concept and strategy of this research. High resolution ^{1}H solid state NMR spectra obtained by ultra fast MAS under ultra high field magnet probes precise ^{1}H geometry, which is inaccessible by x-ray diffraction, by combination with GIPAW chemical shift calculations. Relationship between chemical shift and intermolecular H-bond distance is available for analyses of biomacromolecular structures, such as crystalline fractions with Silk I and Silk II structures.

から化学シフト値を決定した。さらに精密化学シフト計算を組み合わせることで、$(Ala)_3$についてX線解析ではアクセスできない正確な^{1}Hの位置を決定し、化学シフトと水素結合距離との相関式を決定した。次に、この方法を生体高分子の分子間構造解析に応用し、絹タンパク質の繊維化前後の結晶部の構造解析を行った。

【実験】試料はX線構造既知の逆平行βシート構造の$(Ala)_3$および、DMFで処理して平行βシート構造に変換したものを用いた。また、キモトリプシンで家蚕(*Bombyx mori*)絹水溶液のTyr残基C端を切断、得られた沈殿を繊維化前のSilk I型結晶部として回収した。また、それをギ酸に溶解させ、乾燥させたものを繊維化後のSilk II型結晶部とした。また比較対象として、絹結晶部モデルペプチド$(AG)_{15}$を合成し、同様に溶媒処理を行いSilk IおよびSilk II構造を得た。

超高磁場NMR装置は分子科学研究所のJEOL JNM-ECA920(JEOL RESONANCE)を用い、超高速試料回転は1mm試料管プローブセットを用いて主に回転速度70kHzで行った。^{1}H-^{1}H 近接の観測には Dipolar Homonuclear Homogeneous Hamiltonian double-quantum/single-quantum (DQ–SQ) correlation法[1]を用いた。90°pulse=12.9μs、繰り返し時間2s、2τdelayはS/N比が最大となる0.3msで行った。^{1}H化学シフトの外部基準には、シリコンゴム(0.12ppm from TMS)を用いた。

化学シフト計算は、Geometry optimization and the gauge-including projector augmented wave (GIPAW)法を用い、CASTEPプログラムにより周期境界条件下で行った。

【結果・考察】まず^{1}H固体NMR法により、^{1}Hの正確な位置と水素結合距離を決定できるかを検証するため、X線構造が報告されている$(Ala)_3$の平行および逆平行型βシートの^{1}H DQMAS測定を行い、各ピークを帰属し、その化学シフトを決定した。Fig.1に示すように、実測の化学シフトはX線構造から直接GIPAW法により計算した化学シフト（No-opt.）の場合、一致は十分でなかったが、重原子を固定し^{1}Hの位置を最適化した構造から計算した場合 (H-opt.)には、よく一致した。(Fig.2a) このことから^{1}H DQMASと化学シフト計算と併用することにより、より正確な^{1}Hの位置情報が得られることがわかった。また、βシート構造の分子間水素結合に直接関わるアミドプロトンの化学シフトδ_{NH}は、水素結合距離dとδ_{NH}=19.3d^{-3}+5.9（RMSD 0.07Å）の関係で表されることがわかった。ここで得られた係数19.3ppm・Åは溶液NMRによって得られたタンパク質(basic pancreatic trypsin inhibitor)のβシートにおける係数19.2ppm・Å[2]と非常によく一致した。これは固体状態でのペプチドの化学シフトと水素結合距離の関係を表した初めての例である。化学シフトは水素結合距離だけでなく、磁気異方性等、N-H-Oの角度にも影響されるが、βシートにおいてはその影響が少なく、化学シフトを求めることで距離情報を0.1Å以下の精度で抽出できることは非常に興味深い。

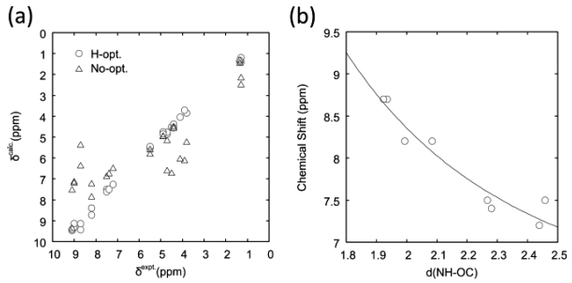


Fig.2 (a) Comparison of the observed ($\delta^{expt.}$) and calculated ($\delta^{calc.}$) ^{1}H chemical shits of Ala_3. For NH_3 and CH_3, three calculated ^{1}H chemical shifts are averaged. (b) The plot of the experimentally determined ^{1}H chemical shifts for the hydrogen-bonded amide protons in AP and P β sheet structures of Ala_3 vs. the distance between these protons and the nearest oxygen atoms. The solid line represents the best fit curve, δ_{NH} =19.3d^{-3} +5.9.

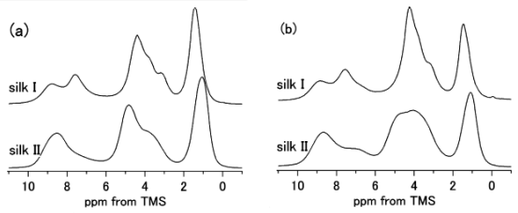


Fig.3 ^{1}H Solid state NMR spectra of (a) AG_{15} and (b) *B.mori* silk crystalline fraction with Silk I and Silk II structures.

次に^{1}H固体NMRを用いたタンパク質の分子間構造解析への応用として、絹タンパク結晶部の繊維化前後（Silk I および Silk II）の構造解析を行った。これらの構造モデルは既に報告されているが、^{1}Hの位置情報の詳細は分かっていない。また、Silk II型構造に関しては、1955年にMarshらによって報告された逆平行βシート構造[3]が知れらているが、実測のX線回折強度と構造モデルに基づく強度との一致はあまりよくなく（Rfactor=37%）、精密な構造決定が求められている。

試料には主に(AGSGAG)n配列を有する絹タンパク結晶部、およびそのモデルペプチド$(AG)_{15}$を用いた。Fig. 2に絹結晶部と$(AG)_{15}$のSilk I、Silk II型の^{1}H固体NMRスペクトル、Fig.3にSilk IおよびSilk II型絹結晶部の^{1}H-DQMASスペクトルを示す。最も高磁場側に表れるCH_3基のピークはAla残基にしか存在しないため、^{1}H-DQMASスペクトルをこのピークから解析し、全^{1}Hの化学シフトを同定した。両試料ともにSilk IではAla残基とGly残基のNH基の化学シフトはそれぞれ7.6、8.9ppmと大きく異なるのに対し、Silk IIでは8.7ppm付近で重なって観測された。これはβシートを形成することで分子

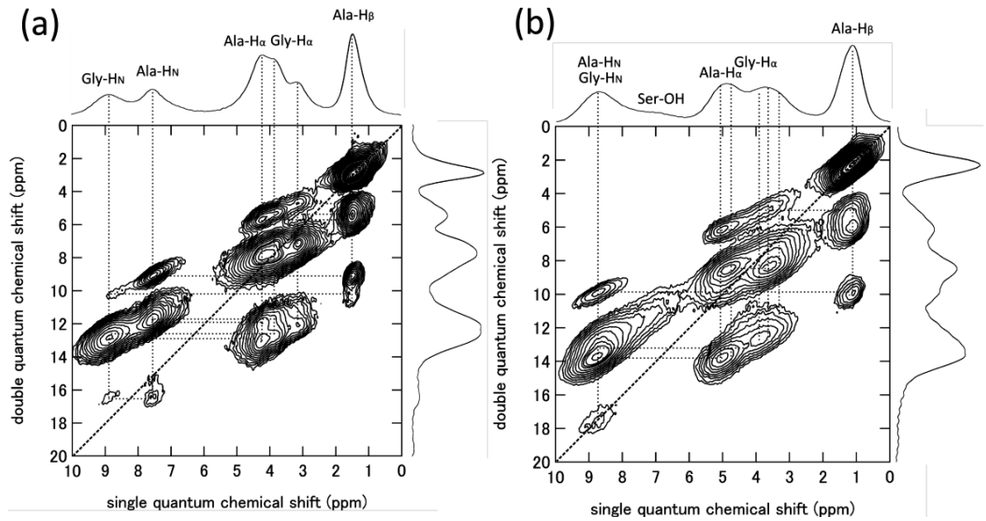


Fig. 4 ^{1}H-DQMAS spectra of *B.mori* silk crystalline fraction with (a) SilkI and (b) SilkII structures.

間水素結合距離の残基による違いが表われなくなっていることを示唆している。また結晶部と$(AG)_{15}$のDQMASスペクトルを比較するとSilk I、Silk IIともに、水素結合距離を強く反映するNH基の化学シフトは両試料間でほとんど変わらず、Ser残基のピークもAla残基とは区別できなかったことから、両結晶構造中でSer基の主鎖部はAla基と同様のコンフォメーションで存在していると考えられる。次に$(Ala)_3$で求めた化学シフトと水素結合距離との関係(Fig.2b)から、Silk IおよびSilkIIの水素結合距離を算出したところ、Silk IではH^N(Ala)-O(Gly)= 2.13Å、H^N(Gly)-O(Ala)1.84Åとなり、文献値の2.01、1.85Å[4]とよく一致した。一方、Silk IIでは、H^N(Ala)-O(Gly)、H^N(Gly)-O(Ala)共に1.91Åとなり、文献値の1.77、1.76Å[3]と比べると0.15Åほど長く、X線から得られた構造モデルを修正できた。今後はさらにシート間距離の解析を行う。

以上により、これまで構造解析にほとんど用いられてこなかった^{1}H固体NMRを超高磁場＋超高速回転により高分解能化することによって、低分子だけでなく、タンパク質の分子間構造の解析に応用できることが分かった。今後は今回得られた^{1}Hシグナル情報を活かすため、試料を部分的に^{13}Cや^{15}Nラベルすることにより、それらと結合した^{1}H間の近接情報を^{1}H観測により得る。これにより、これまで重原子のNMRでは明らかにされていないβシート間距離など、より詳細なSilk IIの構造解析を行う。

【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平成23年度科学研究費補助金基盤研究A（課題番号23245045）により実施された。

【参考文献】

[1] M. Deschamps, et al. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2011, **13**, 8024
[2] G. Wagner, A. Pardi, and K. Wuethrich. *J. Am. Chem Soc*, 1983, **105**, 5948.
[3] R. E. Marsh, R. B. Corey, L. Pauling, *Biochem. Biophys. Acta*, 1955, **16**, 1
[4]Asakura *et al.*, *J. Mol. Biol.* **306**, 291 (2001). Asakura *et al.*, *Macromolecules* **38**, 7397 (2005).

P75

固体NNRを用いたヌクレオソームにおけるヒストンH2Aの構造解析

○戸所泰人[1]，森脇義仁[1]，長土居有隆[1]，立和名博昭[2]，胡桃坂仁志[2]，西村善文[1]
[1]横浜市立大学大学院生命ナノシステム科学研究科
[2]早稲田大学理工学術院

Structural analysis of histone H2A in nucleosome using by solid-state NMR

○Yasuto Todokoro[1], Yoshihito Moriwaki[1], Aritaka Nagadoi[1], Hiroaki Tachiwana[2], Hitoshi Kurumizaka[2], and Yoshifumi Nishimura[1]
[1]Graduate School of Nanobioscience, Yokohama City University, Kanagawa, Japan.
[2] Graduate School of Advanced Science and Engineering, Waseda University, Tokyo, Japan.

In eukaryotic cells the fundamental structural unit of chromatin is a nucleosome core, consisting of two copies of four histones and DNA, whose crystalline structures have been determined. However in the crystals the N-terminal histone tails, which are responsible for gene regulations by their chemical modifications could not be well identified. Here, we have examined the structures of N- and C-terminal histone tails of H2A by solid-state NMR and suggested that both histone tails hold flexible random coil structures, which might play significant roles in gene regulations.

真核生物の長いDNAはヌクレオソームを基本単位としてコンパクトに折り畳まれ、クロマチン構造を形成して核内に収納されている。ヌクレオソームはヒストンH2A、H2B、H3、H4のそれぞれ2分子ずつで構成されたヒストン八量体にDNAが巻きついて形成される（Fig.1）。その X 線結晶構造は既に決定されているが、フレキシブルな構造をとるとされているヒストンテールの構造は示されなかった。ヒストンテールは多くの翻訳後修飾のターゲットでクロマチンの高次構造の制御や遺伝子機能の制御において重要な役割を果たしている。また、クロマチンは均一の構造体ではなくさまざまな形態をとることから、構造解析が難しくなっている。原子分解能の構造情報を得るために、固体NMRではX線結晶構造解析のようにサンプルを結晶化する必要がなく、溶液NMRのような分子量に限界も存在しない。

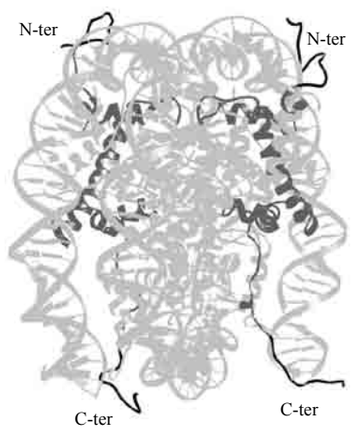


Fig. 1 H2A structures (dark gray) in nucleosome (gray, PDBID: 3AFA) connected by calculated N- and C-terminal histone tails (black)

固体NMR，ヌクレオソーム，ヒストン

○とどころやすと，もりわきよしひと，ながどいありたか，たちわなひろあき，くるみざかひとし，にしむらよしふみ

そこで、本研究では固体NMRを用いてヌクレオソームにおけるヒストンH2Aの構造解析をおこなった。

固体NMR装置はAgilent INOVA 900MHz 3.2 mm HXY Bio MASシステムを用いた。クロマチン構造モデルとして、ヒトヒストン（H2A,H2B,H3,H4）と146塩基対のDNAから作成したヌクレオソーム（200 kDa）を12 mM Mg^{2+}イオンで凝集させたものを用いた。4種類のヒストンはそれぞれ大腸菌により組み換え体として調製した。塩濃度を変化させることで、ヒストン八量体を再構成し、プラスミドDNAから調製した146塩基対のDNAを巻きつけ、ヌクレオソームを再構成した。解析しやすくするために、H2Aのみ^{13}C,^{15}N安定同位体標識をおこなった。また、ヌクレオソームは運動性の高いmobile領域（ヒストンテール）と運動性の低いimmobile領域（ヒストンコア）が存在する。運動性の違いを利用して、シグナルの簡素化、構造の評価を出来るか検討をおこなった。

ヌクレオソームのimmobile領域については固体NMR法の本来の手法であるDARR法を用いて2次元C-C相関測定をおこなった。ヌクレオソームの結晶構造から予測された化学シフト値あるいは溶液NMRにより帰属されたH2A/H2Bダイマーの化学シフト値とスペクトルを比較することで、immobile領域ではX線結晶構造と同様の構造をとっていることが示唆された。また、mobile領域については、溶液NMRで使われるINEPT法とマジック角試料回転法を組み合わせて、2次元H-C相関測定をおこなった（Fig.2）。H2Aのヒストンテールではランダムコイル構造をとって運動していると考えられた。

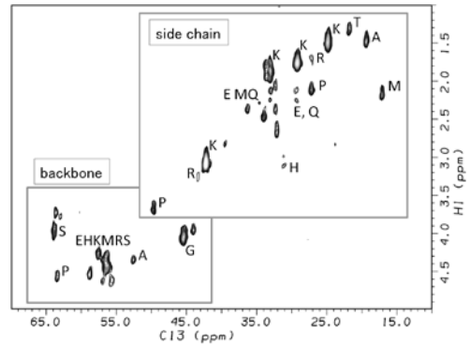


Fig. 2 2D ^{1}H-^{13}C INEPT spectrum of H2A in nucleosome

ヌクレオソームのH2Aの揺らぎを評価するために、GROMACSを用いて分子動力学シミュレーションをおこなった。構造決定されていないH2AのN末端、C末端の領域にそれぞれ14残基、11残基をヒトヌクレオソームの結晶構造（PDBID:3AFA）に付加してシミュレーションをおこなった（Fig.1）。ヒストンテールは伸びた構造からシミュレーションをおこない、0-5 nsまでを平衡過程とし、5-10ns の RMSF （ Root mean square fluctuation）で構造の揺らぎを評価した（Fig.3）。揺らぎの大きい領域はNMRで観測されているmobile領域と一致した。

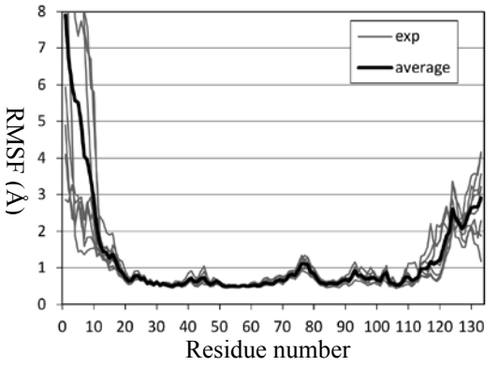


Fig. 3 RMSF of H2A in nucleosome from 5-10 ns MD trajectories

高次クロマチン構造形成下においても、H2Aのヒストンテールはヌクレオソーム単体と同様の運動をしていることがわかった。その運動はヒストンテールの翻訳後修飾を可能にし、さまざまな遺伝子機能発現を制御していると考えられる。

P76

In-situ光照射固体NMRによるバクテリオロドプシン光中間体の捕捉

○宮佐 亮太[1], 川村 出[1], 辻 暁[2], 内藤 晶[1]
[1]横浜国立大学大学院・工学府
[2]兵庫県立大学大学院・生命理学研究科

Trapping of photo-intermediates in bacteriorhodopsin as studied by in-situ photo-irradiated solid-state NMR

○Ryota Miyasa[1], Izuru Kawamura[1], Satoru Tuzi[2], Akira Naito[1]
[1]Graduate School of Engineering, Yokohama National University, Japan
[2]Graduate School of Life Science, University of Hyogo, Japan.

Bacteriorhodopsin (bR) is a membrane protein. When bR is photoirradiated, it transport proton from cytoplasmic side to extracellular side through several photo-intermediates. When the M intermediate generate, Schiff base is deprotonated and Asp96 residue is protonated, accompanied by a large dynamical change in the cytoplasmic side. This dynamical change plays a key role for proton pump mechanism.

D96N-bR shows a longer lifetime of the M intermediate than that of wild type bR. Therefore, we applied in-situ photo-irradiated solid-state NMR for [ε-^{15}N]Lys labeled D96N-bR sample to detect the M intermediate of ^{15}N labeled Schiff base. As a result, we could successfully trap the M intermediate by irradiating green light (520 nm), and it was readily reduced by irradiating blue light (365 nm).

【序論】

バクテリオロドプシン（bR）は高度好塩性古細菌*H. Salinarum*の細胞膜中に存在する膜タンパク質であり、光駆動型のプロトン輸送能を有する。bRは光を吸収すると、プロトンを細胞質側から細胞外側へと能動輸送するが、その際にbRはK, L, M, N, O光中間体を経て基底状態に戻るフォトサイクル（Fig.1）を形成する。光中間体の中でも、M中間体において生じるとされる、細胞質側の大規模な構造変化はbRの機能発現において重要であり、AFM等によってその存在が確かめられている。しかし、その詳細な構造情報や機能発現メカニズムは未だ明らかになっていない。そこで、それらを解明するべくIn-situ光照射固体NMRを用いてM中間体を生成させ、M中間体のレチナール及びタンパク質の構造変化を解明する。

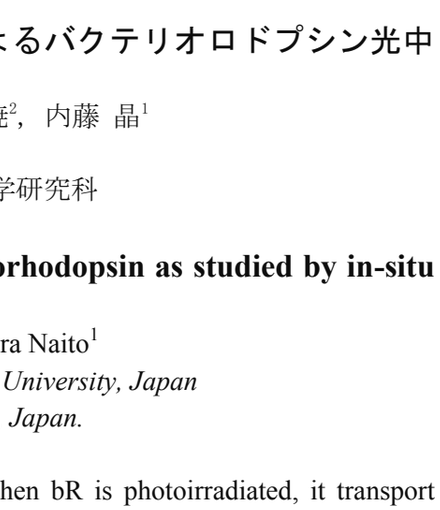


Fig.1 Photointermediates in photocycle of wild type bacteriorhodopsin

In-situ光照射固体NMR, 膜タンパク質, 光中間体

○みやさりょうた, かわむらいずる, つじさとる, ないとうあきら

【実験方法】

D96N変異高度好塩菌を[ε-^{15}N]Lysを含む合成培地中で振盪培養し、安定同位体標識されたD96N-bR試料を作製した。それを5 mM Tris, 300 mM NaCl, pH9のバッファーに置換し、高速遠心機でペレット状にしてからジルコニアローターに入れ、ガラスキャップで封じ、連続光照射と固体NMR測定を同時に行った。MAS周波数を5.3 kHz、測定温度を-60℃とし、CP-MAS法を用いた。まず、暗順応状態でNMR測定し、次に緑色LED光（520±5 nm）を連続光照射して基底状態を励起し、光中間体を生じさせた。続いて青色LED光（365±5 nm）を連続光照射してM中間体を励起した。

【結果と考察】

固体NMRを用いて光中間体の構造解析を行うには、まず光中間体を効率的に生成させ、定常的に光中間体を維持する必要がある。それを達成する為に、野生型bRよりもM中間体の寿命が長い[ε-^{15}N]Lys標識D96N-bRを用いて光照射固体NMR測定を行い、シッフ塩基の脱プロトン化を観測する事でM中間体の捕捉を試みた。20℃でD96N-bR試料を暗順応させた後、温度を-60℃に下げてNMR測定を行い、暗順応スペクトル（Fig. 2 a）を得た。次に、緑色光を連続照射してNMR測定を行い、緑色光順応スペクトル（Fig. 2 b）を得た。その直後に青色光を連続照射してNMR測定を行い、青色光順応スペクトル（Fig. 2 c）を得た。

まず、Fig. 2 a,bより、緑色光照射によって153 ppmのピークが減少し、300 ppmのピークが現れた。ここで、153 ppmのピークは13-*cis*, 15-*syn*レチナールに対応するプロトン化シッフ塩基に帰属されている。また、300 ppmのピークは脱プロトン化シッフ塩基による低磁場シフトの結果生じたと考えられ、NMRで観測するのが困難であったM中間体が捕捉された事を示す。

次に、Fig. 2 b,cより、青色光照射によって300 ppmのピークが消滅し、147 ppmのピークが増加した。ここで、147 ppmのピークはall-*trans*レチナールに対応するプロトン化シッフ塩基に帰属されており、M中間体が青色光を吸収した後に基底状態であるall-*trans*型に戻る事が示された。なお、光照射によってM中間体を生成させた後に光照射を止め、N, O中間体を経て自発的に減衰させてNMR測定を行うと、Fig. 2 cと同様のスペクトルが得られる。しかし、青色光照射によるM中間体の減衰の速度は、明順応状態から暗順応状態に移る速度よりも明らかに早く、これはFig. 2 cでM中間体から直接的に基底状態に戻った事を示している。よって、青色光照射はbRの光照射固体NMR測定における暗順応時間の短縮に繋がると考えられる。

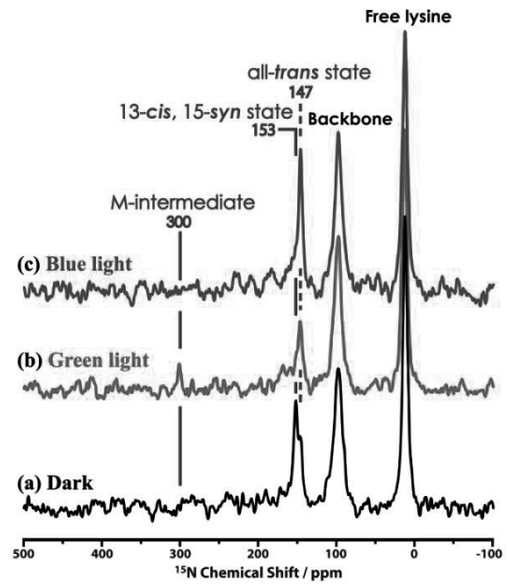


Fig. 2 ^{15}N CP-MAS NMR spectrum

以上から、In-situ光照射固体NMRによってD96N-bRのM中間体を捕捉できることが証明された。現在、M中間体におけるタンパク質構造変化の解明に取り組んでいる。

P77

固体NMRにおけるタンパク質連鎖帰属へのGFT NMR法の応用

○田巻初[1]，江川文子[2]，神谷昌克[1]，菊川峰志[1]，相沢智康[1]，河野敬一[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

Application of GFT-NMR for sequential assignment of proteins in solid state

○Hajime Tamaki[1], Ayako Egawa[2], Masakatsu Kamiya[1], Takashi Kikukawa[1], Tomoyasu Aizawa[1], Keiichi Kawano[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, Suita, Japan.

Solid-state NMR provides the way to obtain structural and dynamics information for insoluble proteins, such as membrane proteins and amyloid fibrils. Nevertheless, sequential assignments are generally difficult for solid-state NMR due to signal overlap. High dimensional measurement is one of the promising approaches for this problem. However, the measurement time increases exponentially with increase in the number of dimensions. We applied GFT-NMR, which is one of fast data acquisition techniques, to measure protein in solid-phase and developed computer aided analytical plug-ins for Sparky software.

〔緒言〕

固体NMR法は、膜タンパク質やアミロイド繊維など不溶性タンパク質の構造やダイナミクスを原子分解能で解析可能な手法である。しかし、現在の計測技術では信号の線幅が広く、従来の帰属手法だけでは熟練者であっても帰属が難しく解析のボトルネックの一つとなっている。このような場合、多次元測定は極めて強力である。しかし、次元が増えるごとに、測定時間は指数関数的に増大してしまうため、高速サンプリング技術の利用は不可欠である。その技術の一つであるG-matrix Fourier Transformation(GFT)-NMRは、いくつかの間接展開軸のディレイを同時にインクリメントすることによって、情報を維持したままサンプリング時間を通常の手法と比べて10倍以上短縮することができる[1]。

GFT-NMRは溶液NMR法を用いたタンパク質の解析において、構造ゲノミクスなどハイスループットな解析が要求される研究に用いられている。また、2010年にはFranksらによって、固体NMR法においても有用であることが報告された[2]。

我々は固体NMR法においてGFT-NMRを利用することによって、高速でより高精度な連鎖帰属法の開発を進めている。GFT-NMRでは、一回の測定から複数のサブスペクトルが得られる。帰属の際には、それぞれのサブスペクトルのピークを対応づける必要があるため、従来の帰属手法に増してコンピュータに支援された解析が望ましい。

GFT NMR, 多次元相関測定

○たまきはじめ, えがわあやこ, かみやまさかつ, きくかわたかし, あいざわともやす, かわのけいいち, ふじわらとしみち, でむらまこと

そこで我々は、帰属ソフトSparkyにその作業を支援する解析プラグインを開発した。本発表ではスペクトルシミュレーションのデータをもとに開発したプラグインによる解析結果を報告する。

〔方法〕

固体NMRスペクトルをシミュレーションによって作成した。パルスシーケンスは(4,3)D-CANCOCX、(4,3)D-CONCACXを想定し、Zhouらによって帰属されたGB1の化学シフト[3]を用いて、交差ピークをプロットした。外部磁場は600MHz、ピーク線幅は^{13}C、^{15}Nどちらも0.5ppmとした。また間接軸のスペクトル幅は^{13}C、^{15}Nそれぞれ25kHz、12.5kHz、間接軸のポイント数は全ての軸において64ポイントとした。これらの設定値は、FID一本あたり、積算が8回程度の場合、1回の測定につき１週間程度となることを想定した。

解析は帰属ソフトSparkyでおこなった。サブスペクトル間のピーク対応づけ等の処理をおこなうSparky拡張プラグインをPython-TkInterを用いて開発した。

〔結果・考察〕

開発した Sparky 拡張プラグインを用いることにより、(4,3)D-CANCOCX のサブスペクトルのピーク対応づけを半自動でおこなうことに成功した。GFT-NMR を導入して削減できる時間と解析ステップ増加による帰属作業時間の増加については、前者の方が圧倒的に大きいため、ハイスループット解析の実現が期待される。

また、Hu らが開発した自動帰属ソフト MCASSIGN2[4] と Sparky を連携させるための拡張プラグインを開発しており、GFT-NMR と半自動解析によって、従来の測定法と手動での解析と比べて短時間での解析が可能となることが予想される。実際の同位体ラベルタンパク質の多次元固体 NMR 測定・解析への適用結果も報告予定である。

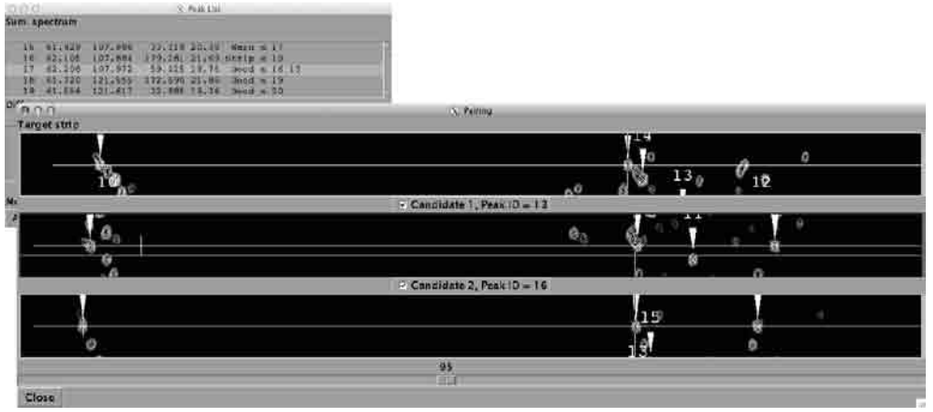


Figure 1: Peak pairing tool for GFT-NMR on Sparky

〔参考文献〕

[1]Kim, *et al.*, J. Am. Chem. Soc., 2003, 125, 1385-1393
[2]Franks, *et al.*, J. Biomol. NMR., 2010, 48, 213-223.
[3]Zhou, *et al.*, Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 2007, 46, 8380–8383.
[4]Hu, et al., J. Biomol. NMR., 2011, 50, 267–276.

P78

Pradimicin A とマンノースとの結合様式の固体 NMR による精密解析

○土井 崇嗣[1],中川 優[2],伊藤 幸成[2,3],五十嵐 康弘[4],竹腰 清乃理[1]
[1] 京都大学大学院・理学研究科　[2] 理化学研究所・基幹研究所
[3] JST・ERATO　[4] 富山県立大学・生物工学科

Solid-State NMR Analysis of the Binding Mode of Pradimicin A with Mannose

○Takashi Doi[1], Yu Nakagawa[2], Yukishige Ito[2,3], Yasuhiro Igarashi[4], K. Takegoshi[1]
[1]*Graduate School of Science, Kyoto University*
[2]*Synthetic Cellular Chemistry Laboratory, RIKEN Advanced Science Institute*
[3]*Japan Science and Technology, ERATO, Ito Glycotrilogy Project*
[4]*Biotechnology Research Center, Toyama Prefectural University*

Pradimicin A (PRM-A) is a natural antibiotic, which specifically binds D-mannopyranoside (Man) in the presence of Ca^{2+} ion to form the aggregate of the ternary complex. We analyzed the aggregate by solid-state NMR to examine the molecular interaction of PRM-A with Ca^{2+} ion and Man. We have already reported that 2D dipolar-assisted rotational resonance (DARR) using biosynthetically ^{13}C-enriched PRM-A and uniformly ^{13}C-enriched Man have revealed that PRM-A binds Man in a Ca^{2+}-mediated manner through its carboxylate group.

In the present work, the aggregate using individually ^{13}C-enriched Man instead of uniformly ^{13}C-enriched Man has been analyzed by solid-state NMR and has brought new information about the binding mode of Pradimicin A with Man.

Pradimicin A（PRM-A; Fig. 1B）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; Fig. 1A）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を示す[3]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。しかし、PRM-A は Ca^{2+}及び Man 存在下で高い凝集性を示し、そのうえ溶液中では Ca^{2+}および Man と複数の複合体を形成することから、X 線結晶構造解析や溶液 NMR 法による解析は難しい。そこで我々は固体 NMR 法を用いて PRM-A の Man 認識機構の解析を行った。

これまでに我々は様々な部位を ^{13}C 標識した PRM-A およびすべての炭素を ^{13}C 標識した Man を用いて複合体を調製し、固体 NMR による測定を行った。その結果、PRM-A が Ala 部分で Ca^{2+} を介して Man と結合すること、また Ala 部分から ABC 環に渡る領域が Man 結合部位であることを初めて明らかにした[4]。しかしながら、Man の 1 – 6 位と PRM-A の各部位との詳細な原子間距離情報が得られていないために、

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、いとうゆきしげ、いがらしやすひろ、たけごしきよのり

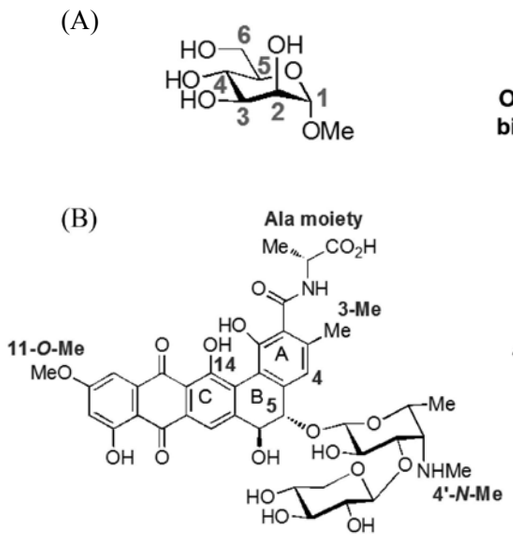


Fig. 1　(A) D-mannopyranoside (Man)
(B) Pradimicin A (PRM-A)

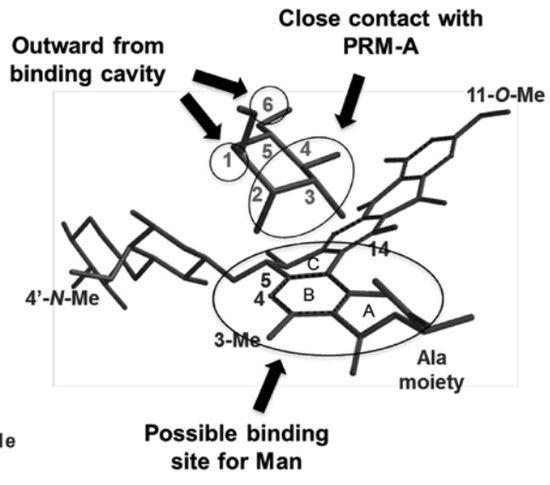


Fig. 2　Possible Man binding conformation of PRM-A. A cavity consisting of the D-Ala moiety and ABC rings is a possible Man binding site.

PRM-A と Man の結合様式を解明するには至っていない。

そこで本研究では、複合体中における PRM-A と Man の原子間距離情報を得るために、PRM-A の各種 ^{13}C 標識体と Man の各炭素を個別に ^{13}C 標識したものを用いて複合体を調製し、two-dimensional dipolar assisted rotational resonance (2D DARR) 解析を行った。2D DARR は、約 6 Å 以内の距離にある ^{13}C-^{13}C の双極子相互作用をクロスピークとして検出する固体 NMR の方法論である[5]。その結果、Man はその 3 位の炭素が PRM-A と最も近接し、次いで 2 位と 4 位の炭素が近接していることが明らかとなった。これらの結果をもとに、考え得る PRM-A と Man の結合様式をモデル化したものを、Fig. 2 に示す。

今後は Man の単糖だけでなく、二糖や多糖を用いた複合体を調製し、固体 NMR 測定を行う予定である。これによって、菌表面のマンナン（Man が枝分かれしながら伸張した糖鎖）に対して PRM-A がどのように結合するかを解明することができると考えられ、創薬化学および糖鎖科学の発展に寄与することができると考えられる。

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] K. Takegoshi, S. Nakamura, T. Terao, *Chem. Phys. Lett.* **2001**, *344*, 631-637; b) K. Takegoshi, S. Nakamura, T. Tamao, *J. Chem. Phys*. **2003**, *118*, 2325-2341.

P79

固体NMRを用いた温度および圧力に対するバクテリオロドプシンの構造変化の解析

○川村 出[1]，堀籠 美也子[1]，西川 大英[1]，田島 可奈[1]，沖津 貴志[2]，和田 昭盛[2]，辻 暁[3]，岩佐 達郎[4]，内藤 晶[1]
[1]横浜国立大学大学院・工学府
[2]兵庫県立大学大学院・生命理学研究科

Temperature and pressure induced structural changes in Bacteriorhodopsin as studied by solid-state NMR

○Izuru Kawamura[1], Miyako Horigome[1], Hirohide Nishikawa[1], Kana Tajima[1], Takashi Okitsu[2], Akimori Wada[2], Satoru Tuzi[3], Tatsuo Iwasa[4], Akira Naito[1]
[1]*Graduate School of Engineering, Yokohama National University, Japan*
[2]*Department of Organic Chemistry for Life Science, Kobe Pharmaceutical University, Japan.*
[3]*Department of Life Science, University of Hyogo, Japan.*
[4]*Muroran Institute Technology, Japan.*

In the dark-adapted Bacteriorhodopsin (BR), the retinal configuration coexists as a mixture of all-*trans* and 13-*cis*, 15-*syn* states with the isomeric ratio close to 1. In this study, thermal and pressure effects on structure of BR were studied by solid-state NMR experiments. The ratio of relative signal intensity of two major peaks of [1-^{13}C]Tyr-BR corresponding to two retinal states at 213K obviously increased compared with that at room temperature. In contrast, the relative signal intensity of [20-^{13}C]retinal-BR did not change significantly at lower temperature. This result indicated that structural change from disorder to α-helix without isomerization of retinal at lower temperature. We applied pressure to BR using fast sample spinning in NMR. The signal of Tyr185 corresponding to 13-*cis*, 15-*syn* retinal was also increased with isomerization to 13-*cis* retinal state.

【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して、光駆動型プロトンポンプ活性を有する膜タンパク質である。発色団であるレチナールの光異性化によって細胞内側から外側へプロトンが輸送される。通常、暗順応状態ではAll-*trans*型と13-*cis*, 15-*syn*型のレチナールがおよそ1:1の割合で存在することがわかっている。また、明順応状態ではAll-*trans*型のみ存在し、圧力をかけると13-*cis*型の割合が増加することがわかっている。これまでに[1-^{13}C]Tyr標識BRのNMR信号を観測し、REDOR filter法などによって、All-*trans*型と13-*cis*型レチナールにそれぞれ応答しているTyr残基を同時に観測し、特定のTyr残基がレチナールの配座に対応していることがわかった[1]。本研究では熱および圧力によって起きるBRの構造変化について固体NMRによって調べ、レチナールとタンパク質間の相互作用について理解することを目的としている。

固体NMR、膜タンパク質、圧力

○かわむらいずる，ほりごめみやこ、にしかわひろひで、たじまかな、おきつたかし、わだあきもり、つじさとる，いわさたつお、ないとうあきら

【実験方法】

[1-^{13}C]Tyrおよび[15, 20-^{13}C]レチナール標識BRはレチナール欠損-高度好塩菌株によって発現させた。また[3-^{13}C]Ala標識BRは高度好塩菌に発現させて、精製し、紫膜として得た。固体NMR測定はCMX-400 infinity分光器で行い、CP-MAS (Cross Polarization Magic Angle Spinning)法とDD-MAS (Dipolar Decoupling Magic Angle Spinning)法を主に使用した。温度変化の実験は293Kから213Kの間で行い、10°Cごと温度を下げ、それぞれ^{13}C NMRスペクトルを観測した。圧力印加の実験はMASの高速回転を利用し、試料に遠心力を加えた。特に圧力はMASの回転周波数およびローター半径の2乗で効いてくるので、MAS 12 kHzでは60 bar程度の圧力が試料にかかる[2]。

【結果と考察】

これまでに行った帰属から、[1-^{13}C]Tyr標識BRのCP-MAS NMRスペクトルで現れる2本の主要な信号はそれぞれ2つのレチナールに対応しているピークであり、タンパク質の構造が2つ存在していることを示した。176.0 ppmはα-ヘリックス構造 (all-*trans*型)、174.0 ppmはdisorder (13-*cis*, 15-*syn*型)のTyr残基で構成されている。これをもとにNMR信号強度の温度依存性を調べた。その結果、CP-MASで得られるTyrのNMR信号は、低温になるにつれて増加していくが、水の凍結前後(260K)で不連続な増加を示した。また興味深いことにこの温度以下で176.0 ppmの信号強度比が増加し、α-ヘリックス構造の増加が示唆された。一方で、All-*trans*型(13.0 ppm)と13-*cis*型(22.0 ppm)レチナールの信号に関しても化学シフト値で区別して観測できるが、260K以下で相対信号強度に大きな変化はなかった。このため、温度を下げた場合にレチナールの構造変化は起きないが、タンパク質の構造はα-helix構造が増えることが判明した。

次に MAS を利用した圧力印加の実験を行い、[20-^{13}C]レチナールの NMR 信号強度の圧力変化を観測した。高速回転の場合に 13-*cis* 型レチナールの信号強度が増加した。さらに all-*trans* 型と 13-*cis*, 15-*syn* 型レチナールの割合の変化に比べ、[1-^{13}C]Tyr185 における 2 つの状態間の割合[α-helix]/[disorder state]の変化の方が大きいことがわかった。この結果はレチナールとタンパク質の間で、平衡定数の変化の仕方に違いがあることを示唆している。すなわち、レチナールの構造は圧力印加により all-*trans* 型から 13-*cis*, 15-*syn* 型にわずかに変化するが、Tyr 近傍のタンパク質はα-helix から disorder state に大きく変化することがわかった。また、[3-^{13}C]Ala-標識 BR を用いて同様に圧力による信号変化を調べた。その結果、MAS 周波数 10, 12 kHz の DD-MAS による測定で新たに 16.6 ppm に信号が現れた。これはレチナールに近い膜貫通領域の Ala81, 84 に帰属され、圧力によって運動性が大きく増加したことを意味する[3]。これは圧力によって局所的に影響を受ける部分が存在していることを示唆し、圧力による 13-*cis* 型レチナールへの異性化と大きく関連するタンパク質側の変化である。

以上をまとめると、2 つの状態の平衡定数は温度や圧力による外部刺激で変化するが、レチナールとタンパク質側の変化量が 1:1 対応で変化しているのではないとわかった。また MAS の回転による圧力効果でタンパク質の構造変化を観測することができた。

1. I. Kawamura et al. *J. Am. Chem. Soc.* 129, 1016-1017 (2007).
2. I. Kawamura et al. *Photochem. Photobiol.* 83, 346-350 (2007).
3. I. Kawamura et al. *Polym. J.* 44, 868-875 (2012).

P80

固体NMRを用いたインドメタシンーニコチンアミド共結晶における分子間水素結合の同定

○丸吉京介[1], Dinu Iuga[2], Oleg N. Antzutkin[2, 3], Sitaram P. Velaga[4], and Steven P. Brown[2]

[1]第一三共株式会社・分析評価研究所、[2]ウォーリック大学・物理学科、[3]ルーレオ工科大学・化学科、[4]ルーレオ工科大学・保健科学科

Identifying the mode of intermolecular hydrogen-bonding in an indomethacin-nicotinamide cocrystal by multinuclear solid-state NMR spectroscopy

○Keisuke Maruyoshi[1], Dinu Iuga[2], Oleg N. Antzutkin[2, 3], Sitaram P. Velaga[4], and Steven P. Brown[2]

[1]Analytical & Quality Evaluation Research Laboratories, Daiichi Sankyo Co., Ltd., Hiratsuka, Japan. [2]Department of Physics, University of Warwick, Coventry, U.K. [3]Chemistry of Interfaces, Luleå University of Technology, Luleå, Sweden. [4]Department of Health Science, Luleå University of Technology, Luleå, Sweden.

Multinuclear solid-state NMR spectra, ^{1}H DQ, ^{14}N-^{1}H and ^{13}C-^{1}H correlation, recorded at natural isotopic abundance unambiguously identify specific intermolecular hydrogen-bonding arrangements in the solid-state structure of an indomethacin-nicotinamide cocrystal.

Cocrystal of active pharmaceutical ingredients (APIs) have become popular in pharmaceutical industries for improving the physico-chemical properties of APIs. For such cocrystals, it is important to prove an intimate molecular proximity of the constituents of the cocrystal, and identify the intermolecular interactions in the solid state. In general, this is achieved by obtaining a three-dimensional structure from diffraction methods. However, it may be impossible to prepare a suitable single crystal or to obtain a high quality powder X-ray diffraction (XRD) pattern. We demonstrate the power of advanced multinuclear two-dimensional solid-state magic-angle spinning (MAS) NMR experiments for identifying intermolecular interaction in an indomethacin-nicotinamide (IND-NIC) cocrystal, for which a three-dimensional structure has not been determined. Four possible arrangements of intermolecular hydrogen-bonding in the IND-NIC cocrystal are shown by Figure 1(a).

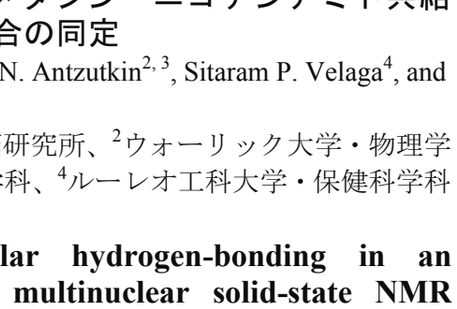


Figure 1(b) shows a ^{1}H double-quantum (DQ) MAS NMR spectrum of the IND-NIC cocrsyal, recorded using one rotor period of BABA recoupling [1]. ^{1}H DQ MAS NMR spectra probe DQ coherences between pairs of through-space dipolar coupled protons corresponding to a close (as a rule, less than 3.5 Å) H-H distance [2]. No COOH auto peak is observed at 32.6 (= 16.3 + 16.3) ppm in the spectrum, thus ruling out arrangement I. Of particular interest is the highlighted pair of DQ peaks at 26.1 ppm between the COOH proton at 16.3 ppm and a proton at 9.8 ppm. A major difficulty is that the lower-ppm resonance at 9.8 ppm could be assigned to a NH_2 or an aromatic CH proton, and therefore arrangements III and IV cannot be distinguished on the basis of the ^{1}H DQ MAS spectrum alone.

On the day, we present WHICH mode of intermolecular hydrogen-bonding in Figure 1(a) is correct answer, and HOW it was identified.

Multinuclear Solid-State NMR, API, Cocrystal

○まるよしけいすけ，ディーノイウガ、オレグアンツーキン，シタラムヴェラーガ，スティーブンブラウン

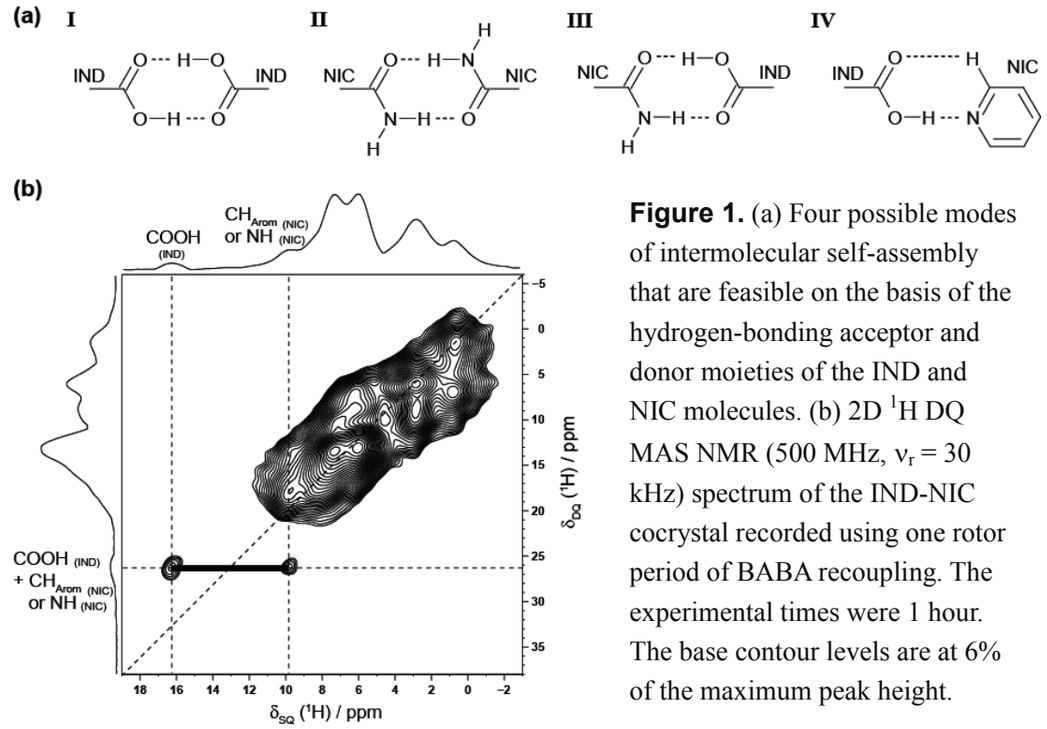


Figure 1. (a) Four possible modes of intermolecular self-assembly that are feasible on the basis of the hydrogen-bonding acceptor and donor moieties of the IND and NIC molecules. (b) 2D ^{1}H DQ MAS NMR (500 MHz, ν_r = 30 kHz) spectrum of the IND-NIC cocrystal recorded using one rotor period of BABA recoupling. The experimental times were 1 hour. The base contour levels are at 6% of the maximum peak height.

Acknowledgement

The UK 850 MHz solid-state NMR Facility used in this research was funded by EPSRC and BBSRC, as well as the University of Warwick including via part funding through Birmingham Science City Advanced Materials Projects 1 and 2 supported by Advantage West Midlands (AWM) and the European Regional Development Fund (ERDF). The 500 MHz spectrometer used in this research was obtained through the Science City Hydrogen Energy project, with support from AWM.

References

[1] W. Sommer, J. Gottwald, D. E. Demco, and H. W. Spiess, *J. Magn. Reson. Ser. A*, 1995, **113**, 131.

[2] S. P. Brown, *Solid State Nucl. Magn. Reson.*, 2012, **41**, 1.

P81

Cryocoil MAS プローブによる固体有機物の^{33}S NMR 測定に向けて

○松尾真嗣[1], 水野敬[2], 野田泰斗[1], 増田裕一[3],竹腰清乃理[1]
[1]京都大学大学院理学研究科
[2]株式会社 JEOL RESONANCE
[3]東北大学大学院薬学研究科

Toward ^{33}S MAS NMR of organic materials by using a cryocoil MAS probe

○Shinji Matsuo[1], Takashi Mizuno[2], Yasuto Noda[1], Yuichi Masuda[3], and K.Takegoshi[1]
[1]Graduate school of Science, Kyoto University
[2]JEOL RESONANCE Inc.
[3]Graduate school of Pharmaceutical Science, Tohoku University

Sulfur is included in a wide variety of organic and inorganic materials, and it plays an important role. However, there are a few solid-state ^{33}S NMR studies because of the demerits such as small gyromagnetic ratio, low natural abundance (0.76%), and broadening due to quadrupolar interactions. Now, we report sensitivity enhancement of a ^{33}S NMR signal by using a cryocoil MAS probe which can improve the sensitivity by 3 to 4 times compared to the conventional MAS probes and ^{33}S MAS NMR of L-Methionine (labeled ^{33}S) by using the conventional MAS probe.

【はじめに】

硫黄は多くの無機物・有機物に含まれており、^{33}S-NMR による構造情報の取得が希求されている。しかし、天然存在比の低さ (0.76%)、低磁気回転比($\gamma^{33}_S/\gamma^{1}_H$=0.7676)、四極子核 (I=3/2)の特性によって一般的に固体の ^{33}S MAS-NMR は検出感度が低く、現在までに ^{33}S MAS-NMR を用いた研究は主に無機物の対称性のよい試料に限定されたままとなっている[1]。本研究では、有機物、特に生体高分子の ^{33}S MAS-NMR を効率よく行うことを目的として、自作 Cryocoil MAS プローブ (試料温度を室温に保ったまま、検出系を極低温下に冷却することによって感度を向上させるプローブ[2])の適用を考えた。今回はその感度向上率(室温時の S/N を 1 として検出系を極低温に冷却したときの S/N)について定量的に検証を行い、固体有機物 (L-methionine)の ^{33}S MAS NMR にむけての予備実験を行った。

【Cryocoil MAS プローブによる ^{33}S NMR の感度向上率の検証】

一般に NMR スペクトルの S/N と検出系のパラメータに対して以下の関係[2]が成り立つ。

$$\frac{V_S}{V_N} \propto \sqrt{\frac{Q}{T_C + T_A + T_D}} \qquad (1)$$

(ただし、V_S :シグナル強度、V_N :ノイズ強度、T_C :コイル温度、T_A :プリアンプ付加雑音温度、T_D :デュプレクサー付加雑音温度)

---

cryocoil, ^{33}S MAS NMR, 感度向上

○まつおしんじ　みずのたかし　のだやすと　ますだゆういち　たけごしきよのり

式(1)の通りに検出系が振る舞っていることを確認するため、自作 Cryocoil MAS プローブ(試料管外径 5 mm、コイル内径 8 mm)による ^{33}S NMR の感度向上率の検証を行った。14 T WB-SCM で CaS (天然存在比)の ^{33}S MAS-NMR スペクトルを取得し、検出系が室温下の時と極低温下の時とを同一積算回数で比較した (Figure 1)。室温時と極低温時における個々の指標値を別途測定した結果を Table 1 にまとめる。これらから式(1)に基づいて計算したところ感度向上率の理論値は 4.75 倍となった。NMR スペクトルから得られる実験値(4.80～5.45 倍)はこれに近い。同様に NMR スペクトルから得られる雑音強度の減少値 (0.46 倍)は理論値 ($\sqrt{T_C + T_A + T_D}$ の比:0.45)に良く対応しており、自作 Cryocoil MAS プローブは十分に性能を発揮していると考えられる。

Table 1. Observed performances of Cryocoil MAS probe.

	Room temperature	Cryo temperature
Coil temperature (K) [i]	293	10
Coil Q factor [ii]	73	310
PreAmp noise (K) [iii]	84	30
Duplexer noise (K) [ii]	45	39
S/N (theoretical value)	1	4.75
S/N(experiment value)	1	4.80～5.45

Measured using (ⅰ) a cernox temperature sesor (Lakeshore), (ⅱ) E5061A network analyzer (Agilent), (ⅲ) N8973A noise figure analyzer (Agilent),

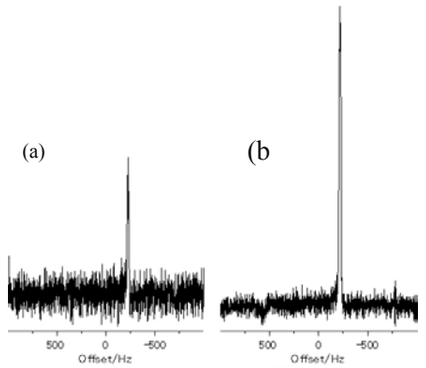


Figure 1 The comparison of ^{33}S NMR spectra observed for 100 scans at 46.066 MHz for carrier frequency by our home-built Cryocoil MAS probe (a) room temperature, (b)cryo temperature.

【L-methionine の^{33}S MAS NMR】

固体有機物試料として ^{33}S で 100 %ラベルされた L-methionine を用いた。L-methionine は未知の測定試料であるため予備実験として 7 T WB-SCM で Varian の三重共鳴プローブ (試料内径 5 φ)を用いて ^{1}H-^{33}S Ramp CPMAS 法によって測定したところ -1000 ppm～1500 ppm の間に分布した線形を確認した(Figure 2)。しかし、広い線幅(60 kHz)のためにシグナルが一様に励起されていないと考えられるので、この方法は化学シフト及び四極子結合定数などの情報を得るのに十分ではない。今後、前記の cryocoil MAS プローブを用い、^{33}S NMR 単核の観測を試みる。

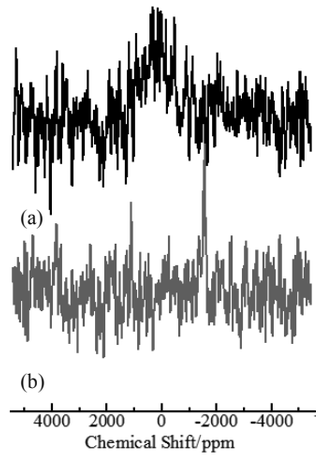


Figure 2 (a)^{33}S CP MAS NMR spectra of L-methionine obtained from 30000scans (experimental time 25 hours) at 22.972 MHz for a carrier frequency, 10 kHz MAS speed. (b)back ground.

○謝辞

本研究は JST 研究成果展開事業【先端計測分析技術・機器開発プログラム】プロトタイプ実証実用化タイプ (平成 22 年度採択) の支援により行われた。

○参考文献

[1]R.Musio, Annual reports on NMR Spectroscopy, Vol 68, p3.
[2]T.Mizuno et al., Rev. Sci. Instrum .80（2009）124702.

P82 非晶化セルロースのCP/MAS ^{13}C NMR解析

○高橋 塁[1]，田中 篤史[1]，五十嵐 一暁[2]，堀井 文敬[3]
[1]花王（株）解析科学研究所、
[2]花王（株）エコイノベーション研究所
[3]福井大・遠赤外領域開発研究センター

CP/MAS ^{13}C NMR analysis of non-crystallized cellulose

○Rui Takahashi[1], Atsushi Tanaka[1], Kazuaki Igarashi[2], Fumitaka Horii[3]
[1] Analytical Science Research Labs., Kao Corporation, Wakayama, Japan
[2] Eco-Innovation Research Laboratories, Kao Corporation, Wakayama, Japan
[3] Research Center for Development of Far-Infrared Region, University of Fukui, Fukui Japan

The structure of non-crystallized celluloses that were prepared by precipitation from LiCl/DMAc solution of Avicel into several precipitants was studied by CP/MAS ^{13}C NMR. Each CP/MAS ^{13}C NMR spectrum was quantitatively resolved into several Voigt components. The integrated intensity ratio of the C4 and C1 lines was found to decrease with increasing fraction of the *gg* conformation for the C6 line. This suggests that the C4 contribution ascribed to the *gg* conformation for the side group is superposed on the upfield C2, 3, 5 lines in good agreement with the theoretical calculations. On the basis of these results, the main- and side-chain conformations were evaluated in relation to effects of precipitants employed.

［緒言］

セルロースはグルコースが(1→4)-*β*-グリコシド結合で結合したホモポリマーであり、地球上に大量に存在することから、循環型社会へ向けた再生可能資源として有効利用が期待されている。セルロースを利用するためには、その固体構造を理解することが重要であり、特に、セルロースの非晶構造を解明することで、機能化材料の機構解明や、天然セルロース中の乱れた構造の理解へ繋がると期待されるが、X線回折等による詳細な解析は行われていない。一方、固体高分解能NMRによるセルロースの結晶状態の構造解析はかなり進展しているが、非晶状態については信頼性の高い解析法はまだ開発途上である。そこで、本研究では、セルロース溶液を、様々な有機溶媒へ滴下・沈殿させることで、状態の異なる非晶化セルロース試料を作製し、各試料についてCP/MAS ^{13}C NMRスペクトルのC4およびC6共鳴線における側鎖コンホメーション（*gt*および*gg*）の寄与を解明し、化学シフト計算の結果[1)]と一致することを明らかにする。また、この結果に基づき、主鎖および側鎖のコンホメーションおよびその分布を解析し、沈殿剤が主鎖および側鎖のコンホメーションおよびその分布に及ぼす影響について検討する。

non-crystallized cellulose, conformation, CP/MAS ^{13}C NMR,

○たかはし るい，たなか あつし，いがらし かずあき，ほりい ふみたか

［実験］

8%LiCl/DMAc溶媒で、Avicel (PH-101, Sigma-Aldrich)の0.8%溶液を作製し、H_2O、MeOH、EtOH、IPrOH、acetone、THFに滴下し、セルロース非晶化物を得た。また、C4及びC6をそれぞれ^{13}Cエンリッチした glucoseを等量用いた酢酸菌培養によりバクテリアセルロースを作製し、上記と同様の方法で非晶化物を得た。これらを室温で減圧乾燥後、110°Cで3時間減圧乾燥した。CP/MAS ^{13}C NMR測定は、JEOL ECA-500分光計により、室温、MAS 8 kHz、繰り返し時間5sで行った。

［結果と考察］

セルロース各試料について、CP/MAS ^{13}C NMRスペクトルの共鳴線強度の定量性を調べるため、CPコンタクトタイム（t_{cp}）依存性を詳細に検討した。Fig. 1には、1例として、EtOH沈殿物（S_{EtOH}）の各ピーク強度の t_{cp} 依存性示す。t_{cp}=2 ms以上ではexponential減衰しており、その傾きが各炭素でほぼ一致していた(Fig.1)。よって、この領域では各炭素の$T_{1\rho H}$がほぼ等しく、スピン拡散により^{1}Hスピン系が均一化していることが分かった。そこで、t_{cp}=2 msと設定し、以下検討した。各非晶化試料のCP/MAS ^{13}C NMRスペクトルについてVoigt関数を用いて波形解析を行った結果 (Fig. 2)、C1共鳴線の積分強度I_{C1}、C4とC2,3,5共鳴線の合計の積分強度(I_{C4}+$I_{C2,3,5}$)、及びC6共鳴線のI_{C6}の比が、ほぼ組成通り1:4:1であることを確認した。また、C6共鳴線は63 ppmと60-61 ppm にピークをもつ2成分（C6$_{gt}$, C6$_{gg}$）に分離でき、それぞれ側鎖が*gt*および*gg*コンホメーションもつ成分[1,2)]と帰属できた。さらに、 (I_{C1}-I_{C4})/I_{C1}を求め、C6共鳴線の波形解析から求めた*gg*分率に対してプロットしたところ、*gg*分率の増加に伴い(I_{C1}-I_{C4})/I_{C1}が増大することが明らかとなった。このことは、Fig.2中の斜線で示したC4共鳴線は*gt*に対応する成分（C4$_{gt}$）であり、*gg*に対応するC4共鳴線（C4$_{gg}$）はC2,3,5共鳴線に重なっていることを示し、量子化学計算の結果[1)]と一致する。また、各試料のC6$_{gt}$共鳴線の線幅、化学シフト値は沈殿剤の種類に依存せずほぼ同一であるのに対し、C4$_{gt}$共鳴線のそれらは各沈殿剤により異なっていることから(Fig.3)、主鎖のねじれ角ϕ, ψ及びそれらの分布に違いが存在すると考えられる。当日は、C4およびC6を^{13}C-エンリッチしたバクテリアセルロースの非晶化試料ついても、同様な検討を行った結果を発表する。

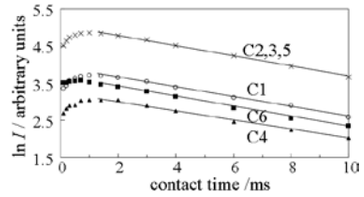


Fig.1 Semilog plots of peak intensities against CP contact time for cellulose precipitate into EtOH.

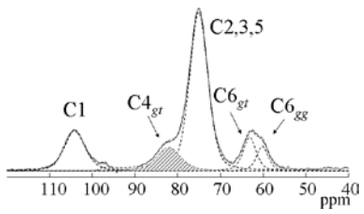


Fig.2 Line-shape analysis of the CP/MAS ^{13}C NMR spectrum for cellulose precipitate (S_{THF}) into THF.

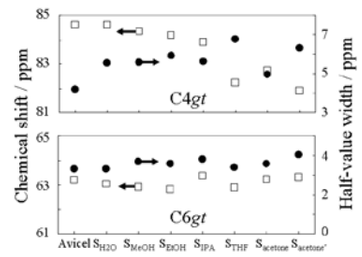


Fig.3 Chemical shifts and half-value widths of the C4$_{gt}$ and C6$_{gt}$ lines for different cellulose precipitates.

1) Suzuki, S., Horii, F., Kurosu, H., *J. Mol. Struct.*, **2009**, *921*, 219.
2) Horii, F., Hirai, A., Kitamaru, R., *Polym. Bull.* **1983**, *10*, 357.

P83

MQMAS法による高分子–Al錯体の研究

○平沖敏文，藤江正樹
北大院工

MQMAS NMR studies on polymer complexes with Al ion

○Toshifumi Hiraoki, and Masaki Fujie
Graduate school of Engineering, Hokkaido University, Sapporo.

We have studied polypeptide-metal ion complexes in solid state by NMR for the possibilities to polymer devices of stereo-regular polymer-metal ion complexes. Acidic poly(α-amino acid)s, poly(glutamic acid) and poly(aspartic acid), are known to form the complexes with various metal ions in solution, while their conformations in solid state have been revealed to be α-helices by our ^{13}C CPMAS NMR studies. In this work local structures of coordination sites for various acidic polymer-complexes with Al ion were characterized by ^{27}Al MQMAS NMR.

ポリαグルタミン酸(PGA)とポリαアスパラギン酸(PAA)は様々な条件下で多様な二次構造（α-helix, β-sheet, coil）をとることが知られている。両者は多くの金属イオンと錯形成し、同時に構造変化が生じることが溶液中での種々の研究から明らかにされている。固体状態では錯体はα-helix構造をとり、ヘリックス含量は金属イオン種に依存することを^{13}C CPMAS NMRより示した(Fig. 1)。[1] 金属イオン結合部位は側鎖カルボキシル基で、錯体が規則構造をとる場合には、高分子表面で金属イオンがナノオーダーで規則的に配列すると推定される。

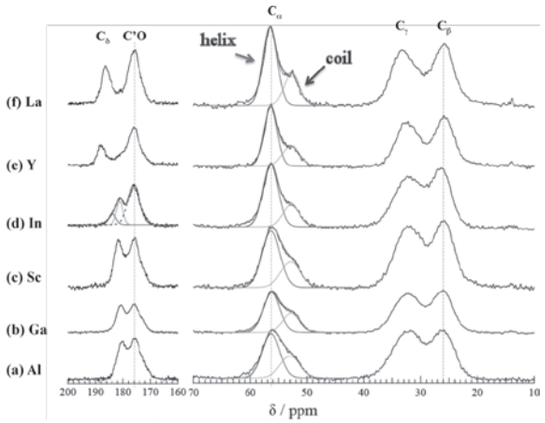


Fig. 1 ^{13}C CPMAS NMR spectra of PGA-trivalent meta ion complexes.

本研究では、PGAとPAAとのAl錯体の^{27}Al MQMAS NMR測定を行い、Alイオンの局所構造を調べた。比較のために、コンフォメーションがdisorderの様々な酸性高分子とAlイオンとの錯体を同様にして調べ、AlのNMRパラメーターを比較検討した。

実験

試料はPGAとPAAに加えて、ポリ(γ,Lグルタミン酸)（LγPGA）、ポリ(γ,DLグルタミン酸)（DLγPGA）、ポリ(メチルメタアクリル酸)（aPMA, isoPMA, synPMA）、ポリアクリル酸（PA）である。錯体試料は各水溶液0.1w/w%にAlミョウバン水溶液を加えて調整した。Al濃度はICPにより決定し、ほぼ化学量論的に高分子に結合していることが分かった。NMR測定は７Tと21.6Tで行った。^{27}Al の化学シフト基準は1M $AlCl_3$水溶液(-0.10ppm)を用いた。MQMAS測定はzフィルター付3Q, 5Q系列を用いた。[2]

高分子-Al錯体、MQMAS、局所構造

ひらおきとしふみ，ふじえまさき

結果と考察

Fig.1にPGAと三価金属イオン錯体の^{13}C CPMAS NMRスペクトルを示す。主鎖と側鎖C$_β$の化学シフト値からいずれの錯体も主鎖はα-helixであることを示している。C$_α$シグナルの肩にはコイル成分も存在し、Al錯体ではこの含量は約35％であった。この結果は、Al^{3+}の結合には三ヶのカルボキシル基が関与するので、錯形成による立体障害のためα-helixが部分的に維持できないことを示唆している。カルボキシル炭素C$_δ$の化学シフト値はイオン半径に依存して変化した。

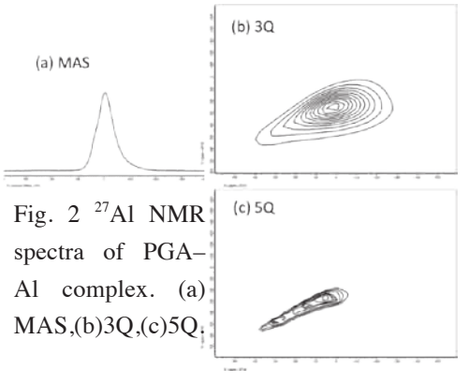


Fig. 2 ^{27}Al NMR spectra of PGA–Al complex. (a) MAS,(b)3Q,(c)5Q

PGA-Al錯体の^{27}Al MAS NMRスペクトルは化学シフト値δ=-0.36ppm、半値幅1.73kHzの1本のシグナルが観測された。シグナルはわずかに非対称性を示し、これが複数の構造によるのもか二次の四極子相互作用によるものかは不明確である（Fig.2(a)）。3Q MAS NMRスペクトルをFig.2(b)に示す。δ_{mas}=0.03ppm、δ_{iso}=1.59ppmに細長い楕円状の１ヶのシグナルが観測された。これらの値から、化学シフト値δ_{cs}=1.59ppmと四極子積P_q=3.86MHzが得られた。[3] 高次コヒーレンスによる高分解能化が期待できる5QMASスペクトルには（Fig.2(c)）、δ_{mas}=0.53ppm・δ_{iso}=2.66ppmに加えて左下に裾を引いて５ヶのシグナルが観測された。主シグナルからはδ_{cs}=1.87ppmとP_q=3.59MHzが計算され、裾のシグナル群からはそれぞれδ_{cs}=2.67～4.70ppmとP_q=3.27～3.38MHzの値が得られた。この結果は、錯体構造は一種類ではなく複数の分布した構造からなることを示唆している。

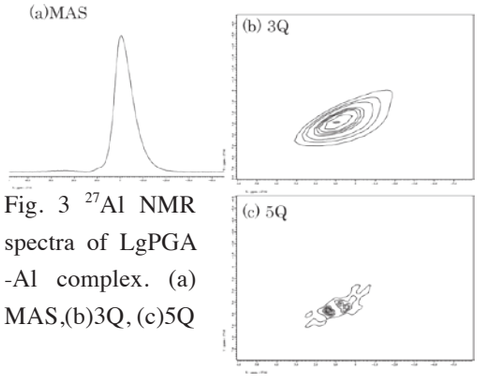


Fig. 3 ^{27}Al NMR spectra of LgPGA -Al complex. (a) MAS,(b)3Q, (c)5Q

PAA-Al錯体の^{27}Al MAS NMRスペクトルはPGA-Alと同様にδ=-0.40ppm、半値幅1.93kHz、わずかに非対称性を示す1本のシグナルが観測された。3Qと5Q MAS NMRスペクトルはPGA-Alとほぼ同様なパターンであった。

LγPGA-Al錯体のスペクトルをFig.3に示す。^{27}Al MAS NMRスペクトルと3Q MAS NMRスペクトルはPGA-AlやPAA-Alと同じパターンであるが、5Q MAS NMRスペクトルは少し異なり、幾つかのピークが混在しており、複数の錯体構造の存在を示唆している。他の試料の結果は発表時に示す予定である。

1) Hiraoki and Fujie, 第48回NMR討論会(2009)
2) J-P. Amoureux, et al.,J. Magn. Reson. A, 123, 116(1996)
3) J-P. Amoureux, et al., Chem. Phys. Lett., 356, 497(2002)

謝辞　本研究の一部は文科省ナノテク総合支援により分子科学研究所超高磁場NMR装置により行われた。LγPGAを提供していただいた高知大・芦内先生に深謝いたします。

P84

固体NMRによるセメント硬化体の化学構造および水和・硬化プロセスの解析

○髙橋貴文[1]、古瀬佑馬[2]、大窪貴洋[2]、金橋康二[1]
[1]新日鐵住金（株）先端技術研究所
[2]千葉大学大学院　工学研究科

Analysis of Chemical Structure, and Hydrating and Hardening Process of Cement Paste Using Solid State NMR

○Takafumi Takahashi[1], Yuma Kose[2], Takahiro Ohkubo[2], Koji Kanehashi[1]
[1]Advanced Technology Research Laboratories, Nippon Steel & Sumitomo Metal Corporation
[2]Graduate School of Engineering, Chiba University

Cement-based cold bond pellet produced by coagulating dusts will be ready for a raw material in blast furnace. Since chemical structure and pore structure drastically change depending on curing time, mechanism of hydration process remains unclear despite of long-term research. In this study, we have applied two approaches to investigate time-dependent changes in chemical structure and pore structure. As a result of ^{27}Al MAS/3QMAS and ^{29}Si MAS NMR, it is found that compression stress is dominated by Al-bearing hydrates (e.g. ettringite) in the early stage of curing (~ 6h), followed by Si-bearing hydrates such as CSH (calcium silicate hydrate) in the longer term. Furthermore, *in situ* ^{1}H NMR relaxation time analysis shows that pore diameter gradually decreases as curing time, and consequently *gel* pore with diameter smaller than 40 nm is formed when CSH-like hydrates are observed in ^{29}Si MAS NMR.

1. 緒言

近年の原料価格高騰を背景に、劣質原料を有効活用する製鉄プロセスが重要となっている。その中で、水和反応を利用した固める技術がキーテクノロジーとなりつつある。その1例として、水和セメントをバインダーとする炭材内装型ペレットがある。これは、ダストや微粉鉄鉱石等の鉄源とコークス粉を近接配置し反応率を高めることによって、高炉の還元材比を低減するもので、大きなコストメリットが期待されている。ペレットの強度発現には、バインダーであるセメントの水和・硬化プロセスが重要な役割を果たす。水和反応の進行とともに内部の空隙構造および化学構造が変化する。強度発現に関わる化学構造や空隙種類を明らかにすることによって、最適な養生条件を見出すことができ、最終的にはセメント使用量削減などの効果も期待できることから、コスト削減に直結する重要な課題である。

ただし、セメントは、エーライト$3CaO \cdot SiO_2(C_3S)$, ビーライト$2CaO \cdot SiO_2(C_2S)$, アルミネート$3CaO \cdot Al_2O_3(C_3A)$、フェライト$4CaO \cdot Al_2O_3 \cdot Fe_2O_3$（$C_4AF$）など複数のクリンカー鉱物から構成され、さらに、水和反応によって幾つかの水和物が加わるため、化学構造を理解することは容易ではない。これまでにもXRD等によりセメント中の化学構造を解析し、硬化プロセスを解析する研究が行われてきた。しかしながら、非晶質な水和物なども存在することから、水和・硬化プロセスには不明な点も多い。そこで、我々は、核種毎の構造情報が得られ、非晶質材料にも有効な固体NMRを用いて、強度発現に寄与する化学構造や空隙構造を明確にし、これらを指標として養生条件の最適化、セメント使用量の削減を目指している。本研究では、^{29}Si, ^{27}Al, ^{1}H多核固体NMRにより化学構造を解析するとともに、*In-situ* ^{1}H NMRの緩和時間分布より空隙構造の発達過程を解析した。更に、構造と圧潰強度との関係を検討し、強度発現メカニズムについて考察した。

固体NMR、セメント、水和・硬化

○たかはしたかふみ、こせゆうま、おおくぼたかひろ、かねはしこうじ

2. 実験

純水と普通ポルトランドセメント(Table 1)を重量比0.4の割合で混合し、1分間混練した後、密閉容器に入れて25°Cで養生した。所定時間（注水後6h, 12h, 24h, 42h, 72h）養生後、セメント硬化体を脱型し、これを減圧下で繰り返しアセトン浸漬した後、40°Cで24h乾燥した。成型体の圧潰強度試験を行った後、破片試料を乳鉢で粉末になるまで粉砕し、NMR測定に供した。

Table 1 Chemical composition of portland cement used in this study.

SiO_2	Al_2O_3	Fe_2O_3	CaO	MgO	Na_2O	K_2O	TiO_2	P_2O_5	MnO	SrO
20.8	5.48	3.07	66.5	1.04	0.21	0.24	0.30	0.26	0.1	0.038

^{27}Al MAS/MQMAS測定には、JEOL ECA700分光計（静磁場16.4*T*）を用いた。また、^{27}Al MQMAS測定には、Fig. 1に示すSoft pulse added mixing (SPAM) 3QMASシーケンス[1]を用いた。^{29}Si MASおよび^{1}H MAS測定には、Agilent Inova 500分光計（静磁場11.7*T*）を用いた。Table 2に、MASスペクトルの測定条件をまとめて示す。

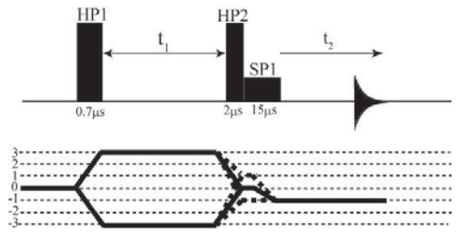


Figure 1. SPAM 3QMAS pulse sequence.
The soft pulse of SP1 was applied with 2.8% of the r.f. field strength for hard pulses.

Table 2 Experimental condition in MAS measurements.

	^{27}Al	^{29}Si	^{1}H
Larmor freqency [MHz]	182.3	99.29	499.86
Rotor diameter [mm]†1	4	3.2	1.2
Spinning rate[kHz]	18	20	58
Pulse width [s]	0.83(π/5)	1.3(π/2)	0.9(π/2)
Recycle delay[s]†2	3	1	5

†1 Zirconia (ZrO_2) rotor

†2 Recycle delay were selected to satisfy full relaxation.

一方、^{1}H NMR 緩和時間測定は、反応を凍結することなく*in situ*で行った。混練後の懸濁試料をNMR試料管に封入し、20分間隔で最長72h後まで観測を行った。測定には、JEOL ECA 600 (14.0*T*)を用いた。緩和時間（T_1）測定法としてInversion Recovery 法を用いた。観測された^{1}H NMR信号について、逆ラプラス変換を用いたCONTIN法[2]により解析し、緩和時間分布を導出した。

3. 結果および考察

3-1. Alの構造変化

水和前および養生時間を変えた際の^{27}Al MASスペクトルをFig. 2に示す。水和前のセメントには、主に4配位Alが含まれる。これらは、C_3A、C_4AFさらにC_3Sに微量に含まれるAlに由来すると考えられる。

水和反応後、養生初期から6配位領域に新たなピークが観測されている。^{27}Al は核スピン*I*=5/2の四極子核であることから、MAS法では二次の核四極子相互作用を平均化できていない。そこで、3QMAS法を用いて高分解能スペクトルを測定し、帰属を行った。その一例として、24h養生

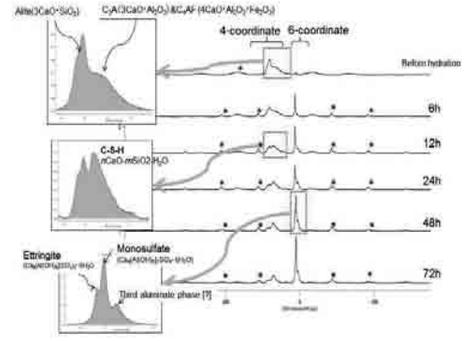


Figure 2 ^{27}Al MAS spectra of cement paste acquired at the spinning frequency of 18kHz.

後の3QMASスペクトルをFig. 3示す。Fig.3(a)より、6配位の領域には、2つのサイトが観測されている。これをMASスペクトルと比較すると、1つのサイトが欠落している。これは、欠落したサイトの四極子相互作用が極めて小さいことに原因があると考えれる。標準試料（エトリンガイト$Ca_6Al_2(OH)_{12}(SO_4)_3・26H_2O$、モノサルフェート$Ca_4[Al(OH)_6]_2SO_4・6H_2O$、ハイドロガーネット$3CaO・Al_2O_3・6H_2O$）のスペクトルと比較した結果、この欠落したサイトはエトリンガイトに帰属された。一方、残りの2つのピークは、6配位領域に観測されるピークのうち、低磁場からモノサルフェート、未同定のThird 6 coordinate Al phase（TAP）に帰属された（Fig. 2a）。

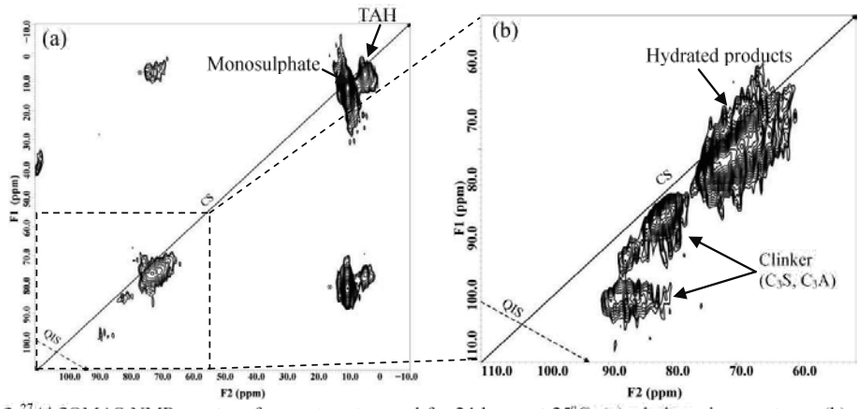


Figure 3 ^{27}Al 3QMAS NMR spectra of cement paste cured for 24 hours at 25°C. (a) whole region spectrum, (b) spectrum focused on the 4-coordinate region. Spectrum (b) was acquired using the rotor synchronized F_1 sweep frequency.

一方、4配位領域には、Fig. 3(b)に示すように、クリンカー由来のサイトがMAS軸上で78～90ppmに観測され、これとは異なる広幅なサイトが60～75ppmに掛けて観測された。後者のサイトは、MASスペクトル上で養生時間とともに増加する傾向を示していることから、水和反応生成物に由来すると考えられる。また、4配位構造を有することから、CSH（calcium silicate hydrate）ゲル生成との関連が強く示唆される。CSHの構造は、Q^1（架橋酸素が1個）およびQ^2（架橋酸素が2個）のSiO_4四面体ネットワークを用いて近似的に表現される。ただし、粘土鉱物に見られるように、四面体SiはAlにより置換される傾向がある。これらを踏まえると、反応に伴い増加する4配位Alは、CSHのネットワーク構造中の四面体Alに相当するのではないかと考えられる。尚、CSHは、非晶質でありXRDでは観測出来ないことから、この結果は固体NMRによってのみ得られる構造情報であると言える。

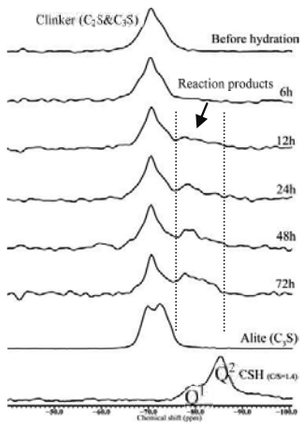


Figure 4 ^{29}Si MAS NMR spectra of cement paste acquired at the spinning frequency of 20 kHz.

3-2. Siの化学構造変化

Fig. 4に養生に伴う^{29}Si MASスペクトルの変化を示す。水和前には約-71ppmを中心としてピークが観測されている。これは、C_3SおよびC_2S中のSiに由来する。水和反応後は、-76～-85ppmにかけて広く分布するピークが観測され、これらは時間とともに増加した。その構造は、化学シフトから考えるとQ^2またはQ^1のネットワーク構造を有すると考えられ、Fig.4からも明らかなように、合成CSHの化学シフト範囲とも概ね一致している。この結果は、Alの構造解析結果とも調和的である。また、セメント硬化体中では、合成CSHに比べQ^2の割合が低いことから理想的なCSHに比べ、ネットワークの発達が弱いと考えられる。

いずれにしても、クリンカー由来のSiと反応生成物由来のSiを凡そ区別して観測できたことは、固体NMRならではの成果である。

3-3. 空隙構造の変化

セメントの水和・硬化過程においては、内部の化学構造の変化に伴い、セメント粒子間の空隙構造が変化し、硬化体に特有の硬化組織を形成すると考えられる。そこで、^{1}H NMRのT_1緩和時間の分布を用いて、微細空隙構造の解析を試みた。Fig. 5にT_1分布の時間変化を示す。混練直後から緩和時間分布が10^{-1}オーダーとなっており、自由水の緩和時間(1s)に比べて大幅に短縮されているように見えるが、これは、セメント中の常磁性イオン（Fe^{3+}）の効果であり、混練直後には自由水に近い運動状態であると考えられる。12h以降では、緩和時間が主に2つのグループに分かれることがわかる。N_2吸着実験の結果も踏まえると、12時間以降観測される10^{-2}～10^{-3}の緩和時間成分は、40nm領域の所謂ゲルポアと考えられ、この相対的な比率は、時間とともに増加する。以上のことより、セメント粒子間の空隙は、0～12hに掛けてμmオーダーの毛細管空隙へと変化し、12h~72hにかけて更に微細なゲル空隙が発達すると考えられる。

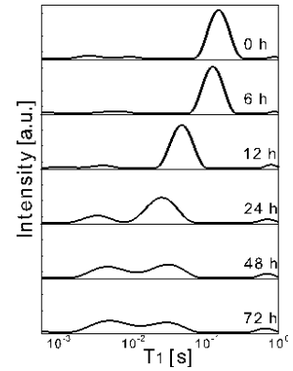


Figure 5 Distribution of ^{1}H spin-lattice relaxation time (T_1) measured by high magnetic field NMR. (Curing time = 0 to 72 hours).

3-4. 圧潰強度発現と化学構造、空隙構造との関係

^{29}Si MAS, ^{27}Al MASスペクトルより、水和物中のAlおよびSiを定量し圧潰強度との関係を検討した。さらに、^{1}H NMRのT_1分布解析から得られた40nm以下のゲルポア比と圧潰強度との関係も検討した(Fig. 6）。その結果、養生6h程度ではゲル空隙は発達していないにも関わらず、強度が発現しており、これはエトリンガイト等のAl水和物の寄与が大きいことを示唆している。その後48hまでは、Al水和物、CSHが増加し、これと平行してゲルポア比も増加している。よって、AlとSi水和物双方が強度発現に関与している。48h以降は、ゲル空隙と水和物中のSiが増加する一方で、水和物中のAl量はほぼ一定となる。よって、長期の強度発現には、ゲルポアを作り出すCSH状のSi水和物が寄与していると推定される。

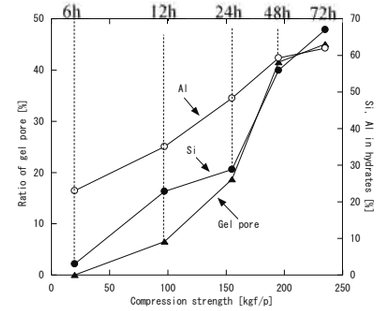


Figure 6 Relationship between compression strength and Si and Al in hydrates, and ratio of gel pore.

【結言】

多核固体NMR法を駆使することによって、セメント硬化体中の化学構造、空隙構造を解析し、水和・硬化プロセスに関する以下の知見を得た。

✓空隙構造に顕著に見られるのは6h以降であり、CSH系水和物の生成に伴い40nm以下の微細ポアが発達すると考えられる。

✓初期（養生6h程度）の圧潰強度発現には、エトリンガイトをはじめAl系水和物の寄与が大きいと考えられる。より長期の強度発現には、CSHをはじめとするSi系水和物の寄与が大きいと考えられる。

これらの知見は、セメントをバインダーとするペレット製造時の強度発現の促進、養生条件の最適化等、プロセス設計の指針となることが期待される。

【References】

[1]Gan, Z. and Kwak, H.T. *J. Magn. Reson*. **168,** 346-351. [2] Provencher, S. W. *Comput. Phys. Commun.*, **27**, 213-221.

P85

魚類資源の多様性比較代謝プロファイリングに向けた条件検討

○星野玲緒奈[1], 葭田征司[1], 伊達康博[1, 2], 菊地淳[1, 2, 3, 4]
[1]横市院生命、[2]理研PSC、[3]理研BMEP、[4]名大院生命農

Examining of comparative metabolic profiling of diversed fish resources for effective utilization

○Reona Hoshino[1], Seiji Yoshida[1], Yasuhiro Date[1,2],Jun Kikuchi[1,2,3,4]
[1] Yokohama City Univ., Kanagawa, Japan,[2]RIKEN PSC, Kanagawa, Japan, [3] RIKEN BMEP, Kanagawa, Japan, [4] Nagoya Univ., Aichi, Japan

Japan has the sixth exclusive economic zone in the world with rich living aquatic resource due to the wide range from north to south coast. Those resources, especially diversed fishes, have a significant impact in the food culture. However, the external organs such as fin were discarded as unused biomass resources. Thus, we examine to develop the analytical procedure for evaluation of various external organs to extract the environmental information from the compositions for effective utilization as valuable biomass resources. The metabolic profiles and physical properties were evaluated by using NMR and other physicochemical approaches in combination with multivariate statistical analysis to verify the differences of fin composition according to their habitats.

【序論】

世界第6位の日本の海域は南北に長く、激しい高低差により豊かな水産資源を有する。とりわけ魚類多様性を活かした食文化に大きな特徴を有し、魚肉部位が種多様性を反映して化学組成をも多様化させていることは食経験から想像され得る。しかし外部の器官、例えば鰭部位はほとんどが未利用水産バイオマス資源であり、各種の棲息環境(流速、水圧、外敵等)に応じた進化を遂げているであろうと考えられるが、比較解析の報告例は乏しい。そこで、重量あたりの代謝物群量や物性の多様な外部器官、特に鰭部位に着目した抽出やNMR計測条件を検討し、代謝プロファイリングが各種魚類の棲息環境をどのように反映し得るかを検討することとした（Fig. 1）。

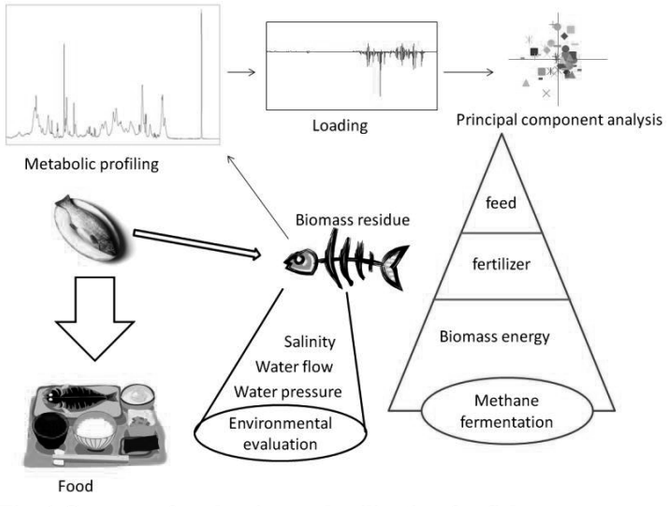


Fig. 1 Concept of evaluation and utilization for fishery resources

環境メタボノミクス　魚類多様性　未利用水産バイオマス

○ほしの　れおな、よしだ　せいじ、だて　やすひろ、きくち　じゅん

【方法】

全国各地で採取した多様な魚類を鰭部位のみ取り分け、凍結乾燥し、フードミキサー及びオートミルによる破砕後に水溶媒、DMSO溶媒、メタノール溶媒およびクロロホルム溶媒を用いて鰭の抽出条件を検討した。抽出溶液は^{1}H-NMRを用いて測定し、得られたスペクトルデータをbin化処理によってマトリクス化した後、フリーソフトウェアRを用いて主成分分析を行った。

【結果と考察】

鰭のNMRスペクトルデータより、1.2 ppmや2.6 ppm付近など、魚の種類によりピークが異なっていることが観察されており、同じハゼ科の*Periophthalmus modestus*と*Tridentiger bifasciatus*では類似のスペクトルが得られる傾向にあった（Fig. 2）。また、得られたスペクトルデータを主成分分析によって解析した結果、各種魚類の生息域（すなわち淡水域、汽水域、海水域）の違いに基づきクラスタリングされる傾向にあった（Fig. 3）。これらのクラスタリングに寄与している代謝物質を調べたところ、海水域に生息する魚類においてトリメチルアミン-N-オキシド、ベタイン、タウリンなどが豊富に存在することが明らかとなり、これらの物質は浸透圧調整等に関係している可能性が示唆された。以上の結果は棲息域の差異に基づき、棲息環境の情報が鰭に蓄積され、異なる代謝プロファイルを示したことを示唆していると考えられ、より多様な魚類における鰭中の代謝プロファイルを詳細に調べて行くことにより、棲息環境の情報抽出が可能な代謝プロファイリング技術の確立が期待できる。

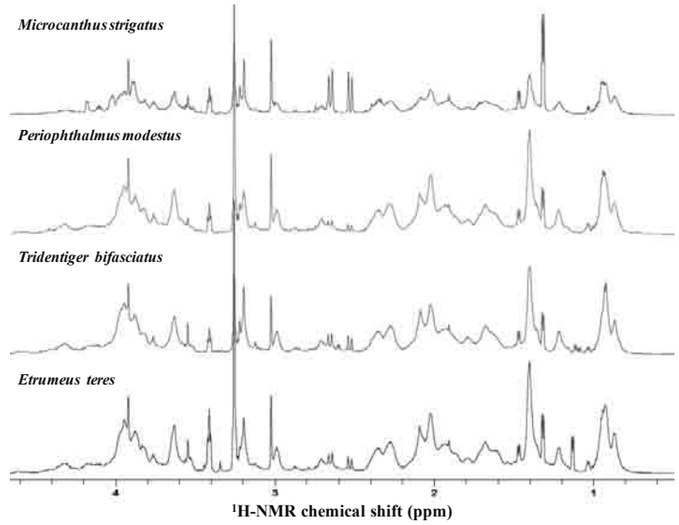


Fig. 2 NMR spectra of water-soluble fin metabolites from diversed fishes

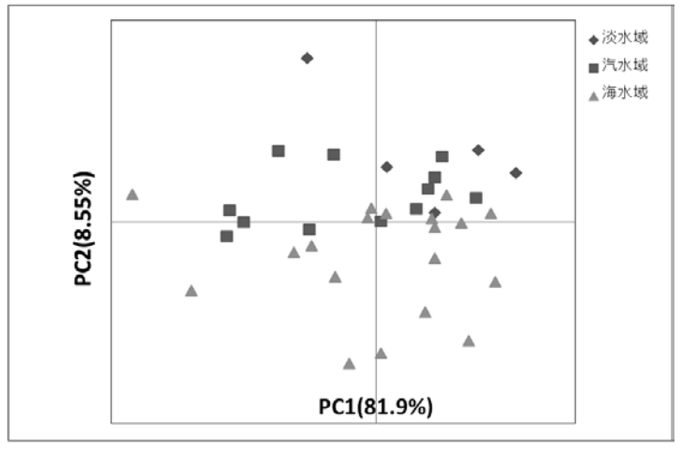


Fig. 3 PCA score plot of water-soluble fin metabolites from diversed fishes

P86 固体NMRによるゴム材料の構造解析

○宇川仁太[1], 清水敏喜[1], 酒井秀之[1]
[1]東洋ゴム工業株式会社

Solid-state NMR structural study of rubber materials

○Jinta Ukawa[1], Toshiki Shimizu[1]and Hideyuki Sakai[1]
[1]TOYO TIRE & RUBBER CO., LTD.

Vulcanization is an essential process for rubber products to appear characteristic properties such as viscoelasticity. Various structural changes, such as crosslinking reaction or cis-trans isomerization, may occur in vulcanization process of rubber materials. Solid-state NMR may be a powerful tool for the structural characterization of vulcanized rubber, but common CP-MAS method often causes unfavorable results due to high mobility of the rubber materials. However, DD-MAS method brings efficient spectra for analyses of vulcanized rubber. Application of DD-MAS method to rubber materials achieves quantitative spectra as well as high resolution and S/N ratio. In this presentation, we discuss quantitative analyses in vulcanization process of rubber materials. Furthermore, taking advantage of the high mobility, we try to obtain DEPT-MAS spectra of vulcanized rubber materials.

＜緒言＞

タイヤなどの製品に用いられるゴム材料は、加硫を行うことで粘弾性などの優れた特性を発揮する。加硫工程ではゴム分子同士が硫黄により架橋されるだけでなく、さまざまな構造変化を示す。しかし加硫ゴムは架橋されているため溶液NMRによる詳細な解析は困難である。よって固体NMRによる加硫ゴムの構造解析が行われるが、加硫ゴムについてCP(Cross Polarization; 交差分極)-MAS(Magic Angle Spinning; マジック角回転)法を用いるとS/N比の低いスペクトルが得られることが多い。これは他の高分子材料と比較してゴム材料の分子運動性が高く、CPの効率が悪くなるためである。ゴム材料を固体NMR法で測定する場合はCPを行わないDD(Dipolar Decoupling; 双極子デカップリング)-MAS法を用いると高分解能、高S/N比のスペクトルが得られる。

本研究ではゴム材料の固体NMR測定においてDD-MAS法で優れたスペクトルが得られることを利用し、ゴムの加硫による構造変化を調べた。DD-MAS法では高分解能、高S/N比のスペクトルが得られるだけでなく、ピーク強度について定量的なスペクトルが得られることから、定量的な議論を行った。さらに、DEPT(Distortionless Enhancement by Polarization Transfer)など通常固体NMR法では適用困難なパルス系列の適用し、詳細な構造解析を試みた。

＜実験＞

試料は天然ゴム(NR)、シス型ブタジエンゴム(BR)、スチレン-ブタジエンゴム(SBR)を原料ゴムとして用いた。原料ゴムに充填剤、加硫剤などのゴム薬品を混合し、140-160℃で所定の時間熱プレス処理を行うことで加硫ゴムを得た。

装置はBruker DPX-400および7mmローター径のMASプローブを用い、MAS回転速度は5000Hzで測定した。パルス系列にはDDのほかDEPTを用いた。

Rubber, Vulcanization, Solid-state NMR

○ うかわじんた, しみずとしき, さかいひでゆき

＜結果と考察＞[1)2)]

Fig.1にBRの加硫時間を変化させたときのDD-MASスペクトルを示す。加硫することにより1,4-transのピーク強度が増えていることが分かる。Fig.2に加硫時間に対する1,4-cis、1,4-trans、1,2-vinylの各ミクロ構造量のプロットを示す。加硫が進むにつれ1,4-cisが減少し1,4-transが増加、1,2-vinylは変化していないことがわかる。このように加硫によってゴム分子は架橋反応だけではなく異性化反応も起きていることが示された。

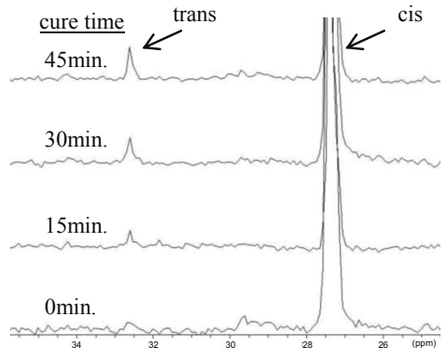


Fig.1 DD-MAS spectra of BR vulcanizates.

加硫NRのDD-MASスペクトルをFig.3に、DEPT135-MASスペクトルをFig.4に示す。DEPT135法は溶液NMRでは汎用的に用いられており、4級炭素は消失し、3級および1級炭素は上向き、2級炭素は下向きに検出される。Fig.4より、通常固体NMRでは困難なDEPT測定がゴム材料であれば測定可能であることが示された。また40-60ppmには加硫により現れる新たなピークが検出され、このピークの炭素の級数もDEPT-MASスペクトルにより決定することが可能となった。

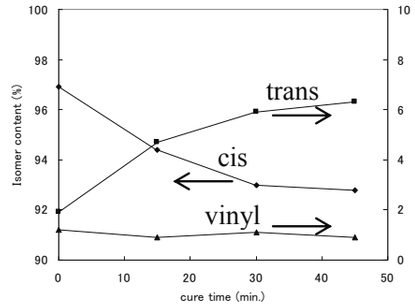


Fig.2 Isomer contents of BR as a function of cure time.

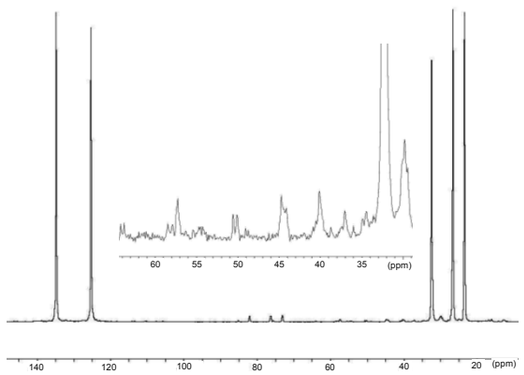


Fig.3 DD-MAS spectra of NR vulcanizate.

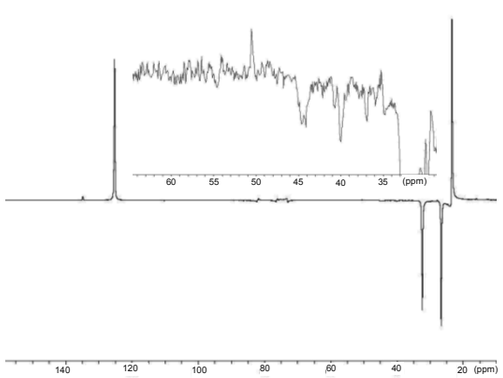


Fig.4 DEPT135-MAS spectra of NR vulcanizate.

＜参考文献＞
(1) 吉本洸哉、伊藤眞義、*日本ゴム協会誌*、**85**、87 (2012)
(2) S.Kawahara et al, *Polymer*, **50**, 1626 (2009).

P87

常磁性ポリ酸の固体 ^{95}Mo NMR

○飯島隆広[1], 山瀬利博[2,3], 丹所正孝[4], 清水　禎[4], 西村勝之[1]
（分子研[1], 東工大[2], MO デバイス[3], 物材機構[4]）

Solid-State ^{95}Mo NMR of a Paramagnetic Polyoxomolybdate

T. Iijima[1], T. Yamase[2,3], M. Tansho[4], T. Shimizu[4], K. Nishimura[1]
Institute for Molecular Science[1], *MO Device*[2], *Tokyo Institute of Technology*[3], *National Institute for Materials Science*[3]

We report solid state NMR of ^{95}Mo NMR for a paramagnetic compound of ϵ-Keggin polyoxomolybdate. ^{95}Mo static NMR spectra for powder crystals of $[Mo_{12}O_{30}(OH)_{10}H_2\{Ni(H_2O)_3\}_4]$, consisting of $\{\epsilon\text{-}Mo_{12}\}$ core with Mo(V)-Mo(V) bonds and of paramagnetic caps of $\{Ni(H_2O)_3\}$, were measured under moderate (11.7 T) and ultrahigh (21.8 T) magnetic fields. The NMR parameters of ^{95}Mo could be obtained from spectral simulation by considering quadrupole, chemical shift and hyperfine interactions. The ^{95}Mo spectrum under 11.7 T was also measured at 173 K. No significant shift was observed for the spectra at 173 and 301 K, which is consistent with the localized spin density of the unpaired electrons of Ni(II) obtained by DFT calculation.

【緒言】第 6 族元素であるモリブデンは Mo(0) から Mo(VI) まで全ての原子価において安定な化合物が存在する。この内、Mo(V) は ϵ-Keggin アニオンやリング・チューブ状のナノサイズの酸化物などのポリ酸 [1] に含まれており、d^1 電子の局在性は分子設計や光学的、電気的、磁気的性質といった物性面から興味が持たれている。^{95}Mo は核スピン $I = 5/2$ の四極子核であり、且つ磁気回転比が $\gamma = -1.743 \times 10^7$ rad s^{-1} T^{-1} と小さいために一般に固体 NMR スペクトルの測定が困難であるが、近年我々は、強磁場マグネットを使用して感度・分解能を向上させ、局在化または非局在化した d^1 電子を有する混合原子価モリブデン (V, VI) ポリ酸の固体 ^{95}Mo NMR スペクトルを報告した [2]。そこでは Mo(VI) サイトに比べ Mo(V) サイトの ^{95}Mo 化学シフトは大きくなることや、d^1 電子の局在性の違いにより化学シフト異方性が大きく異なることを示した。さらに、^{95}Mo の NMR パラメータのこのような違いを利用し、詳細な構造が不明であった ϵ-Keggin 型の $\{Mo_{12}\}$ をコアとする化合物 $[PMo_{12}O_{36}(OH)_4\{La(H_2O)_{2.75}Cl_{1.25}\}_4]\cdot 27H_2O$ について、disorder 構造を明らかにした。

今回は固体 ^{95}Mo NMR の更なる有用性を調べるため、常磁性のポリ酸である $[Mo_{12}O_{30}(OH)_{10}H_2\{Ni(H_2O)_3\}_4]$ (以下 $\{Mo_{12}\}$(Ni)) を研究対象とした。本化合物もコアは ϵ-Keggin 型の $\{Mo_{12}\}$ であるが、これが 4 つの常磁性 Ni(II)$(H_2O)_3$ でキャップされている [3]。

---

^{95}Mo, ポリ酸

○いいじま　たかひろ、やませ　としひろ、たんしょ　まさたか、しみず　ただし、にしむら　かつゆき

本研究では、強磁場マグネット等を用いた固体 ^{95}Mo NMR 測定を行い、得られたスペクトルのシミュレーションや量子化学計算により NMR パラメータを検討した。

【実験】11.7 及び 21.8 T での ^{95}Mo 固体 NMR は JEOL ECA 分光器を用い、それぞれ共鳴周波数 32.725, 60.572 MHz で測定を行った。測定は静止サンプルに対しエコー法で行った。11.7 T では低温（173 K）での測定も行った。スペクトル・シミュレーションは自作のプログラムを用いて行った。NMR パラメータの DFT 計算は、VWN + BP の汎関数及び triple-ζ レベルの Slater 型基底関数を用い、ADF 2012.01 で行った。

【結果と考察】Figs. 1(i-a) および 1(ii-a) にそれぞれ、21.8, 11.7 T の磁場で測定した $\{Mo_{12}\}$(Ni) の ^{95}Mo NMR static スペクトルを示す。両磁場とも、線幅が数千 ppm の極めてブロードなスペクトルが得られた。スペクトルのシミュレーションには、内部相互作用として核四極相互作用及び化学シフト相互作用の他に常磁性 Ni(II) イオンの不対電子による超微細相互作用を考慮した。Figs. 1(ii-a) 及び 1(ii-b) にシミュレーションの結果を示す。実測スペクトルを良く再現している。核四極相互作用や化学シフト異方性によるスペクトルの広がりが大きいため、超微細相互作用の異方性成分によるスペクトル変化は僅かであった。超微細相互作用の等方性成分の寄与を調べるため 173 K の低温で測定したスペクトルの結果が Fig. 1(i-c) である。室温と低温でスペクトルに大きな差は見られなかった。シミュレーションにおいても、低温化に伴う電子スピンの磁化の増大による線幅の多少の広がりはあったものの、等方シフトの温度依存性は考慮する必要がなかった。

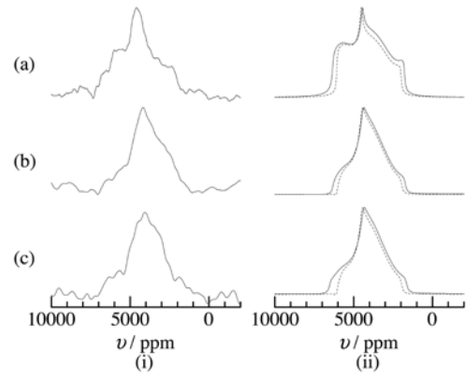


Fig. 1: ^{95}Mo NMR spectra of $\{Mo_{12}\}$(Ni) under (a) 21.8 and (b,c) 11.7 T. (b) and (c) show the spectra at 301 and 173 K, respectively. (i) and (ii) show the observed and simulated spectra, respectively. The solid and broken lines in (ii) show the theoretical curves with and without considering the hyperfine interaction, respectively.

NMR パラメータは DFT 計算でも得られた。化学シフトの大きさがスペクトル・シミュレーションによる値よりも小さく見積もられはしたが、かなり大きな化学シフト異方性など、傾向は一致していた。また、不対電子のスピン密度として Ni(II) 付近に局在した計算結果が得られ、スペクトル全体のシフトの温度依存性が小さいことと合致した。

[1] T. Liu, E. Diemann, H. Li, A.W.M. Dress, A. Müller, *Nature* **426**, 59 (2003).

[2] T. Iijima, T. Yamase, M. Tanasho, T. Shimizu, K. Nishimura, *Chem. Phys. Lett.* **487**, 232 (2010).

[3] P. A. Müller, C. Beugholt, P. Kogerler, H. Bögge, S. Bud'ko, M. Luban, *Inorg. Chem.* **39**, 5176 (2000).

P88 マイクロプローブ固体NMRによるLED部材の劣化分析

○三好理子, 石田宏之, 三輪優子
(株)東レリサーチセンター

Degradation Analysis of LED package by solid-state NMR using micro probe

○Riko Miyoshi, Hiroyuki Ishida, and Yuko Miwa
Toray Research Center, Inc., Shiga, Japan

A state-of-the-art solid-state NMR microprobe, whose sample volume is less than 1 μL, is successfully applied to the characterization of the degradation mechanisms of an encapsulation resin using a white emitting LED. According to the solid-state ^{1}H MAS NMR, the trace of vinyl group and methoxy group containing in the silicone encapsulation resin decreased and some cross-linking structures were generated after the deterioration test. Degradation structure of LED phosphor was also characterized by solid state ^{27}Al MAS NMR using this microprobe. A change of valence state of Ce in the degraded sample was detected, which is supposed to be caused by the oxidation or defects of Ce in the YAG crystalline.

【緒言】　固体 NMR は、構造解析に非常に強いツールである一方、通常測定に数百～数十 mg 程度の試料が必要であり、微細化の進むエレクトロニクス分野など試料量を確保するのが困難な分野に対する適用が難しかった。このような微量試料への対応として、従来からサンプルチューブの小型化による量感度の向上がなされてきている[1)]。現在では、試料管外径 0.75 mm の固体 NMR プローブの報告もあり、今後さらに極微量試料の解析が可能になると期待される。

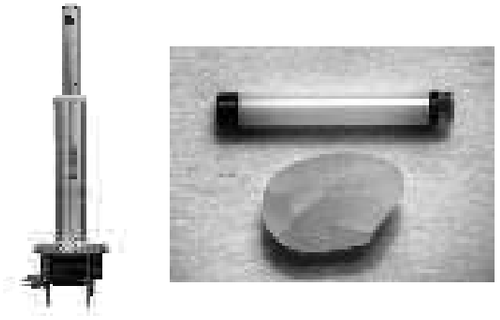


Fig. 1 Photographs of microprobe and sample tube (outside diameter: 1mmϕ).

我々は、近年開発された試料管外径 1 mm のマイクロプローブ（Fig.1）により、市場拡大の著しい照明用白色LED 部材の劣化構造解析の検討を行った。白色LEDにおいては、信頼性や劣化が課題となっており、各部材の詳細な構造解析が非常に重要である。また、一般に不良品、故障品は個数も限られるため、微量試料での評価が望まれている。ここでは、白色 LED の封止樹脂や蛍光体について、過電圧劣化試験を行った結果に関して報告する。対象試料はそれぞれの水準で1～3個とし、微量試料の劣化構造評価の可能性を検証した。

【実験】　市販の白色LEDについて9Vでの過電圧劣化試験を行い、通電試験により全く光らなくなった試料を劣化品として、未通電のものを未劣化品として測定に用いた。9V で通電した場合、すぐに光らなくなるものや長時間継続して発光するものなど、かなりのばらつきがあった。

固体 NMR 測定は、JEOL 社製マイクロプローブ（Fig.1）を Avance400 に装着して行った。LED は解体し、試料をマイクロプローブ用サンプル管（ジルコニア製　内径：0.5mm、外径：1mm、長さ：7.4mm、試料容積：0.8μL）に充填した。

【結果と考察】　Fig.2 に、劣化前後の LED 封止樹脂について測定した ^{1}H MAS NMR スペクトルを示した。ジメチルシロキサンに由来するピークが –0.1 ppm 付近に、ジフェニルシロキサンに由来するピークが 6.9～7.4 ppm に観測され、これらの構造を主骨格とするシリコーンであることが確認された。また、ビニル基とヒドロシリル基により形成される架橋構造 Si-CH_2CH_2-Si（0.4 ppm）の他、未反応ビニル基（5.5～5.9 ppm）やメトキシ基（3.2 ppm）、エチル基（1.0 ppm）と推定されるピークが認められた。劣化品では未劣化品に比べて 5.5～5.9 ppm、3.2 ppm のピーク強度が微減しており、ビニル基やメトキシ基の一部が反応していると考えられた。また、1.3、1.0、0.6 ppm 付近のピーク強度が微増した。このことから、架橋構造（Si-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-Si、Si-CH_2CHR-Si）等が形成されたと考えられた。

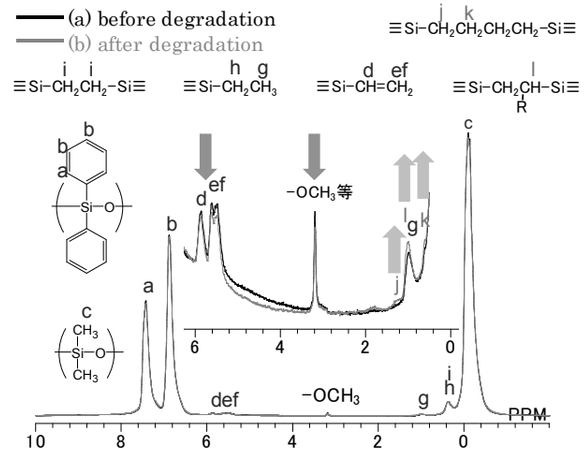


Fig.2　^{1}H MAS NMR spectra of encapsulation resin in LED (a) before degradation (b) after degradation.

Fig.3 に、劣化前後の LED YAG 系蛍光体および YAG 結晶（$Y_3Al_5O_{12}$）について ^{27}Al MAS NMR スペクトルを示した。約 0 ppm に 6 配位由来、約 50～70 ppm に 4 配位由来のピークが観測されている。劣化品において、未劣化品や YAG 結晶に比べて、6 配位 Al 由来のピークがややブロードなこと、スピニングサイドバンド（図中*印）の強度が大きいことから、通電時の熱や光などにより、YAG の結晶構造の対称性の低下や、YAG にドープされた Ce の欠損や酸化状態の変化、価数変化などが起きていると推測される。

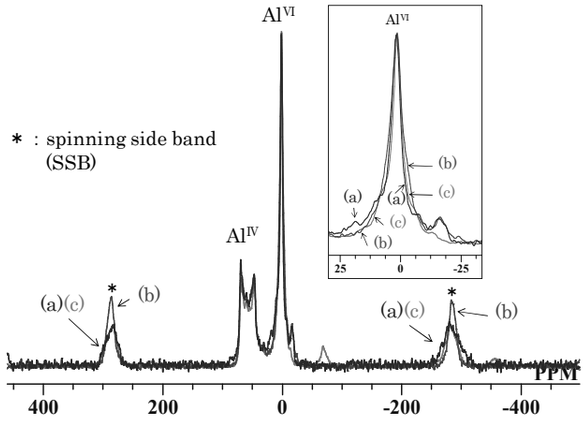


Fig.3 ^{27}Al MAS NMR spectra of phosphor in LED (a) before, and (b) after degradation, and (c)YAG.

【参考文献】

1）K. Yamauchi, T. Asakura, Chem. Lett. **35**, 426.(2006)

LED封止樹脂，LED蛍光体，マイクロプローブ
○みよしりこ，いしだひろゆき，みわゆうこ

P89

システインに保護されたマジックサイズCdSeクラスターの多核固体ＮＭＲ

○澤上勲[1], 野田泰斗[1,2], 武田和行[1], 竹腰清乃理[1]
[1]京都大学大学院　理学研究科　化学専攻
[2]JST・先端

Multinuclear Solid State NMR of Cysteine Capped Magic-Sized CdSe Clusters

○Isao Sawakami[1], Yasuto Noda[1,2], Kazuyuki Takeda[1] and K. Takegoshi[1]
[1]Division of Chemistry, Graduate School of Science, Kyoto University, Kyoto, Japan
[2]SENTAN/JST

We successfully synthesized for the first time magic-sized nano-clusters $(CdSe)_{34}$ which are stable both in solution and in the solid state, by capping $(CdSe)_{34}$ with L-cysteine. In order to study the structure of the L-cysteine of the L-cysteine-capped CdSe nano-clusters, we performed ^{13}C, ^{113}Cd, and ^{77}Se MAS NMR experiments. The nano-culuster bound cysteine showed different ^{1}H-^{13}C CP/MAS spectrum from that of free-cysteine. ^{1}H-^{113}Cd CP/MAS spectra showed three peaks assigned to the Cd atoms bound to the Se, S, and N atoms.

【背景と目的】

CdSeなどのⅡ-Ⅵ族化合物半導体は量子閉じ込め効果により吸光スペクトルのサイズ依存性を持つ[1]。近年、質量分析と第一原理計算により存在が期待されていた粒径1 nm台の原子数がそろったマジックサイズCdSeクラスターの研究が多く報告されるようになった[2,3]。マジックサイズナノクラスターと呼ばれる粒子は、ある決まった不連続な原子数でのみ安定に存在しうる[2,4]。粕谷らはトルエン中に合成したCdSeナノ粒子が$(CdSe)_n$ (n = 13, 19, 33, 34)で極めて安定であることを質量分析によって示した。その中で$(CdSe)_{34}$の解析がなされないままになっていた。これは回折現象を用いた手法で解析するには小さすぎることと、溶液中で安定な$(CdSe)_{34}$の合成報告はあったが[2, 5]、固体との両方で安定化する合成法が確立されていなかったことが理由である。我々はL-システイン(L-Cys)を保護基として用いることで固液両相で安定に存在する$(CdSe)_{34}$を合成した。また、L-Cys保護$(CdSe)_{34}$ナノクラスターの構造を^{13}C, ^{113}Cd, ^{77}Se固体NMRにより解析した。

【実験】

固体でも安定性を保てる合成法をParkらの方法[5]をもとに最適化を行った。Cd、Seそれぞれの前駆体溶液は、$Cd(NO_3)_2$を経由した$Cd(OH)_2$とNa_2SeSO_3である。この前駆体溶液とともに

$$Cd^{2+} + \text{L-Cys} + NaOH + Se^{2-} \longrightarrow (CdSe)\text{-Cys} \qquad (1)$$

の反応によって、モル比[Cd]:[Se]:[L-Cys] = 1 : 0.5 : 4 で合成した。この溶液はFig.1のような吸光スペクトルを示した。第一励起ピークの位置は422 nm、半値全幅は15 nmであった。スペクトルの形状やピーク位置はトルエン中で合成された$(CdSe)_{34}$とほぼ

CdSeクラスター、システイン、多核種固体NMR
○さわかみいさお、のだやすと、たけだかずゆき、たけごしきよのり

同じであった[1,3]。以上から我々が合成した粒子は均一なマジックサイズCdSeナノクラスターであり、$(CdSe)_{34}$と帰属した。$(CdSe)_{34}$の合成後、水溶液中でpHを11に保ちながら溶液に貧溶媒であるアセトンを添加し、遠心分離することにより固体の$(CdSe)_{34}$を得ることができた。この粉末は水に可溶であった。この水溶液の吸光度はFig.1のスペクトルを再現したので、$(CdSe)_{34}$は固体でも安定であることを確認した。

固体NMR測定は磁場7 T (^{1}Hのラーモア周波数は299.52 MHz)、Varian製の5 mmローター・T3プローブで行った。MAS回転速度は7~12 kHzとした。^{1}H, ^{13}C (75.32 MHz), ^{77}Se (57.18 MHz), ^{113}Cd (66.43 MHz) の、すべてI = 1/2である多核種による測定を行いCP/MASにおいて接触時間とMAS速度を変えて測定した。分光計はOPENCORE[6]を用いた。

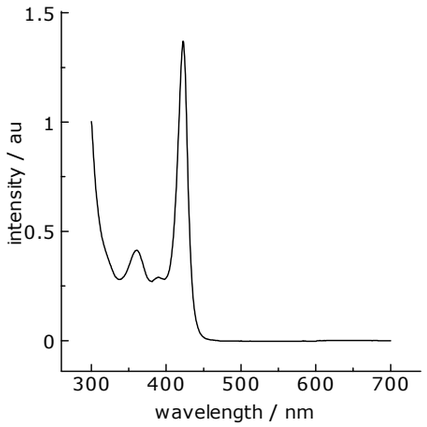


Fig.1 : An absorption spectrum of $(CdSe)_{34}$.

【結果と考察】

Fig.2にL-システイン粉末とL-システインで覆われた$(CdSe)_{34}$粉末の^{1}H-^{13}C CP/MASスペクトルを示す。L-システインのピークの帰属は図中に示し、Free システインと$(CdSe)_{34}$の対応は①と①'のように示した。$(CdSe)_{34}$の①や③のピークにおいて、Free L-システインのピークが同時に現れなかった。したがってL-システインは全て$(CdSe)_{34}$に結合して、Free L-システインは残存していない。

硫黄は金属と結合しやすい性質を持っている。カドミウムイオンとシステインをpH ＞ 10で混合すると、チオール基とアミノ基の両方が配位して錯体を形成する[7]。これらとNMRスペクトルの変化を考慮すると、L-システインはチオールを介してCdと結合していると考えられる。同様に②の2つのピークは化学シフトの近さからどちらもα-^{13}Cと帰属し、それらはアミンがCdまたはSeに結合しているものと何にも結合していないものに対応する。カルボニル炭素(Fig.2の③)は合成中にNaOHを用いていることから、COONaの状態になっていると考えられる。

L-システインのアミノ基とチオール基が$(CdSe)_{34}$の表面と結合していること、特にチオー

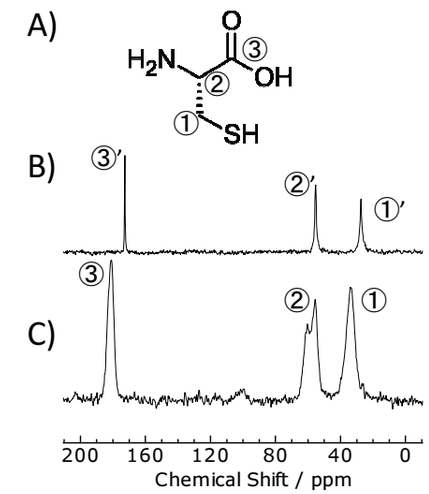


Fig.2 : (A) Structure of L-cysteine , ^{13}C CP/MAS spectra of (B) L-cysteine powder, and (C) $(CdSe)_{34}$.

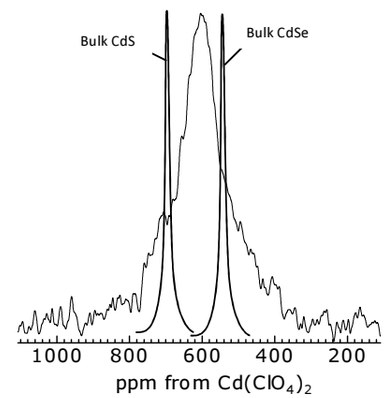


Fig.3 : ^{113}Cd CP/MAS spectra of L-Cys-capped $(CdSe)_{34}$. Sample spinning speed was 9 kHz and contact time was 5 ms.

ル基がカドミウムと結合していることが示唆されたので、これを確認するため、^{113}Cd核に対しても固体NMR測定を行った。

Fig.3は$(CdSe)_{34}$の^{1}H-^{113}Cd CP/MASスペクトルを示す。バルクのCdSeとCdSバルクの^{113}Cdのピークも同時に示した(550 ppmと700 ppm)。過去に報告された大きさ1 nm台のナノ粒子のCP/MASスペクトルは576 ppmに線幅が6 ppmのピークである[3]が、我々が得た$(CdSe)_{34}$の^{113}Cdのピークは線幅が約100 ppmと非常に太く、バルクCdSeとバルクCdSのピーク位置にまで達している。

L-システインが合成に関わっていて、チオール基とCdが結合している予測があり、Sが配位したCdとそうでないCdはHからの距離が異なるので、^{1}H-^{113}Cd CP/MASにおける接触時間τ依存性からピーク分離を試みた。τを変えるとスペクトル形状が変わっていくことが観測された。代表的なスペクトルとしてτ = 1ms をFig.4に示した。このスペクトルから、500 ppm、600 ppm、700 ppmそれぞれのピーク分離をした。各ピークをプロットし、最小二乗フィッティングによって次の式で近似曲線を示した。

$$M(\tau)=\frac{M_0\left(\exp\left(\frac{-\tau}{T_{1\rho}}\right)-\exp\left(\frac{-\tau}{T_{HCd}}\right)\right)}{1-\left(\frac{T_{HCd}}{T_{1\rho}}\right)}$$

Tableにフィッティングにより得られた$T_{1\rho}$、T_{HCd}の値を示す。

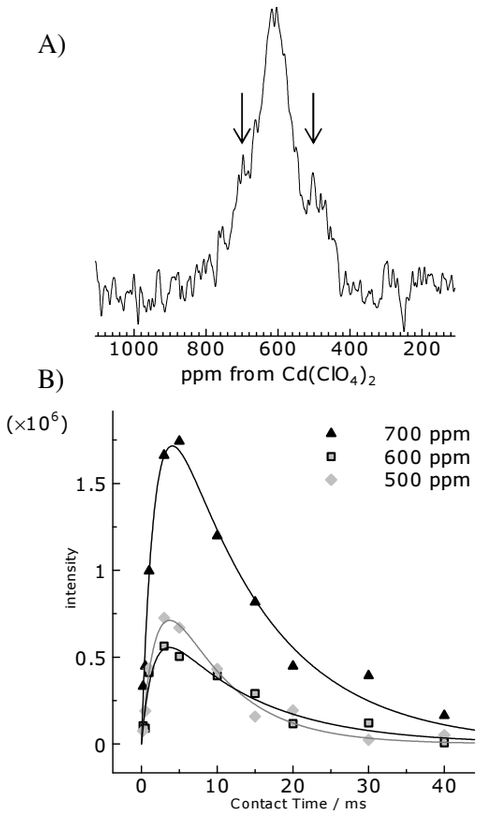


Fig.4 : (A) A ^{113}Cd CP/MAS spectrum of $(CdSe)_{34}$ measured with a contact time of 1 ms. (B) Contact time dependence of the ^{113}Cd-CP/MAS packets at 500, 600, and 700 ppm.

Table : Time constants obtained with curve fitting using Eq.(2).

	$T_{1\rho}$ / ms	T_{HCd} / ms
600 ppm	12.4	1.8
700 ppm	7.8	2.0
500 ppm	12.5	1.6

過去の^{113}Cdに関する報告では、バルクCdSとバルクCdSeのスペクトルがそれぞれ705 ppm、657 ppmに現れ、バルクのCdSSe合金はCdSとCdSeのピークの間に線幅50 ppmの太いシグナルが現れている [8]。これと同様の解析方法は$(CdSe)_{34}$でも適用できる。というのも$(CdSe)_{34}$のモデルによると、CdはSeが３つ、または４つ配位している[2]。L-システインはSとCd、さらにNとCdが結合している可能性が高く、粒子表面において$CdSSe_3$、$CdSe_4$、$CdSe_3N$の３通りの表面サイトが考えられるからである。Fig.4のCP/MASにおけるτ依存性のフィッティングパラメータでは、500 ppmでのT_{HCd}が1.6 msと最も短い値となった。逆に700 ppmでは最も長いT_{HCd} = 2.0 msであった。CdがL-システインのSと結合している場合、Cd-S-CH_2という局所的な構造になり、このアルキル基の水素から磁化が移っていると考えられる。CdがL-システインのNと結合している場合

($CdSe_3N$)は、L-システインがもつアミンが近傍に存在していると考えられる。その場合チオールと結合したCdよりもHとの距離が近くなるので、T_{HCd}は短くなるはずである。したがってFig.4の３つのピークは$CdSSe_3$(700 ppm)、$CdSe_4$(600 ppm)、$CdSe_3N$(500 ppm)と帰属した。

【結論】

これまで溶液中でのみ存在が確認されていた$(CdSe)_{34}$を、固体でも安定に存在出来るものとして合成することに成功した。

^{1}H-^{13}C CP/MASと^{1}H-^{113}Cd CP/MAS測定により$(CdSe)_{34}$表面における^{113}CdはL-システインが持つ^{1}Hと相互作用しており、L-システインは$(CdSe)_{34}$粒子を保護するように、主にチオール基とアミノ基がCdに配位して、1.5 nmの粒子が安定に存在している。また、アミノ基は$(CdSe)_{34}$と結合しているものとしていないものが共存している。バルクCdSeやバルクCdSの^{113}Cdの化学シフトの比較により、Cd原子は、Se、S、Nと結合し、$CdSSe_3$、$CdSe_4$、$CdSe_3N$という３つの結合状態がある。さらにナノクラスター全体の構造を明らかにするために、現在^{77}Se固体NMR測定、および^{113}Cd、^{77}Seをフルラベルした$(CdSe)_{34}$の合成が進行中である。

【参考文献】

[1]C. B. Murray et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 8706-8715 (1993).
[2]A. Kasuya et al., *Nat. Mater.*, **3**, 99-102 (2004).
[3]Y.Noda et al., *Eur. Phys. J. D*, **57**, 43-47 (2010).
[4]T. P. Martin, *Phys. Rep.*, **273**, 199-241 (1996).
[5]Yeon-Su Park et al., *J. Nanosci. Nanotechnol.*, **7**, 3750-3753 (2007).
[6]K. Takeda, *Rev. Sci. Instrum.* **78**, 033103 (2007).
[7]F. Jalilehvand et al., *Inorg. Chem.*, **48**, 5758-5771 (2009).
[8]C. I. Ratcliffe et al., *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **8**, 3510-3519 (2006).

P90

^{27}Al, ^{17}O MQMAS NMR法を用いたUSYゼオライトの局所構造解析

○上口憲陽[1]，真田貴志[1, 2]，芦田淳[3]，奥村和[2]
[1]株式会社日産アーク
[2]鳥取大学
[3]アジレント・テクノロジー株式会社

Local structural characterization of am-monium-treated USY zeolite using ^{27}Al and ^{17}O MQMAS NMR

○Kazuhiro Kamiguchi[1], Takashi Sanada[1, 2], Jun Ashida[3] and Kazu Okumura[2]
[1]Energy-device Analysis Department, NISSAN ARC Ltd., Yokosuka, Japan.
[2]Department of Chemistry and Biotechnology, Graduate School of Engineering, Tottori University, Tottori, Japan.
[3]Agilent Tchnologies International Japan, Ltd., Shinagawa, Japan.

The enhanced strong acidity in USY zeolite treated with ammonium nitrate solution has been studied by means of ^{27}Al and ^{17}O (MQ) MAS NMR. Ammonium salt-treated USY zeolite showed lower δ_{iso} shifts of Al(IV)$_b$ species. Increase in the Brønsted acidity and the catalytic activity for cracking has been found on the ammonium-treated USY zeolite. It is speculated that the chemical shifts of Al(IV)$_b$ is the origin of the enhanced Brønsted acidity and high alkane cracking activity of the USY zeolite treated with ammonium nitrate solution[1, 2].

【目的】Ultra stable Y (USY)型ゼオライトは石油の接触分解プロセスに広く使用されている。近年、奥村らにより、USY ゼオライトを硝酸アンモニウム水溶液で処理することによって、強いブレンステッド酸性質を有し、高いクラッキング能を発現することが示された[1]。しかし、その触媒活性サイトと考えられている酸点の構造は未だ十分には解明されていない。本研究では、主に ^{27}Al、^{17}O MQMAS (multiple quantum magic angle spinning) NMR を用いて、USY ゼオライトの酸点近傍の局所構造の解析、および強いブレンステッド酸性と構造との相関の解明を試みた。

【実験】市販の NH_4-Y ゼオライトをスチーミング処理することにより、as-prepared USY ゼオライトを得た。得られた as-prepared USY ゼオライトについて、各種アンモニウム塩を用いた水溶液や酸で後処理することにより、処理後の USY ゼオライトを調製した。得られた各試料について、X 線回折による結晶構造解析、アンモニア IRMS-TPD（Infared-Mass Spectroscopy / Temperature Programmed Desorption）法による固体酸性質の測定、^{27}Al MAS NMR および ^{27}Al, ^{17}O MQMAS NMR 法による構造解析を行った。固体 NMR 測定は Varian NMR systems 600WB および Bruer AVANCEⅢ 600 を用いた。

Solid state NMR, MQMAS, Zeolite

○かみぐちかずひろ，さなだたかし，あしだじゅん，おくむらかず

【結果と考察】Table 1 に、各試料の X 線回折、IRMS-TPD、^{27}Al MAS NMR による解析結果を示す。as-prepared USY と各処理後 USY を比較すると、酸またはアンモニウム塩水溶液の処理では Si/Al_2 比率の増加が確認されるが、格子定数の変化からはゼオライトのマクロな骨格構造は大きく変化していないことが分かる。しかし、これらのマクロな構造に関する情報だけでは処理後の酸強度の顕著な増加を説明できないため、^{27}Al、^{17}O MQMAS 法を適用し、酸点近傍の局所構造の解析を試みた。Figure 1 に、NH_4-Y、as-prepared USY、NH_4NO_3-USY（2.3M: 2.3 mol/l）の ^{27}Al MQMAS NMR スペクトルを示す。NH_4-Y では、4 配位 Al に帰属される信号のみが観測された。as-prepared USY では、4 配位 Al の信号に加えて、5、6 配位 Al に帰属される信号が観測された。これらは、スチーミング処理による脱アルミ反応で生じた骨格外アルミと考えられる。処理後の NH_4NO_3-USY（2.3M）では、骨格外アルミである 5 配位 Al 、6 配位 Al の信号が減少するとともに、強い酸性質の起源であると推定される[1, 2]、非対称性 4 配位 Al（IV$_b$, IV$_c$）の信号の変化が観察された。発表では、^{17}O MQMAS NMR の測定結果とともに、結果の詳細について報告する。

Table 1. Characteristics of the samples

	Td Al (%)[a]	Si/Al_2 ratio[b]	lattice parameter: *a* (nm)	OH_{super}[c] (KJ/mol)	OH_{strong}[c] (KJ/mol)	$OH_{sodalite}$[c] (KJ/mol)	$OH_{hexagonal}$[c] (KJ/mol)
NH_4-Y	100	5.5	2.471				
as-prepared USY	61	5.6	2.457	112		117	107
USY-NH_3	96	5.6	2.456				
Oxalic-USY	62	6.0	2.445				
NH_4Cl-USY	77	5.9	2.455	135	153	145	147
NH_4NO_3(0.1M)-USY	65	5.6	2.452	138	155	151	154
NH_4NO_3(2.3M)-USY	85	6.8	2.452	135	153	148	147

a: Determined from ^{27}Al MAS NMR spectra
b: Determined from X-ray fluorescence analysis
C: Determined from NH_3 IRMS-TPD methods [1]

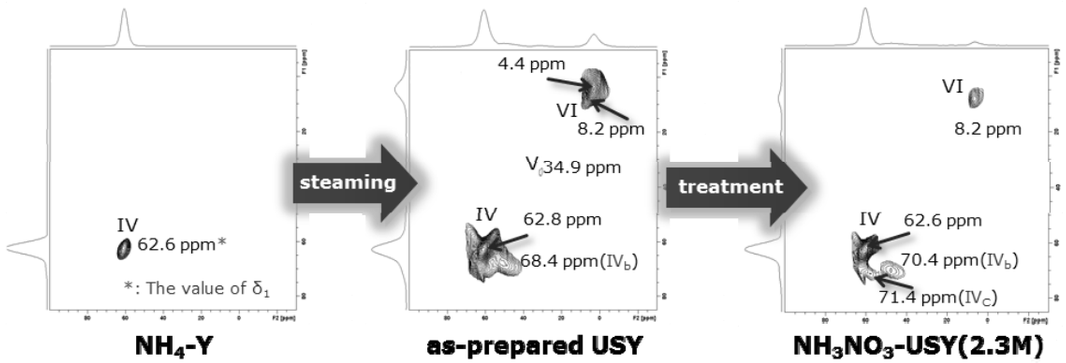


Figure 1. ^{27}Al MQMAS NMR spectra at 14.1 T.

References

[1] K. Okumura, T. Tomiyama, N. Morishita, T. Sanada, K. Kamiguchi, N. Katada, M. Niwa, *Catal. Appl. A*, 405 (2011) 8.
[2] N. Katada, S. Nakata, S. Kato, K. Kanehashi, K. Saito, M. Niwa, *J. Mol. Catal. A.* 236 (2005) 239.

P91

同種核 REDOR NMR 法による層状複合材料中のゲスト分子包摂状態の研究

○櫻木 隆広[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

Homonuclear REDOR NMR study of the local arrangement of the guest molecules in layered nanocomposites

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 studied the structure and physical properties of layered composites such as stacked graphite sheets with a C_{60} fullerene monolayer (C_{60}-Gs), and those with a C_{70} fullerene monolayer (C_{70}-Gs). In this study, we explore the use of a simple rotational-echo double resonance (REDOR) technique for homonuclear spins as a means of determining whether the guest molecules in such layered composites are intercalated between the host structures. This simple technique employs Gaussian soft π pulses to produce a reduction in rotational echo amplitude. It is verified that for homonuclear spin pairs, the reduction in rotational echo amplitude is produced by the simple technique. In addition, we investigate whether the reduction in rotational echo amplitude can be detected on the layered composites C_{60}-Gs and C_{70}-Gs, where the host components have the natural abundance of ^{13}C.

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の固体NMR測定を行うことにより，この『超低摩擦』のメカニズムとして，膨潤化したグラファイトの層間内にあるC_{60}-Gsの運動状態が関係していることを明らかにした．一方，グラファイトの層間にフラーレンが封入されていることを確認する目的で，試料の粉末X線測定とTEM像観察を行ったが，フラーレンの封入を示す直接的な実験結果は得られなかった．これらの結果を受けて，我々は 昨年度 シンプルな同種核REDOR NMR法を考案し，その手法を用いることでフラーレンの封入を確認できるかどうかについて 検証を行った．本研究では，同種核REDOR NMR法の「適用条件・適用限界」を明らかにするために，同手法の平均ハミルトニアンを導出する．そしてそれに基づいて性能（核間距離を明らかにする手法としての性能）評価も行う．

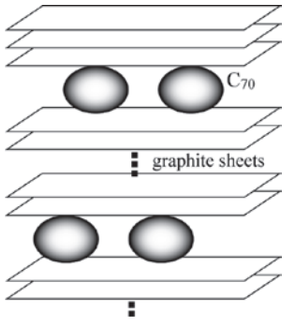


Figure 1.
Schematic representation of the C_{70}-Gs nanocomposite.

キーワード：層状複合材料，同種核，REDOR

○さくらぎ たかひろ，くわはら だいすけ

続いて，平均ハミルトニアンの解析式を使い，回転エコー減衰（REDOR減衰）曲線を計算して，標準サンプルを使った実験結果と比較する．最後に，この手法をC_{60}-Gs，C_{70}-Gsに適用して，同種核におけるREDOR減衰が観測されるかどうかを確認し，ゲスト分子の封入状態について議論を行う．

2. パルス系列と平均ハミルトニアン

本研究で用いたパルス系列を Fig. 2 に示す．スピン I, S は同種核スピンで，系列 I, 系列 S はともに同種核（例: ^{13}C）に照射される．また I, S は化学シフト差 δ をもつことを前提としている．スピン I, S の選択的励起を行うために Gaussian π pulses を使用することから，試料回転は 1kHz 程度の周波数で行うことになる．

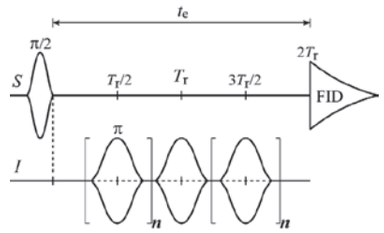


Figure 2.
Homonuclear REDOR pulse sequence.

$n=1$の場合が最も基本的なパルス系列であり，その場合の平均ハミルトニアンは下記のようになる．

$$\overline{\mathcal{H}}_d^{(0)} \cong -\frac{1}{\pi}\tilde{a}_s^{(1)} d_{12}^{(1)}(\beta)\sin\gamma \cdot 2I_z S_z - \frac{1}{\pi}\left\{\sum_{m=1,2}\tilde{a}_c^{(m)} d_{12}^{(m)}(\beta)\cos m\gamma\right\}\cdot 2I_y S_z$$

$$+ \sum_{(\alpha,\beta)\neq(z,z),(y,z)} \Omega_{\alpha\beta}\cdot I_\alpha S_\beta, \quad (\tilde{a}_s^{(1)} = 3.912, \tilde{a}_c^{(1)} = -1.113, \tilde{a}_c^{(2)} = 0.318).$$

上記の平均ハミルトニアンをもとに，第 3 項以降のハミルトニアンの数値計算を行った結果「“$\kappa = \delta/\omega_r \geq 6$”の条件において，同種核スピン系に対する（上記の）REDOR実験は，異種核スピン系に対する REDOR 実験と等価となる」ということが明らかになった（ω_r: 試料回転周波数）．

3. 結果・議論

続いて，$n=1, 2, 3, 4$ に対応するFig.2のパルス系列を使って，標準サンプル*L*-alanine (all ^{13}C labeled sample) 上でREDOR実験を行った．Fig. 3はその結果である．実線は平均ハミルトニアンの解析式を使って数値計算したREDOR減衰曲線で，■は，左より，$n=1, 2, 3, 4$ の実験から得られたREDOR減衰の値を示す．点線は，異種核REDOR実験の下での回転エコー減衰曲線である．理論計算と実験結果はよく一致しており，このことから，同種核REDOR NMR法は，他の多くの“同種核双極子測定法”と同様に同種核間距離測定に資することがわかる．続いて，C_{60}がグラファイト層間に封入されているかを検証するために，C_{60}-Gsに対して$n=1$のREDOR実験を行った．結果としてC_{60}-Gsについては，有意な回転エコー減衰が観測されなかった．これはホスト構造内でC_{60}が非常に速い等方的再配向を行っているためと考えられる．会場ではC_{70}-Gsに対する実験結果，C_{70}の封入状況とともに，同種核のREDOR減衰が観測可能なゲスト分子とホスト構造の組み合わせについて報告する．

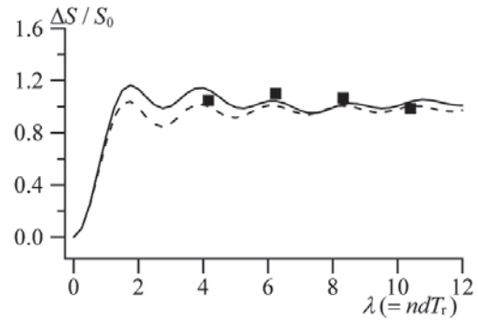


Figure 3. Calculated REDOR reductions for homonulcear spin pairs (a solid line) and for heteronuclear spin pairs (a broken line). The solid squares represent the REDOR reductions experimentally observed.

[1] N. Sasaki, K. Miura, Jpn. J. Appl. Phys. 43, 4486 (2004).

P92 ゴム素材の静止状態^{13}C NMR化学シフトと磁化率

○北村成史[1]，浅野敦志[1]，畑慶明[2]，安岡宏[2]，黒津卓三[1]
[1]防衛大・応用化学
[2]防衛大・応用物理

Strain Induced Static State ^{13}C NMR Chemical Shift and Magnetic Susceptibility of Rubbers

○Masashi Kitamura[1], Atsushi Asan·[1], Y·shiaki Hata[2], Hir·shi Yasu·ka[2], Takuz· Kur·tsu[1]
[1]*Department ·f Applied Chemistry, Nati·nal Defense Academy, Kanagawa, Japan.*
[2]*Department ·f Applied Physics, Nati·nal Defense Academy, Kanagawa, Japan.*

We investigated the effect of deformation of rubbers resulting from the high centrifugal pressure of fast MAS on ^{13}C NMR spectra. The static state ^{13}C DD NMR spectra of the rubbers after MAS presented broad and apparently anisotropic peaks. We discussed the origin of the ^{13}C chemical shifts and concluded that the anisotropic peaks are caused by the differences in the magnetic susceptibility according to the molecular orientation.

＜諸言＞

未加硫天然ゴム (NR)の固体DDMAS ^{13}C NMRスペクトルは、極めて尖鋭なピークとして観測される (Fig.1(a))。これは、NRのガラス転移温度が約–70°Cと低く、固体状態といっても比較的流動的な物性だからである。固体 DDMAS実験後のNRは、ローター内壁に張り付いて圧延した状態となる。この状態で静止状態^{13}C NMRスペクトルを測定すると、Fig.1(b)に示すように、見かけ上2本のピークとして観測されることは、前回のNMR討論会で報告した[1)]。また、MASにより圧延された円筒形のNRを短冊状に切り取り、MASプローブを用いて静磁場に対し、45°ずつローターを回して静止状態で^{13}C NMRスペクトルを測定すると、角度依存性を示し、全てのピークの化学シフト値が周期的に変化する。この変化は、分子配向による化学シフトの異方性のみでは説明できず、二重結合が関与しているのではないかと前回結論づけた[1)]。その後、短冊状NRの磁化率が、試料を静磁場方向に対して平行と垂直にすると異なる値を示すことを見出し、磁化率とNRの化学シフトの関係について学会誌に発表した[2)]。しかしながら、MAS角でNMRスペクトルを測定したため、化学シフト値が変調され、定量的な議論に曖昧さが残った。

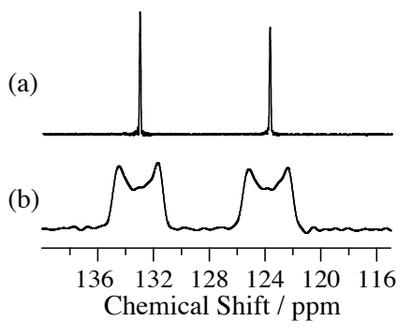


Fig.1. ^{13}C NMR spectra of NR. (a) MAS of 9 kHz (b) Static state.

そこで本研究では、JE·L製のStaticプローブを用いて同様の実験を行い、静磁場に対して正確な角度依存スペクトルを取得し、磁化率と比較した。また、NR同様に二重結合をもつシス-1,4-ポリブタジエン (BR)と二重結合をもたないポリイソブチレン(PIB)を用いて実験を行い、化学シフト値と磁化率との関係について定量的に議論した。

＜実験＞

天然ゴム(NR)は、日本ゴム協会・新世代エラストマー技術研究分科会を通して豊田通商から提供されたRSS#1グレードを用いた。ポリイソブチレン(PIB)はAldrichから購入した。ポリブタジエン(BR)は、シス1,4型が97%を、新世代エラストマー技術研究分科会を通して日本ゼオンから得た。

固体^{13}C NMRスペクトルは、Varian NMR systems 400WB型を用いて測定した。プローブは、Varian社製MASプローブとJE·L社製Staticプローブを用いた。磁石には、Fig. 2に示すように台座を作製して設置した。シム調整は、純水の^{1}H NMR信号を用いて行った。

ゴム素材の圧延制御は、テフロンスペーサーの長さを変えることで行った。圧延伸長は、MAS速度9 kHz、60ºC/12時間で行った。

質量磁化率(χ_m)の測定は、Quantum Design社のMPMS-XL5を用い、磁場を0から4 MA·m^{-1}に掃引して行った。



Fig. 2. Static Probe and a pedestal handmade by our Lab.

＜結果・考察＞

Fig. 3は、異なった長さに圧延伸長制御したNRの静止状態^{13}C NMRスペクトルを示している。測定は全てMAS後のスペクトルであり、(a)がStaticプローブ、(b)がMASプローブを用いて測定したスペクトルである。(a)と (b)を比較すると、どちらも圧延伸長度が大きくなるにつれて1本のピークが2本に分裂していく様子が見て取れる。分裂幅は、3.4 mm(6 mmϕローター長軸方向の長さ)で封入したゴム素材(32 mg)が、最大に伸長される長さ20 mmの時、最大となり、(a)で約7 ppm、(b)で約3 ppmだった。この違いは、静磁場に対してMASプローブが54.7°傾いているために起きていると考えられる。木村らは[3)]、加硫NRを強制的に円筒状に2倍延伸し、静止状態^{13}C NMRスペクトルを観測した。2倍に円筒状に引っ張った場合には、分裂幅が約4.5 ppmのピークとなった。我々が観測した分裂幅は、約7 ppmと2.5 ppmほど広い。これは、加硫と未加硫の違い、また、本実験の伸長度が約6倍と大きいためだと考えられる。

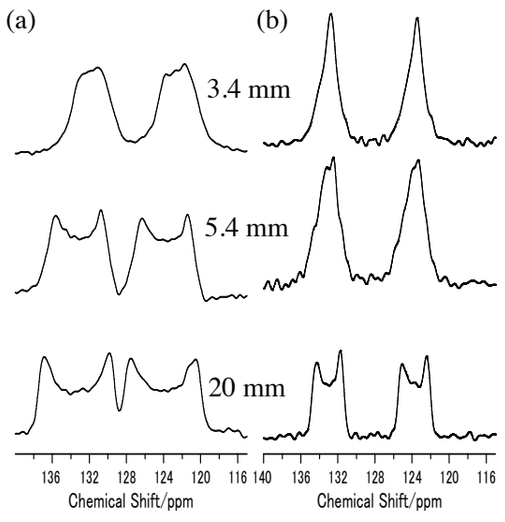


Fig. 3. Observed static state ^{13}C NMR spectra of NR. (a) Static probe, (b) MAS probe.

3.4 mmと5.4 mmの実験結果を比べると、MASプローブを用いた(b)のスペクトルでは、2本の分裂は観測されていない。しかし(a)のStaticプローブを用いた方では、5.4 mm

で明確な分裂ピークとして観測された。このことは、圧延されたNRの分子が配向し、静磁場と分子配向方向との成す角度が(a)と(b)とで異なったため、実際の^{13}C化学シフト値が変化したためと結論づけた。

分子配向が^{13}C NMR化学シフトにどのように影響しているか調べるため、ローター内の圧延された試料を、ローター長軸方向で短冊状に切り、再度ローターに同じ方向で短冊状の試料を封入して角度依存^{13}C NMRスペクトルを観測した。Fig. 4に結果を示す。破線は、静磁場に対して分子配向軸が垂直 (0º と定義、ローター内の短冊状NRが下側にある)、実線が分子配向軸方向を平行(90º と定義、ローター内の短冊状NRが左側)にして測定したスペクトルを示している。(a)、(b)はそれぞれStaticプローブ、MASプローブを用いて測定した結果を示している。ここで興味深いのは、MASプローブにおいて5.4 mmのスペクトルが破線と実線でほぼ一致した化学シフトにピークが観測されるのに対し、Staticプローブでは、破線が高周波数側に観測されることである。破線のピークが高周波数側に観測される現象は、木村らの結果とも一致する[3)]。しかし、3.4 mmでは、(a)、(b)どちらも破線のピークは等方的化学シフト値よりも低周波数側に観測されている。逆に実線のピークは、高周波数側に現れる。このような化学シフト値の変化と、質量磁化率の変化との関連性を調べた。

Fig. 5に、圧延伸長度の異なるNRの磁化率とMASプローブを用いて観測した化学シフト値の変化量をプロットした。また、Fig. 6にはStaticプローブを用いて得た結果をプロットした。磁化率測定は、NMR測定と同じように、静磁場に平行、垂直方向の2つの方向で行った。Fig. 5では、試料が最初から静磁場に対して分子配向軸と$\mathbf{B_0}$方向にθの角度となっているとして解析した。単位磁化率当たりの化学シフト値の変化量をk、0ºと90ºの関係式の交点からのずれをαとβとすると、質量磁化率χ_mとΔδとの間に

$k_i \cdot a_i \cdot \sin\theta_i = \Delta\delta_i$、 $k_j \cdot \beta_j \cdot \cos\theta_j = \Delta\delta_j$

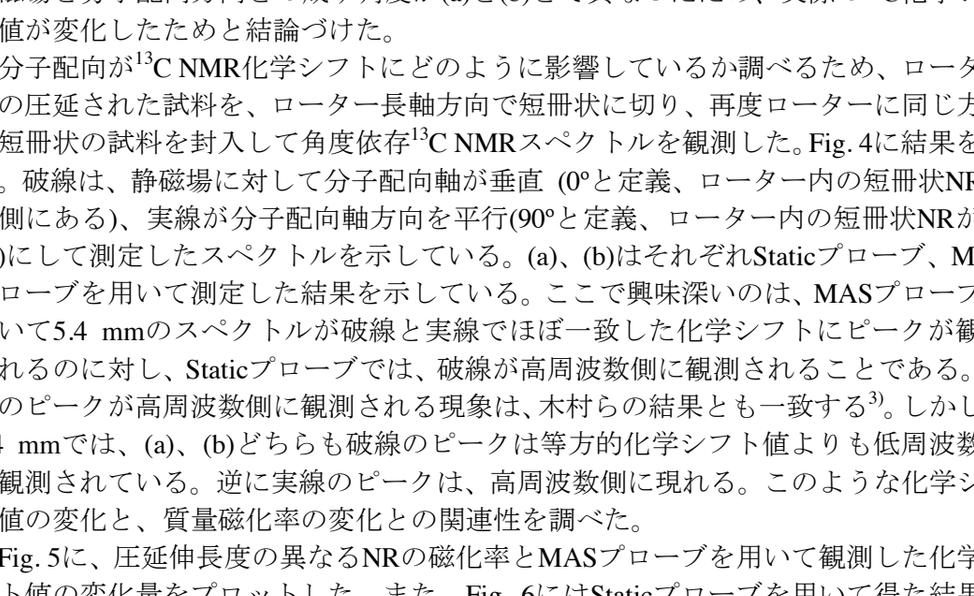


Fig. 4. Angle dependent ^{13}C NMR spectra (0º and 90º) with (a) Static and (b) MAS probes.

が成り立つと仮定した。Fig. 5よりkは3.6 ppm·m^{-3}·kg^{1}と求められた。単位磁化率当たりの化学シフト値の変化量は静磁場と試料の方向とに無関係となった。このことは、解析が合理的であることを示している。また、Fig. 6ではStaticプローブを用いていることから、χ_mとΔδとの関係は、どちらも静磁場方向への分子配向方向の関係は一致している。現在より詳細に磁化率と化学シフト値との関係を解析中である。

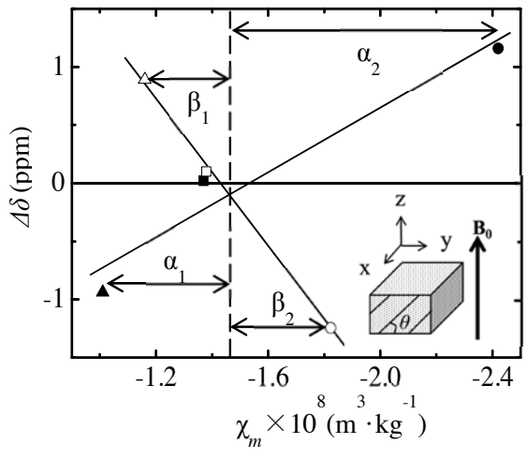


Fig. 5. The chemical shift difference Δδ from the isotropic chemical shift value δ_{iso} using a MAS probe against the mass magnetic susceptibility χ_m. The insert represents the effective angle between the double bond of NR and the static magnetic field $\mathbf{B_0}$. The chemical shift was obtained from the 3.4-mm-long cylindrical NR (▲ and △), the 5.4-mm-long cylindrical NR (■ and □), and 20-mm-long cylindrical (● and ○) of NR. The sample direction for the solid symbols corresponds to 0º defined in Figure 4 and for the open symbols to 90º.

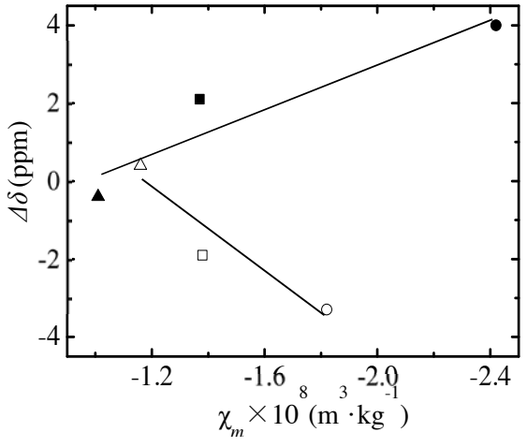


Fig. 6. The chemical shift difference Δδ from the isotropic chemical shift value δ_{iso} using a static probe against the mass magnetic susceptibility χ_m. The symbols are the same as those in Fig.5.

【謝辞】 JEOL製Staticプローブを貸していただいた、東京農工大学の朝倉哲郎先生にお礼申し上げます。この研究は、日本ゴム協会・新世代エラストマー技術研究分科会の研究の一環として行われています。

1) 北村成史ら、第50回ＮＭＲ討論会国際シンポジウム、要旨集 pp.340-341.
2) Masashi, K. et. al., *P·lym. J.* **44**, 778-785 (2012)
3) Kimura, H. et. al., *P·lym. J.* **42**, 25- 30 (2010)

固体^{13}C NMR，ゴム素材，磁化率

○きたむらまさし，あさのあつし，はたよしあき，やすおかひろし，くろつたくぞう

P93 高圧水素シール用ゴム材料の水素膨潤挙動の解明

○藤原 広匡(1), 西村 伸(1,2)
1) 産業技術総合研究所(AIST)
水素材料先端科学研究センター（HYDROGENIUS）
2) 九州大学大学院工学研究院機械工学部門

Study of volume expansion in rubber for high pressure hydrogen sealing in terms of dissolved hydrogen

○Hirotada Fujiwara[1], Junichiro Yamabe[1,2] and Shin Nishimura [1,3]
1 National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)
Research Center for Hydrogen Industrial Use and Storage (HYDROGENIUS)
2 Department of Mechanical Engineering in Faculty of Engineering, Kyushu University

Rubber material used for sealing high-pressure hydrogen storage vessels loses its sealing property due to the swelling (volume expansion) caused by the hydrogen dissolved into the material during hydrogen exposure. We have reported results of solid state NMR measurement of the dissolved hydrogen in rubber existing in two characters having significantly different mobility. In this study, we evaluate the characters and content of the hydrogen, which affects swelling of rubber. Under the condition lower than 10MPa, only the hydrogen with larger mobility was observed and volume expansion did not occur. The volume expansion was observed only in the condition higher than 10MPa. It was ensured that only the hydrogen with smaller mobility contributes to volume expansion of rubber.

【緒言】水素貯蔵容器に用いられる高圧水素ガスシール用ゴム製 O リングは高圧水素曝露によりゴムに溶解した水素が原因となって，膨潤による座屈破壊や，O リング溝からのはみ出しによるき裂が生じ，シール性が担保出来なくなる [1)]．高圧水素曝露により溶解した水素の状態は固体 NMR を用いた直接観察により異なるケミカルシフトと緩和時間を持つ2種の状態で存在することを確認した [2)]．本研究では高圧水素ガスシール用ゴム材料設計指針確立のため，異なる水素圧力で曝露することによりアクリロニトリルブタジエンゴム（NBR)中に溶解した水素の状態と濃度を固体 NMR にて測定し，溶解した水素の濃度と膨潤挙動との関係を検討した．

【実験】円筒状に成形したフィラー未配合加硫 NBR 試料をピンホール付きジルコニアローターに充填後，純度 99.999%水素ガスにて圧力 10～100MPa・30 ・24 時間曝露した．曝露後，ケミカルシフトのリファレンスとしてシリコンゴム(0ppm)が装着されているローターブレードをローターにセットし，超伝導固体 NMR（Bruker BioSpin 製 AVANCE-Ⅲ500MHz）によりシングルパルス測定を行い各圧力における溶解水素を測定した．寸法測定はジルコニアローターと同径ガラス管にゴムを充填し水素曝露した後，オリンパス(株)製測長ステージ付きマイクロスコープ STM6(10 倍)で寸法測定し体積を求めた．

【結果・考察】図 1 に無機添加剤である酸化亜鉛及び硫黄未配合の過酸化物加硫 NBR(NFT)と添加剤を配合した硫黄加硫ゴム(NF)を 100MPa の圧力条件のもと水素曝露し除圧後 1 時間経過した時点で NMR 測定した結果を未加硫原料ゴムのスペクトルと比較して示す． NBR に帰属されるピーク以外に 4.3ppm[A]と 4.8ppm[B]にブロードピークが観測され，時間の経過と共に[A][B]共にピーク強度は減少し最終的に消滅した．[A][B]は NF，NFT 共に同じケミカルシフトを有することから，NF のみに配合された酸化亜鉛及び硫黄に吸着した水素でないことが確認された．従って今回の曝露条件における膨潤挙動はすべてゴム分子中に溶解した水素に起因することが示唆された．縦緩和時間(T1)は Saturation recovery 法による測定の結果，T1[A] ＝ 0.01s，T1[B] ＝ 0.69s と見積もられた．[B]は[A]に比べ T1 が大きく，また，ピークの半値幅が狭いことから，[A]に比べて大きい運動性を持つことが示唆され，自由体積中に溶解した水素と考えられる．一方，[A]は広い半値幅を有する為，ゴム分子鎖と強い相互作用を示す運動性の低い水素と考えられる．

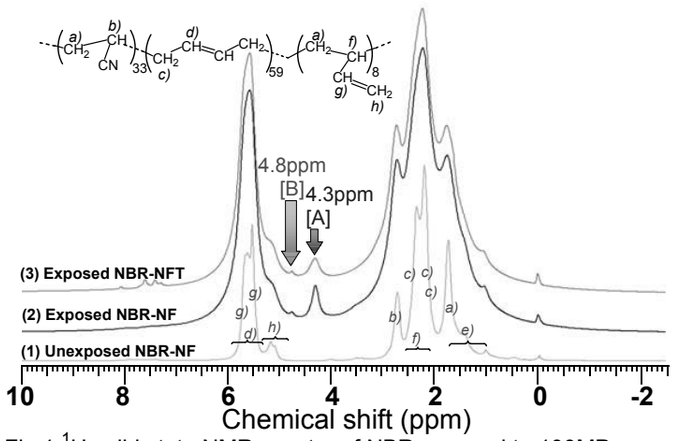


Fig.1 ^{1}H solid state NMR spectra of NBR exposed to 100MPa one hour after decompression. [MAS speed (1):35kHz, (2)(3):8kHz]

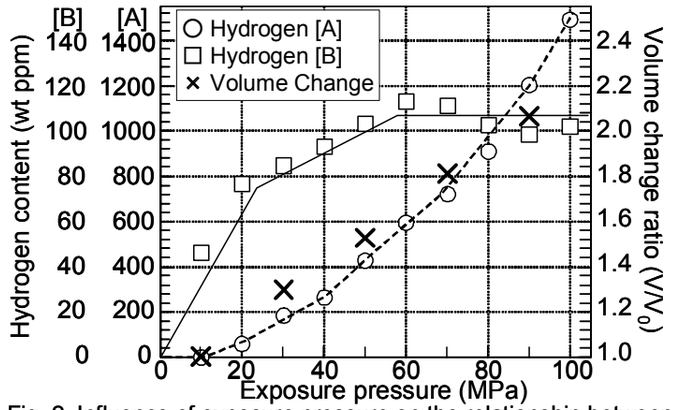


Fig. 2 Influence of exposure pressure on the relationship between dissolved hydrogen content and volume expansion ratio one hour after the exposure at 30°C (left axis shows hydrogen content [A] and [B] in different range, right axis shows volume expansion ratio)

図 2 に各圧力で曝露した試料に溶解した水素の曝露後 1 時間経過した時点での[A][B]の濃度と膨潤挙動の関係を示す．曝露圧力の増加に従い，溶解水素の増加が確認出来たが，10MPa の曝露圧力では，[A]の水素は確認されなかった．曝露圧力の増加に伴い水素がゴム分子鎖の凝集構造中に侵入したためと考える．一方，[B]の水素は，曝露圧力の増加に従い，溶解水素の急激な増加が確認されたが，60MPa 以上の圧力では変化を示さなかった．NBR 中の自由体積が溶解水素により飽和したためと考える．曝露圧力の違いによるケミカルシフト及び T1 の変化は観測されず，溶解水素の状態は圧力の違いによって変化しないことが確認された．曝露圧力の増加に従い体積の増加が確認されたが，[A]の水素が存在しない 10MPa 水素曝露後の試料では，体積の増加は確認されなかった．膨潤現象には運動性が小さい [A]の水素濃度が関与していることが示唆された．

1)) J. Yamabe, S. Nishimura, *Int. J. Hydrogen Energy*, **34**, 1997 (2009).
2) H. Fujiwara and S. Nishimura, *Polym. J.* **44**, 832 (2012).

【謝辞】. 本研究成果の一部は，NEDO 技術開発機構の水素材料先端科学基礎研究事業（平成 18 年度～平成 24 年度）の一環として行ったものである．

Hydrogen GAS, Rubber, Solid state NMR

○ ふじわらひろただ，にしむらしん

P94

^{2}H, ^{27}Al NMRによるアルギン酸ゲルのダイナミクス解析

○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

Dynamics of alginate gels as studied by ^{2}H, ^{27}Al NMR

○Yoshihide Kumagai, Ryutaro Ohashi, Tomonori Ida, and Motohiro Mizuno
Graduate School of Natural Science and Technology, Kanazawa University, Ishikawa, Japan.

Alginic acid forms gels by taking in multivalent metals, which get to cross-linking. In this study, the local structure and the dynamics of water molecules in alginate gels were investigated by ^{2}H, ^{27}Al NMR. The water molecules in alginate gels could be classified into three groups, namely fast, middle and slow components by ^{2}H partial relaxation spectra. The motional modes of fast, middle and slow components are fast free rotation, small-angle flip and slow free rotation, respectively. By spin-lattice relaxation time of copper alginate gel, it was found that fast component exists in the egg-box conformation and middle component is close to the egg-box conformation.

【緒言】　アルギン酸は、多価の金属を取り込むとそれを架橋としてゲルを形成する。二価金属のアルギン酸ゲルでは、その架橋構造はFig. 1のようなエッグボックス構造をとることが知られている[1]。ゲルの硬度は水和量によって変化することから、アルギン酸ゲル中の水の状態はゲルの物性に大きく関与していることが予想される。本研究では、^{2}H, ^{27}Al NMRを用いて二価と三価の金属のアルギン酸ゲル中の水分子のダイナミクスと局所構造を調べた。

【実験】　二価金属のアルギン酸ゲルの試料には、水和量93 wt%のカルシウムのゲル（Alg-Ca）と水和量95 wt%の銅のゲル（Alg-Cu）を用いた。三価金属のゲルの試料には、水和量75 wt%のアルミニウムのゲルを用いた。それぞれの試料は、重水で合成した。NMR測定にはJEOL ECA-300分光器を用いて、^{2}Hと^{27}Alの共鳴周波数はそれぞれ45.28 MHzと76.86 MHzで行なった。Alg-CaとAlg-Alは、^{2}H, ^{27}Alともに四極子エコー法で測定した。Alg-Cuは常磁性金属のゲルであるため、エキソサイクル四極子エコー法を用いた。スピン - 格子緩和時間T_1の測定には反転回復法と飽和回復法を用いた。

【結果と考察】　Fig. 2(a)は、223 Kで測定したAlg-Ca中の水分子の^{2}H NMR部分緩和スペクトルで、図中のdelayは、90°パルスを連続照射して飽和させた後の待ち時間である。これを、運動による緩和を考慮してスペクトルシミュレーションを行なった。シミュレーションに使用した四極子結合定数e^2Qq/hと非対称定数ηはれぞれ210 kHzと0.1である。その結果、ゲル内の水分子は速い等方回転（fast成分）、小角フリップ（middle成分）、遅い等方回転（slow成分）の三成分に分離することができた。シミュレーションから得られたfast成分、middle成分、slow成分それぞれの運動の速さと存在比をTable1に示す。

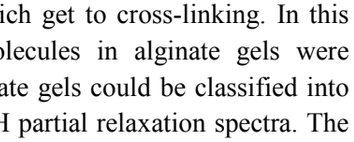


Fig. 1 egg-box structure

Table 1　Parameters determined by the simulation of Alg-Ca

component	correlation rate	abundance ratio
fast	1×10^8 Hz	0.013
middle	2×10^7 Hz	0.018
slow	4×10^3 Hz	0.97

これら三成分の水分子の位置を決定するために、Alg-Cu中の水分子の^{2}Hスピン - 格子緩和時間T_1を測定した。slow成分のT_1は常磁性緩和の寄与は見られなかったため、銅原子から遠い位置に存在していることがわかる。fast成分とmiddle成分のT_1においては顕著な温度依存性はみられず、常磁性緩和に支配されていることがわかった。fast成分のT_1は0.8 msec、middle成分のT_1は6 msecとなった。これらと次の式を用いて、架橋金属と^{2}H核間の距離 r を見積もった。

$$\frac{1}{T_1}=\frac{2}{15}\frac{\gamma_1^2 g^2 s(s+1)\beta^2}{r^6}\left(\frac{3\tau_e}{1+\omega_1^2\tau_e^2}+\frac{7\tau_e}{1+\omega_s^2\tau_e^2}\right)$$

ここでτ_e は電子スピンの 相関時間である。ESRから$\tau_e = 1.91\times10^{-10}$ secと求めた。これらを用いて架橋金属から水分子までの距離を見積もると、fast成分は2.6 Å、middle成分は3.6 Åとなった。fast成分の水分子はエッグボックス内の空間に孤立して存在していると考えられる。また、middle成分の水分子もエッグボックス付近に存在していることがわかった。

Alg-Alでも同様の結果が得られた(Fig. 3, Table 2)。よって、三価金属のアルギン酸ゲルもエッグボックス構造を形成すると考えられる。当日は、^{27}Al NMRについても発表を行なう。

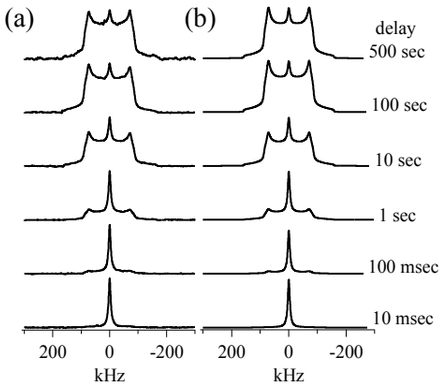


Fig. 2　^{2}H partial relaxation spectra of Alg-Ca at 223K. (a) is experimental spectra and (b) is simulation spectra. Parameters determined by simulation are written in Table 1.

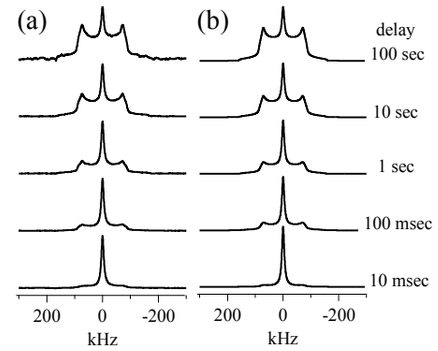


Fig. 3　^{2}H partial relaxation spectra of Alg-Al at 223K. (a) is experimental spectra and (b) is simulation spectra. Parameters determined by simulation are written in Table 2.

Table 2　Parameters determined by simulation of Alg-Al

component	correlation rate	abundance ratio
fast	1×10^8 Hz	0.05
middle	3×10^7 Hz	0.14
slow	4×10^3 Hz	0.81

Reference
[1]Grant, G. T.; Morris, E. R.; Rees, D. A.; Smith, P.J.C.; Thom, D.*FEBS Lett.* 1973, 32, 195

Biological polymer, Dynamics, Cross-linked structure

○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

P95

アミノ基を持つ高分子における二酸化炭素によるゲルの生成

高木　健[1]，小林未奈[1]，○前田史郎[1]，国本浩喜[2]
[1]福井大院工・[2]金沢大院自然

Characterization of gels from polymers which have amino group as a side chain and carbon dioxide as gellant

Ken Takagi[1], Mina Kobayashi[1], ○Shiro Maeda[1], and Ko-Ki Kunimoto[2]
[1]Division of Applied Chemistry and Biotechnology, Graduate School of Engineering, University of Fukui, 910-8507, Japan, and [2]Division of Material Engineering, Graduate School of Natural Science and Technology, Kanazawa University, Kanazawa 920-1192, Japan.

Formation of carbamates by bubbling carbon dioxide gas through aqueous solution of polymers which have side-chain amino groups to make an insoluble gel was studied by solid-state NMR. Some amino groups of polymer react with gaseous carbon dioxide to make carbamates, and others form ammonium groups. Self-assembly of ionic pairs of ammonium groups and carbamate anions leads to cross-linking of polymer and formation of gels. A carbonyl carbon resonance of carbamate anion appears at 164 ppm, and an amide nitrogen resonance appears at 85 ppm. A turbid white gel was formed in polyallylamine (PAA) aqueous solution with CO_2 bubbling for 35 sec. With additional CO_2 bubbling gel dissolved in water to make colorless solution at 75 sec. A large peak at 161 ppm in the ^{13}C NMR spectrum of films cast from PAA aqueous solution with CO_2 bubbling for 75 sec. It is probably the carbon resonance of bicarbonate anion, HCO_3^-. The hydrogels of microbial poly(ε-L-lysine)/carboxymethyl cellulose sodium salt (ε-PL/CMC hydrogel) were formed by bubbling carbon dioxide through ε-PL and CMC aqueous solution mixture. Characterization of hydrogels was done by using ^{13}C and ^{15}N solid NMR, and IR. Solid NMR measurements show a little formation of carbamates in ε-PL. IR measurements implies that there may be poly-ionic interaction between ε-PL-NH_3^+ and CMC-COO^- to make water insoluble hydrogels.

【はじめに】側鎖にアミノ基(-NH_2)を持つ高分子の水溶液に二酸化炭素ガス(CO_2)をバブリングすることによって，側鎖アミノ基(-NH_2)の一部がカルバメート化(-$NHCOO^-$)し，同時に形成されるアンモニウム基とイオン結合して架橋が生じ，ゲルが生成することが知られている[1,2]。私たちは，微生物産生高分子ポリ（ε-L-リジン）(ε-PL)におけるカルバメート生成を^{13}Cおよび^{15}N固体NMRを用いて明らかにするとともに[3]，ε-PLとカルボキシメチルセルロースナトリウム塩(CMC)の混合水溶液にCO_2をバブリングすることによって不溶性のハイドロゲルが生成することを見出した[4]。

Carbon dioxide, solid NMR, Gel

たかぎ　けん，こばやしみな，○まえだしろう，くにもとこうき

【実験】PAA(日東紡績(株))は濃度20%水溶液を用いた。CO_2をバブリングしたPAA水溶液をテフロンシャーレにキャストし, 減圧乾燥してフィルム試料を作成した。ε-PLは遊離型（チッソ(株)提供）を用いた。別々に調製したε-PLとCMC水溶液を，モノマーユニットのモル比がε-PL/CMC= 2/1，1/1，および1/2になるように混合し，室温で攪拌しながらCO_2バブリング（200 mL/min）を行った。生じたε-PL/CMCハイドロゲルを減圧乾燥の後，^{13}Cと^{15}N固体NMRおよびIR測定を行った。固体NMR測定にはChemagnetics CMX Infinity 300を用いた。

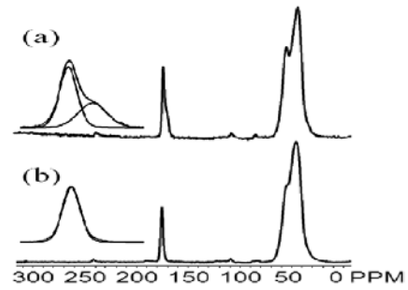


Fig. 1. ^{13}C spectra of PAA films cast from PAA aqueous solution with (a) 75 sec and (b) 35 sec CO_2 bubbling (200mL/min), respectively. Curve -fittings for C=O resonances are shown in the insets.

【結果と考察】Fig. 1に，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。バブリング時間が35秒のスペクトルでは、164 ppmにカルバメートのカルボニル炭素のピークが現れた[3]。^{15}Nスペクトルでは，PAA側鎖のアミノ基(-NH_2)は20ppmに，PAA塩酸塩ではNH_3^+が40ppmに現れた。また，PAAゲルでは中間の30ppmにピークが現れた．PAA水溶液にCO_2をバブリングすると白濁してゲルが生成するのは，-NH_3^+と-$NHCOO^-$ の間のポリイオンコンプレックス形成に起因していると考えられる．一方，バブリング時間が75秒のスペクトルでは，164ppmのピークの他に161ppmにピークが現れた。おそらくこれは炭酸水素イオン(HCO_3^-)のピーク[5]であると考えられる。ゲルが再び溶解するようになったのは多量のHCO_3^-の存在に起因すると考えている。

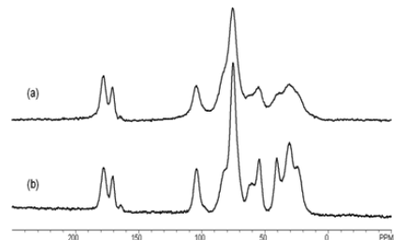


Fig. 2. ^{13}C spectra of ε-PL/CMC hydrogel (a) ε-PL/CMC=1/1, and (b) ε-PL/CMC=2/1.

Fig. 2にε-PL/CMC=1/1と2/1のハイドロゲルの^{13}C CPMAS NMRスペクトルを示す。ε-PL/CMC混合水溶液にCO_2をバブリングすると，ε-PL/CMC= 2/1および1/1の場合に淡黄色のゲルがすぐに形成された。一方，ε-PL/CMC=1/2のときは懸濁液となり，ハイドロゲルは形成されなかった。Fig. 2(a)と2(b)において，164 ppmのピークが小さいことからカルバメート化はほとんど起こっていない。171ppmおよび178 ppmのピークは，それぞれ，ε-PL-NH_3^+とCMCの主鎖アミドカルボニル炭素に帰属することができる。一方，ハイドロゲルでは側鎖α-NH_2基はプロトン化しており，ε-PL-NH_3^+とCMC-COO^-間の静電相互作用によって不溶性ハイドロゲルが形成されたと考えられる。

[1] E. Carretti, *et al., J. Am. Chem. Soc.,* **125**, 5121-5129(2003).
[2] V. Stastny, *et al.*, *J.Org. Chem.,* **71**, 8696-8705(2006).
[3] S. Maeda, *et al.*, *Polym. Bull.*, **68**, 745-754 (2012).
[4] S. Maeda, *et al.*, *Int. J. Mod. Phys. B,* **25**, 4315-4318 (2011).
[5] Y. Li, *et al.*, *Biochemistry,* **49**, 6887–6895(2010).

P96

多摂動二次元相関分光法

○新澤英之[1], 西田雅一[1], 兼松渉[1]
[1]産総研・計測フロンティア

Multiple-perturbation Two-dimensional Correlation Spectroscopy

○Hideyuki Shinzawa[1], Masakazu Nishida[1] and Wataru Kanematsu[1]
[1] *National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Chubu, Nagoya, Japan.*

Multiple-perturbation Two-dimensional (2D) Correlation Spectroscopy is presented. A system of interest is stimulated with more than two perturbations and the response is monitored in a form of sets of spectra described as a function of the perturbations. Synchronous and asynchronous correlation spectra derived form the data set reveal the similar and dissimilar variation behavior of the system induced by the perturbations. In this study, a practical example for the 2D correlation analysis is demonstrated with temperature- and composition-dependent NMR spectra of polylactic acid (PLA). For example, PLA shows gradual deformation when temperature is increased. Such thermal behavior may be influenced by the inclusion of the nanoparticle due to the possible interaction between the polymer and nanoparticle. By analyzing the 2D correlation spectra of the system, it thus becomes possible to derive penetrating insight into the polymer nanocomposite sample.

複数の摂動変化（温度，濃度，圧力，時間等）の下で計測されたスペクトルを，同時，異時という２つの相補的な相関指標によって解析する多摂動二次元相関分光法を開発した．この方法を用いてポリ乳酸ナノコンポジットの熱挙動の変化を調べた．ポリ乳酸の高分子構造は加熱によって構造変化を示す．この構造変化はナノ粒子を添加することによっても影響を受ける．多摂動二次元相関分光法は同時・異時相関スペクトルという2つの相関指標を調べることで，試料が温度やナノ粒子の添加量の変化によってどのように構造変化するかを詳細に調べることが可能になる．同時．異時相関スペクトルは温度の上昇に伴いアモルファス領域の高分子鎖のマイクロブラウン運動が誘発されること，さらにナノ粒子の添加によって高分子鎖が挟み込まれることでマイクロブラウン運動が抑制されるという効果を明らかにした．

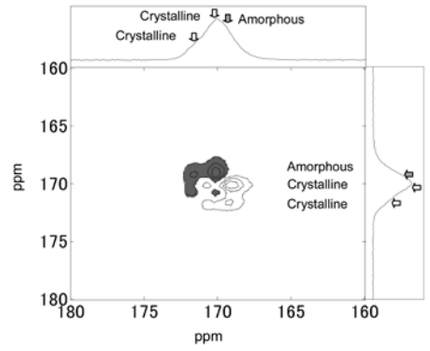


Fig. 1 2D correlation spectra derived from temperature- and compotation- dependent NMR spectra.

Multiple-perturbation 2D correlation analysis, Polylactic acid

○しんざわひでゆき，にしだまさかず，かねまつわたる

P97

トリメチルホスフィンオキシドを用いた固体表面の酸性質観測

○林　繁信，治村　圭子，小島　奈津子
産業技術総合研究所　計測フロンティア研究部門

Acid Properties of Solid Surfaces Probed by Trimethylphosphine Oxide

○Shigenobu Hayashi, Keiko Jimura, and Natsuko Kojima
Research Institute of Instrumentation Frontier, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST).

Evaluation of acid properties is important to develop new acid catalysts, because the catalytic activity is intimately related to the acid properties of the solid surfaces. In the present work, the acid properties were evaluated by means of solid-state NMR using trimethylphosphine oxide (TMPO) as a probe molecule. TMPO was introduced to the solid surfaces via a gas phase (a vapor method) as well as via a solution (a solvent method). The substances studied were silica (SiO_2), titania (TiO_2), and zirconia (ZrO_2), which were frequently used as catalyst supports. ^{31}P MAS NMR spectra were measured, and then the results for the vapor method are discussed compared with those for the solvent method.

【緒言】　省エネルギーおよび環境負荷低減のため、液体酸触媒に代わりうる固体酸触媒の開発が進められている。固体表面の酸性質は固体酸触媒の活性と密接に関係しており、新規な固体酸触媒を開発するためには固体表面の酸性質を評価することが重要である。酸性質を評価する手法には、アンモニア昇温脱離、赤外分光、固体 NMR などがある。固体 NMR では、プローブ分子を吸着させその固体 NMR スペクトルを測定して固体表面の酸性質を調べることができる。よく用いられるプローブ分子の一つにトリメチルホスフィンオキシド（TMPO）があり、^{31}P の化学シフト値からブレンステッド酸点の酸強度を調べることができる。通常 TMPO を溶媒に溶かして試料に導入し真空排気により溶媒を除去する方法（溶媒法）が用いられるが、対象物質の中には溶媒を容易に除去できない物質があり、その場合には溶媒が残留してしまう [1]。そこで、我々は、溶媒を用いないで気相から TMPO を導入する方法（気相法）を以前に提案した [2]。さらに、気相法をモルデナイトに適用した結果を報告した [3]。ところが、TMPO の導入できた量が非常に少なかった。本研究では、気相法を改良した結果を報告するとともに、溶媒法によっても試料を調製して NMR 測定を行い、気相法と溶媒法の比較・検討を行った。測定対象は、触媒担体としてよく用いられているシリカ、チタニア、ジルコニアを取り上げた。

【実験】　試料は、fumed silica （SiO_2、シグマ・アルドリッチ、表面積 200±25 m^2/g、粒子径 14 nm）、チタニアナノ粒子（TiO_2、アナターゼ、99.7%、シグマ・アルドリッチ、表面積 200～220 m^2/g、粒子径 25 nm 以下）、ジルコニアナノ粒子（ZrO_2、日本アエロジル、表面積 60±15 m^2/g、粒子径 21 nm）を用いた。

試料は 200°C で真空排気し、吸着水を除去した。その後、窒素ガス雰囲気下で TMPO を導入した。導入量は、試料重量に対して 5 mass%以下とした。気相法では固体 TMPO を、溶媒法では TMPO のジクロロメタン溶液を加えた。導入後、気相法では室温で真空排気した後、静的真空下で 100°C に加熱し、その後徐冷した。溶媒法では、室温で一晩静置した後、2 時間真空排気して溶媒を除去した。TMPO を吸着させた試料は、窒素雰囲気下で MAS ローターに充填した。

^{31}P MAS NMR 測定は、ブルカーASX400（共鳴周波数 ^{31}P: 161.98 MHz、^{1}H: 400.13 MHz）を用いて行った。^{31}P を直接励起して ^{1}H デカップリング下でシグナルを取り込んだ。85% H_3PO_4 基準でシフトを表示した。

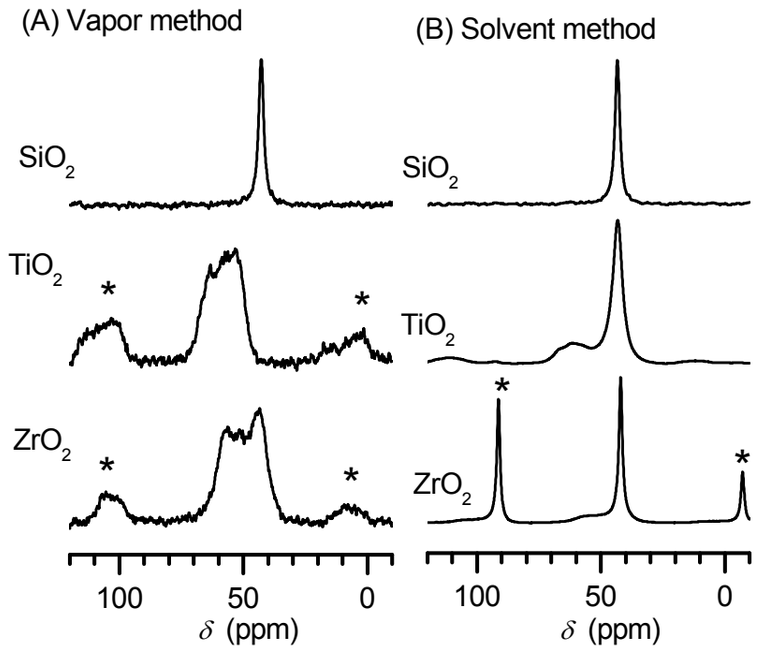


Fig. 1.　^{31}P MAS NMR spectra of TMPO-loaded samples.　* indicates spinning sidebands.　The spinning rates were 8.0 kHz.

【結果及び考察】　Fig. 1 に ^{31}P MAS NMR スペクトルを示した。シグナルが高周波数側に観測されるほど、酸強度が高くなる。気相法において、SiO_2 は 43 ppm にピークを示し、物理吸着した TMPO に帰属される。表面シラノール基がほぼ中性であることを示した。一方、TiO_2 は 65～50 ppm にシグナルが広がり、酸強度が SiO_2 より高いことを示した。ZrO_2 は、60～40 ppm にシグナルを示し、SiO_2 と TiO_2 の中間であることを示した。溶媒法では、SiO_2 は 43 ppm にピークを示し、気相法と同じ結果だった。TiO_2、ZrO_2 でいずれも気相法で観測された、酸点に吸着した TMPO が観測されたが、TiO_2 では 43 ppm に物理吸着した TMPO、ZrO_2 では 42 ppm に結晶 TMPO の強いシグナルが観測された。溶媒法では室温で吸着させたため、吸着量が多くなったためと考えられる。

本研究は、JSPS 科研費 23550236 の助成を受けた。

1) N. Kojima, S. Hayashi, Bull. Chem. Soc. Jpn., 84, 1090 (2011).　2) S. Hayashi, Chem. Lett., 38, 960 (2009).　3) S. Hayashi, N. Kojima, Micropor. Mesopor. Mater., 141, 49 (2011).

固体NMR，固体酸触媒，プローブ分子

○はやし　しげのぶ，じむら　けいこ，こじま　なつこ

P98 固体NMRによる木質系材料の水蒸気処理過程の解析

○西田雅一[1], 田中智子[1], 兼松渉[1], 三木恒久[1], 金山公三[1], 伊藤貴文[2]
[1]産総研中部, [2]奈良県森林セ

Solid State NMR Study of Stream Treatments of Woody Materials

○Masakazu Nishida[1], Tomoko Tanaka[1], Wataru Kanematsu[1], Tunehisa Miki[1], Kozo Kanayama[1], and Takafumi Ito[2]
[1]National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Chube, Nagoya, Japan.
[2] Nara Forest Research Institute, Takatori, Nara, Japan.

Superheated steam and saturated vapor processes for woody materials were monitored by ^{13}C CP-MAS and PST-MAS NMR. In the case of bamboo, the superheated steam attacked on CH_3 site of hemicellulose at first, and then content rates of cellulose and lignin increased owing to removal of hemicellulose. Treatment of bamboo with the saturate vapor also reduced hemicellulose and the residual lignin has high mobility owing to its low molecular weight. On the other hand, Japanese cedar was more stable for the superheated steam than bamboo and a certain amount of hemicellulose still remained even in the treatment at 260 ºC for 2h.

木質系バイオマスをはじめとする天然資源を信頼性の高い工業材料として利用するためには、物性値などの品質について保証する必要がある。固体NMR法は分子構造並びに運動性を非破壊で定性・定量的に検知することができることから、天然資源の品質管理に有効な評価手法である。

今回、我々は固体NMRを用いた木質材料のプロセス解析の一環として、木質材料の過熱蒸気処理過程について検討を行った。素材としては、発筍後８ヶ月のタケ（モウソウチク）切片とスギ柾目板を用いた。過熱水蒸気処理は常圧の飽和水蒸気を220ºC～260ºCで加熱することで発生させ、試料を2～4時間処理することにより行った。蒸煮処理は200ºCの高圧飽和水蒸気中に、試料を30分間暴露することにより行った。タケは粉砕し、一部繊維形状が残る粉末を採取することで、また、スギは板から直接、微小な断片を切り出すことで、試料を固体NMR測定に供した。

Fig.1にa)未処理のタケ、b)～d)過熱蒸気処理タケ、e)蒸煮処理タケの^{13}C CP-MAS NMRスペクトルを示す。

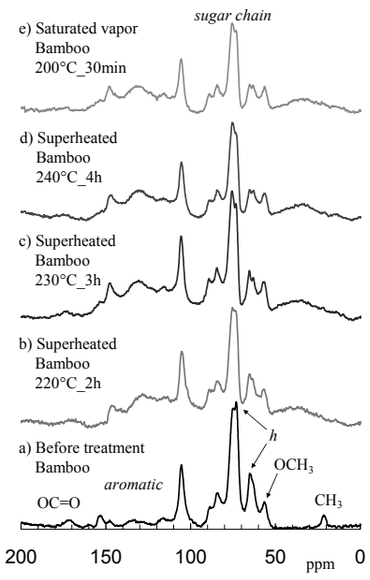


Fig. 1 ^{13}C CP-MAS NMR of bamboos denatured with steam.

Relaxation time analysis, PST-MAS NMR, Lignin

○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，いとうたかふみ

60～110ppmのセルロース糖鎖のピークに加え、ヘミセルロース（*h*: *sugar chain*, CH_3）やリグニン（OCH_3, *aromatic*, OC=O）のピークが未処理のタケから観察された。過熱蒸気処理では、ヘミセルロースのピークの減少が顕著であり、220ºCで2時間の処理を行った時点で、20ppm付近のCH_3が消失し、糖鎖のピークも大幅に減少していた。また同時に、110 ppmから160 ppmまでのリグニンの芳香環のピークが大幅に増大していた。一方、蒸煮処理でもヘミセルロースのCH_3が消失しているのは同様であるが、ヘミセルロースの糖鎖ピークの減少率とリグニン芳香環のピークの増加率は、過熱蒸気処理と比較して少なめであった。続いて、運動性の小さな部分の評価を行うために、^{13}C PST-MAS NMRの測定を行った。(Fig.2) リグニン芳香環のピークは、過熱蒸気処理よりも蒸煮処理ではっきりと検出することができ、過熱蒸気処理の場合と比較して、蒸煮処理後に残存するリグニンはより運動性が大きいことがわかった。

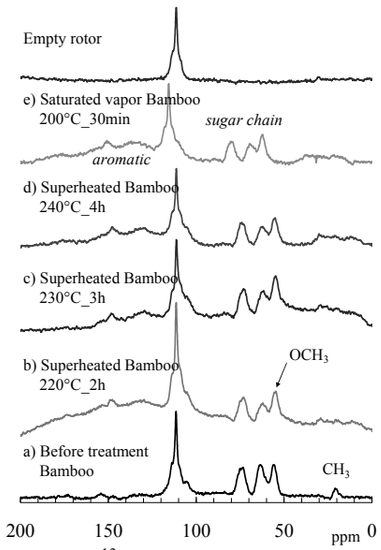


Fig. 2 ^{13}C PST-MAS NMR of bamboos denatured with steam.

次に、スギの過熱蒸気処理における^{13}C CP-MAS NMRの変化をFig.3に示す。未処理のスギもセルロース、ヘミセルロース、リグニンからなるピークパターンを示すが、タケとは異なり、ヘミセルロースのCH_3は検出されなかった。また、過熱蒸気処理でのピークの変化は小さく、タケの蒸煮処理の場合よりも、ヘミセルロースの減少率はさらに小さく、残存物に占めるリグニンの割合も大きく減少していた。一方、^{13}C PST-MAS NMRの結果(Fig.4)からは、リグニンの芳香環、OCH_3の両方が過熱蒸気の温度とともに増加していることから、リグニンの運動性が増加していることがわかった。

以上の結果から、タケの過熱蒸気処理ではヘミセルロースの分解が速やかに起こるのに対して、スギでは比較的ゆっくりと起こり、高温で処理を行ってもヘミセルロースが残存していることがわかった。過熱蒸気による処理後、リグニンの運動性の増加が見られるが、これは分子量の低下によるものであると推測された。一方、蒸煮処理の場合にはリグニンの運動性はより高く、ヘミセルロースの分解ともにリグニンの分解も並行して起こることがわかった。

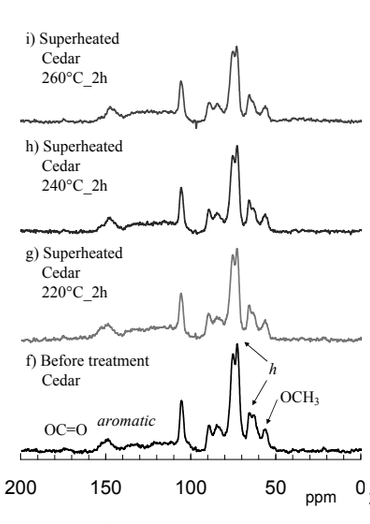


Fig. 3 ^{13}C CP-MAS NMR of cedars denatured with steam.

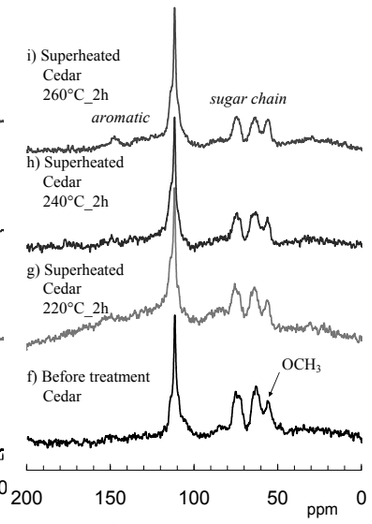


Fig. 4 ^{13}C PST-MAS NMR of cedars denatured with steam.

P99 ポリ乳酸系繊維の製造過程と劣化過程の解析評価

○西田雅一, 新澤英之, 田中智子, 兼松　渉
産総研計測フロンティア（中部）

Instrumental Analyses of Manufacturing and Degradation Processes of Polylactic Acid Fibers

○Masakazu Nishida, Hideyuki Shinzawa, Tomoko Tanaka, and Wataru Kanematsu
National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Chubu, Nagoya, Japan.

Polylactic acid (PLA) fibers were produced by melt drawing starting from pellets containing organic clay or polyesters in a 5-10% addition amounts. Weathering test of PLA fibers was performed in different draw ratio. Mechanical testing showed changing of tensile strength by degradation as well as by additives and stretch ratio. Addition of the organic clay explicitly reduced T_1H, while addition of the polyester mildly decreased T_1H. The melt drawing induced molecular orientation to increase T_1H according to the draw ratio except nanoclay composite fibers, of which T_1H values were more influenced by paramagnetic cation in the clay. In the cases of PLA and 5% nanoclay composite, T_1C increased with increasing exposure time of the weathering test because of decomposition of amorphous phase, while T_1C values of the polyester blends did not increase in the wreathing test.

固体NMR法を用いたグリーンポリマーの解析評価として、ポリ乳酸―ポリεカプロラクトン共重合体における緩和時間と力学データとの相関性[1)]や、ポリ乳酸ナノクレイクレイコンポジットのモルフォロジーが緩和時間に与える影響[2)]について、我々はこれまで報告している。今回、新たな解析対象として、ナノコンポジットやブレンド体を構成要素とするポリ乳酸(PLA)系繊維の延伸過程や劣化過程に対して、固体NMR法を中心とした計測手法により、緩和時間の変化がいかなる現象に起因するものであるかを調べた。

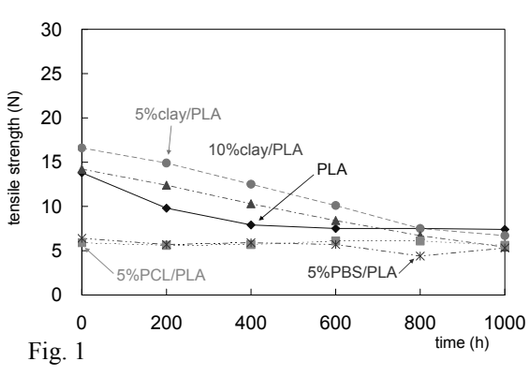


Fig. 1
Tensile strength against accelerated degradation

対象としたポリ乳酸系繊維は、ラボプラストミルにより混錬を行ったペレットを出発原料とし、二軸押出機とロール延伸機により３～６倍に紡糸・延伸したものを用いた。PLAナノコンポジット繊維は延伸倍率が大きくなるほど引張強度が増加していたが、PLAブレンド繊維は延伸による強度の増大はわずかに留まった。一方、Fig.1に示したように、ナノコンポジット繊維では促進加速劣化試験によりその強度は徐々に減少していたが、ブレンド繊維では劣化試験による強度の減少は観察できなかった。

Relaxation time analysis, Melt drawing, Accelerated degradation test

○にしだまさかず，しんざわひでゆき，たなかともこ，かねまつわたる

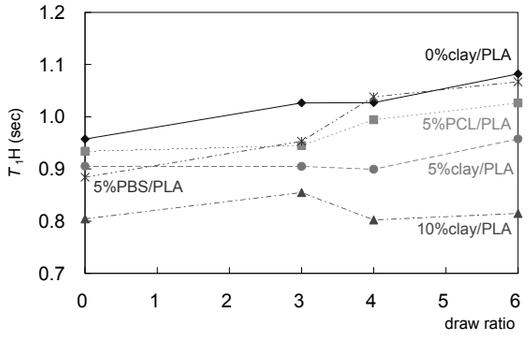


Fig. 2 Changes of T_1H against melt drawing

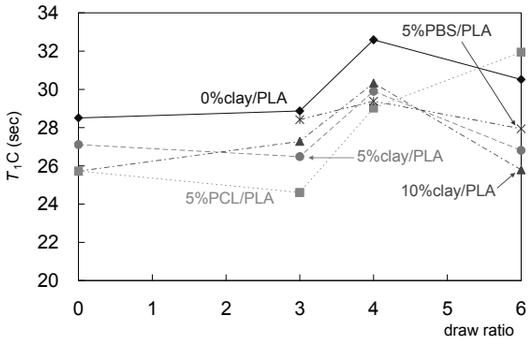


Fig. 3 Changes of T_1C against melt drawing

以上のPLA系繊維について、添加剤、延伸過程、劣化過程が緩和時間に及ぼす影響を調べた。PLA繊維はいずれも添加剤の存在によりT_1Hが減少しており、特にナノクレイの場合、添加剤の量に応じてT_1Hが減少していた。また、延伸によって、PLAやブレンド体において、T_1Hの増大が見られた(Fig.2)。一方添加剤の存在によって、T_1Cも減少しており、5%PCL/PLAについては６倍延伸の時、その他の場合については４倍延伸の時に最大になっていた(Fig.3)。

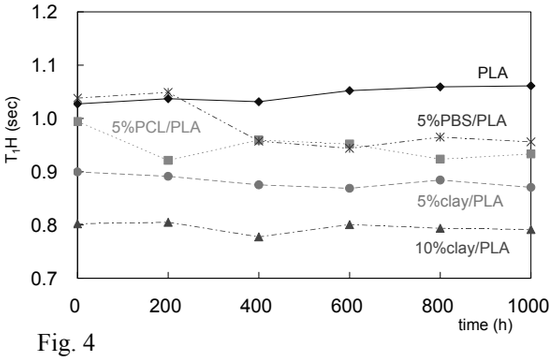


Fig. 4
Changes of T_1H against accelerated degradation

続いて、促進加速劣化試験におけるT_1Hの変化としては、ブレンド体で劣化の初期過程において減少しているとともに、ナノコンポジットで時間とともに漸減していた(Fig.4)。T_1Cは、PLAと5%clay/PLAで800時間までは増加していたが、逆に5%PCL/PLAでは600時間まで減少傾向にあった。(Fig.5)。

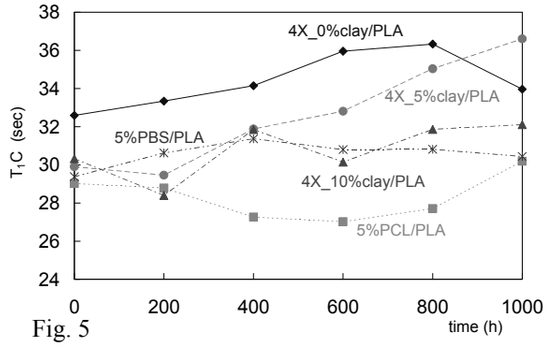


Fig. 5
Changes of T_1C against accelerated degradation

以上の結果から、T_1Hはクレイ中の常磁性イオンに最も影響を受けるが、同時に、延伸による配向性の増大によっても増加することがわかった。ナノコンポジットはクレイの存在のため、延伸による配向の影響をT_1Hによって確認できなかった。一方、劣化過程ではT_1Hの変化は限定的であり、ブレンド体でのT_1Hの減少は添加したポリマーのドメインサイズの変化に伴うものであると考えられた。また、PLAと5%clay/PLAではアモルファス部分の分解による結晶化度の増大でT_1Cが増加するが、ブレンド体については添加するポリマーの分解が同時に起こることで、T_1Cは不変、むしろ減少すると考えられた。

[1] M. Nishida, Y. Nishimura, T. Tanaka, M. Oonishi, W. Kanematsu, *J. Appl. Polym. Sci.* **123**, 1865 (2012).
[2] M. Nishida, T. Tanaka, T. Yamaguchi, K. Suzuki, W. Kanematsu *J. Appl. Polym. Sci.* **125**, E681 (2012).

P100

固体NMRによるコハク酸水素イミダゾリウムのプロトン伝導メカニズムの研究

○海山剛史，大橋竜太郎，井田朋智，水野元博
金沢大院・自然

Mechanism of Proton Conduction of imidazolium succinate using Solid-State NMR

○Tsuyoshi Umiyama, and Ohashi Ryutaro, Ida Tomonori, Mizuno Motohiro
Department of Chemistry, Graduate School of Natural Science and Technology, Kanazawa University, Ishikawa, Japan.

The development of proton-conductive materials using imidazole has attracted considerable attention. Imidazolium salts and polymers with imidazole are known to show high proton conductivity. The motions of the imidazole molecules are considered to play an important role in the proton conductivity. However, detailed information of molecular motion of imidazole in these high proton conductive materials has not been obtained.

In the present study, we analyzed the mode and rate of molecular motions of imidazole in imidazolium succinate crystal which shows high proton conductivity using solid-state ^{2}H, ^{13}C NMR.

【序】固体電解質の材料において、水に代わるプロトン伝導媒体としてイミダゾールが近年注目を集めており、イミダゾールを使った様々なプロトン伝導体の開発が行われている。その一つであるイミダゾールとジカルボン酸の塩は比較的高いプロトン伝導性を示すことが知られており、コハク酸水素イミダゾリウム結晶では室温付近から473 Kの温度領域で10^{-7}-10^{-3} S cm^{-1}の電気伝導率を示す[1]。Fig. 1にコハク酸水素イミダゾリウムの結晶構造を示す。この結晶はa軸方向に平坦な層を形成する。層内でコハク酸イオン同士は，強い水素結合（O－H…O）で繋がっており，イミダゾールイオンとコハク酸イオンは，弱い水素結合（N－H…O）を形成している。高プロトン伝導性は，イミダゾール分子の五員環の回転によるGrotthus型プロトン伝導によるものと考えられているが，詳しいメカニズムは未だ分かっていない。

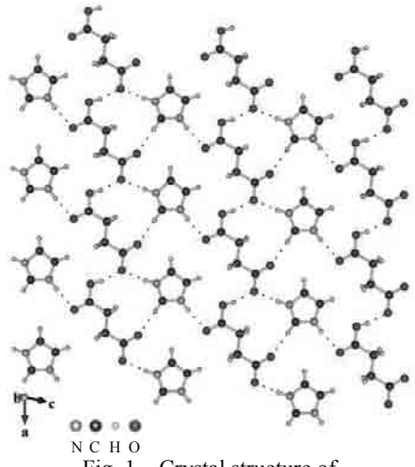


Fig. 1　Crystal structure of imidazolium succinate[1], [2].

そこで本研究では，コハク酸水素イミダゾリウムについて固体 ^{2}H,^{13}C NMRを用いてイミダゾール分子のダイナミクスを調べ，高プロトン伝導のメカニズムを考察した。

Proton Conductivity, imidazole, ^{2}H NMR

○うみやまつよし，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】固体 ^{2}H ^{13}C NMRの測定はJEOL ECA-300分光器を用い，^{2}Hの共鳴周波数45.828 MHz, ^{13}Cの共鳴周波数74.175 MHzで行った。固体^{2}H NMRスペクトルは四極子エコー法で測定した。T_1は飽和回復法で測定した。固体^{13}C NMRスペクトルはCP-MAS法で測定した。測定試料は重水素化したイミダゾール（CIL社製，98%）を軽水で再結晶し窒素部分の重水素を軽水素で置換したものとコハク酸（Wako社製，99.5%）を用いて合成し再結晶を行った。

【結果・考察】Fig. 2にイミダゾール分子の固体^{2}H NMRスペクトルの温度変化を示す。368 K以下ではブロードな線形を示した。398 Kではブロードな成分に加え0 kHz付近にシャープな成分が観測され，温度上昇に伴いその強度が増大した。

Fig.3にスペクトルの全面積強度，及び各成分の面積強度の温度変化を示す。温度上昇に伴いブロードな成分が減少するのに対し，等方回転運動状態のシャープな成分が増加した。また，高温では全面積強度の値が減少しており，ブロードな成分の強度が分子運動によって減衰していると考えられる。

Fig. 4にブロードな成分の^{2}H NMRのT_1の温度変化を示す。室温付近ではT_1は100 s程度の非常に長い値となったが，温度上昇に伴い指数関数的に減少した。T_1の温度変化の傾きから活性化エネルギーを見積もると42 kJ/molとなった。411 KではT_1の値は1.2 sとなったが、ブロードな成分の線形にはほとんど変化が見られないことから、イミダゾールには分子面内で±10°程度の振幅の小角振動が10^{6} Hz程度の速さで起こっていることが予想される。

Fig. 5に353Kでのコハク酸水素イミダゾリウムの^{13}C NMRスペクトルを示す。120-135ppmにイミダゾール由来のピークが現れている。これらのピークの温度変化も含め、解析した結果を報告する予定である。

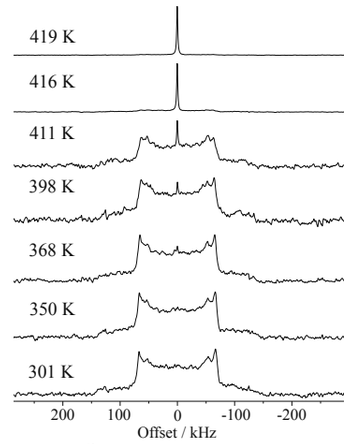


Fig. 2　^{2}H solid-state NMR spectra.

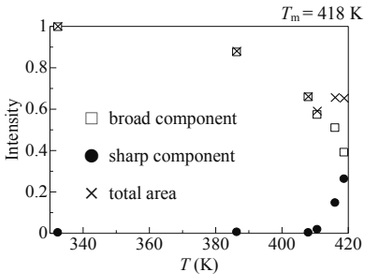


Fig. 3　Temperature dependence of spectral intensity.

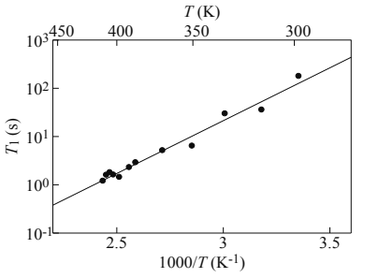


Fig. 4　Temperature dependenceof T_1 of broad component.

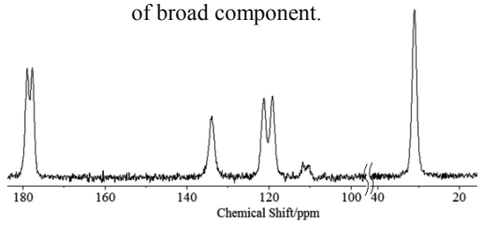


Fig. 5　^{13}C solid-state NMR spectrum.

【参考文献】
[1] K. Pogorzelec-Glaser, Cz. Pawlaczyk, A. Pietraszko, E. Markiewicz, J. Pow. Sou., 173 (2007), 800-805.
[2] K. Momma and F. Izumi, J. Appl. Crystallogr., 41 (2008), 653-658.

P101 Y-89 NMRによる欠陥蛍石型酸化物CeO_2-$YO_{1.5}$の局所構造解析

○安東真理子[1], 及川格[1], 前川英己[1], 中村彰夫[2], 高橋正[3]
[1]東北大・工
[2]原子力研究開発機構
[3]東邦大・理

Local structure analysis of defect-fluorite oxide CeO_2-$YO_{1.5}$ by Y-89 NMR

○Mariko Ando[1], Itaru Oikawa[1],Hideki Maekawa[1], Akio Nakamura[2], and Tadashi Takahashi[3]
[1]Graduate School of Engineering, Tohoku University, Sendai, Japan.
[2]Advanced Science Research Center, Japan Atomic Energy Agency, Ibaraki, Japan
[3]Department of Chemistry, Faculty of Science, Toho University, Funabashi, Japan

CeO_2 is a one of the most important rare-earth oxides for nuclear, electrochemical and ceramic etc areas. The presence of oxygen vacancies is critical to most enhanced performances of ceria-based materials. In this presentation, the local coordination structure around yttrium ions in defect-fluorite oxide CeO_2-$YO_{1.5}$ binary system has been investigated by Y-89 NMR. Sample of $Ce_{1-y}Y_yO_{2-\delta}$($0.05\leq y\leq 0.95$) were prepared by solid-state reaction. NMR spectra are consisted of multiple peaks that can be assigned to 6-, 7-, 8-oxygen coordinated yttrium ions.

[諸言]欠陥蛍石型酸化物は固体酸化物型燃料電池、核燃料、放射性廃棄物固化体等の実用性を持つセラミックス材料である。その相挙動や局所構造はこれらの応用に関わる各種の基礎物性（酸素イオン伝導性、熱物性（熱伝導＋熱膨張）、耐照射損傷性など）との関係で盛んに研究されてきた。しかし、これらの高濃度欠陥系の複雑な局所構造は捉えどころがなく、理解は進まないままだった。中村らは近年、1450℃で焼結した$Ce_{1-y}GdyO_{2-y/2}$（$0\leq y\leq 1.0$）についてＸ線回折法及び^{155}Gdメスバウアー分光法よる構造解析を行い、$0\leq y\leq 0.3$では無秩序化された欠陥蛍石型、$0.3\leq y\leq 1.0$では秩序化されたC-typeの欠陥構造が形成されることを明らかにした[１]。さらにGd添加量が減少するにつれて8bサイトの^{155}Gdメスバウアー強度が小さくなり、ｙ～0.50では信号が消失することが分かった。この結果からC-typeの$GdO_{1.5}$にF-typeのCeO_2を置換していくとCe^{4+}は優先的にminor 8b Gd3+ siteを置換していることが推測された。
本発表ではより詳細な欠陥構造解析を目的として、添加カチオンをY^{3+}にした$Ce_{1-y}Y_yO_{2-y/2}$（$0.05\leq y\leq 0.95$）に着目し、Y-89 MAS NMRから低酸素空孔濃度～高酸素空孔濃度におけるＹ種の定量解析を行うことを目的とした。

[実験方法]Δｙ＝0.05毎にＹ量を変えた$Ce_{1-y}Y_yO_{2-y/2}$($0\leq y\leq 1$)は以下の手順に従って作製した。それぞれの試料にはNMR緩和時間短縮のため0.2mol%Gd_2O_3を添加した。Y/Ce/Gdの混合比を調整した硝酸混合溶液を70℃で乾燥後、800℃でか焼し、ペレット化後1400℃で12h焼結した。その後ペレットを粉砕し、再び1400℃で12h焼結した。XRD測定にはJEOL JDX3530Kを使用し、CuKα、$10^\circ \leq 2\theta \leq 110^\circ$、0.02° step、2°/minで測定を行った。NMR装置にECA-600(JEOL Resonance)、磁場強度(14.1T)を用いて回転数10kHzで測定した。Y-89 NMRの測定は共鳴周波数29.41MHz、1M YCl_3溶液を標準として用いた。

[結果と考察]Fig.1に$Ce_{1-y}Y_yO_{2-y/2}$($0.05\leq y\leq 0.95$) のY-89 MAS NMR測定結果を示す。過去のOldfieldらのY_2O_3、Y-89 NMR結果[2]から272ppmにFace-diagonal<1,1,0> V_0-V_0 pairをもつCN=6(8b-Y^{3+})、314ppmにBody-diagonal<1,1,1> V_0-V_0 pairをもつCN=6(24d-Y^{3+})が観測されることが知られている。Fig.2にｙ=0.95のピーク分離結果を示した。この結果から268ppmにC-type $YO_{1.5}$のCN=6(8b-Y^{3+})、309ppmにC-type $YO_{1.5}$のCN=6(24d-Y^{3+})、また、152ppmに7配位のYが対応するものと考えている。

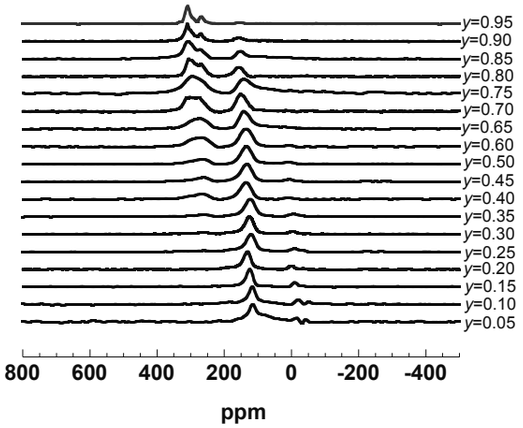


Fig. 1 Y-89 MAS NMR for $Ce_{1-y}Y_yO_{2-y/2}$ ($0.5\leq y\leq 0.95$)

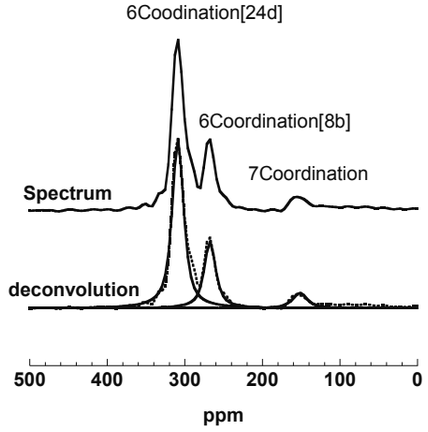


Fig. 2 Y-89 MAS NMR for $Ce_{1-y}Y_yO_{2-y/2}$(y=0.95)

$Ce_{1-y}Y_yO_{2-y/2}$($0.05\leq y\leq 0.95$) のピーク分離結果から$Ce_{1-y}GdyO_{2-y/2}$（$0\leq y\leq 1$）^{155}Gdメスバウアー結果とは異なり、C-type $YO_{1.5}$にF-type CeO_2を置換していくにつれてC-type majorのCN=6(24d-Y^{3+})の比率が小さくなっていき、C-type minorのCN=6(8b-Y^{3+})の比率は大きくなっていくことが分かった。このことから、$Ce_{1-y}Y_yO_{2-y/2}$系ではY-rich側においてCe^{4+}はmajorのCN=6(24d-Y^{3+})を置換していくことが示唆された。発表ではピーク分離結果を詳しく考察し、報告する。

[参考文献]
1. Nakamura.A,Imai.K, Igawa.N, Okamoto.Y, Ymamoto.E, Matsukawa.S, Takahashi.M: *Hyperfine Int.* **207**, 67(2011)
2. P.D.Battle, B Montes, E Oldfield:*J. Chem, Soc., Chem. Commun.*, **9**, 584(1988)

Y-89, defect fluorite oxide, CeO_2-$YO_{1.5}$

○あんどうまりこ,おいかわいたる,まえかわひでき,なかむらあきお,たかはしまさし

P102 逆蛍石型リチウム二次電池正極材料の局所構造解析

○奥村豊旗, 山口洋一, 鹿野昌弘, 小林弘典
産総研

Local Structure around Lithium Ions in Anti-Fluorite Type Positive Electrode for Lithium Ion Battery

○Toyoki Okumura, Yoichi Yamaguchi, Masahiro Shikano, and Hironori Kobayashi
National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Osaka, Japan.

Anti-fluorite type Li_5FeO_4 is one of the favorable positive electrode candidates for next-generation lithium-ion batteries. ^{7}Li MAS NMR shows different isotropic shifts corresponding to the five different crystallographic sites of lithium as well as the signal from Li_2O impurities. The first principle calculation is utilized for estimating the isotropic hyperfine coupling constants of lithium sites, which relate to the observed five shifts. The spectral change during first charging battery would be also discussed for considering the effect of local environment around lithium on electrochemical properties.

【目的】現在、携帯機器等の電源に用いられているリチウム二次電池は、そのエネルギー密度を向上させることで、電気自動車用電源や自然エネルギーを蓄える蓄電デバイスといったより大規模な蓄電池への実用化が期待される。電池を構成する正極材料にはコバルト酸リチウム（$LiCoO_2$）が用いられてきたが、大型化のためにはさらに低コストで高容量な代替正極材料の開発が求められる。逆蛍石型構造 Li_5FeO_4 は、安価な鉄を骨格とし、構造中に多くのリチウムイオンを含むため、より高容量な正極材料開発が見込める。しかし他方、$LiCoO_2$ に比べてそのサイクル特性が悪く、実用化には課題も残されている。本材料でのサイクル特性向上の指針を得るためには、電池反応中での構造変化を解析することが重要である。

^{6,7}Li NMR 測定は、正極材料に広く用いられる 3d 遷移金属イオンとの相互作用からリチウムイオン周囲の局所環境を解析することが可能であるため、正極材料の構造解析手法の一つとして取り上げられてきた[1]。本研究では、逆蛍石型構造 Li_5FeO_4 に関して ^{7}Li MAS NMR 測定を行った。特に本材料の場合、5 つのリチウムイオンが異なる結晶学サイトに配位すること（Fig. 1）や電池反応に伴いアモルファス化が生じるといった特徴を有するため、電池材料の構造解析において他の手法（例えば XRD 測定等）では得られない構造解析が期待できる。また、得られた化学シフトに関して第一原理計算を用いて考察した。

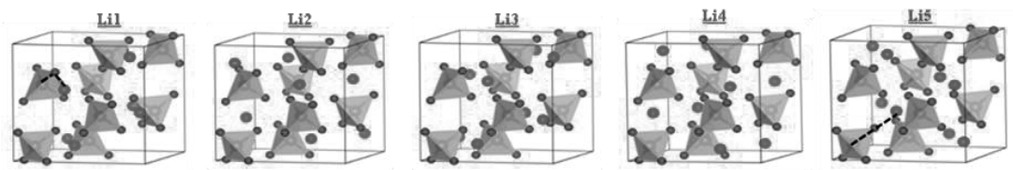


Fig. 1. Five different crystallographic sites of Li in anti-fluorite type Li_5FeO_4.

【方法】$LiOH{\cdot}H_2O$ と $FeC_6H_5O_7{\cdot}nH_2O$ を化学両論比で混合し、アルゴン雰囲気下800℃、24時間焼成することでカーボン被覆 Li_5FeO_4 粉末を合成した。電池試験は、作用極にカーボン被覆 Li_5FeO_4 粉末、アセチレンブラック、PTFE を 60:32:8 の重量比で混合した電極、対極に金属リチウム箔、電解液に1M $LiPF_6$-EC:DMC (1:2) で構成されたコイン型セルを用いた。試験後の試料は洗浄、乾燥の後に、1.4 mm試料管に詰めてBruker AVANCE 300にてHahn echo測定を行った。第一原理計算には、フルポテンシャル線形化拡張平面波法に局在軌道を拡張した(L)APW+lo 法による内殻電子軌道を含む全電子計算に対応したQuantum-Espresso プログラムパッケージを用いた。

【結果と考察】合成した試料のXRD測定の結果、斜方晶（空間群：*Pbca*）で同定され、Li_5FeO_4 が作製されていることが確認された。Fig. 2には、Li_5FeO_4 粉末の ^{7}Li MAS NMR測定結果を示す。各回転速度での比較から少なくとも6つのピークに分離することが明らかとなった。各サイトを占めるリチウムのシグナルは、常磁性の鉄イオンからの影響に伴いピークがシフトする。特に酸化物の場合、常磁性金属イオンの不対電子密度が酸素を介してリチウム原子上に移動するフェルミコンタクト相互作用に伴うシフトが支配的であると考えられている[1]。そこで、Fig. 1に示す各サイトのリチウムに関してそれぞれ計算された原子核上の不対電子密度の値より化学シフトをそれぞれ算出した（Table 1）。計算値は実験値とおおよそ相関していることから、Li_5FeO_4 結晶構造中での各リチウムサイトと化学シフトとの対応関係が明らかとなった。発表では、この結果を踏まえて電池反応に伴いアモルファス化する過程での各リチウムサイト周囲の局所環境の変化について考察する。

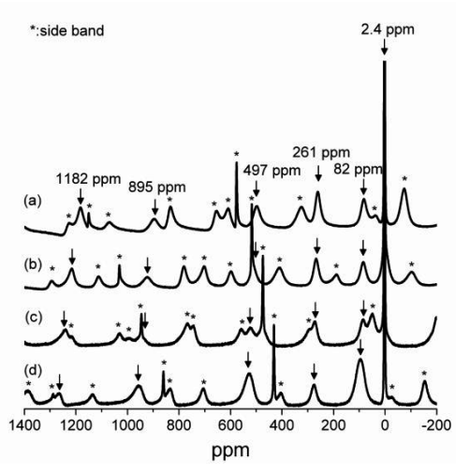


Fig. 2. ^{7}Li MAS NMR spectra of Li_5FeO_4 recorded by Hahn echo pulse sequences at different spinning rates: ν_R = 67 kHz (a), 60 kHz (b), 55 kHz (c), 50 kHz (d).

Table 1. Experimental and calculated chemical shifts, δ_{iso}^{Li} for ^{7}Li in Li_5FeO_4 (in ppm)

Li site	Exp.	Calc.							
		U = 0 eV		U = 2 eV		U = 4 eV		U = 6 eV	
	δ_{iso}^{Li}	$\rho_{r=0}^{Li}$	δ_{iso}^{Li}	$\rho_{r=0}^{Li}$	δ_{iso}^{Li}	$\rho_{r=0}^{Li}$	δ_{iso}^{Li}	$\rho_{r=0}^{Li}$	δ_{iso}^{Li}
1	81.7	0.000312	80	0.000053	14	-0.000212	-55	-0.000460	-118
2	261.4	0.000815	210	0.000604	155	0.000379	98	0.000151	39
3	496.6	0.002513	647	0.002177	560	0.001825	470	0.001479	381
4	895.2	0.005045	1299	0.004764	1226	0.004519	1163	0.004305	1108
5	1182.7	0.006695	1723	0.006244	1607	0.005796	1492	0.005333	1373

参考文献

[1] C. P. Grey *et al.*, *Chem. Rev. B*, 104 (2004) 4493.

^{7}Li MAS NMR, DFT calculation, Lithium-ion battery

○おくむらとよき，やまぐちよういち，しかのまさひろ，こばやしひろのり

P103 固体NMRにおけるBEt_3Me塩を用いた柔粘性結晶の物性研究

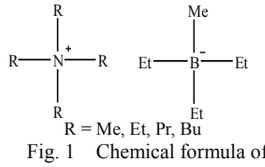
○平川悟[1], 本多尚[1,2], 早崎智之[2]
[1]横浜市立大学国際総合科学部
[2]横浜市立大学大学院生命ナノシステム科学研究科

Solid-State NMR Studies on Physical Property of New Plastic-Crystals Containing BEt_3Me Anions

○Satoru Hirakawa[1] , Hisashi Honda[1,2], and Tomoyuki Hayasaki[2]
[1]International College of Arts and Sciences, Yokohama City University.
[2]Graduate School of Nanobioscience, Yokohama City University.

We have discovered new plastic crystals which contain BEt_3Me anions (Fig. 1). However, any plastic crystal phase wasn't observed in some compound with long alkyl chains. This tendency can be considered that the anion is placed among alkyl chain of the cation, therefore cage-type cations of 1-methyl-4-aza-1-azoniabicyclo[2,2,2]octane (N-Me DABCO) and 1-ethyl-4-aza-1-azoniabicyclo[2,2,2] octane (N-Et DABCO) were introduced in this study. The results of ^{1}H and ^{13}C NMR spectra revealed that isotropic reorientation motion of both the cation and the anion is occurred in the room temperature phase of these crystals.

固体と液体の中間相である柔粘性結晶は、固体のように位置規則性を持っているが、その配向は液体のように無秩序である。そのため、固体状態であるにも関わらず、分子は高い運動性を持っており、柔粘性結晶相では分子の等方回転運動および自己拡散運動が起きている。固体状態で自己拡散運動が観測されるので、柔粘性イオン結晶はイオン伝導体材料としての応用が期待されている。



R = Me, Et, Pr, Bu

Fig. 1 Chemical formula of new ionic plastic crystals.

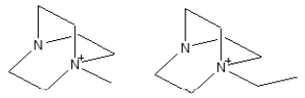
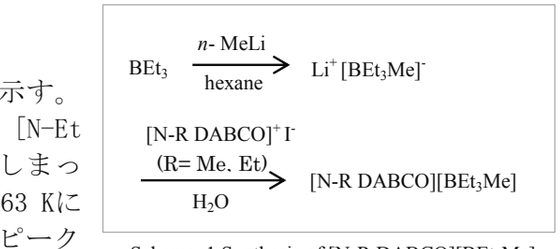


Fig. 2 Structures of N-Me DABCO and N-Et DABCO.

これまでに報告されている柔粘性イオン結晶は、球状イオンと平面に近い対イオンの組み合わせが多く、球状イオン同士の組み合わせによる柔粘性イオン結晶の報告例はほとんどない。我々は、イオン間に働くクーロン力に着目し、Fig. 1 に示すような球状イオン同士の組み合わせによる柔粘性結晶を発見した。しかし、この化合物では、アルキル鎖を長くすると柔粘性結晶相が観測されなかった。その原因として陰イオンがアルキル鎖間に入り、陽イオンの等方回転運動が阻害されると考えられる。そこで、本研究ではFig. 2 に示すような陽イオンが籠状の N-Me DABCO, N-Et DABCO を用い、BEt_3Me 塩の性質を調べた。

各塩の合成経路をScheme. 1 に示す。

得られたDSC測定の結果をFig. 3 に示す。[N-Me DABCO][BEt_3Me] は約 420 K、[N-Et DABCO][BEt_3Me] は約400 Kで分解してしまったため、融点が観測できなかった。約263 Kに見られるピークは固相間相転移によるピークであり、両化合物ともこの温度で固体最高温相に達することがわかった。この転移におけるエントロピー変化はそれぞれ、49.04, 64.33 J K^{-1} mol^{-1} と大きな値であった。柔粘性結晶の場合、固相間相転移で大きな運動の自由度を得るため、融解のエントロピー変化より大きなエントロピー変化が固相間相転移で観測される。今回の系は、融解のエントロピー変化が観測できなかったので、固体最高温相におけるこれらの化合物の運動性を調べるため、固体^{13}C NMR, ^{1}H NMRの測定を行った。測定には、Bruker社製Avance 600 (14.10 T)を用いた。得られた^{13}C NMR測定結果をFig. 4 と 5 に示す。先ず、^{13}Cのスペクトルは、MASをかけていないのに、ケミカルシフトの異方性がほとんど観測されなかった。各イオンの構造を考慮すると、この結果は各イオンの等方回転運動を反映していると考えることができる。また、CP法を用いた方がピーク強度が小さくなることから、室温で速い等方回転運動が起きていると考えられる。続いて、得られた^{1}H NMRスペクトルをFig. 6 と 7 に示す。これらのスペクトルを線形解析したところ、半値幅が数kHzの成分の重ね合わせで説明することができた。また、二次モーメントを求めたところ、1 G^{2}以下であったことから、これらの化合物では自己拡散運動が起きていると考えられる。以上の結果から、[N-Me DABCO][BEt_3Me] も[N-Et DABCO][BEt_3Me] も、柔粘性イオン結晶を形成することが分かった。これまで、BEt_3Me 塩ではNR_4 型イオンだけでしか柔粘性イオン結晶を発見できなかったが、本研究で初めて籠状の陽イオンでも柔粘性を示すことが明らかになった。



Scheme. 1 Synthesis of [N-R DABCO][BEt_3Me]

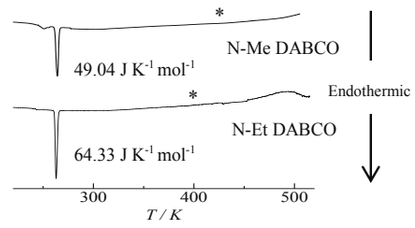


Fig. 3 DSC thermograms of [N-Me DABCO][BEt_3Me] and [N-Et DABCO][BEt_3Me].
" * " indicates a decomposition point.

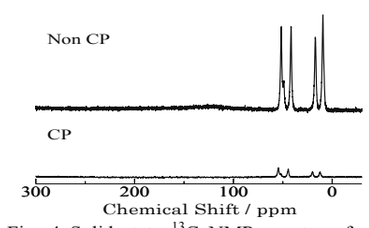


Fig. 4 Solid state ^{13}C NMR spectra of [N-Me DABCO][BEt_3Me] (150.92 MHz, 4.0 mm rotor).

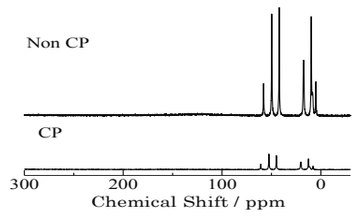


Fig. 5 Solid state ^{13}C NMR spectra of [N-Et DABCO][BEt_3Me] (150.92 MHz, 4.0 mm rotor).

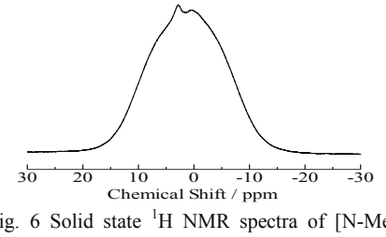


Fig. 6 Solid state ^{1}H NMR spectra of [N-Me DABCO][BEt_3Me] (600.13 MHz, 4.0mm rotor).

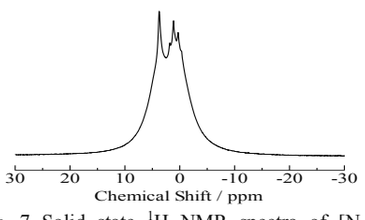


Fig. 7 Solid state ^{1}H NMR spectra of [N-Et DABCO][BEt_3Me] (600.13 MHz, 2.5mm rotor).

柔粘性結晶，固体^{1}H NMR

○ひらかわさとる，ほんだひさし，はやさきともゆき

P104

水分子プローブを用いた表面処理カーボンブラックの固体ＮＭＲによる検討

秦 弘一郎[1],○出田 圭子[2], 大畠 雄三[1], 宮脇 仁[1, 2], 戸田 繁美[3],
原田 竜介[3], 持田 勲[4], 尹 聖昊[1, 2]
[1]九大・総理工、 [2]九大・先導研
[3]東海カーボン（株）、[4]九大・炭素センター

Investigation of surface-treated carbon blacks using a water molecule probe by solid-state NMR

Koichiro Hata[1], Keiko Ideta[2], Yuzo Ohata[1], Jin Miyawaki[2],Shigemi Toda[3], Ryusuke Harada[3], Isao Mochida[4], and Seong-Ho Yoon[1,2]

[1]*Interdisciplinaty Graduate School of Engineering Sciences, Kyushu University, Fukuoka, Japan.*
[2]*Institute for Materials Chemistry and Engineering, Kyushu University, Fukuoka, Japan.*
[3] *Tokai Carbon Co., Ltd.*, Tokyo, *Japan.*
[4]*Research and Education Center of Carbon Resources, Kyushu University, Fukuoka, Japan.*

Carbon blacks (CBs) are mainly used to reinforce tire rubbers. Besides structural parameters of CBs such as particle size and aggregate structure, surface functionalities are known to strongly influence on contact characteristics between CBs and rubbers, which control the tire performance [1]. Such surface functionalities interact with polar molecules like water.

In this study, therefore, we tried to apply NMR technique using water as a surface probe to indirectly analyze surface functionalities of CBs.

【序論】

タイヤゴム強度の向上に用いられるカーボンブラック(CB)の表面状態の把握は、ゴムとの親和性制御に非常に重要である。

本研究では表面処理により酸素含有表面官能基量を制御したCBについて、吸着水を表面プローブ分子として用い、その固体NMR測定によりCB表面の状態評価を試みた。吸着水にはH_2O/D_2O混合蒸気を用い、その混合比を変化させて^{1}Hおよび^{2}H固体NMR測定を行った。

【実験】

未処理の CB（R-CB）、酸化 CB（Ox-CB)は東海カーボン株式会社より提供された。

加えて、Ox-CB酸素官能基を除去するため還元雰囲気下(Ar/H_2 = 8/2 (v/v)) 600℃24時間処理した、水素処理CB (H-CB)を作成した。これらのCBをグローブボックス中で窒素フロー下100℃で2時間乾燥した後25℃でD_2O (Merck, 99.96% for NMR)-H_2O (deionized water)混合溶液の蒸気中に96時間曝露した。H_2O/D_2Oの混合比は1/99, 10/90, 30/70, 50/50, 70/30, 100/0とした。

Table 1. Elemental compositions of CBs (wt%)

Sample	C	H	N	O(diff.)
H-CB	97.96	0.42	0.33	1.29
R-CB	95.33	0.61	0.25	3.81
Ox-CB	93.47	0.53	0.21	5.79

固体 NMR, カーボンブラック, 吸着水

はた こういちろう,○いでた けいこ, おおはた ゆうぞう, みやわき じん,
とだ しげみ, はらだ りゅうすけ, もちだ いさお, ゆん そんほ

これらの試料について元素分析はCHN analyzer (MT-5, Yanako, Japan)で行った。NMRは(JNM-ECX-400およびJNM-ECA-800, JEOL Ltd., Japan)を用い,MASは5 もしくは10 kHz、^{1}Hはecho(τ=20 μs),^{2}Hはシングルパルス測定を行った。

【結果と考察】

CBsへの水分子吸着には少なくとも2種類のサイトが考えられる。1つは10 kHzのMASで変化しない官能基などに水素結合した強い吸着サイト、もう一つは10 kHzのMASで脱着するCB表面のエッジ面、ベーサル面に物理吸着した、もしくは官能基などに吸着した水に会合的に吸着した弱い吸着サイトである。

Fig.1 に乾燥CBのみとH_2O/D_2O比50/50の結果を示す。(a-c)は乾燥したCBsを測定したものであり、ここで観察されるシグナルはCB由来である。酸素を多く含むOx-CB (Table 1) は吸着水がない場合(c)においても7 ppm付近にピークが見られ、これは導入された酸素官能基中のプロトンに起因すると考えられる。

水を吸着させたスペクトル(d-f)では、MAS速度を5 kHzから10 kHzに上げると弱い吸着サイトと思われる高磁場側のシグナルがH-CB, R-CBで2 ppm程度低磁場シフトするが強い吸着サイトと思われる-2ppm付近のピークは残る（Fig.1 およびFig.2に点線で示した）。5 ppm付近の自由水様のシグナルが増加することから、弱い吸着サイトの水分子は遠心力もしくはサンプルの温度上昇により脱着されていることがわかる。

一方、Ox-CBは10 kHzのMASを行っても自由水らしいピークがあまり増加せず、このことから、存在する水のほとんどは官能基に水素結合した強い吸着水であると考えられる。同様の傾向は^{2}H測定（Fig.2）でも見られ、H-およびR-CBでは10kHzで脱着するピークが多くあるのに対し、Ox-CBではピーク変化は見られない。

以上のことからNMRは表面状態を鋭敏に反映する良い手法であり、現在その他のH_2O/D_2O混合比の解析を進めている。

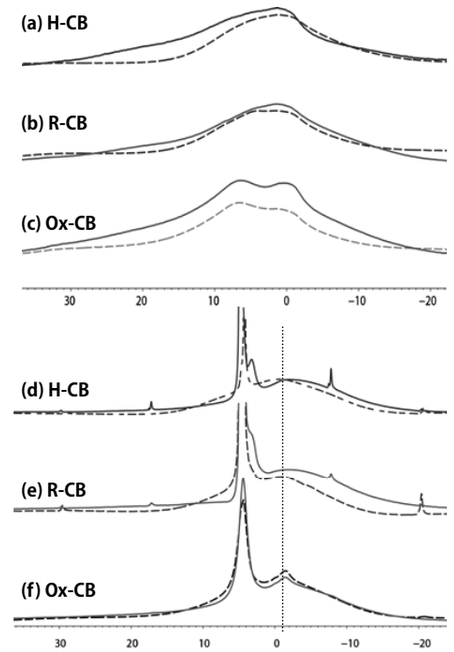


Fig. 1 ^{1}H-NMR spectra of dried (a-c) and water-adsorbed(d-f) (H_2O/D_2O mixing ratio: 50/50) CBs at 5 kHz (solid line) and 10 kHz (broken line) of MAS speed

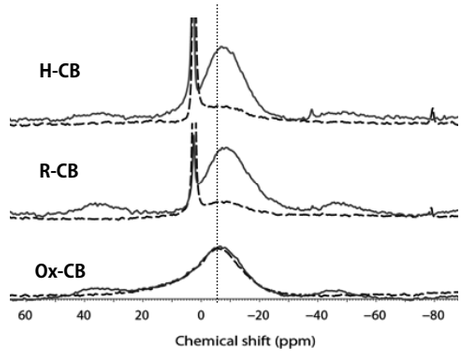


Fig. 2 ^{2}H-NMR spectra of water-adsorbed (H_2O/D_2O mixing ratio: 50/50) CBs at 5 kHz (solid line) and 10 kHz (broken line) of MAS speed

【謝辞】

本研究は（独）新エネルギー・産業技術総合開発機構並びに G-COE「新炭素資源学」の支援のもと行われた。

【参考文献】

[1] Ford FP, Gessler AM. Some properties of butyl rubber-carbon black systems. Ind. eng. chem 1952;44(4):819-824.

P105 多孔性金属錯体の細孔内におけるイオン伝導の拡散NMR法による評価

○犬飼宗弘[1]，上坪祐介[2]・堀毛悟史[2,3]・福島知宏[2]・北川進[1,2]
[1]京都大学iCeMS，[2]京都大学大学院工学研究科，[3]JST-さきがけ

Diffusion NMR study on fast ion conducting coordination polymer

○Munehiro Inukai[1], Yusuke Kamitsubo[2], Satoshi Horike[2,3], Tomohiro Fukushima[2], Susumu Kitagawa[1,2]
[1]iCeMS, Kyoto University, [2]Graduate School of Engineering, Kyoto University, [3]JST-PRESTO

In the area of porous coordination polymers (PCPs)/metal-organic frameworks (MOFs) which are composed of metal ions and organic ligands, several studies on diffusion of gas molecules have been reported and high diffusion constants are observed because of high porosity. On the other hand, there is scarcely observed about the study on the diffusion of ions in PCP/MOFs. In this work, we synthesized the composite of Ca^{2+} based PCP and LiCl and demonstrated over 10^{-2} Scm^{-1} of ion conductivity, and characterized their diffusion mechanism by several techniques including pulse field gradient (PFG) NMR. The firstly demonstrated PFGNMR study for ion conductive PCP composite gave much information about dynamic event of ions in the pores.

【緒言】
多孔性錯体は金属イオンと有機配位子から構成される結晶性と細孔を兼ね備えた高分子であり、有機物と無機物の両方の特徴を持つ新たな物質群である。水やアゾールなどのイオン伝導性のゲスト分子を細孔内に包摂させることで、イオン伝導能を発現させた PCP の研究が報告されている[1-4]。これまで固体 NMR や交流インピーダンス法などを用いてイオン伝導の特性評価やメカニズム解明を行ってきたが、一方で細孔内におけるイオンの拡散挙動に関する物性評価は、イオン伝導度と密な関係があるにも関わらず、今まで報告例は全くない。本研究では、当研究室で開発した高いイオン伝導性を示す PCP の細孔内におけるイオンの拡散挙動について拡散 NMR を用いて評価を行った。

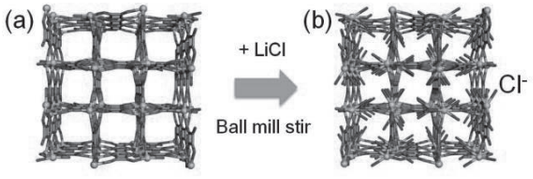


Fig. 1　(a) **1** と(b) **2** の結晶構造

多孔性金属錯体，拡散NMR，イオン伝導

○いぬかいむねひろ，かみつぼゆうすけ、ほりけさとし、ふくしまともひろ、きたがわすすむ

【実験】
$CaCl_2$, Squaric acid ($H_2C_4O_4$)を酢酸・酢酸ナトリウムの緩衝溶液中で反応させ、$[Ca(C_4O_4)(H_2O)]_n \supset 1.5H_2O$（**1**）を合成した。**1**とLiClを室温において固相で混合し反応させることでLiClを細孔内部に導入した$[Ca(C_4O_4)(H_2O)_4(Cl)_{0.5}](Li)_{0.5}$（**2**）を合成した（Fig. 1）。Pulse Gradient Spin Echo (PGSE) 法を用いて、**2**の細孔内における^1H、^7Liの拡散係数の測定を行い、イオンの運動とイオン伝導挙動の検討を行った

【結果と考察】
1 のみでは、室温で 5.4×10^{-9} S cm^{-1} と低いイオン伝導度を示した。一方、LiCl を細孔内に導入した **2** の伝導度は **1** に比べ 10^7 倍もの上昇がみられ、室温で 10^{-2} S cm^{-1} を超えるイオン伝導度を示した。固体 NMR により **2** の細孔内では水分子だけでなくリチウムイオンも高い運動性を有していることが確認されたため、これらのイオンの運動及び関係について拡散 NMR を用いて評価した。その結果、水分子とリチウムイオンはそれぞれ 2 種類の運動状態で存在し、その内の高い拡散係数を示す運動は水分子とリチウムイオンが協同的に運動している事が示唆された。この 2 種類の運動性についてより明らかにするために Pulse Gradient Stimulated Echo bipolar gradient(PGSTEBP)法を用いた解析を行なっており、詳細は当日報告する。

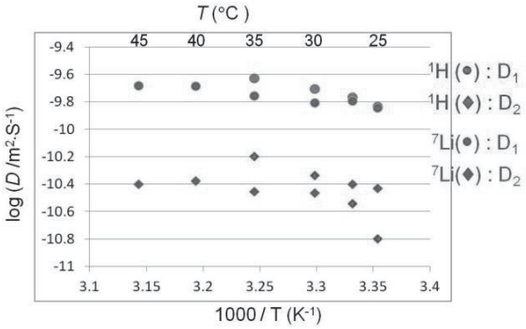


図 2　**2** の細孔内における水とリチウムイオンの拡散係数

参考文献

1. A. Shigematsu, T. Yamada and H. Kitagawa, *J. Am. Chem. Soc.,* 2011, **133**, 2034
2. D. Umeyama, S. Horike, M. Inukai, Y. Hijikata and S. Kitagawa, *Angew. Chem., Int. Ed.,* 2011, **50**, 11706
3. S. Horike, D. Umeyama, M. Inukai, T. Itakura and S. Kitagawa, *J. Am. Chem. Soc.,* 2012, **134**, 7612
4. D. Umeyama, S. Horike, M. Inukai, T. Itakura and S. Kitagawa, *J. Am. Chem. Soc.,* 2012, **134**, 12780.

P106 リチウムイオン電池正極材・電解質溶液間の反応についての考察

○清水俊介[1]，村上美和[2]，竹腰清乃理[1]
[1]京都大学大学院理学研究科
[2]京都大学産官学連携本部

Study of Degradation of Lithium-ion Battery Cathode Material in Electrolyte Solution

○Shunsuke Shimizu[1], Miwa Murakami[2] ,and Kiyonori Takegoshi[1]
[1]Department of Chemistry, Graduate School of Science, Kyoto University
[2]Office of Society-Academia Collaboration for Innovation,Kyoto University

Lithium manganese dioxide ($LiMn_2O_4$) can be a good cathode material for lithium batteries if its problem of capacity reduction after discharge/charge cycles is overcome. So far , X-ray diffraction [1] and ^{7}Li NMR [2] experiments have been applied to examine stability of its spinel structure and showed that structural disorder occurs upon storing in electrolyte solution. In this work, we report the first in-situ ^{7}Li MAS NMR of $LiMn_2O_4$/electrolyte to monitor the degradation of $LiMn_2O_4$.

リチウムイオン二次電池は、その高いエネルギー密度と軽量性から携帯電話や電化製品、ハイブリッド自動車のバッテリーといった用途で広く用いられている。リチウムイオン電池の充放電は電解質溶液を介したリチウムイオンの正極・負極間の移動によって起こっている。正極材として様々なリチウム金属酸化物が用いられているが、その環境への負荷やコストの低さが知られているマンガン酸リチウムが注目されている。マンガン酸リチウムはスピネル型の構造をとっており、その空きサイトをリチウムイオンが移動できることが知られているが、電解質溶液により構造が変化することが示唆されている[1,2]。本研究では電解質溶液とマンガン酸リチウムの混合系の^{7}Li MASスペクトルの時間変化測定と、電解質溶液に浸したのちに乾燥させたマンガン酸リチウムの粉末固体の測定を行ない、その構造の変化を研究した。

アルゴン雰囲気下のグローブボックス中で4φの気密MAS試料管にマンガン酸リチウムの粉末97.4mg と電解質溶液27.7mg ($LiPF_6$-1M/EC:EMC=3:7) を混合したものを詰め、室温・MAS回転速度10kHz下で^{7}Li-NMRスペクトルの時間変化を測定した。また、グローブボックス中でマンガン酸リチウムの粉末固体を電解質溶液に浸し、５日間グローブボックス内で放置した後、ろ過・乾燥させることで得られた粉末90.8mg も同様に測定した(MAS回転速度5kHz)。得られた結果をFig1 に示す。

Fig. 1a は$LiMn_2O_4$単体の粉末試料(85.3mg) のMASスペクトルであり、580 ppmを中心に、多数の回転サイドバンドが観測された。580 ppmのシフトはMnによる常磁性シフトであり、サイドバンドは電子との双極子相互作用による。

正極固体と電解質溶液を混合した直後のスペクトル(Fig. 1b) には、固体のピークに加えて、0 ppmを中心にサイドバンド化した信号が観測された。この0 ppm中心の信号は電解質の$LiPF_6$の^{7}Liの信号であり、そのサイドバンドは$LiPF_6$が$LiMn_2O_4$粉末(粒径12.4μｍ) の表面に吸着したことによるバルクな磁化率の異方性(BMS) によるものだと考えている。2日ほど経過した^{7}Liスペクトル(Fig. 1c) からは固体のピークが消失してしまった。一方、電解質とした0 ppm中心の信号はその強度も含めほとんど変化していない。つまり580 ppm中心の固体の信号がなくなってしまった。これは$LiMn_2O_4$の構造の変化に伴い常磁性シフトが大きく変化して、観測範囲から逸脱したのではないかと考えた。同時に、線幅が大きくなりサイドバンドの数も増えて、S/N的に見えなくなったのではないかと考えた。

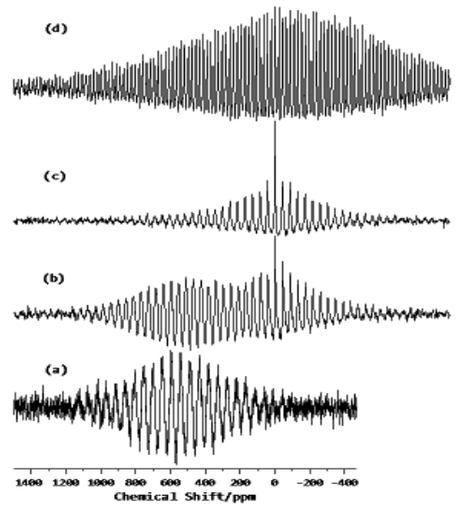


Fig. 1 ^{7}Li-NMR spectra of (a) pristine $LiMn_2O_4$ under 10kHz MAS, (b) just after $LiMn_2O_4$ immersed in the electrolyte under 10kHz MAS, (c)two days later after $LiMn_2O_4$ immersed in the electrolyte under 10 kHz MAS, (d) $LiMn_2O_4$ dried after immersed in the electrolyte for five days under 5 kHz MAS

また、固液混合後乾燥させた試料のスペクトル(Fig. 1d) は単体のスペクトル(Fig. 1a) や固液混合させたもの(Fig. 1b) と比較すると広範囲に表れてかつ、中心は0 ppm付近にシフトしている。又、各サイドバンドは極めてシャープであった。このスペクトルの回転速度は5kHzであるが、これはそれ以上の高速回転が難しいためである。シフトやサイドバンドの変化や回転のしにくさはこの試料の磁化率や電気伝導度が高くなっている可能性を示唆している。乾燥した試料のスペクトルは文献[2]でも観測されている。

上で示されたように固液の試料をそのまま用いた in-situ MAS NMR は$LiMn_2O_4$の電解質による構造変化の研究に有用である。結果として磁性や電気伝導度に大きな変化があることが示唆されたために、現在は固液混合系の磁化率の時間変化測定や 、ESR測定について準備中である。

謝辞

試料調整やNMR測定は、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）の施設で行われた。

＜参考文献＞
[1] M. Hirayama, et al,. J. Am. Chem. Soc., 132 (2010) 15268-15276.;
[2] H. Oka, et al,. Solid State Ionics 144 (2001) 19-29.;

リチウムイオン電池，マンガン酸リチウム

○しみずしゅんすけ、むらかみみわ、たけごしきよのり

P107

In situ NMR測定による$LiCoO_2$正極セルのリチウム挙動のその場観察

○下田景士[1], 村上美和[1], 高松大郊[2], 荒井創[1], 内本喜晴[3], 小久見善八[1]
[1]京大・産官学連携本部
[2]日立製作所
[3]京大・人間環境学研究科

In situ NMR observation of the lithium extraction/insertion from $LiCoO_2$ cathode

○Keiji Shimoda[1], Miwa Murakami[1], Daiko Takamatsu[2], Hajime Arai[1], Yoshiharu Uchimoto[3], and Zempachi Ogumi[1]
[1]*Office of Society-Academia Collaboration for Innovation, Kyoto University, Uji, Japan.*
[2]*Hitachi Ltd., Hitachi, Japan.*
[3]*Graduate School of Human and Environment Studies, Kyoto University, Kyoto, Japan.*

Rechargeable lithium-ion battery (LIB) is currently accepted to be one of the most suitable energy storage resources in portable electronic devices because of its high gravimetric and volumetric energy density. We performed in situ ^{7}Li nuclear magnetic resonance (NMR) measurements during the electrochemical lithium extraction/insertion of $LiCoO_2$ cathode and pursued the lithium movement in a plastic cell battery. The ^{7}Li NMR measurements were carried out with a wide-bore static probe having a 10 mm diameter solenoidal coil at a magnetic field of 14.1 T. The plastic cell battery consists of a positive electrode of $LiCoO_2$ (mixed with acetylene black and PVDF binder) and a counter electrode of Li foil soaked in 1 M $LiClO_4$ (EC:DMC=1:1). From the *in situ* experiment, we successfully observed the NMR signals of lithium ion in the Li_xCoO_2 cathode and the growth/consumption of Li dendrite on the counter electrode during charge/discharge cycles.

リチウムイオン二次電池は、携帯電話や電気自動車のエネルギー貯蔵源としてすでに実用化されて久しいが、より幅広いアプリケーションのためには、容量やサイクル特性、安全性などのさらなる向上が期待される。これらのパフォーマンス向上のためには、電気化学反応中における正極/負極/電解液の状態変化をその場観察することが重要である。本研究では、$LiCoO_2$を正極材料としたNMR測定用ラミネートセルを作成し、in situ ^{7}Li NMR測定を行うことで、電気化学反応中における$LiCoO_2$正極のリチウム信号の変化をその場観察することに成功した。また、Li負極におけるデンドライトリチウム信号の強度変化についても観察できた。

正極活物質には$LiCoO_2$粉末(日亜化学)を使用した。$LiCoO_2$、アセチレンブラック、PVDFを80:10:10で混合し、Al箔に塗布・乾燥させて正極を作成した。対極にはLi箔を使用し、電解液は$LiClO_4$溶液(EC:DEC=1:1)とした。in situ NMR用電池セルは、既報を参考にして作成した[1,2]。セルは10 mm径のコイル(ワイドボア静止プローブ)に水平にセットされ、14.1 Tの磁場で^{7}Li NMR測定を行った。測定にはシングルパルスを用い、90° パルス(3.5 μs)、緩和時間1 sで880スキャン行った(一点15分測定)。充放電測定は3.0 Vから4.3 Vまで定電流モード(32 mA/g, 5時間)で実行し、充電/放電を3サイクル繰り返した(測定1)。さらに、$LiCoO_2$のリチウムをできるだけ引き抜くために、5.0 Vまで5.5 mA/g, 50時間定電流モードで測定を行った(測定2)。

Fig.1に充放電1サイクルの^{7}Liスペクトルを示す(測定1)。~0 ppm付近の比較的鋭いピークは$LiClO_4$電解液の信号である。~250 ppmの鋭いピークはLi負極の信号である。~0 ppmを中心とした-100 ppmから100 ppmの幅広いピークは正極活物質である$LiCoO_2$の信号である。充電($LiCoO_2$からのLiの引き抜き; $LiCoO_2 \rightarrow Li_{1-x}CoO_2 + xLi^+ + xe^-$)によって、~0 ppm付近の$LiCoO_2$信号の強度減少が観察された。また、同時に~270 ppm付近に新たなピークが成長するのが確認できた。これはLi負極表面に形成されるデンドライト状リチウムによる信号であると考えられる[2,3]。一方で、放電過程($Li_{1-x}CoO_2$へのLi挿入)では変化は可逆的であり、$LiCoO_2$ピークの強度増加及びデンドライトリチウムのピーク強度の減少が観察された。測定2の結果を含めた詳細は当日発表する。

本研究はNEDO「革新型蓄電池先端科学基礎研究事業(RISING)」の助成の下で行われた。

[1] Letellier M. et al., Carbon 45, 1025-1034 (2007)
[2] Trease N.M. et al., SSNMR 42, 62-70 (2012)
[3] Bhattacharyya R. et al. Nature Mat 9, 504-510 (2011)

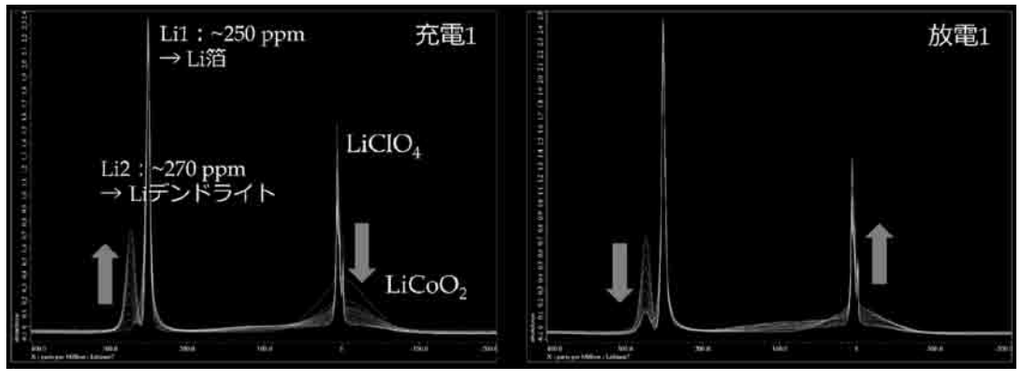


Fig.1 ^{7}Li NMR spectra of a plastic bag cell during a charge/discharge cycle.

in situ NMR, リチウムイオン電池, $LiCoO_2$

○しもだけいじ, むらかみみわ, たかまつだいこう, あらいはじめ, うちもとよしはる, おぐみぜんぱち

P108

ポリ4-メチル-1-ペンテンの結晶相における気体輸送特性のNMRによる評価

○島崎彩奈，吉水広明
名工大院・工

Gas Transport Properties of Crystalline Phase of Poly (4-methyl-1-pentene) by NMR

○Ayana Shimazaki, and Hiroaki Yoshimizu
Graduate School of Engineering, Nagoya institute of technology, Aichi, Japan.

To clarify the gas transport properties of the form I crystal of poly(4-methyl-1-pentene) (PMP), the PMP membranes with several drawing ratio and crystallinity were prepared, and structural features and gas sorption amounts of them were analyzed by NMR methods at various temperatures. From ^{129}Xe NMR observations, the Xe sorption amounts into the PMP membranes could be estimated, and then sorption properties of the crystalline and amorphous phases were individually discussed. Furthermore, the anisotropic diffusivity at the PMP crystalline phase was confirmed by the pulsed field-gradient NMR using CH_4.

[緒言] 結晶性高分子，ポリ 4-メチル-1-ペンテン(PMP)の結晶形態 I 型は，4 本の 7/2 ヘリックス鎖が正方晶に並び，その中心には直径約 4Å のキャピラリー状の比較的大きな空孔が c 軸に沿って形成される．この構造的特徴から，通常の高分子では非晶相のみで起こるとされる気体分子の収着・拡散・透過が結晶相においても起こりうる．空孔サイズに分布がないため高効率な気体分離能が期待できるが, PMP 結晶相において拡散異方性があるとしても，膜中でランダムに配向していてはそれを有効に活かせない．本研究では PMP 膜に延伸処理を施して結晶相の c 軸を延伸方向へ配向させたサンプルを調製し，NMR 法を用いて気体輸送特性を検討した．

[実験] 溶融プレス，キャスト法により結晶化度の異なるいくつかの無配向サンプルを調製した．また配向サンプルには三井化学(株)より供与された様々な延伸倍率の PMP 膜を用いた．配向構造を評価するために 2D WAXD 測定を行い，結晶化度を算出するために DSC 測定を行った．また Xe 収着特性と CH_4 拡散特性の観察をするために，それぞれ ^{129}Xe NMR 測定と PFG ^{1}H NMR 測定を行った．

Poly 4-methyl-1-pentene, ^{129}Xe NMR, 気体収着特性

○しまざきあやな，よしみずひろあき

[結果と考察] 配向サンプルの 2D WAXD 測定の結果，結晶の c 軸が延伸方向に配向していることを確認した．Herman の式を用いて配向度を評価した結果，延伸倍率が高くなるにつれて配向度も上昇した．また，ペネトラント分子に CH_4 を用いて PFG ^{1}H NMR 測定を行った．NMR 管内に膜サンプルを置く“向き”を変えることで拡散異方性を評価した．磁場方向つまり CH_4 の拡散移動方向と PMP 膜中の結晶相の c 軸とが平行となるようサンプルをセットしたものと，垂直にセットしたものを測定し比較した．その結果，平行方向への拡散が垂直方向へのものより大きいことが分かった．PMP 膜中の結晶相における気体の拡散には高い異方性があることが確認され，気体分子は c 軸にそって拡散移動していると予想される．

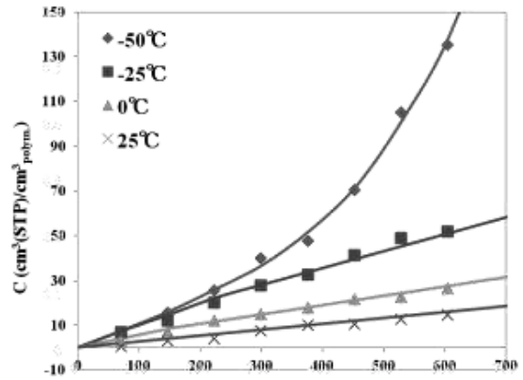


Figure 1 Xe sorption isotherms for PMP63.

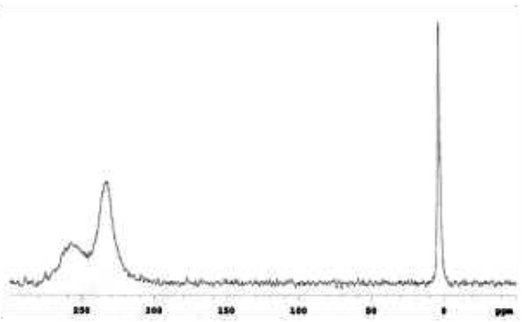


Figure 2 ^{129}Xe NMR spectra of PMP63 at 304 cmHg at -50.

また，^{129}Xe NMR 測定の結果，PMP 膜に収着した Xe のスペクトル強度は同じ温度条件下では圧力の増加とともに増加した．圧力に対しスペクトル強度をプロットし，収着実験から得られたデータと比較することで収着等温線を作成した(Figure 1). PMP の Tg 以上である 25 ℃では Henry 則に従い，それ以下の温度では二元収着型や Flory-Huggins 型の収着等温線を示した．室温では収着した Xe ガスのピークは単一なものが得られたが，-50℃における測定では 2 つのピークに分裂した(Figure 2)．低温にすることで Xe ガスの運動性が低下し，結晶と非晶間の交換速度が低下したからだと考えられる．この 2 つのピークからそれぞれの積分強度を算出し，低磁場側のものをアモルファス，高磁場側のものを結晶相のものとして収着等温線を作成した(Figure 3)．その結果、両者は異なる収着挙動を示していることが分かった．また温度の低下に伴い収着量は増大した．高分子鎖の局所運動性が低下し，ミクロボイド平均サイズが増大したためだと考えられる．

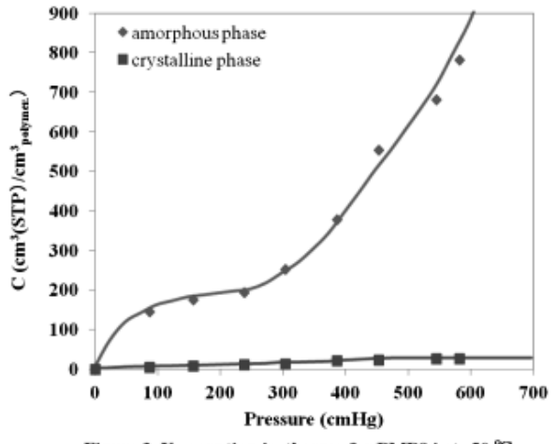


Figure 3 Xe sorption isotherms for PMP94 at -50 ℃.

P109

3種類のメタクリルポリマーにおける局所分子運動性評価

○萬濃香穂, 吉水広明
名工大院工

A study on local molecular mobilities of three methacrylate polymers

○Kaho Manno, and Hiroaki Yoshimizu
Graduate School of Engineering, Nagoya Institute Technology, Nagoya, Japan.

In this study, three different methacrylate polymers were studied by NMR methods to analyze the local molecular mobilities. Furthermore, the gas permeation and sorption measurements were performed. From the data obtained here, it was concluded that the gas transport properties of these methacrylate polymers were strongly influenced by the local molecular motions.

高分子膜による気体分離の過程は，収着，拡散，透過から成っている．本研究では高分子の一次構造上の違いが，それらの過程にどのような影響を与えるかを解明することを目的としている．使用したメタクリルポリマーは優れた透明性を有する非晶性高分子であり，耐候性・耐熱性にも優れ，更に加工性も高いことなどが特長として挙げられ，広く利用されている．本研究ではメタクリルポリマーのうち，一次構造の異なる3種類のポリマー(Figure 1)をサンプルに用い，局所分子運動性などの性質と気体

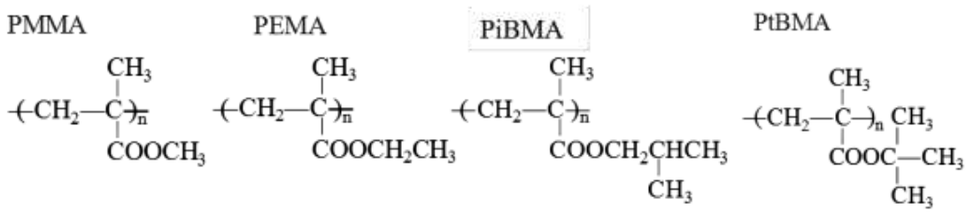


Figure 1 Molecular structures of poly (methyl methacrylate) (PMMA), poly (ethyl methacrylate) (PEMA), poly (isobutyl methacrylate) (PiBMA), poly(tert-butyl methacrylate) (PtBMA).

輸送特性との因果関係について検討を行った．具体的には固体高分解能^{13}C NMRを含む種々のNMR測定や気体透過実験，気体収着実験を行った．Poly(methyl methacrylate) (PMMA)，poly(ethyl methacrylate) (PEMA)，poly(isobutyl methacrylate) (PiBMA)は三菱レイヨン株式会社から提供されたものを用いた．また気体収着実験においてはpoly(tert-butyl methacrylate) (PtBMA)，poly styrene (PS)も用い，比較を行った．気体透過測定は測定温度25～50 ℃，測定圧力1～2 atmで行った．ペネトラントにはO_2，N_2を使用した．サンプルはフィルム状で膜厚は50～100 μmのものを使用した．また各々の炭素の動的挙動を観察するために，固体高分解能NMR用プローブを用いて^{13}C CP/MAS及びDD/MAS測定を観測周波数100 MHzにて行った．測定温度は25，50 ℃，MAS速度3.5 kHz, 積算回数256～2048 回で行った．T_2緩和時間に対応する時定数T_{DDph}が見積もれるdipolar dephasing実験も行った．この測定は，CP/MAS測定において信号

methacrylate polymer, local mobility, gas transport properties

○まんのうかほ，よしみずひろあき

取り入れる前に時間τだけ待ち，その間に双極子緩和を促しスペクトル強度変化を観察する方法である．さらに，各サンプルを短冊状に切り耐圧ガラス製NMR管につめ，CH_4を封入し, 収着平衡を保った状態で溶液^{1}H NMR及び溶液^{13}C NMRを測定するプローブを用いて観察した. 各サンプルのガラス転移温度(T_g)は示差走査熱量(DSC)測定から決定し，密度はアルキメデス法により決定した．密度はPMMAが最も大きく，次にPEMA，残りの3種類のポリマーは同程度であった．またX線回折測定を行い，自由体積空間の大きさの指標であるd-spacing値を求め，各サンプル中の気体分子の拡散場の比較検討を行った．気体収着実験はQCM法を用い，測定圧力0～8atm，CH_4を収着気体として室温(25℃)で行った．ガラス状高分子は，Henry則に従う収着量と，Langmuirの吸着理論に基づく収着量の和からなる二元収着モデルを示す．収着量Cは式(1)によって表される． C_H'はLangmuirサイトに存在するミクロボイドの総量と定義できる．収着量, また二元収着モデルによるC_H'を比較することを目的として実験を行った．

$$C = C_D + C_H = k_D p + \frac{C_H' bp}{1+bp} \quad \text{式 (1)}$$

気体透過実験の結果はTable 1にまとめ、密度，ガラス転移点の結果は，原子団寄与法を用いて算出した自由体積分率と一緒に，Table 2に示す．本研究で使用した3種類のメタクリルポリマーにおいて透過係数は側鎖が大きくなるほど，また高温になるほど上昇した(Table 1)． 気体の選択性，O_2/N_2は側鎖の炭素数が増える程減少した．T_gはPMMA，PEMA，PiBMAの順に高く，それらの値は全て測定温度よりも低かったため実験時サンプルはガラス状態であり，透過係数は高分子のセグメント単位よりも小さな部分または単位の運動性を反映していると考えられる．但し，T_gの値の差は大きく主鎖の運動性の影響も無視できるものではない．各サンプルの^{13}C CP/MAS及びDD/MAS NMR測定から，メチル基の運動性が比較的高いこと，タクチシチーはいずれもアタクチックであること， PMMAの側鎖末端メチル基の運動性はPEMA，PiBMAと比較して低いこと，PiBMAはPMMA，PEMAと比較して主鎖の運動性が高くかつ温度変化も大きなことが確認された. dipolar dephasing実験から各炭素のT_{DDph}値を見積もったところ，同様な考察が得られた．また，CH_4を収着させたサンプルを溶液NMR法でスペクトル観察した結果，PiBMA ＞ PEMA ＞ PMMAの順にポリマー内に存在するCH_4分子の運動性が低いことやCH_4を収着させることで側鎖の運動性が上がる傾向などが確認された．また，収着実験により得られた収着等温線より求めたC_H'は自由体積分率の順に合う結果となった．以上より，気体輸送特性は局所分子運動の影響を強く反映していることが確認された．

Table 1 Permeability coefficients O_2 and N_2 of PMMA, PEMA and PiBMA membranes

	Permeability coefficient × 10^{10} (cm^3(STP)cm/cm^2 sec. cmHg)								
	PMMA			PEMA			PiBMA		
temperture (℃)	O_2	N_2	O_2/N_2	O_2	N_2	O_2/N_2	O_2	N_2	O_2/N_2
50 : a	0.178	0.0111	16.0	3.14	0.628	5.00	7.75	2.46	3.15
25 : b	0.121	0.00704	17.2	1.67	0.296	5.64	4.82	1.15	4.19
a / b	1.47	1.57	0.930	1.88	2.12	0.886	1.61	2.14	0.752

Table 2 Density (g/cm^3), Glass transition temperature (T_g), Fractional Free Volume (FFV) of PMMA, PEMA, PiBMA, PtBMA, PS

	PMMA	PEMA	PiBMA	PtBMA	aPS
Density (g/cm^3)	1.21	1.12	1.05	1.03	1.07
Tg (℃)	106	69.5	63.4	99.6	103
FFV	0.117	0.153	0.166	0.182	0.139

P110 MRIを用いた高温超伝導バルク磁石着磁過程の評価

○玉田大輝[1, 2], 仲村高志[1, 2], 巨瀬勝美[1]
[1]筑波大学大学院　数理物質科学研究科　電子・物理工学
[2]独立行政法人理化学研究所

Evaluation of the magnetization process in the high Tc bulk superconducting magnet using the MRI

○Daiki Tamada[1, 2], Takashi Nakamura[1, 2] and Katsumi Kose[1]
[1]Institute of Applied Physics, University of Tsukuba, Tsukuba, Japan.
[2]RIKEN, Wako, Japan.

The bulk super conducting magnet (SCM) consists of YBCO type super conductor provides a high and stable magnetic field without cryogen-refill and large installation space. However, the bulk SCM has a problem that is the inhomogeneous magnetic field of the magnet.

In our study, we measure the magnetic field distribution during the magnetization process using the MRI. The result shows the usefulness of our method to visualize and evaluate the magnetization process.

1.　背景

高温超伝導バルク磁石（バルク SCM）は，塊状の高温超電導体を超伝導磁石として応用したものであり，小型かつ高磁場の実現が可能である[1]．さらに，比熱が高いため，寒剤が不要という利点も有している．しかしながら，バルク SCM には静磁場均一度が低いという問題があり，バルク SCM を用いた高分解能 NMR/MRI を実現するためにはさらなる静磁場均一度の改善が必要である． 静磁場均一度改善のためのアプローチとして，バルク高温超伝導体材料の改善と，着磁手法の改善の二つを挙げることができる．

本研究では，特に着磁手法に注目し，MRI を用いて着磁中のバルク SCM の補足磁場を計測することで，着磁プロセスの評価を行った．さらに，本研究で得られた結果をもとに，着磁方法の改善について検討する．

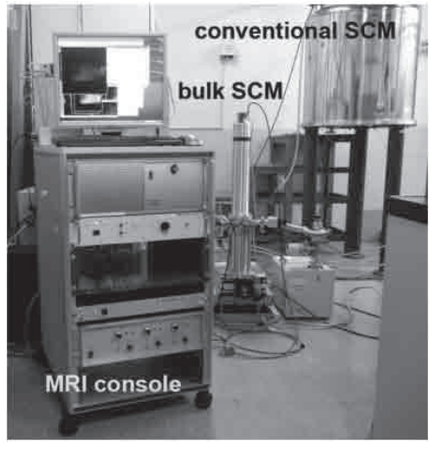


Fig. 1 The MRI system consists of bulk SCM, gradient sets, an RF coil and MRI console.

2.　手法

本研究で使用した MRI システム(Fig.1)は，NMR/MRI 用バルク SCM（目標静磁場強度 4.74 T），勾配磁場コイル，RF コイルおよび MRI コンソールから構成されている[2]．

高温超伝導，MRI，バルク磁石

○たまだだいき，なかむらたかし，こせかつみ

バルク SCM は，6 個のリング状の YBCO 系高温超伝導バルク体(外径 88 mm，ボア径 23 mm, Tc=92 K)で構成されている．RF コイルは鞍型コイル（内径 9 mm, 外形 12 mm），勾配磁場コイルは Golay 型コイル（内径 14.8 mm，外形 16.8 mm）を用いた．

着磁方法として静磁場着磁法を採用した．着磁に用いる磁石として NMR 用ワイドボア超伝導磁石（JASTEC JRTC-300/89）を用いた．具体的な着磁手順を次に示す．まず，着磁用 SCM の磁場強度を 4.74 T とし，超伝導シムを用いて磁場を均一化した．次に冷凍機を用いて，バルク磁石を 100K にまで冷却し，着磁用 SCM の磁場中心に設置する．さらに，温度を 50K まで徐々に下げる（冷却過程）．その後，着磁用 SCM の磁場を 4.74T から徐々に消磁する（消磁過程）．最後にバルク磁石を冷凍機の最低温度（40K）で安定させ，バルク磁石の着磁が完了する．

静磁場の計測方法には，位相差法を用いた．計測時のファントムの溶液には，硫酸ニッケルを用いた．撮像には 3D スピンエコー法（TE/TR=20/100 ms, 分解能=200μm, マトリクスサイズ=64^3）を用いた．また，静磁場の評価領域は直径 6 mm，高さ 6 mm の円柱領域とした．また，計測した静磁場分布を球面調和関数展開によって解析し，静磁場分布の成分ごとの大きさの変化を調べた．なお，冷却過程での静磁場計測は，バルク SCM の温度がそれぞれ 100，92，84，70，60，50K のときに行った．また，消磁過程については，着磁用 SCM の磁場強度がそれぞれ，4.74，4，3，2，1，0T における静磁場分布の計測を行った．

3.　結果・考察

Figure 2 は，バルク SCM の冷却過程における静磁場不均一度（Peak-To-Peak 値，単位 ppm）をプロットしたものである．バルク磁石の温度が 100K，92K のときは静磁場分布にはほぼ変化が見られなかった．しかしながら，バルク体の Tc(92K)付近を境に，静磁場分布が大きく変化した．これは，バルク磁石が Tc 付近で相転移し，磁場を補足し始めているためであると考えられる．Figure 3 は，着磁用 SCM の消磁過程における静磁場不均一度の変化をプロットしたものである．バルク SCM の静磁場不均一度は，着磁用 SCM の静磁場強度が小さくなるとともに線形に小さくなっている．バルク SCM 冷却過程における静磁場不均一度の変化の大きさは，数 ppm 以下に収まっているのに対して，着磁用 SCM の消磁過程における変化の大きさは 100ppm を超えていることがわかった．

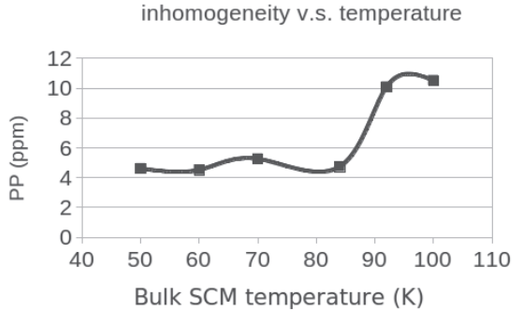


Fig. 2 The inhomogeneity against the temperature of the bulk SCM.

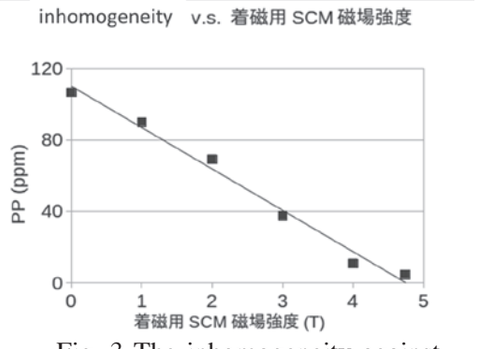


Fig. 3 The inhomogeneity against B0 strength of the SCM.

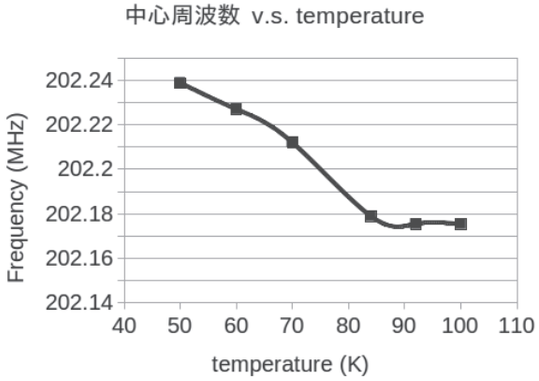


Fig. 4 The resonance frequency of the bulk SCM against the temperature of the bulk SCM.

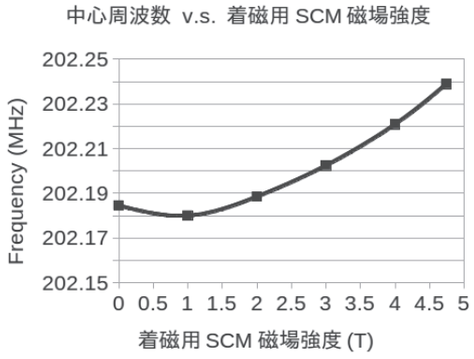


Fig. 5 The resonance frequency of the bulk SCM against B0 strength of the SCM.

着磁過程中のバルク SCM 中心周波数の変化を Fig.4 と Fig.5 に示した．Fig.4 は，冷却過程中のバルク SCM の中心周波数の変化である．中心周波数も静磁場不均一度と同様に，Tc 付近を境に中心周波数が変動し，冷却前の周波数に比べて約 60kHz 周波数が大きくなった．Fig.5 は，消磁過程中のバルク SCM の中心周波数の変化である．中心周波数は，2T 付近まではほぼ線形に変化している．しかしながら，1T 以下では飽和した．最終的な周波数は，着磁用 SCM の磁場強度が 4.74T のときに比べて約 50kHz 小さくなった．着磁過程全体でみると，着磁前の中心周波数(202.175MHz)と着磁後の中心周波数(202.184MHz)は，ほぼ同じという結果になった．

Figure 6 (a-c)はそれぞれ，(a)超伝導磁石内に配置された冷却前のバルク SCM の静磁場分布，(b)冷却過程終了時のバルク SCM の静磁場分布，(c)着磁完了時のバルク SCM の静磁場分布である．着磁過程が進むにつれて， 静磁場分布の二次成

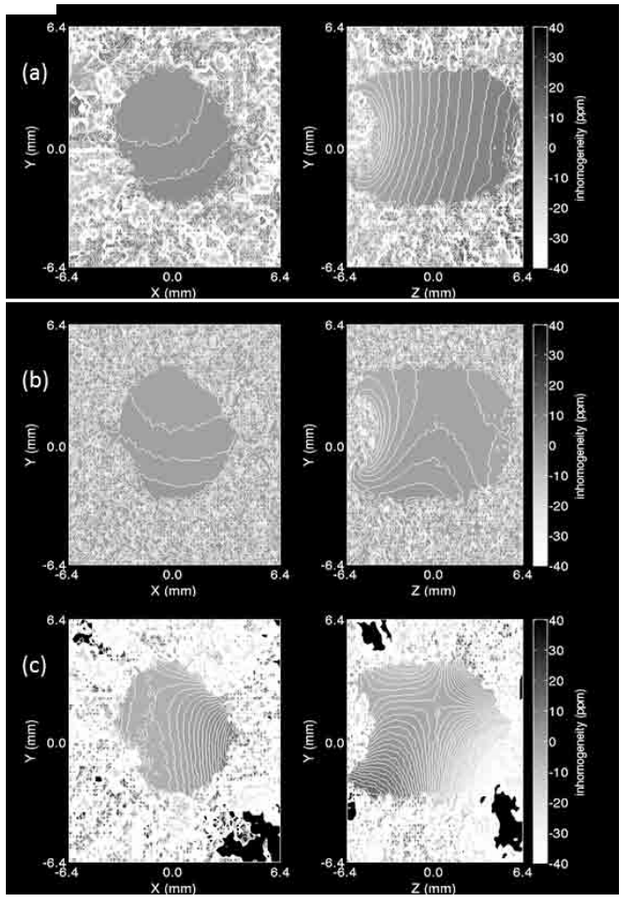


Fig. 6 B0 distribution maps of (a) the bulk SCM before cooling process, (b) the bulk SCM after cooling process, and (c) the energized bulk SCM.

分が大きくなっていることがわかる．着磁前のバルク SCM の静磁場分布は，一次の成分(X1，Y1，Z1)が支配的であった．しかしながら，バルク SCM の温度が Tc 未満の区間においては，一次の成分が小さくなっていることがわかった．

着磁用 SCM の消磁過程においては，バルク SCM 補足磁場の急激な変化が起きており，Tab.1 が示す通り，ほとんどの成分が増大している．特に顕著な成分の増加を示しているのが，YZ 成分と XZ 成分である．これらの項は，消磁過程を通して，成分の大きさが激しく増大し，着磁完了時においては支配的な成分となっている． また，これら二つの成分は着磁用 SCM の磁場強度に対してほぼ線形に変化していることがわかった．

Tab. 1 The magnitude of first- and second-order spatial components of the magnetic field.

着磁用SCM磁場強度(T)	4.74T	0T
Y1成分の大きさ (ppm)	0.18	12.81
Z1	-0.10	15.88
X1	3.27	2.66
XY	-0.12	0.92
YZ	**0.25**	**54.29**
Z2	2.80	4.31
XZ	**2.28**	**34.86**
X2-Y2	0.18	7.43

4. 結論

本研究において，バルク SCM の着磁プロセスを三次元的に可視化することに成功し，MRI を用いたバルク SCM の評価の有用性を示すことができた．また，得られたバルク SCM の静磁場分布を球面調和関数展開することによって，消磁過程において静磁場の特定の成分が増大していることを明らかにした．

バルク SCM のさらなる静磁場均一化を達成するためには，本研究で明らかになった YZ 成分および XZ 成分の増加を抑える必要がある．例えば，あらかじめ，YZ，XZ シムを用いて，増加する成分をキャンセルするような磁場の下で着磁を行うなどの手法が考えられるが，今回の実験のみではその手法の有効性を示すことは難しい．よって，今後はさらなる追加実験を行い，着磁手法の改善を目指す予定である．

5. 参考文献

[1] T. Nakamura, M. Yoshikawa, Y. Itoh, and H. Koshino, Concepts Magn. Reson., Part B31B, 65 (2007).
[2] K. Ogawa1, T. Nakamura, Y. Terada, K. Kose, and T. Haishi, Appl. Phys. Lett., 98, 234101 (2011).

P111

MRI を用いた湖沼底泥サンプルの撮像条件の検討

○高屋　展宏、渡邉　英宏、高津　文人、今井　章雄、
小松　一弘、佐藤　貴之
国立環境研究所

Visualizing 3D internal structure of lake sediments by MRI

○Nobuhiro Takaya, Hidehiro Watanabe, Ayato Kohzu, Akio Imai,
Kazuhiro Komatsu, Takayuki Satou
National Institute for Environmental Studies,Tsukuba, Ibaraki, Japan

The 3D internal structure of 30 cm of sediment core at the center of Lake Kasumigaura was measured using a MRI scanner. Burrows built by benthos may improve water quality by modifying the physical and chemical properties of the sediments. However, the method to visualize the burrows of benthos has not been reported. This study shows that the MRI scanner is a powerful tool for nondestructive analysis of sediments cores.

【はじめに】
湖沼について、近年、流域負荷の低減にも関わらず、水質の環境基準達成率が一向に改善されない。この原因の一つとして、過去数十年分の有機物の眠る底泥表層が嫌気環境になることで、多量のリン酸イオンやアンモニウムイオンなどの栄養塩類が溶出していると考えられる（還元状態）。有機物分解により還元化が促進される一方で、ユスリカなどの底生生物（ベントス）による活動で酸化的底泥が形成される。底泥内部の構造は、ベントスよる巣穴や有機物分解による気泡により形成されると考えられるが、今までこれらを可視化できる方法は報告されていなかった。そこで、今回、MRI による構造可視化の可能性を検討した。
【方法】
霞ヶ浦で採取した底泥を直径 12cm、長さ約 20cm のアクリル製の円筒に移し、上下をゴム栓で密閉して測定用サンプルとした。測定には人体用 4.7T マグネットに Agilent 社製 INOVA 分光計と頭部用 TEM コイルを用いて、グラジエントエコー（GE）法とスピンエコー（SE）法でイメージングを行った。
【結果と考察】
GE法では全く信号が得られなかった。底泥中の水分は約９０％と非常に高いが、泥の成分は有機物から無機物まで様々なものが混在しており、磁場が乱れているため信号が得られないと思われる。そこでSE法で測定したところ、巣穴と思われる線状の画像が得られたのでTR,TEの検討するためにT_1,T_2値を測定した。T_2値はMulti-echo Adiabatic Spin Echo (MASE)法、T_1値はSE法で測定した。その結果、巣穴と思われる線状の領域のT_1値は約900ms、T_2値は約20msであった。

キーワード：イメージング、湖沼底泥、底生生物（ベントス）

○ たかや　のぶひろ、わたなべ　ひでひろ、こうず　あやと、いまい　あきお
こまつ　かずひろ、さいとう　たかゆき

SE 法で測定する際の最適な TR を実測とシミュレーションで検討した。SE 法の TR を変化させて測定した結果、TR=600ms が最適な条件となった（図１）。
シミュレーションの場合、SE 法による信号強度 Mz は次の式で与えられる。

$$M_Z = M_0(1-\{2-\exp[-0.5\frac{TE}{T_1}]\}\exp[-\frac{TR-0.5TE}{T_1}]) \qquad \text{式 1}$$

（M_0は熱平衡状態の縦磁化、T_1は縦緩和時間、TRは繰り返し時間、TE はエコー時間）
この式にT_1=900msを入れて計算した。TEはシークエンスで設定できる最短の10msにした。(図２)。
実測とシミュレーションの挙動は一致しているので、実測の結果より３次元のSE法でTR=600msを採用することにした。

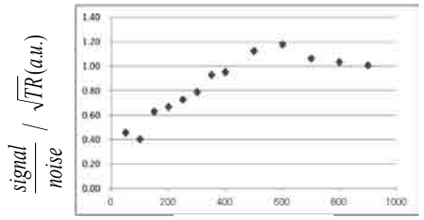


Fig. 1 Observed S/N ratio per measurement time as a function of TR.

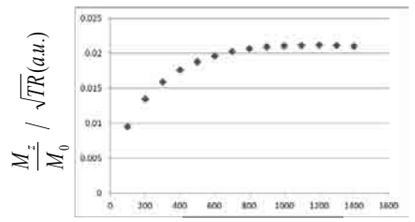


Fig. 2 Calculated signal strength per measurement time as a function of TR.

最適化した条件を用いて３次元のSEシークエンスで測定した結果、巣穴と思われる線状の信号と泥の空隙に存在する水の信号が得られた（図３）。

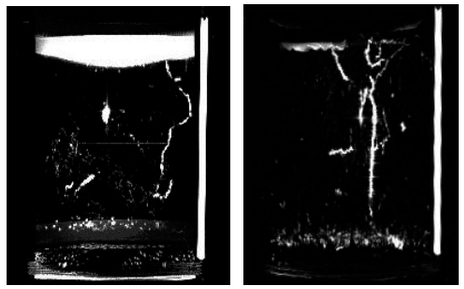


Fig. 3 MIP images of bottom sediments cores
Sequence 3D-SE
FOV 19.2x19.2x19.2　(cm)
Matrix 256x256x256
TR=600ms, TE=10ms, NEX 2
Measurement time 22hr

同じサンプルをMRとX線CTで撮像して比較したところ、MRIでは底泥中の空隙に存在する水を可視化できた一方、X線CTでは、水と泥の間のコントラストは弱く、底泥中の空隙に存在するガス空間の描出に優れていた。これはお互いを補完する画像であり、底泥の構造を解析するためには両者による測定が有効と考えられる。
スピンエコー法を用いることで、MRIで底泥の構造可視化の可能性が示唆された。しかしS/Nが悪く、測定時間もかかるため、専用コイルを作成して、測定時間の短縮、画質の向上が可能か否か検討したい。

【謝辞】
X線CTの測定にあたり、茨城県立医療大学の阿武先生、津田先生、および国立がん研究センター東病院の山口先生にご協力いただき、ありがとうございました。

P112 地磁気MRIにおける送受信共振回路の不感時間低減による高感度化

○山根知明、赤羽英夫、糸﨑秀夫
大阪大学大学院　基礎工学研究科

Sensitivity enhancement of Earth's field MRI by reducing dead time of resonant circuit.

○Tomoaki Yamane, Hideo Sato-Akaba, Hideo Itozaki
Graduate School of Science Engineering, Osaka University

Abstract: It is difficult to obtain magnetic resonance images of the samples having short relaxation time (T_1) such as human tissues (T_1 <100 ms) under the Earth's field because of the weak signal intensity and the short measurable time. To overcome it, it is important to reduce the dead time of the resonant circuits and to start measuring the NMR signal as soon as possible after the transmission of an excitation pulse. In this study, we generated the short pulses using a Q switch, and reduced the switching noise induced at the magnetic gradient inversion by modifying its control signal. To improve the signal sensitivity, we also shortened the echo time between the pulse end and the middle of the echo signal to about 50 ms. We successfully realized the 2D gradient echo imaging of ~4 mM $CuSO_4$ solution (T_1~ 0.13 s).

1.はじめに

地磁気は自然界に遍在する磁場でありながら、高い均質性を持つことから、NMR誕生当初より地磁気を外部印加磁場に利用した地磁気NMR(EFNMR)が研究されてきた [1]。しかし、磁場強度が微小であるために信号感度が低く、地磁気NMRは広く研究に用いられるまでに至っていない。また、地磁気MRI研究においても緩和時間の短い生体組織や人体のイメージングはチャレンジングな課題であると考えられている[2]。こうした背景の下、我々は緩和時間の短い腕や関節等のイメージングを可能にする地磁気MRI装置の開発を目標としている。今回送受信共振回路部分にQスイッチを用いることにより、パルス送信時のQ値を下げることで(Q～2.2)、パルス照射後の共振回路の不感時間を約17msにまで短縮し、これを用いて勾配エコー信号取得を行った結果、従来よりも緩和時間の短いサンプルに対してイメージングを行うことが可能となった。さらに、勾配磁場の切り替え時に生じるスイッチングノイズが信号計測の妨げになっていたが、制御信号を滑らかに切り替えることでノイズを軽減し、T_1が0.13秒程度の$CuSO_4$水溶液に対して、明瞭な2D投影画像の取得に成功した。

MRI, Earth's magnetic field, EFNMR

○やまね　ともあき、あかば　ひでお、いとざき　ひでお

2.開発中の地磁気 NMR-MRI 装置構成

開発中の地磁気 NMR-MRI 装置構成概要を Fig.1 に示す。地磁気下での磁化は非常に微小であるため、本研究では地磁気と垂直な方向に～1000 倍の磁場を印加することで磁化を増強させる Pre-polarization 法を用いており、本装置は主に分極コイル、イメージング用勾配コイル、および NMR 送受信用コイル制御回路から構成されている。装置制御信号の入出力には National Instrument 社の Data acquisition board を使用し、Labview 2009 にてプログラムを行った。また、コイルの構成は内側から NMR プローブコイル、勾配コイル、分極コイルの 3 重構成とした。

今回、一般的な NMR 信号送受信回路に Q スイッチを加え、パルス送信時のみ Q 値が低減されるように制御を行った。その NMR 信号制御回路の概要を Fig.2 に示す。この回路では、計測開始時にパルス制御用スイッチを ON にして定電圧印加することにより共振回路のキャパシタを充電し、同スイッチを切る際に生じる共振回路の過渡現象によりパルス照射を行うことができる。この際 Q スイッチによりパルス送信時は共振回路の Q 値を低い値(Q～2.2)に、受信時には高い値(Q～15.6)にして信号の送受信を行った。Q スイッチの有無によるパルス送信波形を Fig.3 に示す。

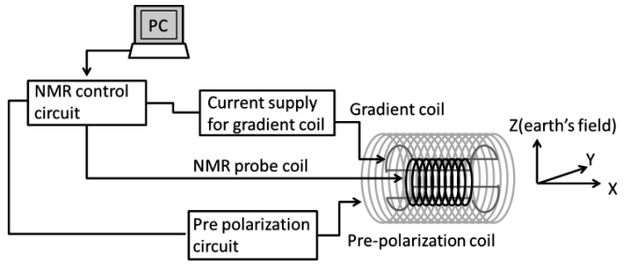


Fig.1. Schematic diagram of a homemade EFNMR-MRI instrument.

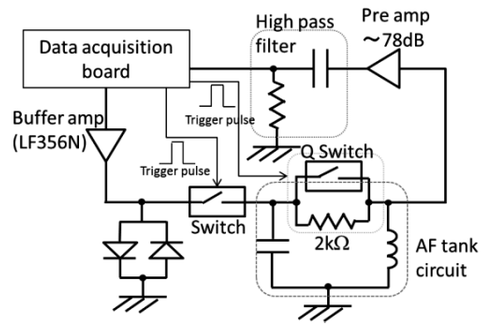


Fig.2. Schematic diagram of a NMR transceiver circuit including Q switch.

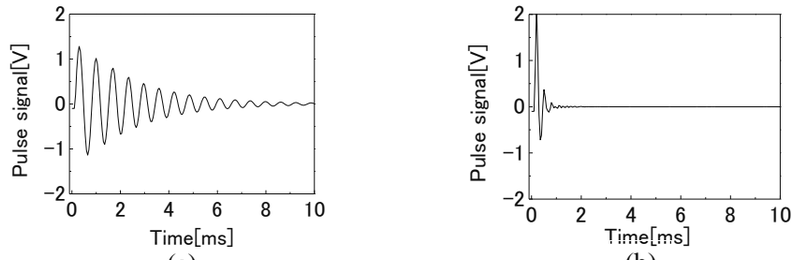


Fig.3. Pulse signal (a) without and (b) with Q switch.

3.実験結果

本研究ではグラジエントエコー法を用いてイメージングを行った。この方法では勾配磁場の極性を切り替える必要があるが、エコー信号のピーク取得に対して勾配磁場制御信号の切り替え時に生じるスイッチングノイズが問題になることが明らかとなった。そこで、勾配磁場を反転させる制御信号の切り替わり部分に Arctan 関数を組み込み、滑らかに変化させることでノイズの軽減を行った。一般に用いられる勾配磁場制御信号と今回使用した信号波形を Fig.4 (a),(b)に、およびそれぞれの制御信号に対するスイッチングノイズの様子を Fig.4 (c),(d)に示す。なお、勾配磁場制御信号には、シム調整用に電流を供給するために、オフセットとして電圧が加えられている。

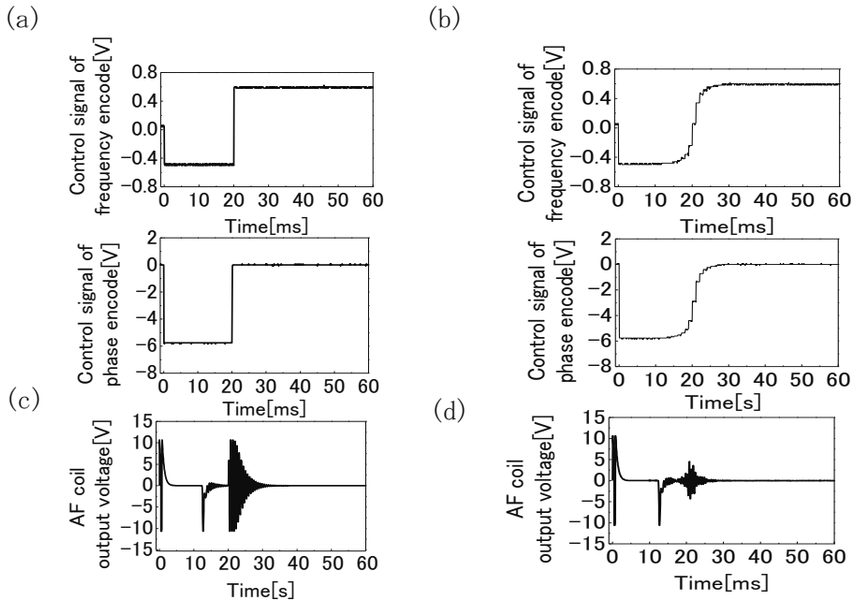


Fig.4. (a) Normal and (b) modified control signal for magnetic field gradient. (Upper column: signal for frequency encode, lower column: signal for phase encode) (c) AF coil output voltage measured in a normal signal and (d) in modified one without any sample.

今回作成した Q スイッチおよび勾配切り替え制御信号を用いた自作地磁気 MRI 装置で、T_1 が 2.8 秒程度の 500 ml ボトル内純水、および T_1 が 0.13 秒程度の 500 ml ボトル内 $CuSO_4$ 水溶液 ~4 mM に対して 2D 断面画像の取得を行った。各サンプルの取得した 2D 画像を Fig.5、Fig.6 に示す。この結果において、測定時にペットボトルを横に倒しているため画像の上側に液面が観測できる。なお、各測定で異なる径のボトルを用いたため、取得した画像も大きさが異なっている。この結果から画像分解能を評価すると液面部分の微分による半値幅評価で約 6.3 mm 程度であった。また、$CuSO_4$

水溶液は純水に比べ T_1 による減衰が早いため、同積算回数で 0.4 倍程度の S/N になっているが断面画像が明瞭に確認できた。

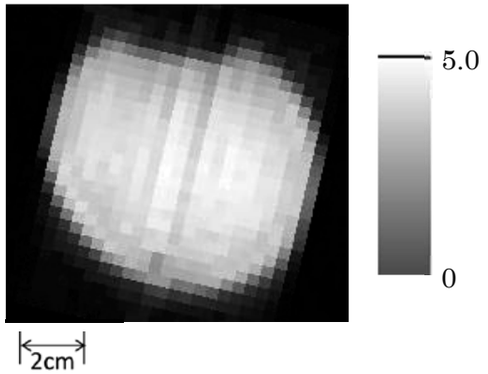


Fig.5. 2D reconstructed image of water in 500 ml PET bottle (about 7 cm in diameter).

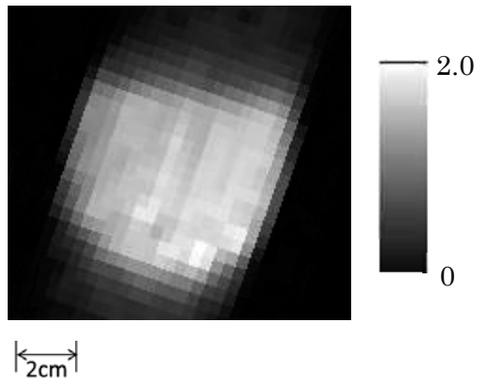


Fig.6. 2D reconstructed image of ~4 mM $CuSO_4$ solution in 500 ml PET bottle (about 6 cm in diameter).

4.考察

自作地磁気 MRI 装置において Q スイッチを用いたパルス照射および勾配磁場制御信号の加工を行うことで、グラジエントエコー信号のピークをパルス照射から 50 ms 程度まで短縮できた。これらの改良は緩和時間の短いサンプルの画像化を行うために必要となる高感度化に有効であると考えている。

5.参考文献

[1] P. T. Callaghan *et al*, Appl. Magn. Reson.32, 63-74 (2007)
[2] M. E. Halse *et al*, Journal of Magnetic Resonance, 182, 75-83 (2006)

P113

安定同位体標識技術を用いた土壌微生物叢の代謝動態の評価

○小倉立己[1, 2]、伊達康博[1, 2]、坪井裕理[2]、菊地淳[1, 2, 3, 4]
[1]横市大院生命，[2]理研 PSC，[3]名大院生命農，[4]理研 BMEP

Evaluating metabolic activity of soil microbiota by monitoring stable-isotopes from plants

○ Tatsuki Ogura[1, 2],Yasuhiro Date[1,2],Yuuri Tsuboi[2], and Jun Kikuchi[1,2,3,4]
[1]Grad. Sch. NanoBio., Yokohama City Univ., [2]RIKEN PSC, [3]Grad. Sch. Bioagri., Nagoya Univ., [4]RIKEN BMEP.

Bacteria inhabit various environments such as animal guts, soil, and ocean, and are responsible for important works such as gut immunity and material recycling which they interact each other. However, these processes including degradation of complex biochemical mixtures by microbial community remain unclear because of their complexity. In this study, we attempted that microbial degradation ability which metabolism of low molecules from plant biomass and change of microbiota were characterized using solution-nuclear magnetic resonance (NMR) and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). In addition, we attempted to evaluate relationship between produced organic acid and originated stable isotope labeled plants.

【序論】

微生物は空気中や土壌、水中など様々な環境中に生息し、各微生物が相互作用をしながら地球上の物質循環に貢献している。例えば植物バイオマスを構成するリグノセルロースは難分解性物質であり生体内ではほとんど分解されないが、土壌中の微生物により分解され、最終的にメタンなどのバイオガスへと変換される。しかしそれらの生体高分子およびその分解反応は基本的に複雑であり、様々な微生物叢が相互に影響を及ぼし、多種多様な代謝経路を経て分解されるため、生体分子複雑系の分子メカニズムについては未だ不明な点が多いのが現状である。

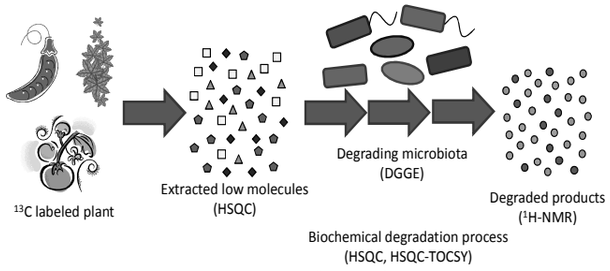


Fig. 1 Schematic overview for evaluation of degradation process of complex biochemical mixtures by soil microbiota

本研究では安定同位体標識技術を用いて標識植物を作成し、植物由来の標識された生体分子混合物を土壌微生物叢に分解させ、その時の代謝動態と微生物叢の変遷を溶液NMRと変性剤濃度勾配ゲル電気泳動（DGGE）を用いてそれぞれ評価することで、複雑微生物叢による分解プロセスの代謝動態を明らかにし、生体分子複雑系の分子メカニズム解明に資する有益な情報の獲得を目的とした。

^{13}C安定同位体標識，土壌微生物叢，代謝動態

○おぐらたつき，だてやすひろ，つぼいゆうり，きくちじゅん

【方法】

本研究では$^{13}CO_2$下で育成されたダイズ、トマト、コマツナを植物サンプルとして用いた。これらのサンプルを凍結乾燥後、フードカッターとボールミルマシンで微粉砕処理を施し、福島の津波被害のあった農地から採取した土壌と混合し、30℃で振とう培養を行った。培養後1～50日目まで継時的にサンプリングを行い、得られたサンプルの溶液中および固体中の代謝物と微生物叢の時系列変動を、NMRやDGGEを用いてそれぞれ評価を行った。

【結果および考察】

土壌微生物叢による植物サンプルの代謝動態を^{1}H-NMRおよび^{1}H-^{13}C HSQCを用いて評価した結果、実験系の違いに基づきそれぞれ異なる代謝プロファイルを示しており、トマト、コマツナおよびダイズの実験系ごとにクラスタリングされる傾向にあった（Figs. 2a and b）。クラスタリングに寄与した因子を解析した結果、トマトではEthanolやOxaloacetateが、コマツナでは2-Oxoglutarateや4-aminobutanoate, Putrescineが多く存在していることが明らかとなった。

さらに土壌微生物叢の変動をDGGEにより評価を行った結果、分解したサンプルによって各微生物叢はそれぞれ異なったプロファイルを示し、ダイズでは分解中期ごろにPC2の負の方向に、トマトではPC3の正の方向へと変動していた（Figs. 2c and d）。それらに関与している因子を解析した結果、ダイズでは*Lactobacillus brevis*, *L. nasensis*が、トマトでは*L. pentosus*, *L. guizhouensis*と相同性の高い微生物が大きく関与していた。以上の結果から、土壌微生物叢とその主要なメンバーは、分解したサンプルの種類によって異なることが示された。今後は、安定同位体標識代謝物と未標識代謝物を識別し、より詳細な代謝動態を明らかに出来るよう検討していきたい。

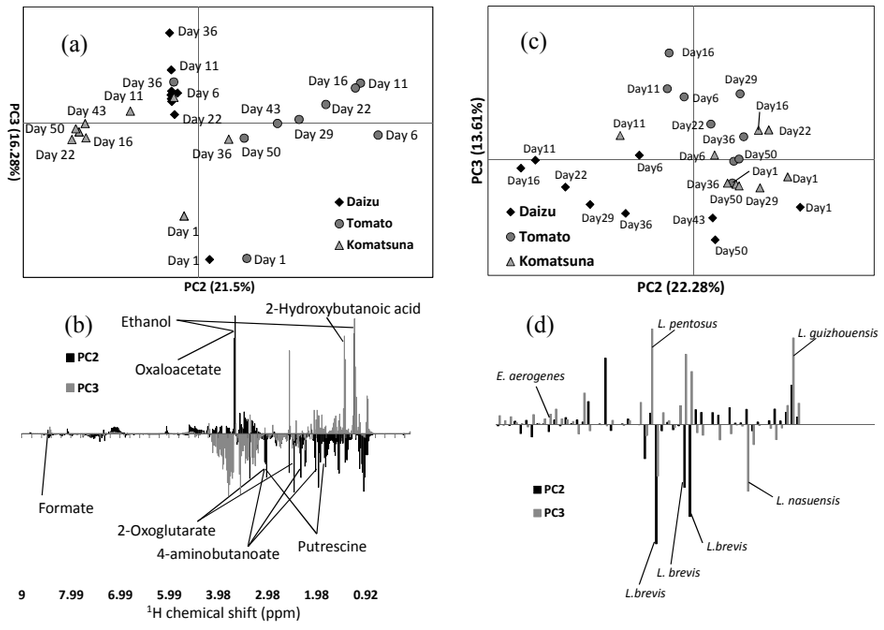


Fig. 2 Profiling of low molecules degradation (a and b) and degrading microbiota (c and d). Dynamics of plant sample degradation (a) and microbiota (c), and characterization of each component (b and d).

P114

^{1}H-NMR メタボロミクスの医療応用ーその 6
ー 透析治療廃液スペクトルの統計的パターン認識

○新川隆朗[1]、安藤一郎[1]、高橋征三[1]、今井潤[1]、竹内和久[1,2]藤原正子[1]
[1]東北大･薬　[2](医)宏人会中央クリニック

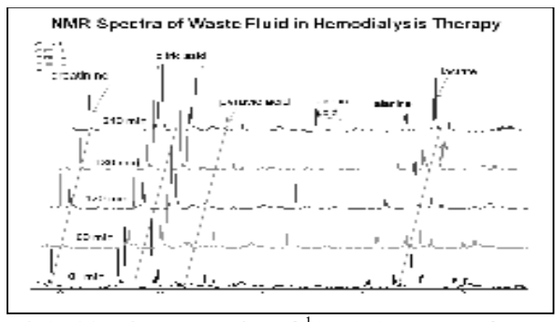
Clinical Application of ^{1}H NMR Metabolomics-Part VI
Statistical Pattern Recognition of Dialysate Spectra in Hemodialysis

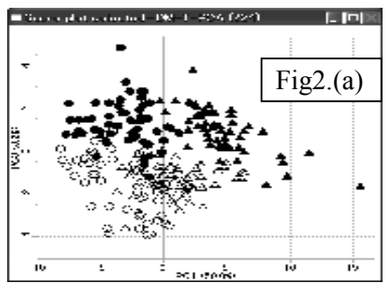
○Takao Shinkawa[1], Itiro Ando[1], Seizo Takahashi[1], Yutaka Imai[1], Kazuhisa Takeuchi[1,2], and Masako Fujiwara[1]
[1] *Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University, Sendai, Japan.*
[2] *Koujinkai Hemodialysis Central Clinic, Sendai, Japan*

Dialysate wastes were collected at several time points during hemodialysis (HD) from 2 major patients groups, diabetes-derived (DM) and non DM patients. Total 228 ^{1}H NMR spectra were measured by 600 MHz NMR spectroscopy. Spectra were analyzed using Principal Component Analysis (PCA) and Bayesian Linear Recognition Method (BLRM) with Feature Selection (FS), for the purpose of detecting patients' metabolism under HD. Our approach is to find out the new clinical markers which identify the underlying diseases despite their phenotypical complexity.

＜目的・背景＞ 透析患者は一般に複雑な原疾患や病態を持つ。近年、糖尿病（DM）を原疾患とする患者が急激に増加し、この予後不良が大きな問題である。これらの解決に従来の生化学データ等の診断では十分と言えず、病態診断や進行因子の標的は定まらない。我々は非標的解析法として^{1}HNMR メタボロミクス法とパターン認識を用いて代謝物を包括的に捉え、病態特異的な標的をあぶり出すことを目的とする。廃液は低分子成分のみで NMR 分析に適しており、採集は患者には完全に非侵襲的であるため時系列変化を追うことが可能となる。

Fig.1. Time course of dialysate spectra during HD





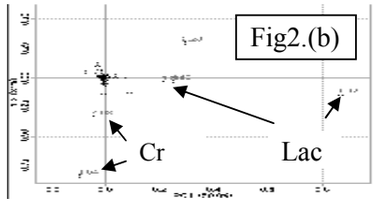


Fig2. (a) PCA score plot of ^{1}H-NMR spectra from DM (○●) and non-DM (△▲) patients.　○△ ; 0～60 min, ●▲ ; 120~240 min　(b) loading plot.

統計的手法、NMRメタボロミクス、透析治療
○しんかわたかお、あんどういちろう、たかはしせいぞう、いまいゆたか、たけうちかずひさ、ふじわらまさこ

＜対象・方法＞（医）宏人会の患者から同意を得、延べ 38 名(DM18, non-DM20 名)の透析治療中 6 ポイントの時間で廃液を採取した。廃液 550 μL に 50 μL の D_2O と TSP-d_4 を加えたものを 1 サンプルとし、これを 600 MHz NMR（JEOL ECA）により ^{1}H NMR 測定した。水消しは事前照射法を用いた。PCA および BLRM の前処理として、スペクトルは、0.04ppm 幅でバケット積分し各々を特徴量として解析をする。総積分値は 100 にノーマライズした。

＜結果・考察＞　典型的な患者の廃液スペクトルの時間変化を Fig.1 に示す。時間を追ってクレアチニンは単調減少するが他の代謝物は必ずしも同じ挙動でない。DM, non-DM の廃液スペクトルを各々108, 120 本測定し PCA に供した。Fig.2 のスコアプロットは PC1, PC3 軸でそれぞれ DM と non-DM 群の分類と透析時間によって分かれていることが示された。ローディングはこの分布に寄与した代謝物を表現し、透析時間にはクレアチニンが病態分類には乳酸が寄与することが示された。とくに透析時間の後半で病態の特徴が分かれること見てとれる。

そこで後半のスペクトル DM と non-DM の 54, 60 本を特徴選択法（FSM）とベイズ線形識別器（BLR）で解析した。両群を分ける最適な識別器を求め、そのときに最も識別に寄与するメタボライトを求めた。フィッシャー比の大きい順に変数を選択し識別の評価は誤識別率を用いた。Fig.3 が用いた変数と誤識別率であるが 6 位までの変数で誤識別率が 5.3%と減少することがわかった。表 1 にこれらに対応する代謝物を示すが、PCA の結果と同様に乳酸が最も識別に寄与していることが分かった。すなわち non-DM は透析後半で廃液中の乳酸が増えているが、DM は顕著な変化がない。Fig.4 は non-DM のスペクトルの平均値から DM のそれを引いたものである。これらの結果から、血液透析中の透析患者の代謝物の変化が、non-DM と DM との違いを示すものと示唆される。さらに詳細な解析を行い未知な疾患マーカを発見できるものと考えている。

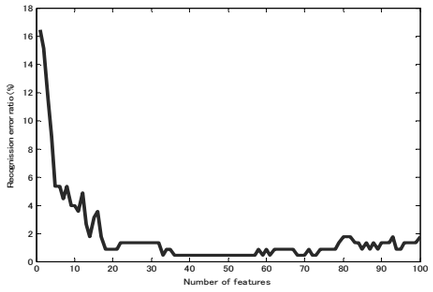


Fig.3. Error ratio *vs*. No. of features analyzed by BLRM

Order	^{1}H (ppm)	Metabolite
1st	1.30 - 1.34	lactate
2nd	3.02~3.06	creatinine
3rd	4.06~4.10	creatinine
4th	3.94~3.98	creatine, tyrosine, phenylalanine
5th	1.06~1.10	valine
6th	1.34~1.38	lactate

Table1 : Top 6 features and their corresponding metabolites which are selected by FSM.

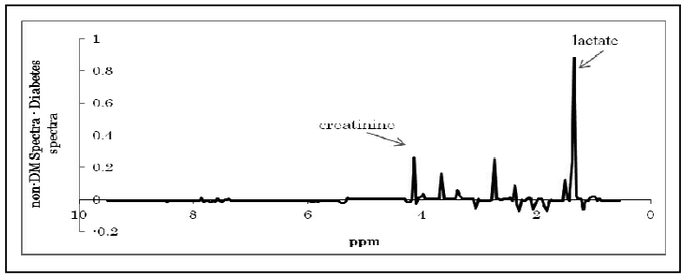


Fig.4 : Subtraction mean DM spectra from mean non-DM spectra.

P115

異種計測データプロセッシングによる水圏植物バイオマス評価の試み

○伊藤研悟[1], 坂田研二[2], 伊達康博[1,2], 菊地淳[1,2,3,4]
[1]横市院生命　[2]理研PSC　[3]理研BMEP　[4]名大院生命農

Evaluation of plant biomass from hydrosphere by data processing of various analytical measurements

○Kengo Ito[1], Kenji Sakata[2], Yasuhiro Date[1,2] and Jun Kikuchi[1,2,3,4]
[1]Yokohama City Univ., Kanagawa, Japan.,　[2]RIKEN PSC, Kanagawa, Japan.,
[3]RIKEN BMEP, Kanagawa, Japan.,　[4]Nagoya Univ., Aichi, Japan.

Data processing techniques are not developed so for integrated evaluation of various spectral data obtained by biomass measurements. Here we examined new data processing technique for integration of various measurements to evaluate the biomass components. Use of Multivaiate Curve Resolution (MCR) method was useful for data preprocessing of overlapped signals and removing noise from spectra data. In combination with MCR method, comprehensive analysis was performed by integrated analysis using Principal Component Analysis (PCA) and Self-Organizing Maps (SOM) from various analytical measurements, not only from solution and solid-state NMR, but also from FT-IR, TG-DTA, ICP-OES, CHNS-O and SI-MS instruments.

【 背景・目的 】　近年、バイオマス資源の有効利用に関する研究が盛んに行われている。バイオマス資源は地球上に豊富に存在し、その用途は多岐に渡るため、多角的なバイオマス成分の評価は重要である。しかし、バイオマス計測により得られた多様なスペクトルデータを統合的に評価するための有用なデータプロセッシング技術は整備されていないのが現状である。そこで我々は、バイオマス成分を多角的に評価するために、水圏環境サンプルを用いて異種測定データの統合データプロセッシング手法を模索した。

【 実験方法 】　本研究ではヒジキ(*Hizikia fusiformis*)を天然海藻サンプルの例として用いた。採集場所は定点(神奈川県三浦市油壷)で、2011年5月から2012年4月の期間に月に1~2回の頻度で採集した。計17サンプルを凍結乾燥後破砕し、得られた粉末試料を各種計測手法により評価した。各種計測機器によるバイオマス評価として、FT-IR、TG-DTA、固体NMRでは固体成分、溶液NMRでは極性代謝物、ICP-OES、CHNS-O、SI-MSでは構成元素及び天然安定同位体比を測定した。年間を通しての海藻類の成分・組成変化を網羅的に検出し、季節変動に対して特徴的な情報の探索を行うため、各測定項目で得られたデータを計量化学に基づき、統合データプロセッシングを行った。本研究におけるデータプロセッシングには、統計解析ソフトのプログラムR及びスペクトル分離ソフトのfitykを用いた。

キーワード；水圏植物バイオマス、環境メタボロミクス、計量化学

○いとうけんご，さかたけんじ、だてやすひろ、きくちじゅん

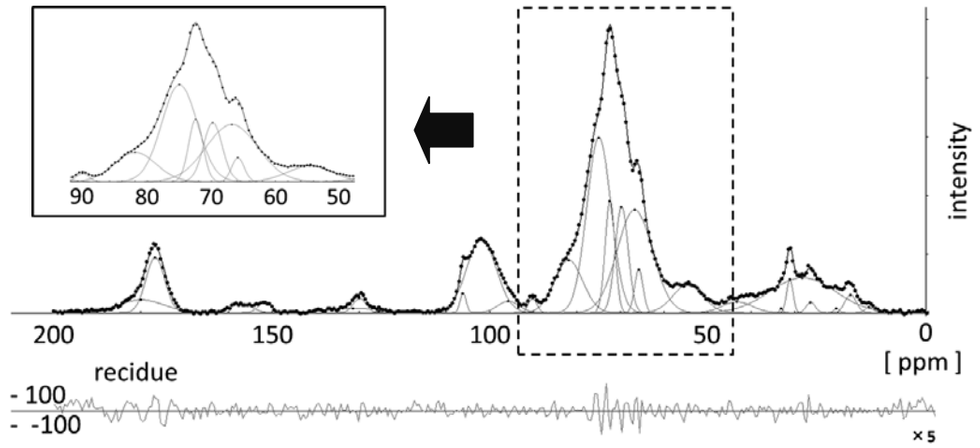


Fig.1　The results obtained from the fitting of Gaussian functions in a ^{13}C CP-MAS NMR binned data (・・・) of *Hizikia fusiformis*. The Gaussian functions (—) as well as the overall fit (—) are depicted.

【 結果・考察 】
各測定項目から得られたデータの統合解析を行う場合の特徴抽出法として、主成分分析(PCA)や相関解析、自己組織化マップ(SOM)が有効である。しかし、固体NMRやFT-IR、TG-DTAのように比較的ブロードなスペクトルデータを相関させる場合、ノイズ成分が影響を及ぼし、有益な情報を抽出することが困難である。そこで、本研究ではノイズ成分を除去して解析を行うのに有効な手法として、多変量スペクトル分離法(MCR-ALS)を用いた。MCR法とは、得られたスペクトルが、純成分のスペクトルの和となると考えて、各純成分のスペクトルを分離する方法であり、ノイズを含むスペクトルデータから各成分データを抽出することができた(**Fig.1**)。溶液NMRに関しては、^{1}H-^{13}C HSQC NMRの測定データをSpinAssignツールによりアノテーションの候補を付け、候補が付いた^{1}H NMRスペクトルのピークピックを行い、統合解析に供試した。以上の統合データマトリックス(17×166)をPCAおよびSOM解析した結果、各時期における成分・組成・元素の変動および関係性を見出すことができた(**Fig.2**)。従って、異種測定により得られたスペクトルデータはMCR法によりノイズ成分を除去し、意味のある成分を抽出することができ、前処理により得られたデータを統合解析することにより、網羅的な情報の探索が可能であった。

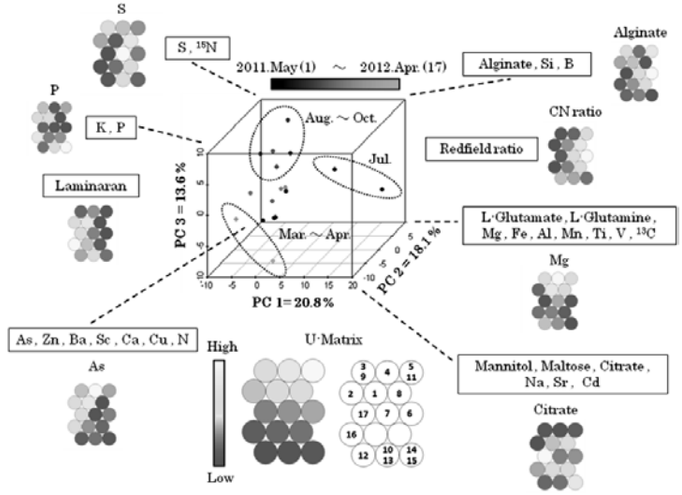


Fig.2　Integration analysis of data obtained by various analytical measurements (PCA and SOMs).

P116

深海底泥反応場を評価するための異種計測データマイニング

○伊達康博[1, 2], 朝倉大河[2], 坪井裕理[1], 吉田尊雄[3], 丸山正[3], 菊地淳[1, 2, 4, 5]

[1]理研・PSC, [2]横市院・生命, [3]JAMSTEC, [4]理研・BMEP, [5]名大院・生命農

Data mining across heterogeneous measurements for evaluation of sediment ecosystems in the deep-sea area

○Yasuhiro Date[1, 2], Taiga Asakura[2], Yuuri Tsuboi[1], Takao Yoshida[3], Tadashi Maruyama[3], and Jun Kikuchi[1, 2, 4, 5]

[1] *RIKEN Plant Science Center, Kanagawa, Japan.*

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

[3] *JAMSTEC, Kanagawa, Japan.*

[4] *RIKEN Biomass Engineering Program, Kanagawa, Japan.*

[5] *Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University, Aichi, Japan.*

The oceans cover over two-thirds of our planet with an average depth of about 3,800 m. The deep-sea area which occupies the great portion of the oceans has basically energy source-poor environment. The deep-sea area including whale falls are usually investigated in a biological viewpoint such as community members of the ecosystem, however little information about chemical profiles and their relations to complex microbial ecosystem are available. Here we described a chemical profiling for evaluation of sediment ecosystems in the deep-sea area by the mining across heterogeneous measurements such as nuclear magnetic resonance (NMR)-based metabolomics approach, inductively-coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES)-based ionomic analysis, and pyrosequencing-based microbial community analysis.

【緒言】

地球上の7割を占める海洋の平均深度は約3800mであり、大部分がエネルギー源の乏しい深海である。エネルギー源の乏しい深海底に鯨の死骸が沈降すると、豊富なエネルギー源が供給される「オアシス」となり、脂肪の分解過程でメタンや硫化水素といった化学合成の基質となる多くの物質が生成され、化学合成細菌を生産者とした独自の生態系が形成される。こういったエネルギー源の乏しいあるいはスポット的にエネルギー源が豊富となった深海底泥において、底泥有機物の化学形態とその分解・代謝・産生プロセスに関する有用な知見は乏しく、化学的反応場としての海底のキャラクタリゼーションはほとんど行われていないのが現状である。本研究ではNMRを基軸として底泥有機物を評価すると同時に、元素組成をイオノーム解析、構成微生物叢をpyrosequencing法によって解析し、これら異種計測データを統合的に評価することで、底泥有機物の化学形態とその物質循環に資する有益な知見を得ることを目的とした。

NMRメタボロミクス，多変量解析，生体分子複雑系

○だてやすひろ，あさくらたいが，つぼいゆうり，よしだたかお，まるやまただし，きくちじゅん

【実験方法】

2008年1月に実施された研究航海において相模湾初島沖の各地点（計10サイト）からサンプリングを行った。サンプリング方法としては、ハイパードルフィンを用いておよそ900m～1200mの深海に潜航し、MBARI式コアサンプラーにより海底表面から深さ約40cm程度までの底泥を採取し、コアサンプラー内の底泥を表層、中層、下層の三層にわけて回収した。採取した底泥サンプルは凍結乾燥し、メタノール溶媒やDMSO溶媒を用いて底泥有機物を抽出しNMRメタボローム解析に供試した。また、深海底泥に分布する元素組成評価のために硝酸抽出を行いICPイオノーム解析に供試するとともに、pyrosequencing法により深海底泥生態系を構成する微生物叢の解析を行った。得られた異種計測データは数値化・マトリクス化し、主成分分析（PCA）等の多変量解析により評価した。

【結果および考察】

鯨骨直下の底泥サンプル（表層、中層、下層の3層）を含む各地点の深海底泥に対してNMRメタボローム解析を行った結果、鯨骨直下の表層サンプルにおいて脂質由来物質のシグナルが顕著に観察され、他の地点と大きく異なるプロファイルを示した（Fig. 1a）。同様にICPイオノームデータの解析結果では、鯨骨直下の表層および中層サンプル、鯨骨至近の底泥表層サンプルにおいて特徴的なプロファイルを示し、これらの底泥にはカルシウムやストロンチウムなどの元素が多く含まれていることを明らかにした（Fig. 1b）。また、pyrosequencing法による微生物叢の解析結果においても、鯨骨直下の表層サンプルで他の地点と異なるプロファイルを示すことを明らかにした（Fig. 1c）。

次に、深海底泥における難分解性の有機物質に関する知見を得るため、水酸化ナトリウムを用いて腐食物質の抽出を行い、DMSO可溶化腐植物質のNMR計測を行った。得られたNMRプロファイルから、鯨骨直下の表層サンプルは他の地点と比較して特徴的なプロファイルを示すことがわかった。また、関東近郊の河川底泥プロファイルと比較すると、深海底泥における腐食物質のプロファイルは河川底泥のものと大きく異なる傾向にあることが明らかとなった。以上のように、エネルギー源の乏しい深海底泥とエネルギー源が豊富な鯨骨下底泥における有機物プロファイルや元素プロファイル、微生物叢プロファイルの違いを評価することが可能であった。

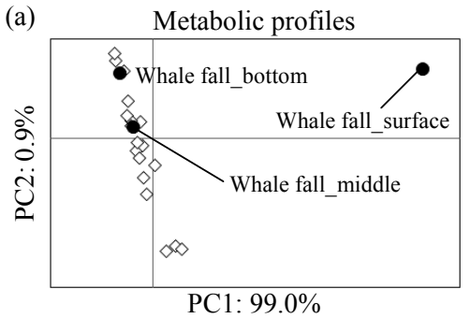


Fig. 1 PCA score plots of metabolic, mineral, and microbial community profiles based on NMR, ICP-OES, and pyrosequencing data, respectively.

P117

[1]H-NMR メタボロミクスの医療応用　その５
血清脂質の共通因子法によるスペクトル分解

○高橋征三[1]、安藤一郎[1]、今井潤[1]、竹内和久[1,2]、藤原正子[1]
[1]東北大学薬学系研究科，[2]宏人会中央クリニック

Clinical Application of [1]H-NMR Metabolomics: Part V
Spectral Separation of Saline Lipids by GRAM

○Seizo Takahashi[1], Ichiro Ando[1], Yutaka Imai1[1], Kazuhisa Takeuchi[1,2], and Masako Fujiwara[1]
[1] Grad. Sch. Pharm. Sci., Tohoku Univ,　[2] Koujinnkai Clinic CKD Cnt.

Saline lipid methyl resonance were tried to resolve into several components by means of GRAM(Generalized Rank Annihilation Method), assuming that the spectral change were explained by the decay curves and their constituents. T2 decays were separated into 2 components while T1 decays were 3 components. The line-shape of 2 methods was different and the solution was rather instable. The result suggests that a recursive method is indispensable to make a reasonable curve resolve based on the difference in relaxation rates.

血液中のリポタンパク質は顆粒状をなし、サブクラスとしてVLDL, LDL, HDL等に分けられることができる。この成分比をNMRスペクトルから定量するには、カタログスペクトルの線形結合でスペクトルをFittingする方法がある。本研究の目的はその方法を補完することである。

【実験】試料は腎透析患者の血清を用いた。使用した装置はJEOL ECA600で、それにNaloracの[1]H専用プローブを装着した。

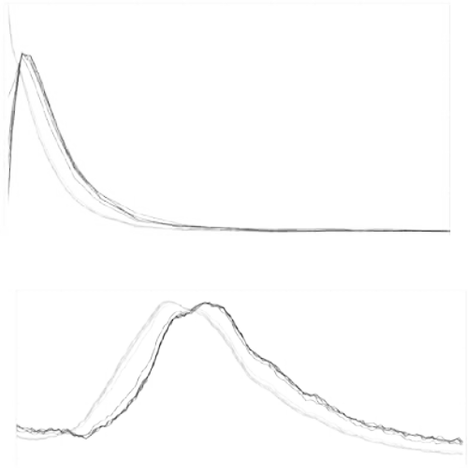


Fig 1　Two Component Analysis of T2 Decay by GRAM.
(a) Resolved spectra (b) decay curves
Overlapped multiple lines are the solution of each measurement. The 2 component result was reasonably stable.

血清、脂質、共通因子法

○たかはしせいぞう, あんどういちろう, いまいゆたか, たけうちかずひさ, ふじわらまさこ

CPMGおよびIRFTスペクトルは各々32回積算し、同一条件で８回繰り返し測定した。データはAlice2でFT後MATLABに読み取りPLS_Toolboxを使って解析した。

【解析】血清スペクトルはタンパク質由来の信号の上に、脂質の非対称のメチル基信号が比較的孤立して現れる。待ち時間に応じて強度変化する２種のスペクトル群を用意し、GRAM によって、共通因子として存在するパラメータ数を指定して、それぞれの緩和成分を担うスペクトルと、その強度変化に分離した。

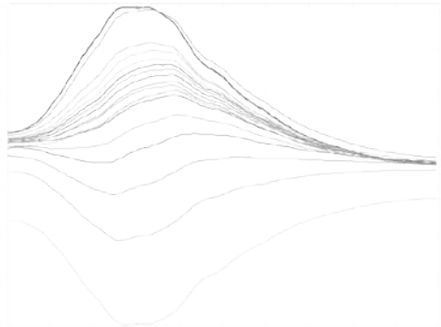
【結果】図１はGRAM(Generalized Rank Annihilation Method)による解の一例を示す。２成分の解析では安定な解を得たが、減衰曲線を見ると0.2秒以下の成分がうまく分離できなかったことを示す。３成分の計算でもこの成分を特異的に取り出すことはできなかった。

T1 変化についても同様な解析を行った(図２)。Null point近傍の挙動から明らかに２成分の存在が読み取れる。解析した結果、３成分以上に分離すべきであることが分かった。しかし結果は不安定で、データの質に左右されやすいことが分かった。

【討論】GRAMは多変量データを、統計的手法を使って、直交する２つの要素に分離する。スペクトル解析に利用するためには、一定の束縛条件のもとで解を求める、新たな解法を開発する必要がある。例えば、各成分の強度が「一定の時定数で指数的に減衰する」という束縛条件のもとで、再帰的に計算する方法が適していると考えられる。この方法によって、一義的な解が得られるかどうかは今後の検討課題である。

緩和測定データにはさまざまな変動成分を含み、単なる統計的手法では変動の大きさによって、結果は大きく左右される。

解が不安定な理由に、反転スペクトルの数が少なく、緩和速度の大きな成分についての情報が不足していることが原因である可能性が考えられる。現実には測定時間の制限から、得られる情報量は極めて限られる。情報量と解の安定性の関係についても、今後検討して行く必要がある。



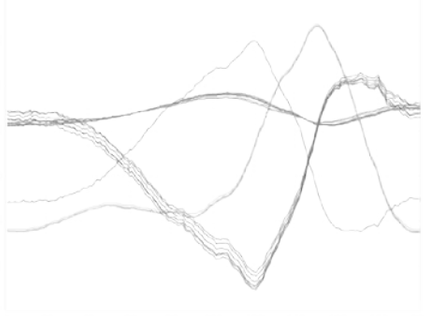


Fig 4　Three Component Analysis by GRAM against T1 Relaxation

(a) T1 Relaxation Spectra of Lipid Methyl. (b) Resolved Spectra of 3 Components
The solution was instable but could be divided into 3 components. However, the line-shape is different from that shown in Fig 1.

P118

Sf9細胞のin-cell NMRにおける測定条件の最適化

○田中　孝[1],浜津　順平[1], 清和　恵美子[1], 池谷　鉄兵[1], 三島　正規[1], 伊藤　隆[1]
[1]首都大院・理工・化

Evaluation of parameters for observing proteins inside living Sf9 cells by in-cell NMR spectroscopy

○Takashi Tanaka[1], Jumpei Hamatsu[1], Emiko Seiwa[1], Teppei Ikeya[1], Masaki Mishima[1], and Yutaka Ito[1]
[1]Department of Chemistry, Graduate School of Science and Engineering, Tokyo Metropolitan University, Tokyo, Japan.

Abstract

The existing protocols for introducing stable isotope-labelled proteins into eukaryotic cells for in-cell NMR measurements require relatively large quantity of purified and concentrated stable-isotope enriched proteins, thus restricting the applications to proteins which are difficult to purify and/or unstable. The alternative approaches utilising the intrinsic protein expression system have therefore been awaited in order to extending the range of applications.

In this presentation, we show a demonstration of eukaryotic in-cell NMR using the Sf9/baculovirus system. Since there is time lag of hours from the inoculation of baculovirus to the expression of target proteins, the timing to introducing ^{15}N-labelled media was optimised so as to achieve the best contrast of signals of target proteins and background. This optimisation provided the significant improvement of the quality of the spectra.

【序】

細胞内では, いわゆる"macromolecular crowding"が蛋白質の立体構造, ダイナミクス, 結合活性や酵素活性などに影響を与えることが示唆されている[1]. In-cell NMRは, 生きた細胞内における蛋白質の立体構造, ダイナミクス, 様々な因子との結合などを詳細に解析できる, 現存する唯一の測定法である[2]. In-cell NMRはまず大腸菌で確立されたが, 現在では, カエル卵母細胞[3,4], ヒト培養細胞[5,6]などの真核細胞でも測定が可能である.

真核細胞のin-cell NMRの際には, ごく最近の*Pichia pastoris*の系[7]を除けば, 全て安定同位体標識した精製蛋白質を外部から導入している. しかし, 細胞への導入時には大量かつ高濃度の精製試料が必要, など制約も多い. 従って, 真核細胞のin-cell NMRの「もう一つの道」として, 細胞内に発現させる方式のin-cell NMRの確立が必要と考えられる.

最近私たちは, 昆虫培養細胞Sf9/baculovirusの系を用い, 細胞内で目的蛋白質を発現させてin-cell NMRを観測することに成功した. Sf9/baculovirusの系を用いた蛋白質発現系は, 哺乳動物細胞に近い修飾が可能であることなど, 大腸菌や酵母の系にはない様々な長所があるため, 今後の応用が期待される.

In-cell NMR, Sf9, protein

○たなかたかし, はまつじゅんぺい, せいわえみこ, いけやてっぺい, みしままさき, いとうゆたか

本研究では, Sf9/baculovirusの系を用いたin-cell NMRについて, 連鎖球菌protein G B1ドメイン(GB1), 高度好熱菌TTHA1718, ヒトHAH1, ラットcalmodulin(CaM)を用い, 良好な^{1}H-^{15}N HSQCスペクトルの取得のための条件検討と最適化を行ったので報告する.

【実験・結果及び今後の展望】

Sf9/baculovirusの系を用いたGB1,およびTTHA1718のin-cell NMRスペクトルは既に昨年のNMR討論会で報告した. HAH1, CaMについては, ポリヘドリンプロモーター下に遺伝子を挿入したバキュロウイルスを作成し, 各々Sf9細胞に接種した結果, 標的蛋白質の発現を確認した. そこで, 計4種のモデル蛋白質について条件検討を行った.

Sf9/baculovirusの系では, 大きなバックグラウンドシグナルの存在が良好なスペクトルの観測を妨げていた. この系では, ウイルスの接種後から標的蛋白質の発現までにラグが存在するため, ウイルス接種から～24時間は非標識培地で培養し, ついで^{15}N標識培地に交換することで, バックグラウンドシグナルを押さえることに成功した. Figure 1には今回用いた4種の蛋白質について最適化前と最適化後のスペクトルを比較して示した.

バックグラウンドシグナルは再現性よく観測されるため,「空の」ウイルスを接種したSf9で測定した^{1}H-^{15}N HSQCスペクトルを差し引くことで, 良好なスペクトルを得ることも試みている. また, 3重共鳴NMRやNOESYスペクトルの取得も行っており, 真核細胞を用いた詳細な細胞内蛋白質動態の解析を目指す.

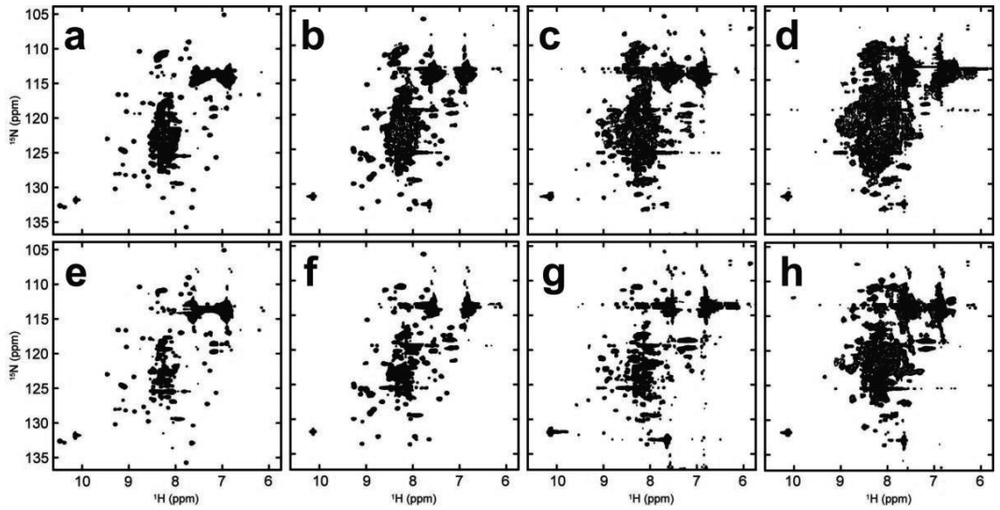


Figure 1

2D ^{1}H-^{15}N HSQC spectra of GB1 (**a**,**e**), TTHA1718 (**b**,**f**), HAH1 (**c**,**g**) and CaM (**d**,**h**) in living Sf9 cells. Figure **a**-**d** show the spectra without optimisation, whilst **e**-**f** show the spectra in which the timing to replace unlabelled media to ^{15}N-labelled media was optimised.

References: [1] Ellis, R. J. *Trends Biochem. Sci.* **26**, 597-604 (2001); [2] Ito, Y. & Selenko, P. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **20**, 640-648 (2010); [3] Selenko, P. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 11904-11909 (2006); [4] Sakai, T. et al. *J. Biomol. NMR* **36**, 179-188 (2006); [5] Inomata, K. et al. *Nature* **458**, 106-10(2009); [6] Ogino, S. et al. *J. Am. Chem.Soc.* **131**, 10834-10825 (2009); [7] Bertrand, K. et al. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 12798-12806 (2012).

P119

Nonlinear Samplingデータに対する複数の信号再構成法の包括的な比較

○山本晃広[1], 池谷鉄兵[1], 角越和也[2], 三島正規[1], 伊藤隆[1]
[1]首都大院・理工
[2]東大院・農学生命科学

A comprehensive comparison of multiple methods of signal reconstruction for NMR data nonlinear sampled

○Akihiro Yamamoto[1], Teppei Ikeya[1], Kazuya Sumikoshi[2], Masaki Mishima[1], and Yutaka Ito[1]
[1]*Department of Science & Engineering, Tokyo Metropolitan University*
[2]*Department of Biotechnology, University of Tokyo*

Nonlinear sampling (NLS) for indirect dimensions and signal reconstruction methods have been shown to provide high quality spectra and time saving in the measurement of multidimensional NMR experiments. In the past decade, numerous reconstruction algorithms for the NLS data have been addressed, such as maximum entropy (MaxEnt), multi-dimensional decomposition (MDD), and maximum-likelihood reconstruction (MLM). Compressive sensing as a recent novel approach has also been proposed from several research groups simultaneously. However, it is still obscure which methods can be practically used for different data in terms of spectral resolution and peak intensity against the number of sampling points and computational time. Moreover, there is no application applying those methods for in-cell NMR spectra that are crucial to reduce measurement time. Here we show comprehensive comparisons among the different reconstruction algorithms and sampling schedules, and discuss the feasibility to the applications for in-cell NMR.

【序論】

NMRによる蛋白質の立体構造解析は，高感度，高解像度のスペクトルを必要とするため，特に多次元NMRでは測定時間の増加が問題であった．生命分子試料は不安定で長時間の計測中に分解し，解析不可能となる試料も多いため，短時間で高精度のNMRデータを計測する手法が強く求められている．こうした問題を解消するため，データをスパースにサンプリングすることで測定時間を短縮し，消失した情報は情報理論に基づいた再構成アルゴリズムにより補完するアプローチが数多く提案されてきた．Nonliner Sampling(NLS)と最大エントロピー法(MaxEnt)による信号の再構成は，その簡便さと堅牢性によりNMRの分野では特に多くの応用が報告されている．我々のグループでも，この方法を応用しin-cell NMRの多次元測定，立体構造決定を可能にしてきた．一方で，近年MaxEntに代わる複数の新たな信号再構成法も提案され，この分野の革新的な進展が見られている．特に圧縮センシングと呼ばれる，データのスパース性に着目して再構成の精度を向上させる方法は，2006年にその情報理論が確立されて以降，急速に応用分野にも拡充し，NMRデータでの成功例も報告され始めた．しかしながら，MaxEntやmultidimensional decomposition (MDD)などの，従来法との明確な比較，検討した例はまだ少なく，各手法の特性，問題点について包括的理解が求められている．

そこで本発表では，圧縮センシングを中心に，MaxEnt，MDD等の各手法について複数のNMRデータを用いて，スペクトルの解像度やシグナル強度変化等の観点から詳細に比較する．また，Wagnerらによって提案さているPoisson Gap Sampling法などの新たなデータサンプリング手法についても検証し，その特長と実際の応用への問題点を明確化することで，この分野の今後の可能性ついて議論する．

【方法】

本研究では,テストデータとして,G B1蛋白質のin-cell NMRデータと*in-vitro* RecO蛋白質のデータのうち，HNCO，HCCH-COSY，^{13}C,^{15}N-separated NOESY等の複数の多次元スペクトルを対象として用いた．*in-vitro*データは，予め全ポイントを測定し，計算機上でデータを間引くことで疑似スペクトルを作成した． In-cellスペクトルは，実際にNLSによってスパースに測定したデータを用いた．疑似スペクトルの作成には，従来より用いられているNLSとWagnerらによって提案されているPoisson Gap Samplingの２つの異なるサンプリング手法を試みた．比較に用いた再構成アルゴリズムは，1) Azaraソフトウェアに実装されているMaxEnt，2) CCPNで開発されたQuantitative Maximum Entropy(QME)，3) mddNMRソフトウェアのMDDとCS，および4)我々が独自に開発を進めているCSプログラムを選択し，各手法を複数のスペクトルに適用させることで，データポイント数に対する解像度，ピーク強度の保存性，計算時間等について詳細な検証を行った．

【結果および今後の展望】

我々のこれまでの研究から，in-cell NMRスペクトルは，一般的にダイナミックレンジが大きく，従来のAzaraソフトウェアによるMaxEntでは，ノイズレベルパラメータの設定が困難であることが分かっている．そこで，MaxEntのこの欠点に対して，MaxEntの改良版であるQMEがどの程度,汎用的であるか，in-cell NMRスペクトルを用いて検証した．Fig.1は，G B1のin-cell HCCH-COSYスペクトルの一部の領域を示している．In-cellデータ特有の大きな背景シグナルにより，従来のMaxEnとでは，赤枠で囲われたシグナルを十分に検出できていない(Fig.1a,1c)．一方，QMEによる再構成では，スペクトル全域に渡って最尤のノイズレベルを，繰り返し計算により求めているため，強い背景シグナルに埋もれることなく，赤枠内のシグナルを明確に再現できている(Fig.1b,1d)．

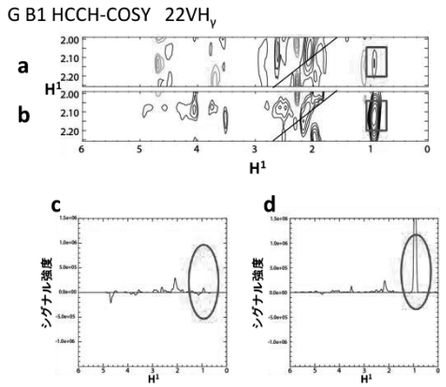


Figure 1. HCCH-COSY spectrum of G B1 processed by MaxEnt (a) and QME (b), and the 1D slices (c), (d).

その他の再構成手法については，現在，様々なスペクトルに対して適用し，検証を行っている．当日の発表では，それらについてさらに詳しく報告する．

キーワード：圧縮センシング，Nonlinear Sampling，最大エントロピー法

○やまもとあきひろ，いけやてっぺい，すみこしかずや，みしままさき，いとうゆたか

P120 ラジオ波帯 NQR 用直方体型コイルの内部磁場均一化

○桂祥太[†], Jamie Barras[‡], 赤羽英夫[†], 糸﨑秀夫[†]
[†]大阪大学基礎工学研究科
[‡]Department of Informatics, King's College London

NQR using homogeneous magnetic field of Rectangular Cross-section RF coils

○Shota Katsura[†], Jamie Barras[‡], Hideo Sato-Akaba[†], Hideo Itozaki[†]
[†]Graduate School of Engineering Sciences, Osaka University
[‡]Department of Informatics, King's College London

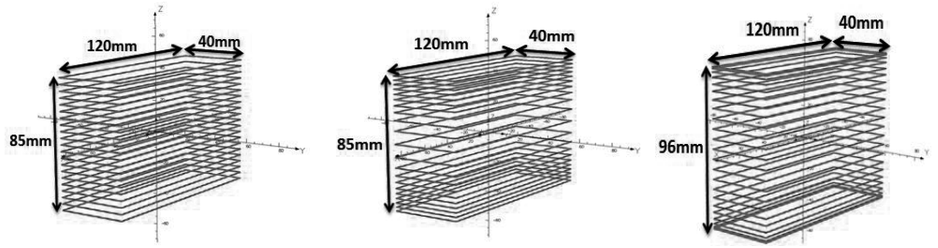
We compared three types of radio frequency (RF) coils, a fixed pitch coil and two variable pitch coils, with rectangular cross-sectional shape for counterfeit drug detection by nuclear quadrupole resonance (NQR). One of the two variable pitch coils was based on the Leifer equations for cylindrical solenoid, and the other was designed from the pitch optimization by electromagnetic field simulator to make the inside magnetic field most homogeneous. Simulation and experimental results showed that the optimized variable pitch coil achieved the significant improvement of the magnetic field homogeneity along z-axis. It can be useful for the quantitative detection by NQR.

1. はじめに

現在、偽造薬剤の蔓延が世界中で脅威となっており、パッケージを開けずに薬剤の有効成分を検査できる手法として、核四極子共鳴(NQR)を用いた分析方法が期待されている。NQR ではコイルにより磁場を送受信して信号を得るが、パッケージ内の位置によって送信した磁場強度が不均一だと、薬剤から受信される信号強度もばらつき、正しい結果が得られない。本研究は、NQR による薬剤検知に向けて、新規に均一に磁場を発生する直方体型コイルを設計、電磁界シミュレーションソフトにより最適化を行うとともに、その評価から NQR 検査における定量分析の有用性を示した。

2. RF コイルの設計および実験結果

箱に入った一般的な薬を検査対象とすることを想定し、プラスチック製の直方体の箱(断面: 120×40 mm^2)の周囲に銅線(直径: 0.5mm)を巻き付け、RF コイルを作成することにした。ピッチを等間隔にした fixed pitch coil、ピッチ間隔を変えた variable pitch coil として 2 種類、合計 3 種類をシミュレーション（VECTOR FIELD 社 Opera を使用）するとともに、実際にコイルを作製・実験し比較した。variable pitch coil は、M. C. Leifer らが円筒型ソレノイドコイルにおいて、そのピッチ間隔を変えて磁場均一化した論文[1]の計算式からピッチ間隔を求めたコイル(Leifer variable pitch coil)と、新たにシミュレーションで最適化して得たピッチ間隔のコイル(optimized variable pitch coil)を検討した。optimiszed variable pitch coil の最適化には 120×40 mm^2 の長方形のリング各々が発生する磁場の足し合わせが内部磁場と考え、リングをコイル中心部は粗く、両端は密に設定、1 mm 単位でピッチ間隔を変え、複数回シミュレーションを行い、z 軸方向の磁場が均一となるように、ピッチを決定した。これらのシミュレーションモデルを Fig.1 に、各コイル内部の z 軸方向の磁場分布のシミュレーション結果を Fig.2 に示す。



(a) (b) (c)

Fig.1 Simulation models of three RF coils, (a)fixed pitch coil (pitch: 4 mm, turn: 21), (b) Leifer variable pitch coil (turn: 21), and (c) optimized variable pitch coil (turn: 23).

さらに、コイル中央位置で高さ-42.5 ~ 42.5 mm の範囲における磁場変動をシミュレーションおよび実際のコイルで測定した結果を Table.1 に示す。今回設計した optimized variable-pitch coil は、磁場均一性が大幅に向上していることが分かる。

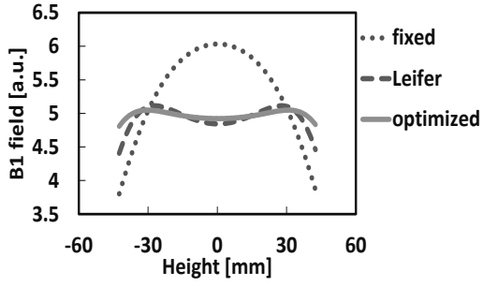


Fig.2 Magnetic field simulation results of three coils along z-axis.

Table.1 Comparison of simulation and experimental result of magnetic field variation.

	fixed	Leifer	optimized
Simulation	47%	18%	7%
Experiment	35%	27%	8%

NQR、コイル、シミュレーション

○かつら　しょうた、　じぇいみー　ばらす、　あかば　ひでお、
いとざき　ひでお

参考文献 [1] M. C. Leifer *et al*., J. Magn. Reson. A105 (1993) 1-6.

謝　辞　本成果は King's College London Ms. G. Kyriakidou, Dr. M. D. Rowe, Prof. K. A. Althoefer, Prof. J. A. S. Smith のご協力によるものであり、各位に感謝いたします。

P121

二面角系分子動力学計算を用いたタンパク質立体構造決定における構造最適化計算法の開発

○嶋崎真那人[1], 池谷鉄兵[1], 三島正規[1], 伊藤隆[1], Peter Güntert[1,2]
[1]首都大学東京・理工学研究科
[2]Goethe-University Frankfurt

Development of NMR structure refinement by torsion angle molecular dynamics in protein structure determination

○Manato Shimazaki[1], Teppei Ikeya[1], Masaki Mishima[1], Yutaka Ito[1] and Peter Güntert[1,2]
[1]Department of Chemistry, Tokyo Metropolitan University, Tokyo
[2]Institute of Biophysical Chemistry, Goethe-University Frankfurt, Frankfurt am Main, Germany.

Torsion angle molecular dynamics (TAMD) is a standard tool for NMR structure calculation. It is more robust to longer step-sizes than in Cartesian space , and can quickly accomplish the tertiary structure with angle and distance restraints. The program CYANA adopting TAMD can efficiently calculate NMR structures with NOE assignment. Nevertheless, it is not trivial to subsequently refine these structures by TAMD since the physical energy in torsion angle space is not identical to the one in Cartesian space. In order to optimize the energy to the torsion angle space, we attempt comprehensive analysis and modifications of the potential terms. Here, we show the new TAMD implementations in CYANA and its feasibility for protein structure refinement.

【序論】
二面角系分子動力学計算法(TAMD)は，現在NMRを用いたタンパク質の立体構造計算の標準的手法となっている．TAMDでは，結合長と結合角を固定し，二面角の運動のみを考慮することによりCartesian系MD(CMD)よりも安定，かつ高速な計算を可能としている．これにより，NOEの帰属と構造の探索を効率的に実行でき，短時間で蛋白質のグローバル構造を得ることができる．しかしながら，その後の構造の精密化計算においては，複数の問題により，TAMDは現在も汎用的な計算手法として扱われていない．主要な問題点は，TAMDでは″1-5″,″1-6″及び″1-7″結合においてvan der Waalsの反発項の影響を受け，非常に高いエネルギー領域が現れてしまう点である(Fig.1a)．そこで我々はCMDに用いられている物理ポテンシャルをTAMDに最適化することで構造計算の精度の向上を試みた．高エネルギー領域が現れる１つの要因は，主鎖のカルボニル酸素と周辺原子との衝突にある．そこで，ここではこの衝突を回避させ，スムーズな運動を可能にするために計算ステップの中でω角をわずかに動くよう修正した．また，Katritchらによって提案されたvan der Waalsの反発項を弱めるソフトポテンシャル関数を1-5,1-6,1-7結合に導入し，問題の解決を試みた．本研究では，Cartesian系MD

Molecular Dynamics, structure refinement, CYANA

○しまざきまなと，いけやてっぺい，みしままさき，いとうゆたか，
ぺーたーぎゅんたーと

で広く用いられているAMBERの物理ポテンシャルをCYANAプログラムに組み込み，これを基に修正されたエネルギー関数と構造との相関を検証した．

【実験】
CYANA ver3.0に，CMD計算で広く用いられているAMBERの物理ポテンシャルを新たに導入した．また，主鎖のω角に若干の自由度を持たせるため，２面角空間における木構造の変更を行い，ω角に対して強い角度拘束を加えた．1-5,1-6,1-7結合でのvan der Waals力に対しては反発の小さいソフトポテンシャル関数によって評価を行い，２面角空間におけるφ-ψ角のエネルギーマップが，Cartesianのものに最も高い相関をもつようにパラメーターを調整した．新たに導入したエネルギー関数の評価を行うために，Protein Data Bank(PDB)から立体構造，分子量の異なる35個のタンパク質を選択し，それぞれに対して，native構造より得られる距離情報から様々な構造分布を持つ構造群を作成した．これらの構造に対して最適化計算を行い，得られた構造のエネルギーと平均二乗偏差(RMSD)より修正されたポテンシャル関数の妥当性を評価した．また，自由度を持たせたω角とソフトポテンシャルに対する個々の影響も検証した．

【結果，考察】
20種類のアミノ酸についてそれぞれ主鎖２面角に対するエネルギーマップを作成し，ソフトポテンシャル導入の有無でのエネルギー領域を比較したところ，高エネルギー領域の減少と低エネルギー領域の保持が確認できた(Fig.1C)．

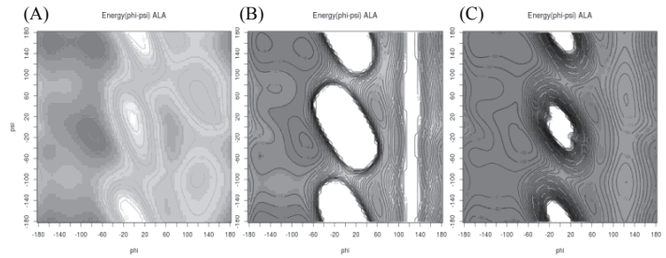


Fig.1 φ,ψ dihedral angle energy maps of the alanine tripeptide. Dark and light colors show lower and higher energy ereas. Those are calculated by the AMBER software (A), CYANA with the original forcefield (B), and with the optimized one (C), respectively.

今回作成したnative構造を含む2001個の構造群についてのエネルギーをRMSDに対してプロットしたところ自由度を持たせたω角とソフトポテンシャルの導入によりエネルギーを低下させることが可能となった(Fig.2A,2B)．多くの蛋白質分子についてはエネルギーとRMSDとの良い相関が得られた一方で，一部の蛋白質については正の相関が得られなかった（Fig.2C,2D)．現在，この原因について検証を進めている．

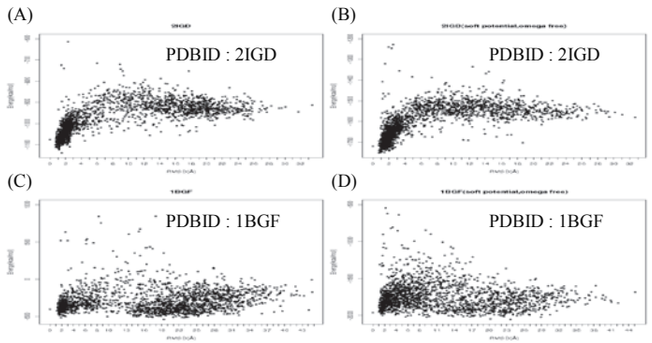


Fig.2 Energies for the native and all decoy structures plotted against the RMSD to the reference structure. (A) and (C) are energies calculated with the original potential, and (B) and (D) are with the optimized one.

また，今後は，レプリカ交換法を用いることで，より広い構造空間内でのエネルギーの詳細な検証を行い，さらに多角的にポテンシャル関数の評価を行って，一層の最適化を進める予定である．

【参考文献】
1)Chen J., Im W., Brooks C.L.Ⅲ, J.Comp.Chem.26,1565-1578(2005)
2)Katritch V., Totrov M.,Abagyan R.,J.Comp.Chem.24,254-265(2002)

P122 極推定法によるFID信号の強度推定

○中尾朋喜[1], 末松孝子[2], 堤遊[2], 古川利博[1]
[1]東京理科大・工学研究科
[2]株式会社 JEOL RESONANCE

Intensity Estimation of FID signal by Pole Estimation Method

○Tomoki Nakao[1] Takako Suematsu[2] Yu Tsutsumi[2], and Toshihiro Furukawa[1]
[1]*Department of Industrial Engineering, Tokyo University of Science.*
[2]*JEOL RESONANCE Inc.*

Recently, QNMR has been proposed as a quantitative method based on NMR. QNMR measures the FID signal to optimize the sample preparation and measurement conditions. In addition, this method has been estimated the signal intensity by the integral value of the spectrum analysis stage. However, because spectrum of FID signal is Lorentz shape, which inevitably contains errors due to peak overlapping. Here we propose a signal intensity estimation method of FID signal by pole estimation and choice of pole by peak power to this problem. The proposed method does not require the computation of the integral value in principle.

【はじめに】

核磁気共鳴（NMR）は，原子核と励起電磁波の共鳴現象を直接観測するため，FID信号の信号強度は原子核の数に比例する．信号強度を精確に推定する手法として，近年定量NMR（QNMR: Quantitative NMR）が注目を集めている．QNMRは，サンプル調製や測定条件を最適に行い，FID信号を観測・解析する方法である．信号強度は，FID信号をFFT後，積分値から求められる．しかし，FID信号のスペクトルはローレンツ波形であり，個々のピークの重なりが生じてしまうため，積分値による強度推定は必然的に誤りが生じる．また，積分範囲の違いによって定量の精度が大きく異なる．

この問題に対し，私は極推定法によるFID信号の強度推定手法を提案する．本手法は，FID信号の線幅と化学シフト値，つまり極を推定し，その後信号強度を推定する手法である．極推定に際，FID信号のz変換を導入しAR（Auto Regressive）係数から極を一意に推定する．その後，最小二乗近似により強度を推定する．本手法は，原理的に積分値計算を必要としないため，ピーク同士の重なりや積分範囲に依存しないといった特徴がある．

本報告では，提案手法について述べた後，計算機シミュレーション及び実データ解析によって本手法の有効性を示す．実データとしてはエタノールの一次元NMRデータを用いた．解析の結果，強度比で約3%程度の誤差が生じた．

integrated value, QNMR, pole estimation

○なかおともき，すえまつたかこ，つつみゆう，ふるかわとしひろ

【FID信号のz変換】

FID信号はブロッホ方程式の解として

$$h(nT_s)=\sum_{k=1}^{p}c_k\exp(s_k nT_s)\qquad(s_k=-l_k/2+j2\pi\nu_k)\tag{1}$$

と表される．但し，c_kを信号強度 $l_k/(2\pi)$を線幅，ν_kを化学シフトとする．また，pをFIDのピークの数，T_sをサンプリング周期とする．便宜上，s_kを極と呼ぶ．提案手法では，まず極を推定し，その後に信号強度を推定する．極の推定方法としてz変換を導入する．式（1）からFID信号のz変換は

$$\begin{aligned}H(z)&=\frac{b_0+b_1z^{-1}+\cdots+b_{p-1}z^{-(p-1)}}{1+a_1z^{-1}+a_2z^{-2}+\cdots+a_pz^{-p}}\\&=\frac{b_0+b_1z^{-1}+\cdots+b_{p-1}z^{-(p-1)}}{\prod_{k=1}^{p}\{1-\exp(s_kT_s)z^{-1}\}}\end{aligned}\tag{2}$$

で表される．但し，aはAR係数，bはMA係数と呼ばれる．極は分母多項式の根として与えられる．よって，AR係数を求め，因数分解することFID信号の極が推定される．なお，AR係数の推定と因数分解，それぞれにPRONY法，Jenkins-Traub法を用いた．

【強度の推定】

上記で推定した極を用いて強度を推定する．式（1）からFID信号は行列表記で

$$\mathbf{Ec}=\mathbf{h}\tag{3}$$

と表わされる．但し，

$$\mathbf{E}=\begin{bmatrix}e^{0}&e^{0}&\cdots&e^{0}\\e^{s_1T_s}&e^{s_2T_s}&\cdots&e^{s_pT_s}\\\vdots&\vdots&\ddots&\vdots\\e^{(M-1)s_1T_s}&e^{(M-1)s_2T_s}&\cdots&e^{(M-1)s_pT_s}\end{bmatrix}\quad\mathbf{c}=\begin{bmatrix}c_1\\c_2\\\vdots\\c_p\end{bmatrix}\quad\mathbf{h}=\begin{bmatrix}h(0)\\h(T_s)\\\vdots\\h((M-1)T_s)\end{bmatrix}\tag{4}$$

であり，Mはデータポイント数とする．
ここで，上記により極sが推定されているので，行列$\mathbf{E}$とベクトル$\mathbf{h}$は既知である．よって，式（３）を$\mathbf{c}$について解くことでFID信号の強度が求められる．なお，実際にはベクトル$\mathbf{h}$は得られず，外乱を含むため，強度の最小二乗解を求める．式（4）の最小二乗解は

$$\hat{\mathbf{c}}=(\mathbf{E}^H\mathbf{E})^{-1}\mathbf{E}^H\mathbf{h}\tag{5}$$

で与えられる．但し，Hをエルミート転置とする．

【シミュレーション】

ピーク数が6の信号に対し，提案手法を用いて極及び強度の推定を行った．信号の条件を表１，SN比を2000，推定次数を200とした場合における推定結果を表2、図1に示す．図は横軸を正規化周波数とし，縦軸は上からそれぞれ信号の吸収スペクトル，線幅，強度，推定信号とした．線幅，強度はそれぞれ○を真値，＋を推定結果とする．なお，紙面の都合上，横軸は0から0.08Hz，線幅は0.0025Hz以下のみをプロットした．

推定結果から，0.07Hz付近の信号の強度の推定誤差が約0.4%と比較的大きく，0.15，0.4Hz付近の強度誤差は0.1%以下と非常に小さい．これは元の信号の強度が小さく，他の信号に比べ雑音の影響が大きいことや他のピークが重なり合っているため推定が困難であることが考えられる．また，0.05Hzから0.06Hz付近に見られる極は，推定次数を元の信号のピーク数に比べ大きくして仮定して推定しているために生じる極である．これらは元の信号の極に比べ，線幅が大きく強度が小さいため，スペクトルに大きな影響を与えない．

表 1 信号の条件

k	c_k	l_k	ν_k
1	3.0	1.0×10^{-3}	1.5×10^{-2}
2	1.0	1.0×10^{-3}	3.8×10^{-2}
3	1.0	1.0×10^{-3}	4.2×10^{-2}
4	0.25	1.0×10^{-3}	6.8×10^{-2}
5	0.5	1.0×10^{-3}	7.0×10^{-2}
6	0.25	1.0×10^{-3}	7.2×10^{-2}

表 2 推定結果（上位 6 つ）

k	c_k	l_k	ν_k
1	3.0002	1.0001×10^{-3}	1.5000×10^{-2}
2	1.0002	1.0003×10^{-3}	3.8000×10^{-2}
3	1.0001	1.0002×10^{-3}	4.2000×10^{-2}
4	0.2509	1.0060×10^{-3}	6.8000×10^{-2}
5	0.5006	1.0031×10^{-3}	6.9999×10^{-2}
6	0.2503	1.0045×10^{-3}	7.2004×10^{-2}

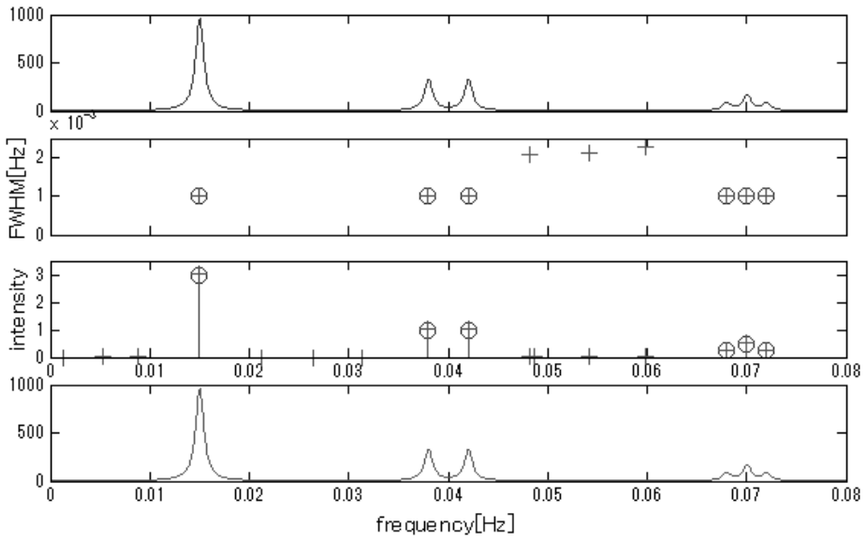


図 1 シミュレーション結果

【実データ解析】

エタノールのプロトン NMR 測定したデータに本手法を適用し，強度比を推定した．共鳴周波数を 399.782MHz、観測スペクトル幅を 5.997kHz とし，データポイント数は 2^{15} とした．推定次数を 500 とした場合の推定結果を表３、図 2 に示す．左から 4.75~4.6ppm、3.6~3.45ppm、1.1~0.95ppm の範囲でプロットした．また，強度比はメチル基の強度を 3 として計算した．CH_3 と CH_2 との強度比は本来の 3 : 2 であるが、本結果では 3 : 2.069 であり，3%強の誤差が生じた．これはシミュレーションの結果に比べ非常に大きな誤差である．この原因としては、主に不均一磁場の影響が考えられる．なお，OH は溶媒の信号の影響を受けていることが考えられるため，本報告では特に議論しない．

表 3. エタノールの推定結果

周波数[ppm]	線幅[ppm]	強度	各帯域強度総和	強度比
4.6635	2.18E-03	2.24E-04	2.24E-04	1.247
3.5429	1.58E-03	4.66E-05	3.71E-04	2.069
3.5252	1.56E-03	1.38E-04		
3.5073	1.58E-03	1.39E-04		
3.4896	1.64E-03	4.76E-05		
1.063	1.58E-03	1.37E-04	5.38E-04	3
1.0453	1.57E-03	2.68E-04		
1.0275	1.60E-03	1.33E-04		

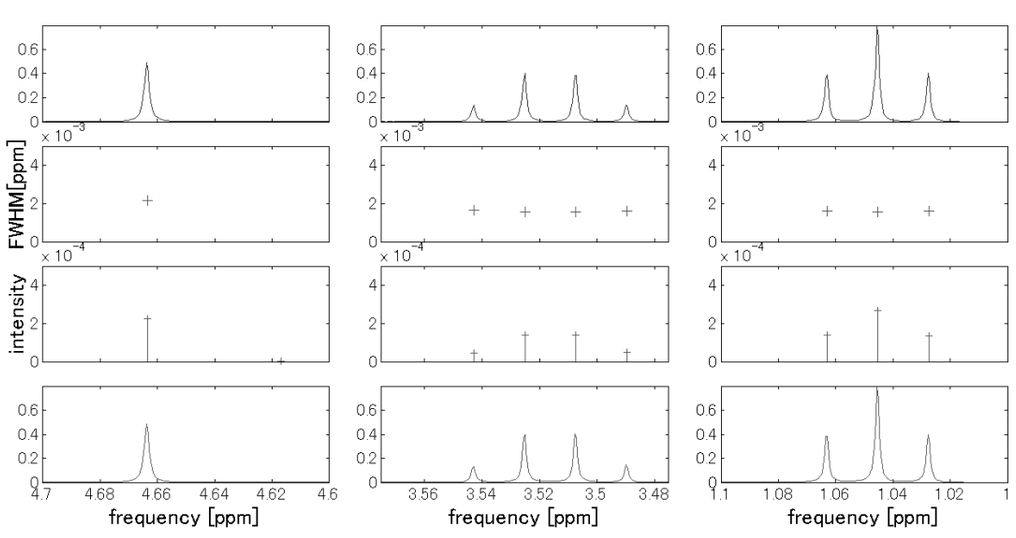


図 2. エタノールの推定結果

P123 化学シフトデータベースを利用した高精度なNMR構造評価システム

○小林直宏[1], 児嶋長次郎[1], 藤原敏道[1]
[1]阪大・蛋白研

A highly accurate NMR structure validation system using the chemical shift database

○Naohiro Kobayashi[1], Chojiro Kojima[1], and Toshimichi Fujiwara[1]
[1]Institute for Protein Research, Osaka University, Osaka, Japan.

Recent developments in Information Technologies (IT) have enabled us to easily and quickly access to the huge database of experimental data. As the total number of entries of NMR structures in PDB and biomolecular NMR data in BioMagResBank have reached more than 9,600 and 8,200, respectively, we are in the era of "big data" which can help us to facilitate the analysis of biomolecular NMR. The automated tools such as CYANA have been a major contribution in the increasing number of entries, however, trustful method to quantitatively assess the structure quality is still desired. Here we have developed a new system to validate ensembles of NMR structures, demonstrating a high reliability to predict backbone RMSD value between actual and reference structure.

【概要】近年のIT技術の発展により、データベースは大規模なデータを管理し、簡便かつ高速アクセスが実現可能となった。現在までに蓄積されたBMRB、PDBのエントリー数も膨大になり（それぞれ9,600件，8,200件）、生体高分子NMR研究にも"big data"の時代が到来したといえる。本研究で我々は立体構造から化学シフトデータを予測する技術と計算機科学的手法を利用した高精度なNMR構造と帰属データの評価システム、MagRO-Validationを開発した。また統合解析環境であるMagRO-NMRViewのGUIモジュールとして組み込むことでスペクトル上での帰属作業とリンクさせることを可能にした。

【方法】評価システムには立体構造から化学シフトを予測するプログラム、SPARTA+ ver. 2.60 [1]，主鎖コンホメーションの評価には WHTCHECK ver. 7.0 [2]，溶媒露出度、側鎖コンホメーションの評価にはmagro_core ver. 0.9853，立体構造の重ね合わせ等の操作には fit_robot ver. 0.6.18を、エネルギー極小化計算にはGromacs ver. 4.5.5を用いた。またホモロジーモデリングにはModeller ver. 9.10を用いた。本研究では評価関数として以下の関数E_{total}を定義した；

$$E_{total} = k_{CS} * E_{CS} + k_{BB} * E_{BB} + k_{Side} * E_{Side} + k_{PE} * E_{PE}$$

化学シフトの予測値から大きく異なる残基数の割合から算出したE_{CS}, backbone normality E_{BB}, 側鎖ロタマーの正常さに対する項E_{Side}, GromacsによるPotential Energyに関するE_{PE}より構成され、各項に対する重みをk_iを掛けて総和とした。この評価関数を最適化するため、PDB構造およびBMRB化学シフトデータが両方登録されているエントリについて、理想構造として参照すべきX線解析構造を配列検索し、60%配列相同性を下限としてModellerによるモデル構造を400件以上用意した。対象とする化学シフト値はHN, ^{15}N, ^{13}CO, ^{13}Cα, ^{13}Cβ, Hαを用い、SPARTA+予測とのエラーが最小になるようオフセットを自動調整した。評価計算には主鎖オーダパラメータϕ ϕの和が1.8を超える収斂部位のみを用い、重み係数k_iを変更しながらスコアと理想構造とのpairwise RMSDに対する相関を最大化するよう自動的に最適化した。

得られた評価関数のベンチマークを目的として、疎水残基側鎖シグナルの帰属のペアをランダムにスワップ（以下Random swap）させ、NOEピークリスト(^{15}N, ^{13}C-edited NOESY)の帰属を人為的に間違わせたCYANA構造を２つのタンパク質 (1WK1: 151残基,1WLM: 150残基) について400件以上発生させた。これによりエキスパートが解析した参照構造の主鎖RMSDは1.0-10.0Åまでの広範囲に分布する構造群が得られた。

【結果と考察】417件のPDB構造とBMRB化学シフトによる評価関数の最適化を行い、スコアと理想構造との主鎖RMSDに対する相関係数0.52の直線性が得られる重み係数をk_i 得た。これを元に、Random swapにより得られた構造群に対しても同様の評価計算を実行したところ、Fig. 1のように直線相関(相関係数 1WLM:0.64, 1WK1: 0.67)が得られた。SPARTA+単独の評価法を適用した場合、1WLM: 0.54, 1WK1: 0.47, WHATCHECKを単独に用いた場合においても1WLM: 040, 1WK1: 0.61であり、MagRO-ValidationスコアがRMSD1.0-2.0Åの構造クオリティーを従来法より正しく評価可能であることが示された。スコアが12.5以下を示す場合、理想構造との主鎖RMSDが1.3Å以下であることを予測できる確率はRandom swapで96%であった。

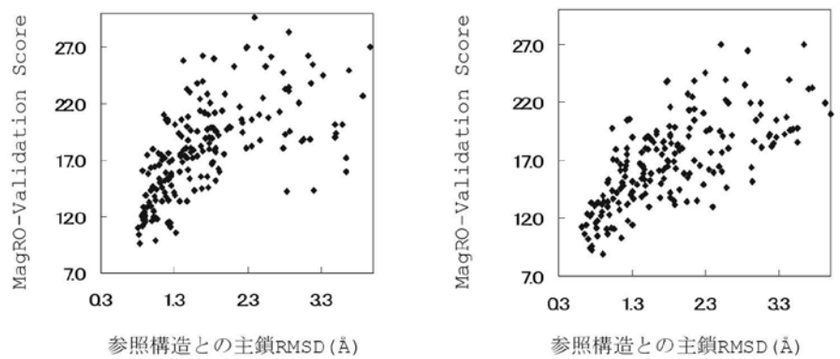


Fig. 1 Correlation plots between artificially generated CYANA structures and their MagRO-Validation scores for the PDB entries 1WLM(left) and 1WK1 (right).

本研究により開発されたNMR構造評価法はNOEベースによる構造解析とは異なる機構により評価するため、立体構造解析の精密化段階における問題点抽出に役立つと考えられ、高精度なシグナル検出から立体構造解析までを全自動化するシステムの開発への寄与が期待できる。MagRO-Validation は統合解析環境であるMagRO-NMRViewより利用可能であり、近日中に一般ユーザーへの配布を計画している。

[1] Y. Shen and Ad Bax. *J. Biomol. NMR*, 48, 13-22 (2010).
[2] R.W.W. Hooft, et al., *Nature* 381, (1996).

Database, Chemical shift, Validation

○こばやしなおひろ，こじまちょうじろう，ふじわらとしみち

P124 部位特異的アミノ酸選択標識とタンパク質立体構造を活用した相互作用界面の同定

○小玉優哉[1,2,3], Michael L. Reese[4], 榛葉信久[1], 小野克輝[2,3], 金森英司[2,3,5], Volker Dötsch[6], 福西快文[2], 鈴木榮一郎[1], 高橋栄夫[2,7]
[1]味の素(株), [2]産総研・BIRC, [3]バイオ産業情報化コンソーシアム, [4]Stanford University, [5]日立ソフトウェアエンジニアリング(株), [6]University of Frankfurt, [7]横市大・院生命ナノシステム

Determination of Protein-Protein Interaction Surface based on Specific Atom Type Labeling and 3D Structure of the Protein

○Y. Kodama[1,2,3], M. L. Reese[4], N. Shimba[1], K. Ono[2,3], E. Kanamori[2,3,5], V. Dötsch[6], Y. Fukunishi[2], E.-I. Suzuki[1] and H. Takahashi[2,7]
[1]Ajinomoto Co., Inc., [2]Biomedicinal Information Research Center (BIRC), National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), [3]Japan Biological Informatics Consortium (JBIC), [4]Stanford University, [5]Hitachi Software Engineering Co., Ltd., [6]University of Frankfurt, [7]Yokohama City University

For rapid and effective identification of the protein-protein interfaces (PPIs), we had developed the approach using NMR without resonance assignments that requires only a single protein sample, labeled with a unique combination of several amino acids on specific atoms. In this approach, the definition of threshold value for the significant chemical shift change, which is used for identification of the resonances involved in PPI, is a critical factor for accurate analysis of the experimental data. Here, we showed the appropriate definition of the threshold value based on the statistical data for non-biased analysis. This criterion is generally useful in the case that only several amino acid types, which possess a different propensity for participating in molecular interactions, are used as a probe for interaction analysis.

タンパク質間相互作用は、シグナル伝達をはじめとした種々の生体現象に関与していることから、相互作用界面に関する情報の迅速な取得は、例えば創薬研究などを効率的に展開していく上で極めて重要である。しかしながら、それらの情報を得るためには、例えばNMR解析においてはNMRシグナルを帰属するための測定、解析作業が一般に必要となり、多大な時間と労力を要することになる。そこで我々は、対象とするタンパク質単体の立体構造が既知であれば、NMRシグナルを帰属することなく、1サンプルに対する実験結果のみを基に、タンパク質複合体の相互作用界面を迅速に同定できる手法を開発した（Y. Kodama et al., *J. Struct. Biol.*, **174**, 434 (2011)）。この手法では、^{1}H-^{13}C相関スペクトル上におけるシグナルの分布が、各アミノ酸残基の原子タイプごとに局在することを利用し、シグナルが出現する範囲が重ならないように部位特異的アミノ酸選択標識を施したタンパク質を調製することで、化学シフト値から各シグナルのアミノ酸種の同定を可能にした。そして、本試料を用いた相互作用実験による化学シフト変化量を観測することで、相互作用界面に存在するアミノ酸残基の種類の一部とその個数を知り、併せてタンパク質立体構造表面のアミノ酸残基の集合状況を考慮することで、相互作用界面の同定を可能にした。

本手法において、化学シフト変化量の大小を判定するための閾値は非常に重要な値である。アミノ酸残基の種類により、相互作用界面における存在傾向は異なるため、本手法のように、一部の種類のアミノ酸残基のみを観測プローブとした場合、例えば変化量の相加平均を閾値とすると、バイアスが含まれてしまう。そこで、相互作用界面への存在傾向を考慮した、統計情報に基づく重みづけ係数を設定し、変化量の加重平均を閾値とすることで、上記のバイアスを除いた解析を可能とした。また、この閾値を超える化学シフト変化を示したシグナルのアミノ酸タイプとその数、およびタンパク質立体構造情報を基に、相互作用界面を形成するアミノ酸残基をプログラムにより自動で決定できるようにした。本アプローチにより、解析者の主観を排除し、一義的に相互作用界面を同定することが可能となった。その汎用性を確認するため、既知のタンパク質複合体構造を用いて、本実験手法とプログラムにより得られる結果をシミュレートしたので（Fig. 1）、併せて報告する。

近年、情報取得における迅速性の要求が高まる一方で、解析対象となるタンパク質のサイズは大きくなり、また膜タンパク質など見かけの分子量が大きいものを対象とした研究も多い。そのような場合において、スペクトルの複雑さや緩和に起因する解析困難な状況を回避する際、アミノ酸選択的標識は有力なアプローチの一つであり、今回示すバイアスを考慮した解析法が、実験結果をより正しく理解するうえで有効なケースは多いと考える。また、これらの手法を用いた相互作用界面同定のストラテジーは、タンパク質間相互作用の理解を手助けすると共に、例えば構造情報に指南された創薬の初期段階などにおいて、有効に活用できると考えられる。

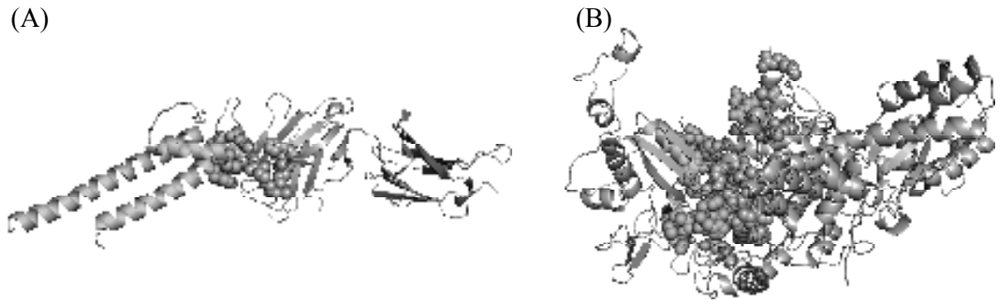


Fig. 1 Result of simulations of PPIs identification. The residues on PPIs identified by using our approach are shown in CPK models. (A) Fragment of potassium channel KcsA (103 A.A., left) and Antibody Fab fragment heavy chain (219 A.A., right). (B) Methyl-coenzyme M reductase I gamma subunit (248 A.A., left) and Methyl-coenzyme M reductase I alpha subunit (545 A.A., right).

タンパク質間相互作用，アサイメントフリー，部位特異的アミノ酸選択標識

○こだまゆうや，まいけるりーす，しんばのぶひさ，おのかつき，かなもりえいじ，ふぉるかーどっち，ふくにしよしふみ，すずきえいいちろう、たかはしひでお

P125 X_0シムコイルの開発とMAS角度の超微細操作

○松永達弥[1]，水野敬[2]，竹腰清乃理[1]
[1]京都大学大学院理学研究科化学専攻，[2]（株）JEOL Resonance

Improvement of X_0 Shim Coil for Precise Adjustment of the Magic Angle

○Tatsuya Mastunaga[1], Takashi Mizuno[2] and K. Takegoshi[1]
[1]Division of Chemistry, Graduate School of Science, Kyoto University, [2]JEOL Resonance Inc.

An X_0 shim coil is a device for precise adjustment of the magic angle through application of an additional static field perpendicular to the main field, tilting the net field with respect to the spinning axis. In order to cope with the previously reported problem of probe displacement due to the Lorentz force, we employed a probe retainer and realized angle adjustment with 0.0001° resolution.

Magic Angle Spinning (MAS) は試料を静磁場に対してマジック角 $\cos^{-1}\frac{1}{\sqrt{3}}$ 傾けた軸周りに高速回転させることで、異方性相互作用を平均化してスペクトルを先鋭化する手法であり、固体 NMR で広く用いられている。四極子核を始めとする広幅のスペクトルを持った物質の NMR 測定[1]や STMAS[2]実験では、正確なマジック角の調整が必要となるが、現在一般的に使われている角度調整機構はネジによる機械的動作に頼っており、満足のいく精度で角度を合わせることが困難な事がある。

一方、最近我々が提案した X_0 シムコイルは超伝導コイルの作る静磁場 B_0 に対して直角な静磁場 B_x を発生させることで正味の磁場を傾けてマジック角を調整する電気的な角度調整機構である (Fig. 1)。よって従来の手法と比べてより正確で再現性のある角度調整が期待できる。実際上 B_0 と B_x が完全に直角である事は期待できないため、ここで 2 つのなす角を $2/\pi+\varepsilon$ で表すこととする。また、電磁気学的計算から静磁場 B_x はコイルに流れる電流 I に比例する。この時、試料の受ける有効磁場 B_{net}、及び試料回転軸と有効磁場がなす角の変化 $\Delta\theta$ は次式で表される。

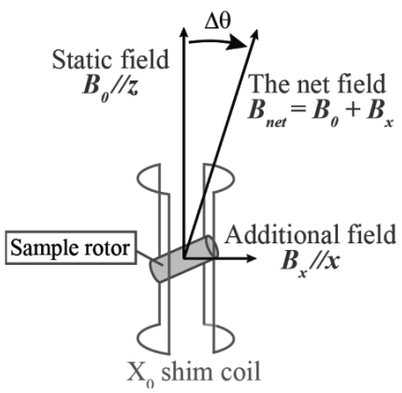


Fig.1 Schematic of an X_0 shim coil.

Solid state NMR, MAS, High resolution MAS NMR of quadrupolar nuclei

○まつながたつや，みずのたかし，たけごしきよのり

$$B_{net}=\sqrt{B_0^2+B_z^2-2B_0B_x\cos\left(\frac{\pi}{2}-\varepsilon\right)}$$

$$\cong \mathrm{B}_0+\frac{1}{2}\frac{B_x^2}{B_0}-B_x\varepsilon \qquad \cdots \quad (1)$$

$$\Delta\theta=\arctan\left[\frac{B_x\cos\varepsilon}{B_0-B_x\sin\varepsilon}\right]\cong\frac{B_x}{B_0} \qquad \cdots \quad (2)$$

また、B_{net} の増加は共鳴周波数のシフト Δ として NMR を使って観測ができる。

$$\Delta=\frac{B_{net}-B_0}{B_0}\cong\frac{1}{2}\left(\frac{B_x}{B_0}\right)^2-\frac{B_x}{B_0}\varepsilon \qquad \cdots \quad (3)$$

しかし X_0 シムコイルの実際上の運用にはいくつかの問題が伴う[3]。その中でも特に重要なものが電流 I が作るローレンツ力の影響である。巨大な静磁場 B_0 中ではコイルの円弧部分に上下で互いに逆向きのローレンツ力が働き、これによって生じるトルクによってプローブが X_0 シムコイルによる回転軸の角度の変化と比べて大きく傾くことがある。

今回我々が開発を行った X_0 シムコイル[4]は円筒形であり、試料中心と B_x の磁場中心が重なるよう設計されている (Fig. 2)。これはワイドボア MAS プローブの RF シールドも兼ねている。また、コイルを平角線で巻くことで電流密度の増加と機械的強度の向上が実現した。コイルは 1 A 辺り $B_x/I \sim 6.19\times10^{-4}$ [T/A] の磁場が発生するように設計されている。従ってたとえば $B_0 = 7.05$ [T] の超伝導磁石を用いる時、式 (1) から回転軸角度の制御分解能は $\Delta\theta/I \sim 0.005$ [degree/A] と見積もられる。つまり

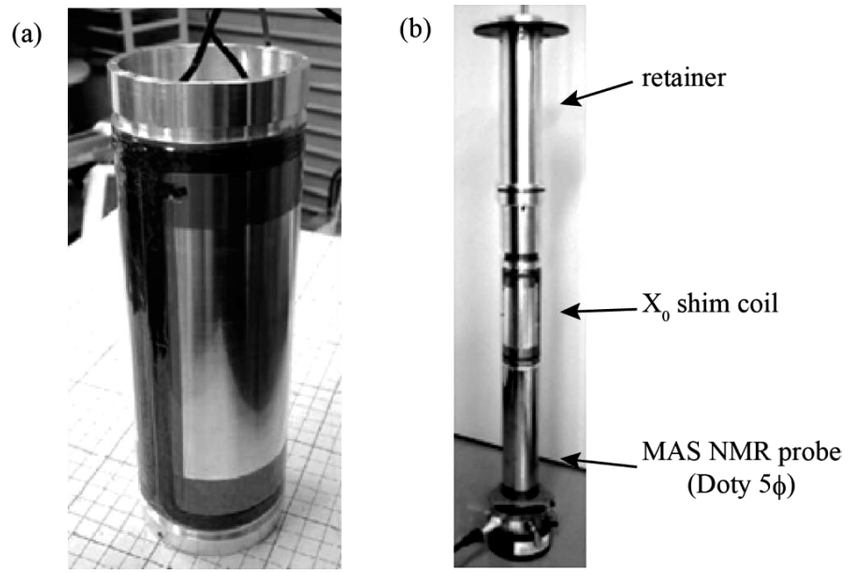


Fig. 2 (a) The X_0 shim coil developed in this work (coil size ϕ68 mm × 160 mm). (b) The X_0 shim coil, a probe and a retainer. The retainer fixes the systems to the main magnet against the Lorentz force.

制御可能な直流電源の分解能が $1\,\mathrm{mA}$ ならば角度の分解能は 5×10^{-6} degree となる。更に、これは従来の角度調整と異なり $I=0$ [A] の基準点から何度傾けるか指定できるという利点を持っている。また、固定器具 (Fig.2 (b)) の開発も行い、プローブを超伝導マグネットの上下とボア内部で固定できるようにすることでローレンツ力によって生じるプローブの傾きを抑制できるようにした。

電流 I の変化に伴う adamantane methylene の ^{13}C CPMAS NMR スペクトルの共鳴周波数変化を Fig. 3 に示す。プローブを超伝導マグネットの下部のみで固定した一般的な固定条件で測定 (Fig.3 (a)) では、±3 [A] 以上の電流をかけることで共鳴周波数が大きくシフトしていることがわかる。これはプローブに一定以上の力がかかった時に突然プローブが大きく傾いてしまうことを示している。式 (3) からこの時のプローブの傾きは 0.1° 以上であったと推測され、X_0 シムコイルによる角度調整は機能していないと言える。一方、Fig. 2 (b) で示した固定器具を用いた条件 (Fig.3 (b)) ではシフト Δ の変化が比較的滑らかであり、電流 I の二次関数で良く近似できた。しかしこれは式 (3) から計算されるシフト Δ の倍程度あり、プローブや固定器具の軋みによってプローブの傾き ε が電流 I に比例して変化したと考えられる。プローブの傾きε と有効磁場の傾き $\Delta\theta$ を合わせた回転軸角度の変化は 1 [A] 当たり約 0.01 [degree] であり、使用した電源装置 (KIKUSUI PBX20-20) の分解能が 10 [mA] であることから、10^{-4} [degree] の分解能で回転軸角度の調整が可能である。また、Fig.3 (b) における Adamantane methylene の半値全幅はいずれも 0.03 ppm から 0.09 ppm の範囲に収まっており、回転軸角度のズレによる線幅の増大も考慮すると、X_0 シムコイルが作る不均一磁場による線幅の増加は無視できる範囲であった。

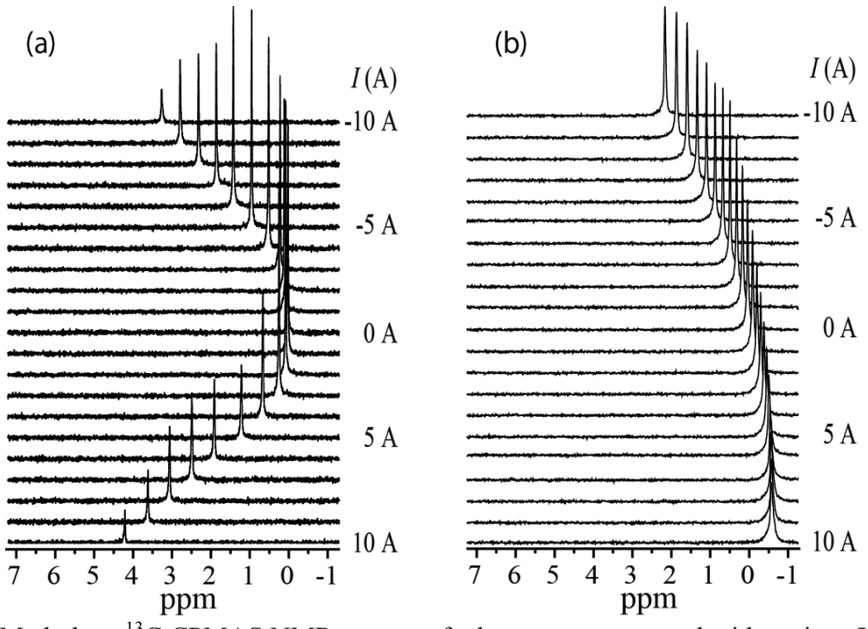


Fig.3 Methylene ^{13}C CPMAS NMR spectra of adamantane measured with various X_0 shim current values (I), (a) without (b) with the retainer. The carrier frequency was 75.7 MHz.

Fig.4 は X_0 シムコイルを用いて測定した部分重水素置換 dimedone-d の ^{2}H MAS NMR スペクトルである。電流 I に応じて試料回転軸角度が変化してピークの幅と高さが変わっている。このピーク高さと電流 I の関係性から最も回転軸角度が適切となるのは I~2 [A] の時と予想され、実際にこの実験では $I=2.3$ [A] の時にピーク高さが最大となった。これは $I=0$ [A] の時に比べ試料回転軸と静磁場 B_0 がなす角が 0.023 [degree] だけ変化したことに対応する。

本実験で開発した X_0 シムコイルは10^{-4} [degree] の分解能で回転軸角度の調整が可能であった。これは正確な回転軸調整が必要となる核種（原子番号の大きい ^{195}Pt や四極子核）や STMAS の測定の効率化に寄与するであろう。また、別途ホール素子等のセンサーでプローブの傾きを観測する[5]ことで、X_0 シムコイルを使った自動的な角度の微調整やフィードバックシステムへの応用も期待される。固体 NMR 測定の簡易的、効率的な運用のために今後更なる X_0 シムコイルの研究が望まれる。

謝辞　本研究は JST 先端計測分析技術・分析機器の支援の下に行われた

Reference
[1] T. Mizuno et al., *J. Am. Chem. Soc., 128, 9683-9686 (2006),*
[2] C. Huguenard et al., *J. Mag. Res., 156, 131-137 (2002),*
[3] T. Matsunaga et al., *第51 回固体NMR・材料フォーラム P4 (2010),*
[4] K. Takegoshi et al., *特開 2011-075472, US Appl. 12885861,*
[5] S. Manone et al., *J. Mag. Res, 190, 135-141 (2008).*

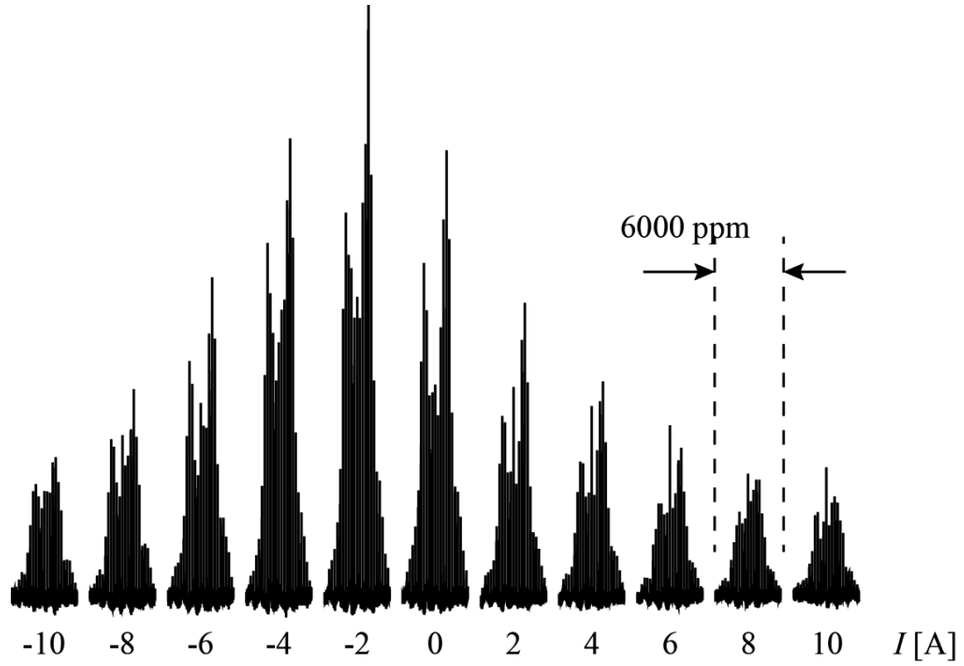


Fig.4 ^{2}H MAS NMR spectra of partially deuterated dimedone for various current values I. The resonance frequency was 46.3 MHz and the spinning frequency was 12 kHz.

P126 クライオNMRを用いたポリオレフィンの末端二重結合定量法

○茂呂ふみか[1]，佐藤浩子[1]，恩田光彦[1]
[1]（株） 三井化学分析センター・構造解析研究部

Quantitation of Unsaturation in Polyolefins by NMR with a High Temperature Cryoprobe

○Fumika Moro[1], Hiroko Sato[1], and Mitsuhiko Onda[1]
[1] *Analysis Research Lab., MITSUI CHEMICAL ANALYSIS & CONSULTING SERVICE INC.*

Microstructure analysis of polyolefins by NMR is essential to understand properties of polyolefins, which are widely used plastic in our daily life. Amount of unsaturation in polyolefins affects the durability and processability of products. As the material developed, analytical demand for the quantitation of a very low level of unsaturation is increased. A high temperature cryoprobe provides a significant sensitivity enhancement for NMR analysis of polyolefins, recently. However, it is still difficult to accurately measure a low level of the unsaturation signals along with huge main-chain signals, which rules the dynamic range of NMR spectra. We applied some pulse sequences to suppress the intense signals from polyolefin main-chain and observe the unsaturation sensitively. We also examined the effects of experimental conditions including the choice of solvent for the optimization.

［背景・目的］

ポリオレフィンは、プラスチックとして私たちの身の回りで広く活用されている。ポリオレフィンの特性を理解するために、NMRにより微細構造の同定と定量がなされてきた。中でも末端二重結合に関する情報は、物性に影響する熱分解や酸化の指標となることに加え、重合機構に関する情報が得られることから重要である[1)]。近年、構造制御の精密化に伴い、ポリオレフィン末端二重結合などの微量構造に対する定量精度への要求が高くなってきた。

高磁場化やクライオNMRによる感度向上で、これまで他の分析機器に比べ感度が低いとされていたNMRでも微量成分の検出が容易となってきた。しかしながら、^{1}H NMRによるポリオレフィンの末端定量などでは、ポリマー主鎖の巨大シグナルによりスペクトルのダイナミックレンジが決まってしまうため、通常のシングルパルス測定ではクライオNMRの感度が生かされない[2)]。

今回、種々のシーケンスを用いポリマー主鎖のシグナルを低減して微小シグナルのダイナミックレンジを確保するとともに、測定溶媒やサンプリング条件を検討し、ポリオレフィン末端二重結合の定量精度の向上を試みた。

キーワード： ポリオレフィン、末端定量、クライオNMR

○ もろふみか，さとうひろこ，おんだみつひこ

［結果］

ポリエチレン試料について、通常測定(シングルパルス)および主鎖シグナルを消去(シングルパルス・ダブルプレサチュレーション)して得られた^{1}H-NMRスペクトルの二重結合領域をFig.1 に並べて示す。帰属は図中に記載した。主鎖シグナルを消去したスペクトルでは、ビニル由来のプロトンシグナル（図中e）が明瞭に確認できる。7ppm付近の溶媒シグナルのS/Nを比較すると、通常測定スペクトルではS/N=1300、主鎖シグナル消去スペクトルではS/N=3500 であり、主鎖シグナルを消去することでS/Nが約3 倍向上した。

発表では、ポリオレフィン末端二重結合の定量精度について、測定溶媒やサンプリング条件の検討結果を報告する。

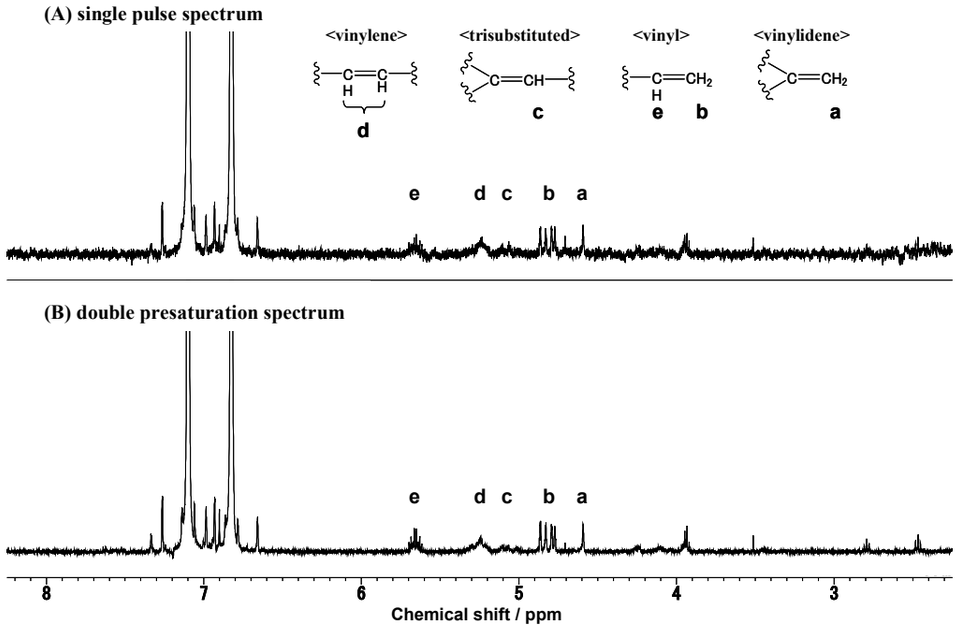


Fig. 1 ^{1}H NMR spectra of polyethylene obtained with (A) single pulse and (B) double presaturation method. Unsaturation regions are assigned to vinylene, trisubstituted, vinyl and vinylidene. ^{1}H NMR spectra were recorded on a Bruker AVANCE III spectrometer operating at 500 MHz equipped with a high temperature cryoprobe. Instrument conditions were as follows: pulse angle;45°, pulse repetition; 7.0 s, scan times; 4 scans, spectral width; 10000 Hz, temperature; 120℃, data points; 32k. The NMR samples were prepared by dissolving 20 mg of polyethylene in 0.5 ml of 1,2-dichlorobenzene-d_4 (ODCB) as a solvent.

［参考文献］

1) N. Kawahara et al., *Polymer*, **45**, 2883-2888 (2004)
2) Z. Zhou et al., *Macromol. Symp.*, **312**, 88-96 (2012)

P127 １．０３ＧＨｚＮＭＲ用三重共鳴溶液プローブの開発 超１ＧＨｚ　ＮＭＲを可能にするＲＦコイル形状

[1] 理化学研究所 SSBC, [2] 横浜市立大学大学院, [3]JEOL RESONANCE
[4] 神戸製鋼所, [5] 千葉大学大学院, [6] 山形大学大学院, [7] 物質・材料研究機構
○ 高橋雅人 [1,2], 秋山弘成 [2], 高杉憲司 [3], 長谷隆司 [4], 柳澤吉紀 [5],
中込秀樹 [5], 大嶋重利 [6], 木吉司 [7], 山崎俊夫 [1], 前田秀明 [1,2]

Development of triple resonance solution probes for 1.03 GHz NMR
- Design study of next generation RF coils over 1 GHz-

[1]RIKEN SSBC, [2]Yokohama City University, [3]JEOL RESONANCE Inc., [4]Kobe Steel, Ltd.,
[5]Chiba University, [6]Yamagata University, [7]National Institute for Materials Science
○Masato Takahashi[1,2], Hironari Akiyama[2], Kenji Takasugi[3], Takashi Hase[4],
Yoshinori Yanagisawa[5], Hideki Nakagome[5], Shigetoshi Ohshima[6],
Tsukasa Kiyoshi[7], Toshio Yamazaki[1], Hideaki Maeda[1,2]

An Ultra-high magnetic field, such as > 23.5 T (1GHz), is useful to achieve high NMR sensitivity and high resolution in protein NMR measurements. However, a Low Temperature Superconducting (LTS) NMR magnet is unable to exceed 23.5 T due to its critical magnetic field. We have commenced a project to replace an innermost Nb_3Sn coil of the current 920 MHz NMR with a Bi2223 High Temperature Superconducting (HTS) coil in order to exceed 1 GHz field, i.e. 1.03 GHz.

This paper presents the development of a triple resonance solution NMR probe for the 1.03 GHz LTS/ HTS NMR magnet; the probe was originally manufactured for the 920 MHz NMR, being reformed for the 1.03 GHz NMR. For the 1.03 GHz triple resonance probe, there is a trade-off between the ^{1}H resonance frequency and the ^{1}H sensitivity. For instance, the resonance frequency is enhanced with an increase in the quartz tube thickness as the RF coil capacitance is reduced, while the B_1 intensity per unit current, corresponding to the NMR sensitivity, decreases at the same time. We have developed a novel RF coil design, realizing the coexistence between a high resonance frequency and a high ^{1}H sensitivity, applicable to the field over 1 GHz. The triple-resonance NMR probes based on this result are being developed in our laboratory, and will be installed into the 1.03 GHz magnet. The NMR system is expected to be operational by the end of March, 2013.

The novel RF coil design for higher frequency over 1 GHz is finally described. These are designed to reduce the capacitance in the based model of Alderman-Grant coils.

緒言

NMR 磁石の高磁場化は NMR の性能向上において重要な役割を果たしてきた。しかし、従来技術である LTS（低温超伝導線材）では 1 GHz 以上の磁場を得ることは困難である。この限界を突破するために、我々は HTS（高温超伝導線材）を用いた超 1 GHz NMR の開発を行っている。これに伴い、1 GHz 以上の高い周波数を送受信できる RF コイルを持つ溶液 NMR プローブも必要であるが、RF コイルの自己共振周波数による高周波化の限界も 1 GHz 付近にある。この限界を突破する方法として以下の方法がある。共振周波数は

$$\nu_{SRF} = \frac{1}{2\pi\sqrt{LC}}$$

の式で表され、(1)試料管と RF コイルの小型化（インダクタンス L の減少）、(2)RF コイルを支える石英管を厚くする（キャパシタンス C の減少）、(3) キャパシタンスが小さくなる新規デザインの RF コイルの採用の３つである。このうち(1)は、測定試料の量を減らしてしまうため感度の低下を招く。(2)は共振周波数を向上させることができるが、RF コイルの直径が大きくなってしまう（つまり、試料から RF コイルの距離が遠くなる）ため B_1 磁場生成効率が低下し、RF コイルの感度が低下する。そこで、(3)の新規 RF コイルの設計検討を行った。

3 次元電磁界シミュレータによる RF コイル形状の検討

従来から広く使われている RF コイル形状である Alderman-Grant 型コイル（**Fig.1(a)**）を元に高周波化の検討を行った。このコイル形状の場合、キャパシタンスは **Fig. 2** に示す位置に存在し、これらの容量を小さくすることで高周波化ができると考えた。その結果 **Fig.1(b)**に示すような RF コイル形状で良好なシミュレーション結果が得られた。これらは RF コイル内に存在するキャパシタンスを小さくするために RF コイルの一部を切り取り直線状の形状になっている。これらの RF コイルの電磁界シミュレーションの結果を **Table 1** に示す。この結果より 1 GHz の限界を突破し、タンパク質の溶液ＮＭＲなどを考慮して試料管直径を 5 mm に維持したまま、高感度かつ 1 GHz 以上で使用可能なまったく新規な RF コイル形状を設計できた。

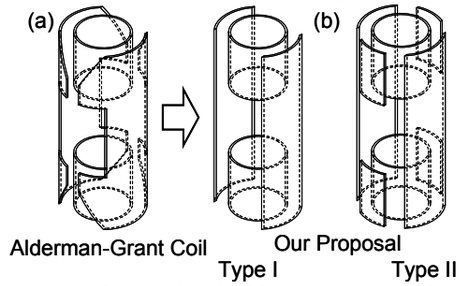


Fig. 1. (a) Conventional Alderman-Grant Coil and (b) New generation RF coils for ultra-high field

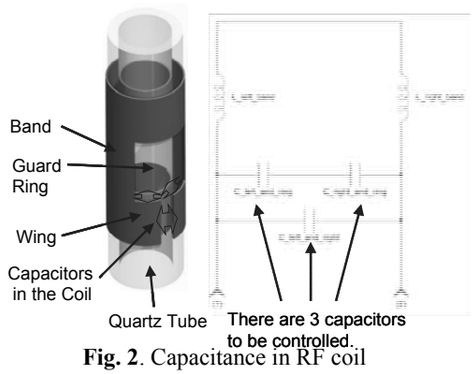


Fig. 2. Capacitance in RF coil

まとめ

今後、さらに詳細な検討を行って高性能化するとともに、実際に RF コイルを製作して性能を評価する。最終的に 1.03 GHz NMR 用三重共鳴プローブに新型の RF コイルを搭載する予定である。

本設計手法は 1 GHz 以上から上限は 1.2 GHz 程度まで適用できるものであり、超 1 GHz の世界を開くものである。

Table 1

	Alderman-Grant Coil for 920 MHz Probe		Our Proposal	
	Original Diameter	Thicker Quartz Tube	Type I	Type II
Self Resonance Frequenby [MHz]	936	1126	1066	1070
Test Frequency [MHz]	920	1030	1030	1030
Q	528	521	485	589
η	0.164	0.135	0.158	0.159
90 Degree Pulse Lengtjh @ 30W [μ sec]	5.04	5.92	5.66	5.12

本開発は、(独）科学技術振興機構の先端計測分析技術・機器開発事業による成果である。

たかはし　まさと, あきやま　ひろなり, たかすぎ　けんじ, はせ　たかし, やなぎさわ　よしのり, なかごめ　ひでき, おおしま　しげとし, きよし　つかさ, やまざき　としお, まえだ　ひであき

P128

半導体レジスト用モデルポリマーの脱保護による分子運動性変化

○相見 敬太郎[1], 鈴木 真由美[1], 西山 文之[2], 西川 尚之[3]
富士フイルム株式会社 R&D統括本部 [1]解析技術センター、
[2]エレクトロマテリアルズ研究所、[3]有機合成化学研究所

Changes in the molecular mobility of model polymers for chemically amplified resist during de-protection reaction

○Keitaro Aimi[1], Mayumi Suzuki[1], Fumiyuki Nishiyama[2], Naoyuki Nishikawa[3]
[1]Analysis Technology Center, [2]Electronic Materials Research Laboratories,
[3]Synthetic Organic Chemistry Laboratories,
R&D management headquarter, FUJIFILM Corporation, Kanagawa, Japan.

Molecular mobility of the resist polymers during the post exposure bake (PEB) process is considered to control the acid diffusion that determines the lithographic performances of the chemically amplified resist. Therefore, changes in the molecular mobility of resist polymers were analyzed using variable temperature solid state ^{1}H MAS and ^{13}C CP/MAS NMR spectroscopy. With increasing the ratio of the carboxylic acid unit, $T_{1\rho}^{H}$ minimum was shifted to higher temperature. At higher temperatures above the $T_{1\rho}^{H}$ minimum, the molecular mobility of the acid labile blocking unit (ABU) became vigorous. Those indicate that the molecular mobility of the ABU becomes slow-down as the de-protection reaction progresses.

［緒言］半導体レジストを用いた光リソグラフィープロセスは、シリコン基板上に形成した感光性レジスト膜を露光・パターニングすることにより半導体デバイスの回路パターンを形成する工程である。レジストパターンは、露光により発生した酸が露光後ベーク時に保護基を分解してカルボン酸を生成し(図 1)、アルカリ可溶となることで形成される。パターンの線幅は脱保護反応時の酸の拡散性によって決まり、これはポリマーの分子運動性と関係していると考えられている[1)]。そこで、脱保護反応の進行に伴うポリマーの分子運動性の変化を調べ、レジスト性能との関係を考察した。

[実験] 試料には、脱保護のモデル試料として保護基とカルボン酸の比率を変えたポリマーを合成し、固体 NMR 測定に用いた。

固体 ^{1}H MAS 及び ^{13}C CP/MAS NMR 測定には、ブルカー・バイオスピン社製 AVANCE DSX-300 分光器と 4 mmϕ HFX CP/MAS probe を用いた。緩和時間 T_1^H, $T_{1\rho}^{H}$ 及び ^{13}C CP/MAS スペクトルは、液体窒素を気化させた窒素ガスを用いて 14 kHz MAS 下で、–20～140℃の範囲で昇温しながら測定を行なった。

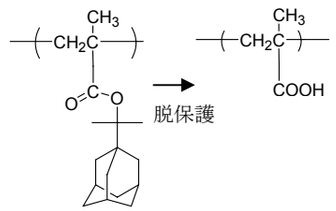


Fig.1 De-protection reaction of ABU.

chemically amplified resist, molecular mobility, solid state NMR

○あいみ けいたろう、すずき まゆみ、にしやま ふみゆき、にしかわ なおゆき

[結果と考察]

カルボン酸比率に対する分子運動性の変化

保護基ユニット (acid labile blocking unit, ABU) や主鎖のコンホメーション変化など、脱保護反応に伴うセグメンタルな分子運動の変化を、緩和時間 $T_{1\rho}^{H}$ の温度変化により調べた。図 2 にカルボン酸(carboxylic acid unit, CAU)比率を変えた試料の $T_{1\rho}^{H}$ の温度変化を示す。

いずれの試料についても $T_{1\rho}^{H}$ の極小が観測され、極小値の前後で傾きが変化していることから、この温度において運動モードが変化していると考えられる。そこでカルボン酸比率 25%試料の温度可変固体 ^{13}C CP/MAS 測定を行った結果、保護基由来のピークの先鋭化が 80℃以上で見られ、保護基の分子運動が 80℃以上で活発化することがわかった。従って、$T_{1\rho}^{H}$ で観測される運動モードの変化が保護基の分子運動によって誘起されると推定した。そこで、簡易的に極小前後での接線の交点を読み取り、保護基の分子運動活発化温度とした。

図3にカルボン酸比率に対する保護基の分子運動活発化温度の変化を示す。カルボン酸比率の増加(脱保護反応の進行に対応) に伴って、分子運動活発化温度が上昇することから、脱保護によりポリマーの分子運動性が低下することがわかった。

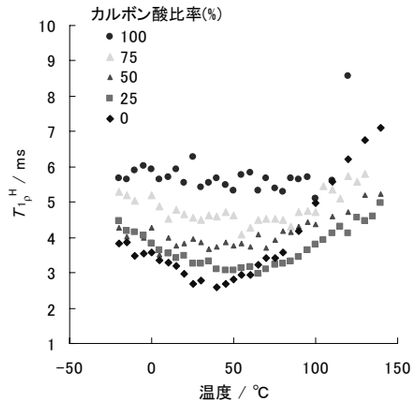


Fig.2 Temperature dependence of $T_{1\rho}^{H}$.

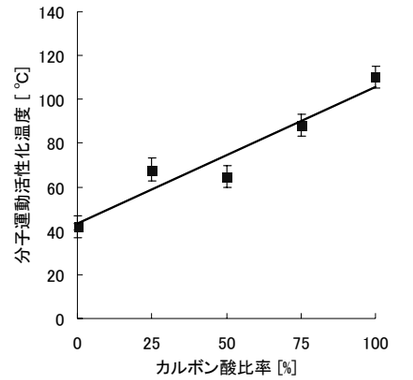


Fig.3 The relationship between the activation temperature of ABU and the ratio of CAU.

保護基の分子運動性と露光ラチチュードの関係

次に、保護基の構造を変えたポリマーについて、$T_{1\rho}^{H}$ 測定からカルボン酸比率に対する保護基の分子運動活発化温度調べた (図 4)。保護基の構造の違いにより、カルボン酸比率に対する活発化温度の変化幅が異なることがわかった。この温度変化幅が大きいほど、露光ラチチュード(EL)が良化しており、脱保護反応前後での分子運動性変化を大きくする分子設計により、EL を良化できると考えられる。

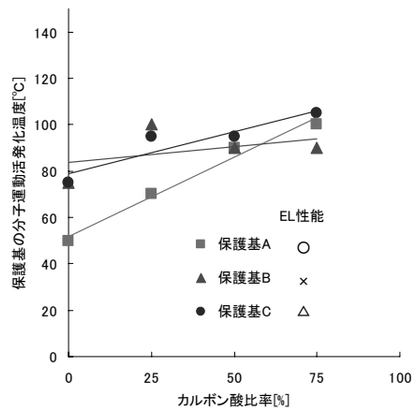


Fig.4 The relationship between the activation temperature of ABU and the ratio of CAU for different ABU.

[参考文献]
1) A. Shibuya, S. Yamaguchi, Y. Yoshida, M. Shirakawa, Proc. of SPIE, 7273, Advances in Resist Materials and Processing Technology XXVI, Clifford L. Henderson, Editors, 72730H.

P129

定量分析におけるNMR装置に起因する測定不確かさの考察

○齋藤剛[1]、斎藤直樹[1]、山崎太一[1]、大手洋子[1]、村上雅代[1]、井原俊英[1]
[1]産総研・計測標準研究部門

Consideration of measurement uncertainty originating from NMR instrument in quantitative analysis

○Takeshi SAITO[1], Naoki SAITOH[1], Taichi YAMAZAKI[1], Yoko OHTE[1], Masayo MURAKAMI[1], Toshihide IHARA[1]
[1]National Metrology Institute of Japan, AIST, Ibaraki, Japan

Quantitative analysis using NMR has received much attention because of its usability and its accuracy has been improved. In the evaluation of reliability of quantification, it is necessary to evaluate uncertainties not only those directory related to repeatability and reproducibility of NMR measurements, but also entire process of the quantification such as sample preparation. Based on this concept, we have proposed an uncertainty budget to evaluate the overall uncertainty of the quantitative analysis using NMR. After evaluation of uncertainty and possible bias components that have significant effects on the result of the analysis, uncertainties originating from NMR instrumentation have become the most significant effects. So far, we have not investigated in details the uncertainties originating from NMR instrument, in this presentation, we are presenting the effect of dependency of pulse offset on peak area intensities.

【はじめに】

NMR を利用した定量分析は、利便性が高く定量精度が向上したことから近年注目を集めている。分析値の信頼性評価においては、測定の繰返し性や再現性に留まらず、試料調製から解析までの定量分析全体を通した不確かさ評価を行う必要がある。このような考え方に基づき、我々は、これまで NMR での定量分析全体を評価した不確かさバジェットを提案し、最終結果に大きな影響を与えるものを軽減することにより、信頼性の向上を図ってきた。本研究では、これまで詳細な検討がなされていなかった装置に起因する不確かさに着目し、主要な要因として考えられるフィルタとパルスオフセットについて検討を行ったので発表する。

【実験】

殺虫剤原料であるエトフェンプロックスに内標準物質を添加したアセトン溶液を試料として、JEOL ECS-400 を用いて評価を行った(Fig.1)。ピーク積分強度に関して、パルス中心からの周波数差の依存性を評価するため、パルス中心とピーク面積を評価した領域の中心までの周波数差及びピーク面積の関係を、パルス中心を変更させながら調べた。

【結果】

同じ 100 ppm のスペクトル幅で、デジタルフィルタを利用しない場合とした場合のピーク面積と周波数差がどのような関係にあるかを確認した結果をFig. 2に示した（ピーク面積の平均値を 1 に規格化)。本装置に装着されたオーディオフィルタは、データ取り込みの周波数帯域が狭いほどパルス中心との周波数差による面積強度の変動が強く表れた（□)。そこで、スペクトル幅を 400 ppm としたところ、中心の 10 ppm 程度は面積強度が標準偏差 0.05 %程度のランダムなばらつきとして観測することができた。一方、デジタルフィルタを利用した場合、オーディオフィルタのみを利用した場合のような、面積強度の変動は無かったものの、デジタルフィルタの特性と同期する形でパルス中心との周波数差による面積強度の変動が観測され（●)、その強度変化は余弦関数で概ね近似することが可能であった（点線)。

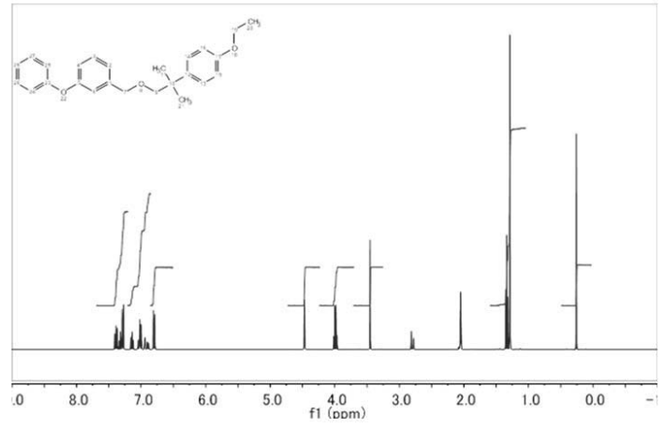


Figure1 1D spectrum and its structure of etofenprox; a peak from internal standard is resonates at 0.25 ppm.

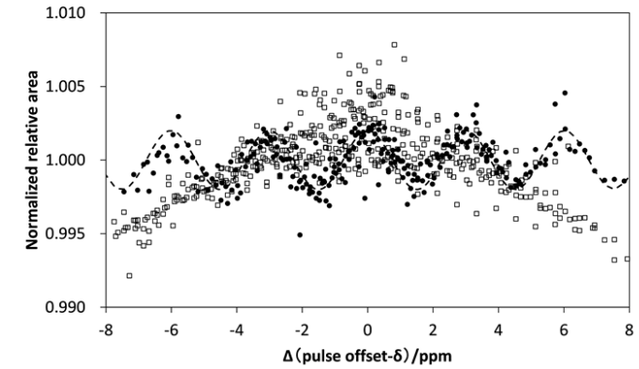


Figure2 Effects on area intensity obtained different pulse offsets; □ audio filter of 20 kH without digital filter, ● digital filter of oversampling rate of five and their simulated curve (--). Both conditions were set for spectral width of 100 ppm.

【結論】

デジタルフィルタを利用しない条件では、10 ppm のスペクトル範囲でシフトに依存しない面積強度を得るためには、スペクトル幅を 400 ppm 程度まで広げることで達成することが可能であった。一方、デジタルフィルタを利用した場合、スペクトル幅を極端に広く取らなくても面積強度の極端な変動は抑制できた一方で、面積強度に約 0.2 %の強度で周期的に変動する傾向が観測され、精確な定量を行う上では、デジタルフィルタの特性を向上させる必要があることが確認された。

Quantification, Uncertainty, Instrumentation

○さいとうたけし，さいとうなおき，やまざきたいち，おおてようこ，むらかみまさよ，いはらとしひで

P130

NMRを用いた定量的元素分析

○一条直規、武田和行、野田泰斗、竹腰清乃理
京都大学大学院 理学研究科 化学専攻

Quantitative elemental analysis by NMR

○Naoki Ichijo, Kazuyuki Takeda, Yasuto Noda, and K. Takegoshi
Division of Chemistry, Graduate School of Science, Kyoto University, Kyoto, Japan

We explore the possibility for identifying the composition of atomic elements in materials of chemical interest by NMR. To keep the efficiency of signal acquisition common for all spin species, we propose to fix the frequency and vary the magnetic field to cover the resonance conditions of the isotopes involved in a sample. For this purpose, we developed an experimental setup using a cryogen-free, field-variable superconducting magnet. Quantitative elemental analysis is demonstrated not only in solution as well as in the solid-state under magic-angle spinning.

1. Introduction

未知試料の元素組成を決定するための手法として、燃焼法、原子吸光分析法(AAS)、電子線マイクロアナライザ法(EPMA)、X線光電子分光法(ESCA、XPS)、誘導結合プラズマ法(ICP)、二次イオン質量分析法(SIMS)等の様々な元素分析法が確立されているが、その多くは測定の際に試料を破壊してしまうという難点がある。上記のうちEPMA、ESCAは非破壊的だが表面の分析しかできない。つまり、現在のところ物質内部の組成を知るには試料を分解するしかなく、常温常圧下におけるバルク試料の非破壊的元素分析は実現されていない。NMRはエネルギーの低いラジオ波を用いた分光法のため、原理的に非破壊で物質内部の情報を得られるという利点がある。本研究で我々は、従来法の弱点を補完するべく、NMRを用いた元素分析の実現可能性を探求した[1]。

ArとCeを除く全ての安定元素には固有の磁気回転比の核スピンを持つ同位体があり、原理的には共鳴条件の掃引により試料中の各元素の有無が判別できると期待される。しかし、固定磁場を用いる一般的なシステムでは、複数の核種にアクセスするために周波数を切り替える必要があり、煩雑なプローブチューニング作業を要する。さらに検出効率が周波数に依存するため、信号強度から核種の存在比を決定する定量的分析は困難である。そこで我々は、周波数を固定して磁場強度を広範囲に変えることで、同一の回路構成と周波数の下に異なる核種の共鳴条件をカバーし、定量的な測定を実現した。

元素分析、磁場可変、異種核間定量

○いちじょうなおき，たけだかずゆき，のだやすと，たけごしきよのり

2. Principle

磁気回転比 γ のスピンは磁場 B_0 において、ラーモア周波数

$$\omega_0 = -\gamma B_0 \tag{1}$$

で歳差運動する。よって磁気回転比 γ の核スピンの集合に対し周波数 $|\omega_0|$ のラジオ波を照射することで共鳴が起こり、コイルに生じる誘導起電力 V_{emf} としてNMR信号が観測される。V_{emf} は鎖交磁束の時間変化に等しい（ファラデーの電磁誘導の法則）から、熱平衡磁化 M を用いて

$$V_{\mathrm{emf}} \propto \omega_0 M \tag{2}$$

と書ける。温度 T における熱平衡磁化は、核スピンの数を N 、スピン量子数を I として

$$M = \frac{N\gamma^2\hbar^2 I(I+1)B_0}{3k_{\mathrm{B}}T} \tag{3}$$

と表される（キュリーの法則）。

NMR信号の強度 S は誘導起電力に比例するので

$$S = \eta V_{\mathrm{emf}} \tag{4}$$

（η は検出効率）と表すと、式 (3) 、(4) より、一定温度の下

$$S \propto \eta N\gamma^2\omega_0 I(I+1)B_0 \tag{5}$$

となる。これより、通常の測定のように磁場強度が一定の場合、磁気回転比 $\gamma_i\ (i = 1, 2, \cdots)$ の核種の存在比は得られた信号強度を用いて

$$N_1 : N_2 : \cdots = \frac{S_1}{\eta_1|\gamma_1|^3 I_1(I_1+1)} : \frac{S_2}{\eta_2|\gamma_2|^3 I_2(I_2+1)} : \cdots \tag{6}$$

を計算すれば求められる。ただし、核種によって決まっている γ_i や I_i と違い、η_i は測定時の回路構成や周波数に依存するため、これを逐一実験的に求める必要がある。

一方、周波数を固定し磁場を変えることで異なる核種にアクセスすれば、全ての測定において検出効率を同一にすることが可能となる。したがってこの場合は、核種の存在比は

$$N_1 : N_2 : \cdots = \frac{S_1}{|\gamma_1| I_1(I_1+1)} : \frac{S_2}{|\gamma_2| I_2(I_2+1)} : \cdots \tag{7}$$

で直ちに求めることができる。

ただし上記の議論が成り立つには、ラジオ波パルスを照射する前に核スピンが熱平衡に達している、かつ核スピンのフリップ角が等しい必要があるため、測定の際には注意を要する。後者に関しては、各核種に対し、共鳴磁場強度に比例した強度のパルスを照射することで実現される。

3. Experimental setup

広範囲に磁場強度を変えるという目的のため、我々は磁場可変型の無冷媒超伝導マグネット(Cryogenic Ltd.)を導入した。このマグネットは卓上サイズで、ボアは直径50.8 mmで大気に開放されている。超伝導コイルは外部の冷却機によって4 K以下に保たれている。コイルの一部を温め局所的に超伝導を破り、電流を制御することで、磁場を0から7 Tまで数分のうちに変えることができる。自作NMR分光計[2-4]にマグネット操作機能を追加することでNMR測定および磁場掃引を行うことができるようにした。

プローブはマグネットのボアサイズに合わせて自作した。マジック角試料回転(MAS)による測定が行えるよう3.2 mmスピニングモジュール(Agilent)を備え付け、共振回路を設計・製作した。周波数は実験に応じて容易に変更できるようになっている。

4. Results and discussion

(i) Liquid: 5.00 M NaH_2PO_4 aq. (30, 75 MHz)

我々はまず溶液試料に対するNMR元素分析のデモンストレーションとして、5.00 Mリン酸二水素ナトリウム(NaH_2PO_4)水溶液の測定を行った。試料は3 mmのガラス管に封入し、共鳴周波数は30.03 MHzとした。

磁場を0から上昇させると、最初の信号は0.7054 Tで観測された（Fig.1 (a)）。これは^{1}Hの共鳴条件に対応する。スペクトルの線幅の主な原因は静磁場の不均一性によるものである。磁場を大きくしていくと1.742 T、2.665 Tで信号が観測され（Fig.1 (b),(e)）、これらをそれぞれ^{31}P、^{23}Naと帰属したが、2.477 T、2.653 Tにも信号が現れた（Fig.1 (c),(d)）。これらの信号はそれぞれ^{65}Cu、^{63}Cuの共鳴条件に現れ、試料管を抜いても観測されたため、サンプルコイルの銅線によるものと推測した。コイルの銅線を銀線に換えると信号が観測されなくなったことからも、これらをコイル内の^{65}Cu、^{63}Cuと帰属した。なお、上記の5つ以外に信号は観測されなかった。

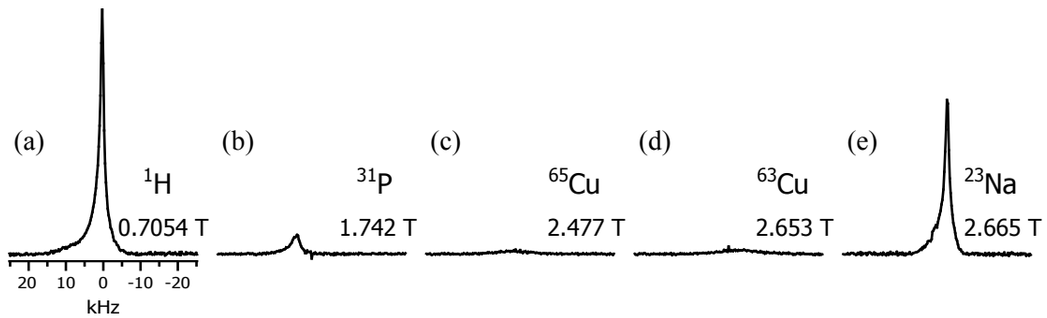


Fig. 1 Spectra obtained in aqueous solution of NaH_2PO_4 in magnetic field of (a) 0.7054 T, (b) 1.742 T, (c) 2.477 T, (d) 2.653 T, and (e) 2.665 T. The carrier frequency was fixed at 30.03 MHz. The signals were assigned to be ^{1}H, ^{31}P, ^{65}Cu, ^{63}Cu, and ^{23}Na, respectively.

次に定量的なNMR元素分析を行うために、共鳴周波数を75.00 MHzに固定し、磁場値1.761 T、4.349 T、6.656 Tにて^{1}H、^{31}P、^{23}NaのNMR測定を行った。その際スピン系が確実に熱平衡に達してから測定を行うために、飽和回復法により各核種のスピン - 格子緩和時間を求め、その7倍以上の繰り返し時間を用いた。また、プローブ部品由来の^{1}Hバックグラウンド信号強度も予め測定し、差分を取った。結果、それぞれのスペクトルの面積強度の比は^{1}H : ^{31}P : ^{23}Na = 59.4 : 1.00 : 3.24となった。測定データのSN比から、誤差は4.1%と見積もった。これより、式 (7)を用いて各スピンの数の比を計算すると^{1}H : ^{31}P : ^{23}Na = 24.0 : 1.00 : 0.991となり、秤量値から求めた比(24.1 : 1.00 : 1.00)と誤差の範囲内で一致した。

(ii) Solid: Sn_4P_3 powder (106 MHz)

固体試料に対するデモンストレーションとして、回転速度10 kHzのMASの下、リン化スズ(Sn_4P_3)粉末を測定した。^{31}P、^{119}Snおよび^{117}Snを観測するため共鳴周波数を106.0 MHzとし、それぞれ磁場6.141 T、6.621 T、6.929 Tで測定を行った。信号強度からスピンの数の比は^{31}P : ^{119}Sn : ^{117}Sn = 10.1 : 1.10 : 1.00となり、誤差は5.3%と求められ、理論値^{31}P : ^{119}Sn : ^{117}Sn = 9.77 : 1.12 : 1.00と一致した。

5. Summary and prospects

本研究で我々は、NMRを用いた新たな元素分析法の可能性を示した。各同位体の存在比の定量を信号強度の直截的な比較によって達成するために、磁場強度を変えることで共鳴条件を掃引する必要があったが、それを磁場可変超伝導マグネットの導入により実現した。溶液および粉末試料に対して定量的NMR元素分析のデモンストレーションを行った。この研究で測定したリン化スズはリチウムイオンを吸収・放出する機能を有しており、定量的NMR元素分析による非破壊的な化学量論的分析は電池開発にも資すると期待できる。

今後は静磁場の不均一性による広幅化を改善するためにシム調整機構の開発を行う予定である。これにより化学シフトなどの情報が解析できるようになれば、元素分析と同時に化学種の同定が可能になると期待される。

References

[1] K. Takeda, N. Ichijo, Y. Noda, and K. Takegoshi, *J. Magn. Reson.*, accepted.
[2] K. Takeda, *Rev. Sci. Instrum.*, **78**, 033103 (2007).
[3] K. Takeda, *J. Magn. Reson.*, **192**, 218 (2008).
[4] K. Takeda, *Ann. Rep. NMR Spectrosc.*, **74**, 355 (2011)

P131 Cryocoil MAS 二重共鳴プローブの開発

水野　敬[1]、戸田　充[1]、野田　泰斗[2]、竹腰清乃理[2]、藤岡　耕治[3]
[1](株)JEOL RESONANCE, [2]京都大学大学院理学研究科,
[3](株)クライオウェア

Development of a ^{1}H-^{13}C double-tuned Cryocoil MAS probe

Takashi Mizuno[1], Mitsuru Toda[1], Yasuto Noda[2], K. Takegoshi[2], Koji Fujioka[3]
[1] JEOL RESONANCE Inc., [2] Depatrment of Chemistry, Kyoto University, [3] Cryoware Inc.

After we had demonstrated the feasibility study for a single-tuned Cryocoil MAS probe which is a simple method to improve sensitivity of solid-state high-resolution NMR for 3 to 4-fold compared with the conventional method, we have developed a novel prototype (3rd type) of Cryocoil MAS (5 mm 300 MHz ^{1}H-^{13}C double-tuned probe for 7 Tesla wide-bore SCM). Key technologies and its attained specification including S/N gain are discussed.

Cryocoil MASプローブとは、試料を室温下に置きつつ検出系（特に送受信コイル、プリアンプ）を断熱された極低温下にて運用することにより、固体NMRスペクトルのS/N向上を目的とした装置である。我々は2005年より本装置の基礎研究を始め、意図した感度向上効果が得られることを実証した[1][2]。2010年からは、試作機の実用化に向け、特に有機物（^{13}C, ^{15}N など）への応用を念頭に^{1}H-^{13}C 二重共鳴プローブ試作機（3号機）の開発を行い、そのための基礎となる冷媒循環システムも開発した[3]。

今回、開発したCryocoil MAS プローブ3号機（5 mm試料管 300 MHz ^{1}H-^{13}C二重共鳴プローブ, 7 T WB-SCM対応）の断面概念図を示す（Figure 1a.）。基本的には従来設計[1]を踏襲しているが、最大の変更点は送受信コイルと熱交換器とを固定的に接続したことである。Cryocoil MAS の感度性能の核心部は”Cryocoil”と称する送受信コイルにある。送受信コイルの熱的特性・寸法形状・電気的特性は、NMR感度性能に占める主要な3つの要素（コイル温度・フィリングファクター・Q値）に直結する。そこで我々は、送受信コイル部が「安定的に冷却され、試料に近づけられ、低温での高周波抵抗を低くされる」ことを、相互に矛盾せずに行うことができる発明を考案[4][5]し、それに基づいて3号機を設計・製作した。3号機の送受信コイルは「ブロック」型の絶縁体に穿った円筒面の内側に設置された銅薄膜ソレノイドコイルとして形成・保持され、その冷却は熱交換器と「ブロック」とを直接的に断面 7mm□の無酸素銅角柱で接続することにより行われる（Figure 1b.）。従来機（1号機, 2号機）に比べると熱リンクの熱伝導断面積が10倍以上に、絶縁体の比熱容量・熱伝導断面積も同様に向上され、特に高出力デカップルパルス照射時におけるコイル温度の安定化に寄与する。また、コイルが絶縁体の円筒面内側に設置されることは、コイル内径をより試料に近づけることに相当し、さらに、近接効果・表皮効果により電流密度がコイル内側へ集中し、低温でのQ値の向上に寄与すると想定される。

Keywords: プローブ、固体NMR、感度向上

○みずのたかし、とだみつる、のだやすと、たけごしきよのり、ふじおかこうじ

実際に達成された従来機(2 号機)と 3 号機における感度性能要素の値を Table 1 に示す。コイル温度、Q 値において顕著な改善を見ることができた。3 号機で ^{13}C 1 パルス-^{1}H デカップルにより取得したスペクトル（試料：アダマンタン）を、検出系温度が室温のとき、および冷却運転したときとで同一積算回数で比較した（Figure 2）。感度性能要素の達成値にくらべ、感度性能、RF 磁場性能はまだ不十分であり、今後さらなる改善を続ける。

Table 1. Key parameters for Cryocoil MAS probe prototypes

No. of prototype	Coil temp [K]	Coil I.D. [mm]	Q-factor (@carrier freq.)	Preamp. temp. [K]	S/N Gain factor
2nd	17	9.0	210 (@44 MHz)	16	4.17
3rd	13.8	7.8	461 (@75 MHz)	18	3.20

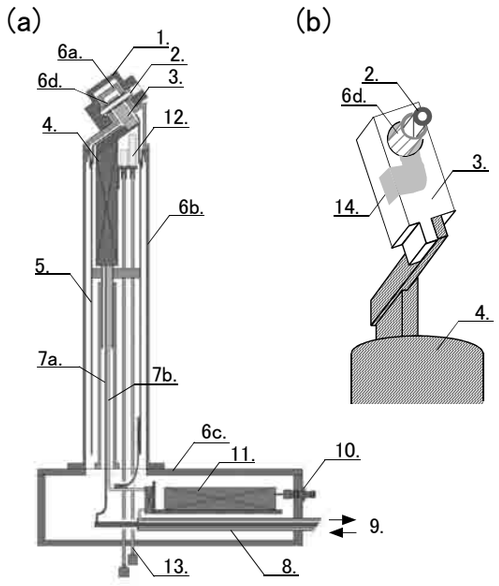


Figure 1. Schematics of the prototype 3rd of Cryocoil MAS (a), and of the detection coil module (b). 1. stator housing, 2. rotor, 3. insulator block (sapphire), 4. heat exchanger (Cu), 5. radiation shield, 6. partition for vacuum insulation [6a. probe-head (FRP), 6b. pipe (Al), 6c. chassis (Al), 6d. sleeve (alumina)], 7. coolant pipe line [7a. forward, 7b. backward], 8. bayonet, 9. from/to a refrigerator, 10. RF connector, 11. DPLX and preamplifier, 12. variable capacitor, 13. adjuster rod, 14. inner plated solenoid coil (Cu).

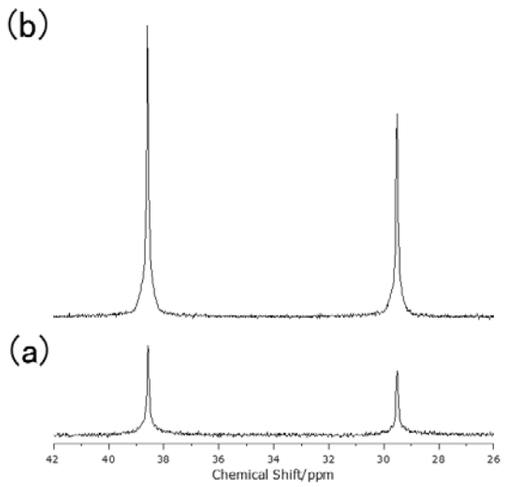


Figure 2. ^{13}C NMR spectra of adamantine using the prototype 3rd of Cryocoil MAS for (a) Room temp. operation, and (b) Cryo-temp. operation. For comparison of S/N, noise level of each spectrum is scaled as same. 7.05 T WB-SCM (JASTEC), home-built open-core spectrometer were used. Carrier Freq. (^{1}H): 301.37 MHz. Carrier Freq. (^{13}C): 75.78 MHz. Pulse sequence: 1 pulse w/ ^{1}H CW decoupling, 64 FID accumulated w/ repetition time of 10 s. MAS speed: 7.6 kHz. (a) Room temp. operation: coil temp. of 298 K, noise temp. of preamplifier of 77 K, ^{13}C Pulse width (90 deg.) 5.1 us (@346W). (b) coil temp. of 13.8K, noise temp. of preamplifier of 18 K. ^{13}C Pulse width (90 deg.) = 2.75 us (@346W), ^{1}H decouple = 10 kHz (@5W). Irradiation time is 655 ms.

References [1] T. Mizuno et al., Review of Scientific Instruments 79, 044706 (2008), [2] T. Mizuno et al., Rev. Sci. Instrum. 80, 124702 (2009), [3] T. Mizuno et al., “Cryocoil MAS with the closed-cycle refrigerating system”, 第 50 回 NMR 討論会(2011),横浜, [4]水野ら, 特願 2012-184530, [5]水野ら, 特願 2012-184541

Acknowledgement: This work is financially supported by SENTAN/JST.

P132

高温超伝導薄膜のRFコイルを用いた 5㎜NMR低温プローブの開発 -高温超伝導薄膜の磁化による磁場均一性への影響-

○金丸朗[1], 古島諒[1], 田中佑斗[2], 大嶋重利[2], 辻成悟[3],
田中良二[3], 末松浩人[3], 高橋雅人[1, 4], 前田秀明[1, 4]
[1]横浜市立大学, [2]山形大学, [3]株式会社JEOL RESONANCE, [4]理化学研究所SSBC

Towards an Ultra High Sensitivity 5mm-Cryogenic NMR Probe with high temperature superconducting (HTS) RF Coils -Effect of Diamagnetic Magnetization of the HTS thin film-

○Akira Kanamaru [1], Ryo Kojima [1], Yuto Tanaka [2], Shigetoshi Ohshima [2], Shigenori Tsuji [3], Ryoji Tanaka [3], Hiroto Suematsu [3], Masato Takahashi [1, 4], and Hideaki Maeda [1, 4]
[1]Graduate School of Nanobioscience, Yokohama City University, Yokohama, Japan.
[2]Graduate School of Science and Engineering, Yamagata University, Yonezawa, Japan.
[3]JEOL RESONANCE Inc., Akishima, Japan.
[4]Systems and Structural Biology Center, RIKEN Yokohama Institute, Yokohama, Japan.

A 5mm-cryogenic NMR probe with high temperature superconductor (HTS) RF coils is being developed for obtaining high sensitivity of NMR. RF surface resistance of the HTS thin film is 20-fold smaller than that of copper foils at cryogenic temperature; it corresponds to an enhancement in NMR sensitivity by a factor of 4 compared with conventional cryogenic probes. However, the effect of diamagnetic property of HTS thin film is a serious problem for the HTS cryogenic probe. As our probe is applied to a 5mm NMR sample tube, the problem is much more serious than the 1mm HTS cryogenic probe previously developed by Brey [1]. Both the temperature dependence of the error field distribution along the NMR magnet axis and temporal magnetic field fluctuation caused by the magnetization of HTS film have been investigated by experiment and numerical simulation in this paper. Based on these results, proper design of the HTS cryogenic probe is to be made.

【はじめに】

NMRは近年幅広い分野で重要な測定手法として用いられている。しかし、測定感度が悪いことが弱点として古くから挙げられており、同時にこれについて様々な角度から対策が取られてきた。本研究は装置開発の観点からこれを克服しようとするものである。NMRの低感度を克服する試みの一つに高温超伝導（HTS）薄膜を用いた低温プローブがある。YBCOを用いた1mmの極低温プローブはBreyらによって既に開発されているが[1]、ここではより一般的な5mmのサンプルチューブに向け開発を行った。

極低温プローブ，高温超伝導，磁場均一度

○かなまるあきら，こじまりょう，たなかゆうと，おおしましげとし，つじしげのり，たなかりょうじ，すえまつひろと，たかはしまさと，まえだひであき

5mm プローブの場合、1mm の場合よりも大きな開発上の問題がある。NMR においては、サンプル空間の磁場の均一度および時間的安定度は大変重要である。RF コイルに HTS を用いた場合、NMR マグネットが作る高磁場に対して HTS が作る新たな磁場が、サンプル空間の磁場を歪めてしまう。5mm の場合では、HTS の RF コイルが持つ反磁性がサンプル空間の磁場均一度に及ぼす影響は 1mm の場合よりも深刻な問題となることが予想される。これは 1mm の場合と比べて求められる磁場の均一空間が大きくなるためである。そこで本研究では、HTS の RF コイルが作る不均一磁場と磁場の時間変動を実験と解析で調べた。この結果を、最終的な極低温プローブの設計に反映させる。

【HTS プローブ開発の手順】

まず、500MHz NMR 装置の中に取り付けた低温プローブを用いて、RF コイルの位置に置かれた HTS の薄膜（25mmx25mm）を極低温まで冷却し、HTS 薄膜がサンプル空間の磁場の均一度と時間的安定度に与える影響を測定する。次に、実際の RF コイル形状に薄膜を加工し、再び NMR 磁石の磁場均一度への影響を調べる。ここまでの調査によって、HTS の RF コイルが作る磁場の分布が、手持ちの室温シムコイルの磁場補正能力の範囲内にあるかどうかを確かめることができる（仮にシムコイルによる補正が難しい場合には、低温シムなどの別の手段を検討する必要が生じる）。最後に、RF コイルに共振回路を取り付けて実際の NMR 測定を行う。これら 3 つのステップのうち、本報告では初めと 2 番目の結果を扱う。

【実験方法】

RF コイルに用いる HTS の候補材料として、THEVA 社製の 250nm 厚の DyBCO 薄膜（25mmx25mm）を使用した。DyBCO を選択したのは高磁場中での臨界電流密度 *Jc* が大きいためである。この薄膜を、当研究室で独自に作製した極低温プローブの RF コイル位置に配置し、500MHz NMR 磁石に挿入して実験を行った。サンプル空間の磁場分布の測定には、新たに開発したマイクロコイル NMR 装置を使用した。マイクロコイル NMR 装置は直径 1mm の細いチューブに水を封入し、直径 0.1mm の銅線を巻いて RF コイルとし、共振回路を取り付けたものである。この装置を用いることで、磁石の軸上の任意の位置の磁場を精密に計測できる。実験では、DyBCO の薄膜中心から上下 30mm 程度の範囲で 2mm ずつマイクロコイルの位置を変え、サンプル空間の B_0 磁場分布を求めた。

【実験結果と検討】

Fig. 1 に、RF コイルの位置に DyBCO の薄膜を置いたときの 46K と 15K におけるサンプル空間の B_0 磁場分布を示す。●は室温の B_0 であり、バックグランド磁場に対応している。Fig. 1(a)の△は 46K での B_0、Fig. 1(b)の□は 15K での B_0 である。低温と 300K の差が DyBCO の磁化による磁場である。46K では左右対称な分布が見られる。46K 以上の温度でも同様の対称分布が得られた。一方、15K では対称性が崩れているが、この理由は不明である。

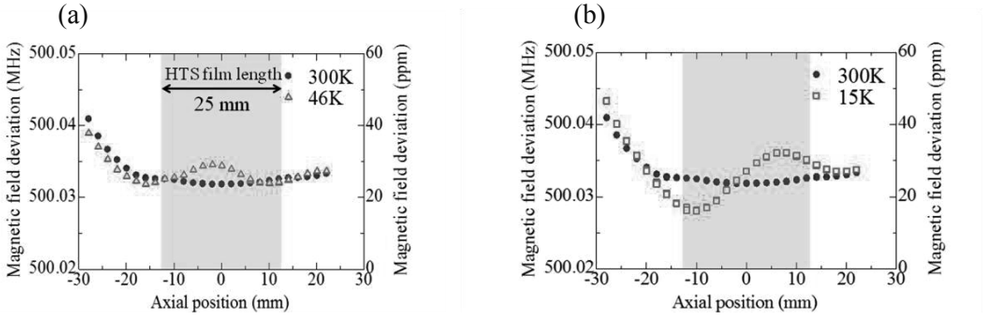


Fig. 1 (a) Magnetic field profile caused by the HTS-film magnetization, measured at 46K. (b) Magnetic field profile caused by the HTS magnetization measured at 15K; the magnetic field profile becomes asymmetric.

電磁界シミュレーションソフト JMAG-Studio version 8 を用いた数値計算により RF コイルの位置に磁性体を置いた場合の磁石軸上の磁場分布を求めた。結果を実験結果と対比して Fig. 2 に示す。解析値(実線)と実験値（△）は比較的よく一致しており、HTS の帯磁率は χ = -0.7 であることが分かる。即ち、磁石磁場 11.74T は DyBCO の上部臨界磁場よりはるかに低いので、帯磁率 χ が-1 に近くなり DyBCO の反磁性による磁場不均一性が無視できない量になる。今後、実際の RF コイル形状に薄膜を加工した場合についても、実験とシミュレーションで評価する。また、DyBCO が作る歪み磁場をシムコイルで補正できるか否かについても検討していく。

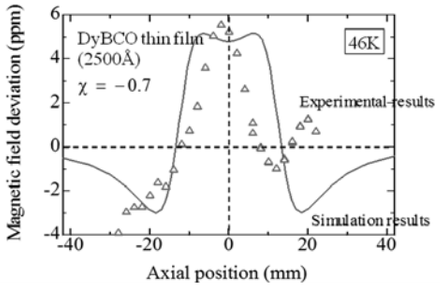


Fig. 2 Comparison between experimental field profile at 46K and the field profile obtained by numerical simulation. The experimental field profile agrees well with a numerical-simulation; corresponding magnetic susceptibility equals to χ= -0.78.

15K の温度において DyBCO が作る磁化磁場を 50 時間にわたり長時間計測した結果を Fig. 3 に示す。図の様に、1~2 時間おきに磁場がパルス的に減少し、再び回復している。パルス幅は 30~50 分で、磁場の減少幅は約 2ppm、対応する帯磁率の変化は $\Delta\chi$~0.3 である。

Fig. 3 の磁場の減少は DyBCO 薄膜への量子化磁束のマクロな侵入（または薄膜への外部磁場の侵入）に対応しており、磁場の再増加は量子化磁束のマクロな排出（または初期超伝導状態の回復）に対応している。この現象は低温超伝導（LTS）におけるフラックスジャンプと類似している。フラックスジャンプは LTS 内の量子化磁束の一部が動くと温度上昇を引き起こし、これが更なる磁束の動きを生み、遂には超伝導性を消失する現象である。この現象は瞬間的に生じる。HTS 薄膜は多層構造となっており、超伝導層の間隙に量子化磁束が止まる。量子化磁束は超伝導面（ab 面）と平行には容易に動く。Fig. 3 の現象は温度と量子化磁束の動きの間のフィードバックにより生じるゆっくりしたフラックスジャンプであると考えることもできる。いずれにしても、これまで、この種の現象はまったく報告されていないが、NMR 計測においては致命的であり、看過できない問題である。今後ゆらぎのメカニズムを解明すると共に、対策を立案していく。また、Fig. 1(b)で B_0 磁場分布が非対称になった原因がこの磁場揺らぎにある可能性があるので、これについても調べる。ちなみに、DyBCO 以外の同類の HTS 薄膜、例えば YBCO でも同様な現象が得られた。

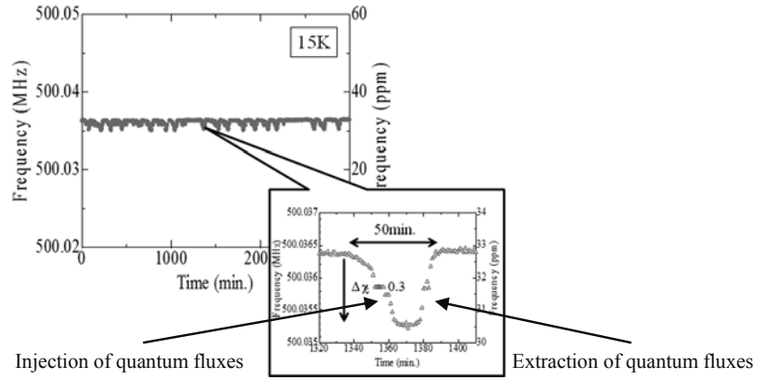


Fig.3 Temporal field fluctuation achieved under long term field measurement such as 50hr at 15K. The field drop as much as 2ppm appears, corresponding to a field susceptibility drop from -0.7 to -0.4. The fluctuation appears randomly, while its time duration is as long as 50min. It might be due to macroscopic injection and extraction of magnetic quantum fluxes from the DyBCO film.

【まとめ】

HTS 薄膜を用いた 5mm 低温プローブの開発を開始した。開発の第 1 段階として HTS 薄膜の磁化が及ぼすエラー磁場と磁場の時間的な不安定性を計測した。その結果、①薄膜の反磁性の帯磁率は-1 に近い大きな値であり、これが無視できないエラー磁場を作ること、②量子化磁束の出入に伴うらしい磁場の時間変動が現れること、などの知見を得ることができた。今後、この知見に基づきプローブの開発を進める。

【文献】

[1]Brey, W.W.; Edison, A.S.; Nast, R.; Rocca, J.; Saikat Saha, S. and Withers, R.S., *Design, Construction and Validation of a 1 mm Triple Resonance High-Temperature Superconducting Probe for NMR,* J. Magn. Reson., 179 (2), 290-293 (2006)

P133

水圏植物バイオマスの多様性を評価するための異種データ統合解析

○坂田研二[1], 伊藤研悟[2], 伊達康博[1,2], 菊地淳[1,2,3,4]
[1]理研PSC, [2]横市院生命ナノ, [3]理研BMEP, [4]名大院生命農

Integrated analysis based on heterogeneous measurements to evaluate diversity of the seaweed biomass

○Kenji Sakata[1], Kengo Ito[2], Yasuhiro Date[1,2] and Jun Kikuchi[1,2,3,4]
[1]RIKEN PSC, Kanagawa, Japan., [2]Yokohama City Univ., Kanagawa, Japan., [3]RIKEN BMEP, Kanagawa, Japan., [4] Nagoya Univ., Aichi, Japan.

The research of land plant biomass is effectively progressing in various fields, whereas seaweed biomass has not been focused on those studies. Therefore analyzing seaweed and mining the data in order to search for valuable information is very important. Here we described an integrated analysis based on heterogeneous measurements to evaluate the biological, phylogenetic and geographical diversity of the seaweed biomass for effective utilization of natural seaweed resources.

【背景および目的】

約 70%を占める地球の広大な海域には多種多様な生物種が生命を営み、海産資源が豊富に存在する有用資源の宝庫である。とりわけ日本は世界第 6 位の排他的経済水域を有し、我々はこれら沿岸海域から生態系サービスの多大な恩恵を享受している。例えば海藻類自身に含まれるアルギン酸やフコイダンなどの海藻類バイオマスは、そのごく一部の構成成分から工業製品や医薬品等、産業界において幅広く利用されており工業的価値は極めて高い。しかしながら地球環境に多様に存在する海藻類バイオマスは、既に有効利用するために様々な研究が行われている陸上植物バイオマスとは異なり、その効能について評価されていないものも多数存在し、手つかずのまま取り残されているのが現状である。このような「未利用資源の宝庫」から埋もれた情報をマイニングするためには、理解が十分とは言えない生体分子複雑系を複雑系のまま計測し、有益な情報をマイニングすることが重要である。そこで我々はこれまでの研究において、2010 年 8 月および 9 月に神奈川県横須賀市天神島にて採取した 16 種類の天然海藻サンプルを用いた NMR および FT-IR データに基づく海藻バイオマス成分のプロファイリング技術を報告した(1)。本会では、海藻類の多様性を評価するために多種多様な海藻類を採集し、海藻類バイオマス資源発掘に向けて NMR、FT-IR、TG-DTA、ICP-OES により得られた計測データを多角的視点から解析し、異種計測データを統合的に評価することで生物学的多様性、地理的多様性を同時に評価することのできる解析技術の構築を目的とした。

キーワード:データマイニング、環境メタボロミクス、地理的多様性

○さかたけんじ　いとうけんご　だてやすひろ　きくちじゅん

【サンプル調製および実験方法】

天然海藻サンプルは福島県久ノ浜港や神奈川県横須賀市油壺周辺など、各地域から計 46 種類を採集した。採集したサンプルは凍結乾燥後、オートミル装置で微粉化処理を施した。微粉化されたサンプルは FT-IR による固体成分の評価および TG-DTA による熱重量変化の評価を行った。また、ICP-OES では粉末サンプルを硝酸溶液で抽出し、金属イオンプロファイルの評価を行った。NMR 測定では粉末サンプルを D_2O 溶媒で抽出し親水性成分の評価を行うとともに DMSO/Pyridine 抽出による難溶性成分の評価も行った。各種計測装置から得られたデータをマトリックス化したのちソフトウェア「R」を用いて多変量解析を行い、生物学的多様性および地理学的多様性を評価した。

【結果および考察】

NMR、FT-IR および ICP-OES 計測により得られた個別データおよびこれら 3 種類の統合データを用いて主成分分析(PCA)を行った結果、各海藻類の系統分類学的差異（すなわち緑藻類、紅藻類、褐藻類の違い）によりそれぞれクラスタリングされた(Fig.1)。これらのクラスタリングに寄与している物質は以前の研究において既に報告済みである (1) が、本会で報告する異種計測統合 PCA(Integrative Heterogeneous Measurements (IHM)-PCA）では、個別の PCA と比較して緑藻類・紅藻類・褐藻類の違いをより明確にすることが可能であった。また褐藻類のデータを用いて同様に PCA を行った結果、地域差(関東、東北、近畿地方等)によってクラスタリングされることがわかった。これは水質等その地域環境との関係性が極めて高いと考えられることから、今後、各地域で同時に採集した環境水サンプルを計測し、含有する金属イオンや栄養塩等との関係性を明らかにしていきたい。

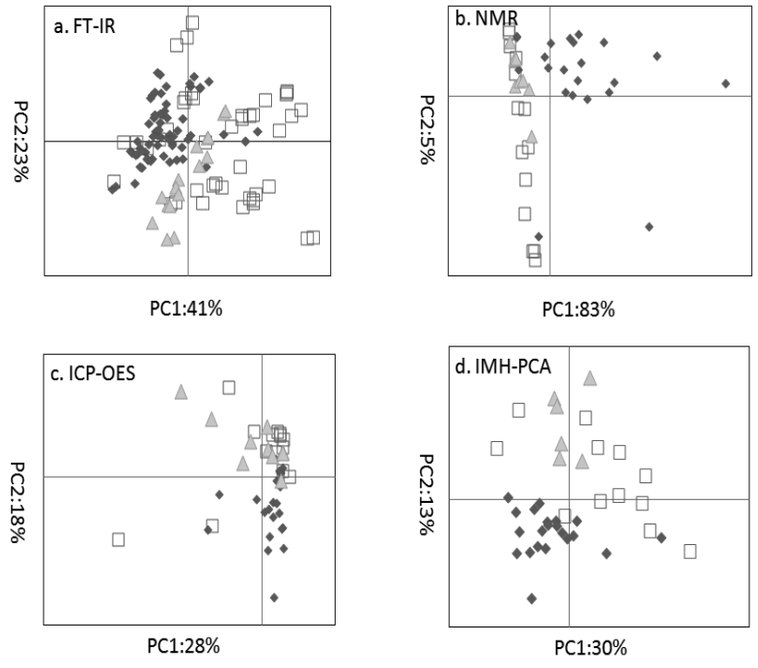


Fig.1 PCA score plots based on FT-IR (a), NMR (b), ICP-OES (c), and IHM (d) profiles
◆: Brown algae　□: Red algae　▲: Green algae

【参考文献】

1. Date, Y., Sakata, K. and Kikuchi, J. *Polymer J.*, (in press.)

P134 マンガン造影 MRI による脳下垂体の活性化とホルモン分泌の研究

○平金　真[1]、國領　大介[2]、寺沢　宏明[1]、青木　伊知男[2]
[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]放射線医学総合研究所・分子イメージング研究センター

Study of pituitary cell activation and hormone secretion utilizing manganese-enhanced magnetic resonance imaging (MEMRI)

○Makoto Hirakane[1], Daisuke Kokuryo[2], Hiroaki Terasawa[1], Ichio Aoki[2]
[1]Department of Structural BioImaging, Faculty of Life Sciences, Kumamoto University,
[2]Molecular Imaging Center, National Institute of Radiological Sciences

The pituitary gland is a key endocrine control organ. The high T_1 relaxation of manganese ions (Mn^{2+}) and the ability of Mn^{2+} to enter cells through calcium ion channels are useful for brain functional imaging with manganese-enhanced MRI. The aim of this study is to detect activated hormone-secreting cells in the pituitary gland, by measuring T_1 relaxation times. We treated Wistar rats with a growth hormone (GH) inhibitor, and compared them with the nontreated control group. A series of 30 T_1 maps were obtained, and $MnCl_2$ was infused during the fourth scan. The R_1 ($1/T_1$) values in the GH inhibitor treated group were statistically decreased, as compared with those of the control group. These results suggested that octreotide decreases Mn^{2+} uptake by the pituitary cells. This approach is a valuable technique with potential applications to the inspection of pituitary diseases and the elucidation of the mechanisms of pituitary hormone secretion abnormalities.

【背景】脳下垂体は、多くのホルモンを分泌する重要な内分泌器官である。成長ホルモンは、糖代謝や脂肪の分解に関与し、糖尿病や肥満などの生活習慣病の原因物質の一つになっている[1]。また、成長ホルモンの分泌異常は、下垂体機能低下症や先端巨大症といった難病を引き起こす。成長ホルモン分泌細胞では、ホルモン分泌物質が成長ホルモン分泌細胞上の受容体に結合すると、細胞内にシグナルが流れ、成長ホルモン分泌や細胞内へのカルシウムイオンの流入が起こる[2]。

マンガンイオン (Mn^{2+}) は、カルシウムチャネルを通り、活動性の高い細胞に多く取り込まれ、T_1 短縮効果により MRI 信号を増強させる[3] (Fig. 1)。最近、我々は、マンガン造影剤を投与し、高磁場 MRI で連続的に定量撮像することで、脳下垂体における Mn^{2+} の取り込みを定量的に評価する方法を開発した[4]。神経興奮物質であるグルタミン酸塩の投与により下垂体への Mn^{2+} の取り込みが促進され、カルシウム拮抗剤の投与により、Mn^{2+} の流入抑制が起こることを、3 分画モデルによる分布容積と速度定数の算出により証明した。この方法は、ホルモン分泌などの脳下垂体の機能を解析する有用なツールとなりうる。

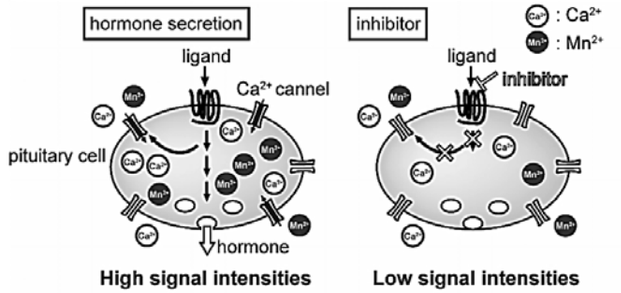


Fig. 1 A schematic describing the relationship between Mn^{2+} transportation and Ca^{2+} channel activity.

【目的】本研究は、Mn^{2+} の取り込みによる T_1 値変化を指標として、脳下垂体におけるホルモン分泌細胞の活性化を観測することを目的とする。

【方法】Wistar ラットを対象とし、成長ホルモンの分泌抑制剤であるオクトレオチド酢酸塩を皮下投与した。オクトレオチド酢酸塩を投与後、1 時間後に塩化マンガン ($MnCl_2$) を投与した。7.0 テスラ MRI 装置とラット頭部用 8 チャネルフェイズドアレイコイル (共に Bruker BioSpin) を用いて、$MnCl_2$ 投与前から投与後 2 時間まで飽和回復 RARE 法による下垂体の連続撮像を行った。測定後、オクトレオチド酢酸塩投与群と非投与群の下垂体の T_1 値を計算し、統計的に比較した。血漿中の成長ホルモン測定と Mn^{2+} 濃度測定のため、撮像中に採血を行った。血漿中の成長ホルモンの測定は、ELISA 法により行った。血漿中の Mn^{2+} 濃度を調べるために飽和回復 RARE 法により血漿の T_1 値の測定を行った。

【結果・考察】下垂体前葉において、オクトレオチド酢酸塩投与群は、非投与群に比べて Mn^{2+} の取り込みの抑制が有意に示された。一方、下垂体後葉においては、オクトレオチド酢酸塩投与群と非投与群で Mn^{2+} の取り込みに差は見られなかった。この結果より、下垂体前葉での Mn^{2+} の取り込みの差は、成長ホルモン分泌細胞の活性化を反映していることが示唆された。

本法は、脳下垂体が関与する疾患の診断や疾患メカニズムの解明に有用な方法となりうると考えられる。

【参考文献】

[1] Cross, D.J., Flexman, J.A., Anzai, Y., Sasaki, T., Treuting, P.M., Maravilla, K.R., and Minoshima, S. (2007) AJNR Am J Neuroradiol 28, 1865-1871.
[2] Yang, S.K., Steyn, F., and Chen, C. (2012) Cell Calcium 51, 231-239..
[3] Møller, N., and Jørgensen, J.O. (2009) Endocr Rev 30, 152-177.
[4] Leuze, C., Kimura, Y., Kershaw, J., Shibata, S., Saga, T., Chuang, K.H., Shimoyama, I., and Aoki, I. (2012) Neuroimage 60, 392-399

MRI, マンガン造影法, 脳下垂体ホルモン

○ひらかねまこと, こくりょうだいすけ, てらさわひろあき, あおきいちお

P135

底質試料プロファイリング技術構築と水圏環境評価の試み

○朝倉大河[1], 葭田征司[1], 伊達康博[1, 2], 菊地淳[1, 2, 3, 4]
[1]横市院生命, [2]理研PSC, [3]理研BMEP, [4]名大院生命農

Metabolic profiling technique for the detritus analysis toward the evaluation of hydrosphere environment

○Taiga Asakura[1], Seiji Yoshida[1], Yasuhiro Date[1,2] and Jun Kikuchi[1,2,3,4]
[1]RIKEN PSC, Kanagawa, Japan., [2]Yokohama City Univ., Kanagawa , Japan., [3]RIKEN BMEP, Kanagawa, Japan., [4] Nagoya Univ., Aichi, Japan.

The estuarine environment exhibit rich in biodiversity, and human society receives a great benefit from its ecosystem services. Thus, the development of analytical valuation by bird's eye viewing approach is expected. Here, we described the metabolic profiling for sediment in the estuarine and coastal environments using several sampling points in Kanto and Tohoku region in Japan. The organic matter in the sediments was successfully characterized by NMR measurements with multivariate statistical analysis. The organic matter information of collected sediment contributes to an evaluation of the estuarine environment in this our sampling strategy. In addition, microbial community and mineral profiles obtained from DGGE and ICP measurements were evaluated. Therefore, our metabolic profiling strategy was possible to extract the information about the characteristics of individual hydrosphere environment.

【背景・目的】 河口・沿岸環境には上流から多様な化学物質が流入し、その堆積によって多量の有機物が存在する。それにより河口・沿岸環境は生物多様性に優れ、人間社会はそれらの生態系サービスから大きな恩恵を受けている。しかし複雑な水環境システムにおける生態系サービスの保全・再生・開発等に資する知見の収集やその恩恵を持続的に享受するための技術開発には、既存の要素還元的な分析方法では複雑な水環境システム全体の相互作用や持続可能性等の総体的な評価を行うことが難しく、網羅的な評価法の開発が嘱望されている。そこで我々は河口・沿岸環境の重要な構成物である底泥堆積物をプローブ試料とし、核磁気共鳴(NMR)メタボロミクスによるプロファイリング技術構築と水圏環境の総合的な評価を試みた。

【方法】 本研究では東京都、神奈川県、福島県、宮城県に存在するFig. 1に示した河口環境10地点において底泥のサンプリングを行った。採集方法は自作の小型ドレッジ採泥器を用い、それぞれの地点で10回ずつのサンプリングを行った。得られた底泥試料を変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法(DGGE)による微生物叢解析および高周波誘導結合プラズマ発光分光分析 (ICP-OES) 法による金属イオン計測を行った。また、各地点での底泥サンプルからNaOHによる腐植物質の抽出を行い、2次元NMRによるDMSO可溶化有機物の計測を行った。

metabolomics, humic substance, hydrosphere

○あさくらたいが，よしだせいじ，だてやすひろ，きくちじゅん

【結果・考察】 ICP-OES計測によって得られた各地点のデータを主成分分析(PCA)により評価した。金属元素プロファイルは地点ごとにそれぞれクラスタリングされる傾向にあり、同一地点内のバラつきに比べ地点間の違いが顕著に大きいことが明らかとなった(Fig. 2)。また、スコアプロットを決定したローディングプロットから、東北と比べ関東の各地点ではAlやFe等の金属元素が豊富に存在していることを明らかにした。

2次元NMR計測によって得られたスペクトルデータでは難分解性の有機物が多く検出され、複雑な混合物で構成されていた。これらの2次元スペクトルデータをマトリックス化し、PCAによって各地点の比較を行った結果、関東河川の腐植物質がクラスタリングされていることが分かった(Fig. 3)。スコアプロットを決定したローディングプロットから、陸上由来と思われるシグナルが関東河川と阿武隈川でより豊富に存在していたことから、関東と阿武隈川では陸上由来の有機物質が多数流入していることが考えられる。久ノ浜港や鳥の海湾には、ほかの河川のような大きな流入経路がないこともこれらの結果に一致していた。また、久ノ浜港や阿武隈川、名取川ではペプチドのような構造物が比較的残留しており、比較的生物に分解されやすいこれらの物質が残留していることは、微生物叢の組成等を反映した反応場の違いが示されていると考えられる。以上のようにこれらの解析方法を用いることによって腐植物質による環境評価・予測が可能になると考えられる。

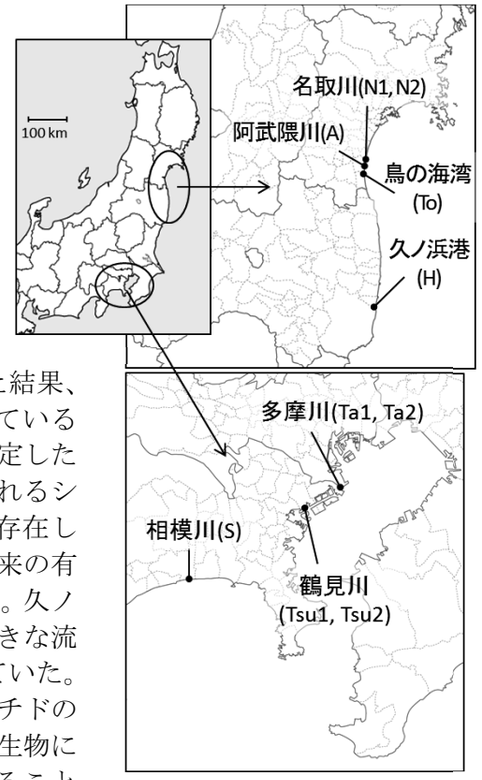


Fig.1: Mapping sampled spots

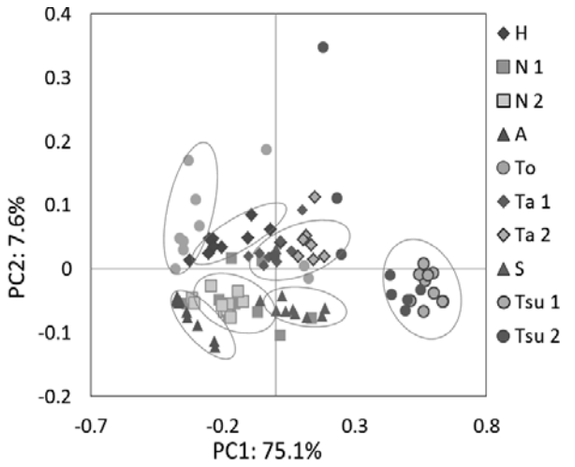


Fig.2: PCA score plot of each sampling spots by ion profiles.

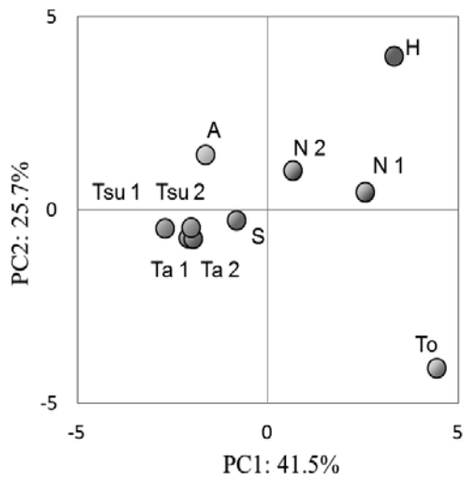


Fig.3: PCA score plot of each sampling spots by 2D NMR of humic substances.

P136 マンガン造影MRI法による中枢神経障害モデルにおける炎症反応の検出

○岩本　成人[1]、寺沢　宏明[1]、青木　伊知男[2]
[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]放射線医学総合研究所・分子イメージング研究センター

In vivo detection of neuroinflammation using manganese-enhanced MRI in CNS disorder model rats

○Shigeto Iwamoto[1], Hiroaki Terasawa[1], Ichio Aoki[2]
[1]*Department of Structural Bioimaging, Faculty of Life Sciences, Kumamoto University*
[2]*Molecular Imaging Center, National Institute of Radiological Sciences*

【Abstract】

Manganese chloride ($MnCl_2$) is a useful positive MRI contrast agent that enters excitable cells through Ca^{2+} channels. It has been applied extensively to manganese-enhanced MRI (MEMRI) for neuroimaging. However, MEMRI has not been generally applied to diagnose central nervous system (CNS) disorders, including neuroinflammation and disruption of Ca^{2+} homeostasis. The aim of this study is to investigate whether MEMRI can detect neuroinflammation in comparison with immunohistochemistry. Our data revealed that the areas with increased MEMRI signals corresponded to the areas with Iba1- and ED1-positive microglia observed in the hippocampus after LPS injection. This result indicated that MEMRI enhancement predominantly reflects brain neuroinflammation with activated microglia, and thus MEMRI is an attractive noninvasive method for the detection of inflammatory CNS disorders.

【背景】

アルツハイマー病などの中枢神経系疾患では、脳内局所の炎症やカルシウム（Ca^{2+}）恒常性の異常が観察される。炎症組織では、神経細胞とグリア細胞がサイトカインなどの炎症メディエーターを互いに産生・放出し、神経細胞では神経の賦活化や神経障害が、グリア細胞では活性型への変化や貪食が行われる。MRI による炎症の診断にあたって、一般的に用いられている超常磁性酸化鉄（SPIO）は、貪食系免疫細胞群に取り込まれることで、炎症部位において信号強度の変化をもたらす。しかし、SPIO は陰性造影剤であり、Ca^{2+} 濃度は反映しない（1）。一方、縦緩和時間を良好に短縮させる陽性造影剤である塩化マンガン（$MnCl_2$）は、全身投与後、脈絡叢から脳室を経て脳内に入り、賦活部位や海馬などの Ca^{2+} の代謝が活発な部位、あるいはグリア細胞の分布に依存して蓄積し、マンガン造影 MRI（MEMRI）法として多くの報告がある（2）。しかし、MEMRI が炎症組織でどのような信号変化を示すか、未だ十分な検討がなされていない。

【目的】

本研究は、炎症時に Mn^{2+} がどのように脳内に蓄積するかを観察することで、炎症性の中枢神経系疾患における MEMRI での評価手法を確立することを目的とする。

キーワード：マンガン造影MRI法、炎症

○いわもと　しげと、てらさわ　ひろあき、あおき　いちお

【方法】

炎症物質であるリポ多糖（LPS）はラット側脳室より投与した。LPS 投与から２日後に $MnCl_2$ を尾静脈から投与し、LPS 投与群（片側に LPS、もう一方に Saline を投与）とコントロール群（両側に Saline を投与）における信号強度および T1 値の変化を追跡した。対象は SD ラット（７週齢）とし、装置は7 T MRI とラット頭部用８ ch フェイズドアレイコイル（Bruker）を使用した。撮像には T1 強調と T2 強調、T1 値の算出には TR/TE を変化させた RARE（Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement）法を用いた。海馬および腹側核を ROI（関心領域）に設定した。

【結果・考察】

LPS 投与群の海馬における MEMRI において、コントロール群に比べ有意な信号増強が観察された。このことは、海馬領域において、炎症による変化を MEMRI によって捉える事が出来ることを示唆している。

次に、実際に脳のどの部位で炎症が起こっているかを調べるため、免疫組織化学染色を行った。免疫組織化学染色では、LPS 投与群の海馬においてミクログリアのみが特異的に活性化しており（Iba1 抗体・ED1 抗体）、astrogliosis など他の組織変性は観察されなかった（GFAP 抗体・HE 染色）。MRI 画像で信号変化の乏しかった腹側核領域では、LPS 投与群・コントロール群ともにどの抗体も反応していなかった。これらの結果から、活性型ミクログリアが集積した領域は、MEMRI の信号増強部位と重なることが分かった。

更に詳細な解析を行うため、搬入時、マンガン投与前、マンガン投与後間で ROI に設定した海馬領域と、腹側核領域の 信号強度および T1 値の経時的変化を比較した。信号強度の変化を解析したところ、LPS 投与による影響はほとんどなく、Mn^{2+} 投与によって信号強度が増大した。特に、LPS 投与群の海馬領域は、コントロール群に比べて腹側核領域との差が大きかった。また、T1 値を比較すると、LPS 投与群においてもコントロール群においても、Mn^{2+} 投与によっていずれの領域も T1 値は短縮するが、LPS 投与群は、コントロール群に比べ海馬領域での T1 短縮効果が大きいことが分かった。これらの結果から、Mn^{2+} は、炎症が引き起こされた海馬領域に集積していると考えられた。

【結論・展望】

これらの結果から、MEMRI は astrogliosis が生じていないモデルにおいて、炎症に伴うミクログリアの集積を検出しうることが示された。また、海馬領域の信号上昇は、炎症部位で活性型ミクログリアの分布密度が上昇したことに加え、Ca^{2+} 流入が亢進した結果、高濃度の Mn^{2+} を蓄積した可能性がある。本研究により、MEMRI が炎症性の中枢神経系疾患における診断方法として有用であることが示された。今後は、神経興奮作用を持つ物質や中枢神経疾患の原因物質を同様に投与し、他の疾患モデルに対する MEMRI の有用性を検証する。

【引用文献】

(1)McAteer, M. A.; Sibson, N. R.; von Zur Muhlen, C.; Schneider, J. E.; Lowe, A. S.; Warrick, N.; Channon, K. M.; Anthony, D. C.; Choudhury, R. P. *Nat Med* **2007**, *13*, 1253.
(2)Kawai, Y.; Aoki, I.; Umeda, M.; Higuchi, T.; Kershaw, J.; Higuchi, M.; Silva, A. C.; Tanaka, C. *Neuroimage* **2010**, *49*, 3122.

キーワード検索
著者検索

キーワード検索

数字

^{129}Xe ····· P70
^{129}Xe NMR ····· P108
^{13}C labeling ····· L2
^{13}C観測DOSY ····· P51
^{13}C安定同位体標識 ····· P113
^{13}C直接観測 ····· P47
^{19}F NMR ····· P58
^{19}F ····· P69, P71
^{19}F NMR ····· P44
^{1}H-NMR ····· P63
^{1}H固体NMR ····· P74
^{2}H NMR ····· P100
^{2}H Solid State NMR ····· P72, P74
2次元交換NMR ····· P68
^{31}P NMR ····· P60
^{33}S MAS NMR ····· P81
^{43}Ca MAS NMR ····· L22
^{43}Ca MQMAS NMR ····· L22
^{7}Li MAS NMR ····· P102
^{95}Mo ····· P87
^{9}Be NMR ····· P61

アルファベット

A

Accelerated degradation test ····· P99
alkali-metal ion ····· L23
Aluminosilicate ····· L13
amelogenin ····· P29
Amino-acid selective labeling ····· P34
Amphotericin B ····· L1
analytical chemistry ····· IL9
Antifreeze protein ····· P11
Anti-parallel β-Sheets ····· P36
API (Active Pharmaceutical Ingredient) ····· P80
Apomyoglobin ····· L7
AtTRB2 ····· P40
AtTTRF1 ····· P40
autoclaved aerated concrete ····· IL10

B

banana liquid crystals ····· L4
Bayesian ····· L3
BASHD ····· P62
BASHD-J-resolved COSY ····· P62
Binding Interface Dynamics ····· P28
Biological polymer ····· P94
biomass ····· P2
Biomolecules ····· P74
β-sheet ····· L2

C

Carbon dioxide ····· P95
Catechin ····· P54
CdSeクラスター ····· P89
Cell-free protein synthesis system ····· P34
CeO_2-$YO_{1.5}$ ····· P101
chemically amplified resist ····· P128
chitin ····· P7
Chemical shift ····· L6, P123
chemical shift anisotropy ····· P43
Chp1 ····· P33
chromatin remodeling complex ····· P10
chromodomain ····· P13
Co-crystal ····· P80
Combinatorial selective labeling ····· P34
Comonomer sequence distribution ····· IL6
conformation ····· P9, P82
Conformon ····· L20
covariance NMR ····· P66
CP/MAS ^{13}C NMR ····· P82
CPMG ····· L13
Cross-linked structure ····· P94
Cryocoil ····· P81
CYANA ····· L3, P121

D

DARR法 ····· P68
Database ····· P123
defect fluorite oxide ····· P101
DFT calculation ····· P102
DHFR ····· L9
Diffusion ····· L20
DMSO-quenched H/D exchange ····· P29
DNA repair ····· P8
DNA結合ドメイン ····· P5
DNA結合蛋白質 ····· P26
DNP ····· P45, P46
DPFGSE-NOE/ROE-SPT-Difference ····· P53
Dual receiver ····· P66
Dynamic Nuclear Polarization ····· P45
Dynamics ····· P94

E

Earth's magnetic field ····· P112
EFNMR ····· P112
Epigallocatechin gallate ····· P54
EPL法 ····· P49

F

fiber formation ····· P25
Fluorescence imaging ····· L21
Folding Intermediate ····· L7
Fuel cell ····· IL10
functional MRI ····· L10
Functional RNA ····· P16

G

Ganglioside GM-1 ····· P55
gas transport properties ····· P109
Gel ····· P95
GFT NMR ····· P77
Glass ····· IL8
GM1 ····· P55
GPCR ····· P42
G-Quadruplex DNA ····· L11
Gタンパク質共役型受容体 ····· P12

H

H2A ／ H2B ····· P39
HD交換 ····· L7
Heme ····· L11
HETCOR ····· P66
heterochromatin ····· P13
High pressure ····· L6
high-energy states ····· L6
HP1 ····· P13
HLA ····· P4
Hub protein ····· P8
humic substance ····· P135
Hydrogen GAS ····· P93
hydrosphere ····· P135
hyperpolarization ····· L23

I

Ice-binding ····· P11
Imidazole ····· P100
In operando 固体NMR ····· P69
in situ NMR ····· P107
in-cell NMR ····· P22, P48, P118
In-situ photoirradiated solid-state NMR ····· L14
In-situ 光照射固体NMR ····· L14, P76
Instrumentation ····· P129
integrated value ····· P122
Interaction ····· P23
Ion-channel complex ····· L1
ionic diffusion ····· IL10

J

J-resolved COSY ····· P62
J-resolved spectroscopy ····· L13

L

Large-amplitude Motion ····· P28
Lectin ····· P23
LED蛍光体 ····· P88
LED封止樹脂 ····· P88
$LiCoO_2$ ····· P107
Lignin ····· P98
Li-ion battery ····· IL9
lipid rafts ····· P72
Lithium-ion battery ····· P102
local mobility ····· P109

M

magnetic field gradient ····· L20
manganese chelate ····· L10
MAPキナーゼp38α ····· P32

MAS P125
Melt drawing P99
Membrane skeleton P25
metabolomics P135
methacrylate polymer P109
micro coil L12
mixture analysis P2
Molecular Dynamics P121
molecular mobility P128
molecular structure L4
Molecular-weight dependence IL6
Molten globule state P30
MQMAS P83, P90
MRI L20, P20, P108, P110, P112, P134
Multinuclear NMR IL8
Multinuclear Solid-State NMR P80
Multiple-perturbation 2D correlation analysis P96
myb-like domain P40

N

Nap1 P39
Native PAGE P19
Nitrogen-vacancy center in diamond L21
NMR P6
NMR spectroscopy P10
NMRメタボロミクス P114, P116
NOE L16, P31
non-crystallized cellulose P82
Nonlinear Sampling P48, P119
NOX1 (NADPH Oxidase) P14
NOXA1 (NADPH Oxidase Activator 1) P14
NQR P120
nuclear spin relaxation L9

O

off resonance effect P44
Optically detected magnetic resonance L21
overtone 14N L12

P

Paramagnetic shift L11
PDZドメイン P21
Peptide hormones P38
photo cycle L14
photoreceptor membrane proteins L14
pH pule labeling L18
PKC P41
pleckstrin homology domain P19
pole estimation P122
Poly 4-methyl-1-pentene P108
Poly lactic acid P52
Polylactic acid P96
Pradimicin A P78
protein P118
Protein folding L18
protein structure P22, P43
protein structure dynamics L9
Proton Conductivity P100
PST-MAS NMR P98, P99

Q

qNMR P56
QNMR P122
Quantification P129
quantitative analysis P44
Quench-Flow HD Exchange L7

R

R1/R2-dispersion L20
rat L10
RDC L5
REDOR L1, P91
Relaxation dispersion P4
Relaxation time analysis P98, P99
residual dipolar coupling P43
RFコイル P127
riboswitch P16
RNA L17
RNAアプタマー L8
Rubber P86, P93

S

SAIL L16
SAIL Method P28
SAIL法 P1
selective isotope labeling P16
selective methyl protonation P22
self-assembly P29, P55
Sf9 P118
SH3YL1(SH3 domain-containing YSC84-like protein 1) P14
Silk L2
Silk I P31
solid NMR P95
Solid state NMR IL8, IL9, L4, P86 P90, P93, P125, P128
SPFH domain P25
Spherical Complex P55
sphingomyelin P72
spin diffusion L23
Stability P4
stable isotope labeling P2, P49
Stereoregularity P52
Stomata P38
STPR P5
structure L4
structure refinement L3, P121
Structure-activity relationships P54
Structure-function relationship P38
Sugar P23
surface water P11
Swi6 P15
SWI/SNF complex P10

T

Tachyplesin I P7
Tacticity IL6
Telomere binding proteins P40
t-loop P17
TRF2 P17

U

ultra high speed MAS P74
Uncertainty P129

V

Validation P123
variable pitch coilNQR P120
very fast MAS L12
Vibrio Extracellular Metalloprotease (vEP) P36
Vulcanization P86

W

Wound infection and septicemia P36

Y

Y-89 MAS NMR P101

Z

Zeolite P90

五十音

あ行

アサイメントフリー P124
圧縮強度と化学構造 P82
圧縮センシング P119
圧力 P79
アポミオグロビン L7
アミロイド P6
アルミノシリケートガラス L22
アロステリック調節機構 P32
安定同位体 P57
安定同位体標識 P3, P49
アンフォテリシンB L1
イオンチャネル複合体 L1
イオン伝導体 P105
異種核多次元NMR P48
異種核間定量 P130
イミダゾール P100
イメージング P111
医薬品 IL7
薄膜 P58
液晶分子 P64
液相析出法 P58
エピガロカテキンガレート P54
炎症 P136

か行

カーボンブラック …… P104
化学シフト …… L6, P123
化学シフト異方性 …… P43, P69, P71
架橋構造 …… P94
拡散NMR …… P105
拡散測定 …… L20
加水分解 …… P60
カテキン …… P54
過渡的中間体 …… L7
加硫 …… P84, P86
カルシトニン …… P6
カルモジュリン …… L19
環境メタボノミクス …… P85, P115, P133
感度向上 …… P47, P81, P131
緩和時間 …… P46
緩和時間解析 …… P98, P99
緩和分散 …… L19
緩和分散法 …… P4, P50
気孔 …… P38
気体収着特性 …… P108
キチン …… P7
絹フィブロイン …… P31
機能性RNA …… P16
希薄親水性有機化合物水溶液 …… P63
逆蛍石型構造 …… P102
キャビティ …… P26
球状錯体 …… P55
吸着 …… P70
吸着水 …… P104
共通因子法 …… P117
局所構造 …… P83
局所構造解析 …… P101
極推定 …… P122
極低温プローブ …… P132
魚類多様性 …… P85
キレート …… L10
クライオNMR …… P126
クラスター …… P63, P65
クルクミン …… P6
クロモドメイン …… P15, P33
群特異性 …… P21
蛍光イメージング …… L21
計量化学 …… P115
血清 …… P117
ケモカイン …… P18, P42
元素分析 …… P130
コイル …… P120
高圧NMR …… P26
高圧NMR法 …… P37
高圧力 …… L6
高エネルギー構造 …… L6
高エネルギー状態 …… P20
高温超伝導 …… P108, P110, P132
交差分極 …… P69, P71
構造活性相関 …… P54
構造機能解析 …… P38
構造計算 …… L3
構造情報 …… P68
構造精密化 …… P121
構造評価 …… P123
構造平衡 …… P12
構造揺らぎ …… P37
高分解能四極子MAS NMR …… P125
高分子－Al錯体 …… P83
高分子量蛋白質 …… P3
酵母 …… P3
湖沼底泥 …… P111
固体^{1}H NMR …… P103
固体^{13}C NMR …… P92
固体^{15}N NMR …… L26
固体NMR …… L24, P73, P75, P78, P79, P84, P86, P91, P93, P97, P102, P104, P125, P131
固体酸触媒 …… P97
ゴム …… P84, P86
ゴム材料 …… P91, P93
ゴム素材 …… P92
昆虫細胞発現系 …… P12

さ行

最大エントロピー法 …… P119
細胞 …… P73
酸化還元電位 …… P35
残余双極子効果 …… P43
磁化率 …… P92
次元数 …… P63, P65
自己組織化 …… P55
自己組織化錯体 …… L5
脂質 …… P117
システイン …… P89
ジスルフィド結合 …… L16
自動帰属 …… L15
シトクロムc …… P27, P35
磁場可変 …… P130
磁場均一度 …… P132
脂肪族CHシグナル …… P1
縦緩和 …… P47
重水素化 …… P46
柔粘性結晶 …… P103
種子品質 …… P57
シミュレーション …… P120
常磁性NMR …… P27
常磁性緩和効果 …… P41
常磁性効果 …… P59
常磁性相互作用 …… L25
食品素材 …… IL7
水和・硬化 …… P84
水圏植物バイオマス …… P115
水素ガス …… P91, P93
生体高分子 …… P94
生体分子 …… P74
生体分子複雑系 …… P116
生物学的多様性 …… P133
積分値 …… P122
セグメント標識 …… P49
セメント …… P84
選択的安定同位体標識 …… P16
選択励起 …… L25
相互作用 …… P23
層状複合材料 …… P91
創薬 …… P18

た行

ダイアモンド窒素－空孔中心 …… L21
代謝動態 …… P113
代謝プロファイリング …… P57
ダイナミクス …… P50, P94
対流 …… P51
多核 …… P56
多核種固体NMR …… P89
多孔性金属錯体 …… P105
多次元相関測定 …… P77
多摂動二次元相関分光法 …… P96
多変量解析 …… P116
多量子NMR …… P63, P65
タンパク質・タンパク質相互作用 …… P24
タンパク質間相互作用 …… P124
タンパク質構造 …… P43
チオリン酸 …… P60
窒素ドープカーボン …… L26
超高磁場NMR …… P127
超高速MAS …… P74
超偏極 …… P70
地理的多様性 …… P133
底生生物（ベントス） …… P111
底泥 …… P111
低濃度サンプル …… P24
低分子RNA …… P9
低分子化合物 …… P21
定量分析 …… P56, P129
データベース …… P123
データマイニング …… P133
デカップリング …… P67
テロメア …… P17
糖 …… P23
糖鎖 …… P59
同種核 …… P91
統計的手法 …… P114
透析治療 …… P114
土壌微生物叢 …… P113

ドメインスワッピング……P25
な行
ナノコンポジット……P96
ナノ粒子……L24
二面角……P1
ヌクレオソーム……P75
熱安定性……P4
脳下垂体ホルモン……P134
脳機能画像法……L10
は行
π-conjugated polymers……L20
パイ共役系高分子……L20
バルク磁石……P108, P110
反応複合体……P32
ピーク分離……P61
光検出磁気共鳴……L21
光受容膜タンパク質……L14
光中間体……P76
光反応サイクル……L14
微視的錯体……P61
ヒストン……P75
ヒストンシャペロン……P39
非線形サンプリング……P48
ヒト主要組織適合複合体……P4
表面……L24
品質保証……IL7
部位特異的アミノ酸選択標識……P124
部位特異的安定同位体標識法……L17
フォールディング……L18
不確かさ……P129
プリオンタンパク質……L8
プローブ……P131
プローブ開発……P127
プローブ分子……P97
プロトン伝導……P100
分子間相互作用……P78
分子クラスター……P69
分子動力学……P121
分子動力学計算……P59
分子内キャビティ……P37
分子認識……P42
ベイズ法……L3
ヘテロクロマチン……P15
ペプチドホルモン……P38
ヘム……P27, P35
ベントス……P111
飽和移動差スペクトル……P18
ポリアニリン……L26
ポリオレフィン……P51, P126
ポリ酸……P87
ポリ乳酸……P52, P96
ま行
マイクロプローブ……P88
マイクロ波加熱……P64
マイクロ波照射NMR……P64
膜骨格……P25
膜タンパク質……L15, P76, P79
膜蛋白質……P73
末端定量……P126
マルチドメインタンパク質……P41
マンガン……L10
マンガン酸リチウム……P104, P106
マンガン造影MRI法……P136
マンガン造影法……P134
マンノースオリゴ糖鎖……P53
水分子周辺のミクロ構造……P63
未利用水産バイオマス……P85
メチル化リジン……P24
木質バイオマス……L8
モルテン・グロビュール状態……P30
や行
ユビキチン……L15
溶液NMR……P8
ら行
ラット……L10
リグニン……P98, P99
リチウム電池……P69
リチウムイオン電池……L25, P104, P106, P107
リチウム二次電池……P102
立体規則性……P52
立体構造……L19
立体構造解析……P20
立体構造決定……P121
立体配座解析……P53
リピート配列……P5
リボスイッチ……P16
レクチン……P23

著者検索

アルファベット

Akimori Wada ····· L14
Akira M. Ono ····· P28
Akira Naito ····· L14
Alexei Buevich ····· IL12
Ayako Egawa ····· L15
Changlin Tian ····· IL2
Chaowei Shi ····· IL2
Chiaki Nishimura ····· L7
Chojiro Kojima ····· L15
Chun-Jiun Yang ····· P28
Clare P. Grey ····· IL13
Daesuk Oh ····· IL5
Daiwen Yang ····· IL4
Dambarudhar Shiba Sanker Hembram ····· P22
Dennis A. Torchia ····· IL11
Dinu Iuga ····· P80
Dong Li ····· IL2
E-Joon Choi ····· L4
Eun Woo Lee ····· L4
F.A.A. Mulder ····· P37
F.W. Dahlquist ····· P37
Fangming Wu ····· IL2
Fumiko Nishikawa ····· L8
G. Marius Clore ····· IL11
Gary E. Martin ····· IL12
Heeyoun Kim ····· P36
Hideyasu Okamura ····· L8
Hikaru Hemmi ····· L11
Hironobu Morita ····· L10
Hiroshi Nishimura ····· L8
Hua Li ····· L6
Huihua Sun ····· IL4
Hulin Tai ····· L11
Inhwan Lee ····· P40
Izuru Kawamura ····· L14
Jackwee Lim ····· IL4
Jamie Barras ····· P120
Jihye Yun ····· IL5
Ji-Hye Yun ····· P14, P36, P40
Jinfa Ying ····· IL11
Jing-Song Fan ····· IL4
Juan Li ····· IL2
Juang Eun Park ····· P36
Jung Sup Lee ····· P36
JunGoo Jee ····· P28
Junji Watanabe ····· L4
Kaiqi Wu ····· IL2
Kaori Saito ····· L11
Kazuhiko Yamada ····· L4
Kazumi Hata ····· L6
Kazuo Kuwata ····· L8
Kazuyuki Akasaka ····· L6
Keiichi Kawano ····· HL1
Keisuke Ikeda ····· L15
Kenzo Deguchi ····· L4
Koichi Kato ····· L5
Kokoro Hayashi ····· L15
Lili Mao ····· P73
Maho Yagi ····· L5
Makoto Fujita ····· L5
Malcolm H. Levitt ····· IL15
Masami Kanzaki ····· L13
Masataka Murakami ····· L10
Masato Katahira ····· L8
Masatsune Kainosho ····· P28
Michael L. Reese ····· P124
Michael P Williamson ····· L6
Michal Malon ····· L12
Mingjie Zhang ····· IL3
Misha Reibarkh ····· IL12
Mitsuhiro Takeda ····· P28
Myeon Haeng Cho ····· P40
Nagao Kobayashi ····· L11
Naoki Kamo ····· L14
Nicky Baxter ····· P20
Nicolas L. Fawzi ····· IL11
Niels C. Nielsen ····· IL14

Oleg N. Antzutkin ····· P80
Pan Shi ····· IL2
Peter E. Wright ····· L7
Peter Güntert ····· L3
Peter Güntert ····· P121
Pravesh Shrestha ····· P14
R. Thomas Williamson ····· IL12
Rodolfo Ghirlando ····· IL11
Ryo Kitahara ····· L6
Ryosuke Takeuchi ····· L5
Ryota Miyasa ····· L14
Satoshi Nishikawa ····· L8
Shin-ichi Tate ····· L9
Sitaram P. Velaga ····· P80
Sooho Choi ····· P10
Sota Sato ····· L5
Steven P. Brown ····· P80
Sung-Kil Lim ····· IL5
Sungmin Kang ····· L4
Sunjin Moon ····· P10
Tadashi Shimizu ····· L4
Tai-huang Huang ····· IL1
Takahiro Nemoto ····· L12
Takashi Nagata ····· L8
Takashi Okitsu ····· L14
Takashi Watanabe ····· L8
Taro Eguchi ····· HL2
Tetsurou Hidaka ····· L14
Toshimichi Fujiwara ····· L15
Tsukasa Mashima ····· L8
Tsutomu Terauchi ····· P28
Volker Dötsch ····· P124
Weontae Lee ····· PIL5, P10, P14, P36, P40
Williamson Michael P. ····· P20
Wolfgang Bermel ····· IL12
Xianyu Xue ····· L13
Yang Chun-Jiun ····· P28
Yasuhiko Yamamoto ····· L11
Yoshiki Yamaguchi ····· L5
Yoshiteru Seo ····· L10
Yuji O. Kamatari ····· L8
Yuki Endo ····· L12
Yuki Sudo ····· L14
Yun Soo Bae ····· P14
Yusuke Nishiyama ····· L12
Yuya Tomonaga ····· L14
Zhang Ying ····· P59
Zhao-Xun Liang ····· IL4

五十音

あ行

相沢　智康 ····· P5, P7, P29, P30, P77
相見　敬太郎 ····· P128
青木　伊知男 ····· P134, P136
赤壁　麻依 ····· P45, P46
赤坂　一之 ····· P26, P37
赤羽　英夫 ····· P112, P120
秋山　弘成 ····· P127
秋吉　克昴 ····· P41
浅川　直紀 ····· L20
朝倉　大河 ····· P116, P135
朝倉　哲郎 ····· L2, P31, P52, P74
浅野　敦志 ····· P92
芦田　淳 ····· P90
芦原　悠太 ····· L17
阿部　孝政 ····· P45, P46
荒井　創 ····· L25, P107
阿波賀　邦夫 ····· P69
安藤　一郎 ····· P114, P117
安東　真理子 ····· P101
飯島　隆広 ····· P87
五十嵐　一暁 ····· P82
五十嵐　康弘 ····· P78
五十嵐　龍治 ····· L21
池上　貴久 ····· L18, P24, P47
池田　和寛 ····· L21
池田　恵介 ····· P73
池谷　鉄兵 ····· L3, P22, P48, P118 P119, P121
石川　潔 ····· L23
石川　洋人 ····· P65

石田　規人 …… P42
石田　宏之 …… P88
石田　真由美 …… P33
伊豆本　幸恵 …… P35
井田　朋智 …… P94, P100
市川　和洋 …… P46
一条　直規 …… P130
出田　圭子 …… P104
伊藤　研悟 …… P115, P133
伊藤　貴文 …… P98
伊藤　建比古 …… P54
伊藤　幸成 …… P78
伊藤　隆 …… L3, P22, P41, P48
P118, P119, P121
糸﨑　秀夫 …… P112, P120
稲垣　冬彦 …… L19, P11
稲葉　理美 …… P26
犬飼　宗弘 …… P105
井上　正順 …… P73
井原　俊英 …… P44, P129
今井　章雄 …… P111
今井　潤 …… P114, P117
岩佐　達郎 …… P79
岩沢　佳尚 …… P17
岩本　成人 …… P136
岩谷　奈央子 …… P21, P25
上田　卓見 …… P12
植田　佳樹 …… P60
上野　貴将 …… P4
宇川　仁太 …… P86
鵜澤　洵 …… P53
牛田　千里 …… P9
内本　喜晴 …… L25, P107
右手　浩一 …… IL6, P52
海山　剛史 …… P100
梅川　雄一 …… L1
梅原　将洋 …… P54
海野　幸子 …… P23
江川　文子 …… P73, P77
江崎　芳 …… P18, P42
及川　格 …… P101
大石　梨紗 …… P57
大木　出 …… P24
大木　進野 …… P38
大窪　貴洋 …… P84
大熊　宏昌 …… P1
大嶋　重利 …… P127, P132
太田　元規 …… P21
大手　洋子 …… P129
大橋　竜太郎 …… P68, P94, P100
大畠　雄三 …… P104
大山　貴子 …… P16
岡村　英保 …… L19
小川　達也 …… L2
沖津　貴志 …… P79
奥居　沙弥 …… P9
奥下　慶子 …… L2
奥出　順也 …… P12
小久見　善八 …… L25, P107
奥村　和 …… P90
奥村　豊旗 …… P102
奥村　雄三 …… P58
小椋　賢治 …… L19, P11
小倉　立己 …… P113
奥脇　暢 …… P39
織田　昌幸 …… P26
小野　明 …… P1
小野　克輝 …… P124
小畑　命輝 …… L20
恩田　光彦 …… P126

か行

甲斐荘　正恒 …… L16, P1
葛西　卓磨 …… P34
梶　弘典 …… P74
粕谷　厚生 …… L24
桂　祥太 …… P120
加藤　晃一 …… P20, P55, P59
金折　賢二 …… P26
金場　哲平 …… P41
金丸　朗 …… P132
金森　英司 …… P124
金山　公三 …… P98
兼崎　隆 …… P56
金橋　康二 …… L22, P84
兼松　渉 …… P96, P98, P99
上口　憲陽 …… IL9, L26, P90
上坪　祐介 …… P105
神原　孝之 …… P71
神谷　昌克 …… P5, P7, P29, P77
亀川　亜希子 …… P25
亀田　倫史 …… P20, P59
河合　剛太 …… P9, P16
川口　あゆみ …… P13
川島　一泰 …… P45
河野　敬一 …… P5, P7, P29, P30, P77
川端　潤 …… P46
川畑　俊一郎 …… P7
河原　郁美 …… L17
川村　出 …… P64, P76, P79
木川　隆則 …… P34
菊川　峰志 …… P5, P7, P77
菊地　淳 …… P2, P57, P85, P113
菊地　淳 …… P115, P116, P133, P135
北川　進 …… P105
北沢　創一郎 …… P20
北原　亮 …… P20, P37
北村　成史 …… P92
北山　寛貴 …… L18
木下　賢吾 …… P21
木村　英昭 …… L26
清澤　秀孔 …… P9
木吉　司 …… P127
日下部　寧 …… P66
櫛引　崇弘 …… P7
国本　浩喜 …… P95
久野　敦 …… P23
熊谷　慶子 …… P45, P46
熊谷　翼秀 …… P94
熊木　康裕 …… P5, P7, P29
久米田　博之 …… L19, P11
胡桃坂　仁志 …… P75
黒木　重樹 …… L26
黒津　卓三 …… P92
桑島　邦博 …… P30
桑原　大介 …… P91
高津　文人 …… P111
神田　大輔 …… P42
合田　名都子 …… P21, P25
幸福　裕 …… P12
國領　大介 …… P134
小柴　生造 …… P34
児嶋　長次郎 …… L17, P24, P47, P73, P123
小島　奈津子 …… P97
古島　諒 …… P132
巨瀬　勝美 …… P110
古瀬　佑馬 …… P84
小玉　優哉 …… P124
後藤　俊介 …… P25
後藤　祐児 …… L18
小沼　剛 …… P50
小林　直宏 …… P123
小林　弘典 …… P102
小林　未奈 …… P95
小松　一弘 …… P111
小松　功典 …… P2
近藤　啓太 …… P12

さ行

斎　政彦 …… P54
齊藤　貴士 …… P42
齋藤　剛 …… P44, P129
斎藤　直樹 …… P129
酒井　秀之 …… P86
坂田　研二 …… P115, P133
櫻井　一正 …… L18
櫻木　隆広 …… P91
笹川　匡裕 …… P68
佐藤　宗太 …… P55
佐藤　貴之 …… P111
佐藤　浩子 …… P126
佐藤　昌彦 …… P39

真田　貴志 ……P90
澤上　勲 ……P89
汐月　大志 ……L25
鹿野　昌弘 …… P102
篠　阿弥宇 ……P57
島崎　彩奈 …… P108
嶋崎　真那人 …… L3, P121
嶋田　一夫 …… P3, P12, P32, P42
清水　俊介 …… P106
清水　禎 ……P87
清水　敏喜 ……P86
治村　圭子 ……P97
下條　秀朗 …… P13, P15, P17, P33
下田　景士 …… P107
徐　宇 ……P43
白井　隆弘 ……P48
白石　勇太郎 ……P12
白川　昌宏 …… L21, P22, P24, P48
新川　隆朗 …… P114
新澤　英之 ……P96, P99
榛葉　信久 …… P124
末松　孝子 …… P122
末松　浩人 …… P132
菅瀬　謙治 ……P4, P20, P50
菅沼　こと ……P52
杉木　俊彦 …… P3
鈴木　榮一郎 …… P124
鈴木　啓介 ……P17
鈴木　不律 ……P74
鈴木　真由美 …… P128
鈴木　悠 …… L2, P31
角越　和也 …… P119
角谷　均 ……L21
清和　恵美子 …… P118
関　宏子 ……P53
外間　進悟 ……L21
薗田　晃弘 ……P42

た行

太　虎林 …… P27, P35
高井　朋代 …… P8
高木　健 ……P95
高澤　信明 ……L25
高杉　憲司 …… P127
高野　等覚 …… P3
高橋　征三 ……P114, P117
髙橋　貴文 ……P84
高橋　栄夫 …… P3, P32, P124
高橋　正 …… P101
高橋　雅人 ……P127, P132
高橋　塁 ……P82
高松　大郊 …… P107
高屋　展宏 …… P111
滝谷　重治 …… P5
竹内　和久 ……P114, P117
竹内　健 …… P6
竹内　恒 …… P3, P32
竹内　誠 ……P38
竹腰　清乃理 …… L24, P65, P66, P67, P71
P78, P81, P89, P106
P125, P130, P131
武田　和行 …… L24, P66, P67, P71
P89, P130
武田　光広 ……L16, P1
田島　可奈 ……P79
田代　充 ……P62
田制　侑悟 ……P64
立和名　博昭 ……P75
楯　真一 ……P43
伊達　康博 ……P85, P113, P115
P116, P133, P135
田中　篤史 ……P82
田中　孝 …… P48, P118
田中　智子 ……P98, P99
田中　佑斗 …… P132
田中　好幸 ……L17
田中　良二 …… P132
谷生　道一 ……P19
田巻　初 ……P77
玉田　大輝 …… P110
玉利　佑 ……P43

丹所　正孝 ……P87
辻　暁 …… P76, P79
辻　成悟 …… P132
辻　辰一朗 ……P42
辻下　英樹 ……P12
辻戸　正彦 ……P61
津田　栄 ……P11
津田　正史 …… P45, P46
津田　雅之 …… P45, P46
土川　博史 …… L1, P72
土屋　祐輔 ……P42
堤　遊 …… P122
坪井　裕理 ……P113, P116
津本　浩平 …… P4
出村　誠 ……P5, P7, P29, P30, P77
寺内　勉 ……L16, P1
寺沢　宏明 …… P18, P42, P134, P136
寺島　純平 ……L25
寺島　裕也 …… P18, P42
天野　剛志 …… P21, P25
土井　崇嗣 ……P78
遠田　悦子 …… P18, P42
徳永　裕二 ……P32
戸田　繁美 …… P104
戸田　充 …… P131
栃尾　豪人 ……L21
戸所　泰人 …… P39, P75
利根川　健 ……P27

な行

内藤　晶 …… P6, P64, P76, P79
中尾　朋喜 …… P122
中川　泰男 …… L1
中川　優 ……P78
中込　秀樹 …… P127
中澤　靖元 …… L2
永田　恭介 ……P39
長土居　有隆 …… P39, P75
中村　彰夫 …… P101
中村　紗里 ……P15
中村　敬 ……P30
仲村　高志 …… P110
中山　潤一 …… P13, P15, P33
鍋島　裕子 ……P49
ナムスライ　ジャブクラントゥス …… P6
成相　裕之 …… P60, P61
西川　尚之 …… P128
西川　大英 ……P79
西田　雅一 …… P96, P98, P99
西野　明理沙 …… P5
西宮　佳志 ……P11
西村　栄作 ……P54
西村　勝之 …… P19, P74, P87
西村　伸 ……P93
西村　千秋 ……L18
西村　善文 ……P13, P15, P17, P33, P39, P75
西山　文之 …… P128
西山　裕介 ……P74
野田　泰斗 …… L24, P66, P81, P89
P130, P131

は行

橋本　康博 …… IL10
長谷　隆司 …… P127
長谷部　亨 ……P63
秦　弘一郎 …… P104
畑　慶明 ……P92
服部　峰之 ……P70
服部　良一 …… P24, P47
濱田　京子 ……P13
濱田　大三 ……P25
浜津　順平 …… P22, P48, P118
早崎　智之 …… P103
林　こころ ……P73
林　繁信 ……P97
原田　慶恵 ……L21
原田　竜介 …… P104
春木　健作 ……P63
春田　佳一郎 ……L17
晴被　貴洋 ……P22
日隈　達也 ……P18
平沖　敏文 ……P83

平金　真 …… P134
平川　悟 …… P103
平林　淳 …… P23
廣明　秀一 …… P21, P25
廣田　洋 …… P6
深田　はるみ …… P24
福井　健二 …… P8
福士　江里 …… P46
福島　知宏 …… P105
福地　将志 …… P66
福西　快文 …… P124
藤江　正樹 …… P83
藤岡　耕治 …… P131
藤田　将史 …… P69
藤田　大士 …… P55
藤田　誠 …… P55
藤戸　輝昭 …… P64
藤吉　好則 …… P25
藤原　敏道 …… P24, P47, P73, P77, P123
藤原　広匡 …… P93
藤原　正子 …… P114, P117
降旗　一夫 …… P62
古板　恭子 …… P24, P47
古川　利博 …… P122
古川　諒一 …… P56
逸見　光 …… P23, P27
星野　玲緒奈 …… P85
堀井　文敬 …… P82
堀内　健 …… P52
堀毛　悟史 …… P105
堀籠　美也子 …… P79
本多　尚 …… P103

ま行

前川　英己 …… P101
前崎　綾子 …… P41
前田　史郎 …… P95
前田　秀明 …… P127, P132
前田　正洋 …… P12
前野　覚大 …… P26, P37
真壁　幸樹 …… P30
牧　秀志 …… P58, P60, P61
増田　裕一 …… P81
松尾　真嗣 …… P81
松島　綱治 …… P18, P42
松田　裕生 …… P52
松永　達弥 …… P125
松原　康史 …… P51
松森　信明 …… L1, P72
丸山　正 …… P116
丸吉　京介 …… P80
萬濃　香穂 …… P109
三浦　愛 …… P11
三上　真一 …… P35
三木　恒久 …… P98
三島　正規 …… L3, P22, P41, P48
P118, P119, P121
水口　峰之 …… P49
水島　良太 …… P8
水野　敬 …… L24, P81, P125, P131
水野　元博 …… P68, P94, P100
水畑　穣 …… P58, P60, P61
宮佐　亮太 …… P76
宮崎　健介 …… P41
宮澤　健太 …… L2
宮沢－大浪　真由美 …… P3
宮ノ入　洋平 …… P1
宮脇　仁 …… P104
三好　理子 …… P88
三輪　優子 …… P88
閔　庚薫 …… IL8
村井　元気 …… P17
村上　雅代 …… P129
村上　美和 …… L25, P106, P107
村田　道雄 …… L1, P72
最上　祐貴 …… P65
持田　勲 …… P104
森　重之 …… L21
森　正之 …… P38
森脇　義仁 …… P39, P75
茂呂　ふみか …… P126

や行

八木　正典 …… L18
矢木　真穂 …… P20, P55
矢澤　宏次 …… P74
矢澤　道生 …… L19
安岡　宏 …… P92
安田　智一 …… P72
谷中　冴子 …… P4
柳澤　吉紀 …… P127
山内　一夫 …… L26
山口　拓実 …… P59
山口　敏幸 …… P72
山口　秀幸 …… IL7
山口　洋一 …… P102
山口　芳樹 …… P53
山崎　太一 …… P44, P129
山崎　俊夫 …… P127
山崎　俊正 …… P31
山瀬　利博 …… P87
山田　哲司 …… P61
山田　哲也 …… P69
山根　知明 …… P112
山本　晃広 …… P119
山本　さよこ …… P59
山本　泰彦 …… P27, P35
柚原　光佑 …… P5
尹　聖昊 …… P104
横田　浩章 …… L21
横山　茂之 …… P37
横山　順 …… P34
横山　卓也 …… P5
吉川　浩史 …… P69
葭田　征司 …… P85, P135
吉田　尊雄 …… P116
吉永　壮佐 …… P18, P42
吉成　洋祐 …… L21
吉正　泰 …… P55
吉水　広明 …… P108, P109

ら行

李　映昊 …… P8

わ行

脇坂　朝人 …… P67
和田　昭盛 …… P79
渡辺　太二 …… P57
渡邊　ひかり …… P6
渡邉　英宏 …… P111

主　催：日本核磁気共鳴学会

共　催：日本生物物理学会
日本農芸化学会
日本蛋白質科学会
日本磁気共鳴医学会
日本生化学会
日本材料科学会
高分子学会

協　賛：日本物理学会
日本分析化学会

後　援：日本分子生物学会

協賛企業（五十音順）

アジレント・テクノロジー株式会社
SIサイエンス株式会社
株式会社　エムアールテクノロジー
株式会社エルエイシステムズ
オザワ科学株式会社
(株)JEOL RESONANCE
株式会社シゲミ
セティ株式会社
株式会社セルフリーサイエンス
大陽日酸株式会社
株式会社ニッピ
ブルカー・バイオスピン株式会社
株式会社フレックス
独立行政法人理化学研究所
理科研株式会社
Wiley

謝　辞

以下のご支援に、お礼申し上げます。

本討論会の開催にあたり、公益財団法人　大幸財団より助成を受けました。

(株)JEOL RESONANCEより、JEOL RESONANCE賞を設置いただきました。

若手ポスター賞賞金の一部はSuraj Manrao Student Travel Science Fundよりご援助頂きました。

（無断で複製・転載を禁じます）
Copyright 2012 The Nuclear Magnetic Resonance Society of Japan

2012年10月22日発行
Published on October 22, 2012

第51回NMR討論会

会　期：2012年11月8日（木），9日（金），10日（土）
November 8(Thu)-10(Sat), 2012

会　場：ウインクあいち　WINC HALL
WINC HALL, WINC AICHI
〒450-0002　愛知県名古屋市中村区名駅4-4-38

世話人：加藤　晃一（自然科学研究機構）

編集・発行：51ST 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：nmr51@kuba.jp

印刷所：福々印刷株式会社
〒113-0033　東京都文京区本郷2-5-2
TEL：03-3812-6514　FAX：03-3812-9338