

The 52nd Annual Meeting of The Nuclear Magnetic Resonance Society of Japan

講演要旨集

Abstracts

会期: **2013年11月12日(火),13日(水),14日(木)** November 12(Tue)-14(Thu), 2013

会場: 石川県立音楽堂 ISHIKAWA ONGAKUDO 〒920-0856 石川県金沢市昭和町20-1

主 催:日本核磁気共鳴学会

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

第52回NMR討論会 運営委員会

 水野
 元博(金沢大学) [委員長]

 大木
 進野(北陸先端科学技術大学院大学)

 前田
 史郎(福井大学)

 水口
 峰之(富山大学)

 井田
 朋智(金沢大学)

 大橋竜太郎(金沢大学)

会場(石川県立音楽堂)への交通案内



石川県立音楽堂

邦楽ホール・交流ホール

〒920-0856 石川県金沢市昭和町20-1

電車をご利用の場合

JR金沢駅東口より徒歩1分。

お車をご利用の場合

音楽堂専用駐車場は地下2階にあり152台まで駐車できます。音楽堂と金沢 全日空ホテルとの間の道路からお入りください。 〈普通駐車料〉 入場料1回につき1時間以内 …… 400円 1時間を超える場合は、30分までごとに……200円 午後11時を超えて翌日の7時までの間……1,000円

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

会場の案内図

◆2F邦楽ホール:口頭発表会場、チュートリアルコース会場、総会会場、ウェルカムランチ ◆地下1F交流ホール:ポスター発表会場、プレゼンコーナー、展示ブース、 インターネットコーナー、休憩所

2F 会場図



1F会場図



地下1F会場図



ポスター・展示会場詳細図

場 所:石川県立音楽堂 地下1F交流ホール

ポスター発表会場、プレゼンコーナー、展示ブース、インターネットコーナー、休憩所



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

懇親会会場案内図



金沢都ホテル

〒920-0852 石川県金沢市此花町6-10 TEL: 076-261-2111

開始日時:11月13日(水)19:00 ~ 会 場:金沢都ホテル 7階 鳳凰の間

*詳細は会場ホームページ (http://www.miyakohotels.ne.jp/kanazawa/) 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

\bigcirc 受 付

受付は石川県立音楽堂1F正面口に設けます。

- 受付時間:11月12日(火) 8:30~18:00
 - 11月13日 (水) $8:30 \sim 18:00$
 - 11月14日(木) 8:30~16:30
- ・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52回NMR討論会ホームページ

(http://www.nmrj.jp/NMR2013/) 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。

◇ウェルカムランチ整理券の配布について

ウェルカムランチの参加には整理券が必要となります。整理券は、当日の8:30より、受付にて配布 いたします。

2. 会場内のサービス・施設

◇クローク

石川県立音楽堂1F邦楽ホールエントランス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12日(火) 8:30~19:00 11月13日(水) 8:30~18:50 11月14日(木) 8:30~18:10 (*講演が延びた場合の終了時間は、最終講演終了の30分後とします。)

◇昼 食

石川県立音楽堂周辺に、レストランが複数あります。

◇インターネットコーナー

地下1F交流ホール内に無線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。邦楽ホール内での飲食は(ウェルカムランチ以外)固く禁じられております。また、ポスターセッションのスペースでの飲食も禁止となっております。喫煙と飲食は所定の場所でお願いします。御協力よろしくお願いします。

◇携帯電話

口頭発表会場(邦楽ホール)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 〒920-0856 石川県金沢市昭和町20-1 石川県立音楽堂 1F正面口

◇会期外

52ndNMR 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:nmr52@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、邦楽ホール内の「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、講演時間終了後には 会議や懇親会などが予定されております。質疑応答などにおいてイニシアティブをとってい ただき、終了予定時間を厳守するようお願いします。

◇講演者の方へ

招待講演、一般講演および若手ポスター賞受賞講演の講演方法:液晶プロジェクターを用いたプレ ゼンテーションのみとなります。講演に使用するコンピュータは各自で持参してください。 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、一般講演および若手ポスター賞受賞講演の受付:講演前の休憩時間までに、邦楽ホール 内の「PC受付」に講演に使用するコンピュータを持参してください。

講演時間:進行は座長に一任されています。持ち時間は特別講演40分、招待講演(海外)40分、招待 講演(国内)35分、一般講演20分、ベルの鳴動時刻は以下の通りです。

	一鈴	二鈴 (発表終了)	三鈴 (質疑終了)
特別講演	35分	40分	_
招待講演 (海外)	30分	35分	40分
招待講演 (国内)	25分	30分	35分
一般講演(日本語または英語)	13分	15分	20分

※特別講演には質疑の時間はありません。

※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いただく予定です。

◇ポスター発表の方へ

作成要項:<u>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</u> を用いてください。タイトル、名前、所属については、英語と日本語を併記してください。発表代 表者の氏名には、左肩に小さな○印を付けてください。3m離れた位置からでも、十分に読める文字 の大きさを用いてください。図や表もできるだけ大きくしてください。

ポスターパネルサイズは縦210 cm×横90 cmです。左上隅20 cm四方のスペースに演題番号を表示し てあります。床から30 cm程度のスペースを空けておくことを推奨します。画鋲は各ポスターパネ ルに用意します。

展示場所:ポスター会場は地下1F交流ホールです。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12日(火) 9:00~12:00の間に掲示し、11月14日(木)14:30~16:20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12日 (火) 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14日 (木) 12:50 ~ 14:20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52回日本核磁気共鳴学会 総会開催通知

日 時:2013年11月12日(火) 12:05~12:35場 所:石川県立音楽堂 邦楽ホール(2F、口頭発表会場)

第52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11日 (月)18:00より	金沢都ホテル 5F 兼六の間
評議員会	11月12日 (火)18:55より	同上
新評議員会	11月13日 (水)12:00より	同上
新理事会	11月13日 (水)引き続いて	同上

◇いずれも、食事の用意があります。

チュートリアルコース

- 日 時:11月11日(月)/Nov. 11, Mon.
- 会 場:石川県立音楽堂(2F邦楽ホール)

(受付 1F邦楽ホール 〈※エスカレータ前、クロークの傍〉)

 $13:00 \sim 14:30$

「メチル基を通して巨大な分子を観る」

池上 貴久 先生 (大阪大学蛋白質研究所 准教授)

たとえTROSY-CRIPTなどの測定法を使っても、蛋白質主鎖のアミド基ではもはや観測できないよ うな大きな分子量を対象とすることに挑戦がなされている。その鍵はメチル基を観ることである。一 般的にメチル基は、その軸で速く回転し、さらに3つの¹Hスピンの化学シフト値が重なることのため に感度が他の基よりも高くなることはよく知られていた。近年、それに加えて交差相関の働きにより、 さらに横緩和が遅くなっていることも実証され、Methyl-TROSYの名で知られるようになった。この 現象を利用すると、巨大分子どうしの相互作用だけでなく、その側鎖のダイナミクスも分かり、また、 必ずしも帰属をしなくても、巨大な蛋白質のアロステリック効果に伴う構造変化なども追うことがで きるようになった。ここでは、それらの実験例とその原理について紹介したい。

14:45 ~ 16:15

「NMRおよびGIPAW計算を用いた有機EL、有機太陽電池の解析」

梶 弘典 先生(京都大学化学研究所教授)

NMRが、他の解析手法では得ることが困難なユニークかつ重要な情報を与えてくれることは、本学 会の皆様はよくご存知のことと思う。本チュートリアルでは、NMRを有機エレクトロルミネッセンス (有機EL)、有機太陽電池といった有機デバイスの解析に応用した例を紹介する。また、最近、分子間 相互作用を考慮した化学シフトの計算が可能となってきた。GIPAWと呼ばれるこの手法の応用例に関 しても紹介したい。

16:30 ~ 18:00

「NMRはいかに創られたか:7. フーリエ変換NMR」

寺尾 武彦 先生 (京都大学 名誉教授)

教科書では長年にわたって積み重ねられた多数の研究成果が系統的に整理され、簡潔に淡々と記述 されている。しかし、その行間には先人たちの汗と涙がにじみ、フィクションを超えるドラマが潜ん でいる。本講演では時代を画したNMRの方法論の研究にスポットを当て、どのような時代背景の下で どういう人物が何をきっかけに歴史的な発想を得たのか、またどんな困難に出くわしてそれをどう解 決して研究を完成させたかを人間的なエ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。今回はフーリエ変換NMRにつ いて話す予定である。

第52回 NMR討論会

The 52nd Annual Meeting of The Nuclear Magnetic Resonance Society of Japan

 会期: 2013年11月12日(火)~14日(木) November 12 (Tue)-14 (Thu), 2013
 会場: 石川県立音楽堂 邦楽ホール ISHIKAWA ONGAKUDO 〒920-0856 石川県金沢市昭和町20-1

English lecture

Poster Session

第1日目 11月12日(火) / Day 1 (Nov. 12, Tue)

$9:25 \sim 9:30$

開会の挨拶 朝倉 哲郎(日本核磁気共鳴学会会長)

Opening remarks: Tetsuo Asakura (President of The Nuclear Magnetic Resonance Society of Japan)

9:30 ~ 10:10

座長 林 繁信

L1 多量子カウンティング法を用いたリチウム電池正極材料の研究 Application of Multi-Quantum Counting NMR for Positive Electrode Materials of Lithium Ion Battery

○村上 美和¹, 最上 祐貴², 清水 俊介², 竹腰 清乃理², 荒井 創¹, 内本 喜晴³, 小久見 善八¹ (¹京都大学 産官学連携本部, ²京都大学大学院 理学研究科, ³京都大学大学院 人間・環境学 研究科)

L2 イオン伝導性配位高分子の開発と拡散NMR・固体NMRによる伝導機構の解明 Diffusion NMR and solid-state NMR study on fast ion conducting coordination polymers ○犬飼 宗弘¹, 堀毛 悟史^{2,3}, 上坪 祐介², 梅山 大樹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、³JST-さきがけ)

10:10 ~ 10:50

座長 西村 勝之

L3 GPIアンカー型蛋白質模倣分子の脂質二重膜存在下での固体NMR測定 Solid-state NMR Spectra of Pseudo GPI-anchored Protein in membranes under Magic Angle Spinning ○野村 薫,原田 英里砂,菅瀬 謙治,島本 啓子(サントリー生命科学財団 生物有機科学 研究所)

L4 ¹⁵N NMRによる環状イミドリン酸イオン群の互変異性のpH 依存性とプロトン伝導特性 pH dependence of Tautomerism Equilibria and Proton Conductivity of Various *Cyclo*-imidophosphate Anions by ¹⁵N NMR

○牧 秀志, 片岡 大亮, 水畑 穣 (神戸大学大学院 工学研究科)

10:50 ~ 11:00 休憩/Break

11:00 ~ 12:00

Chairperson: Hironori Kaji

L5 A Solid-state ¹⁷O NMR Study of Molecular Dynamics for Water in Organic Compounds O Kazuhiko Yamada¹, Shinji Yamada², Nodoka Sako², Kenzo Deguchi³, Tadashi Shimizu³ and Junji Watanabe¹ (¹Tokyo Institute of Technology, ²Ochanomizu University, ³National Institute for Materials Science)

L6 Quick measurement of ¹H solid-state NMR at very fast MAS Yue Qi Ye¹, Michal Maloň¹, Charlotte Martineau², Francis Taulelle², ○Yusuke Nishiyama¹ (¹JEOL RESONANCE Inc., ²University of Versailles) L7 The Paramagnetic Effects of Iron Ion in Nitrogen-Doped Carbon ORR Active Electrochemical Catalysts

○ Shigeki Kuroki¹, and Hideyuki Hara² (¹Department of Organic and Polymeric Materials, Tokyo Institute of Technology, ²Bruker Biospin Japan)

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 (ウェルカムランチ)

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 休憩/Break

15:30 ~ 16:05

座長 鈴木 榮一郎

 IL1 Invited Lecture 1 縮合系合成高分子の溶液 NMR構造解析 Structural analysis of condensation polymers using NMR
 〇松田 裕生¹, 菅沼 こと¹, 朝倉 哲郎^{2,3} (¹帝人株式会社 構造解析研究所, ²東京農工大学 工学部, ³分子科学研究所)

$16:05 \sim 16:40$

- 座長 浅野 敦志
- IL2 Invited Lecture 2 鉄鋼業における固体 NMR の活用 Application of solid-state NMR to steel industry ○金橋 康二(新日鐵住金株式会社 先端技術研究所)
- 16:40~16:55 休憩/Break

$16:55 \sim 17:30$

座長 水野 元博

- IL3 Invited Lecture 3 多孔性ソフト結晶材料の化学と応用 Chemistry and Application of Porous Soft Materials
 〇北川 進¹, 犬飼 宗弘¹, 堀毛 悟史^{2,3} (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, ³JST-さきがけ)
- $17:30 \sim 18:05$

座長 大木 進野

- II.4 Invited Lecture 4 質量選別した気相イオンのNMR分光法の開発 Development of NMR Spectroscopy for Mass-selected Molecular Ions ○冨宅 喜代一(神戸大学大学院理学研究科)
- 18:05 ~ 18:40

座長 池上 貴久

IL5 Invited Lecture 5

糖鎖の機能解明を目指したNMRアプローチ

NMR approaches for elucidating the functional roles of glycans

○加藤 晃一^{1,2,3,4} (¹自然科学研究機構分子科学研究所 岡崎統合バイオサイエンスセンター, ²名古屋市立大学大学院 薬学研究科,³お茶の水女子大学 糖鎖科学教育研究センター,⁴株式会社 グライエンス)

18:55 ~ 日本核磁気共鳴学会 評議員会 (新評議員は出席の必要はありません)

$9:00 \sim$	10:00
-------------	-------

Chairperson: Hiroaki Terasawa

L8 Development and application of the methodology to investigate wood biomass by solution NMR

Hideyasu Okamura^{1, 2}, Hiroshi Nishimura^{3, 2}, Yoshinori Imamura⁴, Yu Kozawa¹, Noritsugu Terashima⁴, Yasuyuki Matsushita⁴, Kazuhiko Fukushima⁴, Takashi Watanabe^{3, 2}, and O Masato Katahira^{1, 4} (¹Institute of Advanced Energy, Kyoto University, ²CREST, JST, ³Research Institute for Sustainable Humanosphere, Kyoto University, ⁴Graduate School of Bioagricultural Science, Nagoya University)

L9 Ligand-driven conformational changes of MurD characterized by paramagnetic NMR Tomohide Saio¹, Kenji Ogura¹, Hiroto Yamaguchi², Hideki Tsujishita², OFuyuhiko Inagaki¹ (¹Faculty of Advanced Life Science, Hokkaido University, ²Shionogi Innovation Center for Drug Discovery, Shionogi & Co., Ltd)

L10 Structure and dynamics of proteins based on the alignment tensors determined by TROSY

 \bigcirc Shin-ichi Tate^{1, 2} (¹Department of Mathematics and Life Sciences, Hiroshima University, ²Research Center for the Mathematics on Chromatin Live Dynamics (RcMcD))

10:00~10:10 休憩/Break

$10:10 \sim 11:10$

Chairperson: Naoki Asakawa

- L11 Dissolution mechanism of carbonate in silicate melts: Information from *ab initio* calculations and ¹³C NMR measurements OXianyu Xue and Masami Kanzaki (Institute for Study of the Earth's Interior, Okayama University)
- L12 Microwave Heating NMR Spectroscopy. Application to Liquid Crystalline Systems O Akira Naito¹, Yugo Tasei¹, Teruaki Fujito², and Izuru Kawamura¹ (¹Graduate School of Engineering, Yokohama National University, ²Probe Laboratory Inc.)

L13 Precise Structure of *Bombyx mori* Silk Fibroin before and after Spinning determined by Solid state NMR

Tetsuo Asakura^{1, 2}, \bigcirc Koji Yazawa^{1, 3}, Keiko Okushita⁴, Yu Suzuki¹, Yasumoto Nakazawa¹, Akihiro Aoki¹, Katsuyuki Nishimura², Yusuke Nishiyama³, Hironori Kaji⁵ (¹Department of Biotechnology, Tokyo University of Agriculture and Technology, ²Institute for Molecular Science, ³JEOL RESONANCE Inc., ⁴National Defense Academy of Japan, ⁵Institute for Chemical Research, Kyoto University)

11:10~11:20 Break/休憩

$11:20 \sim 12:00$

Chairperson: Kiyonori Takegoshi

IL6 Invited Lecture 6

Native Membrane Protein Structure in Lipid Bilayers Requires Solid State NMR Nabanita Das^{1, 2}, Dylan T. Murray^{1, 2}, Yimin Miao^{1, 3} and O Timothy A. Cross^{1, 2, 3} (¹National High Magnetic Field Lab, Florida State University, ²Institute of Molecular Biophysics, Florida State University, ³Department of Chemistry & Biochemistry, Florida State University)

$13:20 \sim 14:00$

Chairperson: Ichio Shimada

IL7 Invited Lecture 7

Environmentally-controlled protein/protein interactions: Insights provided by NMR into nature's switches

Fernando Correa¹, Victor Ocasio¹, Giomar Rivera-Cancel¹, Laura B. Motta-Mena¹, Yirui Guo¹, Thomas H. Scheuermann¹ and \bigcirc Kevin H. Gardner^{1, 2} (¹UT Southwestern Medical Center, ²CUNY Advanced Science Research Center)

14:00 ~ 14:40

Chairperson: Shin-ichi Tate

IL8 Invited Lecture 8 Folding dynamics of topologically knotted proteins O Shang-Te Danny Hsu (Institute of Biological Chemistry, Academia Sinica)

14:40~14:55 Break/休憩

$14:55 \sim 15:35$

Chairperson: Toshimichi Fujiwara

 IL9
 Invited Lecture 9

 Solid-state NMR Spectroscopy of Membrane Proteins
 O Stanley J. Opella (University of California, San Diego)

 $15:35 \sim 16:15$

Chairperson: Masatsune Kainosho

IL10 Invited Lecture 10

Enhancing Signal and Contrast in MRI with Long-Lived Hyperpolarization or Intermolecular Coherences

 \bigcirc Warren S. Warren (Departments of Chemistry, Radiology, Biomedical Engineering and Physics, Duke University)

16:15~16:30 Break/休憩

16:30 ~ 17:10

Chairperson: Yasuhiko Yamamoto

HL1 Honorary Lecture 1

Personal Reminiscences on Helical Polymers by NMR OToshifumi Hiraoki (Graduate School of Engineering, Hokkaido University)

$17:10 \sim 17:50$

Chairperson: Akira Naito

HL2 Honorary Lecture 2 Why can F_0F_1 ATPsynthase rotate? / F_0F_1 ATP合成酵素はなぜ回る? ○ Hideo Akutsu (Institute for Protein Research, Osaka University) $17:50 \sim 18:30$

Chairperson: Tetsuo Asakura

IL11 Invited Lecture 11

Nuclear Magnetic Resonance: A Powerful Tool for Elucidating the Interplay between Structure and Dynamics of Soft Matter

 \bigcirc Hans W. Spiess (Max-Planck-Institute for Polymer Research)

18:30~19:00 Break/移動・休憩

19:00 ~ Banquet/懇親会

第3日目 11月14日(木) / Day 3 (Nov. 14, Thu)

$9:00 \sim 9:40$

座長 木川 隆則

L14 高分子量蛋白質の立体構造解析に向けた新規SAILアミノ酸標識法の開発 New SAIL-NMR methods on structural analysis for large molecular protein

○宮ノ入 洋平¹, 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 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, ³SAILテクノロジーズ株式会社, ⁴大阪大学 蛋白質研究所)

L15 多剤耐性転写制御因子の運動性と薬剤認識機構のNMR解析 Dynamic drug recognition by multidrug-resistance transcriptional regulator ○竹内 恒¹, 嶋田 一夫²(¹産業技術総合研究所 創薬分子プロファイリング研究センター, ²東 京大学大学院 薬学系研究科)

9:40 ~ 10:20

座長 北原 亮

L16 天然変性タンパク質のNMRによる揺らぎ構造解析 Dynamic structure of the intrinsically disordered proteins monitored by NMR 岡崎 萌花¹, 大堀 由佳¹, 幸元 雅也¹, 渡部 暁², 栃尾 尚哉²,○西村 千秋¹(¹帝京平成 大学 薬学部,²理化学研究所)

L17 抗体創薬への貢献を目指す NMR解析 NMR Analysis Aiming for Contribution to Antibody Therapeutics 鳥澤 拓也 (中外製薬株式会社 研究本部)

10:20~10:30 休憩/Break

10:30 ~ 11:10

座長 片平 正人

L18 ヘムオキシゲナーゼ-2の天然変性領域による活性制御機構の解明

Regulation of heme oxygenase-2 activity elucidated by the analysis of structural dynamics 〇古川 亜矢子¹,山本 竜也^{2,3},末松 誠^{1,2,3}, 菅瀬 謙治¹(¹サントリー生命科学財団 生物 有機科学研究所,²慶応義塾大学 医学部,³JST ERATO)

L19 符号理論を応用した新規の安定同位体標識戦略 Novel Stable Isotope Labeling Strategy Using the Coding Theory

〇葛西 卓磨¹,小柴 生造^{1,2},横山 順^{1,3,4},木川 隆則^{1,3,5} (¹理化学研究所 生命システム研 究センター,²東北大学 東北メディカル・メガバンク機構,³理化学研究所イノベーション推進 センター,⁴大陽日酸株式会社 つくば研究所,⁵東京工業大学 総合理工学研究科)

11:10 ~ 11:50

座長 伊藤 隆

L20 ヒト脳内の高精度 *in vivo*¹H スペクトロスコピー絶対定量化に関する検討 Error and Correction in Absolute Quantitation of Metabolites *in vivo* Using Water as Internal Reference

○渡邉 英宏, 高屋 展宏 (国立環境研究所 環境計測研究センター)

L21 ヒト in vivo 脳における鉄分布画像

In vivo iron mapping in human brain

○三森 文行,渡邉 英宏,高屋 展宏(国立環境研究所環境計測研究センター)

- 11:50 ~ 12:50 昼食/Lunch
- 12:50 ~ 14:20 ポスターセッション (奇数番号) Poster Session (odd numbers)
- 14:20~14:30 休憩/Break
- 14:30 ~ 16:10 若手ポスター賞受賞講演 Short talks by Young Scientists Poster Award Winners 座長 河合 剛太,藤原 敏道
- 16:10~16:20 休憩/Break
- 16:20 ~ 17:00
- 座長 出村 誠
- L22 二次元ラプラス逆変換利用した緩和と拡散による材料解析 Material analysis based on NMR relaxation and diffusion using Laplace-Laplace inversion 〇大窪 貴洋, 岩舘 泰彦(千葉大学大学院工学研究科)
- L23 光励起三重項電子スピンを用いたDNPによる室温下での偏極率34%の達成 Room-temperature hyperpolarization of nuclear spins with DNP using photo-excited triplet electron spin

○立石 健一郎¹, 根来 誠², 西田 辰介³, 香川 晃徳², 森田 靖³, 北川 勝浩²(¹理化学研 究所 仁科加速器研究センター, ²大阪大学大学院 基礎工学研究科, ³大阪大学大学院 理学研究科)

- $17:00 \sim 17:40$
- 座長 武田 和行
- L24 Al-MCM-41中の骨格内6配位Alの構造変化 Structure Change of Framework Octahedral Al species in Al-MCM-41
 ○髙橋 利和¹, 岩浪 克之², 林 繁信³, 安田 弘之¹(¹産業技術総合研究所 触媒化学融合研究 センター,²茨城工業高等専門学校 物質工学科,³産業技術総合研究所 計測フロンティア研究部門)
- L25 トリメチルホスフィンオキシドを用いたZSM-5型ゼオライトの酸性質の評価 Evaluation of Acid Properties of ZSM-5 Type Zeolite Probed by Trimethylphosphine Oxide 〇林 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)

 $17:40 \sim 17:45$

閉会の挨拶 水野 元博 (第52回NMR討論会世話人代表) Closing Remarks: Motohiro Mizuno (Organizer of the 52nd Annual Meeting of The Nuclear Magnetic Resonance Society of Japan)

一般ポスター発表/Poster presentation

偶数番号:1日目(2013/11/12)、奇数番号:3日目(2013/11/14) ¥:若手ポスター賞Ⅰ、W:若手ポスター賞Ⅱ

P1 水産資源循環再利用を目指した複合微生物系代謝反応場の評価技術構築 Evaluation methods for metabolic process of metabolic community for sustainable re-utilization of marine resources

> ○星野 玲緒奈¹, 山澤 哲^{1,2}, 葭田 征司¹, 伊達 康博^{1,3}, 菊地 淳^{1,3,4,5} (¹横浜市立大学大 学院 生命ナノシステム科学研究科, ²鹿島技術研究所, ³理化学研究所 環境資源科学研究センター, 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)

- P2 図 2-置換環状 β ジケトンのプロトン互変異性
 Proton tautomerism of 2-substituted cyclic β-diketones
 〇知名 秀泰, 岡田 豊(立命館大学 生命科学部)
- P3 不均一サンプリングを用いた多次元 NMR による低分子化合物の解析 Analysis of Small Molecules by Multiple Dimensional NMR Relying on Non-Uniform Sampling
 ○片平 律子¹, 佐藤 -², 児嶋 長次郎¹, 池上 貴久¹, 藤原 敏道¹(¹大阪大学 蛋白質研 究所,²ブルカー・バイオスピン株式会社)
- P4 図 多変量解析を用いたNMRによる食品成分の分析 Component Analysis of Food using Multivariate Statistics by NMR
 ○久保田 通代¹,細谷 孝博²,熊澤 茂則²(¹静岡県立大学大学院 薬食生命科学総合学府,²静岡県立大学大学院 食品栄養環境科学研究院)
- P5 不均一サンプリングで測定したポリプロピレンの3次元TOCSY-HSQCスペクトル Non-Uniformly Sampled Three-Dimensional TOCSY-HSQC Spectra of Polypropylene ○松原 康史(日本ポリケム株式会社 研究開発部)
- P6 図 カテキン誘導体の水溶性向上効果の検討 Study of water solubility improvement effect of catechin derivatives
 ○梅原 将洋,柳江 高次,斎 政彦,伊藤 建比古(森永製菓株式会社研究所 健康科学研究 センター)
- P7 Multi-phase NMRによる木質バイオマスの溶液・ゲル・固体状態の比較解析 Comparative Analysis of Woody-Biomass in Solution, Gel, and Solid State Using Multi-phase NMR
 ○小松 功典^{1,2}, 菊地 淳^{1,2,3,4} (¹理化学研究所 環境資源科学研究センター, ²横浜市立大学大 学院 生命医科学研究科, 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
 - キラルシフト試薬による光学活性化合物の分離
- P8 № キラルシフト試薬による光学活性化合物の分離
 NMR Separation of Enantiomer Menthol Using a Chiral Shift Reagent
 ○大田 陽介,新谷 恭兵,後々田 忠夫,則武 智哉(株式会社UBE科学分析センター)
- P9 NMR によるシアロ糖鎖の緩和機構とダイナミクスの研究 NMR study on relaxation mechanism and dynamics of sialo-glycans
 ○鵜澤 洵^{1,2}, 関 宏子², 桝 飛雄真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 共用機器センター)

- P10 図 NMRスペクトルの多変量解析によるアクリル系共重合体の一次構造解析 Analysis of Primary Structures of Methacrylate Copolymers and Terpolymers by Multivariate Analysis of ¹³C NMR Spectra
 ○百瀬 陽^{1,2},前田 智也²,直野 辰哉^{1,2},浅川 聖子²,坂尾 竜一²,押村 美幸²,平野 朋広²,右手 浩一²(¹三菱レイヨン株式会社,²徳島大学大学院 ソシオテクノサイエンス研究部)
- P11 ¹H NMRによるアミノ酸類の純度測定
 Purity determination of amino acids by ¹H NMR
 ○斎藤 直樹, 齋藤 剛, 山崎 太一, 加藤 尚志, 山中 典子, 井原 俊英(産業技術総合研 究所 計測標準研究部門)
- P12 図 ³¹P NMR を用いたりん酸基含有有機化合物の定量分析法の検討 Study of quantitative analysis method for organophosphoric acid compounds with ³¹P NMR ○山崎 太一,齋藤 剛,井原 俊英,沼田 雅彦(産業技術総合研究所計測標準研究部門)
- P13
 ¹³C NMR化学シフト値を用いた構造推定: CAST/CNMRシステムの新しい機能と応用 Structure Elucidation from ¹³C NMR Chemical Shifts: New Algorithm to CAST/CNMR System and Its Application
 ○越野 広雪¹,小市 俊悟²,佐藤 寛子³(¹理化学研究所,²南山大学,³国立情報学研究所)
- P14 図 ポリオレフィンの溶液¹³C NMRにおけるピーク強度の定量性 Quantitative Evaluation of ¹³C NMR Peak Intensity for Polyolefin Solution ○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)
- P15超好熱性古細菌由来のオリゴ糖転酵素の基質となるオリゴ糖の化学構造決定と
相互作用解析
Structural elucidation of N-linked oligosaccharides of hyperthermophilic archaea and
Methyl-TROSY spectroscopy of the archaeal oligosaccharyltransferase
○藤浪 大輔,神田 大輔 (九州大学 生体防御医学研究所)
- P16 奈良朝における「うま味調味料: 楡皮」のNMR研究
 "Umami Seasonings: Elm Skin" in the Imperial Court of the Nara Period of Japan as Studied by Nuclear Magnetic Resonance
 鈴木 榮一郎, 伊藤 萌美, 小澤 真一, 〇水越 利巳, 近藤 高史, 宮野 博 (味の素株式会 社イノベーション研究所)
- P17 分子進化工学的手法によるミミズ由来R型レクチン改変体の シアル酸糖結合メカニズムに関するNMR解析
 NMR analysis of a novel sialic acid-binding lectin mutant from the C-terminal domain of an R-type lectin from earthworm
 ○逸見 光¹、久野 敦²、海野 幸子²、平林 淳³(¹農業・食品産業技術総合研究機構 食品総

〇逸見 光, 八野 靫, 海野 辛子, 平林 淳。(「晨業・食品産業技術総合研究機構 食品総 合研究所, ²産業技術総合研究所 糖鎖医工学研究センター, ³産業技術総合研究所 幹細胞工学 研究センター)

 P18 抗ウイルス因子 APOBEC3G の DNA 認識機構の解明 ~ NMR実時間計測法によるアプローチ~ Elucidation of the DNA recognition mechanism of the antiviral factor APOBEC3G as evaluated with the NMR real-time monitoring method ○神庭 圭佑^{1,2}, 永田 崇^{1,2}, 片平 正人^{1,2} (¹京都大学 エネルギー理工学研究所,²京都大学大 学院 エネルギー科学研究科)

P19 LINE RNA逆転写酵素認識部位の立体構造と機能

Structure and function of reverse transcriptase recognition site of LINE RNA

○大津 舞菜¹, 野呂瀨 直¹, 新井 直¹, 寺尾 亮¹, 梶川 正樹², 岡田 典弘³, 河合 剛太¹ (¹千葉工業大学工学部 生命環境科学科, ²東京工業大学大学院 生命理工学研究科, ³台湾国立成 功大学)

P20 MAPキナーゼによりリン酸化される RNA結合タンパク質 Nrd1の構造解析

Structural studies of RNA-binding protein Nrd1, a MAPK target RNA binding protein

○小林 彩保¹, 佐藤 亮介², 藤原 俊伸³, 伊藤 隆¹, 杉浦 麗子⁴, 三島 正規¹(¹首都大学 東京大学院 理工学研究科,²微生物化学研究所 基盤生物研究部,³名古屋市立大学大学院 薬学研 究科,⁴近畿大学 薬学部)

P21 分子混雑環境における蛋白質のNMR緩和解析

NMR relaxation analysis of the protein under macromolecular crowding environment

○岡村 英保¹, 栃尾 尚哉², 杉山 修世^{1,2}, 渡部 暁^{1,2}, フェイグ マイケル^{1,3}, 杉田 有 治^{1,4,5}, 木川 隆則^{1,2,6,7} (¹理化学研究所 生命システム研究センター, ²理化学研究所 生命分子 システム基盤研究領域, ³ミシガン州立大学, ⁴理化学研究所 杉田理論分子科学研究室, ⁵理化学 研究所 計算科学研究機構, ⁶理化学研究所 イノベーション推進センター, ⁷東京工業大学大学院 総合理工学研究科)

P22 マルチドメインタンパク質 Protein kinase Cの構造解析の試み

Attempt to determine the structure of a multi-domain protein, protein kinase C

○金場 哲平¹, 矢巻 菜央¹, 秋吉 克昂¹, 前崎 綾子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奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科)

P23 Interface Dynamics Studies in Protein-Ligand Complexes with the Aid of SAIL and High-Pressure NMR Techniques

○楊 淳竣¹, 武田 光広¹, 宮ノ入 洋平¹, 寺内 勉², 甲斐荘 正恒^{1,3} (¹名古屋大学大学院 理学研究科, ²SAILテクノロジーズ株式会社, ³首都大学東京大学院 理工学研究科)

P24 ミオグロビンにおけるヘムと軸配位子ヒスチジンの電子的相互作用を介した 外部配位子識別機構の解明

Elucidation of Mechanism Responsible for Exogenous Ligand Discrimination through Electronic Interaction between Heme and Proximal Histidine Residue in Myoglobin

○西村 龍¹, 柴田 友和¹, 鈴木 秋弘², 根矢 三郎³, 山本 泰彦¹ (¹筑波大学大学院 数理 物質科学研究科, ²長岡高専物質工学科, ³千葉大学大学院 薬学研究院)

P25ヒト細胞内におけるユビキチンタンパク質の構造安定性解析
Ubiquitin folding stability in human cells

○猪股 晃介¹, 杤尾 豪人², 白川 昌宏² (¹理化学研究所 生命システム研究センター, ²京都 大学大学院 工学研究科)

P26 1 UBIQUITIN RECOGNITION IN SELECTIVE AUTOPHAGY

○Erik Walinda¹, 森本 大智¹, 小沼 剛², 菅瀬 謙治², 杤尾 豪人¹, 白川 昌宏¹(¹京都大 学大学院 工学研究科,²サントリー生命科学財団)

P27 NMR analysis of intramolecular allostery in the PLC- δ 1 PH domain 〇谷生 道一,西村 勝之 (分子科学研究所)

P28 NMRによるp47^{phox} PXドメインとホスファチジルイノシトールの相互作用の解析 NMR analysis of Interaction between p47^{phox} PX domain and phosphatidylinositol ○小椋 賢治¹,小橋川 敬博¹,斎尾 智英¹,横川 真梨子¹,久米田 博之¹,天野 伸治郎¹, 吉田 直樹¹,住本 英樹²,稲垣 冬彦¹(¹北海道大学 先端生命科学研究院,²九州大学 医学部)

P29 遠隔アミノ酸残基の置換による好熱性水素細菌シトクロム c₅₅₂の 軸配位子メチオニン側鎖硫黄原子の不斉反転と機能への影響 Inversion of the Stereochemistry around the Sulfur Atom of the Axial Methionine Side Chain through Replacement of a Remote Amino Acid Residue in *Hydrogenobacter thermophilus* Cytochrome c₅₅₂ and Its Functional Consequences

柴田 友和¹, 太 虎林^{1,*}, 利根川 健¹, 逸見 光², 小林 長夫³, ○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 食品総合研究所, ³東北大学大 学院 理学研究科, ^{*}現所属:奈良先端科学技術大学院大学 物質創成科学研究科)

P30 高圧力 NMR法によるユビキチンの準安定状態 N₂の立体構造解析: Q41N 変異体、2500 気圧 High Pressure NMR Reveals Solution Structure of Alternatively Folded State of Ubiquitin: Q41N Variant at 2500 bar

北沢 創一郎¹, 亀田 倫史², 矢木 – 内海 真穂^{3,4}, Nicola Baxter⁵, 加藤 晃一^{3,4}, Mike P. Williamson⁵, 〇北原 亮¹ (¹立命館大学 薬学部, ²産業技術総合研究所 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名古屋市立大学大学院 薬学研究科, ⁵シェフィー ルド大学 分子生物学・バイオテクノロジー学部)

P31 高圧力NMR法によるジヒドロ葉酸還元酵素の構造揺らぎ研究

Conformational fluctuation of dihydrofolate reductase mutant by using high pressure NMR spectroscopy: D27E mutant

○北沢 創一郎¹, 小林 直弘², 井上 沙紀¹, 大前 英司³, 北原 亮¹(¹立命館大学 薬学部薬 学科, ²大阪大学 蛋白質研究所, ³広島大学大学院 理学研究科)

P32 常磁性緩和効果を用いたタンパク質の溶液構造解析法の開発

A method for determination of high-resolution protein solution structures using paramagnetic relaxation enhancement

○古板 恭子¹, 片岡 沙織¹, 小林 直宏¹, 村山 真一², 建部 恒², 塩崎 一裕², 藤原 敏 道¹, 児嶋 長次郎¹(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 ス研究所)

P33 蛋白質リジン残基側鎖アミノ基の水素交換速度の解析 NMR hydrogen exchange study for side-chain amino groups of lysine residues in proteins 〇武田 光広¹, 寺内 勉², 甲斐荘 正恒^{1,3} (¹名古屋大学大学院理学研究科 構造生物学研究セン ター、²SAILテクノロジーズ株式会社、³首都大学東京 戦略研究センター)

P34 YI NMRを用いたヒト主要組織適合複合体の動的なペプチド認識及び構造維持機構の解明 Dynamic Regulation of Peptide Recognition and Stabilization of a Human Leukocyte Antigen Revealed by NMR

○谷中 冴子¹, 上野 貴将², Shi Yi^{3,4}, Qi Jianxun^{3,4}, Gao George^{3,4}, 津本 浩平^{1,5,6}, 菅瀬 謙 治⁷(¹東京大学大学院 新領域創成科学研究科, ²熊本大学 エイズ学研究センター, ³Beijing Institute of Life Science · CAS, ⁴Institute of Microbiolog · CAS, ⁵東京大学大学院 工学系研究科, ⁶東京大学 医科学研究所, ⁷サントリー生命科学財団 生物有機科学研究所)

P35 PDZドメイン-低分子化合物相互作用に重要なアミノ酸残基の同定 Identification of important amino acid residues for the interaction between PDZ domain and small molecule

○天野 剛志¹, 合田 名都子¹, 岩谷 奈央子¹, 木下 賢吾^{2,3}, 太田 元規⁴, 廣明 秀一¹ (¹名古屋大学大学院 創薬科学研究科, ²東北大学大学院 情報科学研究科, ³東北大学 加齢医学研 究所, ⁴名古屋大学大学院 情報科学研究科)

P36 M アミロイドベータペプチドのオリゴマー形成機構の解明 Analyses of the oligomerization mechanism of amyloid beta peptides 〇田中 愛弓¹, 岩本 成人¹, 斉藤 貴志², 山口 瞳¹, 吉永 壮佐¹, 河野 俊之³, 西道 隆 臣², 寺沢 宏明¹(¹熊本大学大学院 生命科学研究部, ²理化学研究所 脳科学総合研究センター, ³北里大学医学部) 抗炎症薬の創出を目的とするケモカイン受容体制御因子FROUNT P37 - 制御化合物間の相互作用解析 Analyses of the interaction between the regulating factor of the chemokine receptor FROUNT and an anti-inflammatory compound ○石田 規人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) P38 M メチル化リジンの化学シフトと塩橋との相関に関する理論的・実験的研究 Theoretical and experimental study about the correlation between the chemical shift of methylated lysine and salt bridge ○服部 良一¹, Jakub Sebera², Vladimír Sychrovský², 古板 恭子¹, 大木 出³, 池上 貴久¹, 藤原 敏道¹, 児嶋 長次郎¹ (¹大阪大学 蛋白質研究所, ²チェコ科学アカデミー 有機化学・生 化学研究所、³奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科) P39 IVV法により取得した高選択的MDM2結合ペプチドによる MDM2: p53結合阻害の構造基盤 Structural basis for the inhibition of MDM2: p53 interaction by highly selective MDM2-binding peptide obtained with IVV method ○永田 崇^{1,2}, 白川 貴恵³, 小林 直宏², 始平堂 弘和³, 片平 正人^{1,2}, 堀澤 健一³, 土 居 信英³,柳川 弘志³ (¹京都大学 エネルギー理工学研究所,²京都大学大学院 エネルギー科 学研究科, ³慶應大学大学院 理工学研究科) P40 🔞 TRAF6を標的としたタンパク質間相互作用阻害剤の探索および構造解析 Development and Structural Analysis of a Protein-protein Interaction Inhibitor **Targeting TRAF6** ○守谷 潤¹,竹内 恒²,田井 健二¹,米田 直樹¹,新井 謙三³,小林 直樹⁴,福西 快文², 井上 篤¹,木原 美穂¹,村上 拓己⁴,千葉 健一¹,嶋田 一夫⁵ (¹エーザイ株式会社,²産業 技術総合研究所.³H3 Biomedicine.⁴サンプラネット株式会社.⁵東京大学大学院 薬学系研究科) P41 リン酸化された SHARP/SMRT キメラの構造解析 Structure analysis of phosphorylated SHARP/SMRT chimera ○飯沼 純弥, 小林 彩保, 金場 哲平, 伊藤 隆, 三島 正規(首都大学大学院 理工学研究科) P42 天然変性蛋白質 PQBP1のセグメント同位体標識 Segmental isotope labeling of the intrinsically disordered protein PQBP1 ○水口 峰之, 鍋島 裕子 (富山大学 薬学部)

P43 Preparation of secretory proteins produced by *Brevibacillus choshinensis* for NMR study ○谷生 道一¹, 楠 英樹², 河野 俊之³ (¹分子科学研究所, ²国立感染症研究所, ³北里大学 医 学部)

P44 HMBC 法の新しい応用測定──BASHD-J-resolved HMBC 法について BASHD-J-resolved-HMBC, an efficient method for measuring proton-proton and heteronuclear long range coupling constants ○降旗 一夫¹, 田代 充² (¹東京大学大学院 農学生命研究科, ²明星大学 理工学部)

- P45 大腸菌を用いた大量発現系によるアミノ酸選択標識技術の最適化 Optimization for Amino Acid Selective Labeling using *E. coli* Overexpression System ○寺内 勉^{1,2}, 宮ノ入 洋平³, 武田 光広³, 近藤 早恵^{1,2}, 甲斐荘 正恒^{1,2,3} (¹SAILテクノロ ジーズ株式会社,²首都大学東京 戦略研究センター,³名古屋大学大学院理学研究科付属 構造生 物学研究センター)
- P46 図 オルトギ酸メチルを用いてポリジメチルシロキサンを分解する過程のDOSY解析 Dosy analysis of the decomposition process of polydimethylsiloxane by using methyl orthoformate
 ○曽我部 啓介^{1,2},藤本 祐一郎¹,右手 浩一²,大谷 肇³ (¹株式会社カネカテクノリサー

○冒我部 啓介***,藤本 袖一郎*,石手 浩一*,天谷 筆*(「株式会社カネカアクノリサー チ,²徳島大学大学院 ソシオテクノサイエンス研究部,³名古屋工業大学大学院 工学研究科)

P47 In-cell NMRを用いた, HeLa細胞内のストレス応答による Ca²⁺濃度変化のモニタリング An in-cell NMR study of monitoring stress-induced increase of cytosolic Ca²⁺ concentration in HeLa cells

Dambarudhar Shiba Sanker Hembram¹, 〇鴨志田 一¹, 晴被 貴洋¹, 濱津 順平¹, 井上 仁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 理工研究科, ²京都 大学大学院 工学研究科)

P48 ☑ リン系誘導体化試薬による樹脂中の微量水酸基、カルボン酸基分析の検討 Quantitative Determination of Hydroxyl and Carboxylic Acid Groups in Synthetic Polymers by ³¹P-NMR Spectroscopy

○仲村 仁浩,佐野 純子(DIC株式会社分析センター)

P49 多核 NMR による液相析出反応における酸化チタン薄膜の析出機構の解析 Deposition Mechanism Analysis of TiO₂ Thin Films by the LPD Process with Multi Nuclear NMR

○牧 秀志, 奥村 雄三, 水畑 穣(神戸大学大学院 工学研究科)

- P50 図 NMRによる多価アルコールおよびエーテルの定量分析 Quantitative analysis of polyol and ether by the NMR
 ○竹嶋 奈緒美, 土屋 耕一(日本化薬株式会社 分析グループ)
- P51異なる栄養源条件下における微細藻類の代謝動態の比較解析
Comparative analysis of metabolic dynamics in microalgae system upon
different nutrient condition

○小林 俊哉¹,小松 功典^{1,2},菊地 淳^{1,2,3,4} (¹横浜市立大学大学院 生命医科学研究科,²理化 学研究所 環境資源科学研究センター,³理化学研究所 バイオマス工学研究プログラム,⁴名古屋 大学大学院 生命農学研究科)

P52水産物の恒常性維持・品質向上を目指したプローブ試料管理および評価技術開発Development of non-invasively evaluation method for quality improvement and
maintenance of fishery resources

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

P53 ヒト由来非侵襲的試料を用いた NMR 計測技術高度化の試み Advanced sample control techniques using NMR measurements for noninvasive human samples

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

	Development of a novel molecular probe for ${}^{1}\text{H}^{-13}\text{C}\text{-}\text{HMQC}\text{-}\text{MRI}$ ○李 真和 ¹ , 山田 久嗣 ¹ , 牧野 顕 ² , 木村 俊作 ¹ , 近藤 輝幸 ¹ , 白川 昌宏 ¹ , 杤尾 豪人 ¹ (¹ 京都大学大学院 工学研究科, ² 福井大学 高エネルギー医学研究センター)
P55	Sf9 細胞の in-cell NMR におけるアミノ酸選択的安定同位体標識 Amino acid-selective stable isotope-labelling of proteins for the observation of in-cell NMR spectra in sf9 cells 〇田中 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)
P56	¹³ C 標識された緑藻類の代謝混合物群の固体・溶液多次元 NMR法による分析 Solution and solid state multidimensional NMR for complex metabolic mixtures of ¹³ C-labeled green algae ○伊藤 研悟 ¹ ,小松 功典 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 生命医科学研究科, ² 理化学研究所 環境資源科学研究センター, ³ 理化学研究所 バイオマス工 学研究プログラム, ⁴ 名古屋大学大学院 生命農学研究科)
P57	 被災地土壌による¹³C標識化作物非食部の分解代謝動態 Degradation profiles and metabolic dyanamics by soil ecosystems in disaster area using inedible part of ¹³C-labeled plant ○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 生命医科学研究科, ²理化学研究所 植物科学研究センター, 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)
P58	NMRスペクトルに基づく深海底泥有機物質の化学的多様性評価法 Chemical diversity profiling for organic substances in deep-sea sediment based on NMR spectra ○伊達 康博 ^{1,2} ,朝倉 大河 ² ,坪井 裕理 ¹ ,坂田 研二 ¹ ,吉田 尊雄 ³ ,丸山 正 ³ ,菊地 淳 ^{1,2,4,5} (¹ 理化学研究所環境資源科学研究センター, ² 横浜市立大学大学院 生命医科学研究科, ³ 海洋開発機構, 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)
P59	 多孔質体上を連続フローさせた超偏極¹²⁹Xeによる吸着相XeのNMR観測 ¹²⁹Xe Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy of Xenon Adsorbed on Mesoporous Materials under Continuous-flow Hyperpolarized Xenon Gas ○服部 峰之¹, 平賀 隆¹, 加賀 尚博², 大竹 紀夫³ (¹産業技術総合研究所 電子光技術研究 部門, ²アウレアワークス株式会社, ³東横化学株式会社)
P60 Y1	 MRI を用いた嗅覚刺激による嗅球の活性化の検出 Detection of responses to olfactory stimuli in olfactory bulbs using magnetic resonance imaging ○平金 真¹,後藤 はるな¹, 吉永 壮佐¹, 岩本 成人¹, 白須 未香^{2,3},東原 和成^{2,3},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 農学生命科学研究科,³科学技術振 興機構 ERATO)
P61	高沸点ガスのクエンチング効果による超偏極 ¹²⁹ Xe MRI の高感度化と応用 Application of Hyperpolarized ¹²⁹ Xe MRI with the Sensitivity Improved by Quench Effect of the Gas with High-boiling Point 〇木村 敦臣,河村 綾乃,内山 知香,奥村 慎太郎,松本 浩伸,山内 紬起子,藤原 英明 (大阪大学大学院 医学系研究科)

P54 ¹³C-ポリマーを利用した¹H-{¹³C}-HMQC-MRI法のための分子プローブ開発

- 25 -

P62 図 高温超伝導バルク磁石を用いた高分解能 MRI High-Resolution Magnetic Resonance Imaging Using a High T_c Bulk Superconducting Magnet

○玉田 大輝^{1,2}, 巨瀬 勝美¹, 柳 陽介³, 伊藤 佳孝³, 仲村 高志^{1,2} (¹筑波大学大学院 数理 物質科学研究科, ²理化学研究所, ³株式会社 イムラ材料開発研究所)

P63超低磁場機能的核磁気共鳴画像装置の基礎検討
Feasibility study of an ultra low-field functional magnetic resonance imaging system
〇樋口 正法,小山 大介,上原 弦(金沢工業大学先端電子技術応用研究所)

P64 図 脂質二重膜再構成H⁺-ATP合成酵素 subunit *c*-ringの固体高分解能 NMR法によ る構造決定

Structure determination of H⁺-ATP synthase subunit *c*-ring reconstituted into lipid bilayer by solid-state NMR

○戸所 泰人^{1,2},姜 秀珍³,湯面 郁子¹,岩崎 郁¹,鈴木 俊治^{4,5},吉田 賢右^{4,5},藤原 敏道¹,阿久津 秀雄^{1,3} (¹大阪大学 蛋白質研究所,²大阪大学大学院 理学研究科,³ソウル大学, ⁴東京工業大学 資源化学研究所,⁵京都産業大学 総合生命科学部)

P65スピンエコー MAS 法を用いた脂質二重膜の化学シフト異方性測定法
CSA measurement of lipid bilayer by Spin-Echo MAS NMR

○梅川 雄一^{1,2}, 松岡 茂^{1,2}, 山口 敏幸^{1,2,*}, 村田 道雄^{1,2} (¹科学技術振興機構 ERATO, ²大阪大学大学院 理学研究科, ^{*}現所属:サントリー生命科学財団 生物有機科学研究所)

P66 中性膜に結合したラクトフェランピンの膜結合構造と膜親和性に基づく抗菌活性の解明 Structure and affinity analysis of bovine lactoferrampin bound to neutral model membranes as studied by solid state NMR and QCM

○井町 昌義¹, ナムズライ ジャフカラントゥクス¹, 吉良 敦史², 堤 敦史¹, 川村 出¹, 内藤 晶¹(¹横浜国立大学大学院 工学府, ²株式会社 アルバック)

P67 固体NMR 法を用いた細胞内の膜蛋白質 *p*HtrII の構造解析 Solid-state NMR structural analysis of transmembrane halobacterial transducer *p*HtrII in cellular environment

○江川 文子¹, 池田 恵介^{1,2}, Lili Mao³, 林 こころ¹, 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)

P68 固体NMRにおけるGFT NMRを応用したタンパク質連鎖帰属法ならびに 解析支援プログラムの開発

Development of GFT NMR based sequential assignment method and tools for proteins in solid states

〇田巻 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 \hat{u}^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)

P69 ¹³C 固体 MAS NMR によるフォボロドプシンのレチナール-タンパク質間 相互作用の解析 Retinal-Protein interaction in Phoborhodopsin as studied by ¹³C solid-state MAS NMR

○川村 出¹, 西川 亮汰¹, 沖津 貴志², 和田 昭盛², 須藤 雄気³, 加茂 直樹⁴, 内藤 晶¹ (¹横浜国立大学大学院 工学研究院, ²神戸薬科大学, ³名古屋大学大学院 理学研究科, ⁴北海道大 学大学院 薬学研究院) P70 光照射固体NMRによる暗順応状態のバクテリオロドプシンの光励起過程と 局所構造変化の解析 Structural changes in the photo excited process in dark-adapted state of Bacteriorhodopsin as studied by photoirradiation solid-state NMR ○重田 安里寿¹、宮佐 亮太¹、堀籠 美也子¹、川村 出¹、沖津 貴志²、和田 昭盛²、辻 暁³、内藤 晶¹(¹横浜国立大学大学院 工学研究院,²神戸薬科大学,³兵庫県立大学大学院 生命 理学研究科)
P71 *In situ* 光照射固体NMRによるセンサー型光受容膜タンパク質センサリーロドプシンの 米豆肉 経路の解析

光反応経路の解析 Analysis of photoreaction pathway of sensor type photoreceptor membrane protein by *in situ* photo irradiation solid-state NMR

○槙野 義輝¹, 友永 雄也¹, 柴藤 祐介¹, 四方田 洋紀¹, 日高 徹朗¹, 川村 出¹, 沖津 貴志², 和田 昭盛², 須藤 雄気³, 加茂 直樹⁴, 内藤 晶¹(¹横浜国立大学大学院 工学研究 院, ²神戸薬科大学, ³名古屋大学大学院 理学研究科, ⁴北海道大学大学院 生命科学院)

- P72 図 Silk II 型家蚕絹の構造解明へ向けて:DARR法からのアプローチ Elucidation of Silk II Structure of *Bombyx mori* Silk Fibroin: Use of DARR Method
 ○奥下 慶子¹, 浅野 敦志¹, 青木 昭宏², 朝倉 哲郎^{2,3} (¹防衛大学校 応用化学科, ²東京農 工大学大学院 工学研究院, ³分子科学研究所)
- P73 高度に¹³C/¹⁵N 標識化した樹木初期成長時の炭酸固定および根圏吸収代謝動態の評価 Evaluation of metabolic dynamics in early stage growth using highly ¹³C/¹⁵N labeled trees
 ○大石 梨紗¹,小松 功典²,篠 阿弥宇³,菊地 淳^{1,2,3,4,5} (¹横浜市立大学大学院 生命ナノシ ステム科学研究科,²横浜市立大学大学院 生命医科学研究科,³理化学研究所 環境資源科学研究 センター,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)
- P74 図 固体NMRによるタンパク質の構造解析に向けた¹³C-常磁性緩和促進の研究 Structural analysis of proteins by paramagnetic relaxation enhancement of ¹³C-NMR in solid states

〇木戸 浩貴¹, 田巻 初¹, 江川 文子², 亀田 倫史³, 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, ³産業技術総合研究所 生命情報工学研究センター)

 P75 常磁性 Gd³⁺存在下での¹H-NMR緩和による大腸菌細胞の解析 Living *Escherichia coli* cells as studied by ¹H-NMR relaxation under Gd³⁺ paramagnetism
 ○ Chalermpon Khampa, 江川 文子, 児嶋 長次郎, 藤原 敏道 (大阪大学 蛋白質研究所)

P76 ヒトカルシトニンの酸性膜との相互作用に依存した線維形成機構の解明 Amyloid-like fibrillization and the structure of human calcitonin in the presence of acidic lipids
○浅野 洸¹, 阿部 友樹¹, 石島(上平)美弥², 渡辺(伊藤)ひかり¹, 川村 出¹, Ayyalusamy Ramamoorthy³, 内藤 晶¹(¹横浜国立大学大学院 工学府, ²兵庫県立大学 理学部・大学院 生命 理学研究科, ³ミシガン大学 化学部 生物物理学科)

P77 液晶 7CB−n-ヘプタン混合物の²H NMR Liquid crystal 7CB−n-heptane mixture as studied by ²H 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)

P78 M	液晶性バナナ型分子の固体NMRおよび量子化学計算による高次構造解析 Higher-order structure analysis of banana-shaped liquid crystal studied by solid-state NMR and quantum chemistry ○遠洞 佑美 ¹ , 木村 沙織 ¹ , 中西 彩季 ¹ , 橋本 朋子 ¹ , 姜 聲敏 ² , 曽根 正人 ³ , 渡辺 順 次 ² , 黒子 弘道 ¹ (¹ 奈良女子大学大学院 人間文化研究科, ² 東京工業大学大学院 理工学研究科, ³ 東京工業大学 精密工学研究所)
P79	層状構造を形成する液晶性ポリエステルの磁場配向膜の構造と気体拡散特性の NMR法による研究 The structures and gas diffusion properties of the magnetically oriented membranes of liquid crystalline polyester forming the layered structures as studied by NMR methods ○浅沼 諒太, 吉水 広明(名古屋工業大学大学院工学研究科)
P80	ポリカーボネートのXe収着特性と ¹²⁹ Xe NMRによる微細高次構造の解析 ¹²⁹ Xe NMR analyses of Xe sorption properties and higher-ordered structure of polycarbonate 〇樋口 智章,吉水 広明(名古屋工業大学大学院工学研究科)
P81	 アルキル側鎖を有する液晶性ポリエステルにおける気体収着測定と 局所分子運動性に関する NMR法による研究 A study on the gas sorption properties and local molecular motions of the liquid crystalline polyesters with alkyl side chains by NMR methods 〇山内 雅弘, 吉水 広明 (名古屋工業大学大学院 工学研究科)
P82	強磁場中で調製した固体 PBLG の構造解析と気体輸送特性 Structural Analysis and Gas transport Properties of Solid PBLG Prepared in the Strong Magnetic Field ○岩本 純, 吉水 広明 (名古屋工業大学大学院工学研究科)
P83	温度応答性ポリマー水溶液のゲル化に関する二次元 ² H T_1 - T_2 NMR緩和挙動の検討 A study of the gelation behavior of thermo-responsive polymer using two-dimensional ² H T_1 - T_2 NMR relaxation 〇渡部 英司 ¹ , 佐藤 浩子 ² , 関根 素馨 ² , Gregory S. Boutis ³ , 朝倉 哲郎 ¹ (¹ 東京農工大学 大学院工学府, ² 三井化学 分析センター, ³ ニューヨーク市立大学シティカレッジ 物理)
P84	超高速 MAS 高分解能 ¹ H 固体 NMR を用いた一連の絹結晶部モデルペプチドの構造解析 Structural analysis of model peptide for the crystalline domain of silk fibroin studied with high resolution ¹ H solid state NMR by ultra fast MAS 〇大畑 卓也 ¹ , 矢澤 宏次 ^{1,2} , 青木 昭宏 ¹ , 西山 裕介 ² , 西村 勝之 ³ , 朝倉 哲郎 ^{1,2} (¹ 東京 農工大学大学院 工学府, ² JEOL RESONANCE inc., ³ 分子科学研究所)
P85	延伸ロールで一軸延伸されたPETフィルムの固体NMR構造解析 Structural Analysis of uniaxial roll drawing poly (ethylene terephthalate) film by Solid-State NMR 〇石田 宏之,岡田 一幸,中田 克(株式会社東レリサーチセンター)
P86 M	MAS で圧延伸長したゴムの ¹³ C NMRの異方性と運動性 Anisotropic Properties of ¹³ C NMR Spectra and Molecular Motion Change of Rubbers Rolled by MAS 〇北村 成史, 浅野 敦志, 黒津 卓三 (防衛大学校 応用化学群 応用化学科)
P87	固相反応で得られたQuinhydroneの構造研究 Structural study of Quinhydrone Synthesized by Solid-State Reaction. ○伊澤 研一郎, 野田 泰斗, 竹腰 清乃理(京都大学大学院理学研究科)

- P88 アミノ基を持つ高分子と二酸化炭素の反応 Reaction of polymers which have amino group and carbon dioxide
 ○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)
 P89 固体NMRによる木質素材の乾燥と含浸過程の解析 Solid State NMR Analysis of Drying and Impregnation Processes of Woody Materials
 ○西田 雅一¹, 田中 智子¹, 三木 恒久², 金山 公三², 兼松 渉¹ (¹産業技術総合研究所 計 測フロティア研究部門, ²産業技術総合研究所 サステナブルマテリアル研究部門)
- P90 図 チタン結合性ペプチドのTiO₂粒子上における NMR構造解析 Structure of the Ti Binding Peptide on the Surface of TiO₂ Nano Particles Studied by NMR
 ○鈴木 悠¹, 芝 清隆²,朝倉 哲郎^{1,3} (¹東京農工大学大学院 工学府,²がん研究所,³分子科 学研究所)
- P91固体インジウム NMRによる In-doped ZnO の局所構造解析
Local structural analysis of In-doped ZnO by solid-state indium NMR○大橋 竜太郎¹, 川村 祐史¹, 宮下 智史¹, 井田 朋智¹, 佐藤 渉¹, 水野 元博¹, 丹所
正孝², 清水 禎²(¹金沢大学大学院 自然科学研究科, ²物質・材料研究機構)
- P92 図 材料開発のための固体NMR活用事例
 Solid-state NMR applications for material development
 ○新井 彩子,西岡 大輔,陳 海軍,松尾 武士,武脇 隆彦,小西 洋平,丹那 晃央(株式 会社三菱化学科学技術研究センター)
- P93 ⁶Li/⁷Li 固体NMRによる電極/電解質界面相互作用の研究 Interfacial interaction at electrode/electrolyte studied by ⁶Li/⁷Li solidstate NMR
 ○清水 俊介¹,村上 美和²,竹腰 清乃理¹,荒井 創²,内本 喜晴³,小久見 善八²(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,³京都大学大学院 人間環境学研究科)
- P94 in situ NMRによるリチウムイオン実電池解析 正極材がスペクトルに及ぼす影響 In situ solid NMR study for real component lithium ion batteries
 - Influence of the bulk susceptibility of cathode materials to NMR spectra –
 後藤 和馬¹, ○伊塚 美里¹, 新井 寿一², 岡田 裕実春², 武田 和行³, 石田 祐之¹ (¹岡山 大学大学院 自然科学研究科,²ヤマハ発動機株式会社,³京都大学大学院 理学研究科)
- P95In situ NMR測定によるLiNi_{0.5}Mn_{1.5}O4 電極のリチウムのその場観察
In situ NMR measurements of the lithium extraction from LiNi_{0.5}Mn_{1.5}O4 cathode

 ○下田 景士¹、村上 美和¹、森島 慎¹、荒井 創¹、内本 喜晴²、小久見 善八¹(¹京都大学

 産官学連携本部、²京都大学大学院人間環境学研究科)

 P96
 ²³Na NMRによるナトリウムイオン電池負極の解析 Analysis of negative electrode in sodium ion batteries using ²³Na NMR
 ○後藤 和馬¹, 伊塚 美里¹, 嶋津 沙織², 福西 美香², 薮内 直明², 駒場 慎一², 出口 健三³, 大木 忍³, 清水 禎³, 武田 和行⁴, 石田 祐之¹(¹岡山大学大学院 自然科学研究科, ²東京理科大学大学院 理学研究科, ³物質・材料研究機構, ⁴京都大学大学院 理学研究科)

P97 ¹H および²H 固体 NMR による EDLC 電極中おける水系電解質の細孔内吸着挙動解析 Adsorption behaviors of aqueous electrolytes in pores of EDLC electrode analyzed by ¹H and ²H solid-state NMR

金 泰坤¹, 〇出田 圭子¹, 宮脇 仁^{1,2}, 持田 勲³, 尹 聖昊^{1,2} (¹九州大学 先導物質化学研究 所, ²九州大学 総合理工学府, ³九州大学 炭素資源国際教育研究センター) P98 マロン酸イミダゾリウム結晶の局所構造と分子運動 Local Structure and Molecular Motions in Imidazolium Malonate Crystal ○千頭和 瑞貴¹,海山 剛史¹,大橋 竜太郎¹,井田 朋智¹,水野 元博¹,丹所 正孝²,清 水 禎²(¹金沢大学大学院自然科学研究科,²物質・材料研究機構) P99 固体NMRによるPVPA-イミダゾール複合体のイミダゾールのダイナミクスと プロトン伝導性の解析 Analysis of dynamics of imidazole and proton conductivity in PVPA - imidazole aggregate by solid-state NMR ○岩崎 彩乃,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) P100 分子性ナノ多孔質結晶に閉じ込められたガスハイドレート Characterization of Artificial Gas Hydrate Confined to Molecular Nanoporous Crystal ○須賀 亮太, 鈴木 陽, 齋藤 一輝, 磯田 恭佑, 田所 誠 (東京理科大学 理学部) P101 固体NMRによるメソポーラスシリカSBA-16に取り込まれたNaCl水溶液の状態解析 Analysis of NaCl Aqueous Solution Confined to Mesoporous Silica SBA-16 by Using Solid-state NMR ○宮東 達也¹, 佐々波 康一¹, 大橋 竜太郎¹, 井田 朋智¹, 水野 元博¹, 橘髙 茂治²(¹金 沢大学大学院 自然科学研究科.²岡山理科大学 理学部) P102 分子性ナノ多孔質結晶内で安定化された包接水和物のダイナミクス Dynamics of clathrate hydrate stabilized with nanoporous molecular crystal ○鈴木 陽¹,須賀 亮太¹,杉尾 友理恵¹,中村 瑛梨子¹,磯田 恭佑¹,熊谷 翼秀²,水野 元博², 田所 誠¹(¹東京理科大学 理学部, ²金沢大学大学院 自然科学研究科) 固体NMRによるセメント硬化体の化学構造解析 P103 Analysis of Chemical Structure in Cement Pastes Using Solid State NMR ○髙橋 貴文¹, 古瀬 佑馬², 大窪 貴洋²(¹新日鐵住金株式会社 先端技術研究所, ²千葉大学 大学院 工学研究科) P104 **2**次元緩和相関¹H NMRによるセメント材料の解析 Cement Materials Analysis by using Two-Dimensional Relaxation Correlation ¹H NMR ○古瀬 佑馬¹, 高橋 貴文², 出口 健三³, 大木 忍³, 清水 禎³, 前田 孝一¹, 岩舘 泰彦¹, 大窪 貴洋1(1千葉大学大学院工学研究科,2新日鐵住金株式会社先端技術研究所,3物質・材 料研究機構) P105 常磁性金属イオンを用いた結晶性多孔質シリカの高分解固体NMR迅速測定 Sensitivity enhancement in ²⁹Si MAS NMR of porous silicate crystals by paramagnetic doping ○稲垣 怜史¹, 川村 出¹, 佐々木 優吉², 吉田 要², 窪田 好浩¹, 内藤 晶¹(¹横浜国立大 学大学院 工学研究院, ²ファインセラミックスセンター) P106 12 パルスNMRによるフィラー界面における分子運動性評価 -シリカ配合SBRの性能発現機構の解明に向けて-The evaluation of the molecular mobility in the interface between fillers and rubber by the pulsed NMR ○村上 公也¹, 早田 大祐², 井上 芳久², 永田 員也², 松田 孝昭², 山崎 悟¹(¹旭化成株 式会社.²旭化成ケミカルズ株式会社) 多量子 NMRを用いた¹H 分布の次元数の決定とその応用 P107 Dimensionality of ¹H distribution in solids as studied by MQNMR ○最上 祐貴1. 山崎 悟2. 野田 泰斗1. 竹腰 清乃理1(1京都大学大学院 理学研究科. 2旭化 成株式会社 基盤技術研究所)

- P108 図 ¹H DQ MASを用いた医薬品原薬中の微量フリー体の定量~固体NMRの検出限界は?~ What is the lowest concentration of a minor free form component that can be detected by ¹H DQ MAS experiments in pharmaceutical solids?
 ○丸吉 京介¹, Dinu Iuga², Steven P. Brown² (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)
- P109MAS下における二重回転照射異種核デカップリングの解析
Analysis of double-nutation heteronuclear dipolar decoupling under MAS

 ○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)
- P110
 Easy tuning of high-resolution ¹H NMR measurements

 Michal Malon¹, Ivan Hung², Zhehong Gan² and Yusuke Nishiyama¹ (¹ JEOL RESONANCE Inc., ²National High Magnetic Field Laboratory)
- P111 光を使った固体NMRの汎用高感度化法の開発
 General Method for Sensitivity Enhancement of Solid-State NMR Using Laser Induced Paramagnetic Species
 ○松木 陽, Kris Frost, 笹原 久武,藤原 敏道 (大阪大学 蛋白質研究所)
- P112 図 MAS下の新CP法:異方性による低効率化の克服 Novel cross-polarization scheme under magic-angle spinning that can overcome the degrading effect by anisotropies
 ○神原 孝之¹,村上 美和²,野田 泰斗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,²物質・材料研究機構 [現職は京都大学 産官学連携本部])
- P113平均ハミルトニアン理論と最適制御理論に基づく選択平均パルスの数値的設計法
Numerical design method of selective averaging pulses based on averaging Hamiltonian
theory and optimal control theory

○陶山 雷¹, 田渕 豊², 根来 誠¹, 北川 勝浩¹ (¹大阪大学大学院 基礎工学研究科, ²東京大 学 先端科学研究センター)

- P114 図 In-situ マイクロ波照射 NMRによる液晶分子の非平衡加熱状態の観測
 Observation on non-equilibrium local heating state of liquid crystal molecule by *in-situ* microwave irradiation NMR spectroscopy
 ○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)
- P115常磁性液体を用いた銅管コイルの磁化率マッチング
Susceptibility matching of an RF coil wound with paramagnetic-liquid-filled copper pipe
〇高崎 智弥,竹腰 清乃理,武田 和行(京都大学大学院理学研究科)

P116 平均場近似を用いた核磁気相転移の解析
 Analysis of nuclear magnetic phase transition using mean field approximation
 ○香川 晃徳¹,北野 崇博¹,根来 誠¹,丸山 勲²,北川 勝浩¹(¹大阪大学大学院 基礎工学 研究科,²福岡工業大学 情報工学科)

P117 核スピン増幅を用いた量子非破壊測定
 Quantum Non-Demolition Measurement with Nuclear Spin Amplification
 ○根来 誠¹, 立石 健一郎², 西田 辰介³, 香川 晃徳¹, 森田 靖², 北川 勝浩¹(¹大阪大学 大学院 基礎工学研究科,²理化学研究所 仁科加速器研究センター,³大阪大学大学院 理学研究科)

- P118 図 NQR 用平面アンテナ特性に対する近接導電体の影響 The effect of near conductor on NQR planar antenna
 ○大林 輝一,赤羽 英夫,糸崎 秀夫(大阪大学大学院 基礎工学研究科)
- P119 低 y 核種の観測感度向上に適したクライオコイル MASの実用化開発
 Development of a single-tuned Cryocoil MAS probe suitable for low-gamma nuclei
 ○水野 敬¹, 戸田 充¹, 藤岡 耕治², 竹腰 清乃理³(¹株式会社 JEOL RESONANCE, ²株式 会社クライオウェア, ³京都大学大学院 理学研究科)
- P120 図 X₀シムコイルの性能及び再現性の向上 Improvement of performance and reproducibility of X₀ shim coil
 ○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, ²株式会社 JEOL RESONANCE)
- P121常磁性シム 可変磁場の空間的均一性の向上
Paramagnetic shim Improvement in homogeneity of variable magnetic field
〇一条 直規, 武田 和行, 竹腰 清乃理(京都大学大学院 理学研究科)
- P122 図 周波数可変磁気共鳴装置によるパイ共役系高分子デバイス向け分子運動測定法の開発 Development of a measurement methodology of molecular dynamics for π-conjugated polymer electronics devices by a variable frequency magnetic resonance instrument ○福田 國統,浅川 直紀(群馬大学大学院理工学府)
- P123ソフトウェア定義磁気共鳴分光計の開発
Development of software defined magnetic resonance spectrometer○佐伯保明,一村裕基,根来誠,北川勝浩(大阪大学大学院 基礎工学研究科)
- P124 図 T2測定およびCOSYにおける入れ子型複合パルスの有用性
 Usefulness of Concatenated Composite Pulses in T2 Measurement and COSY Experiment
 ○坂東 将光¹,市川 翼²,近藤 康^{1,3},中原 幹夫^{1,3},鹿野 豊⁴ (¹近畿大学大学院 総合理工 学研究科,²学習院大学 理学部,³近畿大学 理工学部,⁴分子科学研究所 協奏分子システムセン ター)
- P125 統合化に向けてリニューアルされたBioMagResBank
 Web-service renewal of BioMagResBank for integration of databases
 ○小林 直宏, 横地 政志, 岩田 武史, 高橋 あみ, 児嶋 長次郎, 藤原 敏道 (大阪大学 蛋白質研究所)
- P126 同種核 REDOR NMR法の理論的研究 Theoretical study for Homonuclear REDOR NMR experiments
 ○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)
- P127 NMR蛋白質立体構造決定のための新規構造最適化法の開発
 Development of a new refinement method for NMR 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, ²Goethe-University Frankfurt)
- P128 Nuclear chemical shielding of quest molecules in sI crystal of gas hydrates ○遠藤 一央¹, 井田 朋智², 鈴木 陽³, 田所 誠³ (¹東京理科大学 総合研究機構, ²金沢大学 大学院 自然科学研究科, ³東京理科大学 理学部)

第一日目 11月12日(火) 日本語セッション 英語セッション

Day 1 (Nov. 12, Tue)

(Japanese Session) (English Session)

多量子カウンティング法を用いたリチウム電池正極材料 の研究 ○村上美和¹,最上祐貴²,清水俊介²,竹腰清乃理²,荒井創¹,

〇村上美和', 最上祐貢', 淯水俊介', 竹腰淯乃理', 氘升創 内本喜晴³, 小久見善八¹ ¹京大・産連本部,²京大・理,³京大・人環

Application of Multi-Quantum Counting NMR for Positive Electrode Materials of Lithium Ion Battery

○Miwa Murakami¹, Yuuki Mogami², Syunsuke Shimizu², Kiyonori Takegoshi², Hajime Arai¹, Yoshiharu Uchimoto³, and Zempachi Ogumi¹

¹Office of Society-Academia Collaboration for Innovation, Kyoto University, Uji, Japan.

²Graduate School of Science, Kyoto University, Kyoto, Japan.

³*Graduate School of Human and Environmental Studies, Kyoto University, Kyoto, Japan.*

To examine lithium ion insertion and extraction processes in a $LiCoO_2$ electrode during charge-discharge cycles, the so-called MQ spin counting experiment is applied to ⁷Li and the obtained results are simulated using a newly developed statistical approach based on the percolation theory. The observed MQ dynamics in a pristine $LiCoO_2$ sample is consistent with that calculated using a triangular lattice model, while those in samples after charge/discharge are not. Further examination will be presented on site.

[緒言] 多量子(MQ)カウンティングは双極子相互作用しているスピンの分布を解析す る手法として、非晶質シリコン中の水素の研究などに用いられている¹。最近、最上 らは浸透理論に基づいた多スピン間のMQの時間発展の統計的解析法を提案し、これ により固体中のスピンの空間分布をより詳細に解析することが可能になった²。本研 究では、この方法をリチウムイオン電池の正極材料であるLiCoO₂に適用し、充放電過 程におけるリチウムの挿入・脱離によるLiCoO₂中の⁷Li分布の変化を解析した。

[実験] LiCoO₂(日亜化学)、アセチレンブラック、PVDFを80:10:10で混合し、Al箔に塗 布して電極とし、対極をLi金属、電解液をLiClO₄溶液(EC:DEC=1:1)として電池セル を作製した。電池セルは所定の条件で充放電後解体し、正極部分を回収して試料とし た。pristinとしてはLiCoO₂粉末をそのまま測定した。⁷Li NMR測定にはJEOL社製 ECA600(14 T、⁷Liの共鳴周波数は233.24 MHz)を用いた。

[結果および考察]得られた測定結果をFig.1に示す。LoCoO2は層状岩塩型構造をとり、 2次元3角格子を形成するCoO2面とその間に位置するLi面で構成されていることが知られている。Pristine試料では、このリチウムが2次元的に無限につながっている構造

多量子カウンティング, リチウムイオン電池, リチウムイオン分布

○むらかみみわ,もがみゆうき,しみずしゅんすけ,たけごしきよのり, あらいはじめ,うちもとよしはる,おぐみぜんぱち
が反映され、励起パルス列の繰り返し回数 *m* が増えるにしたがって多量子コヒーレン スが生じる様子が観測された。2 量子と4 量子の強度比(*I*(4)/*I*(2))の評価については後 で述べる。これに対して充電状態 (Li_{0.5}CoO₂)の試料では、*m* を増やしても

2 量子までしか観測されなかった。この結 果はリチウムがペアまたは3量体で存在す ることを示唆するが、このような構造では Li_{0.5}CoO₂の組成比にはならない。Li_{0.5}CoO₂ では4価のコバルトが生じるため、常磁性 相互作用により、4 量子以上の MQ コヒー



Fig.1 MQ counting spectra of the three samples for m=3,6, and 9.

レンスが減衰してしまうのではないかと考えている。常磁性試料の MQ 測定について は低磁場の利用などが考えられ、現在検討中である。

次に、対極に ⁶Li 金属、電解質として ⁶LiClO₄を使用して充放電を1サイクル行った試料について検討した。つまり充電により ⁷Li が減少し、その後の放電により主に ⁶Li が挿入された試料である。この試料の ⁶Li : ⁷Li は 57 : 43 であった。Fig.1 の右側に MQ 測定の結果を示す。明らかに pristine に比べて MQ の生成が遅くなっていること が分かる。これには、⁷Li が ⁶Li でランダムに希釈されたというモデルや、充電時には リチウムイオンが1次元的に配列しており、

放電時にその隙間に⁶Li が戻ったモデルな どが考えられる。そこで、浸透理論に基づ いた MQ の時間発展解析法を用いてこれら のモデルの検討を考えた。

pristine 試料の MQ 測定結果の 2 量子と 4 量子の比(I(4)/I(2))を二次元三角格子モデル でシミュレーションした結果を Fig.2 に示す。 実験結果と良く一致している。シミュレー ションに用いたパラメータは⁷Li 間の双極 子相互作用に関連した DQ 生成確率 (p_0) だ けである。現在はこの p_0 を用いて1サイク ル試料の実験結果 (Fig.2 o) に対して、上 に述べたような分布モデルについて検討を 行っている。



Fig.2 Experimental m-dependence of I(4)/I(2) (pristine: filled circle; 1 cycled: open circle) plotted against the calculated one for the triangular lattice model (line) for pristine LiCoO₂.

Reference

1. J. Baum, et al, Phys. Rev. Lett., 1986, 56, 1377-1380.

2. Y. Mogami et al, Phys. Chem. Chem. Phys., 2013, 15, 7403-7410.

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。

イオン伝導性配位高分子の開発と拡散NMR・固体NMRによる 伝導機構の解明

○犬飼宗弘¹, 堀毛悟史^{2,3}, 上坪祐介², 梅山大樹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, ³JST-さきがけ

Diffusion NMR and solid-state NMR study on fast ion conducting coordination polymers

OMunehiro Inukai¹, Yusuke Kamitsubo², Satoshi Horike^{2,3}, Tomohiro Fukushima², Susumu Kitagawa^{1,2}

¹*iCeMS, Kyoto University,* ²*Graduate School of Engineering, Kyoto University,* ³*JST-PRESTO*

Proton conductive coordination polymers have potential to serve as a versatile platform for a new class of proton conductors because of their tunability, diversity, and thermal stability. In this presentation, we show two types of proton conducting coordination polymers operating 25 °C under relative humidity 40% and 190 °C without humidity. Single crystal X-ray, diffusion NMR and solid-state NMR study elucidated the effective proton transporting pathway and the mechanism.

【緒言】

配位高分子は金属イオンと有機配位子から構成される結晶性の高分子であり、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。近年、その多様性・細孔性を活かしたプロトン伝導性配位高分子が注目されている。本研究では、ナフィオンなどの既存材料では困難とされる、室温・低湿度下、およびに200℃付近の高温下でプロトン伝導性を示す二種類の配位高分子を開発した。拡散 NMR・固体 NMR により伝導機構の解明およびにプロトン輸送経路を可視化した。

【細孔表面修飾が誘起する H⁺と Li⁺の高速輸送】

CaCl₂, Squaric acid (H₂C₄0₄)を酢酸・酢酸ナトリウムの緩衝溶液中で反応させ、 [Ca(C₄0₄)(H₂0)]_{*n*} \supset 1.5H₂0(**1**) (Fig. 1a)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を細孔内に導入させた[Ca(C₄0₄)(H₂0)₄(Cl)_{0.5}](Li)_{0.5} (**1**')を合成した(Fig. 1b)。Pulse Gradient Spin Echo(PGSE)法を用いて、'H、 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。

拡散NMR, 配位高分子, イオン伝導

○いぬかいむねひろ,ほりけさとし,かみつぼゆうすけ,うめやまだいき,きたがわ すすむ 25 °C・相対湿度 40%において、伝 導度は1に比べ 10⁷ 倍もの上昇がみ られ、10⁻² S cm⁻¹を超えるイオン伝 導度を示した。拡散 NMR により、H⁺ と Li⁺は高い拡散係数 (¹H: 6.1×10⁻¹⁰ m²/s, ⁷Li: 4.9×10⁻¹⁰ m²/s)を有して おり、細孔内で高速拡散しているこ とが明らかになった。それらの拡散 が高いイオン伝導能を引き起こして いると考えられる。

【ゲスト分子の内部配列による配位 高分子の高速プロトン輸送能と高耐 熱性】

酸化亜鉛、5,6-ジメチルベンゾイミ ダゾール (Hdmbim)、リン酸を室温 下で固相合成することで、 1次元鎖 と H_2 dmbim⁺ で 構 成 さ れ る [Zn (H_2PO_4)₂ (HPO_4)]・(H_2 dmbim)₂ (**2**) を得た。 H_2 dmbim⁺は π - π スタッキング しており、一次元鎖の間に取り込ま れている。

スタックしたH₂dmbim⁺は一次元鎖 に対して多点の水素結合を有して おり、190 ℃まで結晶構造が保持 される高い耐熱性を示した。交流 インピーダンス法により、190 ℃・ 無加湿環境下において0.1 mS/cmの プロトン伝導度を示した。²H四極子 エコー法およびに単結晶X線回折 を用いて、プロトン伝導機構を解 析した。その結果、H₂dmbim⁺は一次 元鎖同士の配列を制御しており、 配列した一次元鎖間に連続した高 速プロトン輸送経路を形成されて

いることを確認した(Fig 2a)。



Fig. 1 Crystal structure of (a) 1 and (b) 1'. (c) 1 H and (d) 7 Li spin-echo attenuation in PFG NMR spectra of 1' at 25 °C and relative humidity 40%.



Fig. 2 (a) Proton hopping pathway in the crystal structure of **2** and (b) 2 H solid-state NMR spectra of deuterated **2** in the region of 22-180 °C

参考文献

1. S. Horike, Y. Kamitsubo, M. Inukai, T. Fukushima, D. Umeyama, T. Itakura, S. Kitagawa *J. Am. Chem. Soc.* 2013, **135**, 4612.

GPIアンカー型蛋白質模倣分子の脂質二重膜存在下での 固体NMR測定

○野村薫, 原田英里砂, 菅瀬謙治, 島本啓子 (公財)サントリー生科財団・生有研

Solid-state NMR Spectra of Pseudo GPI-anchored Protein in membranes under Magic Angle Spinning

OKaoru Nomura, Erisa Harada, Kenji Sugase, and Keiko Shimamoto Bioorganic Research Institute, Suntory Foundation for Life Sciences, Osaka, Japan.

We designed a new type of pseudo-GPI-anchored protein in which the protein part was expressed in *E. coli* and attached to a chemically synthesized GPI anchor mimic. So far, such a NMR measurement has not been accomplished because supplying sufficient amount of stable isotope labels in overexpression is difficult for GPI-anchored protein which required complex posttranslational modification. Using two different types of membranes, liposomes and bicelles, we demonstrated two types of insertion procedures for GPI-anchored protein into membranes. The high resolution solid-state NMR spectra for these samples demonstrated the feasibility of this methodology to examine the roles of GPI-anchor in regulating diverse biological phenomena.

【背景】 GPIアンカー型蛋白質は、グリコシルホスファチジルイノシトール(GPI) と呼ばれる糖脂質が蛋白質のC末端に翻訳語修飾された膜蛋白質である。GPIアンカ ー型蛋白質は酵素、細胞接着因子、受容体など体内で重要な役割を担っているが、こ れまでに膜存在下における蛋白質の立体構造決定や運動性の解析、膜や他の分子との 相互作用等の原子レベルでの解析は他の膜蛋白質ほど進んでいない。その理由は、GPI アンカーが付加した形での蛋白質の発現は唯一動物細胞でしか出来ないが、動物細胞 は大量発現には向いていないため、蛋白質にGPIが付加した形で必要量発現精製する ことが難しいからである。そこで我々は、単純化したGPIアンカー模倣分子をし、大 腸菌の大量発現系で発現させたモデル蛋白質GB1に結合させて、脂質二重膜への再構 成を行い、GPIアンカー型蛋白質の模倣分子を固体NMRで解析することを試みた。

【実験方法】(調製法1)先に蛋白質とアンカーを結合させてからリポソームに挿入 する方法と、(調製法2)予めバイセル挿入したアンカーと蛋白質の結合反応を行う 方法の2通りのサンプル調製法を検討した。(調製法1)リポソームには、 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DMPC)を用い、凍結融解法により調 製した。蛋白質はアンカーと反応後、生じたアンカー型蛋白質をHPLCを用いて精製し た。これを界面活性剤除去法によりDMPCリポソームに再構成させた。(調製法2) バイセルはDMPC:1,2-diheptanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DHPC):アンカー

GPI-anchored protein, liposome, bicelle

○のむらかおる,はらだえりさ,すがせけんじ,しまもとけいこ



Fig 1. Schematic representation of the reconstitution of the anchored-protein into liposomes (a) and bicelles (b).

=3:1:0.06のモル比で混合したものを用い、バッファー中で蛋白質と反応させた後 Sephadex G-75を用いて未反応の蛋白質を除いた。各フラクションの³¹PNMRスペクトル を測定し、バイセルを形成しているフラクションを選択すると同時に、これらのフラ クションのゲルろ過のパターンにより、未反応のバイセルがないことを確認した。³¹P, ¹³C1D, ¹³C-¹H, ¹⁵N-¹H, ¹³C-¹³C 2D固体NMRスペクトルはBruker Avance III NMR分光計(¹H 共鳴周波数:600.13 MHz)を用いて測定した。

【結果および考察】上記の2通りのサンプル調製法を検討し、それぞれに適した調製 条件を確立することができた。調製法1では、アンカー部分を蛋白質部分に結合させ た後のアンカー型蛋白質の疎水性が強くなるため、結合後に未反応のアンカーと蛋白 質を精製で除く点に工夫を要することがわかった。

膜に挿入したGPIアンカー型蛋白質模倣分子サンプルの1次元、2次元固体NMRスペクトルを測定したところ、良好なスペクトルが得られた。調製法1で調製したリポソームサンプルでは、室温付近ではCPMASスペクトルで膜脂質のシグナルしか観測されないのに対し、4℃では膜と蛋白質の両方の運動性が低くなるため、蛋白質部分のシグナルも観測することができた。さらに2D¹³C⁻¹³C DARRスペクトルでは、ある程度分離したクロスピークが観測出来た。これらの結果より、リポソームサンプルは双極子相互作用を積極的に利用した分子間の相互作用解析やシグナルの帰属に適していることがわかった。一方、調製法2で作成したバイセルサンプルでは、リポソームサンプルよりも高分解能の1D¹³C INEPTスペクトルが得られた。さらに、2D¹³C⁻¹H, ¹⁵N⁻¹H INEPTスペクトルを測定したところ、¹³C⁻¹³Cのスカラー結合が観測出来るほど分解能の高いシグナルが観測できた。さらに、膜表面に常磁性イオンをキレートしたバイセルサンプルを調製し常磁性緩和の解析を行い、脂質二重膜に近接するGB1の残基を特定することができた。このように、バイセルサンプルはリポソームサンプルとは逆にその運動性の高さを生かしたスカラー結合ベースの測定を利用することができる。

本研究により、擬似的な分子を用いることで、GPIアンカー型蛋白質の膜存在下 における原子レベルでの固体NMR解析が実現できる可能性を示した。今後は実際のGPI アンカー型蛋白質にこの方法を応用し、膜上での分子機構の解析に展開していく予定 である。 **L4**

¹⁵NNMRによる環状イミドリン酸イオン群の互変異性のpH依存性とプロトン伝導特性

○ 牧 秀志・片岡大亮・水畑 穣神戸大学大学院・工学研究科

pH dependence of Tautomerism Equilibria and Proton Conductivity of Various *Cyclo*-imidophosphate Anions by ¹⁵N NMR.

oHideshi Maki, Daisuke Kataoka, and Minoru Mizuhata Graduate School of Engineering, Kobe University, Hyogo, Japan

Tautomerism equilibria of various *cyclo*-imidophosphate anions, involving P-NH-P linkages have been studied by ¹⁵N NMR. The pH profile of the ¹H-coupled ¹⁵N NMR spectra of both anions give most straight forward evidence of the drastic change of the activity of the tautomerisms in these cyclic anions as well. The localization to the imino nitrogen atom of the hydrogen atom remarkably depends on the pH. The H⁺ form of tetramer showed a comparatively high proton conductivity.

【緒言】

近年、環境問題やエネルギー問題を背景に国内外で燃料電池の研究が盛んに行われている。多様な燃料電池の中で幅広い実用化を目標として最も活発に技術開発が行われているのは中温型燃料電池で、中でも全固体型電解質として利用可能なリン酸型電解質の研究が盛んである。しかしながら、現状のリン酸型燃料電池は溶融炭酸塩型や固体酸化物型燃料電池と比較して発電効率が低く、抜本的な発電効率の向上は達成されていない。このような問題を克服する材料としてP-N化合物が挙げられる。環状イミドリン酸は不燃性及び耐熱性に優れている上、互変異性を有する。互変異性とは、H原子の結合位置の変化によって発生する複数の異性体の交換である(Scheme 1)。互変異性においては分子内に易動性の水素原子が存在するため、プロトン伝導体としての

利用が期待されるが、環状イミドリン酸の互変異 性の詳細な平衡挙動や分子間のプロトン伝導に 関する詳細なメカニズムはほとんど分かってい ない。その互変異性の平衡挙動を明らかにするた め、二種類の環状イミドリン酸イオンの溶液状態 での¹⁵N NMRスペクトルのpH依存性を測定した。 さらに交流インピーダンス法により、固体状態で のイオン伝導度測定を行った。



Scheme 1 Tautomerization of P₄O₈(NH)₄⁴⁻

【実験方法】

五塩化リンを90℃のクロロベンゼンに溶解させ、ボールミルで粉砕後真空乾燥させた ¹⁵NH₄Cl(¹⁵N: 98%)を添加し、135℃において激しく撹拌しながら16時間反応させた。未反応 のNH₄Clを濾別し、濾液中のクロロベンゼンを減圧下で留去すると、環状クロロホスファ ゼンの三量体と四量体の混合物が得られた。その結晶を 45℃の1,4-ジオキサンに溶解させ た後、酢酸ナトリウム水溶液を加え、約90 rpmでゆっくりと撹拌した。4時間反応後、常 温下で静置し結晶を析出させ吸引濾過した。得られた結晶の濃厚水溶液にアセトンを添加 することで再結晶させ、Na₃P₃O₆(NH)₃・4H₂O(三量体) およびNa₄P₄O₈(NH)₄・3H₂O(四 ¹⁵N NMR、互変異性、プロトン伝導

oまき ひでし、かたおか だいすけ、みずはた みのる

量体)の混合物を得た。その後再び水に溶解させ、溶解度の差を利用して分離を行った。

互変異性挙動を詳細に観察するため、イミノ窒素原子を¹⁵N NMRで観測した。三量体と 四量体の各水溶液(0.1 mol·L⁻¹ in 10 % D₂O)をHClO₄及びNaOHによりpHを変化させ、 ¹H-coupling及び¹H-decoupling条件下で¹⁵N NMRを測定した。また陽イオン交換樹脂により Na型からH型に変換し、真空乾燥後に圧成形を行い、さらに100~200°Cで焼成した試料を 二極式セルを用いた交流インピーダンス法によりイオン伝導度測定を行った。

【結果と考察】

Fig. 1 に三量体と四量体の¹H-coupled ¹⁵N NMR スペクトルを示した。互変異性は pH に大きく依存することが分かる。塩基性領域(> pH 11)では両端および遠方の P 原子とのスピン-スピン結合により多重線に分裂しているが、H 原子とのスピン-スピン結合は全く観測されず、H 原子は N 原子近傍に局在化していない。一方中性領域(pH 6 – 9) では ¹⁵N 核に強く局在化した ¹H 核とのスピン-スピン結合により、さらに二重線に分裂している。酸性領域(<pH 4)では再び単一の三重線に収束し、¹H 核の非局在化が確認された。さらに三量体と四量体の酸解離定数 pK_a はそれぞれ 3.2 および 3.7¹⁾であり、酸性条件下においてリン酸基のプロトネーションによる高磁場シフトが生じた。酸性条件下で新たなプロトンが配位子に結合することで、互変異性が活性化すると考えられる。上記の pH 領域以外では、互変異性による H 原子の交換速度が NMR の時定数 と同程度となり、広幅なシグナルが観測された。

Fig. 2 に交流インピーダンス法により測定した固体状態の H₄P₄O₈(NH)₄のナイキス トプロットを示した。100°C で 3 時間焼成を行った試料では 120°C において 6.54×10⁵ Scm⁻¹であり、その温度依存性から算出した活性化エネルギーは 30.0 kJ であった。こ の活性化エネルギーからプロトン移動に結晶水が関与することが考えられる。150°C で 3 時間焼成を行った試料では伝導度が 1.22×10⁴ Scm⁻¹に上昇し、活性化エネルギ ーが 13.7 kJ に低下した。焼成により環が開裂し、低分子量の生成物が粒界を減少さ せることで、新たなプロトンの伝達経路が形成されたと考えられる。

【謝辞】

本研究で交流インピーダンス測定を行ったH₄P₄O₈(NH)₄は大塚化学株式会社からご 提供頂いたシクロホスファゼン四量体から合成されました。心より感謝申し上げます。 【引用文献】



1) H. Maki, H. Nariai, T. Miyajima, *Polyhedron*, **30**, 903 (2011)



L5

酸素NMR法を用いた有機水和物における水分子の動的挙 動解析

○山田和彦¹,山田眞二²,佐孝和²,出口健三³,清水禎³,渡辺順次¹ ¹東工大院 ²お茶大 ³物材研

A Solid-state ¹⁷O NMR Study of Molecular Dynamics for Water in Organic Compounds

○Kazuhiko Yamada¹, Shinji Yamada², Nodoka Sako², Kenzo Deguchi³, Tadashi Shimizu³ and Junji Watanabe¹

¹Tokyo Institute of Technology, Tokyo, Japan. ²Ochanomizu University, Tokyo, Japan.

³National Institute for Materials Science, Ibaraki, Japan.

We present experimental and theoretical investigations of molecular dynamics for water molecules in 4-nitrostyrylpyridinium chloride and bromide hydrates, as determined by solid-state ¹⁷O NMR.

有機水和物は結晶内に疎水部と親水部を 併せ持ち、chain、tape、sheet、discrete water motifs など様々な結晶水の形状を示すことが知られてい る。 近年、S. Yamadaらは カチオン-π相互作用を通 じて分子が head-to-tail で 配列 する 有機 水 和物 (b) 4-nitrostyrylpyridinium hydratesを報告した [1]。 Fig.1に4-nitrostyrylpyridinium hydratesの分子構造お よび結晶構造を示す。この分子の特徴は、4つの 層状に重なったホスト分子間に結晶水が縦に配列 しwater channelを形成することである。また、湿度 を制御することで水和物の脱離が起こり、脱水和 物と水和物の間で可逆的な構造変化を示す。しか しながら、これら構造変化やwater channelの形成に 関する結晶水の役割、またwater channel内の水分子 の分子運動について不明な点が数多く残っている。 本発表では、固体¹⁷ONMR法と量子化学計算および 分子動力学法を用いた 4-nitrostyrylpyridinium hydratesにおける結晶水の動的挙動解析の結果につ いて報告する。



Fig.1 (a) Molecular structure and (b) packing of 4-nitrostyrylpyridinium hydrates

Fig.2 に 室 温 に お け る (a) 4-nitrostyrylpyridinium bromideおよび(b)脱水和 物の¹³C CPMASスペクトルを示す。結晶水が脱 離したことで、線形並びに¹H-¹³C CP条件が大き く変化した。本研究では温度変化の固体¹⁷0 NMRスペクトルを計測したが、各温度における ¹³C CPMASスペクトルの線形で水和物の脱離 について判断した。非晶性である脱水和物の構 造は明らかになっていないが、channel構造を維 持するためには水和水の存在が必要不可欠と 言える。Fig.3 に 種々の 温度で 測定した 4-nitrostyrylpyridinium chloride \mathcal{O} stationary ¹⁷O NMRスペクトルを示す。163Kから333Kまで結 晶中に存在する水和水の線形が大きく変化し たことから、何らかのmotional averagingの存在 が示唆された。163Kにおいて水分子は静止状態 と仮定すると、263Kまでの分子運動は氷の三回 軸回転(12通り)の再配向運動と良く一致した [2]。つまり、水分子は移動することなく結晶格 子に留まり、温度変化に伴い回転運動の相関時 間が変化したことになる。また、273Kから333K までは、前温度領域と比較すると比較的線幅が 狭い信号を観測した。この温度領域では水和水 はまだ結晶内に存在すること、¹⁷O化学シフト 値が0 ppm(自由水)でないこと、そして緩和 時間や線幅などから、水和水はwater channel 内 をある一定の束縛条件下で並進運動をしてい ると帰属した。陰イオンの種類によって化学シ フト値が異なることから、水分子はイオン結合 を介した運動と推測できる。373Kでは、徐々に 水和水が結晶外に出て自由水となり、最終的に は脱水和物へと構造変化した。これらNMR法の 実験結果に加えて量子化学計算法や分子動力 学法を駆使し、X線構造解析の結果と併せて結 晶水の詳しい動的挙動を解析した。

文献:

[1] S. Yamada, N. Sako, M. Okuda, A. Hozumi

Cryst. Eng. Comm., **2013**, *15*, 199-205. [2] K. Yamada, S. Yamada, N. Sako, T. Shimizu, K.

Deguchi, J. Watanabe *in preparation*





333

373

Fig.3 Stationary ¹⁷O NMR spectra of 4-nitrostyrylpyridinium chloride as a function of temperature, acquired at 11.7 T.

Quick measurement of 1H solid-state NMR at very fast $\ensuremath{\mathsf{MAS}}$

○叶躍奇¹, Michal Maloň¹, Charlotte Martineau², Francis Taulelle², ○西山裕介¹ ¹JEOL RESONANCE Inc., Japan ²University of Versailles, France

Quick measurement of 1H solid-state NMR at very fast MAS

Yue Qi Ye¹, Michal Maloň¹, Charlotte Martineau², Francis Taulelle², OYusuke Nishiyama¹ ¹JEOL RESONANCE Inc., Japan ² University of Versailles, France

A novel method to realize rapid repetition in ¹H NMR at very fast MAS is shown. The very fast MAS at 110 kHz slows the ¹H-¹H spin diffusion, leading to variation of ¹H T_1 relaxation time ¹H atom to atom. However, this different relaxation behavior for each ¹H nucleus is averaged out by applying ¹H-¹H recoupling during relaxation delay even at very fast MAS, reducing the optimal relaxation delay to maximize the signal to noise ratio. The way to find optimal relaxation delay for arbitrary relaxation curve is shown. The reduction of optimal relaxation delay by RFDR was demonstrated on glycine and ethenzamide with one and multi-dimensional NMR measurements.

1. Background

The popular perception¹ is no longer valid at very fast MAS of 110 kHz² that all the ¹H nuclei shear the same T_1 relaxation time in solid samples. The ¹H T_1 relaxation time at very fast MAS is no longer dominated by ¹H-¹H spin diffusion, but determined by intrinsic T_1 relaxation time of each ¹H nucleus. Thus some molecules show huge variation of ¹H T_1 relaxation time among the ¹H nuclei in the same molecule, reflecting the variation of intrinsic ¹H T_1 relaxation time. Some ¹H nuclei show very long T_1 , requiring very long repetition delay τ_{RD} . This is especially problematic in 2D experiments, where numerous number of scan is required for the time-increment in the indirect dimensions. While the origin of this difficulty is partial suppression of ¹H-¹H dipolar interactions by very fast MAS, the ¹H-¹H interaction can actually be reintroduced by rotor-synchronous rf irradiations.

2. Basic principle

We have applied radio-frequency driven recoupling (RFDR) during τ_{RD} to pump the ¹H magnetization to ¹H of long T_1 out of ¹H of short T_1 (Figure 1)³. In the current experiments

Very fast MAS, ¹H T_1 relaxation, solid-state NMR

よう やくき, まろにゅ みはる, まーてぃのー しゃるろっと, とうれーれ ふらんしす, 〇にしやま ゆうすけ

we apply RFDR before all the ¹H reach full recovery. After relatively short delay, a part of ¹H nuclei is polarized again while the others are still close to saturated. RFDR reintroduces ¹H-¹H spin diffusion and thus averages the magnetization, transferring those magnetizations from short T_1 nuclei to long T_1 nuclei. After repeating this procedure several times, all the nuclei are polarized within the period shorter than longest T_1 relaxation time.



Figure1. Pulse schemes used in the general experiments. equally spaced *m* RFDR trains

The

can be applied during $\tau_{\rm RD}$. In the current experiments, m = 3were used and each RFDR RFDR on / off consists of 96 π pulses.

3. Optimal relaxation delay

The SNR per unit time T can be written by

$$\mathrm{SNR} \propto T^{1/2} S(\tau_{\mathrm{RD}}) \tau_{\mathrm{RD}}^{1/2}, \qquad (1)$$

where $S(\tau_{\rm RD})$ is the signal intensity after $\tau_{\rm RD}$ from the previous scan, i.e. just before the succeeding scan. This equation is valid for any $S(\tau_{\rm RD})$ functions, which can be easily obtained from saturation recovery measurements. The SNR per unit time can be calculated by applying the window function of $\sqrt{\tau_{\text{RD}}}$, thus we can easily obtain the optimal repetition time and maximal SNR per unit time. This approach can be applied regardless of RFDR irradiation during the $\tau_{\rm RD}$ delay.

4. experiment

the NMR measurements were performed on JNM-ECA600 (JEOL All RESONANCE Inc.) at a static magnetic field of 14.1T. The standard double resonance probes equipped with 0.75 mm MAS or 1 mm MAS stators (JEOL RESONANCE) were used. 96 π pulses were applied for each RFDR train, so that the total length of the RFDR train is 1.37 ms at 70 kHz MAS. The ¹H SQ/SQ homonuclear correlation (HOMCOR) spectra were obtained by conventional three $\pi/2$ pulse experiments, and ¹H DO/SO HORMOR were by using BABA-xy16 pulses. The ¹H/¹³C heteronuclear correlation (HETCOR) and ¹³C CPMAS were observed by RAMP-CP.

5. Results and discussion

Figure 2 shows the ¹H T_1 relaxation time of glycine at various spinning frequencies up to 110 kHz MAS. The ¹H T_1 relaxation time of each peak start to separate each other at faster MAS; the ¹H T_1 relaxation time is ranging from 0.23 s to 1.75 s differing 7.6 times at 110 kHz MAS. Circles and triangles in Figure 3(a) show the ¹H saturation recovery curve of



Figure 2. ¹H T_1 relaxation time of glycine at various spinning frequencies from 20 kHz to 110 kHz MAS at 14.1 T.



CH₂ protons of glycine at 100 kHz MAS with and without RFDR during τ_{RD} , respectively. The recovery curve at the intermediate τ_{RD} is definitely different between with and without RFDR. RFDR enhances the growth of ¹H magnetization in the CH₂ moiety by transferring the magnetization from 1 H in the NH₃⁺ moiety. It seems the difference between with and without RFDR is rather small, but SNR per unit time is greatly affected by RFDR. Figure 3(b) shows the SNR per unit time with applying $\sqrt{\tau_{\rm RD}}$ window function to Figure 3(a). The improvement of RFDR in CH_2 protons is clearly seen in Figure 3 (c); RFDR shortens the optimal $\tau_{\rm RD}$ from 1.80 s to 0.60 s, enabling rapid scans. Note that the optimal $\tau_{\rm RD}$ of 0.60 s is much shorter than T_1 of 1.45 s. Even

with this quick repetition, the maximal SNR with RFDR at τ_{RD} of 0.60 s shows 30% improvement than the maximal SNR without RFDR at τ_{RD} of 1.8 s.

Figure 3. (a) the signal intensities of $S(\tau_{\rm RD})$ of

glycine CH₂ protons at 100 kHz MAS measured by saturation recovery experiments with (triangles) and without (circles) RFDR irradiation during τ_{RD} . (b) SNR per unit time obtained by applying $\sqrt{\tau_{RD}}$

window function to (a).

The current method is demonstrated on a pharmaceutical molecule of ethanzamide, which is widely used as a common analgesic and anti-inflammatory drug. Figure 4 shows the reduction of optimal τ_{RD} by RFDR train. The optimal repetition times with and without RFDR for each ¹H are determined by saturation recovery curve with the $\sqrt{\tau_{RD}}$ window function. The optimal τ_{RD} is ranging from 3.5 s to 120 s if no RFDR is applied, requiring a τ_{RD} of 120 s. On the other hand, RFDR greatly reduces the variation which is 8 s to 25 s; ¹H nuclei with very long T_1 shows significant decrease of optimal τ_{RD} with RFDR irradiations and the others are rather lengthened. The results clearly show that the averaging of ¹H magnetization by RFDR realizes the quick and efficient repetition by quick polarization of ¹H nuclei with long T_1 relaxation time.



Figure 4. Optimal τ_{RD} to maximize SNR per unit measurement time for ethenzamide at 70 kHz MAS. The data were collected 1 mm MAS probe at 14.1 T with (triangle) and without (circle) RFDR.

The effectiveness of RFDR irradiation is demonstrated in multi-dimensional experiments. Figure 5 shows ¹H-¹H DQ-SQ and SQ-SQ HOMCOR $^{1}\text{H}-^{13}\text{C}$ experiments. and HETCOR experiments of ethenzamide at 70 kHz MAS with and without RFDR. We need τ_{RD} of 25 s and 120 s to avoid signal suppression with and without RFDR, respectively. However, we have applied a repetition delay of 12 s for make all the experiments to total measurement time reasonable. As clearly shown in the spectra the signals around 8 ppm is partly suppressed due to too quick repetition if no RFDR is applied. On the other hand, RFDR recover these signal intensities and enables to observe these peaks.



Figure 6.The comparison of 2D spectra without (a, c, e) and with (b, d, f) RFDR irradiation (m = 3) during τ_{RD} . (a, b) ¹H DQ/SQ HOMCOR, (c, d) ¹H SQ/SQ HOMCOR, and (e, f) ¹H-¹³C HETCOR spectra of ethenzamide at 70 kHz MAS. Each pair of spectra is plotted in the same contour level.

References

[1] J.E. Anderson et al., J. Phys. Chem. 69 (1965) 3099-3104

[2] S. Parthasarathy et al., Acc. Chem. Res., in press.

[3] A. E. Bennett et al., J. Chem. Phys. 96 (1992) 8624; A. E. Bennett et al. J. Chem. Phys. 108 (1998) 9463.

The Paramagnetic Effects of Iron Ion in Nitrogen-Doped Carbon ORR Active Electrochemical Catalysts •Shigeki Kuroki¹, and Hideyuki Hara² ¹Department of Organic and Polymeric Materials, Tokyo Institute of Technology, Tokyo, Japan. ²Bruker Biospin Japan, Kanagawa, Japan.

Iron-containing and iron-free ¹⁵N labeled polyanilines (PANI) are prepared as a precursor of N-doped carbon electrochemical oxygen reduction catalysts in polymer electrolyte fuel cells (PEFCs). The oxygen reduction reaction (ORR) activity of iron-containing PANI is much higher than that of iron-free PANI. The ESR spectra show that iron-containing PANI contains Fe³⁺ high spin state ions and also ¹⁵N solid-state NMR spectra shows the large paramagnetic shift of nitrogen which is the evidence of the Fe-N coordination existence.

INTRODUCTION: After Jasinski¹ first reported that transition metal porphyrins and phthalocyanines display electrocatalytic activity towards ORR, it has been found that active ORR catalysts can be synthesized by pyrolyzing a wide variety of transition metal, carbon and nitrogen-containing precursors at high temperature.² However, there is much disagreement in the literature regarding the nature of the active sites for ORR. Some researchers have proposed that the Fe-N₄/Fe-N₂ center bound to the carbon support is catalytically active, and that the central Fe plays a crucial role in ORR. Others have proposed that the transition metal (e.g., Fe or Co) may not itself be part of the active site, but rather serves to catalyze the formation of active sites. In this work, iron-free and iron-containing ¹⁵N labeled polvaniline (PANI) is prepared as other kind of precursor of N-doped carbon catalysts and is pyrolyzed at The ORR activity of these samples is evaluated and the several different conditions. solid-state(SS) ¹⁵N NMR and ESR spectra of these samples are measured. Finally, we discuss the relationship between the ORR catalytic activity and nitrogen species in N-doped carbon catalysts.

EXPERIMENTAL: ¹⁵N-labeled PANI was obtained by the polymerization of ¹⁵N-labeled aniline. The ¹⁵N-PANI was dispersed in FeCl₃ aqueous solution (PANIFe). The obtained PANI and PANIFe were pyrolyzed under a flow of N₂ gas for 1 hour at 800°C (PANIFe800, PANI800). PANIFe800 was stirred in conc. HCl for 2 hr and then filtered (PANIFe800aw). PANIFe800aw was repyrolyzed under a flow of N₂ gas for 1 hour at 800°C and washed in conc. HCl (PANIFe800aw800aw). Further, PANIFe800aw800aw was repyrolyzed under a flow of NH₃/N₂ gas for 1 hour at 700, 800 and 900 °C and washed in conc. HCl (PANIFe800aw800aw700NH₃aw, PANIFe800aw800aw800AW3aw and PANIFe800aw800aw900NH₃aw).

The catalytic activity of the samples was tested by liner sweep voltammetry (LSV, 1 mV sec^{-1}) with a rotating disk electrode (RDE).

Paramagnetic NMR shift, Fe-nitrogen doped carbon, Oxygen reduction

○くろきしげき,はらひであき

ESR measurements were carried out on a Bruker Biospin EMX EPR spectrometer at 100 K in X-frequency band. $SS^{-15}N$ NMR measurements were carried out on a Bruker Biospin Avance DSX-300 NMR spectrometer at 7.05 T. The observed frequency of ¹⁵N was 30.42 MHz. The $\pi/2$ pulse width was 3.0 us for both ¹⁵N and ¹H. The MAS speed was set to 14 kHz. ¹⁵N chemical shifts were calibrated indirectly through external glycine-¹⁵N (δ = 11.59 ppm; line width = 17 Hz) relative to saturated ¹⁵NH₄NO₃ ($\delta = 0$ ppm) solution in H₂O.

RESULTS AND DISCUSSION: The electrocatalytic activity for ORR of the PANI and PANIFe samples was tested by RDE voltammetry. The iron-free PANI samples show quite poor catalytic activity for ORR, whilst the iron-containing PANIFe show better catalytic activity compared with iron-free PANI. After the NH₃/N₂ heat treatment, the ORR activity of PANIFe improve more higher.

Fig. 1 shows ESR spectra of PANIFe

catalysts. The signal at g = 4.26 is assigned to Fe³⁺ high spin state in low symmetric six-coordinate iron complex. Also some different signals appear at g = 2.62, 2.26, 2.12, 2.00 and 1.67 which will be assigned to the different type Fe³⁺ in coordinate iron complex. Fig. 2 shows SS ¹⁵N NMR spectra of PANIFe catalysts. The peak at 145 and 255 ppm are assigned to graphitic and pyridinic nitrogens, respectively from our previous work.³ Further, the broaden peak at 1350 ppm is observed. This large chemical shift come from the paramagnetic effects (fermi contact shift) from iron ion. This is the evidence of the Fe-N coordination existence.

Acknowledgments: The author acknowledges the financial support from a Grant-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Science, Culture and Sports of Japan (24560818) and the New Energy and Industrial Technology Development Organization (NEDO).

References

- 1. R. Jasinski, Nature, 1964, 201, 1212-1213(1964).
- S. Kuroki, Y. Hosaka, C. Yamauchi, M. Sonoda, Y. Nabae, M. Kakimoto, S. Miyata, Journal of the Electrochemical Society. 159, F309-315 (2012).
- 3. S. Kuroki, Y. Hosaka, C. Yamauchi, Carbon 55, 160-167 (2013).



Fig.1 The ESR spectra of PANIFe ORR catalysts at 100 K.



Fig.2 The SS ¹⁵N NMR spectra of PANIFe ORR catalysts.

縮合系合成高分子の溶液NMR構造解析 〇松田裕生¹, 菅沼こと¹, 朝倉哲郎^{2,3} ¹帝人・構造解析研究所 ²農工大院・工、³分子研

Structural analysis of condensation polymers using NMR

OHironori Matsuda¹, Koto Suganuma¹, Tetuo Asakura^{2,3}

¹ Material Analysis Research Laboratories, Teijin Ltd., Tokyo, Japan.

² Department of Biotechnology, Graduate School of Engineering, Tokyo University of

Agriculture and Technology, Tokyo, Japan.

³*Institute for Molecular Science, Aichi, Japan.*

In the condensation copolymers, the sequence analyses have been almost limited to the short-range level. One of the reasons is that the large repeating monomer units in the chain limit the NMR peak splitting. So, the development of the analytical technique for the more detailed microstructures of the condensation polymers is necessary. In this experiment, the sequence analyses of some terephthalic copolyesters and fully aromatic copolyamides were performed using uncommon solvents by ¹H or ¹³C NMR.

合成高分子材料のNMR解析が多くの会社の分析部門で毎日のように行われている。 末端基や立体規則性やモノマー連鎖分布などのように、そもそも物理的に分離する ことができないものを解析するときは、それらに由来するNMRピークをスペクトル 上で分離観測することが必要となる。一方、溶解溶媒を工夫できることは溶液NMR の大きな特長と言え、重なるピークを分離観測する "魔法の溶媒" 探しは溶液NMR の楽しみでもある。分離観測したピークは帰属してはじめて意味を持ち、いかに帰 属するかもNMR の醍醐味のひとつである。

本講では、共重合ポリエステルおよび共重合ポリアミドのモノマー連鎖分布解析 において、溶媒の工夫によって連鎖構造を反映したピークの分離と帰属を行った事 例を紹介する。また、DL 共重合ポリ乳酸についても時間があれば紹介したい。

1. 共重合ポリエステルのモノマー連鎖分布解析事例

PET/PBT 共重合体の例のように、酸成分1種、グリコール成分2種から成るテレフ タル酸系共重合ポリエステルのモノマー連鎖分布解析は¹³C NMR で行われるが、長 時間測定となるため会社で働く分析者としては悩ましい。また、dyad という短距離 連鎖構造の解析となるため、複雑共重合体の共重合状態の詳細な解析にも限界があ る。そこで、従来法の課題を克服した、新たなモノマー連鎖分布解析法を開発した。 すなわち、¹H 測定によって、これまで着目されていなかったグリコール成分を中心 モノマー成分としたときの、グリコール成分の関する triad 構造を反映したピーク を分離観測するための測定条件を見出した(Figure 1)。この方法は複雑共重合体に も適用でき、共重合状態の詳細をこれまで以上に分析できるようになった。

ポリエステル,ポリアミド,モノマー連鎖分布 〇まつだひろのり,すがぬまこと,あさくらてつお

2. 共重合ポリアミドのモノマー連鎖分布解析事例

弊社では高強力高弾性繊維テクノーラ®を製造販売している。このポリマーは酸成 分1種とジアミン成分2種から成る全芳香族共重合ポリアミドである。2種のジアミ ン成分のモノマー連鎖分布が物性にとって重要な構造因子となると考えられるが、 NMR測定溶媒が制限され、モノマー連鎖分布解析ができずに課題となっていた。溶解 溶媒を種々検討し、最後の手段として、ポリマーの分解を覚悟して超強酸であるトリ フルオロメタンスルホン酸を検討したところ、dyad構造を反映したピークを分離観測 することに成功した(Figure 2)。帰属のため、連鎖構造を制御したモデルポリマー を合成し、化学シフトを比較すること

で各dyad構造に帰属できた (Figure 3)。 そして、ジアミン成分 2 種はランダム 共重合であることが決まった。



Figure 1. Expanded 600 MHz ¹H-NMR spectra (The alcoholic CH₂ proton region) of poly(ethylene/butylene terephthalate) copolymer in 75/25 (v/v) mixture of *o*-chlorophenol/deuterated chloroform at 80 °C.

合成高分子の溶液NMRには歴史がある が、何気なく会社で使っているNMR溶媒 も、先入観を持たずに、目的に応じて溶 媒を工夫し使いこなすことの重要性を、 本事例を通して学んだ。



Figure 2. Expanded 100 MHz ¹³C NMR spectra (the carbonyl carbon region) of the Technora® polymer in some solvent conditions.



Figure 3. Expanded 100 MHz 13C NMR spectra (the carbonyl carbon region) of the Technora® polymer and the model polymers in trifluoromethanesulfonic acid at 100°C.

[参考文献]

- (1) Matsuda, H.; Asakura, T.; Miki, T. Macromolecules 2002, 35, 4664.
- (2) Matsuda, H.; Asakura, T.; Nagasaka, B.; Sato, K. Macromolecules 2004, 37, 4651.
- (3) Matsuda, H.; Nagasaka, B.; Asakura, T. Polymer 2003, 44, 4681.
- (4) Matsuda, H.; Asakura, T.; Nakagawa, Y.Macromolecules 2003, 36, 6160.
- (5) Matsuda, H.; Asakura, T. Macromolecules 2004, 37, 2163.

鉄鋼業における固体 NMR の活用

○金橋康二 新日鐵住金(株)先端技術研究所

Application of solid-state NMR to steel industry

OKoji Kanehashi

IL2

Advanced Technology Research Laboratories, Nippon Steel & Sumitomo Metal Corporation

We have applied NMR (especially solid-state NMR) to structural analysis of a variety of industrial materials, e.g. coal and slag. Since these materials often are structurally complex, poorly crystalline and insoluble in any solvents, multinuclear solid-state NMR is a powerful tool for analysis of chemical structure and dynamics. Some examples of NMR application in our company are shown in the presentation.

製鉄プロセスは、上工程(製銑、製鋼)から下工程(圧延、表面処理)までの連続処理 プロセスであり、その過程においては、石炭や鉄鉱石、スラグ(鉱滓)、有機皮膜等、非常 にバラエティに富んだ材料を取り扱っている。鉄鋼の高度な組織制御による性能向上のメ カニズムを明らかにするために、電子顕微鏡を始めとした組織観察技術は鉄鋼業にとって 不可欠であるのと同時に、原子・分子レベルの化学構造の視点から原燃料(石炭・鉄鉱石) や副産物(スラグ)の有効活用法を提案していくことが重要となっている。今回の発表で は固体 NMR を中心に、NMR 解析技術が鉄鋼業においてどのような役割を果たしているの かについて触れたい。以下に当社での NMR 活用事例を挙げる。

①石炭の化学構造視点からの有効利用法の提案¹⁾⁻⁹⁾

近年の原燃料の高騰や良質資源の枯渇が懸念される中、安価な石炭をいかにうまく利用 していくかは経営的観点からも非常に重要である。天然物である石炭は多元素からなる非 常に複雑な材料であるが、各元素別の化学構造情報が得られる多核固体 NMR を駆使して、 その中味を明らかにし、炭素成分の骨格構造^{1),2)}や灰分の鉱物相¹⁾⁻⁹⁾に着目した石炭評価法 を構築した。

②スラグ膨張因子の高精度定量分析^{10),11)}

高炉や転炉で副産物として発生するスラグの有効利用を促進する上で、スラグを構成す

固体 NMR、石炭、スラグ

○かねはしこうじ

る無機酸化物の構造や存在量を明らかにすることが重要である。我々は多核 NMR を用い て多成分からなるスラグの骨格構造を決定するとともに¹²⁾⁻¹⁴⁾、スラグ中に存在する MgO¹⁰⁾ やエトリンガイト¹¹⁾等の水和膨張の原因となる化合物の定量に固体 NMR が有効であるこ とを示した。

先にも述べたが、製鉄プロセスは多種多様な材料を取り扱う複雑なプロセスであること から、様々な分析・解析技術を駆使して解を導くことが重要である。NMR は他の分析・解 析手法に比べて測定感度が圧倒的に低いというデメリットがあるが、NMR のメリットを活 かして「NMR でも得られる結果」ではなく、「NMR でしか得られない結果」を導き出すべ く、様々な材料系に対して NMR を適用中である。

文献

- 1) K. Saito, K. Kanehashi, I. Komaki, Annual Reports on NMR Spectroscopy, 44 (2001) 23.
- 2) 齋藤公児, 金橋康二, 日本エネルギー学会誌, 90 (2011) 474.
- 3) 金橋康二, 齋藤公児, 鉄と鋼, 88 (2002) 28.
- 4) K. Kanehashi, K. Saito, Fuel Processing Technology, 85 (2004) 873.
- 5) K. Kanehashi, K. Saito, Energy & Fuels, 18 (2004) 1732.
- 6) 藤部 康弘, 金橋 康二, 畠山 盛明, 齋藤 公児, 鉄と鋼, 93 (2007) 176.
- 7) T. Takahashi, S. Kashiwakura, K. Kanehashi, T. Nagasaka, Energy & Fuels, 23 (2009) 1778.

8) S. Hayashi, T. Takahashi, K. Kanehashi, N. Kubota, K. Mizuno, S. Kashiwakura, T. Sakamoto, T. Nagasaka, *Chemosphere*, **80** (2010) 881.

9) T. Takahashi, S. Kashiwakura, K. Kanehashi, S. Hayashi, T. Nagasaka, *Environ. Sci. Technol.*, **45** (2011) 890.

- 10) 金橋康二, 相本道宏, 鉄と鋼, 99 (2013) 543.
- 11) 金橋康二, 相本道宏, セメント・コンクリート論文集, 66 (2012) 266.

12) 金橋康二, 畠山盛明, 齋藤公児, 松宮徹, 鉄と鋼, 89 (2003) 27.

- 13) K. Shimoda, Y. Tobu, K. Kanehashi, T. Nemoto, K. Saito, J. Non-Cryst. Solids, 354 (2008) 1036.
- 14) 金橋康二, 下田景士, 齋藤公児, 鉄と鋼, 95 (2009) 1.

IL3

多孔性ソフト結晶材料の化学と応用

○北川 進¹, 犬飼 宗弘¹, 堀毛 悟史^{2,3},
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, ³JST-さきがけ

Chemistry and Application of Porous Soft Materials

OSusumu Kitagawa¹, Munehiro Inukai¹, and Satoshi Horike^{2,3} ¹Institute for Integrated Cell-Material Sciences (iCeMS), Kyoto University, Kyoto, Japan. ²Department of Synthetic Chemistry and Biological Chemistry Kyoto University, Kyoto, Japan. ³PREST, Japan Science and Technology Agency

Coordination framework materials with microporosity, namely porous coordination polymers (PCPs) or metal-organic frameworks (MOFs), are promising candidates for use as molecular-based materials for gas-storage, separation, ion-transport, sensing and catalysis. This is because of the designability of the framework topology, the pore size, and the pore surface functionality as a means to tune their porous functions. We have discovered soft PCP crystals and developed their unique functions using NMR and X-ray crystallography.

1. 序論

金属イオンと有機配位子を配位結合によって組み上げられた多孔性配位高分子(PCPまたは MOF)は、近年益々活発に研究が行われている。我々のグループでは、ゼオライト様の堅牢な 細孔を持つPCPに加え¹⁾、ゲスト分子の吸脱着に伴うホスト骨格の構造が大きく変化する柔軟 なフレームワークを持つソフト多孔性機能の研究をしている²⁾。これを用いてこれまで不可 能とされてきた混合物や気体の分離、捕獲、大量貯蔵、触媒、光応答性やポリマー合成など の多様な機能を実現することができつつある。本講演では結晶でありながらゲストに応答す る動的な構造を有するソフトなPCPの研究にNMR法がきわめて有力であることを例をあげて述 べる。

2. 吸着・分離のための動的細孔

多くのPCP細孔表面は、金属イオンとテレフタル酸やピラジンのような平面状の有機配位子に よって構成されており、ゲスト分子の吸脱着を伴って有機配位子の運動モードが変化するこ とが考えられる。細孔表面の物性は吸着現象に大きく影響する可能性があるにもかかわらず、 細孔表面の動的挙動に注目した研究例は少なく、未解明な点が多い。我々はいち早く動的細 孔に注目し、有機配位子の運動モード解析を⁹H 固体NMRなどを用いて明らかにしてきた。 例えば、3次元細孔を有するPCPにベンゼンを吸着させたところ、ベンゼンの立体障害を受け て、有機配位子の回転が凍結することを⁹H 四極子エコー法によって初めて明らかにした³⁾。 また、PCPをナノ化することで、細孔表面の動的挙動を制御することにも成功している⁴⁾。PCP の結晶サイズを5×20 μmから50×320 nmへダウンサイズを行い、⁹H 四極子エコー法を用いて 有機配位子の運動モードを解析した。結果、ダウンサイズにより、有機配位子の回転周波数 が約4 MHzから10 MHz以上に向上していることが明らかとなった。今後、得られた知見を元に、 細孔表面の運動を利用したガス吸着挙動の制御や分離などの応用展開が期待できる。

3. ゲスト分子の高速運動が引き起こすイオン伝導

イオン伝導は、細胞内のイオンチャネルや燃料電池の電解質などで幅広く観測される物理現象である。我々は、PCPの細孔や骨格をイオン伝導の場として用いており、その伝導挙動をPCP にて制御することを目的としている。細孔内に包接させたゲスト分子やPCP骨格の運動は、イ オン伝導の駆動力となるため、固体NMRや拡散NMRによる解析は、伝導挙動を深く理解する上で非常に重要である。Figure 1にプロトンがイミダゾールを介してバケツリレーのように(グロッタス機構)細孔内を高速輸送していると考えることができる例を示した⁵⁾。



Figure 1. PCP-イミダゾール複合体のプロトン伝導度と²H 四極子エコースペクトル

4. ポリマーの構造・運動

PCPは高い規則性の細孔を有しており、細孔サイズ・形状、細孔表面の化学特性などを精密に 制御することが可能である。この制御可能な機能性ナノ空間をポリマー合成の場として利用 することで、従来法では不可能であった高分子鎖の配列・集積制御、及びに重合制御法の開 発を行っている。

例えば、規則的な一次元細孔内で連結化と架橋を行ったポリスチレンは、電子顕微鏡、粉末X 線回折、及びに2D¹H⁻¹³C PMLG HETCOR NMR法により、配向が制御され、整列状態であること が確認できた。整列状態のポリスチレンは高分子鎖同士が架橋されており、耐溶剤・耐熱性 を有している⁶⁾。本手法は他のビニル高分子にも応用することが可能であり、耐溶剤・耐熱 性を備えた高強度スーパーエンプラの新しい合成法として期待できる。加えて²H 四極子エコ ー法により、細孔内に拘束されたポリスチレンが、バルク状態のポリスチレンには見られな いようなほぼ均一な運動モードを有していることも明らかにした。細孔内に拘束されたポリ スチレンは、一本の引き延ばしたポリスチレンのような特異的な構造を有しており、複数の ポリスチレンが絡み合ったバルク状態と比べて、大きく異なる動的挙動を引き起こしたと考 えられる⁷⁾。

S. Kitagawa, R. Kitaura, S. Noro, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2004, 43, 2334.
S. Horike, S. Shimomura, S. Kitagawa, *Nat. Chem.*, 2009, 1, 695.
S. Horike, R. Matsuda, D. Tanaka, S. Matsubara, M. Mizuno, K. Endo, S. Kitagawa, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2006, 45, 7226.
Y. Hijikata, S. Horike, D. Tanaka, J. Groll, M. Mizuno, J. Kim, M. Takata, S. Kitagawa, *Chem. Commun.*, 2011, 47, 7632.
S. Bureekaew, S. Horike, M. Higuchi, M. Mizuno, T. Kawamura, D. Tanaka, N. Yanai, S. Kitagawa, *Nat. Mater.*, 2009, 8, 831.
G. Distefano1, H. Suzuki, M. Tsujimoto, S. Isoda, S. Bracco1, A. Comotti1, P. Sozzani1, T. Uemura, S. Kitagawa, *Nat. Chem.*, 2013, 5, 335.
T. Uemura, S. Horike, K. Kitagawa, M. Mizuno, K. Endo, S. Bracco, A. Comotti, P. Sozzani, M. Nagaoka, S. Kitagawa, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, 130, 6781.

Porous Coordination Polymers, Metal-Organic Frameworks, Dynamic Framework 〇きたがわすすむ、いぬかいむねひろ、ほりけさとし

○富宅喜代一 神戸大院理

Development of NMR Spectroscopy for Mass-selected Molecular Ions

OKiyokazu Fuke

Graduate School of Science, Kobe University, Kobe, Japan.

NMR technique is a powerful tool to study the physical and chemical properties of materials in wide area. However, this technique is limited for the materials in condensed phase. Although this technique is also highly expected to use for mass selected gas-phase ions in both fundamental and applied sciences, the method to extend to the gas-phase ions is not reported yet. In this presentation, we introduce a new principle of the detection of NMR for the gas phase ions based on a "magnetic resonance acceleration" technique and an apparatus, which we are developing. We also present the experimental techniques and the results on the formation and manipulate of cold ion packets in a strong magnetic field, which are the key techniques to detect the NMR based on the present principle of measurement.

本研究では気相イオンに適用可能なNMR分光法の開発を進めている。従来のNMR法では熱 平衡で発生する核スピン状態間の僅かなポピュレーション差を吸収・発光法により検出する ため、共鳴信号の検出感度は非常に低い。このため濃度の希薄な気相への適用は困難である。 気相でのNMR分光については、中性分子線の磁気共鳴分光がNMRの原点としてRabiやRamsey らにより開発されているが、気相イオンについては応用できない。しかし近年の質量分析技 術の進歩と相俟って気相イオンの研究が非常に盛んになり、汎用性の高い構造解析法が希求 されている。ここではイオントラップを用いたシュテルンーゲルラッハ型 (Fig. 1)の新しい磁 気共鳴検出原理を提案し気相NMR分光法の開発を進めている。¹⁾本法では非常に弱い磁気相 互作用で発生するスピン分極を飛行時間差測定で検出するため、低速でかつ速度分布の非常



はたり速度力相の非常に狭い試料イオン束を 用意する必要がある。こ のためイオンの運動を 精密制御し、並進速度分 布を冷却する技術が必 要となる。講演では、イ オンの冷却技術や新し いNMR法の原理検証と 分光への応用の課題を 議論する。



(文献) 1) Fuke, K. et al., Rev. Sci. Instrum. 2012, 83, 085106-1-8.

糖鎖の機能解明を目指したNMRアプローチ

○加藤晃一^{1, 2, 3, 4} ¹自然科学研究機構・岡崎統合バイオ/分子研 ²名市大・院薬 ³お茶大・糖鎖セ ⁴グライエンス

NMR approaches for elucidating the functional roles of glycans

 OKoichi Kato^{1, 2, 3, 4}
¹Okazaki Institute for Integrative Bioscience and Institute for Molecular Science, National Institutes of Natural Sciences, Okazaki, Aichi, Japan.
²Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University, Nagoya, Japan.
³The Glycoscience Institute, Ochanomizu University, Tokyo, Japan.
⁴GLYENCE Co., Ltd., Nagoya, Japan.

The sugar chains displayed on proteins and lipids play pivotal roles in various molecular recognition events on cell surfaces and in intracellular environments. The intermolecular interaction systems involving the carbohydrate moieties could be potential therapeutic targets for various diseases. However, structural analyses of glycoconjugates remain challenging because of flexible properties of the sugar chains. In view of this situation, we have been developing NMR methodology in conjunction with other biophysical techniques for characterizing dynamic conformations and interactions of glycoconjugates.

In this presentation, I present new carbohydrate NMR techniques exploiting the effects of introduced paramagnetic probes and stable isotopes to target glycans. Our NMR approach is also presented for characterization of glycolipid clusters as unique platforms for interactions of amyloidogenic proteins associated with neurodegenerative disorders.

糖鎖は核酸・タンパク質と並ぶ第3の生命鎖と称され、生命現象の様々な局面で重要な機能を発揮している。糖鎖はタンパク質の溶解性や安定性といった物理化学的性状を規定しているばかりでなく、細胞内外における生理的分子間相互作用を制御している。その一方で、糖鎖はウィルス感染、自己免疫疾患、神経変性疾患に関わるタンパク質との相互作用を媒介している。したがって、糖鎖が関わる相互作用系は疾患予防・治療の標的として有望である。また、抗体医薬に代表されるバイオ医薬品の開発・ 生産において、糖鎖の取り扱いは重要な課題となっている。しかしながら、糖鎖が構造の不均一性と高い運動性をもつがゆえに複合糖質の構造解析は困難を伴う。

私たちは糖鎖が担う生命情報を読み解くことを目指し、上記の問題を克服して体系 的な複合糖鎖の構造解析の方法論の構築に取り組んできた。これにより、複合糖質の 動的な立体構造と相互作用を原子レベルで解析することが可能となってきている。

Oligosaccharide, Paramagnetic effect, Stable isotope labeling,

○かとうこういち

一般に、タンパク質の NMR 構造解析においては、核オーバーハウザー効果 (NOE) を利用した立体構造解析法が確立されている。一方、糖鎖は一般にプロトン密度が低 いため、近距離にあるプロトン間の距離情報を反映する NOE を観測し、これに基づ いて構造解析を行うことは容易ではない。さらに、糖鎖は複雑な分岐構造に加え、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。私 たちは、糖鎖の還元末端に常磁性プローブを導入することによって、糖鎖の立体構造 のダイナミクスにアプローチする方法を開発することに成功した。例えば、ランタニ ドイオンを用いた常磁性プローブの導入により、ロングレンジの分子構造情報を反映 した擬コンタクトシフト(PCS)の観測が可能となる。酵母変異体を用いて調製した 安定同位体標識糖鎖の還元末端へ EDTA 誘導体を連結した。得られた試料にランタニ ドイオンを添加した後、高磁場 NMR 計測によって糖鎖の各原子の化学シフト変化か ら PCS 値を定量的に計測し、立体構造情報の収集を行った。一方、分子動力学計算を 実施することで糖鎖の立体配座空間を探査し、それによって得られた多数のコンフォ マーを考慮した3次元構造モデルからPCSの理論値を算出した。これと実験値との比 較を行うことで構造サンプリングの適切さを評価した。その結果、水溶液中における オリゴ糖鎖のダイナミックなコンフォメーション変化を明らかにすることができた。 ところで、糖鎖は細胞表層でクラスターを形成して協奏的に働くことによって単一 分子では実現し得ない機能を発揮していると考えられている。こうした分子クラスタ ーは弱く過渡的な分子間相互作用の集積のうえに成り立っているために、その構造は タンパク質複合体などに比べて遥かに不安定で流動的であると考えられる。このこと が、構造生物学的アプローチによる糖鎖研究を困難にするもう1つの大きな要因であ る。私たちは、こうした問題を克服して糖鎖クラスターを舞台とする分子間相互作用 の実体解明に取り組んでいる。アルツハイマー病を引き起こすアミロイドβをはじめ 神経変性疾患に関わるタンパク質とガングリオシドクラスターとの特異的相互作用 に関して、NMR 解析を通じて得られた知見も紹介したい。

参考文献

- 1) K. Kato, Y. Yamaguchi, and Y. Arata, Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc. 56, 346-359 (2010).
- 2) M. Yagi-Utsumi, T. Kameda, Y. Yamaguchi, and K. Kato, FEBS Lett. 584, 831-836 (2010).
- 3) M. Yagi-Utsumi, K. Matsuo, K. Yanagisawa, K. Gekko, and K. Kato, *Int. J. Alzheimer's Dis.* 2011, e925073 (2011).
- 4). Y. Kamiya, S. Yamamoto, Y. Chiba, Y. Jigami, and K. Kato, J. Biomol. NMR 50, 397-401 (2011).
- 5) S. Yamamoto, T. Yamaguchi, M. Erdélyi, C. Griesinger, and K. Kato, "Chem. Euro. J. 17, 9280-9282 (2011).
- S. Yamamoto, Y. Zhang, T. Yamaguchi, T. Kameda, and K. Kato, *Chem. Commun.* 48, 4752-4754 (2012).
- 7) Y. Zhang, S. Yamamoto, T. Yamaguchi, and K. Kato, Molecules 17, 6658-6671 (2012).
- 8) T. Yamaguchi, T. Uno, Y. Uekusa, M. Yagi-Utsumi, and K. Kato, Chem. Commun. 49, 1235-1237 (2013).
- 9) Y. Kamiya, K. Yanagi, T. Kitajima, T. Yamaguchi, Y. Chiba, and K. Kato, *Biomolecules* **3**, 108-123 (2013).
- 10) T. Yamaguchi, Y. Kamiya, Y.-M. Choo, S. Yamamoto, and K. Kato, Chem. Lett. 42, 544-546 (2013).



Day 2 (Nov. 13, Wed) (English Session)

木質バイオマスを溶液NMR法で解析する為の方法論の開 発とその応用

岡村英保^{1, 2}, 西村裕志^{3,2}, 今村良教⁴, 小澤佑¹, 寺島典二⁴, 松下泰幸⁴, 福島和彦⁴, 渡辺隆司^{3,2}, 〇片平正人^{1,2} ¹京大・エネルギー理工学研究所, ²JST・CREST ³京大・生存圏研究所, ⁴名大院・生命農学研究科

Development and application of the methodology to investigate wood biomass by solution NMR

Hideyasu Okamura^{1, 2}, Hiroshi Nishimura^{3,2}, Yoshinori Imamura⁴, Yu Kozawa¹, Noritsugu Terashima⁴, Yasuyuki Matsushita⁴, Kazuhiko Fukushima⁴, Takashi Watanabe^{3,2}, and OMasato Katahira^{1,4} ¹Institute of Advanced Energy, Kyoto University, Kyoto, Japan. ²CREST, JST, Tokyo, Japan. ³Research Institute for Sustainable Humanosphere, Kyoto University, Kyoto, Japan.

⁴*Graduate School of Bioagricultural Science, Nagoya University, Nagoya, Japan.*

Wood biomass is a promising alternative of oil to obtain energy and various chemical products. Identification of precise chemical structures of its components and monitoring of conversion of the components during its degradation at atomic resolution have not been achieved so far. Solution NMR has a potential to answer these demands. Here, we have developed the methodology to investigate wood biomass by solution NMR. The methodology involves optimized sample preparation, application of TROSY, new quantification methods that are not skewed by variation of either ${}^{1}J_{CH}$ or T₂ values of each component, development of ${}^{13}C$ -labeling and its application, and real-time monitoring of biodegradation of wood biomass in an NMR tube. Development of these elementary techniques made it possible to identify and monitor the conversion of components of wood biomass at atomic resolution.

[序論] エネルギー及び様々な製品の原料は、石油等の化石資源から現在主に得られている。化石資源への依存からの脱却を考えた際、バイオマス、中でも食糧問題を引き起こす心配がない木質バイオマスは有力な代替候補である。しかし、木質バイオマスの構成成分の正確な化学構造と量比は依然未解明であり、従って木質バイオマスの処理過程における各種成分の物質変換を追跡する事も、現状では十分にはできていない。溶液NMR法を適用する事によって、これらの問題を解決する事が期待できる。今回我々は、木質バイオマスを溶液NMR法で解析する為の各種方法論の開発を行った。開発された要素技術は、①試料調製法の最適化、②TROSY法の適用、③・④成分毎に

木質バイオマス, 定量法, 腐朽菌

おかむらひでやす,にしむらひろし,いまむらよしのり,こざわゆう,てらしまのりつぐ,まつしたやすゆき,ふくしまかずひこ,わたなべたかし, 〇かたひらまさと 異なる¹J_{ctt}とT₂の値に影響される事のない物質量の定量法の開発、⑤¹³C標識法の開発 とその活用、⑥木材腐朽過程のNMRチューブ内におけるリアルタイムモニタリング、 である。これらの要素技術を活用する事で、木質バイオマスの構成成分の正確な化学 構造の同定と定量、さらに腐朽過程における物質変換の追跡が可能となった。

[結果と考察]

①試料調製法の最適化 木粉のボールミルを窒素雰囲気化で行い、またミリングの際に適切なインターバルを挿入して昇温を防ぐ事で、この過程における酸化を極力抑える事ができた。有機溶媒への溶解の際に前処理を行い、また溶媒に金属イオンを添加する事で、高い分解能の¹H-¹³C HSQCスペクトルが得られた。

②TROSY法の適用木質バイオマスにおいて、芳香環の¹H-¹³Cに関してTROSY効果が観 測できる事を示した。

③成分毎に異なる¹J_{CH}の値に影響される事のない物質量の定量法の開発 木質バイオ マスに含まれる様々な成分の物質量を定量するのには、¹H-¹³C HSQCスペクトルを用い るのが現実的である。しかし成分毎に¹J_{CH}が異なる為、INEPTにおける磁化の移動効率 に差が生じ、相関ピークの強度がこの変調を受け、定量性が失われる。成分毎の¹J_{CH} の値をあらかじめ測定しておき、その値で較正する事で定量性が確保される事を、今 回示せた。

④成分毎に異なるⅠ2の値に影響される事のない物質量の定量法の開発 ¹J_{ct}値に加えて、T2の値も成分毎に異なる。T2の値が異なると、INEPT期における減衰の度合いに差が生じ、相関ピークの強度がこの変調を受け、定量性が失われる。INEPT期における減衰の度合いを評価する手法を取り入れる事で定量性を確保する方法論を今回開発し、その有効性を実試料で検証する事に成功した。

⑤¹³C標識法の開発とその活用 リグニンは木質バイオマスの三大主要成分の一つで あるが、部位特異的に¹³C標識したその前駆体を調製し、これを植物に投与する事で、 リグニンを部位特異的に¹³C標識する事に成功した。この標識によって単純化された ¹H-¹³C HSQCスペクトルに基づいて、リグニンにおける二量体ユニットの連結様式とそ の量比を正確に決定する事に成功した。

⑥木材腐朽のNMRチューブ内におけるリアルタ イムモニタリング 木材腐朽菌を塗布した木 材を培地溶液の上に浮かべる事で、腐朽過程を NMRチューブ内で進行させられる事を示した (Figure 1)。この系を用いて、木質バイオマスの 腐朽過程における物質変換で主要な役割を果 たす代謝物の消費等を、モニタリングする事に 成功した。

⑦各種腐朽菌による木材腐朽過程における物 質変換の追跡 上記①-⑥の要素技術を活用 する事で、各種腐朽菌(セルロースを選択的に 分解する菌、リグニンを選択的に分解する菌 等)による木材の腐朽過程における物質動態を 追跡する事に成功した。



Figure 1 Real-time monitoring of biodegradation of wood biomass by rotting fungi in an NMR tube.

常磁性プローブ法により明らかにされたリガンド結合に 伴うMurDの構造変化

斎尾智英¹、小椋賢治¹、山口寛人²、辻下英樹²、○稲垣冬彦¹ ¹北海道大学大学院先端生命科学研究院 ²塩野義製薬シオノギ創薬イノベーションセンター

Ligand-driven conformational changes of MurD characterized by paramagnetic NMR

Tomohide Saio¹, Kenji Ogura¹, Hiroto Yamaguchi², Hideki Tsujishita², Fuyuhiko Inagaki¹* ¹Faculty of Advanced Life Science, Hokkaido University, 060-8638 Sapporo, Japan and ²Shionogi Innovation Center for Drug Discovery, Shionogi & Co., Ltd, 001-0021, Sapporo, Japan

MurD is one of the ATP-driven Mur ligases that catalyze the synthesis of the UDP-MurNAc-pentapeptide for the formation of a peptidoglycan layer of bacterial cell wall. Given the indispensability of the rigid cell wall for bacteria to survive, MurD is a potential target for anti-bacterial drugs. MurD catalyzes the formation of a peptide bond between the carboxyl group of the UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanine (UMA) and the amino group of the D-glutamic acid. Though several crystal structures of MurD in the presence and absence of its substrates have been reported, the detailed molecular mechanism is still unclear. Especially, dynamic structural transition coupled with enzymatic process needs to be unveiled.

Here we report Nuclear Magnetic Resonance (NMR)-based approach to investigate the dynamic structural changes of MurD coupled with substrate binding and ATP-hydrolysis in solution, exploiting NMR titration and paramagnetic lanthanide probe method (Saio *et al.*). Paramagnetic lanthanide ions fixed in a protein frame induce several paramagnetic effects in NMR spectra of the protein, such as a pseudo-contact shift (PCS). PCS is a chemical shift change induced by the paramagnetism of the lanthanide ion and provides long-range (~40 Å) distance and angular information on the observed nuclei. We introduced the lanthanide ion to MurD by the use of lanthanide chelating reagent attached to the surface of MurD via double disulfide bridges. Our NMR-based study identified a novel intermediate state of the C-terminal domain that regulates the binding of the substrates. Combined with the existing knowledge, we propose the molecular mechanism of MurD that will provide a key feature for structure-based drug design.

Reference

Saio T, Ogura K, Shimizu K, Yokochi M, Burke TR Jr, Inagaki F. (2011) An NMR strategy for fragment-based ligand screening utilizing a paramagnetic lanthanide probe. *J. Biomol. NMR*. 51, 395-408.

MurD, リガンドスクリーニング、常磁性ランタニドプローブ法

¹さいおともひで、¹おぐらけんじ、²やまぐちひろと、²つじしたひでき、 ¹いながきふゆひこ **L10**

TROSYを用いたタンパク質構造ダイナミクス解析
○楯 真一^{1,2}
¹広島大学・理学研究科・数理分子生命理学専攻
²広島大学・クロマチン動態数理研究拠点

Structure and dynamics of proteins based on the alignment tensors determined by TROSY

Shin-ichi Tate^{1, 2}

¹Dept. Mathematics and Life Sciences, Hiroshima University, Higashi-Hiroshima, Japan ²Research Center for the Mathematics on Chromatin Live Dynamics (RcMcD)

We have been working on the technical improvement and expanding the application of the TROSY-based alignment tensor determination called as DIORITE. We intended to make the DIORITE applicable to the wider range of proteins by reducing the intrinsic limitations associated with the conventional RDC experiments, which include size limitation, solvent, temperature conditions to be applied. In this presentation, I will report our recent technical progresses in the DIORITE approach with some applications to explore the protein structure dynamics in combination with small-angle X-ray scattering (SAXS).

Exploring protein structural dynamics in large amplitudes has become focused. This is because of the technical progresses in the experimental approaches, including small-angle X-ray scattering (SAXS) and the faster computational environments available. In NMR, the RDC-based approach enables to explore the mode of structural change and the potential structural dynamics in large-amplitude associating with the domain rearrangement, for example. In addition, the combined use of the RDC and SAXS paved new ways to improve the structural studies along that line [1].

The RDCs give valuable structural information to grasp the protein structurel dynamics in a large amplitude, but they are generally hard to measure for large proteins (typically over 30 kDa) due to the faster transverse relation of one of the paired signals needed. The sample conditions required for achieving the weak alignment by a liquid crystalline medium also limit the RDC measurement to the sample, which is stable in the temperature over the phase transition point for the liquid-crystalline and the low ionic strength to allow the liquid crystalline phase. The rather narrow ranges in the allowable experimental conditions restrict the RDC application for exploring the large-amplitude motion of proteins. We have proposed an alternative approach to overcome the above limitations in the RDC-based structural analyses, which is called as DIORITE (Determination of the Induced ORIentation by Trosy Experiments) [2-4]. In this presentation, we are going to show some recent progresses in the DIORITE approach.

anisotropic spin interactions, protein dynamics, domain rearrangement

○たて しんいち

Structure calculation using DIORITE restraints in XPLOR-NIH

DIORITE analysis requires the ¹⁵N CSA tensor values for each residue in a priori. We have established a set of ¹⁵N CSA tensor parameters, which allows the precise alignment tensor determination free from the biases coming from the pre-defined ¹⁵N CSA values (in preparation). By embedding the ¹⁵N CSA tensor information in the subroutine in XPLOR-NIH, we enabled the structure calculation using the alignment induced TROSY shift changes as structure restraints, which are measured by the chemical shift changes for each TROSY signal ($\Delta\delta_{\text{TROSY}}$)



Fig.1: Example input data to incorporate DIORITE restraints.

collected in the stretched (anisotropic) and isotropic acrylamide gels [3]. The DIORITE restraints are simultaneously used with the other restraints, including NOEs, the torsion angles, and the SAXS scattering profile on the XPLOR-NIH platform. The example applications will be presented [5].

Simulation of the alignment protein in a stretched acrylamide gel

To avoid the technical limitations in achieving weak alignment of proteins, we use the chemically stable acrylamide gels as aligning media in the DIORITE experiments. To elucidate the protein structure dynamics in large amplitudes using weak alignment, the simulation for the protein alignment in an aligned medium is essential. The simulation for proteins in an aligned bicellar medium is possible with the program PALES [6], while the simulation for the acrylamide gels is not available due to the complete difference in the aligning mechanism. We developed the simulator for the protein alignment in the acrylamide gels. The technical details will be presented.

References

- A. Grishaev, J. Wu, J. Trewhella, A. Bax, Refinement of Multidomain Protein Structures by Combination of Solution Small-Angle X-ray Scattering and NMR Data, Journal of the American Chemical Society, 127 (2005) 16621-16628.
- [2] S. Tate, H. Shimahara, N. Utsunomiya-Tate, Molecular-orientation analysis based on alignment-induced TROSY chemical shift changes, Journal of Magnetic Resonance, 171 (2004) 284-292.
- [3] S. Tate, A. Imada, N. Hiroguchi, Complementary use of NMR to X-ray crystallography for the analysis of protein morphological change in solution, InTech, Rijeka, Croatia, 2011.
- [4] S. Tate, Anisotropic nuclear spin interactions for the morphology analysis of proteins in solution by NMR spectroscopy, Anal Sci, 24 (2008) 39-50.
- [5] J.-i. Uewaki, H. Kamikubo, J.-i. Kurita, N. Hiroguchi, H. Moriuchi, M. Yoshida, M. Kataoka, N. Utsunomiya-Tate, S.-i. Tate, Preferential domain orientation of HMGB2 determined by the weak intramolecular interactions mediated by the interdomain linker, Chemical Physics, 419 (2013) 212-223.
- [6] M. Zweckstetter, NMR: prediction of molecular alignment from structure using the PALES software, Nature Protocols, 3 (2008) 679-690.

L11

炭酸塩のケイ酸塩メルトにおける溶解機構: *ab initio* 計 算と¹³C NMR測定からの情報 〇 藤 献字¹,神崎 正美¹

□」 「岡山大学地球物質科学研究センター

Dissolution mechanism of carbonate in silicate melts: Information from *ab initio* calculations and ¹³C NMR measurements

OXianyu Xue¹, and Masami Kanzaki¹

¹Institute for Study of the Earth's Interior, Okayama University, Misasa, Tottori, Japan.

It is generally known that CO₂ dissolves in silicate melts/glasses as molecular CO₂ and CO₃²⁻ species, but how the latter groups are incorporated in the melt and its effect on the silicate structure have been less certain. Here we report ab initio calculation (vibrational frequencies, ¹³C chemical shift tensors) and ¹³C NMR measurements on ¹³CO₂-bearing glasses of diverse silicate compositions. Our study suggests that both vibrational frequencies and ¹³C chemical shift tensor are sensitive to the local environments of carbonates. The data indicate that carbonates are present dominantly as free carbonates (not bonded to tetrahedral Si/Al) in depolymerized melts, and as network carbonates (bonded to two Si/Al via two of its oxygens) in polymerized melts. The formation of free carbonates would lead to polymerization of the silicate structure.

Introduction. Carbon dioxide is one of the abundant volatile components in natural magmas. Knowledge of its dissolution mechanisms in silicate melts is indispensible for understanding how it affects physical and thermodynamic properties. It is generally known that carbon dioxide dissolves in silicate melts/glasses as molecular CO₂ and CO₃²⁻ species, with the latter dominant for depolymerzed compositions and polymerized compositions with high Al/Si ratios. However, how the CO₃²⁻ groups are incorporated in the melt and how it affects the silicate structure are less certain, because of controversial interpretations of previously reported vibrational and ¹³C MAS NMR spectroscopic results. Here we report ab initio calculations (vibrational frequencies and ¹³C chemical shift tensors) on CO₃²⁻ groups in various environments as well as ¹³C MAS and static NMR results on ¹³CO₂-bearing glasses of diverse silicate compositions. It will be shown that these new results provide unambiguous constraints on the speciation (local environments) of carbonates in silicate melts (glasses) of both depolymerized and polymerized compositions.

Calculation & Experimental Methods. Ab initio molecular orbital calculations on various clusters that mimic the local environments of carbonates bonded to one and two SiO_4/AIO_4 tetrahedra have been performed using Gaussian 09. Geometry optimization and vibrational frequencies were calculated at B3LYP/6-31+G(d,p), with the latter scaled by 0.9685. ¹³C chemical shift tensors were calculated with the GIAO method at B3LYP/6-311+G(2df,p).

silicate melt, carbonate, ¹³C chemical shift tensor

○しゅえ しゃんう,かんざき まさみ

Test calculations on model organic carbonate compounds (e.g. dimethyl carbonate, potassium monomethyl carbonate) showed satisfactory agreement with experimental IR and NMR data.

 13 CO₂-bearing (mostly ~ 1wt%) silicate glasses of both depolymerized compositions, e.g. diopside (CaMgSi₂O₆) and Ca-melilite (Ca_{1.5}AlSi₂O₇), and fully polymerized compositions, e.g. jadeite (NaAlSi₂O₆) and nepheline (NaAlSiO₄), were prepared by quenching melts at 1.0-1.5 GPa and 1400-1600 °C in a QUICKpress piston cylinder apparatus. ¹³C-enriched carbonate (CaCO₃ or Na₂CO₃) was used as the CO₂ source. NMR measurements were performed using a Varian Unity-Inova 9.4 T spectrometer and a 1.6 mm HXY triple resonance MAS probe.

Results and Discussion. The *ab initio* calculation revealed that the splittings (Δv_3) of the asymmetric stretching (v_3) doublets for $CO_3^{2^-}$ bonded to one or two tetrahedral Si/Al are all relatively large (around 180-480 cm⁻¹). The calculated Δv_3 for $CO_3^{2^-}$ bonded to $0\sim 2$ metal cations (Na) and no tetrahedral Si/Al range from zero to ca 250 cm⁻¹, depending on local geometry. Experimental data for minerals containing $CO_3^{2^-}$ bonded only to metal cations show Δv_3 from zero to moderate (up to ~100 cm⁻¹). Thus, the moderate Δv_3 (70-100 cm⁻¹) reported for many depolymerized silicate glasses, which was used by some authors as evidence for $CO_3^{2^-}$ bonded to one Si (e.g. [1,2]), should be better viewed as evidence for free carbonates (carbonates not bonded to any network formers, e.g. Si, Al) with somewhat distorted geometries. Our calculations also showed that carbonates bonded to one or two Si/Al show distinctly different characteristics of ¹³C chemical shift tensors (with skew close to -1) compared to free carbonates (bonded to one or two C).

Our ¹³C MAS and static NMR data for depolymerized silicate glasses are all consistent with features of free carbonates. Our ¹³C MAS and static NMR data for fully polymerized compositions, on the other hand, show features that are consistent with the calculated chemical shift tensors for carbonates bonded to two Si/Al via two oxygens (network carbonate). Previously reported vibrational spectroscopic features, e.g. large Δv_3 (>200 cm⁻¹) (c.f. [1,2]), for glasses of similar compositions are also consistent with our calculation results for network carbonates.

Conclusion. Our *ab initio* calculation has shown that both vibrational frequencies and ¹³C chemical shift tensor are sensitive to the local environments of carbonates. The combined *ab initio* calculation and experimental ¹³C MAS and static NMR data clearly indicate that carbonates are present dominantly as free carbonates (carbonates not bonded to any network-formers, e.g. Si, Al) in depolymerized glasses, and as network carbonates (carbonates bonded to two Si/Al via two of its oxygens) in polymerized glasses. The formation of free carbonates would lead to polymerization of the silicate structure.

References

[1] Blank, JG & Brooker, RA (1994) Rev. Mineral. 30, 157-186.

[2] Brooker, RA, et al. (2001) Chem. Geol., 174, 241-254.

マイクロ波加熱NMR分光法—液晶系への応用— 〇内藤 晶¹、田制侑悟¹、藤戸輝昭²、川村 出¹ ¹横浜国大・院工 ²プローブ工房

Microwave Heating NMR Spectroscopy. Application to Liquid Crystalline Systems

○Akira Naito¹, Yugo Tasei¹, Teruaki Fujito², and Izuru Kawamura¹ ¹Graduate School of Enbineering, Yokohama National University, Yokohama, Japan ²Probe Laboratory Inc., Tsukuba, Japan

We investigated the microwave heating effect on liquid crystalline systems by means of in-situ microwave irradiation NMR spectroscopy. First, we have developed in situ microwave irradiation NMR spectrometer by combining microwave generator (2.45 GHz, 1.3 kW) with solid state NMR spectrometer. This allows us to observe NMR signals under microwave irradiation conditions. Second, we have investigated the microwave heating effect on liquid crystalline systems. ¹H NMR spectra of liquid crystalline samples of MBBA were observed under microwave irradiation. The isotropic phase was stationary appeared as about 2% fraction which is considered as a non-equilibrium local heating state induced by microwave. Third, a nematic-isotropic phase-correlated 2D NMR spectra were successfully obtained in EBBA. The transition from nematic to isotropic phase was established within 10 ms. Consequently, local dipolar fields of 11 magnetically different protons in EBBA were separately observed.

Introduction

Microwave heating is widely used in the acceleration of organic reaction as well as activity enhancement of enzymes. These effects are considered to exist as a non-equilibrium heating state induced by a microwave irradiation. However, detailed molecular mechanism of microwave heating effect on the chemical reaction has not well understood yet.

To characterize a non-equilibrium local heating state, we developed an in-situ microwave-irradiation solid state NMR spectrometer. Microwave irradiation liquid state NMR spectrometer has been developed by Naito et al.¹⁻⁵. Using a microwave irradiation NMR spectrometer, state-correlated two-dimensional NMR spectroscopy was developed¹. This technique turned out to be useful to observe ¹H dipolar patterns of ¹H NMR spectra with high resolution in the liquid state rather than liquid crystalline state. In this technique, local dipolar interaction of individual protons in the liquid crystalline state can be obtained via resonance in the isotropic phase^{1,2,4,5} and also used to detect state correlated two dimensional NMR spectra of native and denatured states of proteins³.

マイクロ波加熱、液晶、局所加熱

○ないとう あきら、たせい ゆうご、ふじと てるあき、かわむら いずる
Liquid crystalline sample is known to be absorbing microwave highly efficiently as in the case of liquid crystalline display. It is therefore expected to observe a non-equilibrium local heating phenomena more clearly in the liquid crystalline systems. In-situ microwave irradiation solid state NMR spectrometer was particularly designed to observe NMR signals under microwave irradiation with good isolation of radio wave for NMR detection with microwave for local heating. This spectroscopy allowed us to observe NMR signals under microwave irradiated condition. This is the first report to observe NMR signals of liquid crystals under microwave irradiating condition.

Materials and Methods

Liquid crystalline sample of N-(4-methoxybenzyliden)-4-butylaniline (MBBA) and 4'-ethoxybenzylidene-4-n-buthylaniline (EBBA) was purchased from Wako Chemical Co. and used without further purification. Liquid crystalline phase to isotropic phase transition temperature (Tc) is 40 and 108 °C for MBBA and EBBA, respectively.

The microwave irradiation solid state NMR spectrometer was developed by building magnetron (2.45 GHz) into a Chemagnetics solid state NMR spectrometer (CMX infinity 400) as schimatically shown in Figure 1. A flat



Figure 1. Block diagram of the in situ microwave irradiation NMR spectrometer equipped with a microwave transmitter. Microwave and radiwave coils in the probe head are also shown.

copper ribbon of 3 mm in width is used for the capacitor of the resonated circuit, which is wound inside the radiowave circuit perpendicularly to reduce arching and increase isolation during microwave irradiation. This allows us to observe NMR signals under microwave irradiating condition. The microwave circuit is tuned properly to 2.45 GHz and radiowave was tuned to 398 MHz by using sweep generator. NMR spectra were recorded at 398 MHz on a Chemagnetic infinity 400 NMR spectrometer, equipped with a microwave generator (IDX, Tokyo Electric Co Ltd.) capable of transmitting 1.3 kW pulsed microwave at a frequency of 2.45 GHz. Microwave was transported from microwave generator to near the magnet through wave guide, and transfer the wave guide to coaxial cable. This coaxial cable was guided to the resonance circuit at the probe head. Microwave pulse was controlled by the gating pulse produced by the pulse programmer of the NMR spectrometer. The temperature of the sample was cooled down to that of the liquid cryatalline phase with a help of gas flow temperature controller.

Results and Discusion Microwave heating of liquid crystalline systems Figure 2A shows ¹H NMR spectra of MBBA at 25 °C which is 15 degree below the phase transition temperature (Tc = 40°C). Broad ¹H NMR spectrum with 40 kHz line width was obtained in the liquid crystalline sample (Figure 2 left column). ¹H NMR spectrum in the isotropic phase was obtained and all kinds of proton signals were resolved and assigned to the deferent protons in the spectrum taken at 50 °C which is 10 degree higher than the Tc (Figure 2D). When the temperature was set at 40 °C, signals due to isotropic phase appeared as a small amount in the majority of liquid crystalline phase (Figure 2C). It was noticed that the signals were broader than that of fully isotropic phase. This kind of broadening can be attributed to the interaction of



Figure 2. ¹H NMR spectra of MBBA at 25 ${}^{0}C(A)$, 25 ${}^{0}C$ under microwave irradiation (B), 40 ${}^{0}C$ and 50 ${}^{0}C$ (D). Left column: Entire range of the spectra of liquid crystalline state. Right Column: Ecpanded spectra of isotropic state.

isotropic phase with liquid crystalline phase. The temperature was set at 25 °C, which is 15 degree below the Tc, followed by continuous microwave (CW) irradiation. When the CW microwave power was carefully controlled, small amount of isotropic signals (about 2% fraction) were stationary appeared in the majority of signals in liquid crystalline phase (Figure 2C). Although the signal shape is similar to that of thermal heating state, the chemical shift value was shifted upper field by 0.5 ppm. This result indicates that microwave heats up locally to quite high temperature.

These phenomena can be explained as shown schematically in Figure 3. When the liquid crystalline phase below the phase transition temperature was heated up by the microwave irradiation (MWH) to reach up the temperature near the Tc, small amount of the isotropic phase was appeared. Because the factor of dielectric loss of the isotropic phase was higher than that of liquid crystalline phase, isotropic phase was more efficiently heated up by microwave



Figure 3. Schematic diagram thermally and microwave heating processes of liquid crystalline state.

irradiation as compared to the liquid crystalline phase did. This caused much higher temperature of isotropic phase than that of liquid crystalline phase. This can be considered as a kind of non-equilibrium local heating state.

State correlated 2D NMR experiments

The pulse sequence used in the state-correlated two dimensional (SC-2D) NMR spectroscopy

is practically the same for the radio frequency part as that of 2D exchange or NOE experiment (Figure 4). The first 90^0 pulse creates the transverse magnetization. During the evolution period, the temperature of the sample is kept to maintain the nematic phase so that the ¹H spins show precession frequency under strong dipolar interactions between proton nuclei in the nematic phase. At time t₁, the second 90^0 pulse is applied to align the magnetization vector along the z axis. During the transition period, a pulsed microwave is applied for a short time to raise temperature, during which the nematic phase is transformed into the isotropic phase. Any remaining transverse magnetization is

expected to diphase within a couple of milliseconds during the transition period under strong dipolar interactions of the nematic phase.

Figure 5 (left column) shows the contour plot of the SC-2D NMR spectrum of EBBA between the nematic and isotropic phases, that was carried out using the pulse sequence of Figure 4. This figure clearly demonstrates that the SC-2D NMR experiment was successful in the liquid crystal sample of EBBA. It is recognized that the dipolar spectra of individual protons are separated in the F1 dimension with resolution in the F2 dimension, namely with resolution in the isotropic phase.

Acknowledgements

Authors thank Profs. K. Akasaka, M. Sato and K. Ushida, and Mr. Yamagami for their useful discussions.



Figure 4. Pulse sequence for state-correlated 2D NMR experiments. A mixing time tm is inserted into the beginning of a transition period to examine the spin diffusion properties.



Figure 5. A nematic isotropic phase correlated 2D NMR spectrum of EBBA with cross sectional pattern by applying a microwave pulse of 10 ms.

References

- 1. A. Naito, M. Imanari, K. Akasaka, J. Magn. Reson., 1991, 92,85-93.
- 2. A. Naito, M. Imanari, K. Akasaka, J. Chem. Phys., 1996, 105, 4502-4510.
- 3. K. Akasaka, A. Naito, M. Imanari, J. Am. Chem. Soc., 1991, 113, 4688-4689.
- 4. A. Naito, Y. Tasei, AS&T, 2010, 2886-2894.
- 5. A. Naito, A. Ramamoorthy, Thermotropic Liquid Crystals, Spriger, 2007, pp85-116.

固体NMRによる家蚕絹の繊維化前および繊維化後の 構造決定

朝倉哲郎^{1, 2},○矢澤宏次^{1,3},奥下慶子⁴,鈴木悠¹,中澤靖元¹, 青木昭宏¹,西村勝之²,西山裕介³,梶弘典⁵ 1農工大工 ²分子研 ³JEOL RESONANCE ⁴防衛大 ⁵京大化研

Precise Structure of *Bombyx mori* Silk Fibroin before and after Spinning determined by Solid state NMR

Tetsuo Asakura^{1,2}, OKoji Yazawa^{1,3}, Keiko Okushita⁴, Yu Suzuki¹, Yasumoto Nakazawa¹, Akihiro Aoki¹, Katsuyuki Nishimura², Yusuke Nishiyama³, Hironori Kaji⁵ ¹Dept. of Biotechnology, Tokyo University of Agriculture and Technology, Koganei, Japan. ²Institute for Molecular Science, Okazaki, Japan, ³ JEOL RESONANCE Inc., Akishima, Japan ⁴ National Defense Academy of Japan, Yokosuka, Japan ⁵Institute for Chemical Research, Kvoto University, Uji, Japan

Determination of the structure of *Bombyx mori* silk fibroin is important because of increase in studies to clarify the reason why the silk fiber is so strong and so tough, and also many applications of the silk fibroin to biomaterials. In this work, the precise structures of *B.mori* silk fibroin before (Silk I) and after (Silk II) spinning could be proposed with solid state NMR and the CASTEP calculation. For Silk I, the ¹H co-ordinates were newly determined on the basis of the co-ordinates of the backbone structure reported previously. For Silk II, the heterogeneous structure which consists of two kinds of anti-parallel β sheet structures with different inter-molecular arrangement in the crystalline domain, (AGSGAG)n could be determined. The proposed structures are generated from two kinds of β sheet structures on the basis of X-ray diffraction unit cell and optimized energetically by the CASTEP calculation. The observed ¹H, ¹³C and ¹⁵N solid state NMR chemical shift data could be reproduced well by the GIPAW chemical shift calculation of the optimized structures.

Introduction

As the dimorphs of *B. mori* silk fibroin, two forms, Silk I and Silk II, have been proposed. By using several solid state NMR techniques, the Silk I structure has been determined to be repeated type II β -turn structure by us.¹ On the other hand, the precise inter-molecular structure of *B.mori* silk fibroin with Silk II form is not still determined although the structure was reported first by Marsh et al.² using X-ray diffraction. This structure is well known as a regular array of anti-parallel β -sheets, but later Fraser et al.,³ Lotz and Cesari,⁴ and Takahashi et al.⁵ claimed the presence of irregular structure in the silk fibers.

In this work, heterogeneous structure of B. mori silk fibroin with Silk II form will be

Bombyx mori Silk Fibroin, Silk I and Silk II, ¹H DQMAS, CASTEP, GIPAW

あさくらてつお, ○やざわこうじ、おくしたけいこ、すずきゆう、なかざわやすもと、 あおきあきひろ、にしむらかつゆき、にしやまゆうすけ、かじひろのり determined. For the purpose, the combination with the use of a micro-coil probe-head and ultrahigh field NMR at 920 MHz, and also the ¹H DQMAS observation^{6,7} were used to obtain information on the ¹H chemical shifts and relative ¹H-¹H proximities. Then, initial two anti-parallel β -sheet structures with different inter-molecular arrangements were generated with X-ray unit cell of Silk II reported previously.⁵ Then the optimization with CASTEP program⁷ was performed for these two model structures. The ¹H, ¹³C and ¹⁵N chemical shifts of Silk II were calculated to check the proposed models. The DARR experiments were performed to obtain information on the spatial positions between two structures.

Materials and Methods

The sample, $(AG)_{15}$ was synthesized by the solid phase method. The ¹³C uniformly labeled Cp fraction (The precipitated fraction after chymotrypsin reaction) was prepared from the aqueous solution of regenerated silk fibroin prepared by giving [U-¹³C] glucose with artificial diet at the 5th larval stage of silkworm.¹

The ¹H DQMAS and double CP ¹H-¹³C correlation NMR were measured using a JEOL JNM-ECA920 spectrometer with ultrahigh speed MAS probe (70 kHz) at Institute for Molecular Science. The ¹³C DARR spectra of the ¹³C uniformly labeled Cp fraction were obtained using a Bruker DRX 500 spectrometer.

Two kinds of anti-parallel β -sheet structures with different inter-molecular arrangement were generated with unit cell, a = 9.38 Å, b = 9.49 Å, c = 6.98 Å of Silk II structure⁵ and with Discover (pcff force field : Accelrys, Japan) method. Then the geometry optimization was applied for all atoms under periodic boundary conditions using CASTEP method under keeping the same cell parameter. The GIPAW calculations of the ¹H, ¹³C and ¹⁵N chemical shifts were performed for two anti-parallel β -sheet structures with different inter-molecular arrangements and the results were compared with the observed chemical shifts.

Results and Discussion

The assignment of the ¹H chemical shifts of (AG)₁₅ with Silk II form was performed by double cross polarization ¹H-¹³C correlation measurement for $(AG)_{7}[1,2,3^{-13}C]AG(AG)_{7}$ as shown in Figure 1. Interestingly Ala methyl region gives two distinct crystalline states that could be distinguished by ¹H and ¹³C chemical shifts. Our previous ¹³C CP/MAS NMR study of *B. mori* silk fibroin with Silk II structure revealed that Ala methyl peak could be divided to three components, that is, two kinds of β -sheets (19.2 and 22.3 ppm) and distorted β -sheet (16.1ppm).¹ The ¹H chemical shifts of Ala methyl



Fig.1 Double cross polarization ${}^{1}\text{H}{}^{-13}\text{C}$ correlation spectrum of $(AG)_{7}[1,2,3{}^{-13}\text{C}]AG(AG)_{7}$ with Silk II form.



Fig.2 ¹H DQMAS spectrum of $(AG)_{15}$ with Silk II form. (Inset) An enlarged view of the cross peak between Ala H α and Gly H α

group can be distinguished from the ${}^{1}\text{H}{}^{13}\text{C}$ correlations, 1.2 ppm (${}^{1}\text{H}$) – 16.1ppm (${}^{13}\text{C}$), 1.0 ppm -19.2 ppm, and 1.3 ppm - 22.3 ppm. In order to elucidate ${}^{1}\text{H}{}^{-1}\text{H}$ correlations, we performed ${}^{1}\text{H}{}^{-1}\text{H}$ DQMAS measurement for the Silk II form of AG₁₅ and showed the spectrum with projections (Figure 2). A cross peak between H_a of Gly located in the β-sheet plane (4.6 ppm) and H_a of Ala (5.0 ppm) exists. This means that hydrogen bondings in β-sheets are formed between Ala and Gly residues, and this result is conflict with the Marsh model.²

In our previous paper,⁸ the torsion angles of *B*. *mori* silk fibroin fiber were determined by orientational constraints based on solid state NMR to be (-140°, 142°) for Ala residue and (-139°,135°) for Gly residue. Thus, we used typical torsion angles (-140°, 140°) of β -sheet for Ala and Gly residues of (AG)₁₅. Then we prepared two initial structural models by energy minimization with Discover under fixing the cell parameter. Furthermore, the energy minimization with CASTEP for the two models (AG)₁₅ was performed. The optimized structures A and B are shown in Figure 3.



Fig.3 The structural model A and B obtained by the CASTEP energy minimization from the initial model structures which are created from P21/b and P21/c, respectively.



Fig.4 Observed (top) and calculated (bottom) chemical shifts of ¹H, ¹³C, and ¹⁵N nuclei of Silk II. Red lines and blue half length lines are originated from A and B structures, respectively. The calculated chemical shifts are set to minimize RMSD between the observed and the calculated data.

Figure 4 shows the stick spectra of 1 H, 13 C and 15 N chemical shifts of (AG)₁₅ calculated by the GIPAW for the models A and B. The agreement between the calculated and observed chemical shifts is good for all nuclei. From the 1 H chemical shift calculation of the model A, it is possible to assign the two Gly H α peaks. The Gly H α observed at lower field at 4.6 ppm can be assigned to the H α located in the β -sheet plane. The appearance of higher field peak of the model A than the model B was also reproduced in the Ala methyl region. For 13 C chemical shifts, the agreement between the observed and calculated chemical shifts is



Fig.5 A summery of Silk II structure. This hetero structure consists of 25% of A (β -sheet), 13% of B (β -sheet), 22% of distorted β -sheet, and 40% of distorted β -turn.

excellent. The appearance of the higher field peak of the model A compared with that of the model B could be reproduced in the Ala methyl region. Finally, ¹⁵N chemical shifts were compared between the calculated and observed ones. In this case, the relative peak position and the chemical shift difference should be compared because of two peaks for Ala and Gly residues, respectively. The results are also excellent.

Thus, the chemical shift calculation could reproduce the observed chemical shifts very well. This means the models A and B proposed here is valid. The final assignment of Silk II methyl peak was summarized in Figure 5. For Silk I structure, the ¹H co-ordinates were determined on the basis of the previous co-ordinates of the backbone structure with similar approach.⁹

References

- T. Asakura, J. Ashida, T. Yamane, T. Kameda, Y. Nakazawa, K. Ohgo and K. Komatsu, J.Mol. Biol., 2001, 306, 291.
- 2. R. E. Marsh, R. B. Corey and L. Pauling, Biochim Biophys Acta, 1955, 16, 1.
- 3. Fraser, R. D. B., and MacRae, T. P. Conformations of Fibrous Proteins and Related Synthetic Polypeptides. Academic Press, New York. 1973.
- 4. Lotz, B., and Cesari, F. C. Biochimie 1979,61, 205.
- 5. Takahashi, Y., Gehoh, M., and Yuzuriha, K. Int. J. Biol. Macromol. 1999,24,127.
- 6. I.Schnell, S.P.Brown, H.Y.Low, H.Ishida and H.W. Spess, *J.Am.Chem. Soc.*, **1998**, *120*, 11784.
- 7. S. P. Brown, Solid State Nucl. Magn. Reson., 2012, 41, 1.
- 8. Demura, M., Minami, M., Asakura, T., and Cross, T. A. J. Am. Chem. Soc. 1998,120, 1300.
- 9. Asakura, T. et al. Macromolecules, 2013, in press.

Acknowledgements T.A. acknowledges support from Grant-in-Aid for Scientific Research from Ministry of Education, Science, Culture and Supports of Japan (23245045,25620169) and Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries of Japan (Agri-Health Translational Research Project).

Native Membrane Protein Structure in Lipid Bilayers Requires Solid State NMR

Nabanita Das^{1,2}, Dylan T. Murray^{1,2}, Yimin Miao^{1,3} and <u>Timothy A.</u> <u>Cross^{1,2,3}</u> ¹National High Magnetic Field Lab, Florida State University, Tallahassee, Florida, USA. ²Institute of Molecular Biophysics, Florida State University, Tallahassee, Florida, USA. ³Department of Chemistry & Biochemistry, Florida State University, Tallahassee, Florida, USA.

Helical membrane proteins account for 50% of all drug targets. Few of these structures have been characterized and fewer than this have been characterized as the native functional structures. These helical membrane protein structures are very sensitive to their environment. The influence of detergents both in micelles and in crystal lattices will be shown through studies of proteins in the Protein Data Bank, where they show the influence in the transmembrane domain of 1) a weak hydrophobic environment, 2) a relatively high dielectric constant, and 3) the influence of a weak lateral pressure profile. The result is that helices 1) are bent, kinked and distorted more than they are in a lipid bilayer environment, 2) show extensive hydrogen deuterium exchange, 3) show an outward curvature of helices in micellar environments, 4) show poor packing of the helical structures, a feature that is required for

tertiary and quaternary structural stability, 5) show effects from crystal packing contacts that distort the tertiary and quaternary structure. These influences lead to non-native like membrane protein structures structures that mislead the biological and pharmaceutical research communities. To avoid this the structures need to validated by a comparison with structural data obtained from lipid bilayers (Fig. 1), or the structures



Fig. 1: OS ssNMR spectra for ¹⁵N Met and ¹⁵N Trp labeled diacyl glycerol kinase in the contours were obtained in lipid bilayers. Shown in the ellipses are the predicted data from the structure shown that was obtained from detergent micelles. The poor fit to the data indicates that this is not a native structure.

need to be characterized in lipid bilayers.

In this talk I will show how structures in a detergent environment can be validated or refuted by data obtained from oriented sample solid state NMR (OS ssNMR) spectroscopy. OS ssNMR data for diacyl glycerol kinase was published in 2007 (Li et al., J. Am. Chem. Soc. 129:5304). Since then multiple structures of this protein have been characterized in detergent environments (Van Horn et al., 2009, Science 324:1726; Li et al., 2013 Nature 497:521). By comparing predicted OS ssNMR data from these structures with the observed data it is possible to validate or refute the native-like character of the structures (Fig. 1). I will also show how the transmembrane domains of several membrane protein structures can be characterized by a combination of OS and MAS ssNMR. The influenza A M2 proton channel drug target has been characterized in lipid bilayers as has the *Mycobacterium tuberculosis* proteins Rv1861 and CrgA. The latter protein is a key protein in cell division and a potential drug target. By using the absolute restraints provide by OS ssNMR the number of distance and torsional restraints from MAS ssNMR needed to characterize the tertiary and quaternary structure is greatly decreased. The methodology for such characterizations will be discussed.

IL7

Environmentally-controlled protein/protein interactions: Insights provided by NMR into nature's switches

Fernando Correa¹, Victor Ocasio¹, Giomar Rivera-Cancel¹, Laura B. Motta-Mena¹, Yirui Guo¹, Thomas H. Scheuermann¹ and <u>Kevin H.</u> <u>Gardner^{1,2}</u>

¹UT Southwestern Medical Center, Dallas, TX, USA. ²CUNY Advanced Science Research Center, New York, NY, USA.

Environmental cues regulate many biological processes, controlling pathways used by cells to respond to changing conditions. Such regulation is often initiated by sensory protein domains that use internally-bound ligands to convert environmentally-triggered changes into altered protein/protein interactions. Several families of these domains have evolved with remarkable diversity in the stimuli they sense and outputs that they control. Using a combination of biophysics, biochemistry and synthetic chemistry, we seek insight into the fundamental protein structure/function principles of such environmental-sensing domains.

Here I will discuss examples of our work from one such family of regulatory domains: the Per-ARNT-Sim (PAS) domains, found in thousands of proteins throughout biology. I will present results from studies of PAS domains that respond to radically different stimuli – ranging from blue light illumination to the presence of metabolites – showing how these share a common transduction mechanism as revealed by solution NMR complemented by other biophysical and biochemical approaches. I will further discuss how we have taken advantage of this mechanistic understanding to search for artificial PAS-binding ligands using NMR-oriented fragment-based approaches and high-throughput screens. Importantly, these compounds can be harnessed as potent modulators of certain PAS-based protein/protein interactions, both *in vitro* and in living cells. Taken together, our work provides an integrated view of a fascinating class of natural switches and suggests routes by which these can be manipulated in the future to achieve desired therapeutic and/or technological outcomes.

IL8

Folding dynamics of topologically knotted proteins Shang-Te Danny Hsu¹ ¹Institute of Biological Chemistry, Academia Sinica, Taipei, Taiwan

Recent studies on the mechanisms by which topologically knotted proteins attain their natively knotted structures spontaneously without the aid from molecular chaperones have intrigued theoretical and experimental biophysicists in the field of protein folding [1, 2]. Despite the lack of spectral signatures to identify the presence of residual secondary and tertiary structures, cyclisation-coupled refolding data provided strong biochemical evidence to indicate that YibK and YbeA, two best-studied knotted proteins, remain knotted in their chemically denatured states [3]. In this talk, I shall discuss our recent efforts in investigating the folding characteristics of a family of proteins that contain a trefoil (3_1) knot or a Gordian (5₂) knot in their backbone structures. Solution state NMR spectroscopy and small angle X-ray scattering (SAX) are employed to investigate the structures and dynamics of YibK and YbeA in order to understand how these proteins can remain topologically knotted in their urea-denatured states. NMR is also employed extensively to study the folding dynamics of the human ubiquitin C-terminal hydrolyase (UCH-L1), which contains a Gordian knot and is a risk factor in Parkinson's disease (PD) [4]. The I93M and S18Y mutations in UCH-L1 have been reported to associate with increased risk of PD. UCH-L1 and its variants exhibit a highly populated folding intermediate, also known as the partially unfolded form (PUF) during chemical denaturation under equilibrium conditions. The nature of the PUF is characterised by NMR hydrogen-deuterium exchange (HDX) in the presence of chemical denaturant. The impact of the I93M mutation is investigated by NMR HDX, which indicates that the mutation significantly destabilises UCH-L1 under native conditions and that the increased population of PUF may be implicated in the aggregation of UCH-L1 into the Lewy body, which is the hallmark of PD.

References

- [1] A. L. Mallam, FEBS J 276, 365 (2009).
- [2] P. Virnau, A. Mallam, S. Jackson, J Phys Condens Matter 23, 033101 (2011).
- [3] A. L. Mallam, J. M. Rogers, S. E. Jackson, Proc Natl Acad Sci USA 107, 8189 (2010).
- [4] F. I. Andersson et al., J Mol Biol 407, 261 (2011).



Stanley J. Opella University of California, San Diego

Membrane proteins are immobilized and aligned by their interactions with phospholipid bilayers. Although they undergo fast rotational diffusion in liquid crystalline bilayers, they require solid-state NMR methods to give high-resolution spectra. Solid-state NMR methods can be used to measure angles and distances as input for structural determination. A variety of solid-state NMR methods will be illustrated with membrane proteins with between one to seven transmembrane helices.

IL10

Enhancing Signal and Contrast in MRI with Long-Lived Hyperpolarization or Intermolecular Coherences

Warren S. Warren¹

¹Departments of Chemistry, Radiology, Biomedical Engineering and Physics, Duke University; Duke Box 90346, Durham, NC 27708 USA

I will discuss two recent research directions in my lab, which address some of the fundamental limitations of conventional approaches to magnetic resonance imaging:

1. Hyperpolarization methods may drastically increase the range of species which can be explored in magnetic resonance microscopy, but the most important issue is short T_1 relaxation times. A recent insight has been that it is possible to make extremely long-lived hyperpolarization, stored in a state which is protected by symmetry from interacting with the outside environment (such as the singlet state, $(\alpha\beta-\beta\alpha)/2^{1/2}$). The basic challenge is that the same symmetry property that reduces relaxation in such disconnected states also makes it difficult to load population into them, or later convert this population to observable magnetization for detection. The initial solution was to create singlets between chemically inequivalent spins¹, preserved using spin locking sequences or by rapid translation to very low magnetic field. However, this creates serious challenges for many imaging applications, and more recent work has focused on slightly inequivalent spins². Alternatively, ref [3] used chemical transformation to pump singlets between chemically equivalent spins. Ref. [4] drastically generalized this approach, showing that if the molecule has the right combination of couplings, it is possible to transfer population in and out of chemically equivalent singlet states at high field, using only rf pulses to make the transfer.

Here we present a variety of molecules with biologically relevant structures and long-lived states (for example using diphenylacetylene (DPA) as a building block), using combinations of ¹⁵N, ¹³C, ¹⁹F and ¹H. We also present three new results which significantly extend the generality of the approach in reference 4. First we demonstrate a unique and highly counterintuitive advantage of the equivalent spin approach: the long-lived state has substantial carbon character, but can be accessed from thermal equilibrium or bulk magnetization using only proton pulses and proton detection. For example, DPA (with carbon-13 on the acetylene) has a proton T_1 less than 4s, but the singlet state pumped and detected only through the hydrogen channel lasts five minutes [5]. Second, we show that extremely simple sequences (essentially carefully calibrated spin locking) can make robust and quantitative transfer into singlet states, with very modest rf power [6]. Finally, we show that a fundamental challenge to screening for useful compounds (synthesizing molecules with carbon-13 in the right positions) can be overcome by high field NMR at natural abundance, where carefully targeted sequences can select only the signal from the correct doubly labeled species. The idea of looking for doubly labeled carbon at natural abundance is not new (the INADEQUATE sequence has been used for years) but existing approaches do not work on equivalent carbons, so this required some novel pulse sequence development as well. Taken as a whole, these results significantly brighten the prospects for hyperpolarized imaging.

2. Dipolar field effects provide a unique window into subvoxel image structure⁷, on a distance scale intermediate between typical image resolution and diffusion-limited distances (tens to hundreds of microns). Recent experimental advances have enhanced sensitivity and improved our ability to look for "dipolar surprisal images"-that is to say, structural features that arise not just because the magnetization is structured, but reflect the local anisotropy. Examples primarily in tissue imaging will be presented, including temperature imaging, alternatives to diffusion tensor imaging, and distinguishing between different types of adipose tissue.

- 1. Carravetta, M., O.G. Johannessen, and M.H. Levitt, Phys. Rev. Lett 92, 153003 (2004)
- 2. M. Tayler and M. H. Levitt, Phys Chem Chem Phys 13, 5556–60 (2011).
- 3. W. S. Warren, E. R. Jenista, R. T. Branca and X. Chen, Science 323, 1711–4 (2009).
- 4. Y. Feng, R. M. Davis and W. S. Warren, Nature Physics 8, 831–837 (2012)

5. Feng Y, Theis T, Liang X, Wang Q, Zhou P, Warren WS. Storage of hydrogen spin polarization in long-lived 13C2 singlet order and implications for hyperpolarized magnetic resonance imaging. J Am Chem Soc. 2013;135(26):9632-5

6. Theis T, Feng Y, Wu T-L, Warren WS. Spin lock composite and shaped pulses for efficient and robust pumping of dark states in magnetic resonance. arXiv:1308.5666 2013.
7. W. S. Warren, "Concentrated Solution Effects", Encyclopedia of Magnetic Resonance (2011), DOI: 10.1002/9780470034590.emrstm0088.pub2

HL1 Personal Reminiscences on Helical Polymers by NMR

Toshifumi Hiraoki

Grad. Sch. Eng., Hokkaido University, Sapporo.

My first contact with NMR came in the year 1972-73, as the undergraduate thesis about the molecular motion of hydrated poly(amino acid)s with using JEOL CW ¹H broad-line NMR equipment at 12 MHz in the Department of Polymer Science, Hokkaido University under the direction of Professors K. Hikichi and A. Tsutsumi. The instrument was no lock and field sweep. My Ph.D. work in the laboratory was the NMR characterization of poly(D-glutamic acid)-paramagnetic transition metal-ion complexes in solution by using JEOL FX-60Q under the supervisor Prof. Hikichi. I attended at first the 19th annual NMR meeting (1980) at Sapporo, and presented the dynamic structure of poly(L-ornithine)-Cu(II) complex. Local structure of the complex could be obtained from the contribution of paramagnetic relaxation times.

In 1985 autumn, I started to work with Professor H. J. Vogel as a research associate at University of Calgary, Canada. We investigated the structures of metal-binding proteins with the state of art AM400. ⁴³Ca(II),¹¹³Cd(II) and ²⁰⁷Pb(II) were found to be excellent reporter molecules for the coordination sites of metal ions to proteins.

Then, I moved back to Professor Tsutsumi's laboratory at Hokkaido University in 1987. We started to the solid state ²H NMR experiments of partially deuterated helical poly(amino acid)s with MSL200 and the home-made probe-head with 90° pulse width of about 1.5 μ s, in order to investigate the local motions of the main and side chains of the polymers. Selected C-²H bond directions are monitored in ²H NMR providing well-defined indicators of polymer orientation and dynamics, because the correlation time of molecular dynamics of polymers is remarkably distributed of 10 to 10⁻¹² s. This technique was applied to the surface dynamics of globular proteins which were selectively deuterated in the end of the side chain of an amino acid residue. Our current research includes the conformational dynamics of various polyacetylene derivatives and poly(amino acid)-metal complexes with DSX300 and ECA920. Their results will be presented in the meeting.

NMR has been always for me the endless frontier. I have really enjoyed my research with NMR. It is my pleasure to thank all my colleagues who have been involved in endeavor which has sometimes been frustrating but more often stimulating.

Why can F₀F₁ ATPsynthase rotate?

Hideo Akutsu

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

H⁺-driven F_0F_1 -ATP synthase plays a major role in energy production in most organisms. It converts the electrochemical potential generated by H⁺-gradient across membranes into the rotation of the *c*-subunit ring in F_0 and then into that of the γ -subunit in F_1 and vice versa. The rotation of γ is related to a conformational change of the β subunit, which induces ATP synthesis/hydrolysis. To understand this mechanism on structural basis, we have been working on this machinery for more than 20 years, using solution and solid-state NMR. Since its molecular mass is more than 500 kDa, we have encountered great difficulties. I will summarize our strategy to tackle on this complex system and what we have learned so far.

F₁F_o ATP synthase is a ubiquitous molecular motor involved in H⁺-mediated energy

conversion in organisms from bacteria to man. The H⁺-driven ATP synthase transfers the energy of the transmembrane electrochemical potential to ATP. It consists of a water-soluble F₁ and a membrane integrated F₀. The former has catalytic site for ATP synthesis/hydrolysis, and the latter mediates H⁺ transport across the membrane. The components of F₁ and F₀ are $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\varepsilon$ and ab_2c_n , respectively. The c subunits form the rotor ring. Walker's group reported the crystal structure of $\alpha_3\beta_3\gamma$, in which β taking the open and closed forms in the absence and presence of a nucleotide, respectively. Furthermore, Yoshida, Kinoshita and their colleagues revealed that γ rotated



Fig. 1 Bacterial F_oF₁ ATPsynthase

at the expense of ATP. The rotation may be induced by a change in the soft interaction between the γ and β s generated by the conformational change in β . We have been working on this energy conversion system using NMR for more than 20 years to elucidate its mechanism. 1. A strategy to understand the whole mechanism

We started with the interest on the energy conversion mechanism in general. However, it turned out that the mechanism of the rotation is the key to understand the energy conversion mechanism. Why can F_0F_1 rotate? Question is simple. To answer the question, however, we need to investigate this system from many kinds of approaches. NMR can contribute to elucidation of the structure and function. The problem is that this enzyme is a membrane protein with multi-subunits, energy conversion, molecular motor, soft interaction, proton translocation

あくつ ひでお

and huge in terms of NMR difficulty on molecular size. Thus, the strategy was the combination of "from a subunit to the complex" and "solution NMR for soluble proteins and solid-state NMR for membrane bound proteins" in collaboration with Prof. Masasuke Yoshida.

2. What is pKa of the catalytic carboxyl group of the β subunit?

We started with the catalytic site of the β subunit from thermophilic *Bacillus* (TF₁ β). Since there was no Cys, the catalytic Glu was replaced with Cys. Then, ¹³COOH was introduced by carboxymethylation. We could detect this signal even in a 52 kDa protein. By pH titration of this signal, pKa of the catalytic carboxyl group was determined to be 6.8. It can provide catalytic ability.

3. What is the driving force of the rotation of the γ subunit?

We tackled on the conformational analysis of specifically deuterated $TF_1\beta$ at first, then moved to the uniformly ¹⁵N-labeled one. Especially, segmental labeling with Intein in collaboration with Prof. Toshio Yamazaki opened a new stage. We analyzed the chemical shift perturbation induced by ADP binding and determined the relative orientation between the N- and C-terminal domains of a monomeric β subunit using residual dipolar couplings in combination with segmental isotope labeling. It was demonstrated that the conformational change of β from the open to the closed form (bending motion) upon nucleotide binding was similar to that expected from mitochondrial F_1 (MF₁) crystal structures and was an intrinsic property of the β subunit. This could be a driving force for the rotational catalysis. We also found that ATP- and ADP-bound conformations were different. The latter was similar to the closed conformation in the crystal structure of MF₁. We suggested that the former was related to an excited conformation.

4. How about the β subunits in F₁ in solution?

We were also successful to analyze the 360 kDa TF₁' in solution, using the segmentally labeled β . We could confirm that the open and closed β conformations were similar to the open and ADP-bound conformations of the β monomers, respectively.

5. Why can the $TF_1\varepsilon$ subunit act as a brake of the γ rotation?

The helix domain of $TF_1\varepsilon$ was found to fold and extend in the presence and absence of ATP, respectively. Thus, the extended helical rod will interfere with the interaction between α/β and γ at low ATP concentration to suppress the rotation not to waste ATP.

6. Why can the *c*-subunit ring rotate in F_0 ?

To elucidate whole mechanism of the energy conversion, we have to understand the mechanism underlying the proton translocation and the *c*-ring rotation in F_o . Since *a*, *b*, and *c* subunits are membrane proteins, analysis was not easy. We started with structural determination of TF_oc monomer in organic solution, which showed inconsistency with the proposed *E. coli* c-ring model. So, we performed structural analysis of EF_oc -ring with solid-state NMR and found out that our previous conclusion was correct. We also investigated the interaction between the *c*-rings and lipid bilayers. For structural determination of the c-ring in membranes, we selected TF_oc -decamer ring as a target because of its stability. Solid-state analysis of the active site of the membrane-reconstituted TF_oc -rings labeled with SAIL-Glu and Asn was carried out. The chemical shift of C^{δ} of Glu56 essential for H⁺-translocation revealed that its carboxyl group is protonated in membranes, forming the H⁺-locked conformation with Asn23. Furthermore, it turned out that there were two types of H⁺-locking in the c-rings from different biological species. The assignment of all ¹³C signals and structural determination of TF_oc -ring is under the way.

IL11

Nuclear Magnetic Resonance: A Powerful Tool for Elucidating the Interplay between Structure and Dynamics of Soft Matter

Hans Wolfgang Spiess Max-Planck-Institute for Polymer Research, Mainz, Germany

In soft matter, the function of complex synthetic as well as natural systems is often achieved by separating regions of order and disorder. Examples are semi-crystalline polymers or polymer systems composed of different repeat units, i.e. polymer blends or copolymers. Moreover, incompatibility of building blocks, e.g., backbone and side groups in macromolecules, or non-covalent interactions, such as hydrogen bonds, ionic forces or π - π interactions lead to self-organization. In the resulting structures the different units are spatially separated and may display vastly different dynamics. Even if highly ordered on a local scale, such systems often do not crystallize. Therefore, their atomic resolution structures cannot be determined by conventional X-ray or neutron scattering. Advanced NMR techniques provide unique insight into the organization of such materials because they can probe both structure and dynamics simultaneously, see Table 1.

Interaction	Geometry	Nuclei	Structure	Dynamics	
Chemical	Intrinsic	¹ H, ¹³ C,	Conformation, Conformational		
shift	and	¹⁵ N, ¹⁹ F,	through-space	transitions, rotational	
	orientation	²⁹ Si, ³¹ P	proximities	motions	
Dipole-dipole	Internuclear	¹ H, ¹³ C,	Through-space	Translational and	
coupling	distance,	¹⁵ N, ¹⁹ F,	distances	rotational motions	
	orientation	²⁹ Si, ³¹ P			
J-Coupling	Internuclear	¹ H, ¹³ C,	Conformation	Conformational	
	distance,	¹⁵ N, ¹⁹ F,	and intergroup	transitions, rotational	
	orientation	²⁹ Si, ³¹ P	binding	motions	
Quadrupole	Intrinsic	² H, ¹⁴ N,	Symmetry of	Rotational motions	
Coupling	and	¹⁷ O, ²⁷ Al	electronic		
	orientation		environment,		

Table 1. NMR interactions used for characterizing the dynamics of polymers.

Therefore, NMR is an indispensable tool for structural and dynamic characterization of soft matter as part of a multi-technique approach, combining spectroscopy, scattering, microscopy and computer simulation. Examples of such studies of various nanoscopically structured functional materials will be described.

Reference: H. W. Spiess, Macromolecules 43, 5479-5491 (2010)



Day 3 (Nov. 14, Thu) (Japanese Session)

高分子量蛋白質の立体構造解析に向けた新規SAILアミノ 酸標識法の開発

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

New SAIL-NMR methods on structural analysis for large molecular protein

○Yohei Miyanoiri¹, Mitsuhiro Takeda¹, Tsutomu Terauchi^{2,3} and Masatsune Kainosho^{1,2,4} ¹Structural Biology Research Center, Graduate School of Science Nagoya University, Aichi, Japan.

²Center for Priority Areas, Tokyo Metropolitan University, Tokyo, Japan.
 ³SAILTechnologies, Inc, Kanagawa, Japan.
 ⁴Institute for Protein Research, Osaka University, Osaka, Japan.

At present, the solution NMR spectroscopy of large molecular proteins (>50-60 kDa) relies exclusively upon the information obtained from the backbone NH and side-chain CH₃ 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 and aliphatic CH cross peaks, even for a 82 kDa *E. coli* malate synthase G (MSG). In this presentation, we introduce a differential labeling method of leucine and valine CH₃ groups for optimizing a precise structural analysis of large molecular proteins.

[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(¹H¹⁵N)やメチル基(¹H₃¹³C)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、これまでに立体整列同位体標識(stereo-array isotope labeling: SAIL)法を駆使し、高分子量タンパク質の精密立体構造解析法の開発を進めてきた¹⁻³⁾。昨年度の年会までに、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を開発し、分子量82kDaのリンゴ酸合成酵素(malate synthase G: MSG)の様々な芳香環及び脂肪族側鎖の¹H¹³C相関シグナルを高感度に観測し、帰属結果を報告した。

今回、我々は、これまでの研究経過をもとに、従来のアミノ酸前駆体を利用した方法では成し得なかった、アミノ酸特異的かつ立体特異的なロイシン(Leu)およびバリン (Val)残基のメチル基標識法を新たに確立した⁴⁾。本年会では、MSGを利用した解析例を示し、高分子量蛋白質の精密立体構造解析における本手法の有用性を報告する。

SAIL法、メチル基、高分子量蛋白質

○みやのいりようへい,たけだみつひろ,てらうちつとむ,かいのしょうまさつね

[実験] Leu及びValのメチル基に、立体特異 的に安定同位体標識を施した新規SAILアミ ノ酸をSAILテクノロジーズ社により合成し た。一例として、 y₁位のメチル基を特異的 に¹H,¹³C標識したVal残基(y₁-Val)をFig.1 に示す。これら選択メチルSAIL-Leu/Valは、 通常の大腸菌高発現系を用いて、MSGへ取 り込ませた。200mlのM9最少培地(選択メチ ルLeu/Val, [U⁻²H]-グルコース, [¹⁵N]-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 養条件下で得られた試料を加水分解後MS分



Fig. 1 Structure of γ_1 -Val.

析することにより、同位体標識率や代謝転移の有無を確認した。その結果、選択メチルSAIL-Leu/Valは、僅か1-10 mg/100ml 程度の添加量で特異的かつ90%程度の高い標識率でMSGに取り込ませることができた。調製した選択メチルSAIL-Leu/Val標識MSGの各種NMRスペクトルの測定には、cryoprobeを装着したBruker AVIII-900を使用した。

[Leu/Val メチルシグナルの観測] 従来、Leu/Val残基のメチル基を安定同位体標識するには、 α ケト酸をはじめとするアミノ酸前駆体が利用されているが、この場合、LeuとValのメチル基は同時に安定同位体標識されてしまう。また、立体選択性に関しても、標識パターンが制限されてしまう。したがって、高分子量蛋白質の解析においては、メチルシグナルの縮重が激しく、立体特異的なメチルシグナルの帰属や、NOEシグナルの解析に困難を極めている。一方、我々が開発した標識法では、 γ_1 -Val(Fig.1)を利用することで、目的蛋白質におけるVal残基の γ_1 メチル基のみを観測することが可能となり、メチルシグナルの縮重を大幅に抑え、正確なシグナル帰属が可能となった。また、本手法では、Leuの δ_1 と δ_2 、Valの γ_1 と γ_2 メチルについて、如何なる組み合わせについても標識することが可能であり、効率的かつ正確にNOEシグナルを解析することにも成功した。

[結論] 選択メチル標識SAIL-Leu/Valを利用した新しいメチル基標識法の開発に成功 した。従来の手法では不可能であった、アミノ酸特異的かつ立体特異的なメチル基の 標識が可能となり、80 kDaを超える高分子量蛋白質においても、簡便かつ正確にメチ ル基に由来する立体構造情報を取得することが可能となった。本手法は、一般的な大 腸菌高発現系を利用しているため、汎用性は高く、これまでに開発してきた緩和最適 化SAIL法との併用も容易であり、高分子量蛋白質の構造生物学研究の前進に大きく寄 与することが期待できる。

[文献]

- [1] M. Kainosho, et al. (2006), Nature, 440: 52-57.
- [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. submitted

多剤耐性転写制御因子の運動性と薬剤認識機構の NMR解析

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

Dynamic drug recognition by multidrug-resistance transcriptional regulator

OKoh Takeuchi¹, and Ichio Shimada²

¹Molecular Profiling Research Center for Drug Disc., AIST, Tokyo, Japan. ²Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tokyo University, Tokyo, Japan.

LmrR is a major multidrug-resistance transcriptional repressor, which controls the expression of multidrug transporter in *L. lactis*. LmrR interacts with various toxic compounds, using a hydrophobic pore located at its dimeric centre. Here, we characterized the binding of four known ligands against LmrR, by using solution-state NMR. Relaxation analyses indicated that an unligated drug-binding domain shows significant μ s-ms dynamics, which might allow the protein to flexibly accommodate the compounds with different shapes. The dynamics at the drug-binding site was not suppressed, upon compound ligations. Instead, in all cases, the hydrophobic interface between the drug-recognition and DNA-binding domains becomes more flexible. The increased flexibility upon compound ligation is favorable for the entropy-driven interaction, which is characteristic to the drug recognition by LmrR.

多剤耐性転写制御因子(MDR-TR)は原核生物 の細胞内で様々な薬剤を結合し、多剤排出ポンプ の発現を亢進させる転写制御因子である。 MDR-TRに薬剤が結合すると、転写制御領域への MDR-TRの相互作用が抑制または亢進され、その 下流に位置する多剤排出ポンプの発現が誘導さ れる。同様の機構はヒトにおいても保存されてお り、核内レセプターPXRは、薬剤によりP糖タン パク質やCYP3A4などの発現を誘導する。

LmrRは、Lactococcus lactis の主要なMDR-TR で2量体形成面において挟み込むようにして1分 子の薬剤を結合する(Fig. 1)。本研究では、LmrR が様々な楽剤を認識する分子機構を明らかにす るため、薬剤結合に伴うLmrRの運動性・構造の 変化をNMR法により解析するとともに、等温滴 定型熱量計による熱力学的解析を行った。



Fig. 1 Structure of LmrR in complex with Daumycin

Drug-recognition, multidrug-resistance transcriptional regulator, Relaxation Analysis

Oたけうち こう, しまだ いちお

薬剤非結合状態におけるLmrR のNMRスペクトルを解析した結 果、薬剤結合部位のシグナル強度 がその他の部位に比べて顕著に低 く、またシグナルが観測されない 残基が複数存在することが判明し た。このことは薬剤認識部位が複 数の構造の間を交換していること を示唆している。そこで主鎖アミ ド¹⁵Nの緩和測定により、LmrRの 運動性についてより定量的な解析



Fig. 2 ¹⁵N T1/T2 value of LmrR in the unligated state

を行った。その結果、薬剤結合ヘリックスは全領域にわたり大きなT1/T2値を示し、 ms-usの遅い運動性を有することが明らかとなった(Fig. 2)。またAlaメチル基のオー ダーパラメーターS²を比較したところ、C末端薬剤結合ヘリックスがより小さいS²を 示した。このことは薬剤結合部位、特にC末端ヘリックス構造の柔軟さによりLmrRの 多剤認識が達成されていることを示唆している。

次に各種薬剤をLmrRに滴定し、結 合前後でのLmrRの主鎖アミド基お よびメチル基の化学シフト変化の比 較を行った。その結果、薬剤結合・ DNA結合ドメインの境界、ドメイン 間ループ等の化学シフト変化が薬剤 間で互いに相関し、薬剤結合に伴っ て当該部位に類似の構造変化が生じ ていることが示された(Fig.3)。

特にIle62¹³C_{$\delta1$}の化学シフト変化 に着目すると、薬剤結合に伴って Ile62の χ^2 がGauche-を取る割合が増 加していることが明らかとなった。



Fig. 3 Correlation between CSP induced by compound titration

Ile62のx²はX線結晶構造中でC末ヘリックスの開閉と相関しており、Ile62の化学シフト 変化は、薬剤結合に伴い開閉構造間の構造平衡が閉方向に傾いたことを示唆していた。 一方、Ile62にAla変異を導入し、変異導入に伴う化学シフト変化と薬剤結合に伴う化 学シフト変化との相関を解析したところ、両者は逆相関を示した。このことは、C末 端薬剤結合へリックスの付け根に位置するIle62が、C末端ヘリックス開閉の構造平衡 を開方向に保つ役割を果たしていることを意味する。

薬剤結合状態においても薬剤結合部位由来のシグナルには顕著な広幅化が観測され、当該領域の運動性は保持されていた。また結合前後でのメチル基S²を比較したところ、薬剤結合に伴って、薬剤結合・DNA結合ドメイン境界のns-ps時間スケールの運動性がむしろ増大していることが明らかとなった。一方、等温滴定型熱量計による熱力学的解析からLmrRと薬剤との結合はエントロピー駆動であった。以上の実験事実から、薬剤が結合しても構造の柔軟さが保持されることは、エントロピー駆動の結合に有利に働いていると考えた。

L16

天然変性タンパク質のNMRによる揺らぎ構造解析

岡崎萌花¹,大堀由佳¹,幸元雅也¹,渡部暁²,栃尾尚哉²,〇西村千秋¹ ¹帝京平成大・薬 ²理研

Dynamic structure of the intrinsically disordered proteins monitored by NMR

Honoka Okazaki¹, Yuka Ohori¹, Masaya Komoto¹, Satoru Watanabe², Naoya Tochio² and Ochiaki Nishimura¹

¹ Faculty of Pharmaceutical Sciences, Teikyo-Heisei University, Tokyo, Japan. ² RIKEN System and Structural Biology Center, Yokohama, Japan.

Alpha-synuclein is an intrinsically disordered protein, which is unfolded even at the physiological condition. The remaining structure may be related to the amyloid formation. The CLEANEX-PM experiment is useful to elucidate the weak protected region of the amide-protons. The residual structure and disorder structure were analyzed in alpha-synuclein.

The p24 was predicted as an intrinsically disordered protein, but its globular structure was successfully determined by the X-ray and NMR. In this study, the protein was destabilized by the addition of the artificial extension at the N-terminus or C-terminus. In this case, the other flexible regions were observed using the relaxation and amide-proton exchange studies. These flexible areas were mainly consistent with the disorder prediction from the primary sequence.

天然変性タンパク質は、生理的な条件下でも一定の構造を持たず、変性状態で存在 するタンパク質である。またほとんどの領域が構造をとっているタンパク質において も、ほどけた揺らぎ構造の領域が存在することがあり、タンパク質の持つ機能発現に 大きく貢献していることが知られている。

このように個々のタンパク質は異なる時間領域の揺らぎ構造を有している。私たち は天然変性タンパク質と予測される3つの蛋白質を用いて、NMRによる異なるタイプ の揺らぎ構造の検出を行ってきたので、今回報告する。

アルファ-シヌクレインの残存構造の解析

アルファーシヌクレインは、代表的な天然変性蛋白質であり、アミロイドを形成する。配列上の中央部のNAC領域は単量体では変性状態であるが、アミロイド形成時には重合部となりベータ構造を形成する。N端とC端領域は溶液中で弱い残存構造を有しており、アミロイド形成にマイナスに働く可能性がある。今回はCLEANEX-PM法を用いてpHや交換時間を変化させて、揺らぎを伴う正確な残存構造を検出した。

CLEANEX-PM法からは、従来の水素重水素(HD)交換から得られる情報と似た情報を 得ることができる。HD交換ではクエンチタイプの実験やSOFASTなどの実験を駆使し ても、数秒時間オーダーのアミドプロトンと(重)水との交換を観測することが限度 であるが、長時間のコア領域の解析には適している。一方、CLEANEX-PM法では、数ミ リ秒から数百ミリ秒の時間の領域においての交換の観測が可能である。このような方法論的な違いより、ほとんど構造がほどけており、残存構造といわれるアルファーシ ヌクレインの構造を解析する場合には、CLEANEX-PM法が有利である。

これまでに、C端領域の残存構造は示されてきたが、N端領域の残存構造を示すことができた。さらにpHや交換時間を変化させて、交換がEX2モードであることを確認するとともに、データの平均化により、精度の高いデータを得ることができた。

HIV-1タンパク質の動的構造解析

HIV-1のp17とp24は、Gag Polyproteinの一部として感染した細胞内で合成され、HIV Proteaseによりそれぞれに切断されて機能を発現できる状態となる。つまり両タンパク質は宿主細胞内で合成された時点では、結合している。両蛋白質ともにPONDRにより、天然変性度が約50%と予測されているが、すでにNMRやX線によって、通常の球状蛋白質として構造が解析されている。

p17はCLEANEX-PM法とHD交換法を用いて、特にループ領域の揺らぎ運動の違いと機能の関連を解析した。

p24の方は予測と一致して、かなり不安定な構造の蛋白質であった。今までにp24の N端ドメインでは、N端側にp17の結合した形での測定、さらにC端側にp24のC端ドメイ ンが結合した形でも、動的な構造が報告され、中央部の4-5ループにおいて、揺らい だ構造の存在することがわかっている。その揺らぎ構造部位が、cyclophilin-Aとの 結合部位であることがわかっている。

本研究では、それ以上の揺らぎ構造を観測するために、N端やC端領域に人工的なタ グを残し、タンパク質の全体的な不安定化を試みて構造解析を行った。p24は CLEANEX-PM法の遅い時間領域と、T₁、T₂や異核NOEで観測される速い時間領域の両方の 揺らぎ運動を、4-5ループにおいて、それぞれのタグ体において保持していた。面白 いことに、C端にタグを付けると、3-4ループと6ヘリックスに柔軟な構造が観測され た。さらに、N端にだけタグを付けると、3-4ループと6ヘリックスに加えて、N端領域 と4ヘリックスに柔軟な構造が観測された。ここで重要なポイントは、どちらにタグ を付けても、3-4ループと6ヘリックスの揺らぎ構造が見られたことであり、このこと から、以下のような段階的揺らぎ構造の獲得を提唱した。

1) 4-5ループ、2) 3-4ループと6ヘリックス、3) N端領域と4ヘリックスの順。 なお、3-4ループはHIV治療薬CAP-1の結合部位と一致した。また、これらの揺らぎ構 造の領域は、PONDR予測の天然変性領域ともおおむね一致した。

以上のように、アルファーシヌクレインに関しては、CLEANEX-PM法を用いて、精度の 高い残存構造を導き出した。さらにp24に関しては、天然変性予測において予測され ていた部位において、タグを付けた場合に、揺らぎ構造が観測された。以上のような 二つの方法は、天然変性タンパク質の解析に有用であると思われる。

Relaxation, Amide-proton exchange, Intrinsically disordered proteins

おかざきほのか,おおほりゆか、こうもとまさや、わたなべさとる、とちおなおや、 〇にしむらちあき ○鳥澤 拓也¹ ¹中外製薬株式会社・研究本部

NMR Analysis Aiming for Contribution to Antibody Therapeutics.

OTakuya Torizawa¹

¹*Research Division, Chugai Pharmaceutical Co., ltd., Kamakura, Japan.*

The biotherapeutics market is expanding rapidly and global pharmaceutical companies are competing to develop drugs in this field. Chugai has been a pioneer of antibody therapeutics, taking the first developed antibody product in the country to market. In addition to the products in the market, we have been continuing research on various candidate molecules which could become the next generation of antibody drugs. In the rapidly developing field, a wide range of analytical information of the molecules of interest is required at the discovery stages of seeds, in their optimization to become drugs, and in subsequent production and quality control. To provide this essential information, we are now using NMR analysis to discover what is going on around the molecules in terms of structure, physicochemical issues and interactions. Here some of these NMR activities will be introduced.

創薬におけるNMRの活用方法と言えば、まずは低分子薬そのものや、それらとの相 互作用するタンパク質の解析を想像するだろう。今回、これらとは異なる製薬企業で のNMR解析について紹介したい。現在、バイオ医薬品市場は急速に拡大し、世界の製 薬企業は最先端のバイオ医薬品の研究開発にしのぎを削っている。中外製薬ではこの バイオ医薬品にいち早く着目し、エリスロポエチンやG-CSFといったサイトカインを 皮切りに、日本国内で初めて開発された抗体医薬品を世に送り出し、バイオ医薬品開 発の国内先駆者となってきた。さらに、上市されたもののみならず、次世代の抗体医 薬品になっていくであろう種々の候補分子についても日夜、研究を進めている。この 急速に進化する創薬分野においてシード分子の発見から医薬品となるまでの最適化、 その後の生産・品質管理に至るまで、対象分子についての多様な情報が必要とされる。 それらの情報の中でも抗体分子に構造・物性・相互作用の観点でどのようなことが起 きているかについてNMR法特有の情報を提供していくことにより、抗体医薬品の創製 の一翼を担うべく日々取り組んでいる。本発表では中外製薬における抗体創薬への貢 献を目指したNMR解析ついて紹介する。

哺乳細胞(HEK293由来:一過性発現系、および、CHO:安定発現系)による抗体発現 系を用いて、安定同位体標識を施したIgGを発現させた。標識されたIgGを限定分解酵 素によりFab(50 kDa)、Fc(50 kDa:ホモダイマー)フラグメントに断片化・精製し、NMR

抗体, 創薬, 高分子量

○とりざわたくや

解析の対象とした。必要に応じてフラグメント化 しないIgG(150 kDa)も解析対象とした。抗体分子 の局所構造のNMR観測によりアプリケーションが 成立する場合には、アミノ酸選択的に標識した試 料を用いて解析した。アミノ酸選択的な標識は、 Asp、Gln、Glu、Proを除く16種類のアミノ酸で可 能であることが確認された。これらの標識試料の 主鎖アミド基、側鎖メチル基のシグナルを観測し た。メチル基については、Ala、Met、Valのシグ ナルを観測し、IgGにおいても十分な検出感度を 得た。アミノ酸選択標識試料のNMRシグナルの帰 属は、主に変異体の利用、および二重標識法の 同時実施により行われた。抗体分子を網羅的に



[u-²H,¹³C,¹⁵N] Fab (2D HN projection)



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

NMR検出する必要があるアプリケーションに おいては、²H, ¹³C, ¹⁵N 均一標識を行い解析対 象とした(Fig. 1)。この均一標識試料のシグ ナル帰属には、¹H-¹⁵N TROSY検出タイプの各種 三重共鳴スペクトル(Fig. 2)および¹⁵N-NOESY スペクトルを用いた。ある解析対象の抗体に おいては、主鎖アミド基シグナルの帰属率が、 Fcについて99 %、Fabについて91 %(IgGとし ては94 %)に達した。これらの抗体のNMR解析 技術基盤を背景に、抗体分子構造のキャラク タリゼーション、物性、分子間相互作用等の 抗体創薬のためのアプリケーションを実施し ている。

構の解明

○古川亜矢子²,山本竜也^{2,3},末松誠^{1,2,3},菅瀬謙治¹ ¹サントリー生命科学財団・生物有機科学研究所 ²慶応義塾大学・医学部 ³JST・ERATO

Regulation of heme oxygenase-2 activity elucidated by the analysis of structural dynamics

OAyako Furukawa¹, Tatsuya Yamamoto^{2,3}, Makoto Suematsu^{1,2,3}, and Kenji Sugase¹ ¹Bioorg. Res. Inst., Suntory Fndn. Life Sci. ²Sch. of Med., Keio Univ. ³JST, ERATO

Heme oxygenase-2 (HO-2), which degrades heme into biliverdin, free iron, and CO, is responsible for cerebral vasodilatation. HO-2 is composed of a structured region including the heme-binding site and a C-terminal disordered region. The C-terminal region has two characteristic cystein residues, which are supposedly involved in the regulation of HO-2 activity. However, its role in the activity is elusive and is difficult to explain by the crystal structure alone because it is disordered. We hypothesized that the C-terminal region transiently interacts with the structured region to regulate the structural dynamics responsible for the activity. To test this hypothesis, we have examined the enzyme activity and structural dynamics of two HO-2 constructs with (long HO-2) and without (short HO-2) the C-terminal region. Enzyme activity assay showed that long HO-2 had 1.5 times higher activity than short HO-2. To explain the difference in the enzyme activity, we performed PRE, R_2 dispersion, and CLEANEX-PM experiments. The results of these experiments suggest that the change of the fluctuating mode by the interaction with the C-terminal disordered region regulates the HO-2 activity.

Heme oxygenase-2(HO-2)は、O₂を用いてヘムをビリベルジン、CO、鉄へと分解 する酵素である。近年、HO-2によって生成される CO の量が脳の血管拡張に関与し ていることが報告されている。アイソザイムである HO-1は、自身の発現量で酵素活 性を調節しているが、HO-2は恒常的に発現しているため酵素活性制御機構は十分に 解明されていない。HO-2はヘム結合領域を含む構造領域とC末端側に2箇の Cysを 含む天然変性領域から成る。HO-1には、この Cys が存在しない。HO は、古くから多 数の結晶構造が報告されているが、C末端領域は天然変性領域なため結晶構造のみで この機能を説明することは困難である。そこで、我々は HO-2に特異的な C 末端の天 然変性領域が酵素活性の制御に関与しているのではないかという仮説を構築した。

ヘム分解酵素H0-2, dynamics, 天然変性領域 ○ふるかわあやこ, やまもとたつや, すえまつまこと, すがせけんじ まず、C 末端領域を含む long HO-2 と含まない short HO-2 の酵素活性を比較した。 その結果、long HO-2 は、short HO-2 より 1.5 倍酵素活性が高いことが明らかになった。 この酵素活性の違いを説明するために、long HO-2 と short HO-2 の¹⁵N-HSQC スペク

トルを比較してみると、各々の 残基の化学シフト値に大きな 違いは見られなかった(< 0.1 ppm; Figure 2d)。このことから、 C 末端の天然変性領域が静的構 造を変化させているとは考え にくい。次に HO-2 の動的構造 を解析するために、PRE, R_2 dispersion, CLEANEX-PM 実験 を実施した。PRE 実験から、C 末端天然変性領域が構造領域 と弱く相互作用していること が分かった(gray box in Figure 2a)。また、 R_2 dispersion と Fi



2a)。また、R₂ dispersion と Figure 2 Structural dynamics of HO-2 (a)PRE (b) CLEANEX-PM (c) CLEANEX-PM 実験から、構造 R₂ dispersion (d) chemical shift differences between long and short HO-2.

領域の多くの残基は揺らいでいて、いくつかの 残基は fold 状態と unfold 状態を遷移しているこ とも分かった(Figures 2b and c)。PRE の結果と比 較することによって、天然変性領域と相互作用 している構造領域中の残基が揺らいでいること も明らかになった(Figure 2 and 3)。

以上の結果から、C 末端の天然変性領域が酵素活性に重要な構造領域の動的構造を変化させ、更にこの動的構造変化によって酵素活性が 調節されていることが強く示唆される。



Figure 3 Mapping of the residues interacting with the C-terminal region colored in black, corresponding to the gray region in Figure 2.

L19

符号理論を応用した新規の安定同位体標識戦略

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

Novel Stable Isotope Labeling Strategy Using the Coding Theory

⊖Takuma Kasai¹, Seizo Koshiba^{1,2}, Jun Yokoyama^{1,3,4}, Takanori Kigawa^{1,3,5} ¹Laboratory for Biomolecular Structure and Dynamics, RIKEN Quantitative Biology Center

²Tohoku Medical Megabank Organization, Tohoku University

³Cell-Free Technology Application Laboratory, RIKEN Innovation Center

⁴Tsukuba Laboratory, Taiyo Nippon Sanso Corporation

⁵Department of Computational Intelligence and Systems Science, Interdisciplinary Graduate School of Science and Engineering, Tokyo Institute of Technology

Amino-acid selective stable isotope labeling is useful for the main-chain assignment process of difficult proteins or in hard cases such as in-cell NMR. We consider the selective labeling as encoding and decoding processes, that is, information of amino acid type is encoded to isotope labeling ratio and decoded by analyzing NMR spectra. From this point of view, canonical and reported combinatorial selective labeling methods utilize only qualitative information of isotope labeling, in other words, one labeled sample possesses only one bit information, therefore require many samples. With our new strategy, the information amount sample is increased by quantitative and precise isotope labeling using per scramble-suppressed cell-free protein synthesis system. This enables that all 19 non-proline amino acids are discriminated with as few as three labeled samples.

<背景>

アミノ酸選択的安定同位体標識法は、解析対象のタンパク質が高分子量である、低 溶解度・低収量である、あるいはin cell-NMRなど困難な環境下で測定をおこなうな どの理由により、三重共鳴による連鎖帰属法のみでは主鎖帰属の難度が高い場合、有 用である。しかし、標準的な選択標識法においてはアミノ酸の種類の数と同じだけ選 択標識体の種類が必要であり、タンパク質調製の手間・コスト、およびNMR測定時間 の点で問題があったため、標識するアミノ酸の種類を組み合わせることにより必要な 標識体の数を削減する組み合わせ選択標識法が提案されている。

<符号理論による選択標識法の理解・改良>

我々は、符号理論の考え方を導入することが、選択標識法の改良のためのブレーク

アミノ酸選択的安定同位体標識法、符号理論、無細胞タンパク質合成系

○かさいたくま,こしばせいぞう,よこやまじゅん,きがわたかのり



Fig.1 Encoding and decoding process of digital transmission (left) and amino-acid selective labeling (right).

スルーになると考えている。すなわち、例えばデジタル通信において、「A」という 文字を2進数に符号化し、伝送路を通じて送信し、受信側が受け取った符号語を復号 して「A」という文字を得るのと同じように、「このシグナルはアラニンに由来する」 という情報を、安定同位体標識率に符号化し、観測したNMRスペクトルを復号するこ とにより「アラニン」という情報を得る、と捉えなおすものである(Fig.1)。この 捉えかたに基づけば、標識体の数を削減するためには、ひとつの標識体あたりに盛り 込む情報量を増やす必要があるということになる。

ここで、標準的な選択標識法や、従来の組み合わせ選択標識法に目を向けてみると、 標識体が標識されているかいないか、あるいは標識率が高いか低いかといった定性的 な情報により各アミノ酸を表現しているに過ぎない。この場合、ひとつの標識体が保 持する情報量は1bitにとどまる。しかし、NMR測定は、安定同位体標識率に比例した シグナル強度が得られるという性質をもっており、情報を0と1でしか送ることができ ないデジタル伝送路とは異なるのであって、安定同位体標識率を定量的に設定するこ とにより、ひとつの標識体あたり1bitを超える情報量を盛り込むことができるはず である。

我々は、当研究室で開発した、標識スクランブルを抑えた無細胞タンパク質合成系 により定量的な標識を実現し、また、精度の高い復号のために、スペクトルのノイズ に影響を受けにくい定量的なスペクトル解析方法を考案して、これを実現した。

<「3進数」による標識パターンを用いた実例>

この符号化標識法のもっとも単純な実装 は、従来法のように2段階ではなく、3段階 の標識率を用いるものである。これは各ア ミノ酸を3進数に対応付けているとも言え る。¹⁵Nについては50%,75%,100%の3段階、 ¹³Cについては0%,50%,100%の3段階とし、 Fig. 2のような標識率となる3種類の標識体 を調製し、2D¹H⁻¹⁵N HSQCと2D HN(CO)スペク トルを測定して解析することにより、i位 (そのアミドを含むアミノ酸)とi-1位(ひ とつN末端側のアミノ酸)が、プロリンを除 く19アミノ酸のいずれであるかを判別でき る。従来の組み合わせ選択標識法(Parker et

	Corresponding			nple	San			Amino
	codeword	3		2	2	1	1	acid
	222	•		•		•		G
	221	•		•		•		F
	220	0	0	•		•		N
	212	•		•		•		L
	211	•		•		٠		S
	210	0	0	•		۲		D
	202	•		0	0	•		М
	201	•		0	0	۲		K
	200	0	0	0	0	•		R
	122	•		•		•		Α
100% ¹⁵	121	•		•		•	•	Ι
A 75% 15	120	0	0	•		•	•	С
0	112	•		•		•	•	V
() 50% ¹³	102	•		0	0	•	•	Y
100% 13	022	•		•		0	0	Q
- 100%	021	•		•		0	0	E
50% ¹³	020	0	0	•		0	0	Н
O 0% 13	012	•		•		0	0	Т
	002	•	•	0	Ó	Ó	Ó	W

Fig. 2 Labeling pattern for discriminating 19 amino acids with 3 samples.

al. JACS, 2004, 126:5020) によれば19アミノ酸を判別するためには6種類の標識体 を必要とするのに比べると、必要な標識体の数は半分である。

Smoothelin CHドメイン(116残基)にこの方法を適用してみると、主鎖の89個の孤 立ピークすべてを正しく判別することができたので、詳細を報告する。

ヒト脳内の高精度*in vivo*¹Hスペクトロスコピー絶対定量 化に関する検討

○渡邉英宏,高屋展宏 国立環境研究所 環境計測研究センター 生体応答計測研究室

Error and Correction in Absolute Quantitation of Metabolites *in vivo* Using Water as Internal Reference

OHidehiro Watanabe, Nobuhiro Takaya

Biological Imaging and Analysis Section, Center for Environmental Measurement and Analysis, National Institute for Environmental Studies. Ibaraki, Japan

Localized ¹H magnetic resonance spectroscopy *in vivo* is a method of measurements of metabolite concentration in human brain. Absolute quantitation method using water signal as internal reference is widely used. We examined position-dependent error caused by chemical shift displacement at high magnetic field. In this measurement, displacement occurs between the slice position of water and that of a metabolite due to chemical shift difference. In addition, B_1 distribution is inhomogeneous inside a human body at high field. In our finding through experiments at 4.7T, those displacement and inhomogeneous B_1 cause errors in quantitation of the metabolite using water signal. We also proposed and validated the correction method.

1. はじめに

In vivo¹Hスペクトロスコピー(¹H MRS)は、非侵襲にヒト脳内の局所関心領域の 代謝物の絶対定量化、すなわち濃度計測ができる方法である。この方法は、多くの臨 床用MR装置で絶対定量化プロトコルまで利用可能となっているものの、得られる測 定値のばらつきなどが大きく、有意差の判定を難しくしていることが多い。個人差な どのヒト由来に加えて、In vivoデータという性質上、誤差が大きくなることは止むを 得ない。しかしながら、方式、装置由来の誤差をできるだけ小さくして、バイアスを 抑えた状態での医学的有用性の評価が必要であると考えている。この観点からのアプ ローチの一例として、我々は、これまでに、上記絶対定量プロトコルで得られる定量 誤差には位置依存性があることを報告してきた。今回、一層の高精度化を目的として この位置依存性誤差要因について検討し、高精度化を行うことができたので報告する。

2.¹H MRSの絶対定量化法と定量誤差の位置依存性

¹H MRSでの絶対定量化には、生体内部の水信号を参照信号とした換算法が広く用いられる。この方法では、生体内部の水濃度を既知として、水スペクトルと代謝物スペクトルのそれぞれのピーク面積を比較することで代謝物濃度を算出する。ヒト脳の場合、関心領域内の水濃度は、この領域に含まれる灰白質、白質量を画像から求め、既報値のそれぞれの水濃度をもとに算出する方法が多く用いられる。

MRIでは、勾配磁場パルスと、関心領域に相当する周波数帯域を持つ高周波磁場パ In vivo¹H MRSスペクトロスコピー, ヒト脳, 定量化

○わたなべひでひろ,たかやのぶひろ
ルスとで構成されるスライスパルスを印加してスライス面の選択を行う。一方、¹H MRSでは、空間3軸に対応する3つのスライスパルスを用いたSTEAMシーケンスなど を利用して局所関心領域内のエコー信号を生成、収集する。このため、化学シフトに 起因したスライス位置ずれが生ずる。一方、高磁場では、誘電体である生体内で電磁 波の波長が被検体の大きさと同程度となるため、B₁不均一分布が生じる。今回、水と 代謝物間のスライス位置ずれとB₁不均一分布が定量誤差の位置依存性の原因ではな いかと考え、下記の実験を行った。

3. 実験方法

実験には、ヒト全身用 4.7T MR 装置(Agilent 製、*INOVA*)を利用した。定量誤差 の位置依存性の再評価のため、水を封入した直径 150 mm の円筒容器内に縦方向(上 段、中央、下段)に3つの直径 40mm の小円筒を設置した模擬試料を用いた。小円筒 内には、25mM のN アセチルアスパラギン酸(NAA)とクレアチン(Cr)の混合溶 液を封入した。この模擬試料を直径 300 mm の体積 RF コイル(QD TEM コイル)内 に設置し、各々の小円筒内に設定した 20×20×20 mm³の局所領域から、水信号抑圧 有、無の STEAM シーケンスにより代謝物信号と水信号を取得した。

次に、化学シフト位置ずれによる信号強度変化を測定するため、搬送周波数をシフトして複数の水信号を取得した。これに加えて、受信 **B**₁分布測定を行った。

4. 結果

評価には、NAA, Cr の Singlet のピーク 面積(PA)を水PAで除算した値を用いた。 中央での評価値とのずれは、上段では、 -8.7% (NAA 2.01ppm) , -4.8% (Cr 3.02ppm) , -2.2% (Cr 3.92ppm)、下段では、それぞれ 5.1%、2.4%、3.7%であった。搬送周波数 シフトの水スペクトルの PA から得た位置 ずれと信号強度変化の関係(■)は、受信 B₁分布から得た関係(▲)と3つの位置共 に同様の傾向を示した (Fig. 1, 図の矢印は NAA、Cr (3.02ppm) と水の化学シフト位 置ずれを示す。)。上段、下段共に水との化 学シフト差が大きい NAA で誤差最大とな ったことは、この傾向に合致した。これら の測定結果から求めた関数を用いて化学 シフト依存の信号強度補正を行った結果、 誤差は-1.8%~1.5%に改善した。



Fig. 1. Relationships between chemical shift displacement and peak areas of water (\blacksquare) and those between displacement and B₁ amplitude of corresponding voxel (\blacktriangle). Each arrows shows chemical shift displacement of a metabolite peak. An image shows a B₁ map in this phantom.

5. 結語

内部水標準を用いた¹H MRS 絶対定量化法では、化学シフト位置ずれと B₁不均一 分布を原因とする誤差が生じ、高磁場や受信表面コイルでの注意が必要である。提案 する補正法は高精度化に有効である。

ヒト in vivo 脳における鉄分布画像

○三森文行¹,渡邉英宏¹,高屋展宏¹, (国立環境研¹)

In vivo iron mapping in human brain

<u>F.Mitsumori¹</u>, H.Watanabe¹, N.Takaya¹ (Natl. Inst. for Environmental Studies¹)

It has been suspected that brain iron has a close correlation with the development of Alzheimer's disease. In this context the brain iron imaging is awaited. We have developed a method for brain iron imaging based on the finding that the apparent transverse relaxation rate of the water molecule in human brain is quantitatively described as a linear combination of the regional iron concentration [Fe], and the macromolecular mass fraction f_M . With thirty iron maps obtained from healthy subjects we discuss about the nonuniform iron distribution as well as the age dependent change in the iron accumulation.

【はじめに】これまで我々は、ヒト脳組織水の見かけの横緩和速度が局所のフェリチン鉄濃度 [Fe]、および高分子量分画 f_Mの線形結合で表せることを示し、その横緩和 機構の提示を行ってきた [1]。この成果のひとつの応用として、脳の鉄濃度を in vivo で画像化することが可能である。脳内の鉄分布には部位ごとに大きな違いがあること が知られているが、死後脳での化学分析を要した。近年、パーキンソン病やアルツハ イマー病の病変部位に鉄の蓄積が見られることが明らかになり、これらの神経変性疾 患の発症に鉄が関わるという疑いが強くなっている [2]。本発表では健常被験者 30 名 の鉄分布画像を作成し、脳内の不均一な鉄分布や、その加齢変化について示す。

【方 法】ヒト脳の測定には、Agilent 社の Inova 4.7T 分光計を用い、Multiecho Adiabatic Spin Echo シークエンス (MASE) により測定した6エコーの単指数関数フィッティン グにより、見かけの横緩和速度(R_2^{\dagger})マップと M_0 マップを得た。鉄分布画像の作成は、 これまでに報告した見かけの緩和速度を表す式(1)を用いて行った。

 $R_2^{\dagger} = 0.47[Fe] + 24.9f_M + 9.54$

(1)

ここで f_M は、 M_0 画像より得た水分布画像 f_w より、 $1 - f_w$ で求めるが、 M_0 画像は高磁 場における B_1 (信号受信時における RF 分布)の不均一により信号強度が歪んでいる ため、既報の方法によりその補正を行った [3]。測定は 13 歳から 63 歳の 30 名の健常 被験者で行い、鉄分布画像を作成した。さらに、同一面で測定した T_1 強調画像より作 成した灰白質、白質の分画画像をテンプレートとして、灰白質、白質の鉄分布画像を 作成し、領野ごとの鉄濃度を評価した。

【結果と考察】図1に10歳代から50歳代の5名の女性健常被験者で作成した脳の鉄 分布画像を示す。鉄濃度は0mg/100g fr. wt.を黒、20mg/100g fr. wt.以上を白とす るグレースケールで表示した。いずれの画像においても脳内の鉄分布は均一でないこ とが明らかである。脳中央部に見られる大脳基底核部位で鉄濃度が高く(グレースケ ールで明)、その内側から後方を走行する神経線維束である内包、視放線部位で低い (暗)ことは、これまでの死後脳の測定結果と一致している。また、白質部に比して

キーワード:ヒト脳、横緩和速度、鉄分布画像

○みつもり ふみゆき、わたなべ ひでひろ、たかや のぶひろ



Fig.1. Brain iron maps in healthy subjects at the age of (a) 10s, (b) 20s, (c) 30s, (d) 40s, and (e) 50s.

灰白質では一般に鉄濃度が高く、特に 後頭葉皮質で年齢とともに鉄濃度が上 昇する様子が見て取れる。灰白質テン プレートを用いて基底核部位の尾状核、 被殻、淡蒼球や前頭、側頭、後頭葉の 鉄濃度を定量すると年齢依存性はより 明確になる。図2、3に被殻、前頭皮質 で平均濃度が年齢に依存して増大する 様子を示す。一方、前頭白質において は、本測定の年齢範囲では年齢による 変化は見られず(図4)、視床において は鉄濃度は加齢に伴って減少した。

【結 語】脳組織水の見かけの横緩和 速度を用いてヒト脳の鉄分布画像を作 成することが可能になった。健常被験 者脳においては部位による不均一な鉄 分布が示され、それぞれの定量値は死 後脳でこれまで報告された化学分析の 結果と一致している。この画像化によ り、死後剖検を待つことなく脳内核部 位の鉄蓄積の個人評価が可能になり、 神経変性疾患の診断や病態評価に応用 できる可能性がある。

【参考文献】

[1] Mitsumori F, Takaya N, Watanabe H, Garwood M et al: Magn. Reson. Med., 68, 947 (2012).

[2] Smith MA, Thu X, Tabaton M et al: J. Alzheimer's Dis. 19, 363 (2010).
[3] Watanabe H, Takaya N, Mitsumori F: J. Magn. Reson. 212,





Fig.2. Age dependent increase in the iron concentration in the putamen region.



Fig.3. Age dependent increase in the iron concentration in the frontal grey matter region.



Fig.4. Age dependent increase in the iron concentration in the frontal grey matter region.

L22

○大窪 貴洋, 岩舘 泰彦 千葉大院工

Material analysis based on NMR relaxation and diffusion using Laplace-Laplace inversion \bigcirc Takahiro Ohkubo, Yasuhiko Iwadate *Graduate School of Engineering, Chiba University, Japan*

The basic principles and experimental techniques of two-dimensional analysis by NMR relaxation and diffusion are presented. A program for Laplace-Laplace inversion based on an algorithm by Venkataramanan was developed, and verified on various NMR experimental parameters such as signal-to-noise ratio and sampling points.

We applied a methodology of 2D relaxation and diffusion, which led to individual selfdiffusion coefficients for deconvoluted water by using the longitudinal relaxation time, to a polymer exchange membrane with different relative humidity. At 30% RH, the diffusion coefficient of water in small-sized channels is greater than that in large-sized channels. On the other hand, the diffusion coefficients of protons with smaller and larger water channels are almost the same at 50, 70, and 90% RH.

[緒言]

空隙を充填した分子の緩和時間 (T₁ および T₂) は、空隙の固体表面から沖合いに存在する バルク状態と表面吸着状態の分子が ps オーダーの早さで化学交換する場合、空隙サイズに 比例する。よってサイズ分布を持つ多孔質材料の空隙を充填した流体を対象とした CPMG 法で観測される信号強度は、空隙サイズに対応した緩和時間分布に由来する指数関数の重ね 合わせとして観測される。それゆえ、信号減衰を CONTIN 法等による逆変換 (ラプラス逆変 換) によって、緩和時間分布を得ることができれば、空隙サイズ分布を評価することができ る。このようなラプラス逆変換を利用した解析手法は、自己拡散係数 (D) の分子量依存性を 利用した DOSY 法等でも用いられている。

本研究では、これまで行われてきた一次元ラプラス逆変換による緩和や拡散の分布関数解 析を拡張し、*T*₁-*T*₂ や *T*₁-*D* 等の緩和と拡散をパラメータとした二次元スペクトルによる解 析手法の構築を目的とする。そのため二次元ラプラス逆変換プログラムの作成と開発したプ ログラムで得られる解の安定性評価を行った。また実材料への応用として、固体電解質ポリ マーの*T*₁-*D*二次元スペクトルによる水チャンネルの評価を行ったので紹介する。

[解析理論]

 $T_1 \ge T_2$ が分布関数 $F(T_1, T_2)$ として存在する試料を考える。この試料を対象に回復時間 τ_1 で反転回復法により磁化を操作し、CPMG トレインでエコー信号を観測する場合、信号強 度 M は、以下のように表される。

$$M = \int_{T_{1,\min}}^{T_{1,\max}} \int_{T_{2,\min}}^{T_{2,\max}} F(T_1, T_2) \left[1 - 2\exp\left(-\frac{\tau_1}{T_1}\right) \right] \exp\left(-\frac{\tau_2}{T_2}\right) dT_2 dT_1 + \epsilon$$
(1)

ここで ϵ は白色ノイズとなる。 $T_1 \ge T_2 \ge N_1 \ge N_2$ ポイントで離散化し、 $\tau_1 \ge \tau_2$ の計測ポイントを $N_x \ge N_y$ する。 $(N_x \times N_1)$ の $K_1 \ge (N_y \times N_2)$ の K_2 行列を考えれば、式 (1) は、以下のようになる。

$$M = K_1 F K_2^T + \epsilon \tag{2}$$

観測データ M から F を求めことが本研究の問題となる。原理的には式 (2) の $K_1 \ge K_2$ の クロネッカー積をとれば、1 次元の逆問題に転換することができる。しかし、例えば τ_1 のポ イント数として $N_x = 32$ 、 τ_2 のポイント数として $N_y = 1000$ 、 $T_1 \ge T_2$ の離散化をそれぞ れ $N_1 = N_2 = 100$ とすると、 K_0 は 10000 × 32000 の密で巨大な行列となる。CONTIN 法 のように F の 2 回微分を求めて繰り返し演算を行う場合、一般的なコンピュータを用いて 解を得ることは現実的ではない。本研究では、Venkataramanan らの提案した $K_1 \ge K_2$ を 特異値分解で低ランク近似し、実用的な計算コストで逆変換を行うプログラムの作成を行っ た。特異値分解によるデータ圧縮は、対角行列の最大要素 Σ^{max} と圧縮変数 S_{factor} との積 より小さい行列要素を 0 とおいて行った。 $K_1 \ge K_2$ のデータ近似により ($N_x \times s_1$) の $\tilde{K}_1 \ge$ ($N_y \times s_2$) の \tilde{K}_2 を求め、ユニタリ行列を使ってデータ圧縮した \tilde{M} を求める。次に近似デー タに基づいてノイズによる解の発散を抑制する smoothing 項 α ||F|| を用いたアルゴリズム により、F を得るための最小化関数 χ は以下のようになる。

$$\chi = ||\tilde{M} - \tilde{K}_1 F \tilde{K}_2^T||^2 + \alpha ||F||^2 \tag{3}$$

適当な α を仮定して、F の要素に対する非負の制限付き条件で最適化問題を繰返し計算によ り解くことで F を得ることができる。最適な α は可能な限り χ を最小にするはずであるか ら、得られた F より α_{opt} は以下のようになる。

$$\alpha_{opt} = \frac{\sqrt{s_1 s_2}}{||\tilde{K}_0 F - \tilde{M}||} \tag{4}$$

よって適当な α から出発して F を求め、さらに得られた F から α_{opt} を得る手順を繰返し行うことで最適解の F と α を得ることができる。

[解析方法の検証]

作成したプログラムの検証は、反転回復法 により T_1 エンコードした磁化を CPMG で信 号を観測する T_1 - T_2 相関パルスシーケンスで 得られる分布関数に基づいて行った。モデル データは、図 1 に示すようなガウス型関数で 分布した 2 つのピークを持つ T_1 - T_2 から計測 データを生成した。 T_1 - T_2 分布関数は、ピーク トップとして (T_1, T_2) = (0.153,0.0409) およ び (0.0409, 0.00244) に等しい高さの強度を持 つ。計測データに印加されるノイズの影響およ び特異値分解でのデータ圧縮に用いる S_{factor} の影響評価を行った。 τ_1 として 0.01 から 1.0 まで 32 ポイント、 τ_2 として 0.0 から 1.0 まで



Figure 1 A model T_1 - T_2 distribution function.

2000 ポイントの計測データを対象に計算を行った。モデル計測データに印加する白色ガウス ノイズは、最大ノイズ強度を ϵ として Signal-to-noize(S/N) 比を以下の式により定義した。

$$S/N = 10 \log \frac{||S + \epsilon||^2}{||\epsilon||^2}$$
 (dB) (5)

解析条件とするデータの S/N は、2.5, 3.5, 6.0, 8.5, 11, 16, 20, 40, 60 dB とした。Figure 2 は S/N の異なるモデル計測データの逆変換から得られた T₁-T₂ 分布を示す。図中に解析結

果から得られた smoothing parameter α , 解析で得た解 F と計測データの差 $\Sigma ||m - \tilde{K}_0 F||$ および特異値分解で近似した $\tilde{K}_0 \geq \tilde{K}_1$ の列のサイズ s_1, s_2 を示す。

Figure 2 は、S/N の異なるモデルデータ から算出した T_1 - T_2 分布を示し、強度 0 から 100% の範囲を 10% 刻みでコンタープロッ トしている。解析によって得られた T1-T2 分布は、S/Nの増加にしたがって Fig. 1の モデル分布の線形に近づいている。10 dB 以下の S/N において、T₁ の小さい領域に "ゴーストピーク"が出現している。また S/Nの増加にしたがって、 $\Sigma ||m - \tilde{K}_0 F||$ は減少している。S/N が 20 dB 以下では $\alpha = 1.2$ に収束し、S/N = 40 および 60 dB のモデル計測データの解析結果は、α <1 で モデル分布関数のピークトップを再現して いる。S/N = 20 dB程度のデータはノイズ によって過剰のスムージングがなされ、解析 結果に影響を与えていると考えられる。ま た特異値分解によって圧縮されたデータサ イズは、S_{factor} = 0.0001 による解析で S/N によらず $(s_1, s_2) = (9, 15)$ であった。特異 値分解によるデータの圧縮率は S/N に大 きく依存しないことがわかった。次にS/N の異なるモデル計測データを対象に Stactor を変えて (1e-6~1e-2) 解析を行い、 S_{factor} が T1-T2 分布に与える影響について検討し た。小さい S_{factor} を用いることで、 (s_1, s_2) は大きくなるが、等しい S/N のデータを異 なる Sfactor で解析した結果は、ほぼ同等の 線形を持つ T₁-T₂ 分布を示した。この結果 は圧縮率に関係する Sfactor パラメータが 1e-2 から 1e-6 の範囲では、解析結果に影響 を与えないことがわかった。良好な解を得 るためには Sfactor= 1e-4 程度で解析を行 うことが妥当と考えられる。

[実材料への応用]

固体高分子形燃料電池の電解質として用 いられる高分子は、燃料電池としての効率 を最大限活用するため高いプロトン電導性 能が求められている。固体高分子中のプロ トン伝導は、固体高分子中のスルホン酸基



Figure 2 T_1 - T_2 distribution calculated from model data with different signalto-noise ratio.

等で形成されるナノメートルスケールの水チャンネルを介して起こると考えられている。こ のように水を介してプロトン伝導を達成する固体高分子電解質は、プロトン伝導が含水率に 強く依存し、高温・低湿度で性能が低下することが知られている。よって、高いプロトン伝導 を発揮する材料を設計するためには、温度湿度をパラメータとした様々な環境下でナノメー トルレベルの水チャンネルの構造と役割を解明する必要がある。本研究では、磁場勾配 NMR を用いて、 $T_1 \ge D$ の二次元相関スペクトルを取得し、高分子中に存在する水チャンネルの構 造と拡散特性の評価を試みた。測定対象の固体電解質ポリマーはスルホン化ポリエーテルス ルホン (SPES)を対象とした。これらの膜を短冊状にカットし、湿度 (30, 50, 70, 90 および 95%) と温度をコントロールしたチャンバーにて含水率調整を行った後、テフロン棒を使っ て NMR 試料管に密閉した。NMR 装置は日本電子製 DELTA を用い静磁場強度 11.75 T の 下で最大 13 T/m まで磁場勾配を印加できるプローブを用いた。パルスシーケンスは、反転 回復法で磁化をエンコードした後、Pulse gradient spin-echo を適用する IR-PGSE により NMR 信号を得た²。回復時間 (τ) と磁場勾配強度 (g) を変化させて信号を観測し、得られた 信号をフーリエ変換したスペクトルから水に由来する信号強度を評価した。このシーケンス で得られる信号強度は、 $T_1 \ge D$ に依存し、以下のように表される。

$$M(T_1, D) = M_0 \left[\left\{ 1 - 2 \exp\left(-\frac{\tau}{T_1}\right) \right\} \exp\left\{-\gamma^2 \delta^2 g^2 \left(\Delta - \frac{\delta}{3}\right) \right\} \right]$$
(6)

ここで γ は磁気回転比、 δ は磁場勾配を印加した時間、 Δ は拡散時間となる。

単一パルスにより含水率の異なる試料の ¹H NMR スペクトルを観測したところ、単 一のブロードなピークのみを示し、ケミカル シフトからプロトン伝導に関係する水チャ ンネルの評価を行うことができなかった。 しかし SPES を対象に、IR-PGSE で得た 信号を2次元ラプラス逆変換を用いてT1-D の二次元スペクトルを得たところ、全ての 湿度条件で明白な2つのクロスピークを示 した。Fig. 3 は、30%RH で調湿した試料 の*T*₁-*D*スペクトルを示す。10⁻¹より短い T_1 と長い T_1 でピークが識別されており T_1 の異なる二種類の水分子が SPES 中に存在 している。SPES 中で親水性のスルホン酸 回りに配位している水は、ps オーダーでバ ルク水と交換していることが、分子動力学



Figure 3 T_1 -D distribution of water confined in a polymer exchange membrane under 30% RH.

計算から示されている³。よって2つのT₁に相当する水は、サイズの異なる水チャンネル に存在する水に相当すると考えられる。2つのクロスピークのD軸に着目すると、短いT₁ をもつ水の方が早い拡散係数を示している。拡散係数の違いは空隙サイズよりはむしろ ms オーダーの拡散時間で引き起こされる制限拡散構造を反映していると考えられ、水チャンネ ルの連結性に由来すると考えられる。

[参考文献]

- 1. L. Venkataramanan et al., IEEE Transactions, 50, 1017-1026 (2002)
- 2. T. Ohkubo et al. et al., J. Phys. Chem. Lett., 3, 1030-1034 (2012)
- 3. T. Ohkubo et al. et al., J. Mol. Model., 18, 533-540 (2012)

光励起三重項電子スピンを用いたDNPによる室温下での 偏極率34%の達成

○立石健一郎¹,根来誠²,西田辰介³,香川晃徳²,森田靖³,北川勝浩² ¹理研・仁科センター ²阪大・基礎工 ³阪大・理

Room-temperature hyperpolarization of nuclear spins with DNP using photo-excited triplet electron spin

OKenichiro Tateishi¹, Makoto Negoro², Shinsuke Nishida³, Akinori Kagawa²,

Yasushi Morita³, and Masahiro Kitagawa²

¹*RIKEN Nishina Center for Accelerator-Based Science, Saitama, Japan.*

²Graduate School of Engineering Science, Osaka University, Osaka, Japan.

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

Dynamic nuclear polarization (DNP), a means of enhancing bulk nuclear spin polarization with using electron spins, has been successfully applied in various research fields. By utilizing electron spins in the photo-excited triplet state, DNP can realize enhancement beyond the conventional limit of 660, independent of the temperature and magnetic field strength. We demonstrate a ¹H spin polarization of 34%, which gives an enhancement factor of 250,000 in 0.4 T at room temperature. The key in this work is suppression of the spin-lattice relaxation by regioselectively isotope labeling of the constituent molecules.

NMR測定の感度改善法として動的核偏極(Dynamic Nuclear Polarization: DNP)は、

近年非常に注目を集めている。DNPとは、 電子スピンの高偏極状態を核スピン系 へ移す手法である。ラジカル中の熱平 衡電子スピンを偏極源に用いる、従来 のDNPの信号強度増大比は^HHスピンの 場合に最大で660倍であるが、電子スピ ンの偏極率を10%以上に高めるには、極 低温装置が必要となる。

電子スピンの偏極率を冷却以外の方 法で十分に高められるのであれば、DNP に極低温装置は必ずしも必要ではなく なる。我々は光励起三重項電子スピン を偏極源に使用し、このような電子ス ピンを用いたDNPをtriplet-DNPと呼ぶ[1]。



Fig.1: Energy diagram of pentacene doped in a *p*-terphenyl crystal. Electrons excited with laser irradiation transit to a triplet state by intersystem crossing (ISC). The populations of the triplet sublevels are 12 %, 76 %, and 12 % respectively.

Dynamic Nuclear Polarization, triplet-DNP, regioselectively isotope labeling

○たていしけんいちろう,ねごろまこと,にしだしんすけ,かがわあきのり,もりた やすし,きたがわまさひろ



Fig. 2: Polarization buildup curves of four samples.

本研究では、室温で70%を超える高偏極状態となるペンタセンの励起電子スピンを偏 極源に使用する(Fig. 1)。ホスト分子には、ペンタセン溶解度が高く、室温で安定 な*p*-ターフェニルを使用し、室温下での高偏極化に関する研究を行った。

[']Hスピンの最大到達偏極率は、DNPによる高偏極状態の供給速度と[']Hスピンのスピン 格子緩和時間のバランスで決まる。本研究では、特に緩和が激しい[']Hを位置選択的に 重水素置換することで後者を伸ばし、最大到達偏極率の向上を図った。*p*-ターフェニ ルの中央のベンゼン環は室温下で激しく分子振動してので、この部分に付いている水 素を重水素置換すれば、スピン格子緩和時間を延ばすことができる。励起電子スピン による緩和は重水素化ペンタセンを用いることで抑制することができる[2]。本研究 では、ペンタセン・重水素化ペンタセンと*p*-ターフェニル・部分重水素化*p*-ターフェ ニルをそれぞれ組み合わせた4つのサンプルを用いてtriplet-DNPを行った。

Fig. 2に4つのサンプルでのtriplet-DNPによる^Hスピン偏極率のビルドアップカー ブを示す。ペンタセン-*p*-ターフェニルの最大到達偏極率は12%であった。重水素化 の効果を単独で用いた場合(ペンタセン-部分重水素化*p*-ターフェニル、重水素化ペ ンタセン-*p*-ターフェニル)の偏極率はそれぞれ16%、18%で、あまり偏極率の向上は 見られなかった。これらを組み合わせた重水素化ペンタセンをドープした部分重水素 化*p*-ターフェニルで40分間triplet-DNPを行うと、^Hスピン偏極率34%を達成した。

上記の実験では偏極率は信号強度比から算出しているが、磁場循環装置を用いた¹³C スピンの非対称スペクトルという別の方法からも偏極率を求めた。そして信号強度比 から算出したものと一致することを確認した。

室温下での高偏極化は、NMRやMRIで極低温装置を用いずに大幅な感度向上を得ることができるだけでなく、偏極標的として不安定原子核との散乱実験など基礎物理実験にも応用が可能となる[3]。

本研究は、科研費(新学術領域 21102004:量子サイバネティクス、若手研究 B 2474023:高利得スピン増幅の研究)、最先端研究開発支援プロジェクト・量子情報処理プロジェクト、GCOE プログラムの支援を受けて行われました。

文献

[1] K. Takeda, *Triplet State Dynamic Nuclear Polarization*, (VDM Verlag, 2009)
[2] T.R. Eichhorn, *et al.*, *Chem. Phys. Lett.* 555 (2012) 296.

[3] S. Sakaguchi, et al., Phys. Rev. C 84 (2011) 024604.

L24

Al-MCM-41中の骨格内6配位Alの構造変化 〇髙橋利和¹,岩浪克之²,林 繁信³,安田弘之¹ ¹産業技術総合研究所・触媒化学融合研究センター ²茨城工業高等専門学校・物質工学科

³産業技術総合研究所・計測フロンティア研究部門

Structure Change of Framework Octahedral Al species in Al-MCM-41

^OToshikazu Takahashi^{1, 2}, Katsuyuki Iwanami, Shigenobu Hayashi, and Hiroyuki Yasuda¹ ¹ Interdisciplinary Research Center for Catalytic Chemistry, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Ibaraki, Japan.

²Department of Chemistry and Material Engineering, Ibaraki National College of Technology, Ibaraki, Japan.

³*Research Institut of Instrumentation Frontier, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Ibaraki, Japan.*

²⁷Al MAS spectra of Al-MCM-41(Si/Al=20, d = 2.8 nm) under some conditions (before / after crushing, crushing pressures, storage period) are studied. On crushing mesopores (100 kN for 1h), a large part of Al[6] sites is once disappeared, then recovered in a different shape. The restricted water diffusion in this sample has enabled us to observe the water re-distribution within the sample. Since most of the catalytic activity have lost after the mesopore crushing, we have concluded that one of Al[6] components having a large electric field distortion, that is easily disappeared by mechanical compression should be the precursor of the active site. With some presumptions, this site appeared to have, in average, four Al-O-Si bonds from the results of site-selective magnetization transfer experiments.

【はじめに】Al-MCM-41はカルボニル化合物のシアノシリル化反応等に特異的に高 い活性を示す^{1,2}。これまで我々はAl-MCM-41中に含まれる活性サイトを探索する中 で、イオン交換によって4配位アルミ(Al[4])と6配位アルミ(Al[6])との間を可 逆的に行き来し、大きなPQ値を持ち、シリカ骨格と強い空間的相互作用をもつ6配位 Alサイトがこの材料のメソ孔内壁に特異的に存在し、ルイス酸サイトとして活性を担 うモデルを提案してきた²⁻⁴。MCM-41は規則的に2次元配列したメソ孔の並びをもつ が、局所構造的にはQ⁴のほかに、Q³種、Q²種も含む複雑な骨格構造を持つアモルフ アスシリカであり、このシリカの一部のSiをAlに置換したAl-MCM-41も同様である。 我々は触媒活性を担うプリカーサーと考えられる表面6配位Alを改めて「骨格内6 配位Al」として位置づけ、この構造の特徴をより明らかにするために新たに3種の

NMRデータを取得し検討を行った。(1)メソ孔の圧潰前後の²⁷Al MASスペクトル、

(2) ²⁷Al-²⁹Si CPMAS CPMG法に基づくビルドアップパターン(1.2 ~ 6 ms)、
 (3) 選択的スピンロックを適用した²⁷Al[4]-²⁹Si、²⁷Al[6]-²⁹Si CPMAS実験結果の比較である。これらの検討結果からAl-MCM-41中に含まれるAl[6]サイトの配位水の吸脱着が改めて確認されたのと同時に、少数の仮定の下に、このサイトがAl[4]と同程度の個数のAl-O-Siを持つことが推論された。

【実験】Al-MCM-41 (Si/Al=20) は文献記載の手 法により調製し、デシケーターに保存した(a)。メ ソ孔の圧潰はIRサンプル作成用打錠器を用いて室 温真空下、10,30,100 kNでそれぞれ1時間圧力を 加えた((b)~(d))。粉末(d)を湿度50%の室温下、 2週間保持した(e)。固体NMR測定はメノウ乳鉢で よく粉砕し、均一な粉末としたサンプルを24時間 湿度50%の室温中におき、ローターに充填して測 定した。測定は3 ch MAS probe を備えた Bruker AVANCEIII 400WBを用い、4 mmジルコニアロ ーターを用い、回転速度12.5 kHz、温度300 Kで 実験を行った。²⁷Al MASスペクトルは15°フリッ プ角にて測定した。²⁷Al-²⁹Si CPMAS実験は Pruskiの条件に基づき、CPMG法を援用して条件 最適化を行った⁵。サイト選択的²⁷Al-²⁹Si CPMAS 実験についてはスピンロック実験を行って6配位 Alの信号が90%以上の純度となる条件を探した。

【結果】メソ孔圧潰前後の²⁷Al MASスペクトラム をFig. 1に示す。10 kN, 30 kN, 100 kNでの圧潰 によってマイクロ孔体積が92%, 81%, 23%と減 少し、BET表面積は83%, 79%, 30%と減少する一 方、触媒活性は1/16, 1/50, 1/400と激減する。²⁷Al MASスペクトルのパターンは(a)-(c)の見かけ上の 変化は小さく、Al[6]がわずかに減少するとともに0 ppm付近のピークがややシャープになる傾向を示 した。一方100 kNでの圧潰によってのみAl[6]が一 時的に半減する現象が見出された(d)。ピーク面積 比Al[4]:Al[6] (20 ppm での切断に基づく) はそ れぞれ(a) 58:42, (b) 60:40, (c) 61:39, (d) 81:19, (e) 62:38であった

最終的に見出された²⁷Al-²⁹Si CPMASの測定条 件は v_1 (Si)=10.2 kHz (100→90%rampの平均値) v_1 (²⁷Al)=1.1 kHzであった。この条件においてビル ドアップパターンを確認するためにCPMG法を援 用してコンタクト・タイムを1.2 msから6.0 msまで 変化させて得たスペクトルをFig. 2 に示す。

配位数選択的な磁化移動スペクトラムを得るためにさらに²⁷Alの照射強度を弱め、 v_1 (Si)=11.5 kHz、 v_1 (Al)=330 Hzを選択した。この強度での²⁷Alのスピンロック後のシグナルをスピンロック時間400 μ sおよび6400 μ sにおいてそれぞれ照射周波数を変更しながら複数測定した(Fig. 3a,b)。この図ではx軸(F2軸)はFIDの観測周波数、y軸(F1軸)は照



Fig. 1 ²⁷Al MAS spectra of Al-MCM-41, before (a) and after compression at 10 kN (b), 30 kN (c), 100 kN (d), (d) stored for 2 weeks under 50% humidity (e).



射中心周波数、等高線は得られた信号強度を表す。

Al[4], Al[6] それぞれについて選択的スピンロック条件を用いて²⁷Al[4]-²⁹Si CPMASおよび²⁷Al[6]-²⁹Si CPMASスペクトルを測定した(Fig.4)。さらに400 μ sの $T_{1\rho}$ フィルターを挿入し、磁化の選択性を高めたスペクトラムを取得した(Fig.5)。



Fig.3 Frequency dependence of spin lock durable magnetization of ²⁷Al. Spinlock duration: 400 µs (a, left) and 6400 µs (b, right). (Solid-line: positive, dashed-line: negative).

【考察】100 kNでのメソ孔の破壊に伴い、壁の内面にあった6配位サイトの半数以上が水を失い4配位に変化した(Fig.1e)。壁面に結合し、配位水を伴っていた6配位Alサイトが壁の崩壊とともに配位水保持能力が低下し、相対的にAl[4]状態が安定化したと考えられる。Al[4]は裸の状態では強い酸性を持つH+を伴うため、やはり水を強く吸着し、H₃O+の形でAl[4]の対イオンとして、またはイオンの結合水として捕捉しうる。この試料を2週間保存している間にふたたび原料とは異なるAl[6]サイトを生成する理由は二次的に生成した4配位Alがメタステーブルであり、Al-O-Si結合の一部が加水分解を受けて改めてAlO₆型に変化しやすいことを意味する。10 kN、30 kNで圧潰した場合に(a)から(e)に対応する変化だけが見出され、(d)の状態は見出されないことから、100 kNで圧潰した場合にメソ孔の閉塞によって水分の流通が妨げられ、水の交換が局所的に起こった結果、(d)が一定時間観測されたと考えることができる。

次に配位数選択的スピンロック実験について述べる。Fig. 3より、この強度におけるスピンロックによって配位数選択的な照射が行いうることがわかる。選択的スピンロックによって選び出されるAl[4]、Al[6]の磁化の純度はそれぞれ約100%、90%と見積もられた。この条件を用いて²⁷Alをスピンロックし、再度²⁹Siのスピンロック強度を最適化したうえで²⁷Al-²⁹Si CPMASスペクトラムを取得した。結果をFig. 4 に示す。図から明らかなようにAl[4]、Al[6]からの選択的磁化移動によって見出される²⁹Siのシグナルはいずれもピーク位置をQ⁴(0Al)とQ³(0Al)の中間にもち、それぞれ若干異なっている。またQ³(1Al)もQ³(0Al)とQ²(0Al)との中間に位置しつつそれぞれ異なる位置にショルダーとして見出される。これらのピーク面積はほぼ3:2と元の触媒そのものに含まれるAl[4]:Al[6]の比率に合致している。さらに磁化の純度を向上させる目的で²⁷Alのスピンロックのみをあらかじめ400µsかけ、その後に²⁹Siにも照射して6 msコンタクトさせた場合($T_{l\rho}$ filtered)に得られた²⁷Al[6]-²⁹Si CPMASを調べると低S/NながらQ⁴(0Al)、Q³(0Al)部分がそぎ落とされ、より先鋭化したシグナルが得られている。この手法によってより選択性高くシグナル観測を行うことができる(Fig. 5)。

²⁷Al-²⁹Si CPMASにおいて得られるシグナル強度は最も簡単な考察から $T_{I\rho}$ (Al), $T_{I\rho}$ (Si)、磁化移動速度 T_{AISi} に下式のように接触時間 t に依存すると考えられる。

$$M_{29Si}(t) = [Al^{x}]Exp\left(-\frac{t}{T_{1\rho}(Al^{x})}\right) \left\{1 - Exp\left(-\frac{t}{T_{AlSi}}\right)\right\} [^{29}Si(OAl^{x})]Exp\left(-\frac{t}{T_{1\rho}(^{29}Si)}\right)$$
(1)

Fig. 2から²⁷Al-²⁹Si磁化移動はスピンロック寿命の長 い成分からゆっくりと均等に磁化移動している。Fig. 3b から $T_{lo}(Al[6]) \leq T_{lo}(Al[4])$ が見出される。また種々の Al[III]化合物の結晶構造から経験的にd (Al[6]-OSi)≧d (Al[4]-OSi)と考えられる。これら2条件はいずれも27Al[4] →²⁹Siに比べて²⁷Al[6]→²⁹Siの磁化移動を不利にする。そ れにも拘わらず²⁷Al-²⁹Si CPMASのシグナルはほぼ Al[4]:Al[6]の比を反映して3:2のシグナル面積で得られた (Fig.4 3.4の縦軸の尺度は同一)。磁化移動におけるCSA や四極子結合の異方性の影響ならびに29SiのT10の細かな 環境による違いが十分に小さいと仮定すれば、観測され る²⁹Siのシグナル強度はサンプル中のAl[4]とAl[6]の濃度 比のほかにそれぞれに隣接する-O²⁹Si結合の濃度(平均 個数)が反映されると考えられる(29Siの天然存在比が 4.7%と低いため、同時に2個の29Siを隣接する可能性は無 視する)。実験結果はシグナル比(Al[6]/Al[4])≒存在比 (Al[6]/Al[4])であることから、Al[6]はAl[4]とほぼ同数の Siを近傍に有していること、すなわち4個近くのOSi結合 を有することが導かれる。これらの結果から触媒活性点 のプリカーサーであるAl[6]は4点でシリカ骨格との結合 をもつ可能性が高いと結論付けられる。

Al-MCM-41中の六配位Alはメソ孔内壁のシリカ骨格 との横のつながりによってアーチ状に釣り支えられた状態にあり、この結合の一部が失われると6配位が保てな くなって、一時的にはむしろ4配位に変化しやすくなる と考えられる。一方十分な量の水分が存在すれば一部の Si-O-Al結合は加水分解を受け、3点もしくはそれ以下の Al-O-Si結合でシリカ骨格と結合した構造に移行して同時に触媒活性も失われると考えることができる。



-80 -100 -120 ppm Fig.4 ²⁷Al-²⁹Si CPMAS spectra of Al-MCM-41. DDMAS,CPMAS, Al[4], Al[6] site-selective magnetization transfer.



Fig.5 ²⁷Al[6]-²⁹Si site selective CPMAS spectra of Al-MCM-41 with/without a T_{l_0} -filter.

参照文献: [1] K. Iwanami, et al ChemComm. 2008, 1002.

[2] 岩浪ら, 触媒 2010, 52, 450. [3] 髙橋ら, 第48回NMR討論会予稿集 2009, 3L10. [4] 高橋, 第52回 固体NMR・材料フォーラム講演予稿集, 2012, L7. [4] M.Pruski et al, *J. Phys. Chem., C*, 2007, 111, 1480.

Al-MCM-41, ²⁷Al-²⁹Si CPMAS, Mechanochemical Structure Change

○たかはしとしかず、いわなみかつゆき、はやししげのぶ、やすだひろゆき

トリメチルホスフィンオキシドを用いたZSM-5型ゼオラ イトの酸性質の評価

○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

Evaluation of Acid Properties of ZSM-5 Type Zeolite Probed by Trimethylphosphine Oxide

OShigenobu 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 of ZSM-5 type zeolites were evaluated by means of solid-state NMR using trimethylphosphine oxide (TMPO) as a probe molecule. TMPO was introduced to the zeolite samples at 373 K via a gas phase (a vapor method), and ³¹P MAS NMR spectra were measured, which reflected the acid properties.

【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、³¹P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、ZSM-5型 ゼオライトにTMPOを導入して、酸強度の評価を行った。

【実験】 試料は、触媒学会の参照触媒 JRC-Z5-25H、JRC-Z5-70H、JRC-Z5-70Naを 用いた。Z5はZSM-5型であることを示し、最後のH、NaはそれぞれH、Na型であるこ とを示す。H、Naの前の数字はSiO₂/Al₂O₃比(仕込み値)を示す。

試料は200℃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結晶

固体NMR, 固体酸触媒, プローブ分子

Oはやし しげのぶ, じむら けいこ, こじま なつこ

TMPOを導入した。導入後、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。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。

³¹P MAS NMR 測定は、ブルカーASX400 (共鳴周波数 ³¹P: 161.98 MHz、¹H: 400.13 MHz)を用いて行った。³¹P を直接励起し て¹H デカップリング下でシグナルを取り 込んだ。85% H₃PO₄ 基準でシフト値を表示 した。

【結果及び考察】 ²⁹Si MAS NMR スペク トルの測定から、骨格の Si/Al 比は Z5-25H が 14.8、Z5-70H が 28.2 であった。そこか ら、ゼオライト骨格に入っている 4 配位 Al の量は Z5-25H が 1.05 mmol/g、Z5-70H が 0.57 mmol/g と見積もられた。この 4 配 位 Al の量がブレンステッド酸点 Si-OH-Al の量と等しい。

²⁷Al MAS NMR スペクトルから4配位 Al 量を見積もったところ、Z5-25H が 1.20 mmol/g、Z5-70H が 0.52 mmol/g となり、 ²⁹Si の結果とほぼ一致した。

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。

w着した TMPO の量は、¹H MAS NMR スペクトルで観測された TMPO のメチル基(CH₃)のシグナル強度から見積もった。 Fig. 1のキャプションに TMPO 量を示した。Z5-25H ではブレンステッド酸点量を越え る量の TMPO を導入することができた。TMPO は酸強度の強い吸着サイトから吸着 する傾向があり、³¹P スペクトルの 90~60 ppm の領域はブレンステッド酸点に吸着し た TMPO と帰属できる。一方、60~40 ppm の領域はブレンステッド酸点以外に弱く 吸着した TMPO と帰属される。Z5-70Na は Na 型であるためブレンステッド酸点がほ とんどないにもかかわらず、60~40 ppm にシグナルを示した。Z5-70Na では、TMPO は Na イオンやゼオライト骨格に吸着している。なお、結晶 TMPO は ³¹P スペクトル で 42 ppm に鋭いシグナルを示すが、今回の試料では観測されなかった。TMPO の導 入温度を 100°C に設定したことにより、細孔内を TMPO が拡散できたためと考えら

本研究は、JSPS 科研費 23550236 の助成を受けた。

れる。

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).



Fig. 1. ³¹P MAS NMR spectra of TMPO-loaded samples; (A) Z5-25H (0.42 mmol/g), (B) Z5-25H (1.64 mmol/g), (C) Z5-70H (0.14 mmol/g) and (D) Z5-70Na (0.23 mmol/g). * indicates spinning sidebands.



Poster Abstract

P1

水産資源循環再利用を目指した複合微生物系代謝反応場の評価技 術構築 〇星野玲緒奈¹, 山澤 哲^{1,2}, 葭田征司¹, 伊達康博^{1,3}, 菊地淳^{1,3,4,5}

¹横市院生命、²鹿島技研、³理研CSRS、⁴理研BMEP、⁵名大院生命農

Evaluation methods for metabolic process of metabolic community for sustainable re-utilization of marine resources

OReona Hoshino¹, Akira Yamazawa^{1,2}, Seiji Yoshida¹, Yasuhiro Date^{1,3}, Jun Kikuchi^{1,3,4,5} ¹ Yokohama City Univ., ²Kajima Tech. Res. Ins., Tokyo, ³RIKEN CSRS, ⁴ RIKEN BMEP, ⁵Nagoya Univ.

Japan has a huge marine resources brought to the fourth volume of exclusive economic zone in the world. Therefore, it is important to consider effective use of an inedible part of marine resources, for example a fish and seaweed. We focused on an anaerobic digestion (AD) process as the sustainable technology, which is capable to harvest the energy from organic waste. In order to find the biomarker, ten kinds of fish and seaweed collected from marine habitat in Japan were measured a composition and tested for AD with batch reactor to be possible to treat more effective or avoid an inhibition of AD. Furthermore, a composition of metabolites during the AD test analyzed by the statistical method revealed the differences of metabolic processes in microbial community based on compositional variations. These results suggest that most appropriate compositions for AD treatment may be capable to be decided.

【序論】

世界第四位のEEZ体積を有す る日本は水産資源大国と言え ようが、TPP参加により潜在能 力の高い水産資源活用を渇望 するほど、魚類非食部や海藻 類といった未利用バイオマス の活用戦略が求められる。 我々は陸上バイオマスに比べ 水産資源は未利用バイオマス の解析例が少ないことに着目 し、NMRをはじめとする種々 の分光・分析法を駆使した比



較解析を遂行した。さらに、**Fig. 1** Concept of evaluation and utilization for fishery resources こうした多様な未利用水産バイオマスを入力源とした嫌気性消化評価系を構築し、入 力源の違いと微生物群集反応場の出力応答関係を統合的に解析し、発酵阻害や阻害回 避へと応用し得るバイオマーカーの探索を試みることとした(Fig. 1)。

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、やまざわ あきら、よしだ せいじ、だて やすひろ、きくち じゅん

【方法】

全国各地から採取した約10種の魚類と海藻を凍結乾燥し、破砕、重水溶媒抽出後、NMR、 ICP、元素分析によって組成分析を行い、得られた各データを多変量解析した。この中から 選定した数種の魚類と海藻を嫌気消化槽に投入し、同様の分析機器を用いて分解過程を 追跡した。多変量解析にはソフトウェア"Automics"や"R"を用いた。

【結果と考察】

魚類と海藻の組成分析結果を Table 1に示す。原料として魚類と 海藻の混合比を変化させ、同一 CODcr負荷条件(3.0 g-CODcr/L)と して嫌気性消化試験を行った (Table 2)。試験期間中における代 謝物推移を¹H-NMRにより追跡し、 スペクトルデータをbin化、matrix 化して主成分分析を行った結果、 PC1成分はプロピオン酸、PC2成 分は酢酸が大きな寄与を示した (Fig. 2)。RUN"A"、 "B"では試験 開始後すぐにプロピオン酸の蓄積 が確認され、3日以降、減少が見 られた。今回検討した条件では致 命的な嫌気性消化阻害は見られ なかったが、消化プロセス初期に おいて魚類の混合比が高いほど プロピオン酸の蓄積が顕著である 傾向が確認された。一方、バイオ ガス回収量は魚類混合比の高い RUN"A"が最も多く、海藻と比較し て魚類の方がCODcrあたりの易分 解成分含有比が高いことが推定さ れた。

発表では、魚類と海藻のより詳細 な構成成分について明らかにし、 また、魚類の鰭、筋肉など、部位 ごとの嫌気性消化特性についても 言及する。それらの情報をもとに 多変量解析による統合的な議論 を行うことによってバイオマーカー 探索が可能となり、ひいては魚類 非可食部や海藻といった未利用 Table 1 Composition of sea wastes

	Fish	Seaweed
CODcr (mg/kg-dry weigt)	1,140,000	510,000
塩化物 (mg/kg-dry weigt)	9,200	2,800
タンニン・リグニン (mg/kg-dry weigt)	4,000	3,000
C/N比 (-)	34.1	5.3

Table 2 Summary of anaerobic digestion

RUN"A"	RUN"B"	RUN″C″	Control
2.27	1.36	0.68	0.00
2.45	4.41	5.88	0.00
1427.5	730.0	1240.0	822.5
50.6	23.6	54.9	0.05
	RUN"A" 2.27 2.45 1427.5 50.6	RUN"A" RUN"B" 2.27 1.36 2.45 4.41 1427.5 730.0 50.6 23.6	RUN"A" RUN"B" RUN"C" 2.27 1.36 0.68 2.45 4.41 5.88 1427.5 730.0 1240.0 50.6 23.6 54.9



Fig. 2 Time course variations of metabolites in anaerobic digestion process evaluated by PCA. (A: Score plot, B: Loading plot)

バイオマスの利活用技術への展開が期待される。

Proton tautomerism of 2-substituted cyclic β-diketones

OHideyasu China and Yutaka Okada

College of Life Sciences, Ritsumeikan University, Shiga, Japan.

NMR analysis of β -diketones is often complicated despite its compounds are described as a simple structure because the many β -diketones possess potentially property of proton tautomerism, *cis-trans* tautomerism and inversion isomerism, in which is depended on some factors such as concentration, temperature, solvent and time. The dependences in chain form of β -diketone have been studied in detail, however the dependences in cyclic form of β -diketone have been left some uncertainties for insufficient research. Structure determination of several cyclic β -diketones, indeed, were misleaded by the influence on proton tautomerism about keto-enol and enol-enol. The right interpretation of the proton tautomerism in cyclic β -diketone is essential to understand its property. In this study, we researched 2-substituted dimedone to elucidate fundamental principle of the proton tautomerism in cyclic β -diketone.

環状βジケトンである種々の2-置換ジメドンとそのメチルエーテル体を合成し、 動的 NMR による線形、緩和時間、拡散係数及び異性化速度などの解析から、エノー ル-エノール (E-E) 互変異性とケト-エノール (K-E) 互変異性を調査した (Fig.1)。



(X= H, Cl, Br, I, NO₂, COCF₃, Et, OMs, CN, Ac, CHO, NHAc, NHCOCF₃) **Fig. 1** Proton tautomerism of 2-substituted dimedone

溶液中の2-置換ジメドンはK-E互変異性を有する 中でケト体の存在比率が高いものと考えられてい たが、主にE-E互変異性を有したエノール体が観測 された。なお2-アシル置換ジメドンにおいては、 HMBC法とDPFGSE-NOE法により環外エノール体 ではなく環内エノール体であることを示した (Fig.2)。E-E互変異性の有無は、4位と6位にお ける線形やプロトンスピン-スピン緩和時間(T₂) のrfパルス間隔依存性から検討し、化学交換の影 響を受ける2-置換ジメドンと化学交換が抑制され たメチルエーテル体を比較することで行われた。 種々の2-置換ジメドンにおける両プロトン互変異 性は、温度、濃度、溶媒及び時間等に依存し、線形 や化学シフトに顕著な変化を及ぼした。特に温度増 加や基質濃度の希釈はE-E互変異性の化学交換によ



Fig. 2 The structure of (A) exocyclic enol form and (B)

endocyclic enol form



Fig. 3 NMR line shape analysis of (A) temperature dependence and (B) concentration dependence

り平均化されていた4位と6位 の線形を分離・先鋭化させること から(**Fig.3**)、意図的な E-E 互変 異性の減速が可能であることを 示唆した。また、極性溶媒の添加 に伴う E-E 互変異性の加速や分 子間水素結合形成に伴うエノー ル性水酸基のプロトンスピン-格子緩和時間(T_1)と拡散係数の 減少から(**Fig.4-5**)、E-E 互変異 性は分子間水素結合により誘発 されることが示唆された(**Fig.6**)。



Fig. 5 Time dependence on diffusion coefficient (*D*). The ¹H DOSY was performed at 25°C in CDCl₃ by PFG BPP LED method with 40 ms of diffusion time (Δ), 1.0 ms of FG pulse width (δ) and 10-200 m²T/m of FG strength (*G*).



Fig. 7 Time course of keto-enol isomerism with inversion isomerism on kinetic NMR analysis in CDCl₃



Fig. 4 Concentration dependence on (A) T_1 and (C) T_2 and time dependence on (B) T_1 and (D) T_2 . T_1 and T_2 were measured at 25°C by IR method and CPMG method, respectively.

一方、2-置換ジメドンの K-E 互変異性は反転異性 を伴うことが示され、エノール体からケト体への 経時的な異性化が観測された(Fig.7)。



Fig. 6 Relation between E-E tautomerism and intermolecular hydrogen bond

Enol-enol tautomerism, Chemical exchange, hydrogen bond

 P3
 不均一サンプリングを用いた多次元 NMR による 低分子化合物の解析

 ○片平律子¹,佐藤一²,児嶋長次郎¹,池上貴久¹,藤原敏道¹

 ¹阪大・蛋白研

 ²ブルカー・バイオスピン

Analysis of Small Molecules by Multiple Dimensional NMR Relying on Non-Uniform Sampling

 \bigcirc Ritsuko Katahira¹, Hajime Sato², Chojiro Kojima¹, Takahisa Ikegami¹ and Toshimichi Fujiwara¹

¹Institute for Protein Research, Osaka University, Osaka, Japan. ²Bruker Biospin, Kanagawa, Japan.

A drastic decrease in experimental time has, recently, been achieved for 3D and 4D experiments of stable-isotopically labeled protein samples by introducing non-uniform sampling (NUS) techniques. Several signal processing methods such as projection reconstruction (PR) method, multi-dimensional decomposition (MDD), maximum entropy method (MEM), shift method and compressed sensing (CS) have been applied to reconstructing the discrete NUS data. The NUS techniques are also beginning to be applied to HSQC and HMBC experiments on small molecules. We show several examples of insensitive 2D and 3D experiments on small molecules and examine the merits and demerits of NUS with CS.

蛋白質の解析に用いられる NMR 実験においては,近年 NUS 法が導入されること により,測定時間の大幅な短縮が達成されてきた.また,NUS によってサンプリング された不連続なデータを再構築するため,PR,MEM,MDD,shift 法や CS などの手 法が応用されてきた.さらに測定装置に NUS や上記のデータを再構築する技術が標 準装備され,これらの手法が一般的に利用できるようになってきた.そしてこれらの 手法は低分子量化合物を用いた比較的高感度な NMR 実験に応用され始めている.

低分子量化合物の NMR 解析では、シグナルの帰属のあいまいさをなくすために、シ グナルの感度が高い、かつ、多次元 NMR 実験の展開方向の分解能が高いスペクトルを 得ることが必要である.しかし、低い天然存在比を利用した¹³C-¹³C 相関や¹H-¹⁵N 相関、 弱い NOE シグナル、および、3D 実験は低感度であり、また、長い測定時間を要する.

本発表では,低分子量化合物を用いたこれら低感度のNMR実験の結果を示し,また, 低分子の構造解析にこの新しい手法が与えるインパクトと適切な利用方法について 提案したい.

低分子化合物, Non-Uniform Sampling

○かたひらりつこ,さとうはじめ,こじまちょうじろう,いけがみたかひさ,ふじわ らとしみち [実験]

[¹³C-¹³C INADEQUATE 実験] 展開方向のグリッドを 128 ポイントに設定し,そのうちの 32 または 16 ポイントを不均一に取得した.測定時間はそれぞれ 16 時間 23 分または 8 時間 13 分だった.これを均一に取得した結果(16 時間 23 分)と比較した.

[¹H-¹⁵N HMBC 実験] 展開方向のグリッドを 128 ポイントに設定し,そのうちの 32, 16 または 8 ポイントを不均一に取得した. 測定時間はそれぞれ 10,5 または 3 分だった. これを均一に取得した結果(38分)と比較した.

[¹H-¹H NOESY 実験] 展開方向のグリッドを 1,024 ポイントに設定し,そのうちの 512,256 または 128 ポイントを不均一に取得した.測定時間はそれぞれ 9 時間 8 分,4 時間 32 分または 2 時間 16 分だった.これを均一に取得した結果(18 時間 17 分)と比較した.

[結果と考察]

¹³C-¹³C INADEQUATE: 不均一に 25% (32 ポイント)取得したスペクトルでは,同じ測定時間を要した従来のスペクトルと比べて,展開方向において,より高分解能な結果となり,解析が容易となった(Fig. 1). 不均一に 12.5% (16 ポイント)取得したスペクトルでは,シグナルの数よりもポイント数が少ないために,良好な S/N は得られなかった.

¹H-¹⁵N HMBC: 不均一に 25% (32 ポイント) または 12.5% (16 ポイント) 取得したスペクトルでは,均 一に取得した従来のスペクトルと比べて,同等の品 質であった. 測定時間を 1/4 または 1/8 に短縮する ことができた. 不均一に 6.25% (8 ポイント) 取得 したスペクトルでは,アーティファクトも観測され た (Fig. 2).

'H-'H NOESY: 不均一に 50% (512 ポイント) 取 得したスペクトルでは, 従来のスペクトルと比 べて同等の品質を得る ことができたが, 25% (256 ポイント) 取得し たスペクトルでは, 小さ



Fig.1 INADEQUATE spectra obtained by conventional (upper) and NUS (lower) sampling

(a)	ppm	(b)	1	ppm	(c)	ppm	(d)		ppm
. ,	- 280			- 280		- 280			- 280
ļu	- 300	Įn	I	- 300	10	- 300	ļij	I	- 300
P. P	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·							1

Fig.2 1 H- 15 N HMBC spectra obtained by (a) conventional, (b) 25%, (c) 12.5% and (d) 6.25% NUS sampling, respectively

い NOE シグナルが検出し辛かった. また,不均一に 12.5% (128 ポイント)取得した スペクトルでは,ほとんど対角ピークのみが検出された.

以上の結果より、低感度の NMR 実験において、ピーク強度の差が大きくない INADEQUATE や¹H-¹⁵N HMBC では、NUS と CS を用いることにより、測定時間を 1/4 に短縮することができた.しかし,対角ピークと交差ピークの強度差の大きいNOESY では、本手法を用いるには注意が必要であると思われる.

[謝辞] 本研究は文部科学省「先端研究基盤共用・プラットフォーム形成事業」により実施された.

P4

多変量解析を用いたNMRによる食品成分の分析

○久保田 通代¹, 細谷 孝博², 熊澤 茂則² ¹静岡県立大学大学院・薬食生命科学総合学府 ²静岡県立大学大学院・食品栄養環境科学研究院

Component Analysis of Food using Multivariate Statistics by NMR

OMichiyo Kubota¹, Takahiro Hosoya², Shigenori Kumazawa²

¹Graduate School of Integrated Pharmaceutical and Nutritional Sciences, University of Shizuoka, Shizuoka, Japan.

²Graduate Division of Nutritional and Environmental Sciences, University of Shizuoka, Shizuoka, Japan.

Recently, nuclear magnetic resonance (NMR) has been used for quantitative analysis and metabolomic analysis with multivariate statistics, which can characterize based qualitative and quantitative analysis in intact sample. We discussed component analysis of food using this method. In this study, we analyzed the constitution of leaves from 35 kinds of green tea harvested from five countries, including Japan, using a combination of quantification and multivariate statistical analysis using NMR spectra. The contents of the main components such as catechins and caffeine were calculated from the integrated values of ¹H-NMR spectra of the green tea extracts. Principal component analysis (PCA), which is a kind of a multivariate analysis, was performed with AMIX software (Bruker BioSpin) using the ¹H-NMR spectra. The results showed that the 35 kinds of green tea could be clearly discriminated based on the contents of the tea by PCA according to differences in country and harvest season. This analytical method may be applied to tea quality control and to the screening of unique types of tea.

【背景・目的】

近年、NMRを利用した定量分析や、NMRスペクトルを多変量解析することによる メタボローム解析が注目されており、このような手法を用いることで、非破壊的かつ 簡便に多成分の定性・定量に基づいた特徴付けが可能となる。食品には様々な成分が 含有されており、また、通常摂取する状態に近い状態での測定が可能であることから、 本手法が有効であると考えた。そこで本研究では、本手法の食品成分分析への応用を 目的とした。今回は、溶液状態でありNMRの測定に適していると考えられた緑茶に着 目し、地域や摘採時期による特徴付けを行った。

【方法】

日本を含めた5か国から合計35種類の緑茶葉を用いた。乳鉢で粉末状にした緑茶葉 を80°Cの軽水 (H₂O) で3分間抽出した後、リン酸緩衝液 (pH 5.8) と重水 (D₂O) を添 加してNMR用測定サンプルとした。NMRはBruker BioSpin AVANCE III (400 MHz) を

食品分析,多変量解析,定量NMR

○くぼたみちよ, ほそやたかひろ, くまざわしげのり

使用し、presaturation NOESYのパルスシーケンスにより軽水のシグナルを消去して ¹H-NMRスペクトルを測定した。シグナル強度からカテキン類やカフェイン、テアニ ンなどの緑茶中の主成分の定量を行った。また、得られた¹H-NMRスペクトルを、多 変量解析ソフトAMIXを用いて水の領域を除いた0.2–10 ppmの範囲を0.04 ppmの幅で バケット積分し、多変量解析の一種である主成分分析 (PCA) を行った。緑茶抽出液 に関しては抗酸化活性評価法として2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ラジカル捕 捉活性の評価を行い、NMRによる解析結果との相関を調べた。

【結果・考察】

NMRによる主成分分析の結果、第一主成分 (PC1)、第二主成分 (PC2) に基づいて、 それぞれの緑茶を国ごとに分類することができた(Fig. 1a)。中でも日本茶においては、 分布が大きく2つに分かれたため、日本茶のみで主成分分析を行ったところ、摘採時 期や栽培方法により分布が大きく分かれた (Fig. 1b)。定量結果や主成分分析結果から、 これらの緑茶の違いには、カテキンやテアニン、スクロース量が大きく影響している ことが明らかとなった。

また、世界各地の緑茶において、DPPH法による抗酸化活性評価の結果は、ガレー ト型カテキン、特にepigallocatechin gallate (EGCg) 量や主成分分析のPC1と高い相関が 得られた。そのため、本手法は、抗酸化能の高い緑茶のスクリーニングに利用できる と考えられた。

NMRを用いた食品成分分析法は、一度の測定で多成分を混合物のまま同時に検出 できること、溶液状態であればサンプルの前処理が不要なため通常摂取する状態での 測定が可能であること、非破壊的な方法であるため測定中に成分の損失がほとんどな いことから、品質管理や品質評価のための有用な手段であると考えられる。今後、他 の食品においても測定条件を検討することで、本手法の応用が期待される。



Fig. 1 PCA score plot of ¹H-NMR spectra of green tea. 35 kinds of green tea harvested from six areas in the world (a) and 17 kinds of green tea harvested from Japan (b).

不均一サンプリングで測定したポリプロピレンの3次元
 TOCSY-HSQCスペクトル
 ○松原康史
 日本ポリケム株式会社 研究開発部

Non-Uniformly Sampled Three-Dimensional TOCSY-HSQC Spectra of Polypropylene

OKoshi Matsubara

Research and Development Division, Japan Polychem Corporation

Three-dimensional TOCSY-HSQC spectra of polypropylene were measured using non-uniform sampling and compressed sensing method. The maximum evolution times of indirect ¹H and ¹³C dimensions were two- and four-times extended, respectively, compared to the conventional sampling scheme governed by the Nyquist theorem. The extension of maximum evolution times is equivalent to the resolution improvement in the frequency domain by the same factors. Small signals which were buried under the gigantic signals of propylene repeating unit in a 2D TOCSY spectrum were separately observed in the resolution-improved 3D TOCSY-HSQC spectrum. The newly observed cross-signals were tentatively assigned to oxidized structures.

合成高分子のNMRスペクトルでは、末端基や異種構造などのシグナルと主鎖のシグ ナルとの化学シフト差が小さく、末端基や異種構造などの微小なシグナルが主鎖の巨 大なシグナルに妨害されて観測できない場合がある。溶媒消去と同じ方法で主鎖の巨 大シグナルを減弱させながらあるいは選択励起で主鎖の巨大シグナルを避けながら NMRスペクトルを測定すればある程度この問題を回避できるが、主鎖シグナル近傍に ある情報を一部失うことは避けられない。

重なったシグナルを分離するために、まず2次元、次いで3次元NMR法が開発されて きた。3次元NMR法では折り返し(folding)による高分解能化を取り入れてもデジタ ル分解能が十分ではなく、通常、測定時間との兼ね合いでデジタル分解能の妥協を強 いられている。そこで3次元を含む多次元NMRの高速/高分解能測定法が種々提案され てきているが、なかでも圧縮センシング(Compressed sensing)理論の確立により、 不均一サンプリング(Non-uniform sampling)によるデジタル分解能向上の有効性が 認識されつつある。

一般に3次元NMR法は安定同位体標識されたタンパク質や核酸などに適用されてい るが、観測軸の増加によるシグナル分離能の向上は普遍的であり、測定対象によらな い。本研究では、ポリプロピレンの3次元TOCSY-HSQCスペクトルを不均一サンプリン グで測定し、2次元TOCSYスペクトルでは巨大な主鎖シグナルに妨害されて観測できな かった微小シグナルの観測を試みた。

ポリプロピレン,不均一サンプリング,TOCSY-HSQC

○ まつばらこうし

ポリプロピレンの2次元TOCSYおよび3次元TOCSY-HSQCスペクトルをFig.1に示す。2 次元TOCSYでは2.1および2.3ppmの微小シグナルから低周波数領域への相関シグナル は0.8-1.8ppmの巨大な主鎖シグナルの裾に埋もれて認識できない(a)。従来法でデー タサンプリングした3次元TOCSY-HSQCスペクトルのF1-F3平面(¹³C 51.8ppm)では、¹³C 化学シフトで分離したことにより、2.1と0.8ppm、2.3と0.8ppmの相関シグナルが観測 されている(b)。データ点数は変えず、不均一サンプリングにより最大展開時間を間 接¹H軸で2倍、間接¹³C軸で4倍にすると、F1-F3平面とその投影図から線幅の減少と主 鎖シグナルによる妨害の軽減が確認できる(c)。対応するF2-F3平面(¹H 2.1ppm)では ¹³C軸の分離能向上と主鎖シグナルによる妨害の軽減が明らかである(d)(e)。この微小 シグナルをポリプロピレンの酸化劣化により生成した部分構造に仮に帰属した。



Fig. 1. (a) Two-dimensional TOCSY and (b)–(e) three-dimensional TOCSY-HSQC spectra of polypropylene. The TOCSY-HSQC spectra were measured with (b, d) a conventional and (c, e) a non-uniform sampling scheme, and (b, c) F1-F3 planes for ¹³C 51.8 ppm and (d, e) F2-F3 planes for ¹H 2.1 ppm were shown. ¹H NMR spectra were attached in the upper- and the left-side of the 2D TOCSY, and projections were attached for each TOCSY-HSQC plane. The spectral widths of TOCSY-HSQC experiments were 10 (F3), 165 (F2), and 10 (F1) ppm, and 512 (t3), 32 (t2), and 48 (t1) complex data points were acquired. The maximum evolution times were 64 (t3), 0.96 (t2), and 6.0 (t1) ms for the conventionally sampled data, and 64 (t3), 3.8 (t2), and 12 (t1) ms for the non-uniformly sampled data. A mixing time of 60 ms was used in the TOCSY part of the experiments.

カテキン誘導体の水溶性向上効果の検討

○梅原将洋,柳江高次,斎政彦,伊藤建比古 森永製菓株式会社・研究所

Study of water solubility improvement effect of catechin derivatives

OMasahiro Umehara, Koji Yanae, Masahiko Sai, and Tatsuhiko Ito *Morinaga & CO., LTD., Yokohama, Japan.*

The polyphenols show many biological activities, such as antioxidant activity, antimicrobial activity, and inhibitory effect of fat accumulation. But many of the polyphenols have low solubility in water and this prevent effective use of these compounds. In this study, we focused catechin derivatives with several aromatic rings and found that some catechins improve the water solubility of insoluble polyphenols by the stacking interaction. Furthermore, we studied structure-activity relationship of catechins.

【背景・目的】

植物中に多く含まれるポリフェノールは、 抗酸化活性や抗菌効果、脂肪蓄積抑制効果な どをはじめ、様々な生理活性を示すことが報 告されている。しかし、これらのポリフェノ ールは構造的に安定である酸性から中性領域 では難水溶性であるものが多く、様々な有用 性を有しながらも、難溶解性であることから 体内への吸収性が悪く、生理活性を発揮でき ない場合が多い。

一方、難水溶性のポリフェノールを溶解させる ためによく利用される方法として、ポリフェノー ルに糖を付加させる方法があるが、体内で生理活



Fig. 1 Structure of catechin derivatives

性を発揮するためには腸内細菌や酵素で糖が外れる必要があり、必ずしも本来の生理 機能を発揮できるとは限らない。

本研究では、芳香環を多数有するカテキン類が難水溶性ポリフェノールの溶解度を 向上させることを発見し、各種カテキン誘導体を用いてその水溶性向上効果と構造と の相関性について検討を行った。

Catechin derivative, Water solubility improvement, Stacking interaction

o うめはら,まさひろ

【方法】

溶質として、ケルセチン2水和物やヘスペリジン、ルチン3水和物などの難水溶性ポ リフェノールを用い、純水もしくは調製した各種カテキン誘導体水溶液を加え、遮光 下、25℃で24時間攪拌した。その後、遠心分離にて上清を回収し、HPLCを用いて各難 水溶性ポリフェノールの溶解量を算出した。さらに、NMR(700 MHz)により難水溶性 ポリフェノール溶液およびカテキン誘導体との混合溶液の測定を行った。

【結果・考察】

各カテキン誘導体水溶液は純水に比較して、難水溶性ポリフェノールの溶解性を向 上させた。また、その効果はカテキン誘導体の濃度に依存していた。¹H-NMRを測定し た結果、溶質である難水溶性ポリフェノールのピークに低磁場シフトが観測されたこ とから、この溶解性向上は、溶質とカテキン誘導体の相互作用によるものと推測され た。さらに、各カテキン誘導体を用いて構造と水溶性向上効果の相関性を解析したと ころ、ガレート基を有する誘導体では水溶性向上効果が高いことが確認できた。これ らのことから、カテキン類は難水溶性ポリフェノールと相互作用することにより、そ の溶解性を高めていると考えられ、また、ガレート基があることにより、その効果が 高まると考えられた。

【参考文献】

T. Ujihara, N. Hayashi, *Biosci. Biotechnol, Biochem.*, 2009, 73 (12), 2773-2776.
G. Nakamura, K. Narimatsu, Y. Niidome, N. Nakashima, *Chemistry Letters*, 2007, 36(9), 1140-1141.

P7

Multi-phase NMRによる木質バイオマスの溶液・ゲル・固体状態の
 比較解析
 ○小松功典^{1, 2},菊地淳^{1,2,3,4}
 ¹理研CSRS, ²横市大院・生命医, ³理研BMEP, ⁴名大院・生命農

Comparative Analysis of Woody-Biomass in Solution, Gel, and Solid State Using Multi-phase NMR

OTakanori Komatsu^{1, 2}, and Jun Kikuchi^{1, 2, 3, 4}

¹RIKEN Center for Sustainable Resource Science, Yokohama, Japan. ²Grad. Sch. Med. Life Sci., Yokohama City University, Yokohama, Japan. ³ RIKEN Biomass Engineering Program, Wako, Japan. ⁴Grad. Sch. Bioagri., Nagoya University, Nagoya, Japan.

We have developed analytical techniques for lignocellulosic biomass using solution NMR, HR-MAS, and solid-state NMR. Total of 119 chemical shifts of solubilized¹³C-lignocellulose were assigned comprehensively by 2D and 3D-NMR experiments. Next, we also developed a new solid-state NMR experiment named dipolar dephasing filtered INADEQUATE, which were used to detect relatively mobile hemicellulosic signals in lignocellulosic mixtures; where dipolar dephasing was used as a signal filter to remove signals derived from immobile cellulose. Furthermore, HR-MAS experiments provided high-resolution spectra of whole cell wall components, which could be used as structural characterization of cell wall samples. Finally, chemical shifts in solution and solid-state NMR were compared, indicating inhomogeneous structure of supramolecular-associated polysaccharides.

木質バイオマスは、主に木化した植物細胞壁から構成される。木化した植物細胞壁 はリグノセルロースと呼ばれるセルロース、ヘミセルロース、およびリグニンが混合 し、高次に構造を形成した超分子構造をもつ。これらの天然高分子は、異なる物性を 有するため、その構造の解析は容易ではない。これまでに、リグノセルロースを有機 溶媒、キレート試薬、酸・アルカリ溶液、酵素消化、還元剤などによって処理し、得 られたヘミセルロースやリグニン画分を有機溶媒へ溶解させ、NMRで構造解析がされ てきた。また、セルロースのモルフォロジーの解明には、固体NMR法が活用されてき た¹。しかしながら、リグノセルロースの資源としての有効利用などの応用展開を考 えると、高分子混合物としてリグノセルロースを解析することが望ましい。近年、単 離・精製をおこなわず、リグノセルロースをまるごと有機溶媒に溶解させ計測する方 法が提案されている。しかしながら、リグノセルロースは完全に溶解されずゲル状に なり、分子量が大きな成分ではシグナルが観測されない。

NMR法では、溶液、気体、ゲル、固体などの様々な状態(multi-phase)の試料を計 測できる。しかしながら、木質バイオマスを計測対象にした場合、それぞれの計測法 長所・短所を直視しブレークスルーへの挑戦が必要である。本会では、溶液NMR、 High-Resolution (HR)- MAS、固体NMR法を用いた木質バイオマスの組成や物性などの 構造解析を討論する。また、それぞれの計測法で得られた情報を比較解析した。

リグノセルロース, Multi-phase NMR, 分子運動性

oこまつたかのり, きくちじゅん



Figure 1 Outline of current study. We applied 3D-NMR experiments to obtain chemical shifts of lignocellulose in organic solvent. HR-MAS is a robust method for structural characterization of gel-state lignocellulose. We have developed signal separation techniques in solid-state NMR..

【実験・結果・考察】

<u>1. 溶液状態における木質バイオマスのNMR²(Komatsu and Kikuchi, Anal. Chem. in press)</u>

¹³C均一標識したリグノセルロースをボールミルによって微粉化し, DMSO-d₆/Pyridine-d₅混合溶媒に溶解させた。このとき,残渣を取り除き可溶化リグノ セルロースのみをNMR試料とすることで,高分解能のスペクトルを取得できた。可溶 化リグノセルロースでは,コヒーレンスの寿命が比較的長く,他の生体高分子と同様 に3次元を含めた多次元NMRの計測が可能である。多糖は-OCH(OH)O-の化学構造が 多く、化学シフトの帰属が困難である。3D-HCCH-COSYを用いることで、多糖領域 のシグナルを分離することができ、119の化学シフトの帰属を達成した。

2. ゲル状態における木質バイオマスのNMR

溶液状態のNMRでは、高分解能であるが、残渣を取り除くことによって定量性は期待できない。木質バイオマスのキャラクタリゼーションの観点から、ある程度の定量情報をもったスペクトルが得られることが望ましい。そこで、Ralphらが提案した木質バイオマスをDMSO溶媒に直接溶解させたゲル状試料の調製³を検討した。ゲル状にした試料のNMRスペクトルは、T₂*が短いためブロードなシグナルが得られる。このゲル化試料に対してHR-MAS法を適用することで、試料の不均一性に由来する異方性を取り除くことができ高分解能のスペクトルを得ることができた。

3. 固体状態における木質バイオマスのNMR⁴(Komatsu and Kikuchi, J. Phys. Chem. Lett. 2013) 固体NMRでは、溶液NMRやHR-MASと比較して分解能が低い。したがって、化学 シフトが密集している多糖の化学シフトの帰属は困難であった。そこで、構成多糖間 の物性の違いを利用したてシグナル分離を試みた。セルロースはその多くが結晶であ るが、ヘミセルロースは非晶である。したがって、木質バイオマスを水和させること で、ヘミセルロースは水和しやすく分子運動は早くなるが、一方、セルロースは水和 しにくく分子運動向上の寄与は小さい。水和させた状態で、dipolar dephasingをおこな うことで、セルロースのシグナルを完全に消去し、ヘミセルロースのシグナルだけを 選択的に取得することに成功した。

この手法は、簡便に多次元計測へと組み合わせることができる。J-INADEQUATE のようなスカラー結合を介した相関実験では、分子運動が早く双極子相互作用が弱ま ったへミセルロースと相性がよい。J-INADEQUATEとdipolar dephasingを組み合わせ た実験をDipolor-Dephasing Filtered (DDF)- INADEQUATEと呼ぶ。DDF-INADEQUATE を、トウモロコシ(Zea mays)およびジャガイモ(Solanum tuberosum L.)由来のリグ ノセルロース試料に適用した結果、前者からは、イネ科植物の二次壁に特有なへミセ ルロースであるグルクロノアラビノキシランのxylopyranose(Xylp)残基と arabinofranose (Araf)残基を、後者からは、ナス科植物の一次壁に特有なアラビノキシ ログルカンのXylp残基とAraf残基を、それぞれ検出し¹³C等方化学シフトを帰属した。

4. 溶液・固体状態における化学シフト情報の比較解析

固体NMRおよび溶液NMRで得られた¹³C等方化学シフトを比較した。固体NMRと溶 液NMRにおける等方¹³C化学シフトの差は、セルロースにおいてヘミセルロースより 大きい傾向が見られた。天然のセルロースの殆どが結晶構造をとっているが、微粉化 によって低分子量化し、有機溶媒へ溶解させたセルロース(β-1,4-グルカン)は、ラ ンダムなコンフォメーションをとっている。したがって、固体NMRと溶液NMRにお ける等方¹³C化学シフトの差は、固体状態と溶液状態での分子のコンフォメーション の違いを反映していると考えられる。Suzukiらは、β-1,4-グルカンの最小単位であるセ ロビオース分子の二面角を変えたときの¹³C化学シフトを、量子化学計算によって算 出した⁵。この時の化学シフトの挙動は、結晶セルロースと有機溶媒中でランダムな コンフォメーションをとり平均化したセルロースの化学シフトの差と同じ傾向を示 した。一方では、ヘミセルロースでは、固体NMRと溶液NMRにおける等方¹³C化学シフトの差が小さかったため、バルクではランダムなコンフォメーションをとっていることが示唆された。有機溶媒中での¹³C化学シフトは、溶媒効果の影響が存在するが、HR-MAS法を用いることで、水中での化学シフトを取得することができる。

【展望】

木質バイオマスを解析するためにNMRの計測対象試料の幅広さを活かし,溶液 NMR,HR-MAS,固体NMRを駆使した。しかしながら,そもそも天然には固体状態 で存在する木質バイオマスの構造解析には,固体NMRがもっとも適している。固体 NMRでは、¹³Cなどの低周波核検出型の実験が多く,一方、¹H核は強力な同種核間双 極子相互作用によるシグナルのブローディングによって化学シフトを分離するのが 困難である。安定同位体標識が困難である木質バイオマスの解析では、ブレークスル ーが必要であり,我々もその難題に挑戦し始めている。しかしながら,超高速MAS などの近年の技術革新によってもこの問題は解決されるかもしれない。また,組成の 定量解析では、重水素化したイオン液体を溶媒として利用する試みが報告されており, 溶媒系の検討も重要課題である⁶。試料調製から計測まで含めた今後の分析技術の発 展が、木質バイオマスの構造解析の基盤技術から、バイオマス産業利用に貢献するこ とが期待される。

【引用文献】

1. Okushita, K., Komatsu, T., Chikayama, E., Kikuchi, J., "Statistical Approach for Solid-State NMR Spectra of Cellulose Derived from a Series of Variable Parameters" *Polymer J.* **44** (2012) pp895-900.

2. Komatsu, T. and Kikuchi, J., "Comprehensive Signal Assignment of ¹³C-Labeled Lignocellulose using Multidimensional Solution NMR and ¹³C Chemical Shift Comparison with Solid-State NMR" *Anal. Chem.* (in press) DOI: 10.1021

3. Mansfield, S. D., Kim, H., Lu, F. C., Ralph, J., "Whole Plant Cell Wall Characterization Using Solution-State 2D NMR" *Nat. Protocols* **7** (2012) pp1579-1589.

4. Komatsu, T. and Kikuchi, J., "Selective Signal Detection in Solid-State NMR Using Rotor-Synchronized Dipolar Dephasing for the Analysis of Hemicellulose in Lignocellulosic Biomass" *J. Phys. Chem. Lett.* **4** (2013) pp2279-2283.

5. Suzuki, S., Horii, F., Kurosu, H., "Theoretical Investigations of C-13 Chemical Shifts in Glucose, Cellobiose, and Native Cellulose by Quantum Chemistry Calculations" *J. Mol. Struct.*, **921** (2009) pp219-226.

6. Cheng, K., Sorek, H., Zimmermann, H., Wemmer, D. E., Pauly, M., "Solution-State 2D NMR Spectroscopy of Plant Cell Walls Enabled by a Dimethylsulfoxide-d₆/ 1-Ethyl-3-methylimidazolium Acetate Solvent" *Anal. Chem.* **85** (2013) pp3213-3221. キラルシフト試薬による光学活性化合物の分離

○大田陽介,新谷恭兵,後々田忠夫,則武智哉 株式会社UBE科学分析センター

NMR Separation of Enantiomer Menthol Using a Chiral Shift Reagent

○Yousuke Ohta, Kyouhei Shingai, Tadao Gogota and Tomoya Noritake UBE Scientific Analysis Laboratory, Inc.

Separation of enantiomer has been investigated in many analytical methods for a long time. NMR spectroscopic method with chiral shift reagent such as Eu complex, Pr complex has been studied. However, chiral shift reagent consisting of paramagnetic elements has a problem that NMR signal is broad. Recently there are many reports of chiral shift reagent consisting of no paramagnetic elements. In this study, separation behavior and quantitative analysis in enantiomer menthol with metal-free chiral molecular (Chirabite-AR) in ¹H- and ¹³C-NMR were investigated.

1. 緒言

光学活性化合物の分離は、古くから様々な手法にて行われており、NMR においても キラルシフト試薬(Eu 錯体、Pr 錯体等)を用いた分離が行われてきた。しかし、そ れらは常磁性を有するため、その影響によるシグナルのブロードニングが問題とされ てきた。しかしながら、近年ではその課題を解消すべく、様々なキラルシフト試薬が 報告されている¹。本報告では、金属を含まない包接キラルシフト試薬(Chirabite-AR) を用いた、光学活性化合物(Menthol)の分離挙動(¹H-NMR および¹³C-NMR)につい て検討し、定量を試みた。また、シグナルの分離(シフト)現象を説明する検証実験 についても報告する。

2. 実験

装置	:日本電子製 ECA 400型
	Bruker BioSpin 社製 AV500 型
測定核	: ¹ H, ¹³ C
試料	:Chirabite-AR(東京化成製),
	D-Menthol, L-Menthol, DL-Menthol
溶媒	:重クロロホルム
温度	:室温、-50℃



Chirabite-AR L-Menthol D-Menthol

Fig. 1 Structure of Chirabite-AR and D/L-Menthol

キーワード:光学活性化合物、包接キラルシフト試薬、Chirabite-AR

○おおたようすけ、しんがいきょうへい、ごごたただお、のりたけともや

3. 結果・考察



金属の常磁性の影響によるシグナル のブロードニングを回避するため、金 属を含まないキラルシフト化合物とし て、Chirabite-ARを用いた。今回、こ の Chirabite-ARを用いた。今回、こ の Chirabite-AR をホストとして用い ることによって、エナンチオマーであ る Menthol (D-, L-)をジアステレオ マー化させ、NMR において分離(認識) が可能であることが確認された (Fig. 2)。しかしながら、シグナルの 分離や定量性(検量線)について課題 が残った。





Chirabite-AR による Menthol (D-, L-) の分離と定量性 (¹³C-NMR)

¹H-NMR では、シグナルの重なりのため良好な検量線が得られなかった。次いで、 ¹H-NMR に比べて分離のよい¹³C-NMR にて、その分離挙動と定量性(検量線)を調べ ることとした。その結果、¹³C-NMR においても Menthol の分離が可能であることが確 認され、¹H-NMR に比べて分離も良く、定量性(検量線)が改善された。



Fig. 3¹³C-NMR spectra of menthol and Chirabite-AR

<u>Chirabite-AR による Menthol (D-, L-) の分離の解釈</u>

¹H-NMR、¹³C-NMRのいずれの場合においても、Chirabite-AR添加量の増加に伴い、 シフト量は増加した。この現象を説明するための仮定として、Chirabite-AR/Menthol 包接体の「平衡」を想定し、その検証を行うこととした。 I. 低温測定及びシミュレ ーション、II. キラバイト添加量とシフト量の相関関係を調べた結果、矛盾なく説明 が可能であった。

参考文献

1. Tadashi Ema, Daisuke Tanida, and Takachi Sakai, J. Am. Chem. Soc., 129, 10591-10596 (2007).

NMR によるシアロ糖鎖の緩和機構とダイナミクスの研究

○鵜澤 洵、関 宏子、桝 飛雄真、山口芳樹 理研 糖鎖構造、千葉大共用機器センター

NMR study on relaxation mechanism and dynamics of sialo-glycans

Jun Uzawa^{1,2}, Hiroko Seki², Hyuma Masu², Yoshiki Yamaguchi¹ ¹Structural Glycobiology Team, RIKEN, ²Center for Analytical Instrumentation, Chiba University

Abstract

Pg

We will report the NMR analysis of sialyloligosaccharides. ¹H and ¹³C NMR signals were completely assigned for sialyllactose derivative (Neu5Aca2-3Gal β 1-4Glc β 1-(CH₂)₂-Si-(CH₃)₃), Neu5Aca2-3Gal β 1-MP (4-methoxyphenyl) and Neu5Aca2-6Gal β 1-MP, using a series of one and two-dimensional NMR spectra. We further obtained the information on the conformation and dynamics of these sialoglycans from one dimensional NOE and ROE measurements as well as relaxation parameters. At 25°C, almost all the observed ¹H-¹H NOEs were negative. When the temperature was increased, each NOE signal became zero at different temperature. At the ¹H frequency of 600 MHz, the ¹H-¹H NOE becomes zero when the correlation time is around 0.3 nsec¹. Under this condition, the sign of NOE was different for each ¹H-¹H pair. Thus we detected very subtle dynamical features. The spin lattice relaxation time (T_1) were also varied by correlation time and observed frequency. We propose that the temperature-dependent NOE analysis coupled with T_1 relaxation analysis of oligosaccharides is a sensitive approach to get information on the dynamics in detail.

緒言

NMR スペクトロスコピーは溶液中での立体構造とダイナミックに関する情報を与えるという特徴を持っている。糖鎖の研究においてもこの特徴は機能との関連を研究する上で貴重である。NMR による研究手法として、緩和時間と NOE の利用が考えられるが、それぞれの特徴を概観する。

NOE は距離情報を得るために主として使われてきたが、特定のプロトン同士の緩 和機構に関連していることも知られている。この情報も糖鎖の立体構造と機能の関連 性において重要であろう。NOE の符号や強度が分子全体と部分構造による運動によ って決まることに着目して、一次元の DPFGSE-NOE を一連の温度で測定した。この 結果、糖鎖を運動の速い部分と遅い部分、中間の部分に分類することができた。

緩和時間には縦緩和時間 T_1 と横緩和時間 T_2 などがあるが、今回は T_1 (spin lattice relaxation time)を測定し、分子全体の運動と糖鎖結合様式の違い、部分構造による違いについて検討した。 T_1 が「Lattice」と称する様々な緩和対象を持つのに対して、 NOE は特定の核への緩和が主たる緩和対象となる。 T_1 については ¹H および ¹³C について測定した。反転回復法により求める緩和時間の温度による変化と NOE の温度による符号と強度の変化は異なる動きを観察していることになることと考えてこれを最大のポイントとした。今回の発表では厳密性は今後の課題として、シアル酸の結合様式の違いや温度による傾向に着目して実験を行った結果について報告する。

Sialo-glycan、DPFGSE-NOE、立体構造とダイナミックス うざわ じゅん、せき ひろこ、ます ひゅうま、やまぐち よしき
試料および装置

今回は化学合成された 1、市販品(東京化成)である 2 および 3 を対象とした。 二次元および一次元 NMR スペクトルより ¹H および ¹³C の全信号を帰属した。装置は Jeol Resonance 製 ECA-600(Ver-5) に TH5ATFG2 および Royal プローブを付属して 使用した。



Figure 1. **1** ; Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4Glc β 1-(CH₂)₂-Si-(CH₃)₃, **2** ; Neu5Ac α 2-3Gal β 1-MP (p-methoxy-phenyl), 3 ; Neu5Ac α 2-6Gal β 1-MP.

NOE から得られた運動情報

比較的小さな化合物やペプチドの場合は正の NOE、タンパク質のような高分子量の場合は負の NOE となる。中間のサイズの場合は ROE を用いて主として分子内の距離情報を得るのが一般的である。本研究においても ROE により距離情報を求めたが、 NOE を測定すると化合物の部分によって符号や強度が異なることを見出した。引き続き、温度を変えて測定したところ Fig.2 のような結果を得た。

すなわち、Gal-1 を照射して MP-o を観測すると(これを MP-o{Gal-1}と表示する) は正の NOE であ

は止の NOE であ る が、Gal-3 は 10℃から 30℃では 負であり、Gal-5 は10℃から16℃で は負む温いとなう り、 のである。いず れより、 強る。 あるクロスする。 の書籍によれば、 ωτ_c=1.12 の時とさ れている¹⁾。

重なりの無い¹H シグナルを照射して 温度可変により観測



Figure 2 Variable temperature DPFGSE-NOE spectra of **2**. Irradiation Condition, SINC pulse:33ms, mix time;0.4sec, a;10°C, b;16°C, c;30°C, d;40°C, e;50°C, f;65°C, g; original 1D spectrum. できた¹H シグナルについて、正から負に変わるゼロ点をクロスする温度を求め、図 にまとめたのが Figure 3 である。同じ部分構造でも1、2、3 の順に低い温度でゼロ 点をクロスしている。全体の分子量と 2-3 および 2-6 結合の違いを反映している。



Figure 3 Temperature (°C) at which NOE becomes zero ($\omega \tau_c=1.12$) corresponding to each ¹H-{¹H} pair.

¹H T₁から得られた運動情報

緩和時間の大きさはは分子相関時間(τ)と測定周波数に依存するが、 τ は温度上 昇で小さくなると仮定する。 τ が小さくなると T_1 は長くなる(①の状態)。 τ が大き



る (①の状態)。 τ が入さ くなるに連れて T_1 は短く なる。 τ がある大きさ以 上になる T_1 は極小値を示 し (②の状態)、これを えると逆に T_1 は長くなる (③の状態)。この運動状 を考察した。化合物 1 で は③、2 については②、3 では③、2 については②、3 では、3 では、5 で示 す T_1 値は ¹H 信号の分 裂や信号の重なりを考慮 して null point とした。

く Hun point とうた。 保護基である Si-CH₃

と MP-CH₃ は温度上昇に 伴い運動が活発になり、*T*₁

Figure 4 Temperature dependent ¹H T_1 values (null point).

は長くなる。①の状態。MP-o (Phenyl 基の ortho プロトン) は化合物 3 の場合は Fig.4 に示すように、温度上昇で長くなるが、2 の場合は 1.5sec 程度で変らない。この図で、 2-Gal-4 は 30~50℃で極小値を示しているが、2-Gal-1、2-Neu-7、2-Gal-1、3-Gal-4、 3-Gal6R も同様であった。-NCOCH₃ はメチル基であるにもかかわらず、1 および 2 では③の状態であり、3 では②である。これは 5-N カルボニル基が 7-OH と水素結合しており^{2,3)}、束縛があることに由来すると考察した。

¹³C T₁から得られた運動情報

カーボンの緩和時間は骨格のダイナミックスを反映すると考えられる。全体の傾向 を知るために、10℃と30℃でカーボンの緩和時間を測定した。その結果、結合部位の カーボンの緩和時間は運動性が束縛されて短くなっていることが明らかとなった。ま た、温度をあげると T₁は長くなることが観察された。

結 語

分子全体の運動は¹³C T_{I_1} ¹H T_{I_1} , NOE に共通して影響を与えるが、今回の実験では、 ¹H T_I の温度による変化は部分構造による違いもいくつか観察された。¹H-¹H の温度可 変による NOE の符号と強度の変化は、縦緩和時間の解析からは得られない興味深い

情報である。すなうように、Fig. 5 に示観¹Hをる。すなすように、同じ¹Hをる¹Hする¹Hする¹Hする¹HするとNOE が異な合いするとり、すいでロスなたのした。この研れした。この研えれでも利用ないたる。この研えれでも利用ないたる。こののでした。こののでした。こののでした。こののでした。こののでした。このでのでした。このでのでした。このでのでした。このでのでした。このでのでした。このでのでのでのでした。このでのでのでした。このでのでのでした。このでのでのでのでした。このでのでのでのでのでした。



Figure 5 DPFGSE-NOE spectra of **1**. Irradiation condition ; SINC Pulse: 50ms, mix time;0.4sec, a; Glc-1 ¹H irradiation, b; Si(CH₃)₃ irradiation, c; original 1D spectrum.

参考文献

- 1. R. Freeman, "Spin Choreography", P-340, Oxford University Press, 1998.
- 2. 鵜澤 洵ら、"異種核間 NOE 相関法"、京都、11 月(1990).
- 3. J.Uzawa et al, "The conformational study of N-acetylneuramic acid by Hetero 2D-NOE and relaxation time (T1)", SMASH 1999, Argonne, USA, Sept. (1999).

P10 NMRスペクトルの多変量解析によるアクリル系共重合体の ー次構造解析 ○百瀬 陽^{1,2},前田智也²,直野辰哉^{1,2},浅川聖子²,坂尾竜一²,

押村美幸², 平野朋広², 右手浩一²
 ¹ 三菱レイヨン² 徳島大院ソシオテクノサイエンス研究部

Analysis of Primary Structures of Methacrylate Copolymers and Terpolymers by Multivariate Analysis of ¹³C NMR Spectra

•Hikaru MOMOSE^{1,2}, Tomoya MAEDA², Tatsuya NAONO^{1,2}, Seiko ASAKAWA², Ryuichi SAKAO², Miyuki OSHIMURA², Tomohiro HIRANO², and Koichi UTE²

¹ Mitsubishi Rayon Co. Ltd., Hiroshima, Japan.

² Deptment of Chemical Science and Technology, The University of Tokushima, Tokushima, Japan.

¹³C NMR spectra of copolymers exhibit complicated splitting due to comonomer sequences and tacticities, and thus assignment of individual resonance peaks is troublesome. In the present paper, multivariate analysis was applied to get quantitative information about primary structures, such as chemical composition, comonomer sequence and tacticity, from ¹³C NMR spectra of copolymers and terpolymers of methyl methacrylate, *tert*-butyl methacrylate, and 2-hydroxyethyl methacrylate without making assignment for the resonance peaks.

【緒言】 機能性を有する高分子材料には多成分共重合体が用いられることが多い. これらの共重合体の分子量,組成,連鎖構造などの構造因子を詳細に解析することは, 材料の性能向上に不可欠である.NMRは高分子の構造解析に用いられる手法の1つで ある.しかし一般に,多成分共重合体のNMRスペクトルは,組成,モノマー連鎖およ び立体規則性などを反映して複雑に分裂しており,直接解析することは難しい.

多変量解析は、複雑かつ大量の情報を、いくつかの有用な情報へと変換する強力な 手法である。例えば、合成高分子に関しては、近赤外、赤外およびラマンスペクトル への適用が数多く知られている^[1].また、いわゆるメタボロミクスと呼ばれる生物代 謝産物の網羅解析では、新薬の開発などで実用化が図られている^[2].

そこで本研究では、多変量解析をメタクリ ル酸メチル(MMA)、tert-ブチル(TBMA)、およ び2-ヒドロキシエチル(HEMA)からなる二元 および三元共重合体の¹³C NMRスペクトルへ 応用し、複雑に分裂したスペクトルの帰属を 行うことなく、共重合組成、モノマー連鎖お よび立体規則性に関する定量的な情報の取得 を試みた.



Scheme 1. Chemical structures of monomers.

Multivariate analysis, Methacrylate copolymer, Primary structure

○ももせ ひかる,まえだ ともや,なおの たつや,あさかわ せいこ,さかお りゅういち,おしむら みゆき,ひらの ともひろ,うて こういち

【実験】 本研究で用いた試料はすべて, 乳酸エチルのモノマー混合物20 wt%溶液中, フリーラジカル重合で合成した. 各種試料をそれぞれ8 wt/vol%のCDCl₃溶液(二元共 重合体の場合)またはCDCl₃/DMSO-d₆ [4/6 (mol/mol)] 混合溶液(三元共重合体の場合) とし, 10 mm (THプローブを装備したJEOL JNM- ECX400を用いて55 °Cで測定した. スペクトルの積算回数は5000回, パルス幅は7.5 µs (45°), 繰り返し時間は2.73 sとして, ¹³C NMRスペクトルを得た(Figure 1). 多変量解析にはJEOL Alice2 ver.5 for metabolome ver 1.6とPattern Recognition SystemsのSirius ver. 7.0を用いた.



Figure 1. Figure 1. 100 MHz 13 C NMR spectrum of poly(MMA-*co*-TBMA) with 55.5 mol% in TBMA units, as measured in chloroform-*d* at 55 °C.

【MMA-TBMA二元共重合体の共重合組成とモノマー連鎖解析】 MMAとTBMAの各 単独重合体(PMMA, PTBMA),組成が異なるPMMAとPTBMAの混合物9種,組成や収 率が異なるMMA-TBMA共重合体16種の合計27種の試料を準備した.¹³C NMRスペク トルの中で,2つのモノマー単位の共通骨格であるカルボニル炭素(175.0–179.0 ppm), 主鎖4級炭素(44.1–48.1 ppm)およびα-メチル炭素(15.1–23.1 ppm)の各共鳴領域を0.25

ppm間隔でバケット積分し,主成分分析(PCA) を行った. Figure 2にスコアプロットを示す.

単独重合体とこれらの混合物の第1主成分 (PC1)のスコアはTBMA組成の増加とともに単 調に減少した. 共重合体のPC1スコアも同様の 傾向を示した. そこで, PC1スコアとTBMA組 成の相関を調べたところ,相関係数 R^2 = 0.998 の直線となることから, PC1スコアは組成を反 映することがわかった.単独重合体2種とこれ らの混合物9種を検量用データとした部分最小 二乗回帰(PLSR)を行い,共重合体16種のTBMA 組成を決定することを試みた. その結果,別途 ¹H NMR測定から求めたTBMA組成に対して, R^2 = 0.997,相対標準偏差(*RSD*) = 3.4 %で一致 した^[3].



Figure 2. PCA score plots for ¹³C NMR signals of the carbonyl, backbone quaternary and α -methyl carbons of PMMA (\blacklozenge), PTBMA (\blacklozenge), their blends (\diamondsuit) and poly (MMA-*co*-TBMA)s obtained at early (\Box) and late (\blacksquare) stages of copolymerization.

一方, 共重合体の第2主成分(PC2)のスコアは組成が等モル付近で最小となり, 組成 が偏るにつれ単独重合体に近づくことから, PC2はモノマー連鎖の不連続性を反映す ると考えられる. モノマー連鎖の不連続性を定量的に表す指標としてランナンバー $f_{MT}^{[2]}$ を採用し, PC2スコアと f_{MT} の関係を調べた. 初期共重合体9種の仕込みモノマー 組成と共重合体の組成から算出したモノマー反応性比($r_{MMA} = 0.81 \pm 0.06$, $r_{TBMA} = 1.26$ ± 0.03)を用いて求めた f_{MT} とPC2スコアとは良い相関($R^2 = 0.996$)を示すことがわかっ た. また, 単独重合体2種と初期共重合体9種を検量用データとしたPLSRにより, 高 重合率の共重合体7種のランナンバーを $R^2 = 0.997$, *RSD* = 7.1 mol%の精度で予測でき た^[4].

【MMA-TBMA二元共重合体の立体規則性解析】 重合温度を-40 ℃から 80 ℃に変化 させ、組成が異なるMMA-TBMA共重合体25種を準備した. バケット積分間隔を0.05 ppmとした以外は、先述した手順と同様にしてPCAを行った. Figure 3にスコアプロッ トを示す. TBMA組成の増大にともない、PC1スコアが増大したため、PC1は共重合 組成が反映されていることがわかった. 一方、PC2スコアは、重合温度が低下するに つれて増大した. 一般に、メタクリレートモノマーのラジカル重合では、重合温度の 低下とともにシンジオタクチシチー(側鎖基が同じ側にあるメソ(m)連鎖に対する、 異なる側にあるラセモ(r)連鎖の割合)が増大することが知られている^[5, 6]. また、モ ノマーの種類によらず、r連鎖を含むNMRシグナルが正のPC2ローディングとして観

測された.これらの結果から, PC2はシンジオ タクチシチーを反映していることがわかった.

そこで、Figure 3の網掛けで示した16種の共 重合体を検量用データとしたPLSRを行い、残 り9種の共重合体を「未知試料」として、その3 連子立体規則性分率(イソタクチックmm、ヘ テロタクチックmrおよびシンジオタクチック rr)の推定を試みた.なお、共重合体のrr、mr、 mmは、TBMA単位を酸加水分解の後、メチル エステル化することによりPMMAへと変換し た試料の¹³C NMRスペクトルから求めた.その 結果、PLSRで予測したrr、mr、mmは、実測値 に対して R^2 = 0.500 (mm), 0.717 (mr), 0.825 (rr), RSD = 26.0 % (mm), 10.1 % (mr), 4.3 % (rr)で一 致した.



Figure 3. PCA score plots for ¹³C NMR signals of the carbonyl, backbone quaternary and α -methyl carbons of 25 poly(MMA-*co*-TBMA)s polymerized at -40 °C ($\mathbf{\vee}$), -20 °C ($\mathbf{\bullet}$), 0 °C ($\mathbf{\wedge}$), 40 °C($\mathbf{\bullet}$) and 80 °C($\mathbf{\blacksquare}$).

【MMA-TBMA-HEMA三元共重合体の共重合組成とモノマー連鎖解析】 MMA-TBMA二元共重合体の検討で用いた27種に加え,HEMAの単独重合体(PHEMA),組成 が異なる単独重合体3種の混合物25種,組成や収率が異なるMMA-HEMAおよび TBMA-HEMA二元初期共重合体各14種,組成が異なるMMA-TBMA-HEMA三元共重合 体32種の合計113種を準備した.2系列の二元共重合体には,初期共重合体9種と,高 重合率共重合体5種の2グループを,三元共重合体には,初期および高重合率の共重合 体を16種ずつ,それぞれ準備した.¹³C NMRスペクトルの中で,二元共重合体の場合 と同様に,カルボニル炭素(173.0–177.0 ppm),主鎖4級炭素(41.5–45.5 ppm)およびα-メ チル炭素(14.2-18.2 ppm)の各共鳴領域を0.05 ppm間隔でバケット積分し,データの中心化と規格化を行った後, PCAを行った.

Figure 4に三次元スコアプロットと、3つの主成分平面への投影図を併せて示す. PC1-PC2投影図で、3種の単独重合体を頂点とし、これらの混合物が面内を埋めるよう な三角相図が示された.この結果から、PC1とPC2のスコアの組み合わせが組成を反 映することがわかった.一方、PC1-PC3およびPC2-PC3投影図では、二元あるいは三 元共重合体のPC3スコアは組成が等モル付近で最大となり、組成が偏るにつれて各単 独重合体に近づいた.また三次元スコアプロットは、単独重合体とそれらの混合物で 構成される平面を底面とし、3系列の二元共重合体が各側面となる三角錐を形成して いたことから、PC3はモノマー連鎖の不連続性を反映していると考えられる.これは、 MMA-TBMA二元共重合体の解析における考え方の拡張である.そこで、MMA-TBMA 二元共重合体の場合と同様に、モノマー連鎖の不連続性を定量的に表す指標として3 種存在する異種2連子モノマー連鎖fMT、fTH、fHMの総和f2-heteroを考え、PC3スコアと単 独重合体3種および初期三元共重合体9種のf2-heteroの関係を調べた.その結果、PC3スコ アは良い相関(R²=0.928)を示したことから、PC3スコアは主としてf2-heteroを反映してい ることがわかった.

次に、単独重合体3種とこ れらの混合物34種に3系列の 二元共重合体44種を加えた 81種を検量用データとした PLSRにより、三元共重合体 の組成を推定した.¹H NMR 測定から別途求めた組成に 対し、PLSRによって推定さ れた組成は, RSD = 14.1 % (MMA), 6.5 % (TBMA), 9.4 % (HEMA)でそれぞれ一致した. また、上記81種の試料群を検 量用データとした三元共重 合体のf_{MT}, f_{TH}, f_{HM}をPLSR で推定したところ,理論値に 対して, RSD = 19.9 % (f_{MT}), 12.1% (f_{TH}), 31.1% (f_{HM})でそ れぞれ一致した.



Figure 4. PCA score plots for ¹³C NMR signals of 113 samples and its projected plots. Symbols: PMMA, PTBMA, PHEMA (\blacklozenge), homopolymer blends (\diamondsuit), copolymers (\Box , \blacksquare), and terpolymers (\blacklozenge).

References.

[1] 総説として, a) Chalmers, J. M., Everall, N. J. (1996) *TrAC* 15, 18-25. b) 下山 昌彦 (1998) 日本赤外線
学会誌 8, 78-86. [2] 総説として, a) Viant M. R., Ludwig C., Gunthe U. L. "Metabolomics, metabonomics and metabolite profiling", ed. Griffiths W. J. (2008) Cambridge: Royal Society of Chemistry; p. 44-70 [chapter 2]. b) 吉田 欣史, 久原 とみ子, 菊池 淳 (2009) ぶんせき, 7, 371-378. [3] Momose, H., Hattori, K., Hirano, T., Ute, K. (2009) *Polymer* 50, 3819-3821. [4] Momose, H., Maeda, T., Hattori, K., Hirano, T., Ute, K. (2012) *Polym. J.* 44, 808-814. [5] Harwood, H. J., Ritchey, W. M. (1964) *J. Polym. Sci. B: Polym. Lett.* 2, 601-607. [6] Ito, K., Yamashita, Y. (1965) *J. Polym. Sci. A: General Papers* 3, 2165-2187.

¹H NMRによるアミノ酸類の純度測定 ○斎藤直樹¹、齋藤剛¹、山崎太一¹、加藤尚志¹、山中典子¹、

井原俊英¹ ¹産業技術総合研究所 計測標準研究部門

Purity determination of amino acids by ¹H NMR

 \bigcirc Naoki Saito¹, Takeshi Satio¹, Taichi Yamazaki¹, Hisashi Kato¹, Noriko Yamanaka¹ and Toshihide Ihara¹

¹National Metrology Institute of Japan, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Ibaraki, Japan

In recent years, Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy has become recognized more and more as a quantitative analytical tool called qNMR, because areas of ¹H NMR signals can be evaluated accurately. We have previously demonstrated that accurate purity evaluation of amino acids may be achieved by careful investigations of solubility and stability of analyte in solution, as well as whether impurities interfered with ¹H NMR signals of the analyte or not. In this study, we conducted purity determination of 17 kinds of amino acids by qNMR with consideration of the above three points. For verification of these purities, a titration method was used. From our results of analysis, sample preparation, ¹H NMR measurement and process parameters for most of the amino acids can be controlled with consideration of only the above three points. However, attentions were needed to be given for ¹³C decoupling parameter, existence of rotamers and shift in chemical shifts by addition of internal standard.

1. はじめに 近年、[']H NMRによる定量分析法(以下、定量NMR)が、その測定の精 確さの向上により注目されており、医薬品、食品添加物、有機系農薬や工業原料等の 純度測定への応用が進んでいる。これまで当グループでは、定量NMRをアミノ酸標準 物質(タンパク質の加水分解で生じるアミノ酸)の純度測定へ応用する際に、①溶解 性、②溶液中での安定性、③不純物シグナル(不純物アミノ酸や溶媒由来のシグナル) の重複に留意することで、純度を精確に評価でき得ることを確認した¹⁾。特に③の評 価において、中性・酸性・アルカリ性溶媒を使い分けて、アミノ酸溶液のpHに起因す る化学シフトの変化を利用することで、不純物シグナルの重複を回避でき得ることを 明らかにした。そこで、本研究ではこれらの点を考慮して、上記以外の17種類のアミ ノ酸類に対して定量NMRの適用を試みた。なお、算出した純度は、日本薬局方等にお いてアミノ酸標準物質の純度測定に用いられる非水滴定法(本研究では、不純物アミ ノ酸類をHPLCにより評価して滴定値を補正)で検証し、信頼性の確認を行った。

 実験 評価するアミノ酸類にはTable 1に示したものを用い、内標準物質には DSS-d₆ (3-(Trimethylsilyl)-1-propanesulfonic acid-d₆ sodium salt)を用いた。
 キーワード:アミノ酸、定量NMR、純度測定

○さいとうなおき、さいとうたけし、やまざきたいち、かとうひさし、やまなかのり こ、いはらとしひで

まず、D₂0を主たる溶媒として10 mg/mL程度のアミノ酸溶液を調製し、溶解性の確認 を行った。次に、NMR装置(JEOL製, ECS400)を用いて、25 °C、90° パルス、32回積 算、60秒以上の待ち時間、¹³Cデカップリング等の条件で、測定開始から約12時間経過 するまで断続的に測定した。その後、得られた異なる官能基由来のシグナルより純度 を算出し、経時的変化から溶液中の安定性を評価した。また、それぞれのシグナルよ り算出した純度を比較し、不純物シグナルの重複を評価した。なお、D₀0を溶媒とし た際に、難溶であった場合あるいは不純物シグナルの重複が認められた場合は、 DC1/D₂0またはNaOD/D₂0を適宜用いた。

結果と考察 結果の一覧をTable 1に示す。評価したアミノ酸類の多くが①D,0 3. に容易に溶解し、かつ②安定であった。さらに、③異なる官能基由来のシグナル間に おける純度の差は、繰返し測定の標準偏差より小さい場合が多く、また、各シグナル の結果を相加平均して得られた純度は非水滴定法によって得られた純度と不確かさ の範囲で一致した。したがって、評価したアミノ酸類の多くは、既報¹⁾と同様に①~ ③の点に注意して試料調製、測定、解析を行えば、精確な純度を算出でき得ることが 確認された。一方、AAAでは、1 mol/L DC1/D₂0を溶媒に用いたことに伴う¹³Cデカップ リングの不良が認められたため、ノンデカップリングで測定を行う必要があり、¹³C サテライトシグナルに重複する不純物シグナルの評価が不十分であった。また、Car では、溶媒により面積強度が変化するシグナルが観測された。Car中には回転異性体 が共存するという報告があり²⁾、溶媒によってその存在比が異なるためであると推察 された。さらに、PEAでは、0.1 mol/L Na0D/D₂0を用いた際に、DSS-d₄を加える前後で スペクトルの化学シフトの変化が確認された。化学シフトの変化は、1 mol/L NaOD/D20 を用いると、十分に抑えることが可能であったことから、DSS-d₆を加えたことに伴う 溶液のpH変化に起因していると推察された。以上のことから、定量NMRをアミノ酸類 の純度測定へ応用する際には、必要に応じて④¹³Cデカップリングの条件、⑤回転異性 体の存在、⑥内標準物質を加えることに伴う化学シフトの変化にも注意すべきである ことが示された。

Table 1 Results of purity determination of amino acids

amino acide	colvent	stability	mean purity by ¹ H NMR	mean purity by Titration
	solvent	stability	(uncertainty, k=2, %)	(uncertainty, k=2, %)
L-Asparagine monohydrate (Asn · H ₂ O)	D ₂ O	Stable (over 12 h)	87.71 (0.72)	87.99 (0.27)
L-Glutamine (Glu)	D ₂ O	Stable (about 10 h)	99.53 (0.80)	99.74 (0.42)
L-Tryptophan (Trp)	0.1 mol/L DCl/D2O	Stable (over 12 h)	99.56 (0.84)	99.96 (0.42)
L-2-Aminoadipic acid (AAA)	1 mol/L DCl/D2O	Stable (over 12 h)	99.11 (1.72)	98.89 (0.26)
DL-2-Aminobutyric acid (α-ABA)	D_2O	Stable (over 12 h)	99.62 (0.86)	99.50 (0.37)
4-Aminobutyric acid (γ-ABA)	D_2O	Stable (over 12 h)	99.08 (0.82)	99.29 (0.33)
DL-3-Aminoisobutyric acid monohydrate (β-AiBA·H ₂ O)	D_2O	Stable (over 12 h)	84.85 (0.72)	85.18 (0.26)
b-Alanine (β-Ala)	D_2O	Stable (over 12 h)	99.51 (0.82)	99.83 (0.29)
L-Carnosine (Car)	D_2O	*Stable (over 12 h)	99.22 (0.84)	99.37 (0.57)
L-Citrulline (Cit)	D_2O	Stable (over 12 h)	99.40 (0.82)	99.56 (0.37)
O-Phosphoethanolamine (PEA)	0.1 mol/L NaOD/D ₂ O	Stable (over 12 h)	93.97 (1.62)	94.48 (2.29)
L-Hydroxyproline (Hypro)	D_2O	Stable (over 12 h)	99.53 (0.86)	99.84 (0.56)
1-Methyl-L-histidine (1-Mehis)	D_2O	*Stable (over 12 h)	89.71 (0.74)	90.12 (0.29)
Sarcosine (Sar)	D_2O	Stable (over 12 h)	99.30 (0.76)	99.46 (0.55)
2-Aminoethanol hydrochloride (EOHNH2·HCl)	D_2O	Stable (over 12 h)	62.56 (0.38)	62.59 (0.19)
5-Hydroxy-DL-lysine monohydrochloride (Hylys · HCl)	D ₂ O	Stable (over 12 h)	80.75 (0.48)	80.50 (0.39)
L-Ornithine monohydrochloride (Orn · HCl)	D_2O	Stable (over 12 h)	78.47 (0.48)	78.33 (0.33)

*However, specific ¹H NMR signal of the imidazole ring is unstable.

参考文献 1) 山﨑太一, 高津章子, 第73回分析化学討論会, 函館, 2013 2) Friedrich and Roderick, *Can. J. Chem.* **64**, 2132 (1986)

³¹P NMR を用いたりん酸基含有有機化合物の定量分析法の検討 〇山﨑太一、齋藤剛、井原俊英、沼田雅彦 産業技術総合研究所 計測標準研究部門

Study of quantitative analysis method for organophosphoric acid compounds with ³¹P NMR

○Taichi Yamazaki, Takeshi Satio, Toshihide Ihara, Masahiko Numataa National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), National Metrology Institute of Japan (NMIJ)

Abstract

Recently, nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy has used for quantitative analysis by ¹H NMR. We have established accurate quantitative analysis by ¹⁹F NMR to expand target compounds¹⁾²⁾. In this research, we discuss the quantitative analysis by ³¹P NMR. Purities of the glyphosate reference material obtained by ¹H NMR and ³¹P NMR techniques were in agreement with its reference value. On the other hand, the measurement variation acquired by ³¹P NMR was larger (ca. 2 %) compared with that by ¹H NMR (ca. 0.5%). This approach was also applied to mononucleotides which are basic units of nucleic acids.

1. Introduction

近年、NMR の定量性が注目され、¹H NMR を用いた定量分析について盛んに研究 が進められている。これまでに当研究グループでは定量分析における核種の拡大を目 指して¹H と同等の感度を持つとされる¹⁹F に着目し、オフレゾナンス効果を低減でき る手法を提案し、¹⁹F NMR を用いた1%以下の精確さを持つ定量法を実現した¹⁾²⁾。 本発表では、さらなる定量対象の拡張を目指して³¹P NMR を用いたりん酸基を含む有 機化合物の純度測定について検討した。また、³¹P NMR で得られた定量値の精確さに ついて¹H NMR を用いて検証を行った。さらに本法を、核酸の基本単位であるモノヌ クレオチドの純度評価にも適用したので併せて報告する。

2. Experimental

全測定には¹H共鳴周波数599.9 MHzのNMR装置(Varian Inc.製 VNS 600A)を、デ ータ解析はMestReNovaを用いた。内標準物質(IS)には、フタル酸水素カリウム(PHP)) 認証標準物質(NMIJ CRM 3001-b)を用いて純度を¹H NMRで評価したテトラメチル フォスフォニウムブロミド((CH₃)₄PBr)を用いた。測定条件の検討にはグリフォサー ト標準物質(和光純薬製TRMグレード)を用い、モノヌクレオチドにはデオキシアデ ノシンーりん酸二ナトリウム(dAMP-Na₂),デオキシシチジンーりん酸二ナトリウム (dCMP-Na₂),チミジンーりん酸二ナトリウム(dTMP-Na₂)およびデオキシグアノシン ーりん酸二ナトリウム(dGMP-Na₂)を用いた。

³¹PNMR, 定量NMR, りん

○やまざきたいち、さいとうたけし、いはらとしひで、ぬまたまさひこ

3. Results and discussions

まず、³¹P NMRにおけるオフレ ゾナンス効果の評価のために、 1% H₃PO₄/D₂Oを用いて中心周波 数を変えて測定したところ、図1 のような励起中心に対して対称 的なシグナル強度の減衰が確認 され、100 ppm励起中心から離れ たシグナルでは20%近いシグナ ル強度の減衰が確認された。この 結果から、ISのシグナルと測定対 象物質のシグナルの中心に励起



中心を設定して³¹P NMRの測定を行った。

次に、³¹P NMRのISに用いる(CH₃)₄PBrの純度を¹H NMRで評価したところ、(0.998 ±0.001)kg/kgとなり、非常に高純度であったことから、³¹Pとしての純度も同等である と考えられた。この(CH₃)₄PBrをISに用いてグリフォサートの純度評価を行ったところ、 ¹H NMRでは(0.984±0.02)kg/kg、³¹P NMRでは(0.982±0.015)kg/kgという結果が得られ た。³¹P NMRの測定ばらつきは1.5%と大きめであったが、¹H NMRで得られた定量値 と測定ばらつきの範囲で一致した。さらに、モノヌクレオチドを¹H NMRおよび³¹P NMRで純度評価するとグリフォサートと同様に³¹P NMRでは測定ばらつきは大きい ものの、¹HNMRでで得られた純度値と一致する結果が得られた。

³¹P NMRではシンプルなシグナルが得られたにも関わらず、測定ばらつきが大きく なった理由としては、得られたシグナルがブロードであることに加え、測定対象分子 の³¹Pの含量が少なくS/Nが低い(S/N<500)ことが原因と考えられる。オフレゾナンス効 果の影響を確認するために測定した1%H₃PO₄/D₂O(S/N=1000~2000)では1%以下の 再現性で測定できたことから、同等の精確さで測定するためにはS/N>1000が必要であ ることが示唆された。

4. Conclusions

³¹P NMRで得られた定量結果は、¹H NMRの結果と測定ばらつきの範囲内で一致し た。一方で、³¹P NMRの測定ばらつきは大きく、実用化には高精度化が必要であると 考えられる。今後は高精度化を行うと共に、複雑な測定対象物質への適用についても 検討を行う予定である。

5. Reference

1) T. Yamazaki, T. Saito and T. Ihara, The 50th Memorial Annual Meeting of the NMR Society of Japan. 148-151 (2011).

2) 山﨑太一、齋藤剛、井原俊英、第51回NMR討論会、230-231 (2012).

¹³C NMR化学シフト値を用いた構造推定: CAST/CNMRシステムの新しい機能と応用

○越野広雪¹,小市俊悟²,佐藤寛子³ ¹独立行政法人理化学研究所 ²南山大学 ³国立情報学研究所

Structure Elucidation from ¹³C NMR Chemical Shifts: New Algorithm to CAST/CNMR System and Its Application

○Hiroyuki Koshino¹, Shungo Koichi², Hiroko Satoh³
 ¹RIKEN, Wako, Japan.
 ²Nanzan University, Seto, Japan.
 ²National Institute of Informatics, Tokyo, Japan.

CAST/CNMR Structure Elucidator, a new chemical structure elucidation system is developed and implemented to play a complementary role for CAST/CNMR Shift Predictor. The Structure Elucidator uses a CAST/CNMR database to obtain fragment structures by mapping the input chemical shift values to a part of each compound in the database, and then assembles the fragments to form substructures and constructs candidate structures by merging common parts of the substructures. The protocol is implemented by using some graph algorithms such as convex bipartite matching(CBM) and weighted bipartite matching(WBM). Structure Elucidator was applied to structural characterization of two sets of NMR data for a mixture of two oxidized sclareolide analogues, and also to some indole-diterpene alkaloids.

データベースに基づいた¹³C NMR 精密化学シフト予測システム CAST/CNMR は化学 構造式をクエリーとして¹³C NMR の化学シフト値を立体化学や環構造を考慮して予測 することを基本とするシステム(CAST/CNMR Shift Predictor)であった¹³。これをより 一般に利用し易くするため、¹³C NMR の化学シフト値をクエリーとして化学構造を出 力する新しい分子構造提案アルゴリズムを開発し、CAST/CNMR Structure Elucidator とした⁴。CAST/CNMR Structure Elucidator による分子構造の提案では、CAST/CNMR の立体化学構造-NMR 化学シフトデータベースを活用し、部分構造検索には2種類の2 部グラフマッチング, CBM (convex bipartite matching) と WBM (weighted bipartite matching)を応用し、化学シフト値が一定の範囲内で一致する炭素を手がかりに部分 構造を結合させて候補構造を構築し提案する。出力は平面構造であるが、検索された 部分構造は CAST/CNMR の GUI で一覧表示が可能であり、その情報に基づいて容易に立 体化学をユーザーは推定可能である。今回、新たに開発した CAST/CNMR Structure Elucidator のアルゴリズムの紹介と応用研究を含む評価の結果について報告する。

CAST/CNMR 構造訂正 構造推定

○ こしのひろゆき,こいちしゅんご,さとうひろこ

構造推定に必要なクエリーは、¹³C NMRの化学シフト値のみで、オプションとして水 素の結合している数の情報を利用可能である。部分構造検索の条件設定は、CBMとWBM の選択、シフト値の許容誤差、出力する提案構造の各原子数の制限などを指定する。 対称性などにより等価な信号が有る場合には、実際の炭素数分同じシフト値をクエリ ーに入力する必要がある。一方、不要な信号が存在しても適切な構造を提案できる場 合が多く、一例として sclareolide の酸化誘導体である2種の類似化合物のシフト値 を混合物と仮想したクエリーにして実行した。その結果、個々の正解構造を含む推定 構造を提案することが可能であった。条件として炭素に結合している水素の数の情報 は正解構造の提出や候補構造の適切な絞り込みに有効であった。より複雑な化合物の 例として、インドールジテルペンアルカロイドに分類される terpendole 類などに関 しても評価を行い、概ね良好な結果が得られた。実践的応用例としては、文献に間違 った構造式が報告されている場合に、同じシフト値のクエリーから正解構造と報告さ れた間違った構造が見いだされることがあるが、同じ NMR データに対して二つの構造 式が提案される矛盾が生じた場合には、個々の構造に対して CAST/CNMR Shift Predictor で構造式をクエリーとして妥当性を評価した。適切な推定構造を提案でき るかどうかは、クエリーに用いた化合物に関連する類縁化合物のデータがデータベー スに登録されているかどうかに大きく依存する。現在約4,000 化合物、炭素種として はその約 20 倍ほどの件数のデータがデータベースに登録されているが、データベー スの拡充とともに適用できる化合物の種類が広がり、より実践的な応用が可能になる と期待される。



[参考文献]

- H. Satoh, H. Koshino, J. Uzawa, and T. Nakata, CAST/CNMR: highly accurate ¹³C NMR chemical shift prediction system considering stereochemistry. *Tetrahedron*, 59, 4539-4547 (2003).
- H. Satoh, H. Koshino, T. Uno, S. Koichi, S. Iwata, and T. Nakata, Effective consideration of ring structures in CAST/CNMR for highly accurate ¹³C NMR chemical shift prediction. *Tetrahedron*, 61, 7431-7437 (2005).
- 3. S. Koichi, S. Iwata, T. Uno, H. Koshino, and H. Satoh, Algorithm for advanced canonical coding of planar chemical structures that considers stereochemical and symmetric information. *J. Chem. Inf. Model.*, **47**, 1734-1746 (2007).
- 4. S. Koichi, M. Arisaka, H. Koshino, A. Aoki, S. Iwata, T. Uno, and H. Satoh, Chemical structure elucidation from ¹³C NMR chemical shifts: Efficient data processing using bipartite matching and maximal clique algorithms. *submitted*.

ポリオレフィンの溶液¹³C NMRにおけるピーク強度の 定量性

○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

Quantitative Evaluation of ¹³C NMR Peak Intensity for Polyolefin Solution OFumika Moro¹, Hiroko Sato¹, and Mitsuhiko Onda¹

¹ Analysis Research Lab., MITSUI CHEMICAL ANALYSIS & CONSULTING SERVICE INC.

Microstructure analysis of polyolefins is essential to understand their mechanical or environmental properties because they are widely used in our daily life as plastic materials. To obtain quantitative ¹³C NMR spectra, the inverse gated decoupling (IGD) method is frequently employed to avoid steady state NOE since the degree of enhancement vary according to different carbons in the ¹³C NMR signal intensity. The recycle time is usually set to three times of the longest T_{1C} in the sample for 45 degree pulse. For natural abundance of ¹³C nuclei, however, it is time consuming to obtain the quantitative ¹³C NMR. Thus, complete ¹H decoupling (CPD) method is still widely employed for engineering purpose by carefully choosing signals for quantification. In this work, we examined several NMR parameters for conventional CPD and IGD sequences to achieve ¹³C NMR analysis quantitatively. Quantitative DEPT with alternative enhancement by polarization transfer is also discussed.

[背景·目的]

¹³C NMR法は、ポリオレフィンの一次構造解析(組成、連鎖分布、立体規則性等) に広く応用されている。¹³C NMRスペクトルでは、インバースゲートデカップリング 法を用いて測定(以下IGDと記載)することにより、炭素核ごとに異なるNOEによる感 度増強を除いて定量解析する方法が提案されている¹⁾。しかしながら、¹³C核は感度が 低いことから、単位時間当たりの積算効率を稼ぐために45°パルス(一般に、繰り返 し時間は最長*T*_{1C}の3倍程度に設定)を用いても、ポリオレフィンの微細構造解析には 非常に長い測定時間が必要となる。このため、¹H核をスピンデカップリングした測定 (以下CPDと記載)でNOEによる感度増強のもと、NOEが同等で緩和時間の短いシグナ ルを選択することで定量されてきた²⁾。

機能性を向上するため様々なポリマーが開発される中で、新たなポリマー系について、その都度最適な測定条件を確認するのは非常に手間である。全ての炭素シグナルの定量性が確保できれば、より精度よく、より簡便にポリオレフィンの一次構造情報 が得られると期待される。

これらの状況から、今回、¹³C NMRのピーク強度の定量性について検討を実施した。 従来用いられてきたCPDおよびIGDに加え、分極移動による感度増強が期待できる Quantitative DEPT³⁾による¹³C NMR測定を実施した。

Polyolefin, ¹³C NMR, Quantitative

○ もろふみか, さとうひろこ, おんだみつひこ

SCIENTIFIC POLYMER PRODUCTS. INC.より入手したポリプロピレン(PP)、ポリ4-メチル-1-ペンテン(P4MP)を重水素化テトラクロロエタンに 10%(w/v)で加熱溶解し、 測定試料とした。

[結果]

長 T1)と主鎖

抜粋して示した。

Table 1 $\downarrow \subset$ PP Table 1. T_{1C} , T_{1H} and NOE factor for PP and P4MP

	10	111					
お上7K DAMD の	Sampla	side chain CH ₃			main chain CH ₂		
	Sample	T_{1C}/s^a	$T_{1\mathrm{H}}/\mathrm{s}^{\mathrm{a}}$	NOE factor ^b	T_{1C}/s^{a}	$T_{1\mathrm{H}}/\mathrm{s}^{\mathrm{a}}$	NOE factor ^b
T_{1C} , T_{1H} , NOE	PP	2.24	1.08	2.7	0.82	0.61	2.7
を側鎖 CH ₃ (最	P4MP	1.60	1.03	2.5	0.27	0.45	2.1

^a Relaxation time obtained by inversion recovery method.

^b NOE factors were determined from comparison of signal intensities with complete ¹H CH₂(最小 T₁)を decoupling (CPD) or inverse gated decoupling (IGD) during the recycle time.

Fig.1(a)および(b)に PP および P4MP の 45° パルス、繰り返し時 間 5.5 秒、CPD の¹³C NMR スペク トルを示す。この条件化で PP の各 炭素のピーク強度はおおむね炭素 数に比例するが、P4MP では側鎖 CH₃のピーク強度が大きい。これ は、P4MP では側鎖 CH₃ 基の NOE(2.5)が、他の炭素核の値 (NOE=2 程度)よりも大きいためと 考えられる。そこで IGD を用いた ¹³C NMR 測定を行い、強度比を確 認した。しかしながら、側鎖 CH₃ の相対ピーク強度は 2.52→2.32 に 減少したものの、炭素数の相対値 から予想される理論値2よりも、 大きい値となった(Fig. 1(d))。繰り 返し時間を20秒と十分長く取ると、 transient NOE が抑制され、定量的な ピーク強度が得られた(Fig. 1(e))。当 日は、CPD および IGD 測定の検討 結果に加え、分極移動で感度が増強 される Quantitative DEPT による¹³C



Fig.1 Solution ¹³C NMR spectra of (a) polypropylene (PP) with complete ¹H decoupling (CPD) and 5.5s of recycle time (RT), (b) poly 4-methyl-1-pentene (P4MP), CPD and 5.5s of RT, (c) P4MP with inverse gated decoupling (IGD) and 5.5s of RT, and (d) P4MP, IGD and 20s of RT.

NMR の定量性についても、検討した結果をあわせて報告する。

[参考文献]

- 1) P. J. Adriaensens et al., *Polymer*, **44**, 3483-3489 (2003)
- 2) Y. Zhang, *Polymer*, **45**, 2651-2656 (2004)
- 3) B. Jing et al., Anal. Chem., 80, 8293-8298 (2008)

超好熱性古細菌由来のオリゴ糖転酵素の基質となるオリ ゴ糖の化学構造決定と相互作用解析 〇藤浪大輔,神田大輔 九大・生医研

Structural elucidation of N-linked oligosaccharides of hyperthermophilic archaea and Methyl-TROSY spectroscopy of the archaeal oligosaccharyltransferase

ODaisuke Fujinami, and Daisuke Kohda Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University, Fukuoka, Japan.

Protein N-glycosylation is an important posttranslational modification that occurs in all domains of life. Oligosaccharyltransferase (OST) is a membrane protein that catalyzes the transfer of an oligosaccharide preassembled on a lipid carrier onto Asn residues in proteins. We selected thermostable OST proteins derived from hyperthermophilic archaea for structural studies. The minus side of the archaeal OSTs is a lack of imformation regarding the chemical structures of archaeal N-linked glycans. Here, we report the N-glycopeptide production by *in vitro* enzymatic reaction using crude membrane fractions of archaeal cells, and the chemical structure determination of N-linked glycans. To study the interactions with the glycopeptides with OST enzymes, we prepared an archaeal OST protein labeled with ¹³CH₃ ε-methionine in the presence of DPC-d₃₈, and successfully recorded Methyl-TROSY spectra at 50 °C.

タンパク質の翻訳後修飾のひとつと して、アスパラギン残基への糖鎖付加(N 型糖鎖修飾)がある。付加された糖鎖(N 結合型糖鎖)は生命現象において重要な 役割を果たしている。N型糖鎖修飾は真 核生物だけではなく、真正細菌や古細菌 を含めた、3つの生物ドメインすべてに みられる。各生物ドメインにおけるN結 合型糖鎖の化学構造は、真核生物ではキ トビオース構造に9つのマンノース と3つのグルコースが結合した14



Fig.1 Biosynthesis of N-linked glycans in eukaryotes

糖からなるコア構造を共通にもつのに対し、真正細菌や古細菌の化学構造は種間で共 通性がなく多様である。これらの糖鎖は、真核生物ではER膜上で、古細菌や真正細菌 では細胞膜上で脂質結合型糖鎖(Lipid-Linked Oligosaccharide, LLO)の形で組み 立てられる。分子量6~10万の膜タンパク質である、オリゴ糖転移酵素 (Oligosaccharyltransferase, OST)はLLOをドナー基質として糖鎖部分を丸ごと、 アクセプタータンパク質のアスパラギン残基へ転移する反応を触媒する(Fig1)。

Oligosaccharyltransferase, oligosaccharide, Methyl-TROSY

○ふじなみだいすけ,こうだだいすけ

アスパラギン残基に転移された糖鎖は、多数のプロセシング酵素により、さらに修飾 を受ける。

本研究では、超好熱性古細菌由来の熱安定なOSTを研究対象に選んだ。

現在までにArchaeoglobus fulgidus 由来0STのアポ状態での結晶構造と, 真正細菌Campylobacter lari由来0ST のアクセプターペプチド結合状態で の結晶構造が報告されている。これら の構造比較から膜貫通ドメインに存 在するExternal loop5(EL5)の構造変 化が基質認識のスイッチとなるモデ ルが提唱された(Fig2)。このモデルに おいて、0STへのアクセプターペプチ ドの結合は、EL5の一部をディスオー



Fig. 2 Switching between the two conformational states of EL5 loop is critical for the LLO binding

ダーさせ、LLOのOSTへのアクセシビリティを上げることが推定された。

本研究では、(1)古細菌由来のOSTとLLOとの相互作用解析を視野に入れ、Pyrococcus furiosusおよびA. fulgidus由来のN結合型糖鎖の化学構造の決定を行った。(2)ペプチド結合に伴うEL5の動的な構造変化に基づいたLLOの認識メカニズムをMethyl-TROSY法により明らかにすることを目的とし、そのためのメチオニンメチル基特異的安定同位体標識したA. fulgidus由来OSTタンパク質の調製を行った。

(1) 培養した古細菌からLLOと OSTが含まれる膜画分を調製した。 その膜画分にアクセプターペプ チドを添加することで、in vitro 糖転移反応により糖ペプチドを 調製した。この方法はOSTの基質 となる構造を持つ糖鎖が付加さ れた糖ペプチドを得ることを可 能にする(Fig3)。アクセプターペ プチドには精製のためのビオチ ンタグと検出のための蛍光色素



Fig.3 Reaction scheme of *in vitro* enzymatic production of N-glycopeptides

TAMRAが付加してある。糖ペプチドはビオチンアフィニティークロマトグラフィー、 逆相HPLCにより精製した。精製した糖ペプチドに対して、単糖組成分析、MS解析、NMR 解析を行い、化学構造を決定した。

決定された*P. furiosus* のN結合型糖鎖の化学構造は、キシロースを枝分れ構造に もつものであった。一方、*A. fulgidus*の化学構造はアスパラギンに直接結合してい る単糖にNアセチル基を持たないものであった。両者ともにN結合型糖鎖として今まで に報告されていない新規な化学構造であった。現在は決定した化学構造を基にLLOの 化学合成を行っている。

(2) 大腸菌を発現宿主として { $U^{-2}H$ }; Met-{methy1- $^{13}C^{1}H_{3}$ } A. fulgidus由来OSTを 0.1-0.2 mg/Lの収量で得ることができた。また、界面活性剤をDPC-d₃₈に置換すること で良好な¹H- ^{13}C HMQCスペクトルを得ることができた。今後は基質の滴定に伴う、ケミ カルシフトパータベーションを観測する。

鈴木榮一郎、伊藤萌美、小澤真一、〇水越利巳、近藤高史、宮野博 味の素株式会社イノベーション研究所

"Umami Seasonings : Elm Skin" in the Imperial Court of the Nara Period of Japan as Studied by Nuclear Magnetic Resonance

Ei-ichiro Suzuki, Moemi Ito, Shin-ichi Ozawa, OToshimi Mizukoshi, Takashi Kondo, Hiroshi Miyano

Institute for Innovation, Ajinomoto Co., Inc., Kawasaki, Japan.

In the Man-yo-shu Waka (Japanese poems) Collection encyclopedia compiled by Susumu Nakanishi, elm skin is on the list as one of umami seasonings (in the Imperial Court of the Nara Period of Japan). ¹H-NMR and amino acid analysis showed it contains glutamate and aspartate in the similar ratio as in Laminaria ochotensis (species of kelp; Rishiri kombu).

【はじめに】

NMRの分析科学での活用における他の追随を許さない特質として、非破壊でしか も網羅的且つ選択的に分析できる利点が挙げられる。そのようなNMRの活用を俟つ 一大分野として、古代食や伝統食品の調理プロセスの解明研究が挙げられる。例えば、 中西進編「万葉集事典」の「主要食料」の「調味料」の項には、塩味、酢味、香辛料、 甘味、油の他、「うま味」の区分があり、そこに、堅魚煎汁(かつおいろり)、楡皮 (にれのかわ)が収載されている。そこに引用されている原典: 関根真隆著「奈良朝 食生活の研究」によると、「この楡は、今日のニレ科に類別するアキニレ(Ulmus parvifolia)、ハルニレ(Ulmus davidiana var. japonica)などに相当・・・楡皮を粉 にした具体的な例は『万葉集』に、『・・・あしひきの この片山の 百楡(もむに れ)を 五百枝剥き垂り 天照るや 日の日(け)に干し さひづるや 柄臼に舂(つ) き・・・』(三八八六)と、楡の皮を剥いで日に干し、臼で搗いたのである。」とあ る。また、太田静行著「だし・エキスの知識」(㈱幸書房、1996年初版)によると、 「『紀伊続風土記』に"楡に二種あり。春ニレは、・・・南国に産せず。・・・秋ニ レは漢名樃楡(ロウユ, langyu;本草)という。本邦各郡山野に甚多し。"とある。古代の 楡皮については、楡皮を(朝廷に) 貢納する前記4か国は、すべて本州中部以西であ ったから、これはアキニレであったと推定されている。」と紹介されている。

しかし、その一方で、全日本漬物協同組合連合会の「漬物ポータルサイト」の「楡 木(ニラギ)」の項には、「楡の皮がいかなる理由で使われたか、・・・楡の皮は、 香気はない・・・ただ、これが中国からきた事は確かで、『斉民要術』で楡は漬物に 使っていませんが、楡子醤、楡醸酒があって、それを裏付けています。」とある。

以上のような背景において、楡皮の成分を明らかにすべく、本報告では、まず、ア キニレの皮を少量入手し、NMR解析とアミノ酸分析を行った結果を中心に発表する。

Ulmus parvifolia, Amino Acid Analysis, NMR すずきえいいちろう, いとうもえみ, おざわしんいち, ○みずこしとしみ, こんどう たかし, みやのひろし 【実験方法】

植物愛好家の方のご厚意で入手したアキニレの内皮を熱水抽出し、定法によるアミノ酸分析とNMR測定を行った。

【結果と考察】

アミノ酸分析結果を表1に示す。グルタミン酸、次いでアスパラギン酸が他に比べ て圧倒的に多い。この特徴は、Fig.1の利尻昆布中の遊離アミノ酸分析結果と驚くほ ど良く似ている。但し、含有量は、アキニレ樹皮は圧倒的に少ない。しかし、「漢方 で楡皮というのは幹の内白皮のみを採取し乾かしたもので、この皮を砕いて粉末とし たもの」という定めに比べると、今回は、オレンジ色の外皮部分を相当含んでいたこ とが原因である可能性があるので、ここで、含有量の絶対値を結論付けることは正し くない。逆に、元々の樹液はアミノ酸をあまり含まず、今回の観測したのは、それの 酵母等の微生物による代謝産物である可能性も考えなければならない。

AI / 「「「」」「個人の口行/「/ 」」				
成分名	含有量			
Aspartic acid	1.272			
Threonine	0.096			
Serine	0.183			
Glutamic acid	1.776			
Glutamine	0.181			
Alanine	0.298			
Valine	0.108			
Leucine	0.112			
g-Amino-n-butyric acid	0.631			
Ethanol amine	0.277			
合 計	4.934			

mg/100g)





(単位

次に、得られたプロトンNMRスペクトル(一部拡大)を示す。これを見て分かる ことは、グルタミン酸をはじめとして、各成分が良く分離されて観測されていること である。この結果は、今後、樹液成分や樹皮の乾燥プロセスの各段階、更には、漬物 に利用した場合の成分変化等々をモル濃度に忠実に比例したスペクトルとして情報 が得られることを利用したNMR研究が可能であることを示している。



Fig.2 アキニレ樹皮エキスの¹H-NMRスペクトル(一部拡大)

分子進化工学的手法によるミミズ由来R型レクチン改変 体のシアル酸糖結合メカニズムに関するNMR解析 〇逸見 光¹, 久野 敦², 海野幸子², 平林 淳³ ¹農研機構・食品総合研究所

- 2産総研・糖鎖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 a novel sialic acid-binding lectin mutant from the C-terminal domain of an R-type lectin from earthworm

OHikaru Hemmi¹, Atsushi Kuno², Sachiko Unno², and Jun Hirabayashi³

¹National 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.*

We tailored a novel sialic acid-binding lectin (SRC) from the C-terminal domain of an R-type lectin from earthworm *Lumbricus terrestris* (EW29Ch) by natural evolution-mimicry and the crystal structures of the sugar-free and the sugar-bound SRC have been determined. However, the X-ray crystallographic analysis does not explain the characterization of dynamic structure of the extended loop of subdomain γ . In this study, we performed ¹⁵N relaxation experiments for the backbone of SRC in the lactose-bound state. These results show that the extended loop of subdomain γ is flexible, because the ¹⁵N{¹H}-NOE value of the extended loop region is low. By contrast, that of the corresponding region of EW29Ch is similar to the average ¹⁵N{¹H}-NOE value in the lactose-bound state. Thus, the difference in the backbone dynamics may be associated with the sialic acid-binding mechanism of SRC.

発表者らは、これまで、NMRによるミミズ由来R型レクチンC末端ドメイン (EW29Ch)の糖鎖結合メカニズムについての研究を行い、分子内の2つの糖結合部 位の糖結合活性が、X線結晶構造においてほとんど同じ相互作用を示しているにも関 わらず、α糖結合部位がγ糖結合部位に比べ約100倍高いこと[1]、さらに、遅い分 子内運動による構造の揺らぎが糖結合活性に関係することを明らかにした[2]。一 方、このR型レクチンを分子進化工学的手法により改変させてシアル酸結合性レクチ ン(SRC)を創製し、SRCとラクトース及び6'-シアリルラクトースとの複合体のX 線結晶構造解析を行い、その結果、α結合部位のみ糖と結合し、γ結合部位は結合し ないこと、また、シアリルラクトースのラクトースの部分では、EW29Chのα糖結合 部位の場合とほとんど同じ相互作用を示すとともに、シアル酸の部分とは新たに2つ の水素結合が形成されることを示した。その新たに形成された2つの水素結合のうち の1つは、サブドメインγの糖結合能が消失したのと引き換えに、サブドメインγ中 Lectin, Sialic acid, Natural evolution-mimicry

○へんみひかる、くのあつし、うんのさちこ、ひらばやしじゅん

の1つのループがサブドメインαの糖結合部位付近へシフトすることにより可能に なったシアル酸との水素結合である[3]。しかしながら、その特異的なシアル酸糖鎖 結合能獲得メカニズムについては十分に解明できていない。その解明の一環として、 今回、ラクトース結合状態での SRC について、¹⁵N 緩和測定法による分子内運動につ いての解析、さらに、残余双極子カップリング(RDC)の測定とX線結晶構造との主 鎖の比較を行ったので、それらの結果について報告する。

[結果と考察]

SRC は精製時に溶出液中に糖リガンド (ラクトース) 共存下でない限り不安定で分解 することが判明したことから、ラクトース結合状態で、¹⁵N-、及び¹⁵N-,¹³C-SRC を調 製した。それらラベル体 SRC を用いて、Bruker 社製 Avance600MHz により、15℃及 び 25℃で、¹H-¹⁵N HSQC や一連の多次元多核 NMR スペクトル (CBCA(CO)NH、 HNCACB、HNCO 等)を測定し、ほぼすべての主鎖及び側鎖の NMR シグナルを帰属 することができた。次に、15℃及び 25℃で、¹⁵N 核緩和 (R₁, R₂, 及び{¹H}-¹⁵N NOE) の測定を行い、ラクトース結合状態における分子内運動の解析を行った。その結果、 サブドメインγのループ領域において{¹H}-¹⁵N NOE の値が低く、運動性が著しく高 いことが分かった。一方、EW29Ch のサブドメインγでは、運動性が高い領域が見ら れないことから、分子進化工学的手法による改変により、サブドメインγ中に、運動 性の高いループ構造が形成されたことが判明した。

上記の通り、SRC-ラクトース複合体、及び、SRC-6⁻シアリルラクトース複合体 のX線結晶構造が報告されていることから、ラクトース結合状態におけるSRCの RDCを25℃で測定し、主鎖の構造を比較した。その結果、サブドメインγのループ 領域において特に著しい違いが見られたことから、そのループ領域において、結晶状 態と溶液状態では主鎖の構造が異なることが判明した。

以上の結果から、SRC のサブドメインγのループ領域が、SRC の特異的な糖鎖結合 能獲得メカニズム解明に重要であることが示唆されたことから、今後さらに、NMR により詳細に解析を進める予定である。

References

- 1. Hemmi, H., Kuno, A., Ito, S., Suzuki, R., Hasegawa, T., and Hirabayashi, J. (2009) FEBS J. 276, 2095-2105.
- 2. Hemmi, H., Kuno, A., and Hirabayashi, J. (2013) FEBS J. 280, 70-82.
- 3. Yabe, R., Suzuki, R., Kuno, A., Fujimoto, Z., Jigami, Y., and Hirabayashi, J. (2007) J. Biochem. 141, 389-399.

[謝辞]本研究は主に、科学研究費補助金・基盤研究(C) (24580500)の助成を受けて行われた。

抗ウイルス因子APOBEC3GのDNA認識機構の解明 ~NMR実時間計測法によるアプローチ~

○神庭圭佑^{1, 2}, 永田崇^{1, 2}, 片平正人^{1, 2} ¹京大・エネルギー理工学研究所 ²京大・エネルギー科学研究科

Elucidation of the DNA recognition mechanism of the antiviral factor APOBEC3G as evaluated with the NMR real-time monitoring method

OKeisuke Kamba^{1, 2}, Takashi Nagata^{1, 2}, Masato Katahira^{1, 2}

¹ Institute of Advanced Energy, Kyoto University.

² Graduate School of Energy Science, Kyoto University.

Human APOBEC3G protein (A3G) is an antiviral factor that disrupt HIV gene by introducing a significant level of mutations in the viral genome. A3G inactivates HIV by converting cytidene (C) into uridine (U) within the first DNA strand, which was reverse-transcribed from RNA genome of HIV. Deamination activity of A3G is highly sequence specific, by which three base repeat of cytidine (CCC) within single-stranded DNA (ssNA) is converted into CCU then CUU, sequentially. Recently, it has been suggested that A3G may also targets RNA as well as modified bases (5-methyl cytidine and 5-hydroxymethyl cytidine). In this study, we analyze the deamination activity of A3G against RNA and modified cytidines by our NMR real-time monitoring method. Systematic DNA to RNA replacement of the nucleotide around the target cytidine contributed to the elucidation of the recognition site by A3G.

<背景>

APOBEC3G (A3G)は、HIVのRNAゲノムから逆転写により合成された一本鎖 DNA(ssDNA)中のシチジン(C)をウリジン(U)に改変(脱アミノ化)することにより、HIV の遺伝子を破壊する酵素である。当初A3Gの脱アミノ化反応に関しては、 ssDNA中 のCC配列をCUに変換すること、またCCC配列(ホットスポット)に対してより高い活 性を示すことが知られていた。これまでの研究において我々は、A3GがCCCをCCU、 CUUに順次変換することを、NMR実時間計測法により明らかにした¹。またA3Gの構 造に関して、我々はC端ドメインの単体における溶液構造を決定している¹。しかし、 A3GはDNAの特定の配列に強く結合する訳ではないので、A3G-DNA複合体の構造解 析は困難であり、分子間相互作用に関する知見が少ないのが現状である。近年、 APOBECファミリータンパク質が5-メチルシチジン(^{5m}C)をチミジンに、また5-ヒドロ キシメチルシチジン(^{shm}C)を5-ヒドロキシメチルウリジン(^{shm}U)に脱アミノ化する可 能性が示唆された。^{5m}C及び^{5hm}Cはゲノムサイレンシングの過程において生成される ため、APOBECファミリーのエピジェネティクス制御への関与に関心が集まっている。 他方、RNAもAPOBECファミリーの基質となる可能性が示されている。本研究では、 基質として修飾塩基やRNAを含むssDNAを用い、A3Gの脱アミノ化反応をNMR実時間 計測により追跡した。特に、ssDNAに一箇所ずつRNAを導入した基質を用いることに APOBEC3G. デオキシシチジン脱アミノ化酵素, NMR実時間計測法

○かんばけいすけ, ながたたかし, かたひらまさと

<方法>

修飾塩基またはRNAを含むssDNAを基質としてA3Gの脱アミノ化反応をNMR実時 間計測法により追跡した。A3Gと基質DNAを混合した点を0分としてTOCSYスペクト ルの測定を行い、その後70分おきに測定を繰り返した。シチジン由来シグナルの強度 を時間に対してプロットした。各基質DNAに対するA3Gの脱アミノ化反応について 速度定数を求め、その値の大きさを脱アミノ化活性の指標とした。修飾塩基を含む ssDNAは、配列5'-ATTCC^{5hm}CGATT-3'及び5'-AAAAC^{5hm}CGAAA-3'、5'-AAAAC^{5m}CGAA A-3'を用いた。RNA一置換体のssDNAは、配列5'-AAACC<u>C</u>GAAA-3'を用いた。

<結果・考察>

ホットスポット内で最初に脱アミノ化されるシチジンを修飾塩基に置換した基質 DNA(5'-ATTCC^{5hm}CGATT-3')を用いた実験から、A3Gは^{5hm}Cを脱アミノ化しないことが 明らかとなった。次に、5'-AAAAC^{5hm}CGAAA-3'と5'-AAAAC^{5m}CGAAA-3'を用いた場 合、 $\frac{5hm}{C}$ は脱アミノ化されないが、 $\frac{5m}{C}$ は著しく効率が低いながらも脱アミノ化され ることがわかった。APOBECファミリータンパク質の脱アミノ化活性については、修 飾塩基の5位の修飾基が嵩高くなるほど低くなることが報告されており²、上記の結果 はそれを支持している。本研究では、A3Gがゲノムサイレンシングに関わる修飾塩基 ^{5m}Cは弱いながらも基質とし得るが、^{5hm}Cは基質としないことが示された。

次に、A3Gは一本鎖RNAに対して脱アミノ化活性を持たないことが示された。また、 基質DNA(5'-AAACCCGAAA-3')のホットスポット内で最初に脱アミノ化されるシチ ジンのみをRNAに置換(CCC→CCrC)した基質も脱アミノ化されなかった。これらの結 果は、A3Gによる脱アミノ化反応には、塩基のみならず糖も関与していることを示し ている。さらに、DNA中に一箇所ずつRNAを導入した基質について、A3Gの脱アミノ 化活性を比較した。その結果、ホットスポット内またはその前後の1塩基をRNAに置 換した場合、Cに対するA3Gの脱アミノ化活性がDNA(5'-AAACCCGAAA-3')の場合の 1/5程度にまで低下した。これは、A3Gによる脱アミノ化反応には、Cのみならずその 前後数残基も関与していることを示している。A3Gがホットスポットよりも広い範囲 の配列を認識していること、また塩基のみならず糖も認識していることの知見は、こ れまで報告されていない新しいものである。これらの部位が酵素活性または結合活性 のいずれに効いているのか、もしくは両方に効いているのかを今後明らかにする必要 がある。

<参考文献>

Furukawa *et al.* (2009) *EMBO J.* 28, 440–451
 Nabel *et al.* (2012) *Nat. Chem. Biol.* 8, 751–758

LINE RNA逆転写酵素認識部位の立体構造と機能 ○大津 舞菜¹,野呂瀬 直¹,新井 直¹,寺尾 亮¹,梶川 正樹², 岡田 典弘³,河合 剛太¹ ¹千葉工業大学・工学部,²東京工業大学大学院・生命理工学研究科, ³台湾国立成功大学

Structure and function of reverse transcriptase recognition site of LINE RNA

○Maina Otsu¹, Nao Norose¹, Nao Arai¹, Ryou Terao¹, Masaki Kajikawa², Norihiro Okada³, and Gota Kawai¹

¹ Faculty of Engineering, Chiba Institute of Technology, Japan.

² Graduate School of Bioscience and Biotechnology, Tokyo Institute of Technology, Japan.

³National Cheng Kung University, Taiwan.

In order to elucidate the recognition mechanism of LINE RNA by the reverse transcriptase (RT), we are analyzing the tertiary structures of RT recognition sites of LINE RNAs. We already determined the tertiary structure of the RT recognition site of the LINE RNA from ell (UnaL2-17). In the present study, the RT recognition site of the LINE RNA from zebrafish (ZfL2-1-34: among several LINEs from zebrafish, ZfL2-1 is similar to UnaL2) was subjected to the NMR analysis. ZfL2-1-34 has two stemloops and, by the comparison of NMR spectra, the structures of the stemloop1 and stemloop2 were found to be similar to those of UnaL2-17 and stem2 which is an RNA with the sequence of the stemloop2, respectively. Thus, the present NMR study clearly showed that ZfL2-1-34 forms the predicted secondary structure. Now, we are determining the tertiary structure of ZfL2-1-34.

序論

Long interspersed nuclear element (LINE) は、自身にコードされた逆転写酵素により RNAを介して逆転写することで新たな位置に挿入されることが知られているが (Fig. 1)、逆転写酵素がどの様にしてLINE RNAを認識しているのかは解明されていない. そこで本研究では、LINE RNAの立体構造解析を行うことで逆転写酵素によるRNAの 認識メカニズムを明らかにすることを目的としている.

私達は既にウナギのLINE RNA (UnaL2)の逆転写酵素認識部位のステムループ (UnaL2-17, Fig. 2)の立体構造を決定しており、ウナギのLINE逆転写酵素の認識にお いてG8が重要であり、U10がその構造を支えていることを示した (Baba et al., *RNA* **10**,1380–1387, 2004. Nomura et al., *Nucleic Acids Res.* **34**,5184–5193, 2006.).

今回はウナギの逆転写酵素認識部位と高い類似性を持つゼブラフィッシュのLINE (ZfL2-1) に着目し (Kajikawa et al., *Mol. Biol. Evol.* 22, 673-682, 2004.), ZfL2-1におけ る逆転写酵素の認識メカニズムがUnaL2と同じであるかを調べるため, ZfL2-1のRNA のステムループの構造解析を行った.

LINE, structure, RNA

○おおつまいな,のろせなお,あらいなお,てらおりょう,かじかわまさき, おかだのりひろ,かわいごうた 方法

34残基のZfL2-1 (ZfL2-1-34) および ZfL2-1-34の10番目の残基をAからGに置換 したRNA (ZfL2-1-34-G10) は試験管内転写 法により調製した.必要に応じて標識NTP (大陽日酸社)を用いて標識RNAを調製した.

ZfL2-1-34のステムループ部分のみの RNA (stem2, 14残基) は,化学合成法により 調製した.

結果

まず、14残基のRNAであるstem2のNMR スペクトルを測定してシグナルの連鎖帰属 を行い (Fig. 3),そのNMRデータに基づき stem2の立体構造をcns_solveを用いて計算 したところ、二次構造で予想した通りのス テムループを形成していることが分かった.

次に, ZfL2-1-34のNMRスペクトルを測定 し連鎖帰属を行った. ZfL2-1-34のステムル ープ2の部分の連鎖帰属の結果 (Fig. 4) を stem2の結果と比較することにより,立体構 造が共通であることが分かった. また, ZfL2-1-34のステムループ1の部分を UnaL2-17と比較することにより, ステムル ープ1についても立体構造が共通であるこ とが分かった.

考察

二次構造予測や活性から、ZfL2-1のステ ムループにおいてはUnaL2のGGRNAモチ ーフのNの位置に、もう一つステムループが 挿入されている可能性が示され、NMRスペ クトルの解析から、予想通りの二次構造を 形成していることが確かめられた。

これらのことから, ZfL2-1においても UnaL2 / ZfL2-2と同様な逆転写酵素認識メ カニズムがあることが示唆された.

現在, ZfL2-1-34の立体構造決定を進めて いる. さらに, 逆転写酵素による認識に重 要と考えている10番目の残基をAからGに 置換したRNA (ZfL2-1-34-G10)の立体構造 も決めることで, ZfL2-1とZfL2-2の認識特異 性について議論したいと考えている.







Fig. 2 RNAs used for the NMR analysis



Fig. 3 Sequential assignment of stem2





MAPキナーゼによりリン酸化されるRNA結合タンパク質 Nrd1の構造解析

○小林彩保¹, 佐藤亮介², 藤原俊伸³, 伊藤隆¹, 杉浦麗子⁴, 三島正規¹ ¹首都大・理工, ²微化研・生物基盤, ³名市立大・薬, ⁴近畿大・薬

Structural studies of RNA-binding protein Nrd1, a MAPK target RNA binding protein

 \bigcirc Ayaho Kobayashi¹, Ryosuke Satoh², Toshinobu Fujiwara³, Yutaka Ito¹, Reiko Sugiura⁴ and Masaki Mishima¹

¹Graduate School of Science and Engineering, Tokyo Metropolitan University, Tokyo, Japan ²Laboratory of Basic Biology, Institute of Microbial Chemistry, Tokyo, Japan

³Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University, Nagoya, Japan

⁴School of Pharmaceutical Sciences, Kinki University, Osaka, Japan

Negative regulator of differentiation 1 (Nrd1) is known as a negative regulator of sexual differentiation in fission yeast. Further, Nrd1 binds and stabilizes the Cdc4 mRNA which encodes a myosin II light chain, and thereby suppressing the cytokinesis. Pmk1 (yeast MAPK) phosphorylates Nrd1 resulting in markedly reduced RNA binding activity. The mechanism by which Pmk1 regulates the RNA binding activity of Nrd1 is unknown. In an effort to delineate the relationship between Nrd1 structure and function, we prepared each RRM (RNA recognition motif) of Nrd1. The structure of the second RRM of Nrd1 has been determined. Furthermore, we will discuss usage of split intein and paramagnetic relaxation enhancement for the full-length Nrd1.

序論

分裂酵母におけるRRM型RNA結合タンパク質Nrd1は、これまで減数分裂や性的分化を 抑制する因子として同定されてきた^{(1),(2)}。さらに、Nrd1はアクトミオシン環の収縮に 必須なミオシンIIの必須軽鎖をコードする*cdc4*±のmRNAに結合し安定化することで、 細胞質分裂を制御する。興味深いことに、Nrd1は、成長シグナルを伝達するPmk1 MAP キナーゼによってリン酸化されるとRNA結合能が抑制される⁽³⁾。本研究は、構造解析 によって、MAPキナーゼによる翻訳マシナリーの直接のリン酸化が分子スイッチとし て機能するメカニズムを明らかにすることを目的としている。

実験

各RRMごとに発現系を作製し、その調製を行い、調製可能な試料に対してNMR法によるCdc4 mRNAとの結合実験を行った。さらに、RNAとの弱い結合が確認されたRRM2ドメインの試料を用いて各種多次元NMR測定を行い、溶液状態の立体構造を決定した。

リン酸化,マルチドメインタンパク質,常磁性緩和効果

○こばやしあやほ, さとうりょうすけ, ふじわらとしのぶ, いとうゆたか, すぎうら れいこ, みしままさき

結果・考察

Nrd1の4つのRRMのうち、RRM1, RRM2, RRM4それぞれ単独でのサンプル調製に成功した。また、単独では調製が困難であったRRM3に関してはRRM3-RRM4とタンデムな領域

での調製に成功した。RNAとの結合実験から、RRM2で 弱い、RRM3-RRM4タンデム領域で比較的強い結合が確 認できた。

また、T40、T126の両リン酸化サイトを含むN末端からRRM1までの領域では、ゲルろ過クロマトグラフィーとHSQC測定の結果から、RRM1より前のN末端領域での 二量体の形成が示唆された。両リン酸化サイトを含む この領域においてもRNAとの結合はみられなかった。 RNA結合能を持つのは、Pmk1 MAPキナーゼによりリン 酸化されるT126を持つRRM1ではなく、RRM2や RRM3-RRM4タンデム領域であることが明らかになった。

Nrd1全長の構造解析の第一段階として、現在までに まずRNAとの弱い結合が確認されたRRM2単独での立体 構造を溶液NMR法により決定した⁽⁴⁾(**Fig. 1**)。



Fig. 1 Solution structure of the RRM2 domain.

Backbone superposition of the final 20 simulated annealing structures of RRM2.

MethylTROSY

 CH_3

展望

スプリットインテインを用いたライゲーションによる全長の再構成及び常磁性緩和効果(PRE)を用いたNMR解析を行うことにより、Nrd1全長の構造解析を行う(Fig. 2)。 また、Pmk1 MAPキナーゼとNrd1を共発現し、リン酸化状態のNrd1の調製を行う。最終

的に、Nrd1全長の構造解析に基づくドメイン間の 相互作用の解析、ドメインの配置はリン酸化によ りどのように変化するかという知見を得て、リン 酸化による制御を理解していく。



Fig. 2 Scheme of using inteins and PRE

RRM1 RRM2 RRM3 CH3 Spin label a) PROXYL

RRM1 joint RRM2-RRM3-RRM4 by intein-splicing. NMR experiments using PRE is useful for multi domain proteins or huge complexes.

参考文献

- (1) Tsukahara, K. et al. Mol. Cell. Biol. 18, 4488-98(1998)
- (2) Jeong, H.T. et al. Biosci. Biotechnol. Biochem. 68, 1621-6(2004)
- (3) Satoh, R. et al. Mol. Biol. Cell. 20, 2473-85(2009)
- (4) Kobayashi, A. et al. Biochem. Biophys. Res. Comm. 437, 12-17(2013)

分子混雑環境における蛋白質の NMR 緩和解析

○岡村英保1, 栃尾尚哉2, 杉山修世1.2, 渡部暁1.2,

フェイグ マイケル 1,3, 杉田有治 1,4,5, 木川隆則 1,2,6,7

¹理化学研究所 生命システム研究センター,²理化学研究所 生命分子システム基盤研 究領域,³ミシガン州立大学,⁴理化学研究所 杉田理論分子科学研究室,⁵理化学研究所 計算科学研究機構,⁶理化学研究所 イノベーション推進センター,⁷東京工業大学 大 学院総合理工学研究科

NMR relaxation analysis of the protein under macromolecular crowding environment

⊖Hideyasu Okamura¹, Naoya Tochio², Shusei Sugiyama^{1,2}, Satoru Watanabe^{1,2}, Michael Feig^{1,3}, Yuji Sugita^{1,4,5}, Takanori Kigawa^{1,2,6,7}

¹RIKEN Quantitative Biology Center, ²RIKEN Systems and Structural Biology Center, ³Department of Biochemistry & Molecular Biology and Department of Chemistry, Michigan State University, ⁴RIKEN Theoretical Molecular Science Laboratory, ⁵RIKEN Advanced Institute for Computational Science, ⁶RIKEN Innovation Center, ⁷Graduate School of Science and Engineering, Tokyo Institute of Technology

The interior of biological cells is a crowding environment. Such macromolecular crowding environment is significantly different from the experimental condition performed in diluted solutions. However, macromolecular crowding effect upon the protein dynamics has still not been fully understood. To elucidate the macromolecular crowding effect, we studied the dynamics of villin head peace at $1 \sim 32$ mM concentrations by NMR relaxation analysis.

細胞内では様々な分子が混み合って存在しており、通常の実験環境のような希薄溶液 とは大きく異なっている。特に蛋白質のような柔軟な分子では、その影響を大きく受 けることが予想される。Feig と杉田らは、詳細な分子動力学シミュレーションにより、 分子混雑の度合いに応じて、蛋白質周辺の水分子の水和構造が変化し、これが立体構 造の安定性を変化させる要因となりえることを示した。さらに、分子混雑環境下では、 弱い分子間の相互作用が強まることで、天然状態とは異なる準安定状態が生じえるこ とを示した。そこで、我々は分子混雑状態が蛋白質の立体構造やその動態へどのよう な影響を与えるのかを実証し、定量的に解析することを目的としている。

分子混雜環境,緩和解析,蛋白質動態

○おかむらひでやす,とちおなおや,すぎやましゅうせい,わたなべさとる,ふぇい ぐまいける,すぎたゆうじ,きがわたかのり villin head peace sub domain (36aa) (Fig.1 \pm) を1~32 mM 濃度で調製することで、希薄 溶液環境 (1 mM) から分子混雑環境 (32 mM) への変化のモデルシステムとした。こ れらの ${}^{1}\text{H}{}^{-15}\text{N}$ HSOC スペクトルは、良く似 たスペクトルを示し、基本的な立体構造は 保持していると考えられる。しかしながら、 ある特定の残基のシグナルには濃度依存的 なシフトが見られた(Fig.2 左)。これらのサ ンプルにおける villin 蛋白質の動態を調べ るために、600~900 MHzの複数磁場強度 のNMR 装置を用いて、278~298K の範囲 で主鎖¹⁵N R₁, R₂, NOE 緩和測定および R₂ 緩和分散測定を行った。まず、予想された 通り、濃度依存的に R_1 は小さくなり、 R_2 が大きくなっていくことが確認された。こ れは分子混雑環境に近づくにつれて、溶液の 粘度が上昇し、蛋白質分子の回転相関時間が



大きくなっていることを示している。さらに、取得した *R*₁, *R*₂, NOE データに対して、 model-free 解析を行い、運動パラメーターを抽出することで、定量的な評価を試みた。 一例として、32 mM, 288K 条件下での解析結果を Fig.1 に示す。分子全体の rotational diffusion model (上)と局所的な運動性の指標となるオーダーパラメーター(下)の結果 を表している。回転相関時間は 19.6 ns と 1 mM 条件下の約 7 倍程度の値となった。 現在、他の条件による結果と比較検証することで、分子混雑環境による影響を調べて いる。また、*R*₂緩和分散測定からは、上述の濃度依存的なシフトが見られる残基を中 心に、278K 条件下で特徴的な分散カーブが確認できた(Fig.2)。現在、これらに対して も、解析を進めている。今後、以上のようなデータを検証し、計算科学的手法とも連 携をすることで、分子混雑環境での蛋白質動態について、明らかにしていきたい。



Fig. 2. Changes of ${}^{1}\text{H}{-}{}^{15}\text{N}$ HSQC spectra and R_{2} relaxation dispersion profiles for V10 of 1 to 32 mM villin.

マルチドメインタンパク質Protein kinase Cの構造解析 の試み

○金場哲平¹, 矢巻菜央¹, 秋吉克昂¹, 前崎綾子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奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科

Attempt to determine the structure of a multi-domain protein, protein kinase C

○Teppei Kanaba¹, Nao Yamaki¹, Katsutaka Akiyoshi¹, Ryoko Maesaki², Kensuke Miyazaki¹, Yutaka Ito¹ and Masaki Mishima¹

¹Graduate School of Science and Engineering, Tokyo Metropolitan University ²Graduate School of Biological Science, Nara Institute of Science and Technology

Protein kinase C (PKC) family is a multi-domain protein consists of N-terminal regulatory domains (C1 and C2 domain) and C-terminal kinase domain, and regulates a wide range of biological processes. In cytoplasm, PKC is thought to be autoinhibited by the interaction between regulatory domains and the kinase domain. Recently, the full-length crystal structure of PKC β II was reported⁽¹⁾. However, in this crystal structure, the C1A domain was not observed and the C2 domain was influenced by the crystal packing interaction. Therefore, the domain orientation and the interactions between the domains of PKC are still elusive. In this study, we are trying to determine the structures of full-length PKC proteins, PKC α and PKC θ , and investigate the regulation mechanism using long-range distance information derived from PRE detected by solution hetero-nuclear NMR.

【序論】

Protein kinase C (PKC)ファミリーはシグナル伝達を担う代表的なセリン・スレオニ ンキナーゼであり、細胞増殖や遺伝子発現など多岐に渡る生理機能に関与している。 PKCはN末端の制御ドメイン(C1、C2ドメイン)とC末端のキナーゼドメインから構成 されるマルチドメインタンパク質であり、生化学的解析によりPKCは通常C1、C2ドメ インが、キナーゼドメインをマスクした自己阻害状態にあると考えられていたが、実 際の構造解析に基づく知見は不足していた。最近になってHurleyらによりPKCβII全長 の結晶構造が報告されたが⁽¹⁾、その構造中では、C1Aドメインは観測されておらず、 またC2ドメインはパッキングの影響により不自然に突出していた。よってPKCの活性 制御機構を議論するためには十分な構造とは言い難い。PKCの機能や活性化を理解す るためには、各ドメインが本来の相互作用をしている自己阻害状態の構造学的知見が 必要となる。本研究では、タンパク質ライゲーション反応や常磁性緩和効果(PRE)を 駆使することにより、各ドメインが相互作用した自己阻害状態におけるPKC全体の構 造決定を目的としている。

-PKC, タンパク質ライゲーション, 常磁性緩和効果

○かなばてっぺい,やまきなお,あきよしかつたか,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

【戦略】

代表的なconventional PKC (cPKC)である PKCaと、novel PKC (nPKC)のPKC0を研究 の対象とした。別個に調製したPKCの各ド メインをsplit inteinを用いたタンパク質ラ イゲーション反応⁽²⁾により連結し(Fig.1)、 再構成した全長PKCについてスピンラベル からのPREをメチルTROSYを用いて観測 することによりドメイン間の長距離情報 を取得する。得られた距離情報をもとにド メイン間の配置を再構成することにより 全長PKCの立体構造を決定する。



Fig.1 Strategy of this study Schematic drawing of protein ligation reaction and measurement of PRE

【実験結果】

ライゲーション反応のためにPKCa、PKC0各ドメインの精製、NMR測定を行った。

• PKC α

PKCaのC1Aドメインは脂質と相互作用する ことでPKCの局在を決定する重要なドメイン である。しかし溶解性が著しく低いため大腸 菌発現系を用いた大量発現や立体構造の決定 がなされていなかった。本研究ではアライメ ントに基づいた変異導入や、発現、精製系の 最適化を行う事で構造解析に十分な量のC1A ドメインのサンプル調製に成功し、NMRを用 いて溶液構造を決定した(Fig.2)。C1B、C2ドメ インについても発現、精製を行い、NMR測定、 シグナルの帰属を終了した。またキナーゼド メインについては、大腸菌の発現系では可溶 性画分での発現は確認されなかったが、カイ コ個体を用いて少量であるが発現を確認して いる。



Fig.2 solution structure of PKCα C1A domain

Superposition of the final 20 simulated annealing structures of PKC α C1A domain.

РКС0

PKC0のC2 like、C1A、C1B、キナーゼドメインそれぞれの構造は既に報告されている。本研究においてもC2 like、C1A、C1BドメインとC1A-C1Bタンデム領域の発現、 NMR測定を行った。またキナーゼドメインについては、大腸菌の発現系からのNMR サンプルの取得に成功した。現在は先述したsplit inteinを用いたタンパク質ライゲーション反応を行っている。

[Reference]

(1) Leonard TA., et al, *Cell*, 144, 55-66, 2011
(2) Minato Y., et al, *Journal of Biomolecular NMR*, 53, 191-227, 2012

Interface Dynamics Studies in Protein-Ligand Complexes with the Aid of SAIL and High-Pressure NMR Techniques

○楊淳竣¹, 武田光広¹, 宮ノ入洋平¹, 寺内勉², 甲斐荘正恒^{1,3} ¹名大院・理, ²SAILテクノロジーズ (株), ³首都大院・理工, ○Chun-Jiun Yang¹, Mitsuhiro Takeda¹, Yohei Miyanoiri¹, Tsutomu Terauchi², and Masatsune Kainosho^{1,3}

¹Structural Biology Research Center, Graduate School of Science, Nagoya University; ²SAIL Technologies Inc.; ³Graduate School of Science and Engineering, Tokyo Metropolitan University

Abstract

NMR spectroscopy is the standard technique to obtain structural and dynamic information for protein-ligand interactions at atomic resolution. However, its applications to the rings of aromatic amino acids, which frequently exist in the ligand binding pockets, suffer from the exceedingly complicated NMR spectra, especially for residues with unfavorable ring flipping rates. We successfully measured the accurate ring flipping rates for the interfacial aromatic residues of FKBP12 bound to ligands, by simplifying the aromatic ring spin systems by the SAIL method. Here we report, for the first time, the activation volumes for the ring flipping motions, obtained by the concomitant use of SAIL and high-pressure NMR, which will provide deeper insights into the interfacial dynamics of the FKBP12-ligand complexes.

Non-covalent interactions involving aromatic rings often play important roles in protein-ligand recognition processes, and therefore yield important knowledge for structure-based drug design approaches. However, most of the structural information used in the current protocols is almost exclusively from X-ray crystal data, which contain little information about the dynamic aspects of the protein-ligand interfaces. Although NMR provides unique opportunities for studying protein dynamics encompassing broad time and amplitude ranges, applications of the NMR method are often hampered in practice by excessively complicated spectra, when using conventional, ¹³C-uniformly labeled samples. This is especially problematic with aromatic residues, as their aromatic ring NMR spectra are usually quite complicated due to tight spin coupling interactions. The situations are sometimes even worse for Phe and Tyr residues, when their rings flip at rates comparable or slower to the chemical shift differences between the symmetry-related spin pairs, namely δ_1/δ_2 and ϵ_1/ϵ_2 .

However, detailed analyses of such flipping rate-dependent aromatic ring spectra, if possible, would provide an unprecedented opportunity to estimate the effects of ligand binding on the ring flipping rates. Note that the aromatic rings of Tyr and Phe undergo degenerated flip-flop transitions about the C_{β} - C_{γ} bond. Nevertheless, their structures, including the neighboring residues, are exactly the same before and after the ring flipping event, and thus the flip-flop transitions can only be manifested by time-dependent NMR spectroscopy. In the present study, amino acids bearing alternative [$^{2}H^{12}C$, $^{13}C^{1}H$]-labeling

Keywords: SAIL method, High-pressure NMR, Protein-ligand interaction



Fig. 2 Chemical structures of ligands. FKBP12 binding region were depicted by boldface.

patterns (Fig. 1) were used to simplify the NMR spectra of FKBP12, which strongly binds to two macrolide immunosuppressive drugs, rapamycin and FK506 (Fig. 2). By virtue of the drastic spectral simplification obtained with FKBP12 labeled with the SAIL amino acids, we successfully measured the accurate flipping rates of the Tyr residues located in the ligand binding pocket, which became slow enough in the ligand bound states to give two discrete signals for δ_1/δ_2 , and for ϵ_1/ϵ_2 (Fig. 3). The flipping rates for the FKBP12-ligand complexes were also measured under various hydrostatic pressures, using high-pressure NMR equipment (Daedalus Innovations), allowing us to determine the activation volumes for the flipping motions of the complexes.



Fig. 3 Selected aromatic region of ¹H-¹³C HSQC spectra acquired with δ -SAIL (A) and ϵ -SAIL (B) Tyr labeled FKBP12 associated with FK506 at 30°C.

The information obtained for the FKBP12-ligand complexes revealed that the interfacial dynamics are substantially different, even for these structurally related ligands. According to the crystal data of these complexes, the ligand binding surfaces in the static structures are almost identical. Although we do not fully understand the different dynamics of the FKBP12-ligand interfaces at this moment, the dynamic aspects of ligand recognition should be considered as additional information for structure-based drug design.

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. Wagner, G. (1980) FEBS Lett, 112, 280-284.

ミオグロビンにおけるヘムと軸配位子ヒスチジンの 電子的相互作用を介した外部配位子識別機構の解明 ○西村龍¹、柴田友和¹、鈴木秋弘²、根矢三郎³、山本泰彦¹ ¹筑波大院・数理物質 ²長岡高専・物質工 ³千葉大院・薬

Elucidation of Mechanism Responsible for Exogenous Ligand Discrimination through Electronic Interaction between Heme and Proximal Histidine Residue in Myoglobin

ORyu Nishimura¹, Tomokazu Shibata¹, Akihiro Suzuki², Saburo Neya³, and Yasuhiko Yamamoto¹ Department of Chemistry, University of Tsukuba, Tsukuba, Japan Departmen of Materials Engineering, Nagaoka National College of Technology, Nagaoka, Japan

³*Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba University, Chiba, Japan*

We have found that functional properties of myoglobin (Mb) are regulated by the intrinsic heme Fe reactivity through the heme electronic structure. In this study, we extended our efforts to further characterize the electronic control of the intrinsic heme Fe reactivity through interaction among the heme and Fe-bound ligands in order to gain deeper understanding of functional regulation of the protein, particularly mechanism of discrimination between oxygen (O₂) and carbon monoxide (CO). We characterized electronic structures of functionally relevant histidine residues, i.e., His64 and His93, of O₂- and CO-bound protein. We found that the nature of Fe-O₂ and Fe-CO bonds is manifested in shifts of the side chain imidazole ¹⁵N signals.

序論 私共はこれまでに、酸素(O₂)貯蔵 タンパク質ミオグロビン(Mb)のO₂親和 性およびO₂と一酸化炭素(CO)の識別が へムの電子構造により調節されること を明らかにしている(T.Shibata *et al.*, *JACS*(2010))。本研究では、MbがO₂とCO を識別する機構におけるへムと軸配位 子ヒスチジン(His93)の電子的相互作用 の寄与を解明するために、電子構造を系 統的に変化させた一連の化学修飾へム (Fig. 1)およびO₂結合状態の安定性が高 い Mb 変 異 体 で ある L29F 変 異 体 (T.E.Carver *et al., JBC*(1992))を調製し、 O₂ と CO 結 合 状 態 の L29F 変 異 体



Fig. 1 Structures of the heme cofactors used in the study (left) and the heme coordination structure in Mb(O₂) (right). Protoheme ($R_2 = R_7 = CH_3$, $R_3 = R_8 = CH=CH_2$), mesoheme ($R_2 = R_7 = CH_3$, $R_3 = R_8 = C_2H_3$), 3,8-DMD ($R_2 = R_3 = R_7 = R_8 = CH_3$), 7-PF ($R_2 = CH_3$, $R_3 = R_8 = C_2H_5$, $R_7 = CF_3$), and 2,8-DPF ($R_2 = R_8 = CF_3$, $R_3 = R_7 = CH_3$).

(L29F(O₂)、L29F(CO))におけるHis93側鎖イミダゾール環の電子構造を解析した。 ミオグロビン、ヘム電子構造、分子認識機構

○にしむら りゅう,しばた ともかず,すずき あきひろ,ねや さぶろう, やまもと やすひこ



Connectivities used for signal assignmentnts are given with the spectrum.

結果・考察 L29F(O₂)とL29F(CO) の¹H NMRスペ クトルで、ヘムのポルフィリンの環電流効果によ り高磁場領域に分離して観測されるVal68 C₇₁H₃の シグナルは、対応する状態の野生型Mbのシグナル とほぼ同一のシフトで観測されたことから (Table 1)、ヘムに対するVal68の配向、したがって、ヘム 近傍の構造は、L29F置換の影響をほとんど受けない ことが示唆された。L29F(O₂)の¹H-¹⁵N HMQCスペク トル(Fig. 2)では、¹J_{NH}によるHis93 N₈Hの相関に加え て、²J_{N(C)H}によるHis93のN₆(C₆)HおよびN₆(C₆)Hの相 関、さらに、ヘム鉄に結合したO₂と水素結合を形 成するHis64 N₆Hの相関が観測された(J.A.Lukin *et al., PNAS* (2000))。一方、L29F(CO)では、速い水素 Table 1. Shifts (ppm) of some 1H and ^{15}N signals of L29F(O2) and L29F(CO) at pH7.4 and 25 °C.

	L29F(O ₂)	L29F(CO)
¹ H NMR		
Val68 C _{v1} H ₃	-2.91	-2.46
	(-2.86) ^a	(-2.41) ^a
His64 N _ε H	5.91	n.d. ^b
His93 N _ō H	10.65	9.53
C₅H	n.d. ^b	1.29
C _ɛ H	3.01	1.85
¹⁵ N NMR		
His64 Ν _ε	161.4	n.d. ^b
His93 N _o	172.4	166.5
Ν _ε	202.7	214.1

^a Observed for the wild-type Mb (R.G.Shulman *et al., JMB* (1970)). ^b Not determined.

交換反応のためHis64 NeHの相関は観測されなかった(スペクトル未掲載)。

His93 N_δ、N_εそれぞれのシフト値がL29F(O₂)とL29F(CO)で異なることは(Table 1)、 Fe-O₂とFe-COの結合様式の相違を反映していると考えられる。Fe-O₂結合はO₂からFe へのoG供与で形成するのに対し、Fe-CO結合ではFeからCOへのπ逆供与が支配的である。 後者では、π逆供与によりFeのd₂2軌道の電子密度は低下するため、His93 N_εの孤立電 子対(lp)がo供与でFeに結合するには好都合であると言える。イミダゾール環の窒素原 子2つのシグナルで、lpがsp²混成軌道を占める方のシフト値は約250 ppm、一方、lpが π 共役芳香環電子系に組込まれている方は約160 ppmであることが知られている。 したがって、His93 N_εのシフト値が L29F(O₂)<L29F(CO) であるのは、後者における N_εのlpが前者よりも安定化されていることに起因すると説明することができる。また、 同様に、His93 N_δのシフト値がL29F(CO)<L29F(O₂)であるのは、前者におけるN_δHの lpが後者よりも安定化されることに起因すると考えることができる。ただし、この解 釈を実証するためには、ヘムのポルフィリンの環電流効果やヘム鉄との配位結合がこ れらのシグナルのシフト値に及ぼす影響を解明することが必要である。ヘムの電子構 造の変化がHis93 N_δ、N_εのシフト値に及ぼす影響を解析すれば、ヘムとHis93の電子的 相互作用に関する新たな知見を得ることができると考えている。

ヒト細胞内におけるユビキチンタンパク質の構造安定性

解析〇猪股晃介¹, 杤尾豪人², 白川昌宏² ¹理研・生命システム研究センター ²京大・工学研究科・分子工学専攻

Ubiquitin folding stability in human cells

○Kohsuke Inomata¹, Hidehito Tochio², and Masahiro Shirakawa² ¹Quantitative Biology Center (QBiC), RIKEN, Osaka, Japan. ²Department of Molecular Engineering, Kyoto University, Kyoto, Japan.

It was a general belief that the folding of proteins under the highly crowded cellular environment was more stable than *in vitro*. However our previous results and the several resent studies by other groups indicated that there was the case that the protein folding stability under the crowded environment is lower than *in vitro*. So we are trying to clarify its mechanism using NMR hydrogen exchange experiment in cells based on the example that the folding stability of wild-type ubiquitin and its mutant in human cells is lower than *in vitro*. In this presentation, we want to discuss about the possible mechanisms from our results.

タンパク質の立体構造やダイナミクスは外部環境(pH,温度,密度等)に影響を受けて変化しうる。これを念頭に、タンパク質の多くが実際に機能する細胞内の環境を 考えてみると、多種多様な分子が高密度に分布し、細胞骨格や細胞小器官等によって 内部が区分けされて混み合っている。更に、外聞刺激等により細胞内部の環境が変化 するような非平衡性も有する。つまり、タンパク質の機能と密接に関与した立体構造 やダイナミクスは、それらが実際に機能する"その場"もしくはそれを模した環境下 で計測した知見をもとに理解する事が望ましいと言える。このような要請から発表者 らは、細胞内のタンパク質の挙動を原子レベルで追跡する事のできるin-cell NMR法 の開発・応用を進めている。

発表者らは上記in-cell NMR法を用いた成果の中で、NMR水素交換実験(Fig. 1)に よる構造安定性解析において特に注目すべき知見を得ている。それは細胞内における タンパク質の構造安定性が、試験管内の均一溶液中に比べて大きく低下するというも のである。これは、細胞内のような高度に分子が混み合った環境ではタンパク質の構

造はより安定化する、という定説を覆しうる結果である。ただし、現状ではそのメカニズムの詳細等不明な点が多い。



Fig. 1 Hydrogen exchange experiment

Hydrogen exchange experiment, Folding stability, Cellular environment

○いのまたこうすけ、とちおひでひと、しらかわまさひろ
そこで本発表では、ユビキチンタンパク質をモデル試料として選び、上記メカニズムを解明すべく、以下の各種条件下で水素交換実験を行った。まず、細胞環境のモデル系として最もよく研究されている分子混み合い効果(macromolecular crowding effect)の寄与を検証すべく、200g/LのBSAタンパク質中におけるユビキチンの水素交換実験を行った(Fig. 2)。その結果、ヒト細胞内における現象を再現できず、むしろ均一溶液中よりも構造が安定化するという以前までの定説を支持する事がわかった。また希釈されるものの、細胞内の構成要素を可能な限り保持するような細胞抽出液との比較においても均一溶液中と大差ないという結果を得た(Fig. 2)。本発表ではさらにこれらの結果をもとに、①ユビキチン変異体や化学修飾体による細胞内水素交換実験、②細胞骨格ダイナミクスに寄与する各種阻害剤の投与の影響、③異なる細胞株による比較、④上記3点をふまえた再構成環境における再現実験の検討の成果を示す。これらを通して、ユビキチンタンパク質や有の影響とタンパク質一般に与える影響を両面から捉え、細胞環境下でタンパク質の構造安定性がどのように影響を受けるのか総合的に議論する。



Fig. 2 Hydrogen exchange experiment of ubiquitin in the reconstituted crowded solution.

P26 UBIQUITIN RECOGNITION IN SELECTIVE AUTOPHAGY

<u>Erik Walinda¹</u>, Daichi Morimoto¹, Tsuyoshi Konoma², Kenji Sugase², Hidehito Tochio¹ & Masahiro Shirakawa¹

¹ Kyoto University Graduate School of Engineering, Japan

² Suntory Foundation for the Life Sciences, Osaka, Japan

Eukaryotes degrade proteins via one of two major pathways – the ubiquitin-proteasome system and autophagy. While the proteasome system is limited to degradation of single-domain proteins that fit into the narrow (~ 13 Å) opening of the proteasome barrel, autophagy is thought be a bulk degradation system that is capable of recycling entire organelles, protein oligomers and large protein aggregates which may be toxic to the cell.

Autophagy ("*self-eating*") is a conserved pathway, in which cytoplasm and organelles are engulfed by vesicles called autophagosomes. By fusion of these vesicles with lysosomes, cellular constituents and protein aggregates can be degraded or, when nutrients are scarce, subjected to turnover. The vital importance of autophagy is reflected by studies in mice that develop neurodegeneration if autophagy is inhibited, presumably due to irreversible accumulation of protein aggregates in neurons.

Long believed to be a somewhat random degradation system, recent evidence suggests that specificity in autophagy. This "selective autophagy" is thought to be mediated by autophagy receptor proteins containing ubiquitin-associated (UBA) domains that recognize ubiquitin-marked substrates (Kraft et al., 2010) and deliver them to autophagosomes for degradation.

While UBA domains show high conservation in both – amino-acid sequence and tertiary structure, their affinity for various types of ubiquitin are completely different. We are studying structure and dynamics of the autophagy receptor proteins p62 and NBR1 by NMR to understand their specificity for ubiquitin and its respective recognition mechanism.

Kraft, C., Peter, M., and Hofmann, K. (2010). Selective autophagy: ubiquitin-mediated recognition and beyond. Nature cell biology *12*, 836-841.

NMR analysis of intramolecular allostery in the PLC-δ1 PH domain

OMichikazu Tanio¹, and Katsuyuki Nishimura¹ Institute for Molecular Science

Protein activities are generally regulated by intramolecular allosteric interactions, by which an event, such as ligand binding or mutation, at a local site modifies conformations and/or dynamics at spatially distal sites in a protein molecule. Intramolecular allosteric interactions in the phospholipase C (PLC)- δ 1 pleckstrin homology (PH) domain were investigated by solution NMR spectroscopy for selectively [α -¹⁵N]Lys-labeled proteins. NMR analyses demonstrated that the ligand-binding activity of the PLC- δ 1 PH domain is allosterically regulated by interaction networks among the α 2-helix, the β 1- β 2 loop, and the β 3- β 4 loop mediated by the side chains of Lys-30, Lys-32, Lys-57, and Phe-87.

Introduction

Ligand binding to a protein usually induces changes in the protein conformation and dynamics, which also occur at distal sites away from the ligand-binding site in the protein molecule, causing allosteric regulation of protein functions. Although elucidation of allosteric mechanisms is expected to be useful for regulations of protein functions and for allosteric drug designs, the detailed molecular mechanisms remain unclear.

Our previous study suggested the existence of intramolecular allosteric interactions in the PLC- δ 1 PH domain [1]. The protein binds to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) in the cell membrane, and inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃), a product of PIP₂ hydrolysis by PLC- δ 1. Mutational analyses of the PLC- δ 1 PH domain demonstrated that conformational disruption of the characteristic short α -helix (α 2) from residues 82 to 87 results in reduced affinity for IP₃ and in thermal instability, and that the phenyl ring of Phe-87 contributes to effective stabilization of the IP₃-binding state [1]. However, the α 2-helix does not make direct contact with IP₃ in the crystal structure of the PLC- δ 1 PH domain complexed with IP₃, and our findings therefore indicate that the α 2-helix indirectly interacts with the IP₃-binding site through intramolecular interactions. In this study, we investigated the detailed molecular mechanisms of intramolecular allosteric interactions among spatially separated sites in the PLC- δ 1 PH domain by NMR [2].

Materials & Methods

The wild-type and mutant proteins of the selectively $[\alpha^{-15}N]$ Lys-labeled PLC- δ 1 PH domain were prepared by *E. coli* BL21(DE3) [1,2]. All NMR experiments were carried out using a JEOL JNM ECA600 spectrometer equipped with an HCN triple resonance inverse probe. Two-dimensional ¹H-¹⁵N HSQC NMR spectra were acquired at 20°C with resonance frequencies of 600.2 and 60.8 MHz for ¹H and ¹⁵N nuclei, respectively [2].

Intramolecular allostery, Ligand binding, Mutation

○たにおみちかず, にしむらかつゆき

Results & Discussion

The ¹H-¹⁵N HSQC NMR study of the selectively $[\alpha$ -¹⁵N]Lys-labeled wild-type PLC- δ 1 PH domain revealed that IP₃ binding affects the local environments at all lysine residues. In addition, the mutational analyses indicated that an interaction network mainly consisting of the side chains of Lys-30, Lys-32, and Lys-43, but not Lys-57 or Lys-86, exists in the ligand-free protein (Fig. 1).

The IP₃ titration experiment of the wild-type protein also demonstrated that in the ligand-free state, the α 2-helix (Lys-86) undergoes intermediate chemical exchange between at least two conformations with different population, and that IP₃ binding stabilizes one of the two conformations.



Fig. 1. Graphical summary of the mutational effects on the PLC- δ 1 PH domain. K30, K32 and K57 directly interact with IP₃.

Interestingly, such stabilization of the α 2-helix induced by IP₃ binding was also observed in F87Y, but not in K57A or F87A (Fig. 2), indicating that the side chains of Lys-57 and Phe-87 contribute to stabilization of the IP₃-binding state, although Lys-57 does not contribute to the interaction network in the ligand-free state. Our results therefore strongly suggested that the pre-existing interaction network, mainly consisting of Lys-30, Lys-32 (β 1- β 2 loop) and Lys-43, in the ligand-free state is modified by IP₃ binding, resulting in formation of a new interaction network, in which Lys-57 (β 3- β 4 loop) and Phe-87 (α 2-helix) contribute to stabilization of IP₃-binding state [2].



Fig. 2. ¹⁵N projections around the Lys-86 signal of the ¹H-¹⁵N HSQC NMR spectra of $[\alpha$ -¹⁵N]labeled K57A (left), F87A (middle) and F87Y (right) in the absence (top) and presence of IP₃ (bottom) as compared with those of the wild-type protein (gray). HLW means half line width.

References

Tanio, M., and Nishimura, K., *Anal. Biochem.* 431, 106–114 (2012).
 Tanio, M., and Nishimura, K., *Biochim. Biophys. Acta* 1834, 1034–1043 (2013).

NMRによるp47^{phox}PXドメインとホスファチジルイノ シトールの相互作用の解析

○小椋賢治¹,小橋川敬博¹,斎尾智英¹,横川真梨子¹,久米田博之¹, 天野伸治郎¹,吉田直樹¹,住本英樹²,稲垣冬彦¹ ¹北大・先端生命,²九大・医

NMR analysis of Interaction between p47^{phox} PX domain and phosphatidylinositol

Kenji Ogura¹, Yoshihiro Kobashigawa¹, Tomohide Saio¹, Mariko Yokogawa¹, Hiroyuki Kumeta¹, Shinjiro Amano¹, Naoki Yoshida¹, Hideki Sumimoto² and Fuyuhiko Inagaki¹ ¹Faculty of Advanced Life Science, Hokkaido University, Sapporo, Japan. ²Faculty of Medical Sciences, Kyushu University, Fukuoka, Japan.

We analyzed the interaction between $p47^{phox}PX$ domain and phosphatidylinositol (3,4)-bisphosphate using solution NMR spectroscopy. Using mutagenesis and chemical shift perturbation method, we determined the PI(3,4)P₂-binding site on the $p47^{phox}PX$ domain was not R43/R90 site but K55/R70 site. Residue-specific change of signal intensities of $p47^{phox}PX$ domain by titration of a lipid bilayer system nanodisc suggested that firstly $p47^{phox}PX$ domain weakly binds to cell membrane using the membrane-insertion loop region, and subsequently recognizes PI(3,4)P₂ embedded in the cell membrane using the K55/R70 site. We constructed the molecular complex model of $p47^{phox}PX$ domain and the inositol phosphate group of PI(3,4)P₂ using a paramagnetic lanthanide probe fixed on the $p47^{phox}PX$ domain.

NADPHオキシダーゼを制御する細胞質タンパク質p47^{phox}はPX-SH3-SH3-AIRのド メイン構成からなるマルチドメインタンパク質である。NADPHオキシダーゼの活性 化状態において、p47^{phox}PXドメインは細胞膜上のホスファチジルイノシトール二リ ン酸 PI(3,4)P₂と結合している。本研究の目的は、NMR法を用いてp47^{phox}PXドメイン とPI(3,4)P₂および細胞膜の相互作用機構を解析することである。

1. PI(3,4)P,結合部位の同定

NMR化学シフト摂動法を用いて、 $p47^{phox}PX$ ドメインの $PI(3,4)P_2$ 結合部位の同定を おこなった.水に難溶性である $PI(3,4)P_2$ の代替として $Ins(1,3,4)P_3$ を滴定し化学シフ ト変化を追跡したところ、K55Q/R70Q変異体では化学シフト変化がほとんど観測さ

PXドメイン、常磁性プローブ、ホスファチジルイノシトール

○おぐらけんじ,こばしがわよしひろ,さいおともひで,よこがわまりこ,くめたひろゆき,あまのしんじろう,よしだなおき,すみもとひでき,いながきふゆひこ

れなかったのに対して,R43Q/R90A変異体では野生型と同様の化学シフト変化が観 測された.このことは,K55/R70サイトがPI(3,4)P₂結合部位であることを示している.

2. ナノディスクによるp47^{phox}PXドメインと細胞膜の相互作用解析

再構成高密度リポタンパク質 (rHDL) の脂質二重膜中にPI(3,4)P₂を組み込んだナ ノデバイス (PI-Nanodisc) を作成した. p47^{phos}PXドメインにPI-NanodiscおよびPI を含まないBlank-Nanodiscを加えてNMRスペクトルを測定し, Nanodisc添加前後で 各残基の信号強度を比較した PI-Nanodiscでは残基番号73~88の領域.

Blank-Nanodiscでは残基番号78~88の領域において信号強度が減弱した.残基番号 78~88の領域は細胞膜挿入ループと呼ばれる部位であり,残基番号73~77の領域は PI(3,4)P₂結合部位に近接している.この結果は、p47^{phox}PXドメインは、初めに細胞 膜挿入ループを使って細胞膜に弱く結合したのち(テザリング),細胞膜上のPI(3,4)P₂ に強く結合する(アンカリング),という二段階の相互作用機構を持っていることを 示唆する.

3. 常磁性ランタニドプローブ法による複合体モデルの構築

p47^{phos}PXドメインにランタニド結合タグを付加した試料を調製した. 常磁性ラン タニドが誘起するPXドメインの偽接触シフト (PCS) から, 磁化率異方性テンソルを 決定した. さらに, Ins(1,3,4)P₃がPXドメインに結合したときのPCSを測定した. Ins(1,3,4)P₃はPXドメインに対してK_d = 0.5mMと比較的弱い相互作用を示すが, Ins(1,3,4)P₃のPCSと磁化率異方性テンソルを用いてp47^{phos}PXドメイン-Ins(1,3,4)P₃ 複合体立体構造モデルを構築することができた.

遠隔アミノ酸残基の置換による好熱性水素細菌 シトクロム*c*552の軸配位子メチオニン側鎖硫黄原子の 不斉反転と機能への影響 柴田友和¹,太虎林^{1,*},利根川健¹,逸見光²,小林長夫³, 〇山本泰彦¹ ¹筑波大院・数物 ²農研機構・食総研 ³東北大院・理 *現所属:奈良先端大・物質創成

Inversion of the Stereochemistry around the Sulfur Atom of the Axial Methionine Side Chain through Replacement of a Remote Amino Acid Residue in *Hydrogenobacter thermophilus* Cytochrome c_{552} and Its Functional Consequences

Tomokazu Shibata¹, Hulin Tai^{1,*}, Ken Tonegawa¹, Hikaru Hemmi², Nagao Kobayashi³, and \bigcirc Yasuhiko Yamamoto¹

¹Department of Chemistry, University of Tsukuba, Tsukuba, Japan.

²National Food Research Institute, NARO, Tsukuba, Japan.

³Department of Chemistry, Graduate School of Science, Tohoku University, Sendai, Japan. *Present address: Graduate School of Materials Science, NAIST, Ikoma, Japan.

In cytochrome *c*, the coordination of the axial Met S_{δ} atom to the heme Fe atom occurs in one of two distinctly different stereochemical manners, i.e., *R* and *S* configurations, depending upon which of the two lone pairs of the S_{δ} atom is involved in the bond, and hence the Fe-coordinated S_{δ} atom becomes a chiral center. We demonstrated that the A73V mutation in *Hydrogenobacter thermophilus* cytochrome c_{552} forces the inversion of the stereochemistry around the S_{δ} atom from the *R* configuration to the *S* one. Functional comparison between the wild-type and the A73V mutant proteins possessing the *R* and *S* configurations, respectively, demonstrated that the redox potential of the mutant protein exhibited a positive shift of ~20 mV relative to that of the wild-type one, i.e., 245 mV, in an entropic manner.

好熱性水素細菌(*Hydrogenobacter thermophiles*) シトクロム c_{552} (HT(Fig. 1))のタンパク質部分はア ミノ酸 80 残 基 から成っており、ヘムは Lys48-The65により構成される Ω -loopと呼ばれる 長いループに覆われている。 Ω -loopの両末端には α -helixが存在し、これら2つの α -helix間の相互作 用は Ω -loopの立体構造の安定化に寄与している。 私共は、HTでは*R*配向である軸配位子Met59の側



Fig. 1. Structure of *H. thermophilus* cytochrome c_{552} (PDB:1YNR)(left). Axial Met59 is shown as a ball-and-stick model, and the mutation site (Ala73) by a space-filling model. Structure of heme active site shown on the right.

鎖のコンフォメーションが、α-helix間の接触界面に存在するAla73をValに置換することにより、S配向に変わることを明らかにした(Tai *et al.*, *Biochemistry*, **52**,4800(2013))。

シトクロム c, 常磁性シフト, ヘム配位構造

しばた ともかず,たい こりん,とねがわ けん,へんみ ひかる,こばやし ながお, ○やまもと やすひこ シトクロムcでは、ヘム鉄に軸配位子としてMetが結合 する場合、硫黄原子(S₆)の2組の非共有電子対のうちい ずれか一方がヘム鉄に供与されるため、S₆は不斉原子 となる。したがって、軸配位子Met側鎖は、RまたはS配向のいずれかのコンフォメーションとして存在する (Fig. 2(bottom))。本研究は、シトクロムcの軸配位子 Metの配位構造を決定する構造化学的因子の解明につ ながると共に、S₈の不斉反転がシトクロムcの機能に与 える影響を明らかすることに役立つと考えられる。

A73V置換はタンパク質全体のフォールディングに あまり大きな影響を与えないことが、¹H-¹⁵N HSQCの 比較より示唆された(Fig. 3)。一方、Met59プロトンと へムのmesoプロトンのNOE相関の観測から、HTでは、 X線結晶構造(Travaglini-Allocatelli *et al.*, *JBC*, **280**, 25729(2005))から予想される通り、Met59 C_eH₃は5位と 20位のmesoと強いNOEを生じるのに対し、A73V変異



Fig. 2. NOESY connectivities between axial Met59 $C_{e}H_{3}$ and heme meso proton signals of the wild-type HT (left) and A73V mutant (right) at pH 7.0 and 25 °C (top). Slice spectrum at axial Met59 $C_{e}H_{3}$ proton signal for each protein is also shown. *R* (left) and *S* (right) forms of the axial Met59 side-chain, with respect to heme, are illustrated at the bottom.

体ではMet59 C_eH₃は15位と20位のmesoと強いNOEが生じた(Fig. 2(top))。この結果から、A73V変異体のMet59側鎖はS配向であることが明らかになった。さらに、種々のアミノ酸置換を検討した結果、Ile46、Met59、Gln62およびVal73の側鎖間のパッキングが、A73V置換によるMet59 S₈の不斉反転を引き起こしていることが明らかになった。

また、A73V変異体の酸化還元電位(E_m)は265 mVであり、HTよりも20 mV高いこと、 そしてこの E_m の上昇は ΔS の寄与に依ることも示された。A73V変異体では、上述の通 り、Ile46、Met59、Gln62、Val73のパッキングが密であるため、 Ω -loopの内部運動性 が抑制されると考えられ、このことが、 ΔS の寄与を通した E_m の上昇に寄与していると 考えられる。一方、タンパク質の安定性の観点からは、内部運動性の抑制は不利であ ると言え、実際、A73V変異体の変性温度はHTよりも、ヘム鉄がFe³⁺、Fe²⁺の状態で、 それぞれ7.5、2.9 °C低いことが確認された。



Fig. 3. Plots of the shifts (ppm) for the main chain amide ¹H and ¹⁵N NMR signals of the A73V mutant in 90% H₂O/10% ²H₂O, pH 6.0, at 25 °C relative to those of the corresponding ones of the wild-type HT ($\Delta \delta_{A73V+HT}$) against the amino acid residue number. Effects of the A73V mutation on the main chain amide ¹H and ¹⁵N signals are observed on the residues at positions 39-77.

高圧力NMR法によるユビキチンの準安定状態N₂の立体構造 解析:Q41N変異体、2500気圧 北沢 創一郎¹, 亀田 倫史², 矢木-内海 真穂^{3,4}, Nicola Baxter⁵, 加藤 晃一^{3,4}, Mike P. Williamson⁵, 〇北原 亮¹ ¹立命大・薬, ²産総研・CBRC, ³岡崎統合バイオ, ⁴名市大・薬, ⁵シェ フィールド大・分生

High Pressure NMR Reveals Solution Structure of Alternatively Folded State of Ubiquitin: Q41N Variant at 2500 bar

Soichiro KItazawa¹, Tomoshi Kameda², Maho Yagi-Utsumi^{3,4}, Nicola Baxter⁵, Koichi Kato^{3,4}, Mike P. Williamson⁵, ORyo Kitahara¹

¹College of Pharmaceutical Sciences, Ritsumeikan University, Kusatsu, Japan

²Computational Biology Research Center, Advanced Industrial Science and Technology, Tokyo

³Okazaki Institute for Integrative Bioscience and Institute for Molecular Science, Okazaki, Japan

 4 Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University, Nagoya, Japan

⁵Department of Molecular Biology and Technology, University of Sheffield, Sheffield, UK

We demonstrate the NOE-based structure determination of Q41N variant of ubiquitin at 2500 bar, where the alternatively folded N₂ state is 98% populated, but only 70% populated at ambient pressure. This allows us to characterize the structure of N₂. The N₂ produced by dual perturbations of Q41N mutation and high pressure shows much more changes in the orientation of β 5-starand. The conformational change matches the change seen on binding of ubiquitin to the E1 activating enzyme. Since the N₁-N₂ conformational fluctuation and the change in the orientation of β 5-starand by the E1 binding are evolutionally conserved in ubiquitin and ubiquitin like protein NEDD8, both of which are the post-translational modifiers having E1-E2-E3 cascade reaction. These results strongly suggest that E1 recognition of ubiquitin and NEDD8 is explained by conformational selection, rather than induced-fit motion.

We have previously shown that wild type (WT) ubiquitin populates a high free-energy conformer N₂ at high pressure, and Q41N mutation amplifies the population of N₂ in the protein. High pressure NMR revealed that the N₂ is 70% populated in Q41N variant at ambient pressure, but 98% populated at 2500 bar. So far, solution structures as a model for N₂ were obtained for the mixed states with estimated populations ratio of N₁:N₂=23:77 for WT at 3000 bar [1] and 30:70 for Q41N at 1 bar [2]. Conformational changes in the structures were commonly obtained at α -helix, the following loop, β 3-starnd, and C-terminal strand. ¹⁵N spin

高圧力NMR, ユビキチン, 高エネルギー状態 きたざわ そういちろう, かめだ ともし, やぎ−うつみ まほ, ばくすたー にこ ら, かとう こういち, ういりあむそん まいく, ○きたはら りょう relaxation NMR analysis showed that the N_1 - N_2 conformational fluctuation occurs in the ten-microsecond time scale [2]. Here, we demonstrate the NOE-based structure determination of Q41N at 2500 bar, where N_2 is 98% populated. This allows us to characterize the structure of N_2 more purely than those in the previous approaches.

High pressure NMR measurements were performed between 1 and 2500 bar on Q41N variant of ubiquitin at 298K and pH7.2 using AVANCE3-800 spectrometer (Bruker BioSpin Co.) with a ceramic pressure-resistance cell (Daedalus innovations). Distance constraints were obtained from single 3D time-sharing ¹³C/¹⁵N edited NOESY-HSQC, and dihedral angle constraints were obtained from chemical shifts of C α , H α , H, N, and C' using TALOS⁺ program. Structure calculations for the doubly ¹⁵N- and ¹³C-labeled Q41N ubiquitin were performed with CYANA version 3.93 with 1311 distance and 74 angle constraints, and then energy-minimized using AMBER11 in explicit water (TIP3P).

The calculated 20 models show 0.44 Å RMSD for backbone and 0.89 Å RMSD for heavy atoms, showing sufficient quality as a NMR derived structure. The structure of N₂ produced by dual perturbations of Q41N mutation and high pressure shows changes in orientation of α -helix, the following loop, β3-strand, and C-terminal strand. In particular, the change in orientation of C-terminal strand is much larger at 2500 bar than at 1 bar because of an increase in the N2 state The conformational population. change matches the change seen on binding of ubiquitin to the E1 activating enzyme (Fig. 1). The N₁-N₂ conformational fluctuation and the change in the orientation of C-terminal strand by the E1 binding are evolutionally conserved in ubiquitin and ubiquitin like protein NEDD8 [3], both of which are the post-translational modifiers having E1-E2-E3 cascade reaction.



Fig.1 Solution structures of ubiquitin. Wild type at 1 bar (PDB: 1D3Z), Q41N at 2500 bar, and wild type ubiquitin bound to E1 activating enzyme at 1 bar (PDB: 4II2).

These results strongly suggest that E1 recognition of ubiquitin and NEDD8 occurs by conformational selection, rather than induced-fit motion.

References

- 1 Kitahara et al. JMB 347, 277-285, 2005.
- 2 Kitazawa et al. Biochemistry 52, 1874-1885, 2013.
- 3 Kitahara et al. JMB 363, 395-404, 2006.

高圧力NMR法によるジヒドロ葉酸還元酵素の構造揺らぎ 研究

○北沢 創一郎¹,小林 直弘²,井上 沙紀¹,大前 英司³,北原 亮¹ ¹立命館大学薬学部,²大阪大学蛋白質研究所,³広島大学大学院理学 研究科

Conformational fluctuation of dihydrofolate reductase mutant by using high pressure NMR spectroscopy: D27E mutant

OSoichiro Kitazawa¹, Naohiro Kobayashi², Saki Inoue¹, Eiji Ohmae³ and Ryo Kitahara¹

¹: College of Pharmaceutical Sciences, Ritsumeikan University, Kusatsu, Japan

²: Institute for Protein Reserch, Osaka University, Osaka, Japan

³: Graduate School of Science, Hiroshima University, Higashihiroshima, Japan

Conformational fluctuations among the basic folded state and high-free energy states have been recognized to be important for protein function, especially in enzymatic reaction. Dihydrofolate reductase (DHFR), which catalyzes the reduction of dihydrofolate to tetrahydrofolate, assumes a variety of conformations in solution. We found that several cross-peaks in the ¹H /¹⁵N HSQC spectrum for the folate-bound form of *E.Coli* DHFR are split into two with increasing pressure, indicating a presence of alternatively folded conformation of *E.Coli* DHFR in solution. We also showed that the alternatively folded conformation is 25% populated in D27E mutant at ambient pressure, but only 10% populated in wild type (WT). Here, we show that the alternatively folded conformation has similar in both structure and dynamics with the basic folded state. High pressure NMR spectroscopy revealed that free energy difference ($\Delta G0$) and partial molar volume difference ($\Delta V0$) between the two conformations in D27E are 2.67 ± 0.09 kJ/mol and 5.5 ± 0.6 mL/mol, respectively.

[Introduction]

水溶液中でタンパク質は、天然状態だけではなく、変性状態や局所変性状態などの 高自由エネルギー状態も分布しており、構造的にそれらの間を揺らいでいることが知 られている。このような高エネルギー状態は、タンパク質の分子認識などの機能に重 要な働きをしていると考えられている。しかし、高エネルギー状態の分布率は小さい ため観測は困難である。これを観測する方法に高圧力NMR法がある。

ジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR)によって、ジヒドロ葉酸がテトラヒドロ葉酸に還元 されるとき、DHFRのM20ループにおける大きなコンホメーション変化が、不可欠で あると考えられている。葉酸結合型のDHFRは、結晶構造解析によると、活性中心を 含むM20ループが開いた構造と閉じた構造の2つが解明されている¹。コンホメーショ ン変化に敏感な高圧力NMR法によれば、野生型(WT)においては、M20ループ近傍の 高圧力NMR、DHFR、準安定構造

○きたざわ そういちろう,こばやし なおひろ, いのうえ さき,おおまえ え いじ,きたはら りょう 主鎖NHのHSQC信号は高圧力下で2つに分かれることが報告されている²。これら2つの信号は、M20ループが開いた構造と閉じた構造に対応すると考えられている。

今回、我々は、常圧下でM20ループ近傍のHSQC信号が、2つに分かれているDHFR-D27E変異体を作成した。水-アミド水素交換速度測定とスピン緩和測定、高圧力NMR 法の測定により、D27Eの2つの状態について、その構造とダイナミクス、熱力学安定 性の研究を行った。

[Methods]

1 mM¹⁵N D27E DHFRを20 mM TrisHCl, 5 mM Fololic acid, pH 7.0の緩衝液に調整した。NMR装置は600 MHz NMR (Bruker Avance 600)を使用し、298 Kにおいてすべての 測定を行った。主鎖のダイナミクス解析のためにスピン緩和解析(¹⁵N-*R*₁,*R*₂,NOE)を行った。安定性解析のために、水アミド水素交換NMR法(CLEANEX-PM)を行った。構 造転移の観測のために、1気圧から2500気圧の範囲で、¹H/¹⁵N HSQCスペクトルの測定 を行った。

[Results and Discussion]

D27Eは常圧下で、25%の高エネルギー状態由来 のピークが観測され、HSQC信号が2つに分裂して いる。D27Eの高圧力NMR実験の結果からD27Eの高 エネルギー状態の分布率は、2500 barで40%まで増 加することが示された(Fig.1)。さらに化学シフトの 圧力依存性の解析からM20ループと110-125残基を 中心に構造変化をしていることが示された。また 二つの状態の信号強度解析から、 ΔV^0 は5.5±0.6 ml/mol, ΔG^0 は2.67±0.09 kJ/molと見積もられた。

D27EとWTのスピン緩和解析から、アミノ酸変異 による構造揺らぎの変化を測定した。ピコ秒から



Fig.1. Pressure dependence of population of two conformations of DHFR-D27E

ナノ秒の動きを反映する縦緩和速度 *R*₁は、WTとD27Eでは顕著な違いは見られなかった。それに対してマイクロ秒からミリ秒の動きを反映する横緩和速度 *R*₂ではM20 ループ(17-40)、110-125残基などD27Eのピーク分裂が観測される周辺で顕著な増加が見られた。これらの結果は加圧により高エネルギー状態の分布率の増加した事実と一致する。それに対して、D27Eにおいては高エネルギー状態と最安定状態の比較では、*R*₁,*R*₂,NOE,水-アミド水素交換実験の結果に大きな違いは見られなかった。これらの結果からD27Eの高エネルギー状態は最安定構造と比べ、構造とダイナミクスに大きな違いはないことが示された。

DHFR D27Eの最安定構造と高エネルギー状態由来のNOEパターンが、明確に異なる ため、距離情報(NOE)を基にした2つのフォールド状態の立体構造を決定するチャレン ジングな試みが進行中である

¹ Michael R. Sawaya et al., Biochemistry, **36**, 586-603 (1997)

² Ryo Kitahara *et al.,Biochemistry*, **39**, 12789-12795 (2000)

常磁性緩和効果を用いたタンパク質の溶液構造解析法の 開発

○古板恭子¹、片岡沙織¹、小林直宏¹、村山真一²、建部恒²、塩崎一 裕²、藤原敏道¹、児嶋長次郎¹ ¹阪大・蛋白研 ²奈良先端大・バイオ

A method for determination of high-resolution protein solution structures using paramagnetic relaxation enhancement

○Kyoko Furuita¹, Saori Kataoka¹, Naohiro Kobayashi¹, Shinich Murayama², Hisashi Tatebe², Kazuhiro Shiozaki² and Chojiro Kojima¹

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

²Graduate School of Biological Sciences, Nara Institute of Science and Technology, Nara, Japan.

Protein tertiary structure determinations by solution NMR usually rely on NOE-derived distance restraints. Therefore it requires sufficient number of NOE peaks and nearly complete assignments of the NOE peaks. However this cannot be always achieved depending on the target protein. In this study, we utilized paramagnetic relaxation enhancement (PRE) to determine a high-resolution structure of a protein which NOE data was insufficient for the structure determination. By combining a total of 867 PRE-derived distance restraints with NOE-derived distance restraints, the structure of the protein was successfully determined with sufficient convergence and accuracy.

[序論] タンパク質の溶液構造決定は、通常NOE由来の距離制限情報に基づいて行われる。構造決定に十分な数のNOE距離情報を得るためには、十分な数のNOE信号及びそのほぼ完全な帰属が必要とされる。従って、タンパク質のほぼ完全な化学シフトの帰属も必要とされる。しかし、これらはタンパク質によっては得られないことがある。

常磁性緩和効果(PRE)は、NOE 距離情報を補足するものとして、NMR 構造決定に利用されてきた。NOE から得られるのは~6Åの距離情報であるが、PRE からは10~24Åという NOE では得られない長距離情報を得ることができる。PRE は、高分子量タンパク質やミセル中の膜タンパク質など、限られた NOE 距離情報しか得られないタンパク質の全体構造を決定するために有効であることが示されている^[1]。

本研究では、化学シフトの帰属が困難であり、また良好な NOESY スペクトルが得られず、常法では立体構造を決定することが困難であった *sp*Sin1タンパク質の160残 基からなる領域(以下 *sp*Sin1)に関して、PRE を利用することで、その高分解能立体構造決定を目指した。

常磁性緩和効果、立体構造

○ふるいた きょうこ、かたおか さおり、こばやし なおひろ、むらやま しんいち、 たてべ ひさし、しおざき かずひろ、ふじわら としみち、こじま ちょうじろう [方法]全ての NMR 測定は Bruker 社製 AVANCE I 800 MHz もしくは AVANCE III 950 MHz NMR 分光計を用いて行った。スペクトル処理には NMRPipe 及び Rowland NMR toolkit、解析には MagRO-NMRView 及び Sparky 3.115を用いた。 化学シフトの帰属は、spSin1の一連の多次元スペクトルを非線形サンプリング法によ り測定し、常法に従って行った。TALOS プログラムにより主鎖二面角(ϕ 及び ϕ) 情報、 3 J_CC_Y 及び³J_NC_Y より側鎖二面角(χ) 情報を得た。NOE 信号は¹⁵N-及び ¹³C-edited NOESY スペクトルより得た。PRE 距離制限情報は、9 種類の spSin1部 位特異的 MTSL スピンラベル体の¹H-¹⁵N HSQC スペクトルより得た。MTSL 酸化 型と還元型のピーク強度比から、不対電子とアミドプロトン間の距離を計算し、求め た距離 ± 7 Å をスピンラベル導入残基の Cβとアミドプロトン間の距離制限とした。 構造計算は、CYANA 3.95を用いて行った。得られた構造は、spSin1の安定な構造を 持つ領域(120残基)の主鎖 RMSD、及びループを除く領域の RDC 実験値と構造か ら求めた RDC 値の相関係数により評価した。

[結果と考察] 化学シフト帰属の結果、主鎖アミド基の窒素核および水素核で94%、 側鎖炭素核で80%、側鎖水素核で82%の帰属を得た。まず、これらの化学シフト、二 面角情報及び NOE ピークリストを用い、CYANA 3.95の NOE 自動帰属機能を用い て構造計算を行った。その結果、主鎖 RMSD が3.06 ± 0.89 Å、RDC 相関係数0.56 ± 0.12 という、収束度、確度ともに不十分な構造しか得られなかった(Fig1a)。

次に、9種類のスピンラベル体から得た867個の PRE 距離制限情報を追加し、同様の構造計算を行った。その結果、主鎖 RMSD が0.91 ± 0.17 Å、RDC 相関係数0.86 ± 0.05の高分解能構造の決定に成功した(Fig1b)。このことから、PRE 距離制限情報が、タンパク質溶液構造の収束度及び確度の向上に貢献することが示された。

PRE 距離制限がどのように構造決定に機能しているのかを調べるため、PRE を用いた構造計算の際に NOE 自動帰属機能により生成された NOE 距離制限ファイルを用い、そこに PRE 距離制限を加えた場合と加えなかった場合で得られる構造を比較

した。その結果、PRE 距離制限情報を加 えた場合は主鎖 RMSD 及び RDC 相関が、 それぞれ0.98±0.20 Å 及び0.87±0.05であ ったのに対し、加えなかった場合は 1.51±0.59 Å 及び0.59±0.04であった。こ のことから、±7 Å という大きな誤差を 含むにも拘らず、PRE 距離制限には構造 の収束度及び確度を向上させる効果があ ることが分かった。しかし、PRE の有無 による構造の差は NOE 自動帰属を用い た場合に、より顕著であったことから、 PRE 距離制限は、NOE の自動帰属の精 度向上にも働いていると考えられた。



Fig1. Overlaid pictures of 10 lowest energy structures of spSin1 (structured region) calculated without PRE (a) and with PRE (b).

[参考文献]

[1] J.L. Battiste, G. Wagner, Biochemistry, 39 (2000) 5355-5365

蛋白質リジン残基側鎖アミノ基の水素交換速度の解析

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

NMR hydrogen exchange study for side-chain amino groups of lysine residues in proteins

OMitsuhiro Takeda¹, Tsutomu Terauchi² and Masatsune Kainosho^{1,3}
 ¹Graduate School of Science, Nagoya University, Aichi, Japan.
 ²SAIL Technologies, Inc, Kanagawa, Japan.
 ³Graduate School of Science and Engineering, Tokyo Metropolitan University, Tokyo, Japan.

We have recently developed NMR methods for monitoring hydroxyl exchange rate of side-chain hydroxyl and sulfhydryl groups in proteins. In the methods, peaks of carbons attached to polar groups are directly observed in a 1:1 mixture of H₂O and D₂O, where polar groups exist in equilibrium between protonated and deuterated isotopomers. The chemical shift of the carbon peaks are different between the two isotopomers due to a deuterium isotope shift effect and the carbon peaks of the two isotopomer peaks are resolved when the exchange rate is slower than the size of deuterium isotope in the H₂O/D₂O (1:1) solution. This approach was extended for monitoring the side-chain amino groups of lysine residues. For this analysis, we synthesized [ϵ -¹³C; ϵ , ϵ -²H₂] lysine and incorporated into proteins to be studied. We present the feasibility of this approach for lysine residues of some proteins.

リジン残基は、核酸やリン脂質結合タンパク質に見られるようにリガンドとの結合 に重要な寄与する事例が多く、そのような相互作用の要となるリジン残基の同定はタ ンパク質相互作用様式やアミノ酸変異による活性への影響を予測する上で重要とな る。従来のNMR水素交換実験法は交換性プロトンを観測対象としており、化学交換速 度の速い側鎖アミノ基は解析対象から外れていた。これに対して、本考案手法では炭 素を観測して間接的に水素交換現象を観測することにより、化学交換速度の制約がな く網羅的な交換速度解析が可能となる。

本考案手法では、毎秒数10回のオーダーより遅く交換するリジン残基側鎖アミノ 基に隣接したイプシロン炭素のNMRシグナルが、軽水/重水混合溶媒中にて同位体シ フト効果により分裂して観測される現象を利用する。同¹³C核のNMRシグナルを先鋭 化して同位体シフト効果を分離観測するため、位置選択的に安定同位体標識が施され たリジンを合成して利用する。合成されたリジン残基は、イプシロン炭素のみが

リジン、水素重水素交換、同位体シフト効果

○たけだみつひろ, てらうちつとむ、かいのしょうまさつね

¹³C標識され、同炭素に結合した2つの水 素は重水素置換されている。(以下合成 リジンと略記する)標的タンパク質に合 成リジン残基を取り込ませ、調製試料の イプシロン炭素を軽水、重水、軽水1:1 の溶液中で直接NMR測定しその線形から 交換速度の情報を得る。

合成リジンにより選択標識をしたタンパ

ク質を調製し、100%軽水中、50%軽水/50%重水中、100%重水中にて同イプシロンシグ ナルを観測する。この場合、100%重水中のスペクトルパターンは、軽水中のものと同 じであるが、全体的に 0.3 ppm 高磁場側にシフトする。これは、アミノ基のプロト ンが重水素に置換される事で、2ボンドを介した重水素同位体シフト効果が生じる。

アミノ基には3つのプロトンが含まれ るので、1つの水素/重水素置換により 0.1 ppmシフト変化が生じるので、合計 0.3 ppm分同位体シフト変化が軽水中と 重水素中とで観測される。続いて、軽水 (H₀)/重水(D₀)混合溶媒中において蛋 白質中のリジン残基イプシロン位の炭 素のNMRシグナルを観測して行う。軽水 (H₀)/重水(D₀)混合溶媒中では、アミノ 基にNH₃, NH₂D, NHD₂およびND₃の4つの同 位体異性体が1:3:3:1 の割合で存在す るため、そのイプシロン炭素は側鎖アミ ノ基からの水素/重水素同位体シフト効 果のため化学シフト値が互いに異なる。 だが、この4者は水素/重水素交換によ り相互変換しており、その交換速度が同 位体シフトの時間(毎秒数十回のオー ダー)より遅い場合、4つの同位体異性 体の・炭素シグナルが分離観測され、逆 に水素交換速度が速ければ4者が平均



Fig. 2 A side-chain amino group exists in equilibrium between four isotopomers in a mixture of H_2O and D_2O (a) and if hydrogen exchange rate is slower than the size of isotope shift effect, the four isotopomer peaks become resolved (b), otherwise averaged as single averaged peak (c)

化された1つのシグナルとして観測されると予想される(図2)。

ウシ膵臓由来トリプシン阻害剤(Bovine pancreatic trypsin inhibitor: BPTI)に含 まれる4つのリジン残基を対象として本考案手法の実証試験を行った。同蛋白質は、 分子量 6.5 kDaの蛋白性プロテアーゼ阻害剤であり、セリンプロテアーゼであるトリ プシンと強く結合して(K_d~10⁻¹⁴ M)、30.5 kDa の複合体を形成する。その際、Lys-15 はBPTI単独状態では分子表面に位置しその側鎖アミノ基の交換速度は速いが、トリプ シン結合時にはトリプシンの基質特異性ポケットに入り込みその交換速度が遅くな ると考えられる系である。本発表では、同リジン残基の水素重水素交換速度変化につ て発表する。

[謝辞] 本研究は倉田奨励金の助成を受けたものである。

 $H_3 N$ $H_1 H$ $H_2 H$ $H_1 H$ $H_1 H$ $H_1 H$ $H_1 H$ $H_1 H$ $H_1 H$ $H_2 H$ $H_1 H$ $H_1 H$ $H_2 H$ $H_1 H$ $H_2 H$ $H_1 H$ $H_2 H$ $H_1 H$ $H_2 H$ H_2

D

重水素同位体

シフト効果

H

H

α

CO₂H

NH₃

 $D = {}^{2}H$

NMRを用いたヒト主要組織適合複合体の動的なペプチド 認識及び構造維持機構の解明

○谷中冴子¹,上野貴将²,Shi Yi^{3,4},Qi Jianxun^{3,4},Gao George^{3,4},津本 浩平^{1,5,6},菅瀬謙治⁷
¹東大・新領域,²熊大・エイズ研,³Beijing Institute of Life Science・CAS, ⁴Institute of Microbiolog・CAS,⁵東大・工学系研 究科,⁶東大・医科研,⁷サントリー生科財団・生有研

Dynamic Regulation of Peptide Recognition and Stabilization of a Human Leukocyte Antigen Revealed by NMR

○Saeko Yanaka¹, Ueno Takamasa², Shi Yi^{3,4}, Qi Jianxun^{3,4}, Gao George^{3,4}, Kouhei Tsumoto^{1,5,6}, Kenji Sugase⁷

¹Graduate School of frontier Sciences, the University of Tokyo., ²Center for AIDS Research, Kumamoto University., ³Beijing Institute of Life Science, Chinese Academy of Sciences., ⁴Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences., ⁵Graduate School of Engineering, the University of Tokyo., ⁶Institute of Medical Science, The University of Tokyo., ⁷Bioorganic Research Institute,Suntory Foundation for Life Sciences.

In immune-mediated control of pathogens, human leukocyte antigen (HLA) class I complexes present various antigenic peptides and activates cytotoxic T lymphocytes (CTLs). The stability and long-lived presentation of the peptide-HLA complex (pHLA) depends heavily on the bound peptide. Crystal structures of pHLAs, however, are very similar to each other, irrespective of the bound peptides. Thus, the inherent determinant of pHLA stabilization remains elusive. In this study, we examined the mechanism by which HLA-B*35:01 recognizes various peptides and stabilizes the complex by elucidating the conformational dynamics of HLA-B*35:01 using relaxation dispersion NMR spectroscopy. Our data revealed that HLA loosely binds to peptides and then transiently forms a minor conformation in which the peptide is more tightly bound, circumventing pHLA disintegration.

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(CTL)を活性化する抗原提示に重要な 蛋白質である。既にHLAと様々なペプチドとの複合体の結晶構造が明らかであるがそ れらの結晶構造に大きな差異はない。一方、HLAのCTL活性持続時間は提示するペプチ ドによって大きく異なり、本研究で用いたHLA-B*3501について円偏光二色性(CD)の測 定から、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我々は明ら かにしている。また、示差走査熱量測定(DSC)の結果は溶液中の構造の差異を示唆し ていた。

緩和分散, ヒト主要組織適合複合体

○ やなかさえこ,うえのたかまさ、つもとこうへい、すがせけんじ

結晶構造では確認されない構造の差異が溶液中に存在する理由として、溶液中には 準安定なマイナー構造が存在し、最安定構造とのアンサンブル構造を取ることが考え られる。そこで、活性持続時間が異なる3つのHLAペプチドVY8-5A、VY8-3A、RY11-8A に着目し、溶液中におけるマイナー構造の特徴を原子分解能で解析できる、NMR緩和 分散測定による動的構造解析を行った。その結果、特にペプチドとHLA重鎖の結合部 位に揺らぐ残基が多く見られ、活性持続時間の長く熱安定なpHLAの方が揺らぎやすい ことが明らかとなった。更に、緩和分散の温度依存性の解析から、マイナー構造はタ イトにパッキングした構造であることが示された。



Fig. 1 Profile of HLA fluctuation

(a) The residues showing relaxation dispersions are plotted on the crystal structure of HLA as gray. The positions around Tyr99 important for selective peptide recognition is encircled. (b) Relaxation dispersion profiles for Tyr99 recorded at 14.1 T (black) and 17.6 T (gray).

pHLAはペプチドが結合している周辺の残基を動的に構造変化させ、タイトにパッキングすることで、構造を維持していると考えられる。また、ルースにペプチドと結合したメジャー構造が多様なペプチドの認識に重要であると考えられる。

また、本研究ではpHLAのマイナー構造がpHLAのレセプターであるTCRとの相互作用 に関わる可能性が示唆されたため、今後pHLA-TCR相互作用におけるpHLAのマイナー構 造の役割について検証していきたい。





The pHLA heavy chain is shown in gray, and the peptide as a trapezoid. Water molecules are shown as gray circles.

PDZドメイン-低分子化合物相互作用に重要なアミノ酸残 基の同定

○天野剛志¹,合田名都子¹,岩谷奈央子¹,木下賢吾^{2,3},太田元規⁴,廣明秀一¹
 ¹名大・院・創薬科学
 ²東北大・院・情報科学
 ³東北大・加齢研
 ⁴名大・院・情報科学

Identification of important amino acid residues for the interaction between PDZ domain and small molecule

 \bigcirc Takeshi Tenno¹, Natsuko Goda¹, Naoko Iwaya¹, Kengo Kinoshita^{2,3}, Motonori Ota⁴, Hidekazu Hiroaki¹

¹Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya University, Aichi, Japan.

²Graduate School of Information Sciences, Tohoku University, Miyagi, Japan.

³*Institute of Development, Aging and Cancer, Tohoku University, Miyagi, Japan.*

⁴Graduate School of Information Science, Nagoya University, Aichi, Japan.

We predicted interactions between PDZ domains and small molecules by eF-seek program and verified them by NMR titration experiments. As a result, many PDZ domains were demonstrated to interact three molecules including diclofenac (DIF). In addition, their interfaces were similar to the canonical binding pocket for a C-terminus of their native ligand. However, the recognition mechanism of PDZ domain for small molecule is still unknown.

In this study, key residues at the interface were identified by the construction of PDZ domain mutants around the canonical binding pocket. When Val 92 and Arg 96 of ZO-1 PDZ1 domain were substituted for Glu and Gln, respectively, almost all signals were not changed by the addition of DIF. Thus, these residues were important for the interaction with DIF.

タンパク質-タンパク質相互作用の足場として機能するタンパク質には、PDZ (Post-synaptic density-95 PSD-95, Disc large Dlg, Zonula occludens ZO-1) ドメインをも つものが多い。このドメインは相手方タンパク質のC末端を認識して相互作用してお り、その相互作用面は2番目の β -ストランド(β 2) と α -ヘリックスの間にあるポケッ トである。

我々は、eF-seekプログラムを使って、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 PDZドメインを探索した。そして、得られた探索結果について、PDZドメイン11種類

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

と低分子化合物 10 種類を用いて、NMR 滴定実験による検証を行った。その結果、ジ クロフェナック(diclofenac, DIF)、フルフェナミン酸(flufenamic acid, FLF)、フシジ ン酸(fusidic acid, FUA)の3 種類の化合物が、複数の PDZ ドメインと相互作用する ことを明らかにした。そして、それらの化合物の相互作用部位は前述のポケットを中 心とした表面であることを示した。しかしながら、なぜこれらの化合物が PDZ ドメ インに対して幅広く相互作用するのか、すなわち相互作用に必要な共通なモチーフに ついては不明のままである。本研究では、相互作用部位に位置するアミノ酸残基に変 異を導入し、低分子化合物との相互作用に重要なアミノ酸の同定を行った。

各 PDZ ドメインにおいて、ポケットに位置する残基を比較すると、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(Fig.)。興 味深いことに、DIF のみ相互作用しなかった harmonin PDZ3 ドメインにおいて、これ らの残基は保存されておらず、それぞれグルタミン酸残基とグルタミン残基であった。 したがって、DIF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 ドメインの 92 番目のバリンをグルタミン酸に、96 番目のアルギニンをグルタ ミンに置換した変異タンパク質を用いて NMR 滴定実験を行った。その結果、DIF を 加えても変異体タンパク質では、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 DIF との相互作用には、α-ヘリックスに位置する疎水性残基と塩 基性残基の組み合わせが重要な役割を果たしていることが明らかとなった。α-ヘリッ クスに上記のアミノ酸の組み合わせをもつ PDZ ドメインは、ヒト細胞ではおよそ半 分(138/255) ほどあり、これらのドメインが DIF と相互作用する可能性がある。一 方、harmonin PDZ3 の 488 番目のグルタミン酸をバリンに、492 番目のグルタミンを アルギニンに置換したリバース変異体を作製し同様の滴定実験を行ったが、シグナル の変化はほとんど観察されなかった。したがって、これらの疎水性残基と塩基性残基 は DIF との相互作用に必要ではあるが、何らかの他の条件も必要であることが示唆さ れた。

DIF、FLF は鎮痛剤として用いられる非ステロイド性抗炎症薬の一種であり、その ターゲットはシクロオキシゲナーゼである。そこで、シクロオキシゲナーゼをターゲ ットとする他の薬剤について、マウス ZO-1 PDZ1 ドメイン用いて相互作用の確認を 行った。アセチルサリチル酸、メフェナム酸、イブプロフェン、インドメタシンにつ いて NMR 滴定実験を行ったところ、イブプロフェンとインドメタシンにおいてシグ

ナルの変化が確認され、変化 したアミノ酸はポケット周 辺とβ-シート面に位置して いた。DIFと相互作用しない 変異体を用いて滴定実験の 行ったところ、ポケット周辺 のアミノ酸由来のシグナル について変化しない、もしく は変化が小さくなったこと から、これらの化合物との相 互作用についても、疎水性残 基と塩基性残基の重要性が 明らかとなった。



Fig. schematic diagram of amino acid residues around the binding pockets of PDZ domains

アミロイドベータペプチドのオリゴマー形成機構の解明

 ○田中 愛弓¹、岩本 成人¹、斉藤 貴志²、山口 瞳¹、 吉永 壮佐¹、河野 俊之³、西道 隆臣²、寺沢 宏明¹
 ¹熊本大学大学院生命科学研究部
 ²理化学研究所・BSI
 ³北里大学医学部

Analyses of the oligomerization mechanism of amyloid beta peptides

○Ayumi Tanaka¹, Shigeto Iwamoto¹, Takashi Saito², Hitomi Yamaguchi¹, Sohsuke Yoshinaga¹, Toshiyuki Kohno³, Takaomi C. Saido², Hiroaki Terasawa¹ Faculty of Life Sciences, Kumamoto University, Kumamoto, Japan.
 ² RIKEN, BSI, Saitama, Japan.
 ³ Kitasato University, School of Medicine, Tokyo, Japan.

The deposition of senile plaques is observed in the brains of <u>A</u>lzheimer's <u>disease</u> (AD) patients. Amyloid beta peptide (A β) oligomers formed in the process of senile plaque production are thought to be neurotoxic in AD. The A β (1–40) and A β (1–42) species, which have different C-terminal lengths, were previously identified. A β (1–42) is reportedly more prone to aggregation than A β (1–40).

To elucidate the roles of A β (1-40) and A β (1-42) in the formation of A β oligomers, we used solution NMR, PICUP (Photo-Induced Cross-linking of Unmodified Proteins) and ESI-TOF MS techniques to analyze A β (1-40) and A β (1-42). Our results indicated that the central and C-terminal regions of A β (1-42) may play a critical role in the formation of A β oligomers.

【背景・目的】

現在、先進国において高齢化が進行しており、認知症の患者数は増加の一途をたどっている。日本では、65 歳以上人口の認知症の有病率は 8~10% 程度と推定され、2020 年には 325 万人にまで増加すると言われている。主要な認知症の一つに、アルツ ハイマー病 (AD) がある。AD 患者の重要な所見のひとつに、脳において老人斑が多 発することが挙げられる。従来、老人斑を形成するアミロイド線維が、AD の神経毒 性の原因と考えられてきた。しかし、近年、老人斑形成過程で生じるアミロイドベー タペプチドオリゴマー (Aβ オリゴマー) が、強い神経毒性をもち、AD 発症に関与す ることが明らかになってきた。Aβ ペプチドは、主にカルボキシル末端 (C 末端) の 長さの異なる Aβ (1-40) と Aβ (1-42) からなり、Aβ (1-42) は Aβ (1-40)と比較し

アミロイドベータペプチド、緩和解析、アルツハイマー病

○たなかあゆみ、いわもとしげと、さいとうたかし、やまぐちひとみ、 よしながそうすけ、こうのとしゆき、さいどうたかおみ、てらさわひろあき て凝集能が高いことが知られている。

本研究は、Aβ (1-40) と Aβ (1-42) のオリゴマー形成能を明らかにし、オリゴマ ー形成メカニズムを構造生物学的に解明することを目的とする。

【実験】

¹⁵N で安定同位体標識した Aβ 試料を用いて、¹⁵N 核の T₁、T₂、T₁,の測定を行い、 緩和解析を行った。T₁測定では、100、200、300、400、500、600、700、800 ms の 9 つの遅延時間を用いて測定した。また、T₂測定では、10、20、40、60、90、120、160、 200、240 ms の 9 つの遅延時間を用いて測定した。T₁および T₂測定は Aβ (1-40) と Aβ (1-42) のいずれについても行った。T₁,測定では、8、20、40、60、80、100、120、 140、160 ms の 9 つの遅延時間と 1 kHz のスピンロック周波数を用いて測定した。T₁, 測定は Aβ (1-42) について行った。NMR 測定は、Bruker 社の 600 MHz(低温プロー ブ装着)の NMR 装置を用いて行い、スペクトル解析には、ソフトウェア NMRPipe と Olivia を使用した。

PICUP (Photo-Induced Cross-linking of Unmodified Proteins) と呼ばれる光架橋法 [1] を用いて Aβ を架橋させた後に電気泳動を行い、各 Aβ ペプチドのモノマー、ダイマ ー、トライマーを得た。その後、トリプシンを用いてポリアクリルアミドゲル内で消 化を行い、ゲルから各オリゴマーをそれぞれ抽出後、ESI-TOF MS にて消化断片の質 量分析を行った。ESI-TOF MS の測定は、Bruker 社に依頼し、スペクトル解析にはソ フトウェア Data Analysis 4.0 SP3 を用いた。

【結果・考察】

 T_1 および T_2 の緩和解析の結果、A β (1-42)のC 末端領域の運動性が A β (1-40)の C 末端領域と比較して低いことが示された。また、いずれの A β においても V12-L17の領域に運動性があることが示唆された。この運動性が化学交換を反映する遅い時間スケールの運動かどうかを確かめるため、A β (1-42)の $T_{1\rho}$ 解析を行った。その結果、V12-L17の領域にミリ秒スケールの運動性があることが示された。A β (1-40)の $T_{1\rho}$ については、現在解析を進めている。

また、Aβ (1-40) と Aβ (1-42) の ESI-TOF MS 解析の結果、トリプシンで消化し てできた断片のうち、H6-K16の断片同士が架橋した状態で検出された。この断片は、 緩和解析でミリ秒スケールの運動性がある領域とほぼ一致していた。

以上の結果から、中央部の V12-L17 の領域周辺が A β (1-40) と A β (1-42) に共通したオリゴマー化部位であること、A β (1-42) においては、さらに C 末端領域がオリゴマー化に関わり、高いオリゴマー形成能をもつ可能性があることが示唆された。 【展望】

A β (1-40) に関して T₁ の解析を行い、A β (1-42) と比較し、オリゴマー形成能の 違いを生じる原因を探る。また、A β の C 末端領域や H6-K16 の領域のように、オリ ゴマー化に関わる領域に注目し、分子間の相互作用部位を同定する。

【参考文献】

[1] Bitan, G. et al., J. Biol. Chem., 276, 35176–35184 (2001)

抗炎症薬の創出を目的とするケモカイン受容体制御因子 FROUNT-制御化合物間の相互作用解析

○石田 規人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

Analyses of the interaction between the regulating factor of the chemokine receptor FROUNT and an anti-inflammatory compound.

○Norihito Ishida¹, Sosuke Yoshinaga¹, Kaori Esaki¹, Yuya Terashima², Etsuko Toda², Kouji Matsushima², and Hiroaki Terasawa¹

¹*Faculty of Life Sciences, Kumamoto University, Kumamoto, Japan.* ²*Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, Tokyo, Japan.*

Leukocyte chemotaxis is induced when chemokines bind to their receptors during inflammation. We identified the chemotaxis-regulating factor, FROUNT, which binds to the chemokine receptor CCR2. We also obtained a compound that inhibits the CCR2-FROUNT interaction and exerts an anti-inflammatory effect. To clarify the mechanism of binding between the compound and FROUNT, we performed NMR titration analyses using the compound and the CCR2-binding domain of FROUNT (FNT-C), which revealed wide-ranging signal changes in FNT-C. These results suggested that a large conformational change occurred in FNT-C. In addition, the compound-binding site on FNT-C is different from the CCR2-binding site. Therefore, we considered the compound to induce an allosteric inhibition of the FROUNT–CCR2 interaction.

【背景・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、炎症部位からケ モカインが産生され、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 の細胞内領域 (Pro-C) に結合し、白血球遊走を 制御するタンパク質 FROUNT を同定した [1]。また、FROUNT 上のケモカイン受容 体結合領域が 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 NMR 法に基づいて決定した。

ケモカイン,アロステリック阻害,制御化合物

Oいしだのりひと,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 一方、ともに単球やマクロファージに発現するケモカイン受容体である CCR2 と CCR5 の Pro-C は非常に相同性が高く、これらの Pro-C に FROUNT が結合するこ とで白血球の遊走を効果的に制御していることを我々は報告している [2]。我々は 13 万種類以上の化合物のライブラリーを用いたスクリーニングにより、CCR2 Pro-C と FNT-C 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制御 化合物を取得した。この制御化合物は、FROUNT-CCR2 および FROUNT-CCR5 の 相互作用を阻害することで、相乗的な抗炎症効果を得ることができると考えられる。

本研究は、制御化合物による FNT-C-CCR2 Pro-C 間の相互作用の阻害機構を明ら かにし、立体構造に基づいて制御化合物の構造を最適化することを目的としている。

【方法】¹³C¹⁵N 標識した FNT-C に対して 0.25、0.5、1、2 当量の制御化合物を順に 滴定し、¹H–¹⁵N HSQC を測定した。また、三次元 HNCA、HN(CO)CA、HNCACB を 用いて FNT-C-制御化合物複合体の主鎖帰属を行い、制御化合物の添加による FNT-C 由来の NMR シグナルの変化を解析した。一方、制御化合物の結合によって、FNT-C と Pro-C との相互作用が阻害されることを確認するため、 FNT-C-制御化合物複合 体に対し 0.08、0.16、0.32、0.64、1 等量の Pro-C を滴定する実験を行った。なお、 すべての測定には、低温プローブを装備した 600MHz NMR 装置 (Bruker BioSpin) を 用いた。

【結果・考察】¹³C¹⁵N 標識 FNT-C に対する制御化合物の滴定実験において、FNT-C 単体由来のシグナルが消失し、制御化合物との複合体に由来するシグナルが観測され た。制御化合物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、制御化合物との結合により FNT-C が大きな立体構 造変化を起こすことを示している。解析の結果、化学シフト変化が顕著な部位は、以 前我々が FNT-C ~ Pro-C の滴定実験を行った際に変化した部位も含まれていた。ま た、 FNT-C-制御化合物複合体に Pro-C を滴定したところ、Pro-C の結合を示す化 学シフト変化が見られなかった。これらの結果から、FNT-C-CCR2 Pro-C 間の相互 作用を、制御化合物がアロステリックに阻害していると考えられた。

以上の解析結果に基づいて、制御化合物による FNT-C-CCR2 Pro-C 間の相互作用 の阻害機構について議論する。本知見は CCR2 だけでなく CCR5 の FROUNT に対 する阻害機構の理解にも寄与できると考えられる。今後は制御化合物の類縁体と FNT-C の結合解析を行うことで制御化合物を最適化し、特異性の高い抗炎症薬の創 製に貢献できると考える。

【参考文献】[1] Terashima, Y., et al., Nat. Immunol. 6, 827–835 (2005) [2] Etsuko, T., et al., J. Immunol. 183, 6387–6394 (2009)

メチル化リジンの化学シフトと塩橋との相関に関する 理論的・実験的研究

○服部良一¹、Jakub Sebera²、Vladimír Sychrovský²、古板恭子¹、 大木出³、池上貴久¹、藤原敏道¹、児嶋長次郎¹ ¹大阪大学 蛋白質研究所 ²チェコ科学アカデミー 有機化学・生化学研究所 ³奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科

Theoretical and experimental study about the correlation between the chemical shift of methylated lysine and salt bridge

○Yoshikazu Hattori¹, Jakub Sebera², Vladimír Sychrovský², Kyoko Furuita¹, Izuru Ohki³, Takahisa Ikegami¹, Toshimichi Fujiwara¹, Chojiro Kojima¹ ¹Insititute for Protein Research, Osaka University ²Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of Czech Republic ³Graduate School of Biological Sciences, Nara Institute of Science and Technology

NMR signals derived from the methyl groups of methylated-lysine residues are sensitive probes to monitor the electronic environments of lysine side-chain amino groups. Here we quantitatively demonstrate that the salt bridge formation induces upfield shift and split peaks in the ¹H-¹³C HSQC spectrum of the methyl group of the methylated-lysine residue. Experimental chemical shift values were compared to the theoretical values calculated by the quantum chemical calculation based on density functional theory, and surprisingly good correlation was obtained for both ¹H and ¹³C chemical shifts. The split peaks were also explained by the salt bridge formation. These features are useful for determining the strength of the lysine-mediated salt bridges.

【背景】

塩橋は、対に帯電したタンパク質側鎖間の非共有性の相互作用であり、イオン結合 性と同時に水素結合性を有する。NMR法では、タンパク質中の水素結合を、化学シフ ト・スピンカップリング・同位体シフトなどから、生理的環境下で同定可能である。 しかしながら、塩橋に含まれる水素結合性について、NMR法を用いた解析例はほとん どない^{1,2}。その理由として、塩橋での水素結合に関与するプロトンは溶媒との交換性 が高く、直接的な検出が難しいことや、主鎖アミド基を介した水素結合と比べて運動 性が高く、本質的には過渡的な相互作用であることが挙げられる。NMR法によって塩 橋に関する構造情報が得られないということは、NMR法を用いたタンパク質構造解析 おいて、実験的な証拠をもとに塩橋形成の有無を反映させられないということ意味す る。そのため、塩橋に関する構造情報取得のための手法が必要とされている。

化学シフト、メチル基、塩橋

○はっとりよしかず、じゃかぶせべら、うらじみーるしくろふすきー、ふるいたきょ うこ、おおきいずる、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 還元的メチル化法では、 化学修飾によってリジン 側鎖アミノ基に高感度な ¹³C メチル基を導入する ことができる(Fig. 1)。



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

この¹³Cメチル基は、他のリガンドやタンパク質との相互作用解析に用いられるほか ^{3,4}、直接的な NMR 検出が難しいアミノ基の静電的環境の間接的な検出にも用いられ てきた^{5,6}。それは、メチル化によってアミノ基の pKaが 0.5-1 程度しか変化しないた め、メチル基の化学シフト変化から、本来のアミノ基の静電的性質を推定できるから である。とくに、塩橋形成とメチル基の化学シフトの関連についてはいくつもの議論 がされてきたが、これまでに系統的かつ定量的な研究報告はない。そこで本研究では、 3 種のタンパク質のリジン側鎖アミノ基に導入したメチル基の化学シフトを得て、そ の塩橋形成との相関を明らかにした。

【結果と考察】

1. 化学シフト値と N...O 間距離の取得

タンパク質として、分子量 10 kDa 前後であり、順に 7、8 および 10 残基のリジン 残基を有するユビキチン、FKBP およびチオレドキシンを用いた。これらを還元的メ チル化法によって完全に¹³C ジメチル標識し、¹H-¹³C HSQC 測定を行った(Fig. 2)。 そして、リジンをアルギニンに置換した変異体を用いて、すべての帰属を完了した。

帰属された 25 残基のうち、8 残基 については非等価な¹³Cシフトを 示し、そのうちの3残基は¹Hシ フトも非等価であった。非等価な ¹Hシフトを示す3残基は、タン パク質内部に埋もれて塩橋を形 成する、または複数の酸性アミノ 酸残基と塩橋を形成すると思わ れるリジンであった。本研究では それらの残基を解析から除外し、 タンパク質表面で単純な対にな っている塩橋について、一般性を 見出すことに焦点を当てた。また 他には、芳香環に近接しており環 電流シフトの影響が大きいと思 われる3残基を除いた。よって、 合計 19 残基の¹H および¹³C 化学 シフトを解析に用いた。



Fig. 2 $^{1}\text{H-}^{13}\text{C}$ HSQC spectra of (a) ubiquitin, (b) FKBP and (c) thioredoxin acquired at pH 6.8, 30 °C and 400 MHz NMR.

塩橋形成の指標としては、結晶構造におけるリジン N_t原子から2つのアスパラギ ン酸 O₈原子またはグルタミン酸 O₈原子までの平均距離(N...O 間距離)を求めた(Fig. 3a)。一般に、塩橋は N...O 間距離が 4 Å 以内であると定義され、エネルギー的な安 定化に寄与する距離である⁷。

2.¹Hシフトと N...O 間距離の対応

メチル基¹Hシフトとそれに対応するN...O間距離をプ ロットすると、N...O間距離が短くなるにつれて、¹Hシ フトが小さくなる(高磁場シフトする)ことが示された (Fig. 3b)。通常、水素結合に関与する場合の¹H シフト は低磁場シフトを示すため、非常に興味深い結果であっ た。ここから、メチル化リジンの塩橋は、側鎖カルボキ シル基とメチル基との水素結合(CH...O相互作用)では なく、アミノ基との水素結合(NH...O相互作用)によっ て安定化していると推測された。そして、メチル基の高 磁場シフトは、古典的には、側鎖カルボキシル基の局所 的な電場および磁気異方性がもたらす空間的な影響であ ると考えられた。

しかしながら、この有意ではあるが小さな高磁場シフ トの傾向を古典的なモデルから説明することは困難であ った。そこで、密度汎関数理論(B3LYP/6-311++G^{**})に 基づく構造最適化と化学シフト計算を行った。その結果、構造最適化によって CH...O

相互作用が見られた2残基では低磁場シフトを示したが、その他の残基ではNH...O 相互作用が見られ、かつ実験値と同程度の高磁場シフトを示したことから、実験的に 得られた相関が強く裏付けられた。

3.¹³C シフトと N...O 間距離の対応

¹³C シフトについては、過去 にもその非等価性と塩橋形成 の関連が示唆されているが、 本研究においても同様の傾向 が示された (Fig. 4a)。さらに は、¹³C シフト自体が、¹H シ フトと同様、N...O間距離が短 くなるにつれて高磁場シフト することが明らかとなった



(Fig. 4b)。¹H シフトと同様の塩橋形成による高磁場シフトは、同じく側鎖カルボキ シル基からの空間的な影響によるものであると考えられた。



Fig. 3 (a) Schematic representation of N...O distance in salt bridge. (b) Correlation plot between N...O distances and ¹H shifts

4. 塩橋が失われた場合のメチル基¹H および¹³C シフト変化

pH を下げて側鎖カルボキシル基 をプロトン化させる、または酸性ア ミノ酸残基へ変異を導入すること によって塩橋を損失させると、塩橋 を形成していたメチル化リジンの メチル基¹Hシフトは低磁場シフト を、¹³Cシフトは非等価性の解消お よび低磁場シフトを示した(Fig.5)。 すなわち、これまでに得られたメチ ル基の化学シフトについての特徴 が、塩橋形成によるものであること が示された。



Fig. 5 Peak shifts of the methyl groups of K11 in ubiquitin induced by (a) the pH changes from 6.9 to 3.2 and (b) the mutation of E34Q (E34 forms a salt bridge to K11).

【結論】

リジン側鎖に導入したメチル基の化学シフトの高磁場シフトと塩橋形成に関与す る側鎖 N...O 間距離が定量的に相関することが、理論的および実験的に確かめられた。 NMR 法における塩橋形成の同定は、タンパク質の物性解明や構造精密化において極 めて貴重な情報となる。また、高磁場シフトが本来のリジンの塩橋で見られる水素結 合 (NH...O 相互作用)を間接的に反映したものであることに加えて、NMR 法によっ て構造決定されたメチル化修飾 FKBP が、非修飾体と同等の立体構造(主鎖 RMSD 0.9 Å)を有することから、化学修飾による NMR プローブ法として、有用なものである といえる。

【文献】

(1) Liu, A. Z.; Hu, W. D.; Majumdar, A.; Rosen, M. K.; Patel, D. J. J. Biomol. NMR 2000, 17, 305.

(2) Tomlinson, J. H.; Ullah, S.; Hansen, P. E.; Williamson, M. P. J. Am. Chem. Soc. 2009, 131, 4674.

(3) Bokoch, M. P.; Zou, Y. Z.; Rasmussen, S. G. F.; Liu, C. W.; Nygaard, R.; Rosenbaum, D. M.;

Fung, J. J.; Choi, H. J.; Thian, F. S.; Kobilka, T. S.; Puglisi, J. D.; Weis, W. I.; Pardo, L.; Prosser, R. S.; Mueller, L.; Kobilka, B. K. *Nature* **2010**, *463*, 108.

(4) Hattori, Y.; Furuita, K.; Ohki, I.; Ikegami, T.; Fukada, H.; Shirakawa, M.; Fujiwara, T.; Kojima, C. *J. Biomol. NMR* **2013**, *55*, 19.

- (5) Gerken, T. A.; Jentoft, J. E.; Jentoft, N.; Dearborn, D. G. J. Biol. Chem. 1982, 257, 2894.
- (6) Zhang, M. J.; Vogel, H. J. J. Biol. Chem. 1993, 268, 22420.
- (7) Kumar, S.; Nussinov, R. Chembiochem 2002, 3, 604.

ⅣV法により取得した高選択的MDM2結合ペプチド による MDM2:p53結合阻害の構造基盤 ○永田 崇^{1, 2}, 白川貴恵³, 小林直宏⁴, 始平堂弘和³, 片平正人^{1,2}, 堀澤健一³, 土居信英³, 柳川弘志³

「京都大学・エネルギー理工学研究所

²京都大学大学院・エネルギー科学研究科

³慶應大学大学院·理工学研究科

4京都大学大学院・エネルギー科学研究科

Structural basis for the inhibition of MDM2:p53 interaction by highly selective MDM2-binding peptide obtained with IVV method

○ Takashi Nagata^{1, 2}, Kie Shirakawa³, Naohiro Kobayashi⁴, Hirokazu Shiheido³, Masato Katahira^{1, 2}, Kenichi Horisawa³, Nobuhide Doi³, and Hiroshi Yanagawa³
 ¹Institute of Advanced Energy, Kyoto University
 ²Graduate School of Energy Science, Kyoto University
 ³Graduate School of Science and Technology, Keio University
 ⁴Institute for Protein Research, Osaka University

MDM2 is an oncoprotein whose binding to a tumor suppressor p53 has been implicated in human cancers. Peptides that mimic MDM2-binding region of p53 reportedly restore the anti-cancer activity by p53. We had performed rigorous selection of MDM2-binding peptides by means of mRNA display (IVV method) and identified an optimal peptide, MIP, which shows higher activities for MDM2-binding and tumor cell proliferation suppression over the known peptides. Here we determined the structure of MIP bound to MDM2. Higher anti-MDM2 activity observed for MIP turned out to originate from its ability to enlarge the binding interface. The structural information obtained in the present study provides a road map for the rational design of an inhibitor against the MDM2:p53 binding.

INTRODUCTION Oncoprotein MDM2 is the E3 ubiquitin ligase that targets the tumor suppressor p53. Since p53 prevents tumorigenesis through cell cycle arrest or apoptosis, inactivation of p53 by MDM2 results in cancers. MDM2 binds directly to the transactivation domain of p53, and therefore, inhibition of the MDM2:p53 interaction has been a major target for the development of anticancer drugs. Our IVV method, which can handle larger random peptide libraries than phage-display, enabled rigorous selection of MDM2-binding peptides and obtained an optimal 12-mer peptide, MIP. We have shown previously that MIP has higher activities for MDM2-binding and tumor cell proliferation suppression over the known peptides. In the present study, we have intended to shed light on the structural basis for the strong binding of MIP to MDM2 and obtain fruitful information towards rational drug design.

MDM2, p53, 癌

○ながた たかし,しらかわ きえ,こばやし なおひろ,しへいどう ひろかず, かたひら まさと,ほりさわ けんいち,どい のぶひで,やながわ ひろし **EXPERIMENTS** MIP (residues 1-12) and MDM2 (12-108) were expressed as a fusion protein so as to facilitate the preparation of stable isotope labeled MIP as well as MDM2. The fusion protein contains from N- to C-term: a histidine affinity tag (HAT), GB1 as the solubility-enhancement tag, MIP, MDM2, and T7 tag. The HAT-GB1 tag was removed by thrombin cleavage, and MIP and MDM2 were allowed to be cleaved with TEV protease. All NMR data were collected at 298 K on Bruker AVANCE 600. The conventional set of NMR spectra needed for backbone and side chain resonance assignments, and collection of distance and dihedral angle information was performed. NMR spectra were processed with NMRPipe/NMRDraw. Spectral analysis was performed with MagRO 1.2.19. Structure calculations were performed using CYANA 2.1 and AMBER 12.

RESULTS AND DISCUSSION Firstly, [¹H, ¹⁵N] HSQC spectra of MIP-MDM2 fusion protein (MIP-MDM2) and MIP:MDM2 complex, which was obtained by TEV protease treatment, were compared. Only minor differences in the signal patterns of the [¹H, ¹⁵N] HSQC spectra were identified, so we decided to use MIP-MDM2 for further NMR measurements. Next, NMR spectral and structural analyses were performed by standard protocols. For reference, 90 % of the backbone resonances were assigned among 131 residues (excluding the N-term and six Pro). The solution structure of MIP-MDM2 was determined with good geometry and excellent structure quality scores. The structure of MIP portion, which comprises residues 1-12 and TEV cleavage site (residues 13-21), contains a single α -helix (3-12); while that of MDM2 portion, which consists of 12-108 and T7 tag (109-119), contains from N- to C-term: αA (38-47), αB (56-70), $\beta 1$ (80-82), αC (87-92), $\beta 2$ (96-98), and αD (102-112). Steady-state {1H}-[¹⁵N] NOE experiment was then performed; it has clearly shown that the TEV cleavage site in the MIP portion and the residues 12-34 and 113-119 of MDM2 portion are flexible, which are consistent with the obtained structural results.

The structure of MIP bound to MDM2 turned out to be similar to that of previously reported MDM2-binding peptides but with some prominent differences. All of the MDM2-binding peptides contain a single α -helix (3-12 in MIP). The distinction is that the α -helix of MIP is elongated by M11 and E12 to the C-term as compared with others. All of known MDM2-binding peptides share conserved F3-W7-L10 triad, side chains of which are oriented towards the deep binding cleft of MDM2 and form a hydrophobic core. Further structural analysis revealed that there are two hydrophobic patches that are formed by solvent exposed residues: (i) W4, L8, and M11 of MIP and three residues of MDM2; (ii) Y6 of MIP and two residues of MDM2. The position of M11 in the previously reported MDM2-binding peptides is usually small amino acid such as Ser, Thr, or Pro. In the case of MIP, M11 seems to contribute to both the elongation of the α -helix and formation of the hydrophobic patch. It is unusual to find a hydrophobic residue exposed to the solvent in MDM2-binding peptides. However, W4 of MIP seems to play important role in making many interactions. Thus strongest binding to MDM2 and resulting highest anti-MDM2 activity by MIP seems to have originated from enlarged binding interface. Although, MIP is one of the shortest MDM2-binding peptides, it uses solvent exposed residues to increase the number of interactions. Designing of small molecules that utilize solvent exposed functional groups for MDM2-binding may be highly rational.

 P40
 TRAF6を標的としたタンパク質間相互作用阻害剤の探索 および構造解析

 ○守谷 潤¹,竹内 恒²,田井 健二¹,米田 直樹¹,新井 謙三³, 小林 直樹⁴,福西 快文²,井上 篤¹,木原 美穂¹,村上 拓己⁴,

> 千葉 健一¹,嶋田 一夫⁵ ¹エーザイ株式会社,²産業技術総合研究所,³H3 Biomedicine,⁴サン プラネット株式会社,⁵東京大学大学院 薬学系研究科

Development and Structural Analysis of a Protein-protein Interaction Inhibitor Targeting TRAF6

○Jun Moriya¹, Koh Takeuchi², Kenji Tai¹, Naoki Yoneda¹, Kenzo Arai³, Naoki Kobayashi⁴, Yoshifumi Fukunishi², Atsushi Inoue¹, Miho Kihara¹, Takumi Murakami⁴, Kenichi Chiba¹, and Ichio Shimada⁵

¹Eisai Co., Ltd., ²National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, ³H3 Biomedicine Inc., ⁴Sunplanet Co., Ltd., ⁵Graduate School of Pharmaceutical Sciences, the University of Tokyo

Tumor Necrosis Factor (TNF) receptor associated factor 6 (TRAF6) is an intracellular signal transducer for the TNF receptor superfamily, which was reportedly shown as a promising target for the treatment of rheumatoid Arthritis. We identified initial hits for small-molecule inhibitors of TRAF6-receptor interaction through *in silico* screening. Subsequently, the hit analogues were synthesized and finally we've got the most potent inhibitor. The NMR interaction analyses (INPHARMA and DIRECTION) along with the docking and MD simulation revealed the structural characteristic of the protein-compound interaction, which satisfied the structure-activity-relationship and useful for the further optimization of the compounds.

TRAF6はTNF受容体superfamilyなどのシグナル伝達を仲介するアダプタータンパク 質である。TRAF6を介する細胞内シグナル伝達は、免疫応答、炎症反応、骨再形成な どを誘起することが知られており、TRAF6-受容体相互作用はリウマチ治療の有望な 標的となっている。しかし、TRAF6-受容体の相互作用表面は広く平坦であり、弊社 保有ライブラリを用いたHigh throughputs screeningでは阻害活性を有する低分子化合 物を同定するには至っていない。本研究においては、より広範な化合物空間を探索す るため*in silico*スクリーニングを利用したヒット化合物の探索と合成展開を行い、高 親和性化合物を得ることに成功した。また、NMR相互作用解析と計算機科学的手法の 融合により、構造活性相関を満たし、さらなる合成展開の可能性を示唆する有効な TRAF6との複合体モデルを構築できた。

Drug discovery, Protein protein interaction inhibitor, Structural analysis

○もりや じゅん,たけうち こう,たい けんじ,よねだ なおき,あらい けん ぞう,こばやし なおき,ふくにし よしふみ,いのうえ あつし,きはら みほ,む らかみ たくみ,ちば けんいち,しまだ いちお

シード化合物(ER-000564989-000)の発見および合成展開

TRAF6の結晶構造に対して100万化合物のin silicoスクリーニングを行った。高スコ ア化合物のうち、SPRにてTRAF6-受容体(RANK)ペプチド阻害作用、およびマウ ス骨髄細胞の破骨細胞への分化阻害を示した4化合物をヒットとした。これら4化合物 をそれぞれTRAF6に添加したところ、全ての化合物についてTRAF6のNMRスペクト ルパターン変化が観測された。しかし、ER-000564989-000を除く3化合物については 同時にTRAF6の凝集を誘起し、特異的な相互作用阻害剤開発という観点から不適格で あると判断し、ER-000564989-000をシード化合物として選択した。

ER-000564989-000について活性向上の余地があると考えられたため合成展開を行った。その結果、最終的に高親和性化合物ER-000520940-000を得ることに成功した。 本化合物は骨髄細胞への分化阻害アッセイ系においてもER-000564989-000に比べ活性向上が認められた。

<u>NMRデータに基づいたTRAF6-ER-000520940-000の構造推定</u>

化学シフト摂動法および変異実験の結果から、ER-000520940-000結合部位はRANK 結合部位と重複することが示唆された。そこで結合部位情報を基にドッキング計算を 行ったところ、化合物が互いに反対の向きに結合した2種の構造が得られた。TRAF6 -RANK-ER-000520940-000を用いたINPHARMA実験は、そのうち一方を支持する NOEピークを与えたことから、複合体構造を一義的に決定することが出来た(Figure a, b)。本構造をさらに精密化するために、TRAF6-ER-000520940-000間のDIRECTION 実験を行い、実験結果を拘束条件としたドッキング計算により最終的な複合体モデル を得た(Figure c)。複合体構造中において化合物の一部はRANKペプチドと同様の相 互作用を形成していたが、RANKの利用していないサイトに対する相互作用も確認さ れた。また、化合物の相互作用は、合成展開の過程で得られたSAR(Structure Activity Relationship)を説明するものであった。今回得られた構造を活用することにより、更 なる高活性化合物の構築が可能となる。

本研究は、平坦な表面を有するタンパク質に対する阻害剤探索の戦略を提案するものであり、その中でNMRが多面的に活用できる有用な解析技術であることを示した。



Figure.

a) NOESY spectrum of the mixture of TRAF6, RANK, and ER-000520940-000. b) TRAF6 – ER-000520940-000 (stick) complex structure overlaid with RANK (line). c) Molecular surface representations of TRAF6 complexed to ER-000520940-000 obtained by docking simulation.

リン酸化されたSHARP/SMRTキメラの構造解析 ○飯沼純弥,小林彩保,金場哲平,伊藤隆,三島正規

首都大・理工

Structure analysis of phosphorylated SHARP/SMRT chimera

OJunya Iinuma, Ayaho Kobayashi, Teppei Kanaba, Yutaka Ito, Masaki Mishima Graduate School of Science and Engineering, Tokyo Metropolitan University, Tokyo Japan.

SHARP is a component of transcriptional repression complex in steroid hormone receptor and Notch/RBP-J κ signaling pathways. SHARP recruits HDAC complex regulates transcription at the chromatin level. SHARP has three RRM domains at N-terminal part and the SPOC domain at C-terminal. The SPOC domain binds the C-terminal tail of SMRT. Until now, the structure of phosphorylated SHARP/SMRT complex has been determined, and we revealed CK2 phosphorylation on SMRT is important to its interaction. In this study, we constructed SHARP/SMRT chimera in order to label SMRT peptide, and aimed to achieve rigorous structure analysis of SHARP/SMRT complex.

[序論]

SHARPは発生や分化など細胞運命決定に関与するspen遺伝子群産物のひとつであり、 Notch/RPB・Jェシグナル経路や、核内受容体シグ ナル経路における転写抑制共役因子として知ら れている。SHARPのC末端側に存在するSPOCド メインとSMRTのC末端が結合することでHDAC がリクルートされ、クロマチン構造レベルで転写 制御が行われていると考えられている。現在まで にリン酸化されたSHARP/SMRT複合体の構造を 決定し、SMRTのリン酸化修飾がその相互作用に 重要であることを明らかにした(Fig. 1)。そこで本 研究では、SMRTペプチドにラベル化が十分に導



Fig.1 Structure of SHARP/SMRT

入できるSHARP/SMRTキメラタンパク質を作成し、SMRTペプチドがリン酸化されたSHARP/SMRT複合体全体の安定同位体標識と精密な構造解析を目指している。

リン酸化、キメラタンパク質、構造解析

○いいぬま じゅんや、こばやし あやほ、かなば てっぺい、いとう ゆたか、み しま まさき

[実験・結果]

Infusion反応によりSHARPとSMRTペプチドをGSリンカーで繋ぎ、SHARP/SMRTキメ ラタンパク質を作成した。次に、SMRTペプチドにリン酸化を導入するために SHARP/SMRTキメラタンパク質とCasein Kinase II (CK II)の共発現系を作成し、¹⁵N同 位体標識をし、大腸菌の大量発現系を用いて培養、精製を行った。精製したキメラタ ンパク質にリン酸化が導入されているか確認するために質量分析を行ったところ、99 パーセント以上リン酸化がされていることが確認できた。そして、このサンプルを用 いてHSQC測定を行った(Fig.2)。



Fig.2 HSQC spectrum of SHARP /SMRT chimera 0.8 mM phospholyrated SHARP

/SMRT chimera.

今回の測定結果と以前我々が測定した化学合成したリン酸化SMRTペプチドとの複合体の測定結果を比較したところ、複合体型のスペクトルとなっていることが確認できた。そこで次に¹³C、¹⁵N同位体標識を施したSHARP/SMRTキメラタンパク質の精製を行い、主鎖(3D HNCACB, CBCA(CO)NH, HN(CA)CO, HNCO)・側鎖(3D C(CO)NH, H(CCO)NH, 4D HC(CO)NH)の帰属に必要な3次元の測定を行った。これらは現在解析中である。

[今後の展望]

測定結果の解析を引き続き進め、SHARP /SMRT chimera の構造解析を行っていく予定である。

○水口峰之,鍋島裕子 富山大・薬

Segmental isotope labeling of the intrinsically disordered protein PQBP1

OMineyuki Mizuguchi and Yuko Nabeshima Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Toyama, Toyama, Japan.

The polyglutamine tract-binding protein 1 (PQBP1) is one of the pre-mRNA splicing factors involved in the spliceosome. PQBP1 is composed of a small folded WW domain and long unstructured regions containing the polar amino acid-rich domain and the C-terminal domain. Here we produced segmentally labeled PQBP1, which is composed of a non-labeled segment (residues 1-219) and a ${}^{13}C/{}^{15}N$ -labeled segment (residues 220-265). The segmental isotope labeling of PQBP1 decreased the number of overlapping cross-peaks and dramatically simplified NMR spectra.

天然変性蛋白質(intrinsically disordered protein; IDP)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。一般に、disorder領域のシ グナルはNMRスペクトルの狭い範囲に重なるため、解析が非常に困難である。

本研究では、近年に開発されたセグメント同位体標識法(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。いくつかのセグメ

ント同位体標識法が開発されているが、 本研究ではExpressed Protein Ligation (EPL)法を用いた。EPL法は、安定同位体 標識したフラグメントと非標識のフラ グメントを別々に発現・精製し、これら を連結する方法である(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。

本研究では天然変性蛋白質PQBP1について研究した。PQBP1はスプライシング因子でありスプライソソームの初期 複合体に含まれる。PQBP1はWWドメ



Fig. 1 Protein Ligation of PQBP1.

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。

PQBP1(1-219)をMxe GyrA INTEINのN末端側に連結した融合蛋白質を準備した(Fig. 2)。また、Mxe GyrA INTEINのC末端側にはアフィニティー精製のためにchitin-binding domain (CBD)を連結した。

Segmental labeling, Expressed protein ligation, Intrinsically disordered protein

○みずぐちみねゆき, なべしまゆうこ
この融合蛋白質をchitin beadsに結合させ、 50 mM sodium 2-sulfanylethane sulfonate (MESNA)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を切断し、C末端 がチオエステル化されたPQBP1(1-219)を 得た。これをN-fragmentとした(Fig. 2)。

PQBP1(220-265)をSSp DnaB INTEINの C末端側に連結した融合蛋白質を準備し た(Fig. 3)。セグメント同位体標識のた めに、融合蛋白質は¹³C/¹⁵N標識として発 現・精製し、PQBP1(220-265)にGly220Cys 変異を導入した。この融合蛋白質をchitin beadsに結合させ、20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl (pH 8.5 at 20°C)を十分量流した。その後、 chitin beadsを50 mL チューブに移し、 dithiothreitol (DTT)を100 mMになるように加 えた。Chitin beads懸濁液のpHを7.6-8.0にし た後、37°Cで12時間インキュベーションした。 これにより、融合蛋白質からINTEIN-CBDを 切断しPQBP1(220-265)を得た。さらに、 PQBP1(220-265)を逆相高速液体クロマトグ



Fig. 2 Preparation of N-fragment of PQBP1.



Fig. 3 Preparation of C-fragment.

ラフィーによって精製した。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、これをC-fragmentとした (Fig. 3)。

EPL反応は、N-fragmentとC-fragmentを1:10のモル比で混合し37℃で行った(Fig. 1)。 混合直後の蛋白質濃度は、N-fragmentが0.24 mM、C-fragmentが2.2 mMである。この混 合溶液を20 mM HEPES, 100 mM NaCl, 5 mM MESNA (pH 8.0)に対して透析し、37℃で 16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℃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C-fragmentが連結され た全長PQBP1を確認できた。セグ メント同位体標識したPQBP1の HSQCスペクトルをFig.4に示した。 240-265残基のセグメントに由来す るシグナルだけが観測され、1-219 残基に由来するシグナルは消失し ている。



labeled PQBP1 (left) and segmentally isotope labeled PQBP1 (right).

Preparation of secretory proteins produced by Brevibacillus choshinensis for NMR study

OMichikazu Tanio¹, Hideki Kusunoki², and Toshiyuki Kohno³ ¹Institute for Molecular Science ²National Institute of Infectious Diseases ³Kitasato University School of Medicine

The *Brevibacillus choshinensis* expression system is useful to produce recombinant proteins with intramolecular disulfide bonds. We established a simple and cost effective protocol for uniform and selective isotope labeling of recombinant proteins secreted by *B. choshinensis*. The monomeric mutant of the human M-ficolin pathogen-recognition domain (FD1), which has two disulfide bonds, was uniformly and selectively labeled by using this system, and the backbone resonances of the protein were assigned. The predicted secondary structure of the monomeric FD1 suggested that the secondary structures are mostly conserved between the monomeric form in solution and the trimeric form in the crystal.

Introduction

Stable isotope labeling is an essential tool for NMR studies of proteins. Many protein expression systems, such as *Escherichia coli*, *Pichia pastoris*, *Lactococcus lactis*, *Leishmania tarentolae*, baculovirus-infected insect cells, mammalian cells, and cell-free protein synthesis, are available to produce recombinant proteins, and each of these systems has some advantages and disadvantages. In these systems, the gram-positive bacterium *Brevibacillus choshinensis* may be one of the best candidates for NMR studies of secretory proteins. We previously established a simple and cost effective method to prepare uniformly or amino-acid-type selectively isotope-labeled recombinant proteins using this system [1,2]. In the present study, we applied this protocol to the monomeric mutant of the human M-ficolin pathogen recognition domain (FD1), which is a secretory protein with two disulfide bonds [3], to assign its backbone signals [4].

Materials & Methods

The monomeric mutant of FD1, F127S/L128S (26.8 kDa), and its histidine-replaced mutants were expressed by the *B. choshinensis* expression system (TaKaRa Bio) [5, 6]. To check the ligand-binding activity of the recombinant proteins, the zonal affinity chromatography (ZAC) experiments were performed as described previously [6]. Isotope-labeled proteins were prepared using the C.H.L. media (Chlorella Industry) as previously described [1,2]. All NMR data were acquired at 303 K on a Bruker AVANCE II 700 spectrometer, and the backbone resonance assignments were obtained using the TROSY-based NMR spectra of the labeled proteins.

Secretory protein, ficolin, Brevibacillus choshinensis

○たにおみちかず、くすのきひでき、こうのとしゆき



Fig.1. ¹H-¹⁵N TROSY HSQC NMR spectrum of the ¹⁵N-labeled monomeric FD1.

Results & Discussion

The ZAC analyses of the monomeric FD1 and its histidine mutants provided clear evidence that the monomeric FD1 has a ligand-binding activity [6], and that His-251, His-284 and His-297 are essential for the ligand-binding activity of the monomeric protein as well as the wild-type trimeric protein [5], indicating that the recombinant protein is correctly folded. The ¹H-¹⁵N TROSY HSQC NMR spectrum of the uniformly ¹⁵N-labeled monomeric FD1 showed well-dispersed signals (Fig. 1), also supporting that it is properly folded. In total, 89.4% of the backbone ¹⁵N, 89% of ¹H_N, 94.3% of ¹³C α , 93.7% of ¹³C β and 93.4% of ¹³C² resonances have been assigned in the protein sequence (BMRB accession No. 11522). The secondary structure predicted from these backbone assignments indicated that the secondary structures are mostly conserved between the monomeric FD1 in solution and the trimeric FD1 in the crystal. This result strongly suggests that these chemical shift assignments of the monomeric FD1 and the full-length M-ficolin [4].

References

- [1] Tanio, M., Tanaka, T., & Kohno, T., Anal. Biochem. 373, 164-166 (2008).
- [2] Tanio, M., Tanaka, R., Tanaka, T., & Kohno, T., Anal. Biochem. 386, 156-160 (2009).
- [3] Tanio, M., Kondo, S., Sugio, S., & Kohno, T., J. Biol. Chem. 282, 3889-3895 (2007).
- [4] Tanio, M., Kusnoki, H., & Kohno, T., *Biomol. NMR Assign.* doi:10.1007/s12104-013-9484-4 (2013)
- [5] Tanio, M., & Kohno, T., Biochem. J. 417, 485-491 (2009).
- [6] Tanio, M., Wakamatsu, K., & Kohno, T., Mol. Immunol. 47, 215-221 (2009).

HMBC 法の新しい応用測定----BASHD-J-resolved HMBC 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-HMBC, an efficient method for measuring proton-proton and heteronuclear long range coupling constants 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 often possess various spin systems consisting of a methine group directly bonded to a methyl group (e.g. -CHa-CHb(CH3)-CHc-). The methine proton Hb splits into a broadened multiplet by coupling with several vicinal protons, rendering analysis difficult of ${}^{n}J_{C-H}$ with respect to Hb in the J-resolved HMBC-1. In purpose of the reliable and easy measurements of ${}^{n}J_{C-H}$ and ${}^{n}J_{H-H}$ in the aforesaid spin system, we have developed a new technique, named BASHD-J-resolved-HMBC. This method incorporates the band selective homo decoupled (BASHD) pulse and J-scaling pulse into HMBC. In this method, high resolution cross peaks can be observed along the F1 dimension by J-scaling pulse, and BASHD pulse simplified multiplet signals. Determinations of ${}^{n}J_{C-H}$ and ${}^{n}J_{H-H}$ of multiplet signals can easily be performed using the proposed pulse sequence.

<u>はじめに</u>

天然有機化合物の相対立体構造解析において、long range J_{CH}およびプロトンープ 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。特に、 multiplet に分裂した複雑なクロスピークでは long range J_{CH}ばかりか、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。例えば、ポリケタイド抗生物質に は-CH-CH(CH3)-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 相対立体の解析には、このメチンプロトンからのプロトンープロトン、および、プロ トンー炭素と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、既に BIRD-J-resolved HMBC 法を報告した⁽¹⁾。この方法は、隣接プロトンを decoupling し、スピン系を単純 化する方法であるが、観測される cross peak すべてが decoupling されるわけでない ため、解析が困難な場合がしばしばであった。このメチンプロトンのスピン結合を解 析する方法としては、新しく BASHD-J-resolved HMBC 法を開発した。

BASHD-J-resolved HMBC

BASHD-J-resolved HMBC 法は、プロトンープロトンのスピン結合した相手のプロトンを decouple し、単純なスピン系にしてそのプロトンを J-resolved HMBC-1 法と同 じように測定する。この方法は F1 軸で long range J_{CH}と proton-proton J_{HH}を測定す

BASHD, BASHD-J-resolved HMBC, J-resolved HMBC

ふりはたかずお、たしろみつる

るために J-scaling 法⁽²⁾を導入し、 nt1max を 300msec から 500msec 以上にスピン展開する。例えば、 J=2Hz を観測するためには、 digital resolution を 2n Hz 以下、 nt1max を 500msec 以上になるよう に、測定ポイントと scaling factor (n)を設定する。その結果、



Fig.1 BASHD-J-resolved HMBCのpulse系列

スピン結合定数は実際の値に対しn倍の値として観測される。BASHD-J-resolved HMBC 法のパルス系列はJ-resolved HMBC-1のパルス系列において、プロトンープロトンの decoupling を導入するために、J-分解法のプロトンの 180°パルスを BASHD (Band Selective Homo Decoupled pulse)パルスに置き換える^(3,4,5) (Fig. 1)。BASHD pulse は selective180° pulse と hard180° pulse の組み合わせである。そして、それに続く HMBC のパルス系列をCT-HMBCパルスに置き換える。これは、BASHD-J-分解法とCT-HMBC 法⁽⁶⁾との組み合わせである。Decouple するプロトンは selective180° pulse と hard 180° pulse を受け、0° pulse となり defocus する。一方その他のプロトンは180° pulse を受け J-modulation を生じる。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、nt1の展開時間の間で、 selective pulse を受けたプロトンは homo-decoupling が実行される。また、t1の展 開時間の間は constant time に設定されるため、J- modulation の展開はない。

<u>BASHD-J-resolved HMBC の模式図</u>

Fig. 2 は BASHD-J-resolved HMBC の模式図である。-CHa (CH3)-CHb-のスピン系において、(a) に J-resolved HMBC における cross peak を示す⁽²⁾。Ha は multiplet の cross peak であるが、J_{CH}の分裂は f1 軸に平行に分裂するため解析ができる。しかし、プロトンープロトンの解析は困難である。(b) では BASHD-J-resolved HMBC の cross peak である。目的とするプロトン(メチル基)を decouple した結果、cross peak は F1 軸に対して double-doublet に分裂する。この場合の J_{CH}の分裂は F1 軸に平行に分裂 するのに対して J_{HH}は傾斜して観測されるため、J_{CH}と J_{HH}との判別は容易である。(c) では Selective J-resolved HMBC の cross peak を示す⁽⁷⁾。ここでは Ha のプロトンの みを励起する。この場合、隣接したメチル基と Hb プロトンは decouple されるため、cross peak は BASHD-J-resolved HMBC よりは更に単純化し、J_{CH}のみの分裂となる。

この図において (a) J-resolved HMBC, (b) BASHD J-resolved HMBC, そして、 (c) Selective J-resolved HMBC において、 multipletのcross peakが特徴 ある分裂パターンを示した。プ ロトンープロトンのスピン結合 及び long range J_{CH} を観測する 場合には、BASHD-J-resolved HMBC 法が有効な方法になる。ま た、long range J_{CH} のみを測定す る場合は Selective J-resolved



HMBC 法の方が、スピン系がより 単純化され良好な cross peak を 与える。

<u>Portmicin への応用</u>

Fig.3 には portmicin の BASHD-J-resolved HMBC スペク トルを示す。メチル基を decoupleするために、0.3ppmから 2.0ppm の領域を励起した。 Re-burp の pulse 幅は 11.3msec であった。portmicin の H4 につ いて,(a) J-resolved HMBC, (b) BASHD-J-resolved HMBC、 (c) Selective-J-resolved HMBC

の拡大スペクトルを示す。 H4 は 4-Me と 3 位、4 位のプロト ンとスピン結合をし、multiplet に分裂している。また、T2 が早 いために S/N の良い cross peak が得られない。このプロトンに おいて、スピン結合を読み取る には困難である。

(a) の J-resolved HMBC におい て、H4 のプロトンから、 C3, C2, C5, C6 と 4-Me の 5 個のそ れぞれ傾斜した multiplet の cross peak を観測している。C3 と C5 の cross peak から long range J_{CH} が観測されているが、 プロトンープロトンのスピン結 合は読み取ることはできない。 (b) BASHD-J-resolved HMBC にお いては、H4 のプロトンから、 C3, C2, C5, C6 と 4-Me の 5 個の



cross peak を観測する。しかし、H4 は 4-Me を decouple しているため、J-resolved HMBC の cross peak よりは単純化され、proton-proton のスピン分裂は double-doublet に 分裂し、スピン結合の解析が可能な cross peak となっている。C3, C5 の cross peak からそれぞれ long range J_{CH} を読み取ることができる。しかし、この cross peak か らプロトンープロトンの spin 結合は観測できない。一方、C6, 4-Me の cross peak は long range J_{CH} が 3Hz と小さいために、cross peak は単純化され、プロトンープロト ンのスピン結合が観測できる。この cross peak から J_{HH} は 10.9 Hz と 3Hz 以下である ことが判明した。しかし、この値は J_{HH5} と J_{HH5} とのどちらのスピン結合なのか判別は 出来ない。これは COSY スペクトルなどから判断し、 J_{HH5} =10.9 Hz、 J_{H54} は 3Hz 以下 の小さい値であることが判明した。 (c)の Selective J-resolved HMBC においては、隣接プロトンすべてを decouple することができるため、非 常にシンプルな cross peak となり long range J_{CH} のみの分裂を与える。 その結果、 J_{HACS} =6.3 Hz, J_{HACS} =7.8 Hz



Fig.4 Newman projections along C3-C4 and C4-C5

を観測し、また、 J_{H4C2} = 5. 2Hz、 $J_{H4C6} \leq$ 3Hz 以下であることが判明した。この Selective J-resolved HMBC では long range J_{CH} の観測は容易であるが、プロトンープロトンの スピン結合の観測は困難である。

以上の結果を Fig. 4 の Newman の投影図に示す。H4 のメチンプロトンは 10.9Hz と 3Hz 以下の double doublet の分裂を示す。この H4 と H3 とのスピン結合は≦3Hz であ り gauche の関係にあるが、3-OMe と C2 は、H4 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、H4 と C2 の間 で long-range J_{CH} が 5.2Hz、H4 と C3 の間で 6.3Hz であったことから、H4 と C2 は anti、 H4 と 3-OMe は gauche の関係にあることが容易に判明した。また、H4 と H5 とスピン 結合は 10.9Hz を観測し、また H4 と C6, H4 と C5 の long range J_{CH} はそれぞれ≦3Hz と 7.8Hz を観測する。その結果、H4 と H3 は anti の関係に、H4 と C6 および C5 に結 合した酸素は gauche であることが判明した。

まとめ

J-resolved HMBC-1 法は F1 軸の分離能を高めるために long range J_{CH}およびプロト ンープロトンのJ値の解析が容易となる。しかし、multiplet シグナルでは解析は困 難である。一方、BASHD 法はプロトンープロトンの homo decoupling を可能にする。 この二つが結合した、BASHD-J-resolved HMBC 法は、目的のシグナルを decoupling し、複雑な multiplet のスピン系を単純なスピン系にし、long range J_{CH}およびプロ トンープロトンの J_H値の観測は容易となることが判明した。この方法は Me 基の付け 根のメチンプロトンという限られたスピン系の解析手段であるが、multiplet に分裂 したメチンプロトンにおいて、long range J_{CH}および、プロトンープロトン J_Hを如何 に観測するかという問題の一つの解決法である。この方法により、従来法では観測が 困難であった、メチンプロトンからの long range J_{CH}およびプロトンープロトン J_H

- 1) K. Furihata, M. Tashiro and H. Seto, Magn. Reson. Chem. 2011, 49, 53.
- 2) K. Furihata and H. Seto, Tetrahedron Lett., 1999, 40, 6271.
- 3) R. Broschweiler, C. Grisinger, O. W. Sorensen, R. R. Ernst, J. Magn. Reson. 1988, 78, 178.
- 4) V. V. Krishnamurthy, Magn. Reson. Chem. 1997, 35, 9.
- 5) K. Furihata, M. Tashiro and H. Seto, Magn. Reson. Chem. 2012, 50, 713.
- 6) K. Furihata and H. Seto: Tetrahedron Lett., 1998, 39, 7337.
- 7) K. Furihata, M. Tashiro and H. Seto, Magn. Reson. Chem. 2009, 47, 814.

大腸菌を用いた大量発現系によるアミノ酸選択標識技術 の最適化

○寺内勉^{1,2},宮ノ入洋平³,武田光広³,近藤早恵^{1,2},甲斐荘正恒^{1,2,3} ¹SAILテクノロジーズ株式会社 ²首都大学東京 戦略研究センター ³名古屋大学大学院 理学研究科附属構造生物学研究センター

Optimization of Amino Acid Selective Labeling using an *E. coli* Overexpression System

°Tsutomu Terauchi^{1, 2}, Yohei Miyanoiri³, Mitsuhiro Takeda³, Sanae Kondo^{1,2} and Masatsune Kainosho^{1,2,3}

¹SAIL Technologies Inc., Kanagawa, Japan.

²Center for Priority Areas, Tokyo Metropolitan University, Tokyo, Japan.
 ³Structural Biology Research Center, Graduate School of Science, Nagoya University, Aichi, Japan.

We developed a practical and robust method involving a conventional *E. coli* overexpression system for producing recombinant proteins selectively labeled with Ala, Arg, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Pro, Met, Thr, Tyr, Trp, and Val residues. Using our protocol, labeling rates higher than 90%, which is sufficient for a variety of NMR experiments, could be achieved for the 13 amino acid residues even on using only small amounts of labeled amino acids. A merit of this approach is that a variety of proteins that are otherwise difficult to produce can be obtained because of robust cellular expression, thereby providing an opportunity to apply this advanced isotope labeling method for a variety of proteins. Thus, the results of the current study, which involved the preparation of proteins labeled using SAIL amino acids in an otherwise deuterated background, show the feasibility of using this method for some proteins.

SAIL法をはじめとする高度な安定同位体利用NMR技術の進歩は、高分子量タンパク 質の立体構造情報、特にそれらの関与する相互作用や運動性と生物機能との関わりに ついてより詳細な情報の入手を可能にした。これらの技術では、²H、¹³C、¹⁵Nで位置・ 立体選択的に標識されたアミノ酸を代謝拡散させずに様々なNMR実験に資する十分な 標識率でタンパク質に取り込まれることが重要である。しかしながら大腸菌や酵母な どの生きた微生物、或いは培養細胞等を用いたin vivo 発現系では、アミノ酸代謝の 影響により多量の標識アミノ酸、或いはそれらの標識前駆体を用いてNMR用サンプル を作成する必要があった。このためSAIL法をはじめとする高度な安定同位体標識アミ ノ酸を用いたタンパク質調製法では、少量の標識アミノ酸でもアミノ酸代謝を制御し つつ高い標識率で標的タンパク質に取り込ませることが可能な無細胞タンパク質合 成系を推奨してきた。

SAIL法,安定同位体標識アミノ酸

○てらうちつとむ,みやのいりようへい,たけだみつひろ,こんどうさなえ,かいの しょうまさつね



Fig.1 Determination of labeling rate by GCMS

一方で現在多くのNMR研究者が日常的に利用している大腸菌の大量発現系を用いた標的タンパク質の調製技術は、無細胞タンパク質合成系とは異なり使用できるアミノ酸の種類に限界があると予想させるものの、タンパク質の特定部位の構造情報の入手等には数種類のアミノ酸を同位体標識するだけで十分な場合があることから、大腸菌の大量発現系による選択標識技術は、NMR研究者の習熟度や利用しやすさを考えると極めて有用である。そこで本研究では高度な安定同位体標識アミノ酸を用いたアミノ酸選択標識タンパク質の安価且つ簡便な調製技術の開発を目的とし、大腸菌を用いた大量発現系においてSAILアミノ酸でも使用できる少ない添加量で、代謝拡散を最低限に抑えることを可能にする発現プロトコルを検討した

本研究ではアミノ酸代謝の少ないAla、Arg、His、Ile、Leu、Lys、Phe、Pro、Met、 Thr、Tyr、TrpおよびValの13種類のアミノ酸において、タンパク質調製に必要最低限 のアミノ酸添加量を、GCMSを用いて決定した(Fig.1)。さらに個々のアミノ酸代謝 にも着目して細胞内のアミノ酸間の影響やインヒビター等も検討することにより、こ れら13種類のアミノ酸混合物における個々のアミノ酸の添加量の最適化を行った。そ の結果、多くのアミノ酸に関して無細胞タンパク質合成技術と同程度のアミノ酸使用 量で90%以上の標識率を与えるタンパク質調製プロトコルを確立することができた。 本研究ではさらにSAIL技術への応用として、添加量を最適化した13種類のアミノ酸に ついてSAILアミノ酸を一つのタンパク質に同時に取り込ませたmini-SAILタンパク質 の調製についても報告する。

オルトギ酸メチルを用いてポリジメチルシロキサンを分 解する過程のDOSY解析 〇曽我部 啓介^{1, 2},藤本 祐一郎¹,右手 浩一²,大谷 肇³ ¹株式会社カネカテクノリサーチ ²徳島大学大学院ソシオテクノサイエンス研究部 ³名古屋工業大学大学院

Dosy analysis of the decomposition process of polydimethylsiloxane by using methyl orthoformate

OKeisuke Sogabe^{1, 2}, Yuichiro Fujimoto¹, Koichi Ute² and Hajime Ohtani³ ¹ KANEKA TECHNO RESEACH CORPORATION, Osaka, Japan

²Department of Chemical Science and Technology, The University of Tokushima, Tokushima, Japan.

³Department of Materials Science and Engineering, Nagoya Institute of Technology, Aichi, Japan.

Polydimethylsiloxane (PDMS) was decomposed by methyl orthoformate in methanol. Process of the decomposition was monitored by ¹H DOSY. Diffusion coefficients (*D*) for the end-groups and the main chain of the PDMS increased with the passage of time. Number average molecular weight (M_n) was calculated from the intensity ratio of the resonances due to the end-groups and the main chain. Changes in M_n and *D* of PDMS were investigated.

〈緒言〉ポリシロキサンは耐熱性,耐候性,化学的安定性に優れている.この特性は、シロキサン結合(-Si-O-Si-)がC-C結合やC-O結合よりも大きな結合エネルギーを有することにより発現する.オルトギ酸メチル(MOF)を用いた分解法^{1), 2)}は,温和な酸性条件(反応温度100 ℃以下)でシロキサン結合を切断することができる.さらに、液状のポリジメチルシロキサン(PDMS)ならば、室温でも分解可能である.著者らはPDMSやその架橋物、さらには無機物を含むPDMS架橋物を,MOFを含む溶液により分解する方法を報告した³⁾.その報告の中では、PDMSが分解する過程を¹H NMR法により追跡したが、PDMSの分子量の経時変化を観測することはしていなかった.分子量の変化を測定する最も一般的な方法はSECであるが、希薄な溶液の中の高分子の分子量とDiffusion Ordered Spectroscopy (DOSY)から求めた自己拡散係数(D)が相関関係を有することはすでに知られている⁴⁾.DOSY測定を連続的に行えば、SEC測定のように反応途中の溶液を逐次取り出す必要なしに溶質が変化する様子を追跡できる.本研究では、PDMSがMOFを含む溶液中で分解する過程を、¹H DOSYにより分析した.

〈実験〉MOF(関東化学),脱水メタノール(関東化学),硫酸(関東化学)を適量 混合したMOF分解溶媒(以下MOF solv.とする)500 mgをビニル末端ポリジメチルシ ロキサン(数平均分子量 8,000)30 mgに加えて,その一部を外径2 mmのNMR測定用

MOF分解法,¹H DOSY,反応時間依存性

○そがべけいすけ、ふじもとゆういちろう、うてこういち、おおたにはじめ

2重試料管の内挿管に移し、封管した.外径5 mmのNMR試料管にテトラメチルシラン を混合した重クロロホルムを移した後に先に封管した外径2 mmの内挿管を挿入し, ¹H NMR測定に供した.NMR装置はVARIAN製Unity-INOVA 600分光計を用いた.¹H DOSY測定にはDbppste-ledパルスシーケンスを使用した.データの解析にはNMR tec 製Gifa 5.2ソフトウエアを使用し,逆ラプラス変換には最大エントロピー法を用いた^{5),6}.

〈結果と考察〉 PDMS / MOF solv.を, 20 ℃ で30 min毎に¹H DOSYと休止を繰り返して NMR測定した.0.3~0.5 ppmに3本のピーク が検出され(低磁場側からx~zとする), x~zはそれぞれPDMS主鎖, PDMS末端, ジメトキシジメチルシラン (DMS) のSi に結合したメチルプロトンであると帰属 した. $x \sim z$ の組成 (以下 $C_x \sim C_z$ とする) $\epsilon^1 H$ DOSY測定アレイの1本目の¹H NMRスペク トルから読取り, それらの経時変化を追跡 した結果をFig.1に示す. Cx, Czはそれぞれ 単調に減少または増加し、Cvは6時間後に 最大値を示し、その後減少した. x~zの拡 散係数 (以下 $D_x \sim D_z$ とする) および数平均 分子量(M_n)の反応時間依存性をFig.2に 示す. 分子量はxとvの積分比およびPDMS 繰り返し単位の式量から求められる. Mn は時間の経過と共に減少した. Dx, Dvは 時間経過とともに単調に増加し、分子量低 下と良い相関を示した. D,はDMSのDであ るので、一定の値を示した、同じ時間に計 測されたD_vがD_xより大きいのは,前者のD の分布曲線がポリマー鎖のモル分率に比 例するのに対し、後者のそれは重量分率に 比例するためである.



Fig.1 Time dependence of composition of peak x, y and z.



Fig.2 Time dependence of D and M_n of peak x, y and z.

MOFを用いたPDMSの分解過程で起きる分子量低下とDの経時変化を¹H NMRと¹H DOSYにより追跡することができた.この方法は、より分子量の高いPDMSや、ポリエーテルやポリカーボネートなどの他のポリマーにも応用可能である.

- 1) 日本国特許第3529854号
- 2) 日本国特許第3529858号
- 3) 2012高分子分析討論会
- 4) W. Li, H. Chung, C. Daeffler, J. A. Johnson, R. H. Grubbs, Macromolecules., 45, 9595(2012)
- 5) M. A. Delsuc, T. E. Malliavin, Anal. Chem., 70, 2146 (1998)

6) L. Nyadong, G. A. Harris, S. Balayssac, A. S. Galhena, M. M. Martino, R. Martino, R. M. Parry, M. D. Wang, F. M. Fernández, V. Gilard, *Anal. Chem.*, **81**, 4803 (2009)

In-cell NMRを用いた, HeLa細胞内のストレス応答に よるCa²⁺濃度変化のモニタリング

Dambarudhar Shiba Sanker Hembram¹, ○鴨志田 一¹, 晴被 貴洋¹, 濱津 順平¹, 井上 仁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)

An in-cell NMR study of monitoring stress-induced increase of cytosolic Ca²⁺ concentration in HeLa cells

Dambarudhar Shiba Sanker Hembram¹, OHajime kamoshida¹, Takahiro Haremaki¹, Junpei Hamatsu¹, Jin inoue¹, Teppei Ikeya¹, Masaki Mishima¹, Masahiro Shirakawa²

and Yutaka Ito¹

(¹Dept. of Chem., Tokyo Metropolitan Univ., ²Dept. of Eng., Univ. of Kyoto)

Recent developments in in-cell NMR techniques have allowed us to study proteins in details inside living eukaryotic cells. The lifetime of in-cell NMR sample is however much shorter than that in culture media, presumably because of various stress as well as the nutrient depletion in the anaerobic environment within the NMR tube. It is well known that Ca^{2+} -burst occur in HeLa cells under various stress. In this study, aiming at monitoring the states of proteins resulting from the change of cytosolic Ca^{2+} concentration during experiments, human calbindin D_{9k} was used as the model protein and cultured HeLa cells as host cells.

【緒言】

In-cell NMR¹ 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 注目されており, 2001 年に提案されてからこれまで様々な系に適用されてきた. 一方 で, 様々な原因から, 真核細胞・原核細胞を問わず NMR 試料管中の細胞は培地中 に比べて寿命が短く, より生理的条件に近い測定条件の検討が必要となっている.

本研究では、in-cell NMR 測定条件での真核細胞の状態を検証するために、細胞 のストレス応答の一つとして引き起こされる細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇を in-cell NMR で 観測することを試みた². ホスト細胞としてはヒト HeLa 細胞を用い、細胞内に導入する 標的蛋白質としては、 Ca^{2+} 結合蛋白質であり、 Ca^{2+} のバッファーの機能を担っている と考えられている、ヒト calbindin D_{9k} (79 a.a.)を用いた.

In-cell NMR, HeLa cells, Calbindin D_{9k}

だんばるだーる しば しゃんかる へんぶらむ, 〇かもしだ はじめ, はれまき たかひろ, はまつ じゅんぺい, いのうえ じん, いけや てっぺい, みしま まさき, しらかわ まさひろ, いとう ゆたか 【実験】

HeLa 細胞を用いて in-cell NMR 測定するために, 猪股らによって開発された, 細胞膜透過ペプチド (cell-penetrating peptides, CPP)を目的試料とジスルフィド結合 させ, 細胞内に導入する方法 ³を利用した.本実験では, calbindin D_{9k}に Pro47 残 基における cis-trans 異性化を妨げる変異 (P47M)と, CPP との結合用の C 末端 Cys 残基を変異導入したものを作成し[calbindin D_{9k}(P47M+C80)], 大腸菌内の大量発 現系を用いて, ¹³C/¹⁵N 標識した試料を作成した. 続いて, 精製した calbindin D_{9k}を CPP と結合させ, HeLa 細胞内に導入し, 2D ¹H-¹⁵N SOFAST-HMQC 測定を行った. 測定は, 間接観測軸 (¹⁵N 軸) に nonlinear sampling を適用し, 1D MaxEnt を 用いてスペクトルを再構築した.

【結果・考察】

CPP を用いた HeLa 細胞への導入は非常に効率よく行われ,良好な 2D¹H⁻¹⁵N SOFAST-HMQC スペクトルが観測できた.しかし, *in vitro* で測定した, apo 型, Mg²⁺結合型, Ca²⁺結合型のスペクトルとの比較から, HeLa 細胞内の calbindin D_{9k} は,測定開始直後はMg²⁺結合型であり,その後経時的に Ca²⁺結合型へ変化することが判明した(Fig.1). 細胞内は Ca²⁺濃度は低く保たれており(10⁻⁷ M), 一方で Mg²⁺ 濃度は高い(~10⁻³ M)ことから, 細胞内に導入された直後は Mg²⁺型になっており,その後様々なストレスによって小胞体から Ca²⁺放出が起こったために,次第に Ca²⁺結合型に変化したと考えられる.



Fig1. Time course of the 2D ${}^{1}\text{H}{-}{}^{15}\text{N}$ SOFAST-HMQC spectra of uniformly ${}^{15}\text{N}{-}$ labelled calbindin D_{9k}(P47M+C80) in HeLa cells. The spectra were obtained during the period of 0-38 min (a), 39-76 min (b), 77-114 min (c), 115-152min (d), 153-190min (e) from the start of the in-cell NMR experiments.

【参考文献】

- (1) Serber, Z. et al. J. Am. Chem. Soc. 123, 2446-2447 (2001)
- (2) Hembram, D. S. S. et al. Biophys. Biochem. Res. Comun. 438, 653-659 (2013)
- (3) Inomata, K. et al. Nature 458, 106-109 (2009)

リン系誘導体化試薬による樹脂中の微量水酸基、カルボン酸基分析の検討

○仲村仁浩¹,佐野純子¹ ¹DIC株式会社・分析センター

Quantitative Determination of Hydroxyl and Carboxylic Acid Groups in Synthetic Polymers by ³¹P-NMR Spectroscopy

OMasahiro Nakamura¹, and Junko Sano¹ ¹DIC Corporation, Chiba, Japan.

The end groups of synthetic resins affect drastically their physical properties and performance as products. For analysis of hydroxyl and carboxylic groups in some kinds of polymers, the derivatization using 2-chloro-4,4,5,5-tetramethyldioxaphospholane (TMDP) followed by ³¹P-NMR spectroscopy^{1, 2)} was investigated. This efficient and convenient method was found to analyze the small amount of end groups in polymers.

【序論】

合成樹脂は様々な用途に使用されるが、微量の末端基が全体の物性に影響を与える ことが多い。構造解析においては、現在 NMR 法が必須の分析法となっているが、樹 脂中の末端水酸基、カルボン酸の定性、定量に関しては、特に微量の場合には¹H、 ¹³C-NMR法では困難となる。それは水酸基やカルボン酸基に由来するピークは、ケミ カルシフトが測定条件によってシフトすることが多く、また微量となるとピークの検 出が困難になるからである。この微量の水酸基やカルボン酸基は、樹脂の反応性や塗 膜の密着性等の物性に影響を与えることが多く、これらの定性、定量は企業の製品開 発において重要な課題となっている。一方、Spyros らは植物油やアルキッド樹脂を用 いてそれらの微量水酸基、カルボン酸基の定性、定量を検討している^{1,2)}。そこで、今 回はSpyrosらが報告しているリン系誘導体化試薬 2-chloro-4,4,5,5-tetramethyldioxaphospholane (TMDP)を用いて種々の樹脂について水酸基、及びカルボン酸の誘導体化 を行い、その手法の有効性について検討を行ったので報告する。

【実験】

装置はJEOL RESONANCE社製 JNM-ECA500型核磁気共鳴装置を使用した。試料に用いた樹脂は社内合成品あるいは市販品を用いた。

試料量は水酸基やカルボン酸基の量によっても異なるが、1mg~数100mgとした。これに緩和試薬としてCr(acac)3を添加したピリジンとCDCl3の混合溶液0.5ml、及び誘導体化試薬TMDP 30µlを添加し、室温で2時間静置した後、³¹P-NMRをゲートデカップリング法で測定した。定量の内部標準としてシクロヘキサノールを使用した。TMDPによる誘導体化の反応スキームを以下に示す。

リン系誘導体化試薬,³¹P NMR,末端基

○なかむらまさひろ, さのじゅんこ



X=0, COO, CO

Scheme 1

【結果】

一例として、ひまし油/無水フタル酸 (PAn) /トリメチロールプロパン (TMP) 系アル キッド樹脂について、TMDPによる誘導体化を行った後の³¹P-NMRスペクトルをFig. 1 に示す。誘導体化されたシクロヘキサノール由来のピークを145.2ppmとした。標準モ

ノマーを用いて解析した結果、 146~147ppmに現れたピークが 水酸基、135ppm付近のピークE が PAn の末端カルボン酸由来 のピークであることが分かっ た。さらに水酸基成分のピーク については、Aがひまし油中の リシノール酸中の水酸基、Bが 1.3-ジグリセライド、CがTMP 中の水酸基由来と推定された。 CのTMP由来のピークが分裂す ることについてはTMPアセチ ル化物のTMDP誘導体化によっ て確認した。Fig. 2にTMPアセチ ル化物のTMDP誘導体化後の ³¹P-NMRスペクトルを示す。Fig. 2より、TMPに結合したアセチル 基の数によってピークが分裂し ていることが分かる。これらの 結果より、³¹Pのケミカルシフト が構造に敏感であり、樹脂末端 の詳細解析が可能であることが 示唆された。

その他、ポリエステル、フェ ノール樹脂等についても検討 を行った。詳細はポスターで報 告する。



Fig. 1³¹P-NMR spectrum of derivatized alkyd resin.



Fig. 2³¹P-NMR spectrum of derivatized acetylated TMP.

参考文献

- 1) A. Spyros and P. Dais, J. Agric. Food. Chem., 48, 802 (2000)
- 2) A. Spyros, J. Appl. Polym. Sci., 83, 1635 (2002)

多核NMRによる液相析出反応における酸化チタン薄膜の析出機構の解析

○ 牧 秀志・奥村雄三・水畑 穣神戸大学大学院・工学研究科

Deposition Mechanism Analysis of TiO₂ Thin Films by the LPD Process with Multi Nuclear NMR.

oHideshi Maki, Yuzo Okumura, and Minoru Mizuhata Graduate School of Engineering, Kobe University, Hyogo, Japan

The Liquid Phase Deposition (LPD) reaction mechanism for preparing TiO₂ films was investigated by ¹⁹F NMR analysis. In the LPD reaction solutions, ¹⁹F NMR spectra indicated that $BF_3(OH)^-$ formed within a short reaction time, and the concentration of $BF_3(OH)^-$ was much higher than that of BF_4^- during the reaction. The concentration of fluoride ions which were not scavenged by H_3BO_3 was higher with increasing the concentration of $(NH_4)_2TiF_6$. The complicated equilibrium behaviour of these various intermediate species in the LPD reaction solutions will affect the surface morphologies and the amount of yields of the metal oxide thin films.

【緒言】液相析出 (LPD) 法は金属フッ化物錯体 ($MF_x^{(x-2n)}$)の加水分解平衡反応 (1) を、フッ化物イオンとより安定な錯体 (BF_4) を形成する H_3BO_3 を添加する (2) こ とにより酸化物(MO_n)析出側へ平衡をシフトさせ、金属酸化物薄膜を得る方法である。

> (析出反応) $MF_x^{(x-2n)-} + nH_2O \Leftrightarrow MO_n + xF^- + 2nH^+$ (1) (駆動反応) $H_3BO_3 + 4H^+ + 4F^- \rightarrow BF_4^- + H_3O^+ + 2H_2O$ (2)

これまでに LPD 法により SiO₂, V₂O₅ などをはじめとした様々な金属酸化物薄膜の合成が報告されているが、中でも TiO₂ 薄膜合成系における研究は広く行われており、反応種の濃度や pH 等の濃度条件により外観や組成の異なる膜形成が行われることが知られている^[1]。こうした条件の最適化が新規金属酸化物薄膜合成法の開発へと繋がることが期待されるが、本手法による従来の研究報告は主として合成された薄膜の形状や物性に関する検討が多い。そこで本研究では、主として¹⁹F NMR を用いた多核NMR 測定およびそのスペクトル定量解析により LPD 法による TiO₂ 薄膜合成系の溶液内イオン平衡を解析し、液相析出反応の反応機構に関する考察を行った。

【実験方法】H₃BO₃を0.20 mol L⁻¹ で固定し、(NH₄)₂TiF₆を0.025,0.10,0.20 mol L⁻¹の 3 つの濃度に調製したものを反応溶液とした。ここに親水処理を施したガラス基板を 浸漬し、30°C にて所定時間反応後の反応溶液を分析するとともに、基板を取り出し 洗浄、乾燥させたものを試料とした。試料の評価には SEM, XRD,反応溶液の分析に は主として¹⁹F NMR を用いた。各反応化学種の濃度は、外部基準である 1.0 mol L⁻¹ の KF 水溶液中の F^{-0 19}F NMR ピーク積分強度との比較から算出した。さらに、H₃BO₃ と(NH₄)₂TiF₆濃度を一定条件下で溶液の初期 pH を変化させ、薄膜の表面性状や析出

液相析出法,薄膜,多核NMR

oまき ひでし、おくむら ゆうぞう、みずはた みのる

量との関連を調べた。

【結果と考察】試料の表面 SEM 像及び XRD 測定結果から、(NH4)っTiF6 0.025 mol L⁻¹ の時に、表面に白濁を伴う TiO₂ (anatase) 薄膜、0.10mol L⁻¹の時に透明な TiO₂ (anatase) 薄膜、0.20 mol L⁻¹の時に NH₄TiOF₃ で表される微結晶の成長が確認され、濃度条件に より外観及び組成の異なる3種類の膜が得られることが確認された。

次に反応溶液の分析を行った。Fig. 1 に (NH₄)₂TiF₆ 水溶液 0.10 mol L⁻¹ 及び、 (NH₄)₂TiF₆と H₃BO₃をそれぞれ 0.10, 0.20 mol L⁻¹にて LPD 反応開始後の各反応時間に おける¹⁹F NMR スペクトルを示した。LPD 反応開始前の(NH₄)₂TiF₆ 水溶液 0.10 mol L⁻¹ のスペクトルから TiF₆²⁻に帰属されるピークのみが観察され、LPD 反応開始1時間以 降には BF₃(OH), 6 時間以降に BF₄に帰属されるピークが観察された。一方、析出反 応により生成する遊離 Fに帰属されるピークは観察されなかった。この結果は、 (NH₄)₂TiF₆濃度が 0.025, 0.20 mol L⁻¹の場合にも共通していた。Fig. 2 に ¹⁹F NMR シグ ナルの面積強度解析により決定された TiF62-, BF3(OH), BF4濃度の反応時間依存性を 示す。ホウ酸によるフッ素捕捉反応における主生成物が、従来考えられてきた BF4 ではなく、BF3(OH)であることが分かった。さらに反応前後のフッ素の物質収支より、 減少した TiF₆²中のフッ素量よりも生成した BF₃(OH) 及び BF₄中のフッ素総量が少な いことが分かった。これは反応化学種間の高速な配位子交換によるシグナルの広幅化 のため NMR ピークの直接観測は不可能な化学種 TiF_{6-r}(H₂O)_r (x > 0)の存在を示唆す る結果であり、薄膜中にフッ素が取り込まれる原因であると考えられる。以上より、 LPD 反応溶液中において安定に溶存している化学種の同定及び定量から、加水分解に よりFはTi から全て外れるのではなくTiとの結合を保持したまま溶存していること が示唆された。またこのような Fは(NH4)っTiF6濃度に依存して多いことが分かり、こ のことが析出物の構造の違いに影響を与えたと考えられる。一方で、反応溶液の初期 pH の僅かな差異が、薄膜の析出量や結晶性、表面構造に大きな影響を与えることも 分かった。LPD 反応の前駆体である金属フルオロ錯体の過飽和状態の制御が、反応速 度などを通じて種々の薄膜物性に大きな影響を及ぼすことが明らかになった。

【引用文献】

[1] S. Deki et al., Chem. Lett., 25, 433 (1996)





Fig. 1 ¹⁹F NMR spectra of 0.1 mol L⁻¹ (NH₄)₂TiF₆ aq. Fig.2 Reaction time dependence of the concentration of the

 $(NH_4)_2 TiF_6 aq.$: (a) 0.025 mol L⁻¹, (b) 0.10 mol L⁻¹, (c) 0.20 mol L⁻¹. H_3BO_3 aq. : 0.20 mol L⁻¹. •: TiF₆²⁻, **=**: BF₃(OH)⁻, \blacktriangle : BF₄⁻

NMRによる多価アルコールおよびエーテルの定量分析 〇竹嶋奈緒美¹, 土屋耕一¹ ¹日本化薬株式会社・分析グループ

Quantitative analysis of polyol and ether by the NMR

ONaomi Takeshima¹, and Kouichi Tuchiya¹ ¹Analytical Research Group, NIPPON KAYAKU CO., LTD., Tokyo, Japan.

Almost inks for ink jet printers contain not only colors but also many kinds of solvents and additives. The performance of the inks depends on the ratio in mixture containing solvents and additives. Usually, we use GC/MS to do quantitative analysis of the ratio. But recently research about quantitative nuclear magnetic resonance (qNMR) shows that it is easy, fast, and accurate quantitative analysis. So we challenged fitting qNMR methods for solvents and additives analysis. In this study, we tried the quantitation of the mixture containing glycerin and triethylene glycol monobutyl ether (TEGMBE) in D_2O at once measurement. In this case, the signals appeared in the same region between 3.50-3.85ppm, which were attributable to the methine and methylene protons of the glycerol and ethylene oxide protons of the TEGMBE. We challenged the separation of these overlap signals.

[諸言]

P50

インクジェットプリンタなどに利用されるインクは、色素の他に種々の溶剤や界面 活性剤などの添加剤がある一定の割合で混合している。この割合の微妙な違いがイン クとしての性能を左右する。

インクの溶剤などの定量は、主にGC/MSで行うが、最近の論文で、定量NMRの精度が 格段に上がってきたこと¹⁾、また300倍以上の濃度差のサンプルについての定量が可能 であること²⁾が報告されていることもあり、一斉にNMRにて溶剤の定量分析できるか、 適用を試みた。

今回は一般的にインクに利用される溶剤である、グリセリンとトリエチレングリコールモノブチルエーテル(TEGMBE)をほぼ当量ずつD₂0に溶解した混合溶液をモデルサンプルとして、定量分析を行った。

[実験]

グリセリン、TEGMBEを各10mg、内部標準試薬として 3-(Trimethyl silyl)propionic-2,2,3,3-d4 acid sodium salt 2mgをD₂0にて希釈し、 測定を行った。緩和時間は30秒、積算回数は8回である。 [結果と考察]

TEGMBEのメチルなどは高磁場に独立したシグナルとして現れるため、正確な定量が可能であった(Fig. 1)。しかしグリセリンに関しては、全てのシグナルがTEGMBEのシ グナルと重なってしまうため正確な定量ができなかった(Fig. 2-a)。

キーワード: 定量NMR

○たけしまなおみ,つちやこういち



Fig.1 ¹H NMR spectra of glycerin and TEGMBE (0ppm-2ppm)



Fig.2 ¹H NMR spectra of glycerin and TEGMBE obtained with (a) signal in D_2O (b) signal in D_2O pH1.0. (3.5ppm-3.9ppm)

そこで、なるべく簡便にグリセリンのシグナルをTEGMBEのシグナルから分離させる 方法を検討した。まず文献¹⁾などを参考にし、サンプルの液性の調整を試みた (Fig. 2-b)。pH1付近に液性を変化させると、グリセリンのオキシメチンのシグナルが 約0.02ppm低磁場へシフトし、完全に分離した。定量NMRにおいて、シグナルが独立し、 その前後のベースラインが平らであることは定量精度向上のために必要な条件であ る。よってpH調整を行う事で当サンプルの定量NMR測定が可能になることが分かった。

次に、重溶媒を変えてシグナルの分離が向上するか試した。文献²⁾を参考にし、種々の重溶媒にサンプルを溶解させた後、NMR測定を行った。その結果、トリフルオロ酢酸-d(TFA-d)に溶解させると、シグナルの分離がD₂0と比較して良くなった(Fig. 3)。

またTEGMBEのオキシメチレンのシ グナルが3.75ppmに単独で出現し、 グリセリンのオキシメチンのシグ ナルが4.2ppm付近に分離した。しか し1日後に測定してみると、未帰属 のシグナルが多数出現していた。こ れはグリセリンとTFA-dで何らかの 反応が起こったものと考えられる が、定量性の精度に影響を及ぼすた め、TFA-dのみの溶媒は、当モデル サンプルの定量NMRには不向きであ ると考えられる。



Fig.3 ¹H NMR spectra of glycerin and TEGMBE obtained with (a) signal in D_2O (b) signal in TFA-*d*

発表では、その他の溶剤に対しての検討結果も報告する。

[参考文献]

- 1) F.Malz et al., J. Pharmaceut. Biomed. Anal., 38, 813-823 (2005)
- 2) R.Koike et al., BUNSEKI KAGAKU, 54, 715-722 (2005)

異なる栄養源条件下における微細藻類の代謝動態の比較 解析

○小林俊哉¹,小松功典^{1,2}、菊地淳^{1,2,3,4} ¹橫市院生命医、²理研CSRS、³理研BMEP、⁴名大院生命農

Comparative analysis of metabolic dynamics in microalgae system upon different nutrient condition

○Toshiya Kobayashi¹, Takanori Komatsu^{1,2} and Jun Kikuchi^{1, 2, 3, 4} ¹Grad.Sch.Medical Life Science, Yokohama City Univ., ²RIKEN CSRS, ³RIKEN BMEP ⁴Grad. Sch. Bioagri., Nagoya Univ

Microalgae system has "flexible" metabolic dynamics upon surrounding environmental changes such as different nutrient condition. We have investigated ¹³C/¹⁵N labeling conditions in microalgae system such as chlorella, and detected both water-soluble metabolites and macromolecular components in ¹H-¹³C-HSQC spectra. Furthermore, use of ¹H-¹³C-HSQC-TOCSY and 3D-HCCH-COSY spectra help to identify as many as metabolites and macromolecular sugar moieties each other. Since the microalgae has unique metabolic system to storage its carbon sources into polysaccharides, we will discuss such environmental response and its polymer characterization by a variety of NMR techniques.

【序論】

微細藻類は、海洋に約30億年前に発生してから鉄の沈降や酸素生産等、現在の青い 地球環境形成に甚大な影響を及ぼし、現在では10万種に及ぶ多様性を有している。そ の永い進化史や膨大な多様性から予想できるように、種特有の物質生産・環境応答シ ステムを有する。こうした微細藻類の代謝能力や水圏環境で培養できる特性を活かし、 健康食品、医薬品、飼料から水質浄化、燃料など幅広い分野への応用が期待されてい る。このように、水圏栄養という環境条件の変化への代謝応答を追跡する手法を構築 すれば、環境浄化や物質生産および利用プロセスを評価する一助となり得ると考え、 未標識培地で代謝応答を簡易評価する系、および標識培地で代謝物や貯蔵多糖のより 詳細な評価を行う実験系の構築を試みた。

【方法】

クロレラ (*Parachlorella kessleri*)を、各種培地、および¹³C/¹⁵N標識培地を用いて、 12/12時間の明暗周期で27℃において振とう培養した。細胞を回収し、その極性代謝 物を、重水化したリン酸カリウム緩衝液 (pH=7.0)を用いて抽出し、NMR試料とし た。共鳴周波数700 MHzのNMR装置を用いて各種NMR計測をおこなった。また、抽 出後の残渣を水、およびHFAによって洗浄し、ボールミルによって3時間粉砕し、 DMSO- d_6 / pyridine- d_5 = 4:1 (v/v) によって高分子成分を抽出し、¹H-¹³C-HSQC、 3D-HCCH-COSYスペクトルを測定した。

微細藻類,安定同位体標識,代謝動態解析

○こばやしとしや、こまつたかのり,きくちじゅん





【結果および考察】

¹³C/¹⁵N標識培地において培養したクロレラの極性代謝物の¹H-¹³C-HSQC-TOCSYスペ クトルをFig. 1に示す。シグナルは、SpinAssignによってアノテーションを行い、 ¹H-¹³C-HSQC-TOCSYによって詳細な帰属をおこなった。アルギニンやセリンとピー クが重なっているエタノールアミンリン酸,およびラフィノースと多くのピークが重 なっているスクロースなどが帰属できた。さらに、DMSO-*d*₆ / pyridine-*d*₅混合溶媒に よって抽出した高分子成分の¹H-¹³C-HSQC、3D-HCCH-COSYスペクトルをFig. 2に示 す。3D-HCCH-COSYによって¹H-¹³C-HSQCスペクトルに、スターチおよび未同定の五 炭糖の糖残基のピークが検出された。

このように安定 同位体培地を用い ることで、代謝物か ら多糖類まで網羅 的な成分解析が可 能になる。今後、栄 養源を変える、種を 変える、内部貯蔵多 糖などの高分子分 析など多角的な観 点から、代謝動態の 比較解析を行う予 定である。例えば、 微細藻類には陸上 の動植物が生合成 できない代謝物や 貯蔵多糖を生産す



Fig. 2 1 H- 13 C-HSQC and HCCH-COSY spectra of DMSO- d_6 / pyridine- d_5 soluble polysaccharides in chlorella.

るものも存在する。特に、ユーグレナはパラミロンという独自の貯蔵多糖を蓄積する ことが知られている。このような独自の化合物の物性などを溶液および固体NMR法に よって解明していきたい。

水産物の恒常性維持・品質向上を目指したプローブ試料 管理および評価技術開発

○佐藤有穂¹,朝倉大河¹、伊達康博¹²,菊地淳^{1,2,3,4,} ¹横市院生命医、²理研CSRS、³理研BMEP、⁴名大院生命農

Development of non-invasively evaluation method for quality improvement and maintenance of fishery resources

○Yuho Sato¹, Taiga Asakura¹, Yasuhiro Date^{1,2}, Jun Kikuchi^{1,2,3,4} ¹Yokohama City Univ., ²RIKEN CSRS, ³RIKEN BMEP, ⁴ Nagoya Univ.

Food crisis and population growth is becoming a serious problem worldwide, and expected that further utilization of abundant fishery resources, namely in global ocean-faced county such as Japan. We are trying to develop non-invasive evaluation method for fishery resources using ¹H-NMR metabolomics of feces and intestinal contents from fishes. These probe samples were collected from fish water tanks by time-dependent manner, and then freeze-dried and extracted by KPi and MeOD solvents. NMR metabolic profiles of fish feces were mainly clarified by species variations and environmental adaptation from the wild life to laboratory life in fish water tanks. Our result suggests one of the effective processes as non-invasive maintenance for cultured fish.

【背景・目的】 世界的な人口増加、食糧危機という背景を受け、日本に豊富に存在 する水産資源のさらなる活用が嘱望されており、魚類における個体検査や健康管理、 品質管理・向上に資する技術開発が重要である。そこで我々は、すでにヒトやマウス で行われている糞便や尿を用いた健康管理技術に着目し、魚類の糞便・腸内容物をプ ローブ試料として用いることで、健康状態・生理機能について評価可能な非侵襲的検 査技術の確立および品質管理技術の向上に資する技術開発を目指している。本研究で は、NMRメタボロミクスを主軸とした代謝プロファイリング技術の構築とそれによる プローブ試料評価法開発を試みた。

【方法】 本研究では魚類糞便・腸内容物についての解析と評価を行うため、スズキ 目キス科シロギス(Sillago japonica)・スズキ目ハタ科マハタ(Epinephelus septemfasciatus)・カサゴ目フサカサゴ科シロメバル(Sebastes cheni)・カサゴ目フサ カサゴ科カサゴ(Sebas tiscus marmoratus)を中心とした多種多様な魚類を天然環境か ら採集し、人工海水水槽にて種ごとに飼育し、定期的に糞便のサンプリングを行った。 採集後の糞便は凍結乾燥しオートミルによる破砕を行なった。得られた粉末サンプル はMeODおよびKPi/D₂O溶媒を用いて抽出し、700MHzのNMR装置を用いて¹H-NMR計 測した。これらの多検体スペクトルデータをbin化処理により数値化・マトリックス化 した後、フリーソフトウエアRを用いて主成分分析(PCA)等の多変量解析により評 価した。

水産資源、試料管理技術開発、代謝プロファイリング

○さとうゆほ,あさくらたいが,だてやすひろ,きくちじゅん

【結果・考察】 水槽で飼育された魚類から得られる糞便サンプルは量に限りがあり、 最少量で生理・健康状態を反映するデータ抽出を行うべく条件検討を行なった。凍結 乾燥後、オートミル破砕を行なった粉末サンプルを2 mg、5 mg、10 mgずつそれぞれ 量りとり、KPiおよびMeOD溶媒を用いて抽出し、¹H-NMRで計測した。その結果、2 mg ではS/N比が低く、最低でも5 mg以上の量が必要であることがわかった。また、KPi 溶媒では低分子由来のシグナルがほとんど観察できなかったことから、サンプルは水 中下で水溶性の低分子が溶け出してしまっている可能性が示唆された。

次に、種の多様性および時系列による変化を観察するため種数およびサンプル数を 増やして計測を行ない、PCAにより評価した結果(Figure 1)、種の違いを反映して クラスタリングされる傾向にあった。スピンアサインによってアノテーションをつけ、 ローディングプロットにより解析した結果(Figure 2)、脂質およびステロイド様物 質が、海水魚、なかでもカサゴ・マハタに豊富に含まれている傾向にあることを明ら かにした。これは陸上動物の大腸でも見られる胆汁酸等の両親媒性物性の物質が、魚 類の消化管構造と機能が多様な

短の宿宅皆構造と機能が多様な ために、魚種ごとの特徴がある ことを示唆していると考えられ た。また、同一種内において比 較すると、種によっては飼育期 間の違いによって代謝プロファ イルが変動している様子も示唆 されており、今後は天然環境下 と水槽飼育下での違い、あるい は個体差に起因する代謝プロフ ァイルへの影響を詳細に評価し ていく必要があると考えられる。

以上のことから、生育環境・ 食餌の違い、および種による違 いが糞便の代謝プロファイリン グに影響をもたらすこと示唆さ れた。魚類糞便には生理状態や 健康状態の情報が反映されてい ることが予想され、養殖魚類の 非侵襲的な検査技術として可能 性を検討していく。特に、サン プル数を増やした多変量解析と もに、腸内容物と糞便サンプル との比較・解析も行うことで、 その化学組成や微生物叢組成の 差異についても明らかにし、魚 類養殖技術における付加価値創 出に資する知見収集を試みる。



Figure 1: PCA score plot of NMR spectra of fish feces



Figure 2: Loading plot of NMR spectra of fish feces



ヒト由来非侵襲的試料を用いたNMR計測技術高度化の試み 〇三澤拓真¹,伊達康博^{1,2},菊地淳^{1,2,3,4} ¹横市院生命医科,²理研CSRS,³理研BMEP,⁴名大院生命農

Advanced sample control techniques using NMR measurements for noninvasive human samples

^OTakuma Misawa¹, Yasuhiro Date^{1,2} and Jun Kikuchi^{1,2,3,4} ¹Yokohama City Univ., Kanagawa, Japan, ²RIKEN CSRS, Kanagawa, Japan, ³RIKEN BMEP, Kanagawa, Japan, ⁴Nagoya Univ., Aichi, Japan

Noninvasive human samplings are important to alleviate pain with clinical test in a field of medical care. Metabolic profiling from the noninvasive samples may bring medical benefits such as discovering of biomarkers. In this study, we focused on the determining of most suitable condition for analyzing noninvasive human samples using NMR. According to the method optimized by our research, we performed PCA for noninvasive human samples collected from some volunteers. Our results will provide to advance in metabolic profiling technique for analyzing noninvasive human samples to lead to discovering of biomarkers by the modifications and optimizations.

【序論】

ヒトを対象とした研究及び検査で用いられる検体には血液や髄液など、侵襲性を有 するものが多く存在する。これは患者にとっての負担であることに加え、疾患予備軍 と呼ばれる人たちが、自らの健康状態を把握する上で障害となりうる。そこで我々は、 非侵襲的に手に入る検体から生体情報を抽出し、生体環境の総合的な評価及び疾患の 事前予測に繋げる事ができないかと考えた。これらの中には、今まで臨床検査におい て使われてこなかったものも多く、新たなバイオマーカーの発見も期待することがで きるのではないかと考えた。本研究は、ヒト由来非侵襲的サンプルの前処理、測定法 及び保存方法について最適化し、生体環境の総合的な評価及び疾患の事前予測が可能 な代謝プロファイリング技術の構築を目的とした。

【実験】

本研究ではヒト由来試料の非侵襲的なサンプリング方法について、採取方法や採取 に用いる材質等の条件を変え検討した。また、測定前処理方法として、タンパクに埋 もれてしまうようなピークを観察するための除タンパク操作についても検討すると ともに、濃縮方法や保存条件における代謝プロファイルへの影響も評価した。サンプ ルは、複数名のボランティアから採取し、得られた水溶性サンプルにはKpi/D₂O溶媒 を10分の1量添加し、各種パルスシーケンスプログラムを用いてNMR計測を行った。 得られたスペクトルは、ビン化処理により数値化し、マトリクス化した後、多変量解 析の一種である主成分分析 (PCA)等を用いて評価した。また、各スペクトルの帰属 には、当研究室で開発したSpinAssignプログラムを用いるとともに、BMRBやHMDB などの他機関におけるメタボロミクスデータベースも参照した。

非侵襲的サンプリング、試料管理法開発、代謝プロファイリング ○みさわ たくま、だて やすひろ、きくち じゅん

【結果と考察】

ヒト由来試料の多くはタン パク質などの高分子成分が豊 富に含まれており、これら由 来のシグナルが低分子成分由 来のシグナルとオーバーラッ プすることにより、メタボロ ミクス解析を行う上での障害 となり得る。そこで本研究で は、各種タンパク質吸着材を サンプリング工程にとりいれ ることにより、タンパクなど の高分子成分が吸着され、埋



もれてしまっていた低濃度のピークが観察しやすくなり、サンプリング条件の最適化 に成功した。さらに、保存時における酵素や微生物等の影響を軽減するため、添加材 等による酵素・微生物の失活方法についても検討しており、最新の解析結果も踏まえ た最適条件についても本会で議論したい。

次に、個体差および日差変動による代謝プロファイルへの影響を評価する為、各個 人から提供されたサンプルを¹H NMRにより計測し、得られたスペクトルデータに対 してSTOCSYを用いて解析することで各ピークのアノテーションを行い、lactateや propionateなどの有機酸由来ピークの同定に成功した(Figure 1)。また、¹H NMRにより 得られたスペクトルデータをPCAにより解析した結果、各個人の代謝プロファイルは、 個人差を大きく反映する傾向にあり、特に、Acetateやlactate、formate、propionateなど に大きな違いがみられた(Figure 2)。一方で、同一人物の代謝プロファイルはスコアプ ロット上で比較的近い位置に描出され、日差変動の影響はさほど大きくないであろう 事が示唆された。

今後も条件検討を継続して行い、さらなる分析技術の向上と悪条件下でも安定性を 保てるような保存法の最適化およびサンプル管理手法の高度化を図りたいと考えて おり、最適化された方法を用いて、食や生活習慣などの摂動を持たせた調査を行って いきたいと考えている。



NMR spectra. The volunteers described as ID in the score plot.

¹³C-ポリマーを利用した¹H-{¹³C}-HMQC-MRI法のための 分子プローブ開発 ○李真和¹,山田久嗣²,牧野顕⁴,木村俊作³,近藤輝幸²,白川昌宏¹,杤尾豪人¹ ¹京大・工学研究科・分子工学専攻 ²京大・工学研究科・物質エネルギー化学専攻 ³京大・工学研究科・材料化学専攻 ⁴福井大・高エネルギー医学研究センター

Development of a novel molecular probe for ¹H-¹³C-HMQC-MRI

•Masakazu Lee¹, Hisatsugu Yamada², Akira Makino⁴, Shunsaku Kimura³, Teruyuki Kondo²,

Masahiro Shirakawa¹, and Hidehito Tochio¹

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

² Department of Energy and Hydrocarbon Chemistry, Graduate School of Engineering, Kyoto University, Kyoto, Japan.

³ Department of Material Chemistry, Graduate School of Engineering, Kyoto University, Kyoto, Japan.
 ⁴Biomedical Imaging Research Center, Fukui University, Fukui, Japan.

As a candidate of novel molecular probes for Magnetic Resonance Imaging (MRI), a copolymer composed of poly-lactic acid and poly-sarcosine was synthesized with ¹³C enrichment. The polymer formed a molecular assembly called "lactosome" in aqueous solution, whose particle size was measured as approximately 50 nm. 2D 1 H $^{-13}$ C HMQC spectrum confirmed that the synthesized ¹³C-enriched lactosomes gave rise to substantially intense NMR signals, indicating its potential ability to be a molecular probe for ¹H-{¹³C} HMQC MRI. The synthesized polymer was tested for *in vivo* visualization of tumors implanted in mice by using ¹H $^{-{13}}$ C}-HMQC MRI pulse sequence.

【緒言】

ガドリニウム錯体や鉄ナノ粒子のような造影剤を用いる MRI では、造影剤が近傍の水の¹H-NMR 信 号に影響を及ぼすことによって、画像コントラストが得られる。しかし、体内には水の¹H-NMR 信号 に影響を与える様々な他の要因が存在するため、このような間接的な方法では、局所における造影剤 の濃度変化を見積もる等の定量的な解析を行なう際に限界がある。加えて、生体内の化学反応につい て、より正確な知見を得るためにも、特定の分子プローブの NMR 信号を「直接」観測し、画像化する ことが望ましい。そこで我々は、¹H-{¹³C}-HMQC-MRI 法 ¹⁰(Fig. 1)を用いることを念頭に、¹³C を含む分 子プローブを開発しており、これまでに、¹³C 標識した合成高分子をマウスに投与し、その腫瘍部位を 可視化できることを明らかにしてきた(論文準備中、Fig.2)。ところで、牧野らは、Polysarcosine(PS) と Poly-L-lactate(PLLA)の共重合体が水溶液系で作るラクトソームと呼ばれる分子集合体を調製し、こ れに近赤外イメージングのための分子プローブを搭載することによって、マウス腫瘍の *in vivo* 可視化 に成功している²⁰。そこで、このラクトソームを¹³C 標識すれば、先の高分子と同様に ¹H-{¹³C}-HMQC -MRI のための分子プローブとなると期待できる。

ラクトソーム,¹H-¹³C-HMQC

○りまさかず,やまだひさつぐ,まきのあきら,きむらしゅんさく,こんどうてるゆき,しらかわまさひろ, とちおひでひと





Fig. 2 In vivo visualization of tumors in mouse models



Fig. 3 ¹³C-PS–PLLA

本研究では、¹³C標識したPS-PLLA(¹³C-PS-PLLA, Fig. 3)を合成し、¹H-{¹³C}-HMQC-MRIによるマウス腫瘍の可視化を目指した。

【実験】

PLLAを開始剤とする¹³C-サルコシン-N-カルボン酸無水物の開環重合により¹³C-PS-PLLAを合成した。¹H-NMR 信号の積分比をもとに¹³C-PS-PLLA の重合度を算出した。さらに、*in vivo* での検討のために、BALB/ca マウスを購入し、その体側に colon26 細胞(ヒト腸癌細胞株)を 1×10⁶ 個移植した。腫瘍が 5-6 mm に成長したところで、合成した分子プローブを腹腔内或いは、尾静脈投与し、*in vivo* NMR 測定及び MRI 撮像に供した。*In vivo* NMR 及び MRI 測定には Bruker BioSpec (7 テスラ) を用いた。

【結果と考察】

ラクトソームの粒径が腫瘍取り込みに適したサイズとなる ように、¹³C-PS(n=94)-PLLA(m=39)のポリマーを合成した。な お、ここで PS のメチル基のみを¹³C 標識した。¹³C-PS-PLLA の 2D¹H-¹³C-HMQC スペクトル(Fig. 4)を測定したこところ、 ¹³C メチル基に由来する強い NMR 信号のみが確認できた。但 し、主鎖ペプチド結合のシス-トランス異性に起因すると思わ れる NMR シグナルも見られたが、それらの化学シフトは近接 しているため、MRI 測定には影響を及ぼさないと考えら れる。現在、¹³C-PS-PLLA のマウスへの投与を行い、 HMQC-MRI による腫瘍の可視化を試みている。





参考文献

- 1) van Zijl, et al., Magnetic Resonance in Medicine 30 (1993) 544-551
- 2) A. Makino, et al., Biomaterials 30 (2009) 5156-5160

Sf9細胞のin-cell NMRにおけるアミノ酸選択的安定同位体 標識

○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

Amino acid-selective stable isotope-labelling of proteins for the observation of in-cell NMR spectra in sf9 cells

•Takashi Tanaka¹, Jumpei Hamatsu¹, Emiko Seiwa¹, Teppei Ikeya¹, Masaki Mishima¹, and Yutaka Ito¹

¹Department of Chemistry, Tokyo Metropolitan University, Tokyo, Japan.

Abstract

The protocols employing intrinsic protein expression system for in-cell NMR measurements involve the considerable problem that severe background signals were commonly found in the spectra, whilst we have achieved ~80% of backbone resonance assignments of *streptococcus* GB1 in living sf9 cells by employing sf9/bacuoovirus protein expression system.

In this presentation, we show a demonstration of amino acid-selective stable isotope-labelling for sf9/baculovirus system, which allows us to simplify the severely overlapped in-cell NMR spectra. Furthermore, we also show a demonstration of utilising bioreactor system for extension of the lifetime of sf9 cells in NMR tubes, which is crucial for observing 3D NMR 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]、トト培養細胞[5,6]などの真核細胞でも測定が可能である.

真核細胞発現系を用いた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なく、in-cell NMRの適用範疇を広げる手段として期 待される.一方で、*Pichia pastris*の系[7]でも見られるように、内在性蛋白質などに由来す る巨大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取得を妨げていた.

この問題に対して私たちは、昆虫培養細胞sf9/baculovirusの系を用い、培養条件、測定法、データ処理法等の条件検討と最適化を行うことで、良好な¹H-¹⁵N HSQCスペクトルの取得に成功した.また、3次元3重共鳴NMRにより、連鎖球菌GB1の主鎖シグナルの約80%の帰属にも成功した.Sf9/baculovirusの系を用いた蛋白質発現系は、哺乳動物細胞

In-cell NMR, sf9, selective stable isotope-labelling

○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 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.

本研究では、sf9/baculovirusの系を用いたin-cell NMRについて、GB1をモデル系として用い、アミノ酸選択的安定同位体標識の有用性を検証した.また、NMR試料管中の細胞 試料の延命のために、バイオリアクターシステム[8]を利用した長時間測定も試みたので、併 せて報告する.

【実験・結果及び今後の展望】

Sf9/baculovirusの系を用いたGB1のin-cell NMRスペクトルによる主鎖シグナルの帰属 は昨年のNMR討論会で報告した.アミノ酸選択的安定同位体標識試料については、¹⁵N 標識Lysを用いて作成した昆虫細胞培養培地IPL-41でsf9細胞を培養することにより調製 した.また、バイオリアクターシステムは、久保博士らによる報告に基づいて作成した.

¹⁵N-Lys標識したsf9細胞を試料として測定した¹H-¹⁵N HSQCスペクトルでは,GB1の Lys残基が選択的に標識されていることを確認した(Fig. 1a).また,バイオリアクターシステ ムを利用した測定では,細胞試料をそのまま試料管に詰めた系に対し,10時間程度測定し た際にも,良好な¹H-¹⁵N SOFAST-HMQCスペクトルが観測された(Fig. 1b-g).

大腸菌の系では、Ile, Leu, Val選択的安定同位体標識が、in-cell NMRによる蛋白質の 立体構造解析に重要な役割を果たしていることが報告されている[9]. 今後は、 sf9/baculovirusの系においてもIle, Leu, Val選択的安定同位体標識の手法を確立し、バ イオリアクターシステムを併せて用いることで、NOE情報等の取得を試みる.



Overlay of the 2D 1 H- 15 N HSQC spectra of sf9 cells expressing GB1 cultured with uniformly 15 N labelled medium (gray) and the Lys selective 15 N-labelled medium are shown in (a). Close-up views of the overlayed HSQC spectra are also shown. 2D 1 H- 15 N SOFAST-HMQC spectra of sf9 cells expressing GB1 with bioreactor system (b~d) and without bioreactor system (e~g). The measurements were performed with respect to each 2 hours, 0~2 hours (b), (e), 4~6 hours (c), (f), and 8~10 hours (d), (g) from the initiation of the measurements are shown.

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); [8] Kubo, S. et al. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 52, 1208-1211(2013); [9] Sakakibara, D. et al. Nature 458, 102-105(2009).

¹³C標識された緑藻類の代謝混合物群の固体・溶液多次元 NMR法による分析

○伊藤研悟¹,小松功典¹,坂田研二²,伊達康博^{1,2},菊地淳^{1,2,3,4} ¹横市院生命医 ²理研CSRS ³理研BMEP ⁴名大院生命農

Solution and solid state multidimensional NMR for complex metabolic mixtures of ¹³C-labeled green algae

OKengo Ito¹, Takanori Komatsu¹, Kenji Sakata², Yasuhiro Date^{1,2} and Jun Kikuchi^{1,2,3,4} ¹Yokohama City Univ., Kanagawa, Japan., ²RIKEN CSRS, Kanagawa, Japan., ³RIKEN BMEP, Kanagawa, Japan., ⁴Nagoya Univ., Aichi, Japan.

Comprehensive measurement of complex metabolic mixtures in seaweed has not yet been performed by combing ¹³C stable isotope labeling and NMR techniques. So we tried such analysis using ¹³C-labeled sample of *Caulerpa brachypus Harvey* by several NMR measurements. The cross peaks detected by ¹³C CP-INADEQUATE were analyzed by using network approach following through ¹³C-¹³C coupling connectivities, then polysaccharide peaks were annotated as Glucopyranose moiety. In solution NMR, the peaks of many saccharides were detected around 4 ppm, and Maltodextrin and alpha, alpha-Trehalose were abundantly observed in the sample. From these results, comprehensive analysis of complex metabolic mixtures in seaweed was possible by several NMR measurements using ¹³C-labeled sample.

【背景・目的】 近年、バイオマス有効利用に関する研究が盛んに行われている。特に海藻類においては、そのごく一部の構成成分から工業製品や医薬品等に幅広く利用されており、産業的価値は極めて高いと考えられる。しかし、海藻類バイオマスは陸上植物バイオマスの研究に比べると、その効能について評価されていないものも多数存在し、海藻類の構成成分を網羅的かつ高感度に検出可能な計測技術高度化が望まれている。このような成分は安定同位体標識サンプルのNMR計測により網羅的な検出が可能であるが、¹³C標識技術を用いた海藻類の代謝混合物群の網羅的な計測は行われていないのが現状である。そこで我々は、海藻類の¹³C標識サンプルを用いて、多様なNMR計測法により代謝混合物群の網羅的な分析を行った。

【実験方法】 我々は緑藻類のヘライワズタ (*Caulerpa brachypus Harvey*)を対象に、 ¹³CO₂を1Lマリンフラスコ及び60L水槽の海水に常時流入させ、光合成により取り込ま せることで¹³C標識サンプルを作成した。採取した海藻は凍結乾燥後に破砕し、粉末 サンプルとして各種計測機器に供した。IR-MSにより同位体比を計測し、¹³C標識率の 時系列変化を調べた。固体NMRではCP-MAS、HP-DEC、CP-INADEQUATE及びDARR を用いて高分子成分を計測した。また、溶液NMRではKPi/D₂Oおよびメタノール抽出 を行い、得られた極性・半極性代謝物を1~3次元のNMR計測を行うことにより網羅的 に検出した。溶液NMRに関しては当研究室で開発したSpinAssignツール (http://prime.psc.riken.jp/)により代謝物のアノテーションを行った。

安定同位体標識、水圏植物バイオマス、環境メタボロミクス

Oいとうけんご、こまつたかのり、さかたけんじ、だてやすひろ、きくちじゅん

【結果・考察】 IR-MSによる炭素同位体 比計測から、海藻の分化細胞及び伸長部は 元の部分及び成長が見られなかった細胞 よりも高い¹³C標識率であった。また、60L 水槽よりも1Lマリンフラスコで生育した 海藻の方が標識率は高く、最大で約43%で あった。成長した葉状部と茎部の標識率に は大きな差が見られなかった。¹³C標識さ れた代謝物群は固体及び溶液NMR計測に より分析を行った。¹³C CP-MAS及び HP-DECのスペクトルをMCR法により分 離した結果、29のピークが確認できた。¹³C CP-INADEOUATEでは、糖類及び脂質のピ ークが見られ、ネットワーク解析も併用し た¹³C-¹³C結合解析により、検出された糖類 はGlucopyranoseではないかと考えられた (**Fig.1**)^{1^{-13}}C DARRでは、mixing timeを5ms 及び30msで計測し、スペクトルを解析した 結果、Xvlanの結合が見られた²。これらの 固体NMR計測により¹³C-¹³Cの多様な結合 情報が取得でき、海藻由来成分の網羅的探 索が可能であった。

また、KPi/D₂O抽出の溶液NMR計測では、 未標識サンプルに比べて高感度に多数の ピークが検出された。2D計測としては¹³C INADEQUATE、¹H-¹³C HSQC-TOCSY、 ¹H-¹³C HSQC、3DではHCCH-COSY、 HCCH-TOCSYを計測し、成分の帰属を行 うため得られたピークをSpinAssignツール により代謝物のアノテーションの候補を 付けた。特に4ppm付近では糖由来のピーク が 多 数 検 出 さ れ 、 Maltodextrin 、



Fig.1 The 2D ¹³C CP-INADEQUATE spectra of *C. brachypus*.



Fig.2 The 3D HCCH-TOCSY spectra of *C*. *brachypus*.

alpha,alpha-Trehaloseが顕著に見られた。また、高磁場側ではAcetate、Succinate、Pyruvate のピークが観察された(Fig.2)。

以上のように本研究では、海藻の育成条件及び¹³C標識方法の検討を行い、2~40%の ¹³C標識化されたサンプルを得ることができた。¹³C標識率の高い海藻サンプルでは、 多様なNMR計測法により代謝混合物群の網羅的な分析が可能であった。さらに今後、 経時的に採取したサンプルのNMR計測を行うことで、海藻類の成長における代謝動態 を追跡することができ、また、海水との統合的な解析を行うことで、環境と生体の関 係を探索できると考えている。

【参考文献】

1. Malz, F. et al., Carbohydrate Research. 2007, 342, 65-70.

2. Lahaye, M. et al., Carbohydrate Research. 2003, 338, 1559-1569.

被災地土壌による¹³C標識化作物非食部の分解代謝動態

○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

Degradation profiles and metabolic dyanamics by soil ecosystems in disaster area using inedible part of ¹³C-labeled plant

○ Tatsuki Ogura^{1, 2}, Yasuhiro Date^{1,2}, Yuuri Tsuboi², and Jun Kikuchi^{1,2,3,4} ¹Grad. Sch. NanoBio., Yokohama City Univ., ²RIKEN PSC, ³Grad. Sch. Bioagri., Nagoya Univ., ⁴RIKEN BMEP.

Metabolic ability of microbial community in disaster field in Fukushima was greatly changed by the Great East Japan Earthquake. However, the ability including degradation of biochemical mixture by microbiota is difficult to evaluate by traditional method because of their complexity. In this study, we attempted to advance in metabolic profiling using ¹H and ¹³C-adiabatic Distortionless Enhancement by Polarization Transfer (DEPT) nuclear magnetic resonance (NMR) and characterization of changing microbiota accompanied biomass degradation using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). In addition, we established metabolic network map and elucidated relationship between degradation pathway and microbes in each sample.

【序論】先の東日本大震災における津波被 害により土壌の代謝能は著しく変化し、環 境や生態系、農作物への影響を評価するこ とが急務の課題である。そこで著者らは ¹³C標識グルコースを用いた微生物分解の モニタリング手法の開発や¹³C標識セルロ ースを用いた固体から液体・気体へのバイ オマス分解過程の評価、および単一成分の



profiling using ¹H- and ¹³C-NMR spectra

分解動態やバイオマスの構造状態の違いによる分解特性の変化等、複合系における分 解代謝評価法を開発してきた(Ref.1)。しかし、糖に由来する多数のシグナルが検 出されるサンプルにおいては、糖領域におけるオーバーラップシグナルの問題が発生 し、これらの手法だけでは詳細な解析が難しく、新たな手法を確立する必要があった。 そこで本研究では、安定同位体標識植物を用いて、標識植物由来の生体分子混合物を 土壌微生物叢に分解させ、その時の代謝動態を¹H-,¹³C-DEPTおよび各種NMR計測法 を用い、各計測データを統合解析することで、シグナルのオーバーラップにより困難 だった生体分子混合物の解析手法を確立した。また微生物叢の変遷を変性剤濃度勾配 ゲル電気泳動(DGGE)を用いて評価し、それぞれのデータを統合し解析することで、 複合微生物系における植物バイオマス分解時の代謝ネットワーク評価を行い、被災土 壌中で生じるバイオマス分解反応に関する有益な情報の獲得も目指した。

土壌微生物叢、作物残渣、代謝ネットワーク

○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¹³CO₂下で育成されたダイズ、トマト、コマツナを作物残渣サン 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代謝物と微生物叢の時系列変動を、¹H-,¹³C-adiabatic DEPTお よびその他のNMR計測法やDGGE法を用いて評価した。各計測法によって得られたデ ータは多変量解析により評価するとともに、KEGGを用いて代謝ネットワーク図を作 成し、サンプルの違いによるバイオマス分解反応の変化を評価した。

【結果および考察】土壌微生物叢による作物残渣サンプルの代謝動態を¹H-および ¹³C-DEPT NMRでそれぞれ評価した。¹³C-DEPT NMRによる解析を行うことで、 ¹H-NMRでは解析の難しい糖のシグナルを分離能よく得ることが可能であった。さら に、得られた¹H-および¹³C-DEPT NMRデータの統合解析により、バイオマス分解によ る各代謝物の経時的変動を評価した(Fig. 2)。その結果、分解系ごとに異なる代謝 プロファイルを示し、Loading plotによる解析から、酢酸がPC1の正の方向に、D-キシ ロースがPC1の負の方向に寄与していた。またシステイン、D-キシロース、D-マンノ ースがPC2の正の方向に寄与し、エタノールや酪酸、コリン、オキサロ酢酸などがPC2 の負の方向に寄与していた(Fig. 2b, c)。以上の結果から、キシロースやマンノース

(a)

Day 1

PC2 (16.14%)

Day 1

Dav 3 ▲Day 5

Day 5▲

Day 6

Day 22

Day 16

Day 8 Day 8

⊿

Day 11

Day 6 🛕 Day 9

Day 11

Day 10

◆ Day 22

Day 16

Sovbeans

Tomato

🛆 Komatsuna

Day 10

といった単糖を基質とし、酢酸やエタノール といった有機酸が産生されていることを示 唆した。さらに、各代謝物のシグナル変動を もとに、各分解系における代謝ネットワーク を作成し、複合微生物系におけるバイオマス 分解動態を評価した。本会では、各分解系に おける微生物叢変動および代謝反応との相 関関係を評価することで得られた、代謝ネッ トワークと各微生物種との関係性に関する 最新の知見についても議論したい。



Fig. 2 Metabolic profiling by integrated analysis using ¹H- and ¹³C-DEPT NMR. Result of PCA score plot (a), loading plot of ¹H-NMR (b), and ¹³C-DEPT NMR (c).

Reference; 1. Ogura T. et. al., PLoS ONE, 8, e66919 (2013), Yamazawa A. et. al., molecules, 18, 9021-9033 (2013), Date Y. et. al., J. Proteome Res., 11, 5602-5610 (2012), Date Y. et. al., J. Biosci. Bioeng., 110, 87-93 (2010)

NMRスペクトルに基づく深海底泥有機物質の化学的多様 性評価法

 ○伊達康博^{1,2},朝倉大河²,坪井裕理¹,坂田研二¹,吉田尊雄³, 丸山正³,菊地淳^{1,2,4,5}
 ¹理研CSRS,²横市院生命医,³JAMSTEC,⁴理研BMEP,⁵名大院生命農

Chemical diversity profiling for organic substances in deep-sea sediment based on NMR spectra

○Yasuhiro Date^{1, 2}, Taiga Asakura², Yuuri Tsuboi¹, Kenji Sakata¹, Takao Yoshida³, Tadashi Maruyama³, and Jun Kikuchi^{1, 2, 4, 5}

¹*RIKEN CSRS, Kanagawa, Japan.,* ²*Grad. Sch. Med. Life Sci., Yokohama City Univ., Kanagawa, Japan.* ³*JAMSTEC, Kanagawa, Japan.,* ⁴*RIKEN BMEP, Kanagawa, Japan.,* ⁵*Grad. Sch. Bioagri. Sci., Nagoya Univ., Aichi, Japan.*

Deep ocean floor is basically nutrient-poor environment but has an important food source provided by a continuous shower of marine snow consisting of mostly organic detritus. However, little information about complex forms, structures, and compositions of chemical mixtures deposited into the deep-sea sediments is available. Here we developed an evaluation approach for chemical diversity based on NMR spectral data by modification and optimization of the concept of "diversity index" in the field of ecology, and evaluated the chemical profiles and diversities in deep-sea sediments. The evaluation by the approach was capable to capture the characteristics of organic compositions and their complex chemical forms in individual sampling points. Correlation analysis based on the approach revealed chemical diversities inversely related with microbial diversities in the deep-sea sediment.

【緒言】 地球上の約7割を占める海洋の大部分はエネルギー源の乏しい深海である。 このような深海環境では、マリンスノーと呼ばれるプランクトンの排出物や死骸およ びそれらの分解物がやがて深海底に堆積し、深海に生息する生物の餌として供給され ている。堆積した難分解性有機物質は長い年月をかけて少しずつ還元反応を進め酸素 原子数を減らし、数万年の時を経て脂質(化石燃料)へと変化していくことが知られ ているが、深海底泥に堆積する難分解性有機物質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、そのプロセスを担う微生物生態系との関係性 についても不明な点が多いのが現状である。そこで我々は、相模湾初島沖の深海約 1000mから底泥を採取し、NMR法を用いた深海底泥有機物質のキャラクタリゼーショ ンを行い、昨年度の学会にて報告した。本会では、NMR法により得られたスペクトル データに基づく化学的多様性評価手法の構築を行うとともに、構築した本手法を用い て評価した、難分解性有機物質の化学的特徴と微生物生態系との関係性や、陸上から 河口、浅海、深海に至るまでの各地点における有機物組成や化学形態の違いについて 報告する。

metabolomics, chemical diversity index, multivariate statistical analysis

○だてやすひろ,あさくらたいが,つぼいゆうり,さかたけんじ,よしだたかお, まるやまただし,きくちじゅん 【実験方法】 相模湾初島沖の10地点(#794, #795, #796a, #796b, #797a, #797b, #798a, #798b, #799a, #799b)から、ハイパードルフィンを用いてMBARI式コアサンプラーに より底泥を採取し、表層、中層、下層の三層にわけて回収した。また、河川底泥は自 作したドレッジ式採泥器を、浅海底泥はエクマンバージ式採泥器を用いてそれぞれ採 取した。採取した底泥サンプルは凍結乾燥し、NaOH処理により底泥有機物を抽出し、 DMSO溶媒を用いてNMR計測を行った。得られた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】 深海底 泥の各地点における難分解 性有機物質を解析するため、 DMSO 可溶化有機物質の NMR計測を行った。得られた 有機物プロファイルに対し て、生態学の分野で用いられ ている多様度指数(Shannon 指数および Simpson 指数)を 導入し、NMRスペクトルの性 質に合わせて改良および最 適化を行うことにより、深海 底泥有機物質における化学 的多様性の評価手法を構築 した。構築した本手法を用い て深海底泥各地点における多 様性を評価したところ、有機 物質の多様性が高い地点と低 い地点が存在することを明ら かにした(Fig. 1)。また、 pyrosequencing 法により 深海 底泥生態系を構成する微生物 叢を解析し、得られた微生物 叢プロファイルから多様度指 数を計算し、化学的多様性と の関係性について評価した結 果、微生物の多様性と有機物 質の多様性は弱い負の相関関 係にあることが明らかとなっ



Fig. 1 Relationships between chemical diversity and microbial community diversity.



Fig. 2 Chemical profiles in deep-sea, shallow sea, estuarine, and soils evaluated by PCA.

た(Fig. 1)。さらに、多様度指数によってノーマライズされた深海底泥、浅海底泥、 河口底泥および土壌における有機物質プロファイルをPCAにより解析したところ、 PC2軸方向に沿って深海、浅海、河口底泥と有機物プロファイルが遷移していく傾向 が観察された(Fig. 2)。一方PC1軸方向で比較すると、土壌中における有機物質プロ ファイルは、他の水圏環境由来有機物プロファイルと大きく異なる傾向を示した。以 上のことから、各地点における有機物組成や化学形態の違いを捉えることに成功し、 本研究で構築した化学的多様性評価手法の有用性が示された。

多孔質体上を連続フローさせた超偏極¹²⁹Xeによる 吸着相XeのNMR観測

○服部峰之¹、平賀隆¹、加賀尚博²、大竹紀夫³ ¹産業技術総合研究所 電子光技術研究部門、 ²アウレアワークス(株)、³東横化学(株)

¹²⁹Xe Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy of Xenon Adsorbed on Mesoporous Materials under Continuous-flow Hyperpolarized Xenon Gas

OMineyuki Hattori¹, Takashi Hiraga¹, Naohiro Kaga², Norio Ohtake³ ¹National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (esprit), Tsukuba, Japan. ²Aurea Works Corporation, Yokohama, Japan, ³Toyoko Kagaku Co., Ltd, Kawasaki, Japan.

¹²⁹Xe 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】¹²⁹Xe 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¹²⁹Xe 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]。

¹²⁹Xe 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、¹²⁹Xe NMR の各種パラメータに影響を与える。超偏極¹²⁹Xe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。

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¹²⁹Xe NMRスペクトルの取得 を行った。

超偏極,多孔質,¹²⁹Xe

○はっとりみねゆき、ひらがたかし、かがなおひろ、おおたけのりお
【超偏極¹²⁹Xe生成装置と狭帯域化光源による高効率化】³He, ¹²⁹Xeの核スピンが1/2の 希ガスは、RbのD₁線 (5²S_{1/2}-5²P_{1/2})を光ポンピングしたアルカリ金属とのスピン交換 を行って、NMR信号を飛躍的に増強できる。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¹²⁹Xe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[4]。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 - (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 ± 0.15 nm by changing temperature of VHG element.

1.5mm厚のVHGを採用した、狭帯域レーザ ーモジュール2個を組み合わせたシステ ム(52W)を用いて、バッチ式偏極装置 における中心波長依存性の測定を行っ た。狭帯域(線幅60pm)レーザーにより 励起した超偏極129Xeの偏極率の中心波 長依存(Xe:100%、バッチ式生成) をFigure 3に示す。バッチ式の場合は、 励起光源の中心波長がRbの吸収線の中 心波長とずれていても、偏極される。



Figure 3. Excitation wave-length dependence of the polarization rate of hyperpolarized ¹²⁹Xe, excited by the developed line-narrowed diode laser.

【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¹²⁹Xe NMR実験】¹²⁹Xe NMR スペクトルは、6.3T (¹²⁹Xe: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¹²⁹Xe含有混合ガス (Xe:N₂:He混合比,1%:5%:94%)を流通させながら、吸着したXeの¹²⁹Xe 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。¹²⁹Xeの化学シフト、線幅を1番目のスペクトルから解析した。

【結果】Figure 4. に測定した、¹²⁹Xe 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90pm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。Figure 5. には、全測定温度での、化学シフトと線幅の温度変化をプロットした。

-109°C	-80°C	30°C

Figure 4. Temperature dependence of ¹²⁹Xe NMR Spectrum of adsorbed on Levovist® pore.



Figure 5. Temperature dependence of $^{129}\mathrm{Xe}$ shifts and line-width of Xe adsorbed on Levovist® pore.

【考察】超偏極¹²⁹Xe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。Xeが液体になる温度では、吸着したXeが多孔質試料との接触により緩和が起こり、¹²⁹Xe超偏極NMR信号が減少していくことが観測された。

【参考文献】

[1] A ¹²⁹Xe 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).

MRI を用いた嗅覚刺激による嗅球の活性化の検出

 ○平金 真¹,後藤 はるな¹,吉永 壮佐¹,岩本 成人¹, 白須 未香^{2,3},東原 和成^{2,3},寺沢 宏明¹
 ¹熊本大学大学院 生命科学研究部 構造生命イメージング分野
 ²東京大学大学院 農学生命科学研究科 応用生命化学専攻
 ³JST ERATO 東原化学感覚シグナルプロジェクト

Detection of responses to olfactory stimuli in olfactory bulbs using magnetic resonance imaging

⊙Makoto Hirakane¹, Haruna Gotoh¹, Sosuke Yoshinaga¹, Shigeto Iwamoto¹, Mika Shirasu², Kazushige Touhara², Hiroaki Terasawa¹

¹Department of Structural BioImaging, Faculty of Life Sciences Kumamoto University ²Department of Applied Biological Chemistry, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo ³ERATO Touhara Chemosensory Signal Project, JST, The University of Tokyo

Sensory input to the olfactory system provides animals with essential information for survival. Odors are chemical signals that regulate a wide range of social and sexual behaviors in many animals. Mice detect odors through the olfactory sensory neurons in the main olfactory epithelium (MOE). This neuroepithelium is connected to the next central station, the main olfactory bulb (MOB). We sought to detect the activated glomeruli in the olfactory bulb by manganese-enhanced MRI techniques, and to clarify the mechanism of discrimination and recognition of numerous chemical signals. After an aqueous MnCl₂ solution was injected into its nostril, the mouse was exposed to the odor. T₁-weighted MRI covering the olfactory bulb was acquired with 3D rapid acquisition. We found that odors increase Mn^{2+} uptake into the cells of the olfactory bulb in the odor-stimulated groups, in comparison in a control group.

【背景】嗅覚は外界の情報を受取る重要な器官である。匂い物質は嗅覚によって受容 され、行動や生理的変化を引き起こす。匂い物質は鼻腔から取り込まれ、嗅上皮に存 在する嗅覚受容体に選択的に結合する[1]。そのシグナルは、嗅球の特定の糸球体を活 性化する。嗅球において、匂い情報は統合処理され、さらに高次の脳へと伝えられる。 これまで光学イメージング法などを使用した実験により、嗅球にはそれぞれの匂いに 対する特徴的な応答パターンがあることがわかっている[2]。しかし、嗅球腹側領域や 内側領域における応答パターンの全貌解明には至っていない。

MRI は、非侵襲的に生体深部を観測できるという利点を持つため、血流の変化に

MRI, マンガン造影法, 嗅覚

○ひらかねまこと,ごとうはるな,よしながそうすけ,いわもとしげと,しらすみか, とうはらかずしげ,てらさわひろあき よって MRI 信号の強度が変化す る BOLD 効果を利用することで、 匂い刺激による嗅球の反応をとら えることができる[3]。一方、MRI の手法のひとつに、マンガン造影 剤を用いたマンガン造影 MRI 法 がある。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[4]。また、末梢性に投与さ れた Mn^{2+} は、神経末端から取り



Fig. 1 Manganese-enhanced imaging (MEMRI) of the olfactory bulb. Both the glomerular layer (GL) and mitral cell layer (MCL) were enhanced, while other layers, such as the external plexiform layer (EPL) and the granular cell layer (GCL) were darker in coronal (left) and axial (right) slices.

込まれ、神経軸索に沿って輸送されることが示唆されている[5]。この方法を用いるこ とで、BOLD 効果のような血流の変化ではなく、嗅球の活性化した細胞を直接的に 可視化し同定することが可能である。

【目的】本研究は、MRI を用いて匂いやフェロモン物質による嗅球の活性化部位を 明らかにし、匂いやフェロモンを識別するメカニズムを解明することを目的とする。

【方法】C57BL/6 マウスを対象とし、イソフルラン麻酔下でマンガン溶液を鼻腔内に マイクロシリンジを用いて投与した。マウスをケージに移し、麻酔から覚醒したこと を確認した後、匂い物質をケージ内に滴下し20分間の匂い刺激を行った。MRI 撮 像は、7.0 テスラ MRI 装置 (Bruker BioSpin) と低温プローブ (Bruker BioSpin) を用 いて行った。3D RARE 法を使用し、嗅球の T₁ 強調画像の連続撮像を行った。測定 後、匂い刺激による経時的な信号強度の増強を計算し、匂い刺激なしの撮像と匂い刺 激後の撮像で比較を行った。

【結果・考察】マウスに匂い刺激を行った場合と匂い刺激を行っていない場合での嗅 球の信号強度の増強を比較した結果、匂い刺激を行った場合に嗅球の一部の領域で信 号強度の増強が大きいことが分かった。これは、匂い刺激によって活性化した細胞に Mn²⁺ が多く取り込まれ T₁ 値の短縮が起こったと考えられる。この方法を用いるこ とで、個々の匂い物質に特異的な脳活性化の分布パターンを検出できる可能性がある。 今後は、マウスの行動や生理機能に影響を与える匂い物質の刺激に応じる脳の活性化 部位を観測することで、そのシグナル伝達経路の解明を行う。

【参考文献】

[1] K. Touhara, L. B. Vosshall, Annu Rev Physiol 71, 307-332 (2009)

- [2] N. Uchida, Y. K. Takahashi, M. Tanifuji, K. Mori, Nat Neurosci 3, 1035-1043 (2000)
- [3] F. Xu, M. Schaefer, I. Kida, J. Schafer, N. Liu, D. L. Rothman, F. Hyder, D. Restrepo, G.
- M. Shepherd, J Comp Neurol 5, 491-500 (2005)
- [4] Y. J. Lin, A. P. Koretsky, Magn Reson Med 38, 378-388 (1997)
- [5] R. G. Pautler, A. C. Silva, A. P. Koretsky, Magn Reson Med 40, 740-748 (1998)

高沸点ガスのクエンチング効果による 超偏極 129Xe MRI の高感度化と応用

○木村 敦臣,河村 綾乃,内山 知香,奥村 慎太郎, 松本 浩伸,山内 紬起子,藤原 英明 阪大医保

Application of Hyperpolarized ¹²⁹Xe MRI with the Sensitivity Improved by Quench Effect of the Gas with High-boiling Point OAtsuomi Kimura, Ayano Kawamura, Chika Uchiyama, Shintaro Okumura, Hironobu Matsumoto, Yukiko Yamauchi, Hideaki Fujiwara

Department of Medical Physics and Engineering, Division of Health Sciences, Graduate School of Medicine, Osaka University, Suita, Osaka, Japan.

Introduction: The sensitivity of hyperpolarized ¹²⁹Xe magnetic resonance imaging (HPXe MRI) can be improved by mixing gases with a quench effect such as N_2 .¹ Hitherto, we have developed an apparatus for continuously producing HPXe with a polarization of ca. 10-15% in which N_2 is mixed with ¹²⁹Xe by 30 volume %.² However, in this case it is difficult to purify the HPXe by separating from N_2 , resulting in a sensitivity decrease by dilution. On the other hand, the problem is possible to be evitable by using a gas with a high-boiling point as a quench-source. In the present study, we attempted to develop an apparatus to purify the HPXe from the quenching gas and intended to apply it to pulmonary functional imaging of mice.

【背景・目的】 超偏極希ガスを製造する際、クエンチングガスを混合することで偏 極率が向上する。我々は、クエンチングガスとして窒素ガスを利用して、約10-15% の偏極率を有する連続フロー型超偏極希ガス製造装置を開発し、これを用いてマウス 肺機能診断に応用している。しかし、窒素ガスは偏極後の分離が困難なために、偏極 率向上による信号強度の増強は希釈による損失との補償関係にあった。これに対して、 高沸点ガスをクエンチングガスとすることで信号強度増強を達成するとともに、偏極 操作後の希ガスの分離精製を容易に実施できるという可能性を見出した。本研究では

超偏極¹²⁹Xe -MRI, 肺機能診断, クエンチング

Oきむらあつおみ、かわむらあやの、うちやまちか、おくむらしんたろう、まつもとひろのぶ、 やまうちゆきこ、ふじわらひであき 超偏極希ガスの分離精製装置を開発・利用し、飛躍的に感度増強された超偏極 ¹²⁹Xe 磁 気共鳴イメージング (HPXe MRI) 肺機能診断法の精度向上を図ることとした。

【方法】 自作の連続フロー型超偏極希ガス製造装置および分離精製装置を用いて HPXe を生成した。クエンチングガスはイソブテンを使用し、偏極操作後-78℃に冷 却する事で分離精製した。雄性 ddy マウスに HPXe 混合ガス(HPXe: $O_2=80:20$)を自 発呼吸下で吸入させながら、MRI を測定した。MRI 撮像は Agilent Unity- INOVA 400WB(9.4T)を用いて行った。呼吸同期撮像は圧センサーをマウス腹部に固定する事 により取得した呼吸信号を利用して行った。1 回から 10 回まで呼吸回数を変化させ ながら MRI 撮像を行い、呼吸回数に応じた信号強度を解析することで 1 回換気割合 r_a を求めて換気能評価の指標とした。磁化移動コントラスト(Xenon magnetization

Transfer Contrast: XTC) 画像は balanced steady state free precession(b-SSFP)法に 反転パルスを加えたパルス系列を用いて撮 像し、この画像を用いて肺胞と血液との間 のガス交換率 fd (%) を求めた。

【結果】 高沸点ガスをクエンチングガス として利用することにより、HPXe の信号 強度を従来の約2倍向上させることが可能 であり、マウス肺の MRI コントラストが 増強する事を併せて確認した(Figure 1)。こ の時、偏極率は 20-30%であった。これに 伴い、呼吸回数の少ない MRI 肺画像の画 質が改善されるとともに換気・拡散を表す 肺機能パラメータ(r_a 及び f_d)を包括的に同 時評価することが可能であった。





b)



Figure 1. HPXe lung MR image obtained from the present study (a) and the ordinary one (b).

参考文献

- 1) Fukutomi J, Suzuki E, Shimizu T, Kimura A, Fujiwara H. J Magn Reson 2003;160:26-32
- Imai H, Kimura A, Hori Y, Iguchi S, Kitao T, Okubo E, Ito T, Matsuzaki T, Fujiwara H. NMR Biomed 2011;24:1-11

高温超伝導バルク磁石を用いた高分解能MRI

○玉田大輝^{1,2},巨瀬勝美¹,柳陽介³,伊藤佳孝³,仲村高志^{1,2}
 ¹筑波大学大学院 数理物質科学研究科 電子・物理工学専攻
 ²理化学研究所
 ³(株)イムラ材料開発研究所

High-Resolution Magnetic Resonance Imaging Using a High T_c Bulk Superconducting Magnet

ODaiki Tamada^{1, 2}, Katsumi Kose¹, Yosuke Yanagi³, Yoshitaka Itoh³, and Takashi Nakamura^{1,2}

¹ Institute of Applied Physics, University of Tsukuba. ² RIKEN. ³ IMURA MATERIAL R&D CO., LTD.

³ IMURA MATERIAL R&D CO., LTD.

A high critical temperature (T_c) superconducting bulk magnet is a promising magnet for high resolution magnetic resonance imaging (MRI). A bulk magnet MRI system we developed in 2011 showed their potential for high resolution imaging by acquiring the MR image with the resolution of (50 μ m)³. However, there are still challenges to achieve higher resolution, and better quality imaging because of the inhomogeneity of the magnetic field, the shielding effect of the magnet, and low signal-to-noise ratio due to small voxel volume. In this study, we designed the new bulk magnet using the finite element method to achieve higher homogeneity with lower shielding effect. In addition, the compressed sensing method was used for MR imaging to improve the signal-to-noise ratio per unite time. Finally, MR images were acquired to show the usefulness of our system.

【はじめに】高温超伝導バルク磁石(バルク磁石)[1]は,現在広く用いられている超 伝導磁石や永久磁石に続く新たなNMR/MRI用磁石である.我々のグループは,2011 年に4.7 Tに着磁されたEuBCOバルク磁石を用いたMR microscopeを開発し,生体試料 の高分解能撮像(分解能(50 µm)³)に成功した[2].しかしながら,さらなる高分解能・ 高画質のMR画像を得るにあたって,いくつかの問題点が存在する.

まず初めに静磁場均一性の不足である.これは,高温超伝導体結晶の不完全性や着磁中の磁石内の温度勾配,着磁手法の問題に起因する[3].さらに,高温超伝導体のマイスナー効果による勾配磁場の遮蔽があるため,勾配磁場効率が減少するという問題も存在する[3].また,高分解能撮像においては,ボクセル体積が小さくなるため,十分な信号対雑音比(SNR)を得るためには数時間から数日に及ぶ長時間の信号積算が必要である.そのため,生体試料のように時間経過とともに試料の性質が変化する場合は,高分解能撮像が困難である.これらの問題を解決するために,本研究では,有限要素法解析による最適化計算を行うことで,従来設計のバルク磁石よりも,均一な静磁場を持ったバルク磁石を開発した.また,高温超伝導体の内径を広げることで,

MRI, 高温超伝導, マイクロイメージング

○たまだだいき,こせかつみ,やなぎようすけ,いとうよしたか,なかむらたかし

勾配磁場コイルとバルク磁石との間で生じるマイスナ 一効果の低減を試みた.さらに、撮像サンプリング法に Compressed Sensing (CS)[4,5]を用いることで、単位時間 当たりのSNRを改善した.これらの結果、生体試料を (32µm)³の高分解能で撮像することに成功した.

【システム】本研究で用いたMRIシステム(Fig.1)は, バルク磁石(磁場強度4.74 T,ボア径23 mm),MRIコ ンソール(MRTechnology社製),RFコイル及び勾配磁 場コイルから構成されている.

高温超伝導バルク磁石は、リング状の EuBCO 高温超 伝導バルク体 (転移温度 T_c=93 K,外径 60 mm),冷凍機 及び圧縮機で構成されている.バルク体は冷凍機コール ドヘッドに設置されている.



Figure 1 MRI system used in this study.

本研究では、 B_1 分布の不均一性に由来するアーチファクトを避けるために、8mm管用RFコイルとして、鞍型コイルの代わりにTwisted Loop Coil (TLコイル,直径8.1 mm, Q=52 (-3dB))を採用した[6]. TLコイルは、極めて単純な構造であるにも関わらず、均一な B_1 分布を発生させることが可能である。また、小型サンプルの撮像にはソレノイドコイル(直径4 mm,長さ4 mm,Q=106 (-3 dB))を用いた.

勾配磁場コイルに関しては、GX、GYコイルとしてGolayコイルセット、GZコイル としてMaxwellペアを用いた. 勾配磁場コイルは、内径14.7 mm、外径18.0 mmのアク リルパイプ上に直径0.3 mmの被覆銅線を配置することで作成した. また、コイルのタ ーン数は10とした.



Figures 2 (a) Schematic of the bulk magnet. (b, and c) The bulk magnet was magnetized using the field cooling method. (d) Twisted Loop Coil (8.1 mm diameter) (e) Solenoid Coil(4 mm diameter, 4 mm length, and 4 turns).

【手法】高温超伝導バルク磁石は、内径28 mmおよび36 mmのEuBCO高温超伝導バル ク体の組み合わせで構成されている.磁石の構造をFig.2(a)に示す.上部と底部に関し ては、内径28 mm、中央部に関しては内径36mmの超伝導体を用いた.バルク磁石の 構造は、静磁場分布が均一になるように有限要素法による電磁界解析(PHOTO-Series) を用いて決定した.バルク磁石の着磁方法として静磁場着磁法を採用した.また、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、着磁用超伝導磁石の磁場強度を4.74T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、Fig.2(b)のように着磁用超伝導磁石の磁場中心に設置した.さらに、温度を 50Kまで徐々に下げた後、着磁用超伝導磁石の磁場を4.74Tから徐々に消磁した.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した (Fig.2(c)). バルク磁石の性能評価のために,静磁場分布及びバルク磁石中の勾配磁場効率を計測した.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(TR /TE =100/10 ms,分解能=(200 μ m)³,マトリクスサイズ=64³)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.

TL コイル(Fig.2(d))及びソレノイドコイル (Fig.2(e))は、可変キャパシタを用いて 202 MHz に 同調させた.TL コイルは Fig.2(d)にあるコイルパタ ーンに従って製作した.コイルパターンが印刷され た OHP シート(幅 25.4 mm,高さ 12.8 mm)上に厚 さ 0.3 mm,幅 3 mmの銅箔を配置することでコイル を製作した.また、コイルは 33 pFのキャパシタを 用いて分割した.Figs.3(a, and b)と(c, and d)は、それ ぞれ TL コイルと鞍型コイル(直径 8.1 mm)を用い て 8mm 試験管に入った硫酸ニッケル水溶液(Fig.3(d)) を撮像した結果である.鞍型コイルでは、静磁場方 向及び径方向に不均一性が確認された(信号の変動

係数(CV)=0.21)のに対して,TLコイ ルは,信号強度の変化が小さいことが わかる(CV 値=0.15).

MR画像のSNRはボクセル当たりの 試料体積に比例するため,高分解能撮 像を行う際には,長時間の信号積算が 要求されるという問題がある.近年, 少ないサンプリング点数から元の信 号を復元するCS法を利用した撮像時

間短縮手法が提案された[4]. そこで、本研究では、サンプリング点数を減らし、積算 回数を増やすことによって、単位時間あたりのSNRの向上を試みた[5]. CSにおける 信号のアンダーサンプリングにはReduction Factor (R) = 5のランダムフェーズエンコ ーディング(全サンプリング点に対して20%のサンプリング点数)を用いた. 取得し たk-spaceデータは、GPU(NVIDIA、Tesla1060)とFast Composite Splitting Algorithm (FCSA)を用いて再構成を行った. CSの有用性を確認するために、生体試料(ヤマ ゴボウ)の撮像実験を行った. 比較のため、通常のフルサンプリング(FS)法とCS法を 用いた. 撮像シーケンスには3DSEシーケンス(TR/TE=100/10 ms,分解能=(50 μm)³、マ トリクスサイズ=256³、FS法の信号積算回数=2、CS法の信号積算回数=10)を用いた. FS及びCS法の撮像時間はいずれも3.6時間である.

最後に、本システムの有用性を示すために、生体サンプル(ダンゴムシ、リンゴの 種子)の撮像実験を行った.ダンゴムシは、酢酸エチルを用いて殺虫処理をした後、 3DSE シーケンス(TR/TE=600/10ms,分解能=(50µm)³,FOV = (12.8mm)³,マトリックス サイズ=256³、撮像時間=36.5時間、信号積算(NEX)=16)とTL コイルを用いて撮像した. また、リンゴの種の撮像には 3DGE シーケンス(TR/TE=70/10ms,分解能=(32µm)³,FOV = (8.19 mm)³、NEX=5、マトリクスサイズ=256³、撮像時間=1.3時間)とソレノイドコイ



Figure 3 (a-d) MR images of NiSO₄ doped water using the saddle shape coil (a, and b), and TL coil (c, and d). (e) NiSO₄ doped water in a 8 mm NMR tube.



Figure 4 (a) *Phytolaccaceae* (b, and c) MR images of *Phytolaccaceae* using spin echo sequences with full sampling (b), and CS sampling (c).

ルを用いた.

【結果・考察】本研究で開発したバルク磁石の静 磁場均一性は、27.9 ppmであった. さらに、勾配 磁場コイルを用いた一次シミングを行った結果, 18.8 ppmの静磁場均一性を達成した.これは、従 来設計のバルク磁石[2]で得られた均一性31.2 ppm(1次シミングあり)よりも約4割改善されて いる. また、従来設計のバルク磁石におけるGX、 GY, GZコイルの勾配磁場効率はそれぞれ, 12.6 G/cm/A, 11.4 G/cm/A, 8.3 G/cm/Aであった. これ に対して、本研究で開発したバルク磁石における 勾配磁場効率はそれぞれ、14.1 G/cm/A、13.0 G/cm/A, 10.1 G/cm/Aであった. これらの結果か ら、マイスナー効果の影響が小さくなったことで 勾配磁場効率が改善したことが示された. これによっ

て、さらなる高分解能撮像が可能になると考えられる. ヤマゴボウ(Fig.4(a))をFS法及びCS法で撮像し, SNR を比較した結果、CS法を用いることによって、単位時 間当たりのSNRが大幅に向上したことがわかった.FS 法を用いた画像(Fig.4(b))のSNRが5.2であるのに対して、 CSを用いたMR画像Fig.4(c)のSNRは25であった.

Fig.5 (a)は、8mm試験管に入ったダンゴムシである. また, Figs.5 (b, and c)はダンゴムシ断面のMR画像であ る. また, Figs.5 (d, and e)はMR画像を最大値投影(MIP) 処理したものである. CSを用いることによって、ホル gradient echo sequences with CS.

マリン等の化学固定されていない生物の構造や形状を現実的な撮像時間内に高分解 能((50 µm)³)で撮像することに成功した. Figs. 6は、リンゴの種(Fig. 6(a))のMR 画像(Fig. 6(b))と, MIP画像(Fig. 6(c))である. 1.3時間という短時間で十分なSNR を持った(32 um)³の高分解能撮像に成功した.これらの画像に,静磁場の不均一性に 由来するアーチファクトはほとんど見られなかった.

【結論】本研究では、有限要素法解析を用いた最適化計算に基づいて磁石の設計及び 開発を行った.その結果,静磁場均一性は従来設計で得られる均一性に比べて約4割 改善した. また, 高温超伝導体の内径を大きくすることで, マイスナー効果の影響を 減少することに成功し、バルク磁石中の勾配磁場効率が1割から2割改善することを確 認した. さらに. CS法を用いることで, 短時間当たりのSNRを大幅に改善することに 成功した.これらの結果、従来設計のバルク磁石で得られた結果を上回る高分解能撮 像 ((32 µm)³) に成功した.

【謝辞】本研究はJSPS科研費25・490の助成を受けたものである.

【参考文献】 [1] T. Nakamura, et. al., Concept Magn. Reson. B (Magn. Reson. Eng.) 31B (2007) 65. [2] K. Ogawa, et. al., Appl. Phys. Lett. 98 (2011) 234101. [3] D.Tamada, et. al., Physica C, 492 (2013) 174. [4] M. Lustig, et al., Magn. Reson. Med. 58 (2007) 1182. [5] D.Tamada, et. al., Proc., ISMRM, 21th Annual Meeting (2013) 0136. [6] W. Loew, et. al., Proc., ISMRM, 20th Annual Meeting (2012) 2623.



Figure 5 (a) Pill bug. (b, and c) MR images of the pill bug using spin echo sequences with CS. (d, and e) Minimum intensity projection of the MR images.



Figure 6 (a) Apple seed. (b, and c) MR images of the apple seed using

超低磁場機能的核磁気共鳴画像装置の基礎検討

○樋口正法,小山大介,上原弦 金沢工業大学・先端電子技術応用研究所

Feasibility study of an ultra low-field functional magnetic resonance imaging system

OMasanori Higuchi, Daisuke Oyama and Gen Uehara Applied Electronics Laboratory, Kanazawa Institute of Technology, Kanazawa, Japan.

Recently, many studies of ultra low-field magnetic resonance imaging by using superconducting sensors have been reported. This brand-new technology has a potential to obtain functional information of a human brain (Ultra Low-Field functional Magnetic Resonance Imaging: ULF-fMRI). A problem is that the frequency of the nuclear magnetic resonance signal becomes extremely low and this causes difficulties to reconstruct images. We proposed a method to transform such extremely low frequency to more practical frequency by using the asymmetry spin echo method. By performing NMR experiments, we confirmed that the proposed method works properly.

1. はじめに

近年超伝導センサ(SQUID)を用いた超低磁場核磁気共鳴装置の研究が注目されている。これは地磁気以下の静磁場中での核磁気共鳴現象を観測するもので、低周波での 感度が非常に高い超伝導センサを信号検出に用いるものである。静磁場を超低磁場に することによって、従来検出することが出来なかった脳神経活動による核磁気共鳴信 号のゆらぎを観測できる可能性がある(超低磁場機能的核磁気共鳴画像装置: ULF-fMRI)。本研究はその基礎検討として、脳内における脳神経活動による磁場強度 の見積もりと実現化の課題について検討を行った。

2. 脳神経活動に伴う脳内磁場の見積もり

脳磁計測から脳神経活動のモデルとして50nAmの電流ダイポールを想定し、その近傍の磁場を算出した。その結果、電流ダイポール近傍の磁場は200pT程度を有することが分かった。従って、1μT以下の静磁場であればスピンに影響を及ぼす可能性がある。

3. 実現化の課題と解決方法

ULF-fMRIの実現化の課題として、超低磁場中での勾配磁場精度や共鳴信号の低周波化 に伴う周波数分解精度の問題が考えられる。そこで、信号検出時の静磁場を大きくし 信号を高周波化する手法を考案した。これは分極磁場(核磁化)遮断直後の静磁場を 1 µ T以下の超低磁場にして神経活動による磁場でスピンを磁場修飾し、その後極性 を反転した静磁場を加える時に高磁場の静磁場にするものである。観測されるエコー 信号は高周波であり、かつ神経活動の磁場変化の影響を受けたものとなる。

超低磁場核磁気共鳴、機能的核磁気共鳴画像装置、脳神経活動

○ひぐちまさのり、おやまだいすけ、うえはらげん

4. 原理実験

信号検出センサとして最終的にはSQUID を用いることを想定しているが、SQUID は外部磁気ノイズの影響や磁束トラップ の問題など核磁気共鳴現象とは別の SQUID固有の問題が発生する。原理実験に おいては、これらの問題点を考慮する必 要のない多重コイルを用いた実験システ ムを構築した。図1に本システムの構成 を示す。

まず、核磁化磁場遮断直後の静磁場(B1) とその後の反転磁場(B2)の磁場強度が異 なる非対称スピンエコーの実施例を図2 に示す。B1において、検出コイルの感度 帯域ではないため波形レベルでは確認は 難しいが、スペクトル解析では磁場強度

(20 µ T) に対応する周波数 (851Hz) にピ ークを認めることができた。B2において は時間波形でも明瞭にエコーを認めるこ とができ、またそのスペクトルも磁場強 度(44 µ T) に対応する周波数のところ (1873Hz) にピークが認められた。

次に、B1中に外部磁場(B_{add})が加わった 場合の結果を図3に示す。これは神経活 動による磁場が発生したことを想定して おり、B1を十分に小さくしたときにエコ ーが神経活動により影響を受けることを 模擬するものである。この図において、 B1が大きいとき(13μT)にはあまり影響 を受けないが、小さいとき(0.04μT)に は最初のエコーが消失しているのが分か る。なお、本データは静磁場に対して直 交方向に磁場を加えたもので、静磁場と 同じ方向の場合、B1の大きさの違いによ る変化はほとんどない。変化の仕方は磁 場の向きや強度、タイミング等によって 変化する。

以上の実験結果より、本研究で提案した 非対称スピンエコー法の原理を確認する ことができた。今後は実証装置の開発と ヒトの脳神経活動の画像化を目指す。



Fig.1 System block diagram of the NMR experimental system.



Fig.2 Observed NMR signals in asymmetry spin echo.



Fig.3 Influence of the additional field(B_{add}) in first measurement field(B1).

脂質二重膜再構成H⁺-ATP合成酵素subunit *c*-ringの固体高 分解能NMR法による構造決定

○戸所泰人^{1,2},姜秀珍³,湯面郁子¹,岩崎郁¹,鈴木俊治^{4,5},吉田賢右^{4,5}, 藤原敏道¹,阿久津秀雄^{1,3} ¹阪大・蛋白研,²阪大・理,³ソウル大学,⁴東工大・資源研,⁵京産大・ 総合生命

Structure determination of H^+ -ATP synthase subunit *c*-ring reconstituted into lipid bilayer by solid-state NMR

•Yasuto Todokoro^{1,2}, Su-jin Kang³, Ikuko Yumen¹, Iku Iwasaki¹, Toshiharu Suzuki⁴, Masasuke Yoshida^{4,5}, Toshimichi Fujiwara¹, Hideo Akutsu^{1,3}

¹Institute for Protein Research, Osaka University, ²Department of Science, Osaka University, ³Department of Biophysics and Chemical Biology, Seoul National University, ⁴Chemical Resources Laboratory, Tokyo Institute of Technology, ⁵Department of Molecular Bioscience, Kyoto Sangyo University

A rotary motor ATP synthase is located in bacterial plasma membranes, thylakoid membranes of chloroplasts, and mitochondrial inner membranes. F-type ATP synthase from a *thermophilic Bacillus* PS3 (TF_oF₁-ATP synthase) is one of them. TF_o subunit c (TF_oc) consists of 72 amino acids, and forms an oligomeric ring, which acts as a proton motor. The proton-transfer mechanism has not been understood in detail however several structures of c-ring have been determined in crystals. Thus, we determined the structure of the TF_oc-ring reconstituted into liposomes to elucidate the proton-transfer mechanism by solid state NMR.

H⁺-ATP合成酵素は生体エネルギー変換系の最終段に位置する巨大膜タンパク質複 合体であり、真核生物ではミトコンドリア内膜に、バクテリアでは細胞膜に存在する。 ATP合成酵素は、生体膜を介した水素の電気化学的ポテンシャルを利用して、ADPと リン酸からATPを合成する。バクテリアでは、主に $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$ のサブユニットからなる膜 表在性のF₁と ab_2c_{8-15} のサブユニットで構成される膜内在性F₀から構成され、サブユニ ットcは複数集まってring構造を形成している。本研究では、好熱菌PS3由来ATP合成 酵素F₀のサブユニットc-ring(以下TF₀c-ring)に注目した。c-ringは、生物種によって ring構造を構成するオリゴマーの数が異なるが、プロトン輸送によるringの回転は共通 している。近年、X線結晶構造解析により界面活性剤中のring構造が幾つか報告された が、脂質膜中の構造は全く報告されておらず、回転メカニズムの詳細はいまだ解明さ れていない。そこで、回転メカニズム解明に向けて、生体内の環境に近い脂質膜中で のTF₀c-ringの構造決定を固体NMRによりおこなった。

試料は大腸菌大量発現系により¹³C,¹⁵N均一およびリバースラベル法による部分標 識TF_oc-ringを計4種類調製した。界面活性剤を用いてインタクトな TF_oc-ringを精製し、

固体 NMR, ATP 合成酵素, 膜蛋白質

○とどころやすと,かんすじん,ゆめんいくこ,いわさきいく,すずきとしはる,よ しだまさすけ,ふじわらとしみち,あくつひでお



Fig. 1 Structures of TF_0c -ring in membrane determined by solid-state NMR. (a) Superimposed 10 structures. (b) Electrostatic potential mapped with positive areas in black and negative in gray. Cartoon representation of the ring, viewed from membrane (c) and F_1 (d).

DMPC(dimyristoylphosphatidyl -choline) でできた脂質二重膜に再構 成した。さらに無細胞蛋白質発現系に よりアミノ酸選択標識したサンプル2 種類を調製した。

上記の6種類のサンプルについて、 残基間 2D ${}^{13}C^{a}_{i+1}{}^{13}C^{a}_{i}$ 相関、2D ${}^{15}N_{i+1}{}^{13}C^{a}_{i}$ 相関、2D ${}^{15}N_{i+1}{}^{13}C^{a}_{i}$ 相関スペクトルを測定し、 配列特異的に主鎖を帰属した。分解能 の悪い固体 NMR のシグナルのオーバ ーラップを改善するために、選択ラベ ルサンプルを使用した。選択ラベルは 経験的にシグナルが分散し、アミノ酸 配列で帰属がつながるようにデザイ ンした。それらを相補的に用いること で配列特異的に主鎖を帰属が可能と なった。また、主鎖の帰属をもとに 2D ${}^{13}C{}^{-13}C$ 相関スペクトルから側鎖 の帰属もおこなった。

距離相関を得るためにDARR法あるいはspin diffusion法を用いて2D¹³C-¹³C相関スペクトルを測定した。上

記の選択標識した試料は分子間距離を得る測定においてもシグナルの重なりが軽減 でき、非常に役に立った。それぞれのサンプルについて混合時間 15、50、100、200、 400、600、700 msのスペクトルを測定し距離情報を得た。

得られた距離情報によりXplor-NIHを用いてTF_oc-ringの構造計算を行った。TF_oc-ring は同一の10分子が集まったデカマーであり、分子間の帰属において左右の区別ができ ない。そこでモノマーのみの構造を決め、結晶構造の分子間の重なりを仮定してリン グ構造モデルを作成し、分子間の帰属を判別した。最終的には拘束条件として1分子 につき分子内1538個(ヘリックス間も含む)、分子間25個の距離制限、TALOSによる二 面角制限、水素結合を拘束条件に200個構造計算した。エネルギーの低い10個の TF_oc-ring構造について重ねて表示した(Fig.1a)。

TF_o*c*-ring は脂質膜中で決定された最初の構造であるが、界面活性剤中の結晶構造 と同様に砂時計型の構造をとっていた。また、構造の内側4~34残基、外側41~71残 基でヘリックスをとるhelix-turn-helix のヘアピン構造となっていた(Fig.1c,d)。ター ンの中心に位置するE39 C^aと対角分子のものとの距離(直径)は40Åであり、高速AFM による直径39±3Åと一致した。表面電荷は脂質との接触面は活性部位であるE56付近 を除いて疎水的で、ヘリックスの両端には電荷を持ち、DMPC膜の厚さ45Å(黒:極 性部、灰:疎水部)に合う構造となっていた(Fig.1b)。活性部位E56は膜内の疎水的 環境にあるため、側鎖の方向が内側のclosed構造とっている。この結果はSAILアミノ 酸を用いて活性部位E56-N23の構造を解析した結果と一致した。サブユニット*ab*2とと もに脂質に再構成することでE56とN23にどのような変化が見られるか興味深い。

スピンエコーMAS法を用いた脂質二重膜の 化学シフト異方性測定法 〇梅川雄一^{1, 2},松岡茂^{1, 2},山口敏幸^{1, 2, \$},村田道雄^{1, 2} ¹JST-ERATO ²阪大院理

CSA measurement of lipid bilayer by Spin-Echo MAS NMR

○Yuichi Umegawa^{1, 2}, Shigeru Matsuoka, Toshiyuki Yamaguchi, and Michio Murata ¹JST-ERATO Murata Lipid Active Structure Project, Osaka, Japan. ²Graduate School of Science, Osaka University, Osaka, Japan.

Chemical shift anisotropy (CSA) of lipids is frequently used to discuss membrane properties and lipid-protein interactions. To obtain the CSA values from high resolution MAS spectra, we performed spin-echo MAS experiments with non-rotor-synchronized interpulse delay time. In this method, the CSA value is observed as decay of center-band signal intensity.

In this presentation, we applied the spin-echo MAS method to various lipid membranes, and successfully extracted the CSA values from high resolution NMR spectra. Based on these results, the advantages of this method will be discussed.

脂質二重膜を構成する分子の秩序性や動的構造は、脂質二重膜そのもの、または脂 質-タンパク質の相互作用を理解するうえで非常に重要である。NMR測定により得ら れるパラメータの1つである化学シフト異方性(CSA)は、分子の運動性や配向に依存 するため、脂質二重膜の物理化学的評価法として広く用いられてきた。従来、CSAは サンプルを静止、またはマジック角で低速回転させて得られる粉末パターンから求め られてきたが、これらの手法ではシグナルの重複や強度の低下等の問題があり、複数 の成分からなる膜試料への適用には限界があった。一方で、高感度かつ高分解能スペ クトルが得られる高速マジック角回転では、CSAのような異方的な相互作用は平均化 され、消去される。そこで我々はスピンエコー法を用いることで、高速マジック角回 転下、高分解能のスペクトルを得ながら同時にCSAの評価を行う方法を検討した。

スピンエコーの待ち時間を試料回転周期に同期させた場合、MASによりCSAをはじめ とする異方的な相互作用は平均化される。一方で待ち時間が試料回転周期と非同期の 場合は平均化が不完全となり、異方性相互作用はセンターバンドシグナルの強度減少 としてスペクトルに現れる。この減少の割合からCSAを算出することができる。

まず単純なモデル膜として、飽和リン脂質である1,2-ジミリストイルホスファチジ ルコリン(DMPC)の水和二重膜を用いて測定を行った。スピンエコーの待ち時間を変化 させMAS測定を行うと、期待通りローター周期に非同期の点でシグナル強度の低下が 観測され、逆に同期している点では強度の回復が見られた(Fig. 1a)。この強度変化を 理論式でフィッティングすることにより¹⁾、CSAの値を求めることに成功した(Fig. 1b)。 また、温度を変化させ同様の測定を行うことで、ゲル相、リップル相、流動相への相 転移に伴うCSAおよび緩和時間の変化を検出することができた。

Spin echo, Chemical shift anisotropy, Lipid bilayers ○うめがわゆういち,まつおかしげる,やまぐちとしゆき,むらたみちお § 現所属は(公財)サントリー生科財団・生有研 次に脂質ラフトを模したステアロイルスフィンゴミエリン(SSM)/1,2-ジオレオイ ルホスファチジルコリン(DOPC)/コレステロールの3成分混合膜に対して本手法を適 用した。静止状態では完全に重複していたSSMとDOPCの³¹P NMRシグナルは5 kHzのMAS により分離し(Fig. 2a)、それぞれの脂質についてスピンエコー法によりCSAの値を求 めることに成功した(Fig. 2b)。さらに¹³C NMRからは、SSMのアミド炭素とDOPCの2つの アシル鎖に由来するカルボニル炭素(CO1, CO2)の3つのシグナルが区別できたので、 これらのCSA値を同時に決定することができた(Fig. 2c, d)。

現在、CSAからリン脂質-タンパク質の相互作用を評価するため、Halobacterium salinariumの紫膜における脂質とバクテリオロドプシンの相互作用解析を行っており、合わせて発表する予定である。



Figure 1. MAS (5 kHz) 31 P NMR spectra of hydrated DMPC membrane (243 MHz, 29.5°C) at different interpulse delays (a) and relative intensity of centerband signal (b), where the best fit curve was drawn with the CSA value of 41.3 ppm and the T_2 relaxation time of 2.21 ms.

Figure 2. (a) MAS ³¹P NMR spectrum of SSM/DOPC/cholesterol membrane measured at 45°C under 5 kHz MAS. (b) Relative intensity of SSM and DOPC ³¹P signals at different interpulse delays. (c) Non-¹H decoupled MAS ¹³C NMR spectrum of SSM/DOPC/cholesterol membrane obtained at 45°C under 5 kHz of MAS with the deconvolution of overlapping carbonyl signals of DOPC. (d) Relative intensity of three carbonyl carbon signals at different spin-echo interpulse delays.

参考文献 1) Raleigh, D. P.; Olejniczak. E. T.; Griffin, R. G. J. Chem. Phys. 1988, 89, 1333-1350.

中性膜に結合したラクトフェランピンの 膜結合構造と膜親和性に基づく抗菌活性の解明

○井町昌義¹,ナムズライジャフカラントゥクス¹,吉良 敦史², 堤 敦史¹,川村 出¹,内藤 晶¹ ¹横浜国立大学大学院工学府 ²株式会社アルバック

Structure and affinity analysis of bovine lactoferrampin bound to neutral model membranes as studied by solid state NMR and QCM

 \bigcirc Masayoshi Imachi^1, Namsrai Javkhlantugs^1, Atsushi Kira², Atsushi Tutsumi^1, Izuru Kawamura¹, and Akira Naito¹

¹ Graduate School of Engineering, Yokohama National University, Yokohama, Japan. ²Reasearch and Development Division, ULVAC Inc, Japan.

Bovine lactoferrampin(LFampinB) is an antimicrobial peptide found in the N1-domain of bovine lactoferrin(268-284). The structure of LFampinB bound to the neutral membrane(DMPC:DMPG=5:1) was determined by analyzing the chemical shift anisotropies of carbonyl carbons of 6 kinds of amino acid residues. These results indicated that LFampinB formed α -helix in the N-terminal region and the α -helical axis rotated rapidly about the bilayer normal with the tilt angle of 40° to the axis. The association constant (Ka) of LFampinB with the neutral lipids was 300 times smaller than that with the acidic membrane determined by QCM. The difference of the Ka value explains that LFampinB selectively interacts with the acidic bacterial membrane.

【序論】

Bovine Lactoferrampin (LFampinB)は、乳汁中のタンパク質 Bovine Lactoferrin(bLF) のN1ドメインの268-284 アミノ酸残基に相当する17 残基からなるペプチドであり、 bLF のN1ドメインから胃中のペプシンによる消化で切り出されるペプチド Bovine Lactoferricin(LFcinB)近傍に発見された。¹⁾ LFampinB は全体として+5 の電荷をもった 塩基性ペプチドであるため、酸性リン脂質を多く含む細菌膜に特異的に結合する。²⁾ また、現在提唱されている抗菌活性のメカニズムには脂質膜中でのペプチドの構造や 配向に依存することが知られているので、生体膜中での配向や局所構造を分子レベル で明らかにすることは重要である。細菌膜を模した酸性膜との相互作用については、 LFampinB は 1-11 残基が α-helix 構造を形成し、その helix 軸を脂質膜面法線に対して 45°傾けて膜法線周りを回転運動していることが先行研究で報告されている。³⁾そこ で本研究では中性リン脂質に LFampinB を再構成した系で固体 NMR 測定をすること により、哺乳動物の脂質膜への結合構造や相互作用を明らかにすることを目的とした。

固体NMR, 抗菌ペプチド, LFampin

○いまちまさよし,なむずらいじゃふからんとうくす,きらあつし,つつみあつし, かわむらいづる,ないとうあきら 【実験】

¹³C標識LFampinBは、Leu³, Leu⁴, Ala⁷, Gln⁸, Phe¹¹, Gly¹²のカルボニル炭素が¹³C 同位体標識されたアミノ酸残基にFmoc基を導入し、固相合成法を用いて合成した。 哺乳動物模倣膜として中性脂質のDMPCと酸性脂質のDMPGを5:1の割合で混合した ものを使用し、これにペプチドを組み込み多重膜小胞(MLV)を調製した。ペプチド: 脂質=1:20(モル比)として、各膜試料を作成し、水和試料は40℃でDD法、粉末試料は 20℃でCP法により¹³C-NMR測定を行い、LFampinBの動的構造を、³¹P-NMR測定か らペプチドとリン脂質の相互作用を観測した。NMR測定にはChemagnetics CMX infinity-400 FT-NMR分光器を使用した。

【結果及び考察】

(1)膜結合時のリン脂質の状態

³¹P-NMR測定によりリン脂質の相の状態を見ることができ、MLVが正しくできて いるかどうかを見ることができる。MLVは液晶相を表す軸対象テンソル δ_{\perp} 、 δ_{\parallel} が現れ るが、膜が分断し小分子化されると0ppmに等方相 δ_{iso} のみが現れるようになる。中性 膜にLFampinBを添加した場合、濃度が高くなるほど大きく膜分断を起こすことが示 された。

(2)脂質膜中でのLFampinBの挙動

helixを形成したペプチドが脂質に分子膜中の膜面法線周りで一軸回転運動をする とき、各アミノ酸残基の異方性の理論値 $\Delta\delta_{cal}$ は、回転軸から膜法線への角度 ζ 、カル ボニル平面の面角 γ を用いて以下のように表せる

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

また、各アミノ酸残基の異方性は¹³C DD-static測定により異方性の実験値 $\Delta\delta_{obs}$ を、¹³C DD-MAS測定により等方値、低速¹³C CP-MAS測定により各カルボニル炭素のテンソルの主値 $\delta_{11},\delta_{22},\delta_{33}$ を求めた。測定結果の例をFig.1に示す。



Fig.1 ¹³C NMR spectra for [1-¹³C] Leu⁴ LFampinB (a) DD-Static (b) DD-MAS 4kHz (c)CP-MAS 2KHz * peak of lipid

 $\Delta \delta_{cal} \ge \Delta \delta_{obs}$ の一致を示すRMSD値より、このhelixの膜法線から の傾きを40° と決定した。この角度を用いて $\Delta \delta_{cal}$ の曲線と $\Delta \delta_{obs}$ のプロット(化学シフトオシレーション)からhelixの種類や境界 を判断し、Leu³からAla⁷までは α -helixを形成し、Phe¹¹からは α -helixが崩れていることが確認できた。膜結合構造はFig.2のよ うにN端から中性膜に挿入し、膜法線から40°傾いて一軸回転運 動をしているということが判明した。

【参考文献】

- 1) Marieke, I. A. van der Kraan et al: Peptides (2004) 25, 177-183.
- 2) Evan, F. et al: Biochim. et Biophys. Acta (2007) 1768, 2355-2364.
- 3) Tsutsumi, A. et al: Biophys. J (2012) 103, 1735-1743.

Fig.2 Structure of LFampinB bound to neutral lipid bilayer

P67 固体 NMR 法を用いた細胞内の膜蛋白質 pHtrll の構造解析

江川文子¹、池田恵介^{1,2}、Lili Mao³、林こころ¹、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

Solid-state NMR structural analysis of transmembrane halobacterial transducer *p*HtrII in cellular environment

 \bigcirc Ayako Egawa¹, Keisuke Ikeda^{1,2}, Lili Mao³, Kokoro Hayashi¹, Chojiro Kojima¹, Masayori Inouye³ and Toshimichi Fujiwara¹

¹Institute for Protein Research, Osaka University ²Graduate School of Pharmaceutical Sciences, University of Toyama ³Department of Biochemistry, UMDNJ-Robert Wood Johnson Medical School

Transmembrane protein *p*HtrII from *N. pharaonis* is a transducer binding to phoborhodopsin. We studied fully ¹³C, ¹⁵N labeled 159-residues *p*HtrII by high-resolution solid-state NMR in *Escherichia coli* cells. Only protein *p*HtrII was labeled efficiently in the cells by the condensed single protein production (cSPP) system using *m*-RNA interference. The amount of the cells required for this cellular analysis was much smaller than that for the analysis of purified protein reconstituted in lipid bilayers. The obtained ¹³C chemical shifts in the cells confirmed that the transmembrane and cytoplasmic domains formed the structure reported by our previous solid-state NMR study of the purified protein. The cleavage of the peptide bonds in the cells was also monitored by the ¹⁵N signals.

【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 *pp*R (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 *pp*R 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*pp*R 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決まっている(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。これまでに、固体 NMR を使って脂質二重膜に再構成した pHtrII の解析の結果、HAMP ドメインを含む 構造を捉えることができた。そこで、より生理的環境下に近い細胞内での pHtrII の

インセル固体NMR、細胞、膜蛋白質

○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 構造解析を行うために、目的蛋白質のみを効率的に同位体標識できる Single Protein Production (SPP) 法[2]を使って、インセル固体 NMR 測定を行うことにした。

【方法】培養は SPP 法で行った。pHtrII のみを ¹³C, ¹⁵N 安定同位体標識した大腸菌試料は、ACA 配列非含有のpHrtII 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。集菌したペレットはそのまま 3.2mm ローターに超遠心機を用いて詰めた。インセル固体 NMR 実験は、Varian Infinity-plus 700 分光計を用いた。2D ¹³C-¹³C スピン拡散スペクトルは試料回転数 12.5 kHz、設定温度–70°C で行った。最後に、設定温度 5°C で ¹³C-¹³C NOE-TOCSY 法の測定を行った。また、溶菌した試料をローターに詰め、¹⁵N の 1D ¹⁵N スペクトルの測定を行った。

【結果と考察】

最初に、cSPP 法による培養に よって、宿主タンパクが完全に抑制さ れ、目的タンパクのみが同位体標識さ れていることを確認するために、非発 現誘導と発現誘導の膜画分試料の1D

¹³C スペクトルを比較した。その結果、 細胞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、 膜面分試料で¹³C-¹³C NOE-TOCSY と ¹³C-¹³C 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 (Figure1)。



Figure 1. 2D $^{13}{\rm C}^{-13}{\rm C}$ correlation spectrum of the membrane fraction of $p{\rm HtrII}$ expressed cells.

また、脂質二重膜に再構成された試料では観測されない信号が確認され、帰属の結果、 大腸菌由来のペプチドグリカンであることが分かった。

最後に、設定温度-70℃でインセル固体 NMR 実験を行い、膜画分同様、pHtrII 由来の信号にほぼ重なることが確認できた。この結果は、脂質二重膜中 pHtrII と同様 に HAMP ドメインを含めて構造を維持していることを示唆している。さらに、室温 に約 70 時間放置して溶解させた細胞の¹⁵N スペクトルの強度解析の結果、アミノ末 端の信号増加がアミド基の信号強度に対して 5 % であることが分かった。これは、 アミド結合が pHtrII の 167 残基中約 9 カ所で分解されていることに相当する。

【参考文献】

- 1. Gordeliy, V.I. et al. (2002) Nature, 419:484-487.
- 2. Suzuki, M. et al. (2007) Nat Protoc, 2:1802-1810.

固体NMRにおけるGFT NMRを応用したタンパク質連鎖帰属 法ならびに解析支援プログラムの開発 〇田巻初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

Development of GFT NMR based sequential assignment method and tools for proteins in solid states

OHajime Tamaki¹, Ayako Egawa², Masakatsu Kamiya¹, Takashi Kikukawa¹, Tomoyasu Aizawa¹, Keiichi Kawano¹, Toshimichi Fujiwara² and Makoto Demura¹ ¹ Graduate School of Life Science, Hokkaido University, Sapporo, Japan ² Institute for Protein Research, Osaka University, Osaka, Japan

Magic-angle-spinning solid-state NMR (MAS ssNMR) has great potential to provide information for structure and dynamics of insoluble biomolecules such as membrane proteins and amyloid fibrils. In spite of rapid development of technical aspects, assignment is still a difficult task, due to peak line width broadening in solid-state. Multi-dimensional experiment is a straightforward approach to avoiding this problem. One of the biggest drawbacks of this approach is sampling limitation in indirect dimensions. To tackle this limitation, we have developed a sequential assignment method based on G-matrix Fourier transform (GFT) projection NMR spectroscopy, which is one of the fast data sampling methods. In addition, we have developed computer-aided assignment software for GFT NMR in solid states. We will discuss about them.

固体NMR法は、膜タンパク質やアミロイド繊維といった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、原理的に信号の線幅が 広く、熟練者であっても帰属が難しいため解析のボトルネックの一つとなっている。 多次元測定はこの問題を解決する極めて強力な手法である。この方法の最大の欠点は、 次元が増えるごとに測定時間が指数関数的に増大してしまうことである。我々は高速 測定技術の一つであるG-matrix フーリエ変換NMR (GFT NMR)に着目した(Kim and Szyperski, 2003)。GFT NMRでは、複数の展開軸を同時にインクリメントするジョイ ントサンプリングによって、測定時間を一桁以上短縮できる。さらにジョイントサン プリングされた化学シフトは線形結合で表現されるため、ピーク分散の改善が期待さ れる。しかし、GFT NMRには複数のサブスペクトルを同時に解析する必要があるとい う欠点があり、解析の負担を低減するためコンピューターによる解析支援が望まれる。 我々はGFT NMRをベースとした連鎖帰属方法と解析支援プログラムを開発した。本発 表では、その有用性を検証するために行った、モデルタンパク質GB1を用いた測定お よび解析について報告する。

GFT NMR, 高速多次元測定, 解析支援プログラム

○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 方法

測定試料には¹³C, ¹⁵N均一標識したGB1の微結晶を用いた。CANCOCX MASローターは外径3.2mm,容量22 µLのものを使用した。 すべての測定で、装置は700MHzの固体NMR装置 (Varian/Chemagnetics Infinity-plus 700)を使用し、測 定中の試料回転は14.6kHz, プローブ温度は-10℃に設定 した。

 $C\alpha_i - N_i - C'_{i-1} - CX_{i-1}$ の相関を与えるパルスシーケンス 4D-CANCOCXと、 $C'_{i-1} - N_i - C\alpha_i - CX_i$ の相関を与えるパルスシ ーケンス 4D-CONCACXのN, CO軸にジョイントサンプリン グを適用した(4,3)D-CANCOCX/CONCACXを組み合わせるこ とにより、連鎖帰属に必要な相関を取得した(Figure 1)。 得られたFIDを時間領域でG行列変換した後、通常の3次元 測定と同様のプロセスを経て、それぞれから2つのサブス ペクトルを得た。

得られたサブスペクトルをスペクトル解析プログラム SparkyとGFT NMRスペクトル解析用に開発したプラグイン 群を組み合わせて解析した。開発したプラグイン群は主に、 サブスペクトル間でのピークの対応づけ、同一の Ca_i-N_i-C'_{i-1}相関をもつピークのグルーピング、連鎖帰属 のプラグインで構成されている。いずれのプラグインも自 動解析機能を実装している。Sparkyの標準機能を用いてピ ークピックした後、プラグインによる自動解析、ユーザー 入力による解析の確認・修正を経て、GB1の主鎖原子を帰 属した。



Figure 1.

Chemical shift correlation diagrams of CANCOCX and CONCACX. Atoms circled with dashed line were jointly sampled.

結果

【測定時間】(4,3)D-CANCOCX/CONCACXの測定には、およそ1週間を要した。デジタ ル分解能は¹³Cで1.7ppm、¹⁵Nで2.2ppmであった。従来法で同じ分解能のデータを得る場 合に比べて測定時間を40分の1に短縮することに成功した。また従来法を用いて同じ 時間で測定した場合、単純計算で分解能は4分の1程度となるため、帰属に使用するに は適さないことが予想される。なお、スペクトル幅とポイント数の最適化や大容量ロ ーターの使用により、測定時間はさらに半分以下まで短縮可能であると考えられる。 【ピーク分散】 Ca_i-N_i-C'_{i-1}の化学シフトがほぼ等しい2つのスピン系を除く、す べてのスピン系が分離していた。現在広く使用されている3D-NCACX, NCOCX, CANCOを 併用するプロトコールの場合、スピン系を構築する際に用いるN_i-Ca_iとN_i-C'_{i-1}の相 関がそれぞれ10個程度縮退する。GFT NMRを用いた4次元測定により、現在主流の方法 と比べてピーク分散が向上することが確認された。

【自動解析】 自動解析の精度は各ステップにおいて70%程度であり、所要時間は合計で数分であった。自動解析結果の確認・修正に要した時間を加えても半日~1日程度で解析を終えることができ、開発したプラグインを用いることで効率的に解析できることが確認された。

¹³C固体MAS NMRによるフォボロドプシンのレチナール -タンパク質間相互作用の解析

○川村出¹,西川亮汰¹,沖津貴志²,和田昭盛²,須藤雄気³,加茂 直樹⁴,内藤晶¹ ¹横浜国大・院工,²神戸薬大³名大,⁴北大

Retinal-Protein interaction in Phoborhodopsin as studied by ¹³C solid-state MAS NMR

 \bigcirc Izuru Kawamura¹, Ryota Nishikawa¹, Takashi Okitsu², Akimori Wada², Yuki Sudo³, Naoki Kamo⁴ and Akira Naito¹

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

²Department of Organic Chemistry for Life Science, Kobe Pharmaceutical University, Kobe,

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

⁴*Faculty of Advanced Life Science, Hokkaido University, Sapporo, Japan.*

Here we present a ¹³C MAS SSNMR study of retinal-protein interactions in *pharaonis* phoborhodopsin (*p*pR), which is a microbial 7-transmembrane-helix protein. [15, 20^{-13} C]Retinal, [C ζ^{-13} C]Tyr and [C ϵ^{-13} C]Lys-labeled *p*pR and its mutants within the lipid bilayer were prepared to investigate the conformation of residues in the vicinity of retinal. The correlated peaks of Tyr174 and Lys205 with retinal were clearly appeared in 2D proton-driven spin-diffusion (PDSD) NMR spectra. These NMR signals have revealed structural information about retinal-binding site. In this presentation, we will describe the application of solid-state NMR to probe the change of interaction between retinal and protein.

1. 緒言 フォボロドプシン(ppR)は高度好塩好アルカリ性菌Natronomonas pharaonis 中に存在する7回膜貫通型の光センサー膜タンパク質である(分子量26,000)。このタン パク質に結合しているレチナールの光異性化反応をきっかけにして、共役するトラン スデューサータンパク質に信号を伝達することで、細菌の忌避応答である負の走光性 機能を発現する。ppRの結晶構造からレチナール近傍にはTyr174およびThr204が位置 していることがわかっており(図1)、それぞれに変異を導入すると忌避応答は示さない ため(1)、これらの残基は機能発現に極めて重要である。また、ヘリックスFに位置す るこのTyrは他のロドプシンタンパク質においても高く保存されており、レチナール とタンパク質の相互作用を理解する上でも重要なTyr残基である。我々は*In-situ*光照射 -固体NMRを用いて、これまでにppRのレチナール光異性化と光中間体の捕捉に成功し てきた(2)。レチナールの化学シフト値を参考にして、本研究ではProton-Driven Spin-Diffusion (PDSD)などの手法を用いてレチナールとTyr174の¹³C相関信号を観測し、 変異体との比較により機能発現に関わるコンフォメーション変化を解析することが 目的である。

固体NMR,¹³C-¹³C相関, レチナール

oかわむらいずる, にしかわりょうた, おきつたかし, わだあきもり, すどうゆうき, かもなおき, ないとうあきら

<u>2. 実験方法</u> ¹³C安定同位体標識ppRの調製は次のとおりである。ppR/His-Tagプラス ミドを導入した大腸菌BL21(DE3)株を用いて、[15, 20-¹³C]標識レチナール, [C ξ -¹³C]Tyr および[C ϵ -¹³C]Lysを含むM9培地により大量発現した。ここでOH基が結合したC ξ の標 識部位はレチナールとの相互作用やそのコンフォメーション変化を観測するために 導入した。その後、超音波破砕、界面活性剤n-dodecyl- β -D-maltoside (DDM)による可 溶化、Ni-NTA resinによる精製を行った。精製した可溶化タンパク質をEgg PC脂質膜 (ゲル-液晶相転移温度 4°C)にBio-Beadsを用いてモル比1:30(タンパク質:脂質)の割合 で再構成した(pH 7.0)。これと同様な手法で変異体(T204A)についても作成した。およ そ8 mgのタンパク質試料を4 mmのMASローターにパッキングした。¹³C固体NMR測定 はBruker 600 MHz Avance III分光器を用いて、グリシン粉末のカルボキシル炭素の信 号176.03 ppm (TMS 0 ppm)を基準にして、MAS回転周波数11.0 kHz、測定温度27℃の 条件で行った。

<u>3. 結果と考察</u>¹³C CP-MAS測定から*pp*R中のレチナールの20位と15位の炭素の信号 は、それぞれ13.5 ppmと162.1 ppmに観測された。*pp*R中には11残基のTyr、2残基の Lys(そのうち一つはレチナールとシッフ塩基結合しているLys205)が含まれている。こ れらのTyr C5の信号は155 ppm付近に重なって現れた。また、Lys205の信号はレチナ

ールとシッフ塩基結合を形成しているため54.3 ppmおよびLys157の信号は39.8 ppmに帰属した。

つづいて、¹³Cスピン拡散を利用する2D PDSD (混合時間 500 ms)によって、レチナールとTyr174 およびLys205との間のクロスピークを観測する ことができた。これにより、157.8 ppmの信号を Tyr174に帰属した。この信号はCP-MASで得られ た11残基のTyr Cζの信号のうち、最も低磁場側に 現れたのでTyr174は*p*pRのTyrの中で最も強い 水素結合を有していることが示唆された(3)。

一方でThr204変異体(T204A)の¹³C CP-MAS
 NMRスペクトルでは、レチナールとTyrの信号



図 1: レチナール近傍の Tyr174 および Thr204 の位置 (PDB:1jgj)

位置が変化していることがわかった。これはThr204とTyr174の間の水素結合が無くなることによって、Tyr174とレチナールとの相互作用が変化したと強く示唆される。このような膜タンパク質の信号について生理条件に近い測定温度27℃、細胞膜が液晶状態で測定することに成功した。討論会までに変異体を用いた場合のTyr174の化学シフト値を詳細に解析し、Tyr174の側鎖のコンフォメーション変化を議論する予定である。

4. 参考文献

(1) Y. Sudo, Y. Furutani, H. Kandori, J.L. Spudich (2006) J. Biol. Chem. 281 34239-34245.

(2) Y. Tomonaga, T. Hidaka, I. Kawamura, T. Nishio, K. Osawa, T. Okitsu, A. Wada, Y. Sudo, N. Kamo, A. Ramamoorthy, A. Naito (2011) *Biophys. J.* <u>101</u> L50-L52.

(3) M. Eilers, J.A. Goncalves, S. Ahuja, C. Kirkup, A. Hirshfeld, C. Simmerling, P.J. Reeves, M. Sheves, S.O. Smith (2012) *J. Phys. Chem. B* <u>116</u> 10477-10489.

光照射固体NMRによる暗順応状態のバクテリオロドプシンの光励起過程と局所構造変化の解析
 〇重田 安里寿¹, 宮佐 亮太¹, 堀籠 美也子¹, 川村 出¹,
 沖津 貴志², 和田 昭盛², 辻 暁³, 内藤 晶¹
 ¹横浜国大・院・エ
 ²神戸薬大
 ³兵庫県立大・院・理

Structural changes in the photo excited process in dark-adapted state of Bacteriorhodopsin as studied by photoirradiation solid-state NMR

○Arisu Shigeta¹, Ryota Miyasa¹, Miyako Horigome¹, Izuru Kawamura¹, Takashi Okitsu², Akimori Wada², Satoru Tuzi³, and Akira Naito¹

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

²Kobe Pharmaceutical University, Hyogo, Japan.

³Graduate School of Science, University of Hyogo, Hyogo, Japan

Bactriorhodopsin (BR) is an integral membrane protein that functions as a light-driven proton pump and has retinal chromophore which forms two different configurations of all-*trans* (AT) and 13-*cis*, 15-*syn* (CS) with 1:1 molar ratio (dark-adapted state (DA)), and changes to ~100% AT under photoirradiation condition (light-adapted state (LA)). In this study, retinal configuration change in BR was observed using $[1-^{13}C]$ Tyr-, $[20-^{13}C]$ Retinal-BR by means of *in situ* photoirradiation SS-NMR. At 20°C, change from DA to LA is seen; however, at -20° C, an CS-like intermediate (CS*) is observed stationary under green light illumination. Large structural change was also observed in protein side in CS*.

These results suggest presence of a new photocycle, starting from CS in which CS may play an **a** essential role in proton pump function.

【序論】バクテリオロドプシン(BR)は高度好 塩菌の紫膜に存在する光駆動型プロトンポ ンプ機能を持つ膜タンパク質である。光照射 により all-*trans* (AT)は K, L, M, N, O 中間体 を経て AT に戻り、この間 H⁺を細胞外に 輸送する。一方 13-cis, 15-syn (CS)は別の 中間体を経て AT に変化すると考えられ ないる。





固体NMR, バクテリオロドプシン

○しげたありす,みやさりょうた,ほりごめみやこ,かわむらいずる,おきつたかし, わだあきもり,つじさとる,ないとうあきら 本研究は光照射固体 NMR を用いて、特にこの CS の光励起過程におけるレチナール とタンパク質の構造変化の解明を目的として行った。

【実験】レチナールとそれを取り囲むタンパク質の構造変化を観測するために、高度 好塩菌のレチナール欠損株 Halobacterium salinarum E1001 株を用い、[1-¹³C]Tyr-, [20-¹³C]Retinal-BR を得た。測定温度は 20℃および-20℃に設定し、Dark(D1)→Light(L1) →Dark(D2)の順番で測定を進行して、レチナールとタンパク質の構造変化を解析した。 光照射 NMR 測定は、520 nm LED を光ファイバーによりプローブに導入し、試料管内 部から光照射する方法を用い、マジック角回転 MAS(回転周波数 4 kHz)条件で固体高 分解能 CP-MAS NMR 測定をそれぞれ 20000 回積算行った。

【結果と考察】20℃で光照射することにより、暗順応状態(AT (13.1 ppm): CS (22.2 ppm) = 1:1)から明順応状態(~100% AT)に変化した。次に-20℃で、光照射すると CS の 信号強度が減少し、AT の位置と異なる位置(19.7 ppm)にピークが成長した。(Fig.1a) こ の結果は CS とは別の 13-cis 型の光中間体(CS*)に変化したことを示している。次いで、 光照射を切り D2 状態にすると CS*のピークは 6 時間以内に AT に変化した。(Fig.1b) 以上の結果から、光照射により CS から直接 AT に変化するのではなく、CS*を経由し て AT に変化することがわかった。20℃で CS*が観測できなかったのは、CS*から AT に緩和する速度が遅くなり、CS*の寿命が短く、常温では捕捉できなかったためと考 えられる。また、-20℃において CS*が定常的に観測されたことより、CS と CS*の間 に平衡が成り立っていることが明らかになった。

先行研究により、AT だけでなく CS が起点となる光サイクルが存在し、いくつかの中間体を持つことが報告されている。このことより、CS*は CS 光サイクルの中間体の可能性の1つである可能性が示唆される。AT の光サイクル中の中間体は、基底状態から光励起により K 中間体が形成され、緩和過程(L, M, N, O)を経て基底状態に戻

る。しかし、実験結果からは、CS フォトサイクルの中間体 は暗所にあると CS には戻らず、CS*から AT へ変化する経路 の存在が明らかになった。以上のことから BR には図 2 のよ うな CS と AT を起点とする 2 つのフォトサイクルが存在す ると考えられる。

同時にモニターしていたタンパク質側の[1-¹³C]Tyr の NMR 信号の変化から構造変化について観測した結果、20[°]C では暗順応から明順応に変化しても Tyr の信号(174.2 ppm と 175.8 ppm)にはほとんど変化が見られなかったのに対し、 CS*状態では random coil から α -helix への大きな構造変化が 観測された。AT と CS のときのタンパク質構造には大きな 変化がないことから、CS^{*}ヘレチナールが異性化するときタ ンパク質側にひずみが加わるため、大きく構造変化する可能 性が考えられる。



Fig. 2. BR Photocycle as revealed by these experiments

In situ 光照射固体NMRによる センサー型光受容膜タンパク質センサリーロドプシンの 光反応経路の解析 ○ 慎野 義輝¹、友永 雄也¹、柴藤 祐介¹、四方田 洋紀¹、 日高 徹朗¹、川村 出¹、沖津 貴志²、和田 昭盛²、 須藤 雄気³、加茂 直樹⁴、内藤 晶¹ ¹横浜国大・院工,²神戸薬大,³名古屋大・院理,⁴北海道大・院生命理

Analysis of photoreaction pathway of sensor type photoreceptor membrane protein by *in situ* photo irradiation solid-state NMR

OYoshiteru Makino¹, Yuya Tomonaga¹, Yusuke Shibafuji¹, Hiroki Yomoda¹,

Tetsurou Hidaka¹, Izuru Kawamura¹, Takashi Okitsu², Akimori Wada², Yuki Sudo³,

Kamo Naoki⁴, and Akira Naito¹

¹Grad. Sch. Emg, Yokohama Natl Univ.

²Kobe Pharm Univ.

³Grad. Sch. Sci, Nagoya Univ.

⁴Grad. Sch. Life Sci, Hokkaido Univ.

Sensory rhodopsin is a photo receptor retinal protein with a congenital transducer protein. Through the photo cycle, signal transfer to transducer protein to express function of negative or positive phototaxis. ppR(pharaonis phoborhodopsin) from complex with a transducer protein *p*HtrII to express negative phototaxis. To analyses photoreaction pathway, we measured ¹³C NMR under the photo irradiation using *in situ* photo irradiation CP-MAS NMR. The result demonstrated that the conformational change occurred in the transmembrane region of *p*HtrII, and some intermediates such as M, N, O were observed. In the same way, we observed to photo activation pathways of *sr*SRI shows mainly positive phototaxis, while negative phototaxis under UV light. The result demonstrated color-discriminating pathways of *sr*SRI such as G \rightarrow M, (green light) M \rightarrow P(blue light),and G \rightarrow P(blue light).

[序論]

センサリーロドプシンは高度好塩菌の膜中に存在するレチナールタンパク質であ る。この光受容膜タンパク質は、Fig. 1に示すようなフォトサイクルと呼ばれる特有 の光反応経路を経て、トランスデューサータンパク質に信号を伝達し、正・負の光走 性を示す。ppR は Natronomonas pharaonis の膜中に存在する光受容膜タンパク質であ り、生体膜中で固有の信号伝達タンパク質 pHtrII と2:2の複合体を形成し、負の光 走性を担っている。しかし、その光反応経路の詳細は未だ解明されていない。また、 srSRIはSalinibacter ruber の膜中に存在する正と負の両方の光走性を担う光受容膜 in situ 光照射固体NMR, 膜タンパク質, センサリーロドプシン

○まきのよしてる、ともながゆうや、しばふじゆうすけ、よもだひろき、 ひだかてつろう、かわむらいずる、おきつたかし、わだあきもり、すどうゆうき、 かもなおき、ないとうあきら タンパク質である*st*SRIの光反応経路に関しては未だ多くの情報が得られていない。

これらppR/pHtrII複合体とsiSRIの光反 応過程を解明するために、in situ 光照射 固体NMR装置を用いて、光照射下での¹³Cの化 学シフト値の変化を測定した。

[実験方法]

*p*pRと*p*HtrII(1-159)を*E. coli*(BL21)を用いて発現し、[15-¹³C, 20-¹³C]retinal標 識*p*pR及び、[1-¹³C] Va1, [2-¹³C] G1y, [3-¹³C]A1a標識*p*HtrII(1-159)を精製した。そ れらをEgg-PC脂質二重膜に*p*pR:*p*HtrII=2:2のmol比になるように再構成した。*st*SRI も同様に発現させ[15-¹³C, 20-¹³C]retinal標識*st*SRIをPG膜に再構成した。再構成後の 試料を*in-situ*光照射固体NMR法によって光照射下で¹³C NMRスペクトルを測定した。 光照射の光源はLED光(520 nm、365 nm)であり、光ファイバーを用いて試料管に直接 光を導入した。光ファイバーをNMR試料管に非接触とすることで、マジック角回転4 kHz で試料を高速回転しながら光照射下で、¹³C NMR測定を行った。

[結果と考察]

[ppR/pHtrII複合体の光励起過程]

ppR/pHtrII複合体は光照射下、0℃においてG状態から M中間体に異性化をした(Fig. 2)。これに伴い、Alaは α - helixからrandom coilに構造変化をした。これは、 膜内部での光受容体(ppR)からトランスデューサー (pHtrII)に信号伝達されていることを示唆するもので ある。さらに、幅広なM中間体の信号の詳細を解明すべ く、-40℃で観測を行い、M中間体には少なくとも3種 類が存在していることが判明した。そのうちの1つは blue lightの照射で減衰しないことからバクテリオロ ドプシンのN-中間体様の構造であることが示唆された。 また低温での実験では0-中間体様のall-*trans*配座を 示す信号が顕著に観測された。光照射固体NMRによる定 常的な光反応過程では寿命の短い中間体でも観測可能 であることが明らかとなった。



[srSRIの光励起過程]

次に*st*SRIの光照射固体NMRの実験を -40° Cで行った。520 nm照射下では定常的にM 中間体(19.8 ppm)を捕捉でき、光照射によるG→Mの光反応経路が確かめられた。M中 間体を十分に捕捉した後、365 nmを照射したところ、M中間体(19.8 ppm)の信号が25 ppm 付近に移動した。この信号はP中間体であると同定でき、Fig. 1(B)に示したM→Pの光 反応経路を観測することに成功した。さらに、G状態に365 nmを照射したところG状態 (13.5 ppm)の信号は25 ppm付近に移動した。これは、1光子過程(G→P)による定常的 なP中間体の捕捉を示唆していた。光照射固体NMRによる本研究は、温度や照射光波長 の調節により、波長依存的に特定の中間体を捕捉可能であることを示す結果となった。



Fig. 1 Potocycle of *p*pR(A) and *sr*SRI(B)

Silk II型家蚕絹の構造解明へ向けて: DARR法からのアプローチ

○奥下慶子¹、浅野敦志¹、青木昭宏²、朝倉哲郎^{2,3} ¹防大・応化、²農工大院工、³分子研

Elucidation of Silk II Structure of *Bombyx mori* Silk Fibroin: Use of DARR Method

OKeiko Okushita¹, Atsushi Asano¹, Akihiro Aoki², and Tetsuo Asakura^{2,3}

¹ Department of Applied Chemistry, National Defense Academy, Kanagawa, Japan.

² Department of Technology, Tokyo University of Agriculture and Technology, Tokyo, Japan.

³ Institute for Molecular Science, Aichi, Japan.

The structure of the crystalline region of *Bombyx mori* silk fibroin changes from Silk I to Silk II by spinning. Although the structure Silk I was already determined with solid state NMR, the structure of Silk II has not been determined yet. Recently, a novel Ala-Gly (AG) model of the Silk II consisting of two kinds of β -sheets with different inter-molecular arrangement and distorted β -turn was proposed. In this study, we tried to elucidate the Cp-fraction (crystalline fraction) with Silk II form on the basis of the build-up curves obtained from 2D ¹³C-¹³C DARR measurements. At first, the validity of the build-up curve analysis was examined with AP- β [U-¹³C] Ala₄, where the structure was already determined by X-ray study. The error range of the analysis was estimated to be (EV) = 0.31. Then, the 2D DARR spectrum of [U-¹³C] Cp-fraction was used to analyze the Silk II structure by paying attention to the inter-molecular distances between Ser and Ala residues.

〈背景・目的〉

家蚕絹の一次構造のうち、約55%は結晶部と呼ばれる繰り返し配列で構成された領域である。吐出後の家蚕絹糸の結晶部はSilk II型と呼ばれる繰り返し構造をとることが知られており、その分画は、家蚕絹糸を精錬し、酵素処理をすることで得られる(ここではSilk II 型構造を有する、この分画をCpフラクションとする)。

Cp フラクションの固体 ¹³C CP/MAS NMR スペ クトルにおいて、Ala-Cβ部位は、見かけ上 3 種類 のピークからなる(Fig. 1)。このうち、最も高磁場 側のピークは、化学シフトマップとスピン拡散 NMR を用いた 2 面角の解析から、Distorted β-turn 構造と帰属されている¹。それ以外の 2 本のピー クは結晶由来のピークと帰属され、少なくとも 2 種類のβシート構造からなると結論されてきたが、



Solid-state NMR, DARR , Silk fibroin, Silk II structure

○おくしたけいこ,あさのあつし、あおきあきひろ、あさくらてつお

これら2種類のβシート構造を有する領域を単離して取り出すことはできない²⁴。

Fig.1 に示したように、Ala-Gly(AG)連鎖ペプチドと Cp フラクションの AlaCβ部位 の¹³C CP/MAS NMR スペクトルは酷似していることから、Cp フラクションのモデル として AG 連鎖ペプチドを取り上げることができる。そこで、このペプチドについて、 X 線解析によって報告されてきた Silk II 型構造の単位格子を適用し、b 軸と c 軸を逆 転させた 2 種類の構造、A と B を作製、構造最適化を行った後、¹³C、¹H、¹⁵N 化学シ フトを GIPAW 法で計算すると、その結果は実測と良く一致することが分かった⁵。

本研究は、Cp フラクションについて、比較的長距離までの距離情報が得られる、 固体 2 次元¹³C DARR スペクトルを測定、複数の結晶相を形成する Silk II 型の構造を 解析することを目的とする。Cp フラクションの低磁場ピークは、A と B からなるが、 Ala-Cβ以外のピークは¹³C 化学シフト値がほぼ等しいため、固体 2 次元¹³C DARR か ら得られる各相関ピーク強度の混合時間依存性(ビルドアップカーブ)から、構造 A と B 内の各炭素間距離を直接算出することはできない。そこで、実測の化学シフトを良 く再現する、エネルギー最適化された AG 連鎖モデルを出発点として、炭素間距離情 報を求め、ビルドアップカーブを理論的に計算し、実測のビルドアップカーブと比較 して Cp フラクションの構造解析を行った(Fig. 2)。



Fig.2 Schematic representation of analytical process for the Silk II structure. The build-up curve was simulated from each effective ¹³C-¹³C distance (r_A , r_B) estimated from (AG)₁₅.

2種類の構造AとBの間で最も差の大 きい炭素間距離は、各構造内で折り返す シート間の Ala-CB同士である。しかしこ の部位の相関ピークは、対角ピークと重 なり、実測のビルドアップカーブを求め ることは困難である。一方、Cp フラクシ ョンと AG 連鎖モデルではアミノ酸配列 が少し異なり、前者は3つの Ala のうち 1つが Ser に置き換わっている。この Ser 側鎖の OH は、分子間で水素結合するこ とによりβシート構造の安定化に寄与し ている⁶。Ser の化学シフトは Ala とは異 なるため、相関ピークも観測されやすい。 そこで、Ser-Ala間の理論ビルドアップカ ーブを AG 連鎖モデルの Ala-CBと Cp フ ラクションのSer-CBが同じ座標にあると 仮定して求め、解析を進めた。

〈実験・解析〉

試料作製: 家蚕飼育時、餌に [U-¹³C₆]Glucose を混合し、アミノ酸の全炭素を¹³C ラベル化([U-¹³C]) した絹糸を得た。 [U-¹³C] 家蚕絹糸を精練(絹糸表面のセリシンを 除去)後、9 M LiBr 水溶液に溶解、透析を経て再生絹フィブロイン水溶液を得た。各 水溶液をα-キモトリプシン処理した後、沈殿(全体の 55%)を集めて、Silk II 型構造の [U-¹³C] Cp フラクションを得た。

固体 NMR 測定: 家蚕絹については JEOL ECX 500 NMR (物質・材料研究機構)、また、βシート構造の[U-¹³C] Ala₄ については Bruker DMX 500 NMR(防衛大学校)を用い、

MAS 11 kHz 下で、¹³C CP/MAS 測定と 2D DARR 測定を行った。2D DARR の混合時 間(*τ*_m)は、0.1 ms~300 ms の間で 14 点設定した。

解析: 各混合時間の 2D スペクトルにおける各ピークの体積強度は、自作の Fortran プログラムによりガウス波形を仮定して算出した。求めた各ピーク強度を、混合時間 0 msにおける対角ピーク強度の和を1として規格化した。構造 A、Bの座標から各構 造中の有効炭素間距離 $r_A \ge r_B を求め、スピン拡散速度定数と有効炭素間距離との関$ $係 <math>k \propto 1/r^6$ からビルドアップカーブを計算し、実測のビルドアップカーブとの差を評 価した。実測と計算値との差を評価するために、構造既知の逆平行βシートの Ala₄(AP-β [U-¹³C] Ala₄)で同様の解析を行い、誤差の評価基準値を算定した。

〈結果・考察〉

1.構造既知試料による誤差の評価基準値算定

逆平行βシート[U-¹³C] Ala₄ の構造はX線解析により構造 決定がなされているため、解 析誤差の確認に用いること ができる。実測 2D DARR ス ペクトル(Fig. 3a)の各ピーク 番号に対応したビルドアッ プカーブは Fig. 3b(●)のよう に作成される。有効炭素間距 離から算出されたビルドア ップカーブ(実線)との差は、 平均自乗偏差(RMSD)により 評価した。なお、ピーク強度 による RMSD の偏りを修正 するため、実測のビルドアッ プカーブの最大値で RMSD を規格化した値(EV、Fig. 3c) を誤差の評価基準値とした。 観測された全ピークの平均 EV 値は 0.24、EV の標準偏 差は0.17であった。体積強 度が正しく得られていない ことが明らかなピークを除



Fig. 3 (a) ¹³C CP/MAS and 2D DARR spectrum ($\tau_m = 100 \text{ ms}$) of AP- β [U-¹³C] Ala₄, (b) comparison between the observed (\bullet) and calculated (solid line) build-up curve, and (c) evaluation value at each peak estimated from the normalized RMSD. Numbers of (b) and (c) correspond to the peak numbers in (a).

外すると、EV 平均値は 0.19、標準偏差 0.12 となり、EV=0.31 (0.19+0.12 より)までの 範囲を、実測データと計算値の一致を判断するための誤差基準値として用いた。

<u>2. Silk II 型 Cp フラクションのピークの帰属とビルドアップカーブによる解析</u>

Fig. 4aに混合時間 400 ms における Cp フラクションの DARR スペクトルを示した。 Fig. 4a 上のピーク 3 と 4 は、Ser-Cβと Ser-Cαのピークである。これら 2 つのピークと 2 種類のβシート構造 A と B に由来する Ala-Cβピーク 8 と 7 との間に、相関ピークが 観測された (Fig. 4a 中の〇で囲んだピーク)。このことは、Ser 残基が 2 種類のβシー ト構造AとBを構成しているこ とを示している。AG連鎖モデル 中のAla-Cβ間距離については、 シート間側鎖の距離が最短であ る(Fig. 4b)。そのため、Ser-Cβと Ala-Cβとの相関ピークの実測ビ ルドアップカーブと、AG連鎖モ デル中での分子間のAla-Cβ同士 の炭素間距離をもとに計算した ビルドアップカーブの差が、前 述の誤差基準範囲内かどうかを 検討することで、分子間構造に ついてもモデルと一致している かを議論することができる。

Fig. 5 に Ser-Cβと Ala-Cβとの 相関ピークの実測と計算のビル ドアップカーブの一例を示した。 AG モデル構造から求めた有効 距離をそのまま使用して計算す

ると、実測を再現するようなビルドアップカーブ を計算することはできなかった (Fig. 5a)。しかし、 Ser/Ala の残基比や ¹³C ラベル率といったスピンの 割合を考慮すると(Fig. 5b)、 τ_m の前半ではよく一致 するようになった。 τ_m 後半では十分な一致を得ら れていないため、現在、より精密に実測の体積分 離データを取得しており、解析中である。

〈謝辞〉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)から一部補助を受けた。また、本研究の解析は大阪大学蛋白研の藤原教授と江川研究員、ニューヨーク市立大の Boutis 准教授に支援いただいた。ここに感謝いたします。

〈参考文献〉

- [1] Asakura et al., Protein Sci. 2005, 14, 2654-2657.
- [2] Demura M. et al., J. Am. Chem. Soc. 1998, 120, 1300-1308.
- [3] Asakura et al. J. Am. Chem. Soc., 2002, 124, 8794-8795.
- [4] Asakura, T.; Yao, J. Protein Sci., 2002, 11, 2706-2713.
- [5] 朝倉ら, 平成 25 年度繊維学会年次大会発表 2013 1C06.
- [6] Kameda T. et al., Macromolecules 1999, 32, 7166-7171.



Fig. 4 (a) ¹³C 2D DARR spectrum of $[U^{-13}C]$ Cp-fraction ($\tau_m = 400$ ms). The cross peaks of Ser-Ala depicted by broken lines and circles. (b) The (Ala-C β)-(Ala-C β) distances in the relation of intra- and inter-molecular structure in AG model A and B.



Fig. 5 Observed (•) and calculated (solid line) build-up curves of a (Al-C β)-(Ser-C β) correlated peak. The calculated curve in (a) was estimated from r_A and r_B directly and that in (b) was also utilized the ¹³C label ratio and Ser-Ala residue fraction.

高度に¹³C/¹⁵N標識化した樹木初期成長時の炭酸固定 および根圏吸収代謝動態の評価

○大石梨紗¹,小松功典²,篠阿弥宇³,菊地淳^{1,2,3,4,5}
 ¹横市院生命ナノ,²横市院生命医,³理研CSRS,⁴理研BMEP,
 ⁵名大院生命農

Evaluation of metabolic dynamics in early stage growth using highly $^{13}\mathrm{C}/^{15}\mathrm{N}$ labeled trees

°Risa Oishi¹, Takanori Komatsu², Amiu Shino³, Jun Kikuchi^{1,2,3,4,5} ¹Grad. Sch. NanobioSci., Yokohama City Univ., ²Grad. Sch. Medical Life Sci., Yokohama City Univ., ³RIKEN CSRS., ⁴RIKEN BMEP., ⁵Grad. Sch. Bioagri., Nagoya Univ.

Only few reports invested metabolic dynamics in woody plant by NMR. In this study, we applied ${}^{13}C/{}^{15}N$ -labeling techniques onto *Azalea* and investigate their metabolism in their early stage growth using NMR. We had obtained 30-64% ${}^{13}C$ -labeled *Azalea*. Using such highly labeled plant samples, we proceed both solution and solid-state NMR analysis for carbon metabolized biomass as well as nitrogen anabolism from rhizosphere.

【序論】

植物は、光合成によって炭素固定を行う。この一次生産者としての働きは、生態 系の維持に必要不可欠である。植物に固定された炭素は、代謝反応を経て主に細胞壁 バイオマスとして蓄積される。近年樹木が本来有する森林生態系機能の維持、荒廃す る里山の整備による水源の安定供給、植物バイオマスを石油(ナフサ)代替資源として 変換利用するバイオリファイナリーが注目されている。このように、樹木の炭素固定 および利用変換過程の基盤的理解は、環境・資源科学の両面から期待されている。

炭素の代謝動態は、¹³C 標識をおこない ¹³C に由来する信号を NMR や MS によって追跡することで解析できる。このような解析は、草本植物を対象としたものでは多数の報告例があるが、樹木は、草本に対して成長が遅く、生育が難しい等の理由から、その報告は少ない。我々はユーラシア大陸に最も広く分布するツツジに注目し、樹木としては前例のない最大 64%もの ¹³C 標識化に成功した。これにより可能となるボンドマー追跡による代謝動態解析、固体 NMR を用いた炭酸固定化バイオマス解析について議論する。

【試料と方法】

ツツジを播種し、発芽一週間後から標識ツツジの育成を試みた。標識には既報の手法¹⁾を用いて¹³C/¹⁵N二重標識ツツジを育成し、週に一度サンプリングしたものの標識率や重量などを調べた。各サンプルを乾燥,粉末化し、固体NMRスペクトルおよび水溶性 画分の溶液NMRスペクトルを測定した。

安定同位体標識 ボンドマー解析 固体二次元NMR

○おおいしりさ、こまつたかのり、しのあみう、きくちじゅん

【結果および考察】

溶液 NMR による代謝物の動態解析

ツツジ代謝物の¹H 一次元スペクトルを 計測した。¹³C ゲートデカップリングしたス ペクトルおよび、していないスペクトルを 計測し、得られたスペクトルを主成分分析 によって解析した(Fig. 1)。第一主成分 (PC1) は、¹³C デカップリングの有無によ ってプロットが分離することから、¹H-¹³C カップリングの有無を反映した成分と考 えられる。興味深いことに、デカップルを していない 出一次元スペクトルのうち、 ¹²CO。下で育成した試料のスコアプロット は、PC1 の正の方向へとシフトした。この ことは、多変量解析によって標識率を反映 した情報が取得できることを示している。 一方、第二主成分 (PC2) は、初期成長時の 代謝組成変動を反映している。PC2 では、 正の方向にキネートのシグナルが寄与し、 負の方向には他の糖類のシグナルが寄与 した。キネートは、シキミ酸経路に関与す る代謝物であり、樹木の初期成長において 高濃度に存在することが報告されている。 このことは、維管束系が発達した樹木の初 期成長特有の代謝を示唆している。討論会 時は、多次元 NMR スペクトルにおけるボンドマー解析による部位特異的標識情報につ

固体 NMR による¹³C 標識バイオマスの解析 ¹³C CP-MAS によってツツジ初期成長時のバ イオマス成分の変動を解析した(Fig. 3)。 成長に従い、65 ppmの結晶性セルロースに 由来するシグナルが増大した。一方、非晶 セルロースのシグナルが現れる 62 ppm の シグナルは減少した。しかしながら、ヘミ セルロースやペクチンなどのマトリック ス多糖も同じ化学シフトを持つことから、 62 ppm のシグナルの減少の詳細に迫る

には、更に¹³C-¹³C 二次元相関スペクト ルの解析も必要である。討論会時には、この相関シグナル解析結果に加え、¹⁵N CP-MAS スペクトルから窒素動態も議論したい。

【参考文献】

いても議論したい。

1)Kikuchi, J & Hirayama, K. (2007) Method. Mol. Biol. 358, 273-286.



Fig. 1 PCA of Azalea water-soluble fractions. (a) Score plot. (b) Loading plot.



固体NMRによるタンパク質の構造解析に向けた¹³C−常磁性 緩和促進の研究

 ○木戸浩貴¹,田巻初¹,江川文子²,亀田倫史³,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
 ³産業技術総合研究所・生命情報工学研究センター

Structural analysis of proteins by paramagnetic relaxation enhancement of ¹³C-NMR in solid states

○Kouki Kido¹, Hajime Tamaki¹, Ayako Egawa², Tomoshi Kameda³, Masakatsu Kamiya¹, Takashi Kikukawa¹, Tomoyasu Aizawa¹, Keiichi Kawano¹, Toshimichi Fujiwara² and Makoto Demura¹

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

²Institute of Protein Research, Osaka University, Suita, Japan.

³Computational Biology Research Center, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Tokyo, Japan.

Paramagnetic relaxation enhancement (PRE) provides longer distance information than NOE and spin diffusion. Thus, it is widely used for structure analysis of the biomolecules in solution NMR. Recently, ¹⁵N-PRE is applied to analysis protein backbone structures by solid-state NMR. In contrast, ¹³C-PRE has an advantage that it provides not only backbone information but also side-chain information. However, qualitative analysis of ¹³C-PRE in fully ¹³C labeled proteins is difficult due to spin-diffusion. In order to solve this problem, we aimed to develop a method for the measurement of ¹³C-PRE and the estimation of distance in solid-state NMR. We will discuss the validity of distances derived from ¹³C-PRE method.

【緒言】

常磁性緩和促進(PRE)はNOEやスピン拡散に比べ、より遠距離の構造情報を得ること が可能である。そのため溶液NMRではタンパク質などの生体高分子の構造の決定や精 密化に広く利用されている。近年、固体NMRにおいても、Cu²⁺による¹⁵Nの縦緩和促進の 定量解析によって、タンパク質の主鎖構造が決定可能であることが示された¹。その一 方、¹³Cを用いたPREでは¹⁵Nでは得られない側鎖の情報が得られる利点があるが、¹³C均 一標識分子ではスピン拡散の影響を受けやすく、¹⁵Nと同様の手法ではPREの定量的な 解析が困難である。そこで本研究では固体NMRによる¹³C-PREの定量的な測定法の開発 を目的とし、構造が既知のタンパク質GB1を用いて研究を行った。

固体NMR, 常磁性緩和促進

○きどこうき,たまきはじめ,えがわあやこ,かめだともし,かみやまさかつ,きく かわたかし,あいざわともやす,かわのけいいち,ふじわらとしみち,でむらまこと
【実験手法】

大腸菌で調製した¹³C, ¹⁵N均一標識GB1のE19C変異体にMn²⁺またはZn²⁺を付加した N-[S-(2-pyridylthio)cysteaminyl]EDTAを常磁性/反磁性タグとしてC19のチオール 基に結合させた^{1,2}。その後、分子間PREを抑制するため均一標識GB1:非標識GB1=1:3 で希釈し、バッチ法で微結晶を調製した。この試料を3.2mmローターに詰め、600 MHz 固体NMR装置(Varian社製Infinity plus)を用いて測定を行った。定量的な解析のた め、¹³C-PRE効果のみを観測する必要がある。そこで、¹³C-PRE効果の時間依存性を測定 する目的で、2次元¹³C-¹³C DARR法パルスシーケンスの交差分極(CP)後に37.5 kHzの スピンロック期を導入した。緩和速度R₁₊はスピンロック時間を0,0.6,1.0,2.1 ms と変えて測定し、算出した。試料回転速度は12.5 kHz、CP接触時間は160 μ s、DARR 混合時間は20 ms、測定温度は-10℃で行った。

【結果・考察】

2次元¹³C-¹³C DARR法によるスペクトルの解 析の結果、常磁性タグ(Mn²⁺)の導入による PRE効果によって、部位特異的に主鎖・側鎖 の信号強度が減弱していることが確認され た(Fig.1)。これらの信号から得られた減衰 曲線を指数関数でフィッティングを行い、緩 和速度を算出し、Solomon-Bloembergen 式か ら距離を求め、結晶構造の既知の距離と比較 を行った。そのうち、¹³C-PRE効果により信 号が消失した原子は15個あり、信号が分離さ れていて定量的な解析ができた原子は60個 あった。解析から得られた距離は、既知の構 造の距離との相関があり、誤差はおよそ±5Å だった。また、C'やC。など主鎖の距離だけ でなく、¹⁵N-PREの測定から得ることのでき ないC。やC、などの側鎖の距離も得ることが できた。

【結論】

以上のことから、スピンロックを導入した DARR法によって¹³C-PREを定量的に解析する ことに成功した。また、¹³C核を使った常磁 性緩和解析によって主鎖だけでなく側鎖の 距離情報を得ることができた。

【参考文献】

¹Sengupta I., et al., Nat. Chem., 2012, 4, 410-417.

²Nadaud P. S., *et al.*, J. Am. Chem. Soc., 2009, **131**, 8108-8120.



Fig.1 2D ${}^{13}C{}^{-13}C$ correlation spectra of GB1. C' region of 19EDTA-Mn²⁺ sample (A) and 19EDTA-Zn²⁺ (B).

常磁性Gd³⁺存在下での¹H-NMR緩和による大腸菌細胞の解析

○Chalermpon Khampa¹,江川文子¹,児嶋長次郎¹,藤原敏道¹ ¹大阪大学・蛋白質研究所

Living *Escherichia coli* cells as studied by ¹H-NMR relaxation under Gd³⁺ paramagnetism

Ochalermpon Khampa¹, Ayako Egawa¹, Chojiro Kojima¹ and Toshimichi Fujiwara¹ ¹ Institute for Protein Research, Osaka University

A water component of an *Escherichia coli* sample containing glycerol and gadolinium (III) ion was studied by ¹H-NMR at 0°C. An analysis of relaxation curves revealed that water protons in the *E. coli* sample in this study could be classified into two groups consisting of 1) the protons of the intracellular water and 2) the protons of the extracellular water. The concentrations of the free Gd³⁺ion inside and outside the *E. coli* cells were also estimated from the experimental ¹H-NMR spectral intensities. This verified that most of the free Gd³⁺ ions in this sample were distributed in the extracellular solution. Thus, the extracellular free Gd³⁺ ion could enhance the relaxation rate of a molecule on the outer membrane of the *E. coli* cells. The apprehension of the location of free Gd³⁺ ion in the *E. coli* sample will be utilized to develop the in-cell site specific NMR spectroscopy technique. This study, furthermore, proved that Gd³⁺ permeated gradually into the cells on the time scale of a day.

Introduction

The location of a protein in cell is essential to apprehend the biological functions. Even though the using of paramagnetic relaxation enhancement (PRE) enables the NMR spectroscopy to investigate these properties in a membrane-mimetic environment [1-2], the determination of the protein location in cell is still difficult. In order to use the PRE of gadolinium (III) ion to examine the location of the protein in the native cell, the understanding of the distribution of free Gd^{3+} ion in the living cell sample is necessary.

Materials and Methods

This study utilizes the Gd^{3+} paramagnetism to study the water of *E. coli* cells. The relaxation rate of the cellular water proton provides the concentration of free Gd^{3+} ion in the living *E. coli* sample. The BL21 StarTM (DE3) *E. coli* was cultured in LB medium. The suspension of the cell after washing and centrifugation was mixed with glycerol in order to prevent cell lysis due to the strong ionic strength of the Gd^{3+} solution. The Gd^{3+} solutions with various concentrations were finally added into the sample before the NMR experiment. (Figure 1.) The relaxation rates of proton in the *E. coli* samples were measured by 500 and 700 MHz spectrometer, equipped with a 4.0 mm triple resonance probe using saturation recovery pulse. The relaxation curves were then

In-cell NMR, Paramagnetic Relaxation Enhancement, Gadolinium

fitted with a multiple exponential relaxation function. The *E. coli* sample which did not contain glycerol and Gd^{3+} solution was lyophilized overnight. The final concentrations of Gd^{3+} ion in the extracellular of *E. coli* sample were estimated based on the lyophilization result and the statistical data of *E. coli*.



Figure 1. Procedure of E. coli sample preparation

Results and Discussion

The relaxation curves of the *E. coli* sample containing Gd^{3+} ion were best fitted with the double exponential relaxation function. This revealed that water protons in the *E. coli* sample in this study could be classified into two groups consisting of 1) the protons of the intracellular water and 2) the protons of the extracellular water. This also indicated that the distributions of free Gd^{3+} ion inside and outside the cell were unequal. The extracellular proton should relax faster than the intracellular proton. This result confirmed that most of the free Gd^{3+} ion was confined outside the cell. (Figure 2.) Nevertheless, the relaxation rates of both intracellular proton and extracellular proton increased when the concentration of Gd^{3+} ion was higher. This delineated that some of Gd^{3+} ion could diffuse into the cell and enhance the relaxation rate of the intracellular proton. Moreover, the fraction of each type of proton in each *E. coli* sample which different in Gd^{3+} concentration was not constant. This reflected the response of *E. coli* against the raising of the extracellular Gd^{3+} ion. [3]

The relaxation curve of the Gd^{3+} -free *E. coli* sample was also able to be fitted with the double exponential relaxation function. The assignment of the proton components of this sample was based on the comparison with the reference sample and the theoretical model. The 20% by volume glycerol solution was prepared according to the lyophilization result to mimic the extracellular solution of the *E. coli* sample. Its relaxation rate was close to the relaxation rate of one of the proton components analyzed from relaxation curve. This component was, therefore, identified as the extracellular proton. The relaxation rate of the other component was distinct from the relaxation rate of the glycerol solution. This relaxation rate related to the cellular water model of Persson and Halle. [4] Persson and Halle stated that the cellular water could be divided into the



Figure 2. Model for calculation the total concentration of extracellular Gd³⁺ ion

first hydration layer and the bulk water. The viscosity of the first hydration layer is about 15.6 folds higher than the bulk water. The correlation times of a water molecule in the first hydration layer and the bulk water calculated from Persson-Halle model corresponded well with the correlation times calculated from the experimental relaxation rate. Thus, this proton component should be the intracellular proton.

The relaxivities, the enhanced relaxation rate per one unit of concentration of a paramagnetic source, of Gd^{3+} ion on the extracellular and intracellular proton were estimated from the relaxation rates of the Gd^{3+} -free *E. coli* sample. This method resulted the relaxivities of Gd^{3+} ion on the extracellular and intracellular proton of 43 and 23 sec⁻¹ mM⁻¹ respectively. These relaxivities led to the concentrations of the extracellular and intracellular free Gd^{3+} ion. The concentrations of the extracellular free Gd^{3+} ion were greater than the concentration of the intracellular free Gd^{3+} ion. This verified that most of the free Gd^{3+} ion in this sample was distributed in the extracellular solution. The concentrations of the extracellular free Gd^{3+} ion were related linearly to the total concentrations of Gd^{3+} ion estimated from lyophilization result. In contrast, there was no linear relation between the concentrations of intracellular free Gd^{3+} ion and the total concentrations of Gd^{3+} ion should occur from the inhomogeneous distribution of the Gd^{3+} ion inside the *E. coli* cell.

The transportability of Gd^{3+} ion through the cell membrane was investigated by repeating the NMR experiment of the same sample several times. The result described that Gd^{3+} ion could pass into the cell on the time scale of a day. This study also recommended the NMR experiment of living *E. coli* should be finished within a day.

Conclusion

In conclusion, this study proved that most of the free Gd^{3+} ion in *E. coli* sample distributed in the extracellular solution. Thus, the extracellular free Gd^{3+} ion could enhance the relaxation rate of a molecule in the *E. coli* cells. The apprehension of the distribution of free Gd^{3+} ion in the *E. coli* sample will be utilized to develop the in-cell site specific NMR spectroscopy technique.

References

- [1] Zangger, K et al. J. Phy. Chem. B 2009, 113, 4400 4406.
- [2] Respondek, M et al. J. Am. Chem. Soc. 2007, 129, 5228-5234.
- [3] Record, M. T. et al. Trends Biochem. Sci 1998, 23(4), 143-148.
- [4] Person, E.; Halle, B. Proc Natl Acad Sci. 2008, 105(17), 6266-6271.

ヒトカルシトニンの酸性膜との相互作用に依存した線維
 形成機構の解明

 ○浅野洸¹,阿部友樹¹,石島(上平)美弥²,渡辺(伊藤)ひかり¹, 川村出¹, Ayyalusamy Ramamoorthy³,内藤晶¹
 ¹横浜国立大学大学院 工学府 機能発現工学専攻
 ²兵庫県立大学 理学部・大学院 生命理学研究科
 ³ミシガン大学 化学部 生物物理学科

Amyloid-like fibrillization and the structure of human calcitonin in the presence of acidic lipids

 \bigcirc Akira Asano¹, Yuki Abe¹, Miya Kamihira-Ishijima², Hikari Itoh-Watanabe¹, Izuru Kawamura¹, Ayyalusamy Ramamoorthy³, and Akira Naito¹

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

²Graduate School of Life Science, University of Hyogo, Hyogo, Japan.

³Biophysics and Department of Chemistry, University of Michigan, Michigan, USA.

Human calcitonin (hCT) is a 32-residue peptide hormone, involves in bone calcium metabolism and known as an amyloid peptide. However, the detailed fibrillization mechanism has been not well understood. In this study, the structure and fibrillation kinetics of hCT in solution containing neutral and acidic phospholipids (bicelles and micelles) were observed using NMR and UV-Vis spectroscopies. The fibrillation kinetics was revealed using a two-step autocatalytic reaction mechanism composed of fibril nucleation (k_1) and fibril elongation reactions (k_2). In the presence of lipid, the first reaction was accelerated but the second reaction was decelerated. The surface condensation effect and the electrostatic interaction between hCT and lipid may play a significant role in fibril formation.

【序論】

アミロイド線維とは、βシート構造に富んだタンパク質の凝集体で、アルツハイマ ー病など数多くの病気(アミロイド病)の原因物質として考えられており、この線維 が生体内で蓄積すると、細胞死が起こり、病気が発症すると考えられている。

しかし、アミロイド線維形成機構については、未だ不明な点が多く、病気の原因もよ く分かっていない。本研究で用いている、ヒトカルシトニン(hCT)とは32アミノ酸 残基からなるペプチドホルモンで、血中のカルシウム濃度を調製する作用があり、骨 粗鬆症の治療薬として期待されていた。しかし、水溶液中で容易にアミロイド線維に 変化するため、治療薬として用いることが難しいことが分かった。

もし、このhCTの線維形成機構を解明することが出来れば、①hCTを骨粗鬆症の治療薬として用いる方法の開発。②アミロイド病の原因究明、の二つに繋がるため、この研究は重要であると考えている。

キーワード:ヒトカルシトニン,アミロイド線維,脂質膜

○あさのあきら,あべゆうき,いしじま(かみはら)みや,わたなべ(いとう)ひか り,かわむらいずる,ラマムーシー・アヤルサミー,ないとうあきら 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きた。 先行研究室ではアミロイド線維形成を2段階自己触媒反応として説明している。(Fig 1) hCTモノマーが会合してミセルを形成し、ミセルが構造転移を起こして核を形成する 核形成反応(速度定数 k₁)、その核にモノマーが会合して線維伸長していく線維成長反 応(速度定数 k₂)、この2段階の反応によって、線維形成していくと考えている。また、 成熟した線維よりも中間体(線維核)の方が,細胞毒性が強いことが、近年報告されてい る。



Fig1 アミロイド線維の2段階自己触媒反応

しかし、生体膜存在下での線維形成機構は未だ明らかになっていない。そこで本研 究では特に酸性膜とhCT線維との相互作用について注目し、研究を行ってきた。酸性 膜の割合の変化に対するhCTの線維化の影響を調べることは、アミロイド線維が細胞 内でどのように変化を起こすのかを調べることにつながり、選択的毒性を説明する上 で重要と考えている。

【実験】本研究で用いたすべてのhCTは、ペプチド合成機を用いて固相法で合成し、 脱保護、空気酸化、逆相HPLCにより精製した。また、擬似生体膜として、ミセルと バイセルを用いた。本研究は大きく分けて以下の二つからなる。

【結果と考察】

1. ミセルとhCTとの結合様式の解明

本実験では、溶液NMRを用いて、モノマーのhCTが中性ミセル(DPC)、酸性ミセル(負 電荷をもつ:SDS)それぞれに対してどのように結合するのかを観察した。重水素置換 したミセルとhCTを混ぜた試料に、NMR信号を消滅させる常磁性イオンMnCl₂を、濃 度を変えて加えていった。¹H-NMRの信号を観察することで、hCT由来のみの信号を 見ることができ、MnCl₂の濃度変化に伴う、その信号の減衰の変化から、hCTがどの ようにミセルに結合しているのかが分かった。中性ミセルとして DPC(dodecyl-phosphocholine)、酸性ミセルとしてSDS(sodium dodecyl sulfate)を用いた。

中性膜にはhCTはミセルの疎水性コア部分まで、入り込むが、酸性膜には、表面上に結合することが判明した(Fig 2)。hCTは中央部分に両親媒性の部分を持っているため、中性膜に対しては疎水性部分まで、入ることが出来ると示唆される。一方、酸性膜に対しては、hCTは正の電荷を持っているため、酸性膜の負電荷と強く結合し、疎水性部分まで入り込めないと考えられる。また、DPCおよびSDS存在下それぞれの、線維形成速度に関しても、紫外分光光度計による散乱光の経時変化から、反応速度解析を行い、調査した。これらの結果より、hCTは酸性膜表面で、濃縮されることが示唆された。



2. バイセル存在下でのhCTの線維構造および線維形成速度の観測

本実験では、時間経過を追いながら、実際に、バイセル存在下における¹³C標識し た「1-¹³C] Gly¹⁰, [3-¹³C] Ala²⁶-hCTの線維形成過 程を固体¹³C-NMRで観測し、線維構造と線維形成 速度を解析した。

バイセルとはディスク状のミセルであり、長 鎖リン脂質と短鎖リン脂質からなる。本研究で

は、長鎖リン脂質(DMPC+DMPG): 短鎖リン脂質(DHPC)=3:1(モル比) の割合で調整したものを使用した。 DMPCとDHPCは中性リン脂質で、 DMPGは負電荷をもつ酸性リン脂 質である。長鎖リン脂質中のDMPG の割合が0%(DMPC100%の中性バ イセル)、10%、15%、25%となる バイセルを今回使用した。調整した バイセルをhCT:バイセル=1:5(モ ル比)になるようにpH 3.3の酢酸水 溶液に加え、測定試料とした。線維 形成過程を固体¹³C-NMRの DD-MAS法(モノマー成分の観測)

とCP-MAS法(線維成分の観測)を 交互に用いて、観測した。









① 構造解析

カルボニル炭素やメチル炭素の¹³C化学シフト値は2次構造とよい相関があるので、 [1-¹³C], [3-¹³C]標識アミノ酸残基近傍の局所構造を決定できる。Gly¹⁰近傍(hCT中央部) では、水溶液中や中性膜中と同様に、酸性膜中でもモノマー成分はα-helix構造をとり、 線維形成後はβ-sheet構造に転移することがわかった。また、Ala²⁶近傍(C末端付近)で は、水溶液中、中性膜中と同様に酸性膜中でもモノマーはrandom coil構造をとり、線 維形成後β-sheet構造に転移することが分かった。しかし、酸性膜中の線維の構造は水 溶液中のものとは異なっていることが分かった。(Fig 4)

②反応速度解析

時間経過に伴う、NMRの信号強度変化より、核形成反応速度定数k₁と線維成長反応 速度定数k₂を求めた(Table.1)。結果として、膜存在下での線維形成を比べると、酸性 膜の割合が増えるにしたがって、核形成反応は速く進行することが分かった。一方で、 線維成長反応はあまり変化しなかった。また、水溶液中と膜存在下での反応を比べる と、膜存在下では核形成反応が速くなり、線維成長反応が遅くなった。つまり、膜の 酸性度が増すほどhCTが中間体である時間が長くなり、hCTの細胞毒性が増加したこ とを示唆している。(Fig 5)

この現象の理由として、モノマーが膜に結合し、モノマーが膜表面で濃縮されるため、核形成が促進されたと考えられる。そして、膜の酸性度の上昇とともに、モノマーが膜に強く結合すようになり、膜結合hCTが線維と結合して、成熟した線維へ成長することが阻害され、中間体の状態が長くなったと考えられる。

	濃度 [mg/ml]	$k_1 [s^{-1}]$	$k_2 [s^{-1}M^{-1}]$
水溶液中	80	2.71×10 ⁻⁸	1.04×10 ⁻³
DMPC100%	20	5.81×10 ⁻⁶	3.03×10 ⁻⁵
DMPG10%	20	8.97×10 ⁻⁶	1.10×10 ⁻⁵
DMPG15%	20	9.77×10 ⁻⁶	1.12×10 ⁻⁵
DMPG25%	20	2.90×10 ⁻⁵	5.95×10 ⁻⁵

Table 1. hCTの速度定数

【結論】

hCTは酸性膜表面上に結合し、濃縮 される。そして、hCTの線維は酸性 度が高い生体膜に対して高い毒性 をもつことが考えられる。これら のことより、アミロイド線維形成 および病気の原因として、酸性膜 が大きな役割を担っていることが 示唆された。(Fig 5)



Fig5 酸性膜表面での線維形成

【参考文献】

M Kamihira et al. Protein science, 9, 867-877, (2000)

液晶7CB—*n*-ヘプタン混合物の²H NMR

○熊谷翼秀,大橋竜太郎,井田朋智,水野元博 金大院・自然科学研究科

Liquid crystal 7CB—*n*-heptane mixture as studied by ²H NMR

•Yoshihide Kumagai, Ryutaro Ohashi, Tomonori Ida, Motohiro Mizuno Graduate School of Natural Science and Technology, Kanazawa University, Ishikawa, Japan.

4-Cyano-4'-heptylbiphenyl (abbreviated as 7CB) exhibits only the nematic phase as liquid crystal phase. By adding *n*-heptane as solvent, the smetic A phase was induced in 7CB *n*-heptane system. Orientational order parameter S of *n*-heptane was estimated from the quadrupole splitting of the ²H NMR spectrum. In the nematic phase, S shows large dependence on temperature compared with the dependence of S in the smetic A phase.

【諸言】4-alkyl-4'-cyanobiphenyl (nCB、nはアルキル鎖中の炭素数)は、末端基としてアルキル鎖を持つ液晶物質である(Fig. 1)。nが7までではネマチック相(N)のみが液晶相として現れるのに対し、10以上ではスメクチックA相(Sm A)のみが現れ、8と9では低温側でSm A相が、高温側でN相が現れる。N相のみを発現する7CBに*n*-ヘプタンを混合するとSm A相が発現する。このことは、*n*-ヘプタンを加えることは7CBのアルキル鎖を見かけ上長くすることに対応することを示している[1, 2]。アルキル鎖の見かけの長さ*n**は、次の式であらわされる。

$$n^* = 7 + \frac{7x}{1-x}$$

ここでxは、n-ヘプタンのモル分率である。7CB中でn-ヘプタンがどのように振る舞っているか興味が持たれるがその詳細はわかっていない。そこで本研究では、7CBと重水素化したn-ヘプタンを混合した試料の²H NMR測定を行ない、n-ヘプタンの配向秩序やダイナミクスを調べた。

【実験】測定試料には、n-ヘプタン-d16と7CBを混ぜ合わせたものを用いた。²H NMR 測定は、JEOL ECA-300分光器を使い、45.28 MHzの共鳴周波数で行なった。スペクト ルの測定には四極子エコー法、スピン-格子緩和時間 T_1 の測定には反転回復法を用い た。温度変化測定は降温過程で行なった。



Fig. 1. Molecular structures of nCB and *n*-heptane.

Liquid crystal, Phase transition, deuterium

○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

【結果】以下に、n*=8.5の試料につい ての結果を示す。295 Kから253 Kまで、 液晶性を示す四極子分裂したピークが 見られた。Fig. 2に283 Kでの²H NMRの 実験スペクトルとシミュレーションス ペクトルを示す。(a)は実験スペクトル、 (b)はシミュレーションスペクトル、(c) はシミュレーションスペクトルの各成 分である。各ピークの大きさの比較か ら、ピークDとEはn-ヘプタンのメチル 基の重水素に、ピークAとHは真中のメ チレン基 (Fig. 1のn-ヘプタンの4)の 重水素に帰属される。また、外側のメ チレン基ほど運動の振幅が大きいと予 想されることから、BとGは3と5のメチ レン基の重水素に、CとFは2と6のメチ レン基の重水素に帰属される。

分子の配向秩序を示すオーダーパラ メーターSは、スペクトルの分裂幅を $\Delta \nu$ とすると以下の式で表される。

$$S = \frac{3}{4} \left(\frac{e^2 Qq}{h}\right)^{-1} \frac{\Delta v}{P_2}$$
$$P_2 = \frac{1}{2} (3\cos^2\theta - 1)$$

ここで、 e^2Qq/h は四極子結合定数、 θ は 分子配向軸と電場勾配の主軸方向のな す角である。Fig. 3に、ピークCとFの分 裂幅から計算したSの温度変化を示す。 Sの計算は、 $e^2Qq/h = 167$ kHz, $\theta = 90^{\circ}$ と して行なった。Sm A相に比べ、N相で はSは温度に対して大きく変化した。 Fig. 4はピークCとFのスピン - 格子緩 和時間 T_1 の温度依存性である。N相では、 T_1 はほとんど温度に依存しなかった。 これらの傾向は、その他のピークにつ いても見られた。



Fig. 2. ²H NMR spectrum of 7CB—*n*-heptane ($n^* = 8.4$) at 283K. (a) is experimental spectrum , (b) is simulation spectrum and (c) is each components of simulation spectrum.



Fig. 3. Temperature dependence of S of peaks C/F.



Fig. 4. Temperature dependence of T_1 of peaks C/F.

Reference

[1] Y. Yamaoka, Y. Taniguchi, S. Yasuzuka, Y. Yamamura, and K. Saito, J. Chem. Phys. **135**, 044705 (2011).

[2] K. Saito and M. Sorai, Chem. Phys. Lett. 366, 56(2002).

液晶性バナナ型分子の固体NMRおよび量子化学計算によ る高次構造解析

○遠洞佑美¹,木村沙織¹,中西彩季¹,橋本朋子¹,姜聲敏²,曽根正 人³,渡辺順次²,黒子弘道¹ ¹奈良女子大院・人間文化研究科 ²東工大院・理工学研究科 ³東工大・精密工学研究所

Higher-order structure analysis of banana-shaped liquid crystal studied by solid-state NMR and quantum chemistry

⊖Yumi Endo¹,Saori kimura¹,Saki Nakanishi¹,Tomoko Hashimoto¹,Kang Sungmin²,Masato Sone³,Junji Watanabe²,Hiromichi Kurosu¹

¹Graduate School of Humanities and Sciences, Nara Women's University, Nara, Japan. ²Department of Organic and Polymeric Materials, Tokyo Institute of Technology, Tokyo, Japan

³Precision and Intelligence Laboratory, Tokyo Institute of Technology, Tokyo, Japan

Solid-state ¹³C nuclear magnetic resonance (NMR) measurements were performed for the B7 phase of the banana-shaped molecule P-8-O-PIMB (NO₂). In this phase, NMR chemical shifts assigned to five methylene carbons on the alkyl tail appear as at least seven peaks, indicating that the two alkyl tails within a single molecule have different packing structures. Combined CP/MAS and PST/MAS measurements show that one of the alkyl tails has dense packing with low molecular mobility and the other has loose packing with high molecular mobility. Thus, it can be concluded that both the polar bent and molecular axes are tilted toward the layer in the B7 phase of P-8-O-PIMB(NO₂), exhibiting molecular leaning. Then, quantum chemical calculations of NMR shieldings for three molecules model have been carried out.

【緒言】

バナナ型分子とは液晶性を持つ物質のひとつである。分子中央の芳香族環がベント 形状を与えるためバナナのような屈曲した形をとる。この屈曲分子が密に詰まった層 構造をとるため、分子の持つ分極が層内で一方向を向くという極性構造をとる。バナ ナ型分子は液晶形成に不向きとされるほど屈曲しているが、この屈曲した分子形状に より、通常の棒状液晶や円盤状液晶から見られた形態とは異なる新しい液晶種、すな わち様々なバナナ液晶相を発現する。すでに多くの相が発見されているが、バナナ型 分子の詳細な高次構造が明らかになると、高分子化やグラフト重合などで繊維にする ことや、自発分極を利用した高機能性繊維を作り出せる可能性がある。さらに、液晶 紡糸における液晶場として、特異な自発分極を持つバナナ型分子を応用することで高 度な配向や機能を持つ繊維の創製につながる可能性が高く、液晶紡糸の基礎的研究と

Banana liquid crystals, Solid-state NMR, Phase structure

○えんどうゆみ,きむらさおり、なかにしさき、はしもとともこ、かんそんみん、そ ねまさと、わたなべじゅんじ、くろすひろみち して今後役立てることができると 考えられる。またアキラルでありな がらもキラリティを発現するとい う大きな特性から、キラリティの起 源を明確に解明し、そのキラリティ を制御することからもキラル合成 など様々な新分野への応用が期待 される。



本研究では、固体NMRと量子化学

Figure 1 P-8-O-PIMB (NO₂)

計算を用いてバナナ型分子P-8-0-PIMB(NO₂)のB7相の詳細な高次構造を明らかにする ことを目的とする。

【方法】

固体NMRを用いてCP/MAS測定とPST/MAS測定を行い、スペクトルフィッティングによる解析を行う。またP-8-0-PIMB(NO₂)の3分子局所モデルを作成し、分子間距離や傾きを変化させて量子化学計算を行う。

【結果と考察】

解析結果より、アルキル鎖の炭素5つの範囲にピークトップとショルダーピークを 合わせて7本のピークが確認されたことから、P-8-0-PIMB(NO₂)のアルキル部分には異 なるパッキングが存在し、チルト構造をとっていることが示唆される。

CP/MAS 測定と PST/MAS 測定結果のピークの強度比を比較すると、高磁場側より低磁 場側の方の運動性が高く、この2つのパッキングのうち、チルト構造の密の部分が運 動性の低いピーク(高磁場側)に、粗の部分が運動性の高いピーク(低磁場側)に帰 属できると考えられる。



Figure 2 Expanded ¹³C (a)CP/MAS (b)PST/MAS NMR spectra of P-8-O-PIMB(NO2) and peak fitting (using ten decomposed peaks) at 135°C(B7 phase).

P-8-0-PIMB(NO₂)の3分子局所モデルを用いた量子化学計算については当日発表する。

層状構造を形成する液晶性ポリエステルの 磁場配向膜の構造と気体拡散特性のNMR法による研究

○浅沼諒太¹, 吉水広明¹ ¹名工大院・工

The structures and gas diffusion properties of the magnetically oriented membranes of liquid crystalline polyester forming the layered structures as studied by NMR methods

○Ryota Asanuma¹, and Hiroaki Yoshimizu¹ ¹ Graduate school of Engineering, Nagoya Institute of Technology

The all aromatic polyester with n-alkyl side chain, B-Cn is one of the thermotropic liquid crystalline polymers. The main chain and side chain layers are formed by parallel-aligning at one molecular level. This characteristic higher-ordered structure of B-Cn is named to layered structure. In the side chain layer, their thickness is easily controlled with the number of carbon of the alkyl side chain, and it was confirmed that the gas sorption occur only in there. The permselectivity of gases can be changed with variation of the side chain layer. The diffusibity of gases can be improvement by magnetic orientation of the layered structure. In this study, the anisotropical diffusion properties of the magnetically oriented B-Cn membranes were observed by NMR methods.

<緒言>

アルキル側鎖を有する全芳香族ポリエ ステル B-Cn (n は側鎖アルキル側鎖の炭素 数)(Figure 1)は 1,4-ジアルキルエステルと 4,4-ビフェノールから合成され,サーモトロ Figure ピック液晶性を示す.剛直な芳香族主鎖が主 鎖骨格のベンゼン環の寄与により並列して板状 に凝集し,柔軟なアルキル側鎖層と1分子レベ ルで交互に配列した層状構造をとる.この特徴 的な層構造を活かして,物質の選択的な透過, 分離が可能な機能材料が創れると期待してい Figur る.これまで, B-Cn の層状構造において比較 of lay 的小さな気体は,側鎖層のみへ収着し拡散すること,





Figure 2 Illustration of the magnetically orientation of layered structure.

liquid crystalline polyester / gas diffusion properties / layered structure/

○あさぬまりょうた,よしみずひろあき

高い磁気異方性を持つベンゼン環の存在により磁場を印加すると B-Cn の層状構造が 磁場方向に平行配向することが確認されている.また,アルキル側鎖の炭素数を調整 することで層間隔を制御できるので,これにより気体分離能の異なる機能材料が作り 出せると考えられる.本研究では高性能な気体分離膜創成の指針となるよう,B-C14, B-C10, B-C6 の 3 種を合成, 調製してその磁場配向構造と気体拡散特性について NMR 法を用いて比較検討した.

<実験>

B-C14, B-C10, B-C6の構造確認は¹H NMR 測定から行った. DSC 測定を行い相転 移挙動の確認を行った. 層状構造形成の確認は WAXD で行った. 9.4T の強磁場中で, 温度を調節することで磁場配向試料を調製した. 配向構造は¹³C CP/static NMR 測定 から確認した. 気体拡散特性を検討するため, 25 ℃で気体収着測定を重量法で行なっ た. 気体には Xe, CO₂, CH₄, i-C₄H₁₀を用いた. CH₄を対象に¹H PFG NMR 測定を行 い, B-Cn 中での自己拡散係数を求めた.

<結果及び考察>

WAXD 測定の結果,溶融,液晶状 態を経由して調製した B-C14, B-C10, B-C6 はいずれも室温下で層状構造を 安定的に形成しており,非晶又は不 規則構造は見出されなかった.¹³C NMR 測定により側鎖層で比較的高 い運動性が確認された.また,¹³C CP/static NMR 測定の結果、層構造が ランダムな方向を向いている無配向 試料では,化学シフト異方性の影響 を受け幅広いピークが観察された (Fig.3(a)).分子鎖方向である z 軸が磁 場に平行になるように置かれた磁場



Figure 3 ¹³C CP/Static NMR spectra of B-C6 at 22°C ; (a) not oriented (b) z axis is perpendicular to B_0 (c) z axis is parallel to B_0 .

配向試料のスペクトルではいくつかの鋭いピークが観察できた(Fig.3(c)). さらにこの 試料を 90°回転させて z 軸が静磁場と垂直になるように置いて得たスペクトルはブ ロードで且つランダム配向試料のそれとも異なっていた(Fig,3(b)).これは分子軸が一 定の方向に配向しているためであり、この結果から配向を確認することができた.ま た、¹H PFG NMR 測定の結果、自己拡散係数は拡散気体の観測方向と垂直な方向に主 鎖を配向させた試料で一番小さく、次に無配向試料、一番大きい値は、観測方向と平 行に配向させた試料で観測された.これらの結果から B-Cn の気体拡散異方性を確認 することができた.

ポリカーボネートのXe収着特性と ¹²⁹Xe NMRによる微細高次構造の解析

○樋口智章¹,吉水広明¹ ¹名古屋工業大学大学院 工学研究科

¹²⁹Xe NMR analyses of Xe sorption properties and higher-ordered structure of polycarbonate

○Tomoaki Higuchi¹, and Hiroaki Yoshimizu¹ ¹Graduate School of Engineering, Nagoya insitute od Technology

In the glassy polymers, a part of the micro spaces between polymer chains, which is called it microvoid, is considered as the unrelaxed volume. Slowly cooled, melt quenched, and CO_2 -conditioned membranes of polycarbonate were prepared. Xe sorption and ¹²⁹Xe NMR measurements were performed using three polycarbonate membranes. It was confirmed that the microvoid size was changed by some processings, such as slowly and rapidly cooling, and CO_2 -conditioning.

<緒言>

高分子膜材料を食品包装材などのガスバリア膜や工業用ガス分離膜に応用する上で、その気体収着特性と高次構造との因果関係を解明することは重要である.高分子にはガラス転移温度(*T_g*)以下の温度域で、実測の比容積と仮想液体状態における比容積との差である未緩和体積(余剰自由体積)が存在する(Fig.1).この未緩和体積は分子

鎖間隙の一部を一種の"とりかご"と見立て, それを一分子サイズレベルの微小空孔,す なわちミクロボイドとここでは呼び,その 総量に対応するものである.このガラス状 高分子に存在するミクロボイドは,気体収 着サイトであり,拡散経路の一部を形成す ると考えられている.本実験ではポリカー ボネート (PC)を用いて,物理処理を施し てガラス状態を変えた試料を調製し,Xe 収着測定及び¹²⁹Xe NMR 測定を行い,ガラ ス状高分子における気体輸送特性とミク



Figure 1 Schematic representation of a specific volume - temperature curve.

ロボイドとの因果関係を明らかにすることを目的とした.

Polycarbonate, Xe sorption, ¹²⁹Xe NMR

○ひぐちともあき,よしみずひろあき

<実験>

市販の PC 板を 250°C, 20 気圧で 10 分間プレ スし,その後真空オーブン中で 160°C,24 時間 アニーリング処理をして,徐冷膜を調製した. 徐冷膜を 160°C で 10 分間保持したのち,瞬時に 氷水中に投入し,急冷膜を調製した.耐圧容器 中に徐冷膜を入れ,25°Cにおいて 16 時間,60 気 圧の CO₂ に曝したのち,速やかに減圧し,高圧 CO₂処理膜を調製した.また収着測定は Fig.2 に 示した定容法の装置で行った.Xe は巴商会より 購入し,そのまま使用した.¹²⁹Xe NMR 測定に



は NMR 管内の圧力及びサンプルへの Xe 収着量への把握が不可欠である.そこで管 内の圧力がリアルタイムでモニタできる装置を製作し使用した.なお NMR 試料管は, 外径 10 mm の耐圧ガラス製(エムアールテクノロジー社製)を使用した.細かく裁断し た試料断片を NMR 菅に約 0.5 g 充填した後,十分時間真空乾燥してから所定圧に相当 する Xe を導入し,収着平衡に達するまで 24 時間程放置した.¹²⁹Xe NMR スペクトル は Agilent Technologies 社製 Inava 400 plus NMR 分光計を用い,観測周波数 110.5MHz にてシングルパルス法により測定した.

<結果・考察>

Fig. 3 に徐冷膜, 急冷膜の 25℃における Xe 収着測定の結果を示す.また得られた 等温線を(1)式で解析し, 各パラメータ値 を算出した結果を Table 1 に示す. 急冷膜 の C_H '値は徐冷膜の値より大きかった. C_H 'は未緩和体積(ミクロボイド)の指標 であり, 急冷処理を施すことでミクロボイ ドが増加した, すなわちガラス状態の非平 衡性が拡大したと考えられる.

また徐冷膜を対象に種々の温度で収着 測定を行った結果から,温度を下げるとと もに収着量が増大し, C_H'の値は大きくな った.¹²⁹Xe NMR 測定により決定した収着 Xe の化学シフト値と収着等温線から得ら れる二元収着パラメータから,ミクロボイ ドサイズを算出した.温度を下げるとミク ロボイドのサイズは大きくなっているこ とが確認できた.また高圧 CO₂ 処理膜の 結果などについては当日報告する.



Figure 3 Xe sorption isotherms for PC treated with several physical processing at 25 $^{\circ}$ C.

$$C = C_{D} + C_{H} = k_{D}p + \frac{C_{H}bp}{1+bp}$$
(1)

Table 1 Dual-mode sorption parameters of Xe for PC membranes at 25 $^{\circ}\mathrm{C}$

Sample [cm ³	k _D × 10 ² STP/cm ³ _{polym} .cmH	C _H ' g][cm ³ STP/cm ³ _{polym.}]	b × 10 ³ [1/cmHg]		
Slowly cooled	1.26	5.39	15.2		
Melt quenched	0.90	9.20	7.01		

アルキル側鎖を有する液晶性ポリエステルにおける気体 収着測定と局所分子運動性に関するNMR法による研究 〇山内雅弘¹, 吉水広明¹ ¹名工大・吉水研

A study on the gas sorption properties and local molecular motions of the liquid crystalline polyesters with alkyl side chains by NMR methods

OMasahiro Yamauchi¹, and Hiroaki Yoshimizu¹

¹Graduate School of Engineering, Nagoya Institute Technology, Nagoya, Japan.

The liquid crystalline polyester, B-C14 is one of the thermotropic liquid crystal polymers. It is formed the layered structure and filled layer space with the alkyl side chain. In this study, the effects of gas in B-C14 on local molecular motions of it were investigated by NMR. The motions of side-chain layer of B-C14 were remarkably changed by gas sorption.

【緒言】

液晶性高分子は流動性を持った状態 でも自発的に配向し,温度を下げてもそ の配向性が保たれることから,構造に高 い規則性を持った分離膜が得られると 期待される. B-C14 (Fig.1) は,側鎖に柔 軟なアルキル鎖を有する全芳香族液晶 性ポリエステルである. この物質はサー





モトロピック液晶性を呈し,アルキル側鎖層と芳香族主鎖層がそれぞれ板状に凝集し 交互に配列した層状構造を形成する.主鎖層は硬く,側鎖層は軟らかいので,気体分 子は側鎖層にのみ収着すると考えられている.本研究では収着気体が B-C14 の局所 分子運動性に及ぼす影響について主に NMR 法を用いて検討した.

Gas sorption properties, local molecular motions, liquid crystalline polyester

○やまうちまさひろ,よしみずひろあき

【実験】

示差走査熱量測定を行い結晶-液晶相転移ピークを確認した. 試料はキャスト法で 製膜した B-C14 を液晶が存在し層状構造を形成する 145℃でアニーリングしたもの を使用した. その試料の X 線回折測定を行い層状構造の形成を確認した. そして 25℃における気体収着測定を重量法により CH₄, C₃H₈, i-C₄H₁₀, CO₂ についてそれぞ れ行った. 収着した際の分子運動性変化を評価するため ¹H, ¹³C NMR 測定, ¹H スピン-スピン緩和時間 (T₂)測定を行った.

【結果・考察】

X線回折測定を行ったところ非晶成分はほとんどないが,層状構造がランダムに 配向して形成されていることを確認した.CH4,CO2の収着等温線は原点を通る直線で ヘンリー型であり,膜のゴム状領域に気体が収着していると考えられる(Fig.2). C₃H₈,i-C₄H₁₀の収着等温線は圧力を上げると,ある一定の圧力を超えたら収着量が 急激に増大する溶解型を示し,C₃H₈,i-C₄H₁₀と親和性が高いアルキル側鎖層に集中 的に気体が収着しているといえる(Fig3).

CH₄,C₃H₈, i-C₄H₁₀, CO₂ を0~9atm 気体を収着させた状態で¹HのT₂測定,及び¹H,¹³C NMR測定を行った.気体を多く収着させるとT₂ が長くなり、側鎖のNMRスペクトルの先鋭化が見られた.以上のことから気体を収着させると圧力増大に伴い分子運動性が向上し、それは側鎖領域において顕著であるということが確認された.



Fig.2 Methane and carbon dioxide sorption isotherms of B-C14 at $25 \,^{\circ}$ C.





強磁場中で調製した固体PBLGの構造解析と気体輸送特性 〇岩本純,吉水広明

名工大院工

Structural Analysis and Gas transport Properties of Solid PBLG Prepared in the Strong Magnetic Field

OIwamoto Jun, and Yoshimizu Hiroaki Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology, Gokiso-cho, Showa-ku, Nagoya, 466-8555, Japan.

The PBLG which shows good solubility form a stable α -helix in the helix solvents. PBLG also shows lyotropic liquid crystal and then, exhibits a cholesteric phase when it were in high-concentration. Furthermore, it is transferred to the nematic phase by applying a magnetic field. It would be intended to prepare a polymer sample was controlled orientation using this nature, which has the anisotropy of the gas transport properties. This report, we prepared 35 wt% of the PBLG / chloroform solution. Solid PBLG samples were obtained by casting in a strong magnetic field. Result of the 2D WAXD measurement, the uniaxially oriented PBLG helix rods were confirmed.

【緒言】

液晶性ポリマーは流動性を持った状態でも自発的に配向し,高い異方性を示す構造を 形成し得るので、気体分離膜としての応用が期待される.一方、PBLGはαへリックス コンホメーションを安定に形成して、クロロホルムやジオキサンなどのへリックス溶 媒中でライオトロピック液晶性を示し、濃厚溶液時にコレステリック相を呈する.ま たこの状態に磁場を印加すると、らせん軸方向に示す巨大な永久双極子モーメントが 磁場と平行に配向し、ネマチック相へと転移する.外部磁場を用いて高度に秩序構造 を制御させることで物質の選択的透過、分離を可能とするスマートメンブレンの創成

へとつながると考え られる.本研究では 磁場を用いてαヘリ ックス鎖を配向させ た固体PBLGを調製 し,その構造及び気 体輸送特性を評価し た.



Figure 1 The scheme of the hierarchical structure of the PBLG.

PBLG, Magnetic orientation, Gas transport properties

○いわもとじゅん,よしみずひろあき

【結果と考察】

液晶形成濃度を調べるため, 濃度が 5~50 wt%になるように PBLG/クロロ ホルム溶液を調製し, 室温にて¹³C CP static NMR 測定を行った. 結果を Figure 2 に示す. 主鎖カルボニル炭素 の化学シフトテンソル主値 σ_{22} (198 ppm) は水素結合方向, すなわちらせ ん軸方向に対応する. 従って PBLG の 配向構造は主鎖カルボニル炭素の観 測化学シフト値が σ_{22} 値であるかど うかで判断することができる. 固体試 料の¹³C CP MAS NMR 測定で得られ たスペクトル(a) で 175 ppm に現れ る主鎖カルボニル炭素のピークは¹³C



Figure 2 (a)¹³C CP/MAS NMR spectrum of the solid PBLG, (b) \sim (d)¹³C CP/static NMR spectra of the liquid crystalline solution of various concentration of PBLG, the concentration was (b)40, (c)15, (d)10 wt%.

CP static NMR 測定では濃度が 10~35 wt%の溶液では 195 ppm 付近に現れた. しかし 10 wt%の溶液のスペクトル(d)は他の濃度で配向したサンプルのスペクトルと比べ, 主鎖カルボニルピークの線幅が太い. 10 wt%の溶液では他のサンプルより配向度が低 いと考察される. 以上より, 配向に適した濃度は 15~35 wt%の範囲であることがわ かった.

これらの結果を踏まえ,濃度 35 wt%から強磁場中でキャストし固体試料を調製した.また磁場を印加せずに調製した無配向試料も用意した.得られた配向試料と無配向試料の二次元 X 線画像を Figure 3 に示す.磁場を印加させて調製したサンプルは高度に一軸円筒配向していることがわかった.なお,NMR による気体輸送特性の結果は当日発表する.







Figure 3 X-ray diffraction photgraph of (i) non-oriented PBLG (ii) magnetic oriented PBLG measured at edge view.

温度応答性ポリマー水溶液のゲル化に関する二次元²H *T₁−T₂* NMR緩和挙動の検討

○渡部英司¹, 佐藤浩子², 関根素馨², Gregory S. Boutis³, 朝倉哲郎¹ ¹農工大院・工,²三井化学・分析セ,³ニューヨーク市立大・物理

A study of the gelation behavior of thermo-responsive polymer using two-dimensional ²H T_1 - T_2 NMR relaxation

○Eiji Watanabe¹, Hiroko Sato², Sokei Sekine², Gregory S. Boutis³, and Tetsuo Asakura¹

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

²*Mitsui Chemical Analysis & Consulting Service, Inc., Japan*

³Department of Physics, City College of New York, USA

The thermo-responsive behavior of a unique biocompatible polymer, poly(*N*-substituted α/β -asparagine) derivative (PAD), was studied with several NMR methods. The ¹³C solution NMR spectra did not change before and after the phase transition. The ¹³C CP/MAS NMR showed restricted backbone motion of the polymer chain occurred only at low temperature. The ²H two-dimensional (2D) T_1-T_2 relaxation studies based on an inverse Laplace transform, were used to monitor change in the correlation times and their distribution of ²H₂O in the PAD-²H₂O solution system during the phase transition. Namely, with increase of the observed temperature, several correlation times of ²H₂O were observed suddenly above the temperature of the phase transition. Thus, ²H 2D T_1-T_2 relaxation studies are very useful to study the complex aggregation and dissociation process resulting in the liquid to gel transition of thermo-responsive polymer in aqueous solution.

刺激応答性高分子の中でも、高い生体適合性を有し、水溶液が加熱に伴ってゾルー ゲルーゾル相転移挙動を示す両親媒性のα/β-N-置換ポリアスパラギン誘導体(PAD)は、 医療分野をはじめとする広い分野への応用が期待されている。

本研究では、PADの重水溶液について、相転移を生ずる前後の各温度にて重水の²H 二次元(2D) $T_I - T_2$ 緩和挙動及び2D $T_2 - T_2$ 緩和挙動を測定し、重水のダイナミクス挙 動と¹³C 溶液 NMR及び¹³C CP/MAS NMRを用いたPADの溶液構造を検討した。 <実験>

<u>温度応答性ポリアスパラギン誘導体(PAD)の合成</u>: DMF中でポリコハク酸イミドに対してラウリルアミン(LA)及び3-アミノ-1-プロパノール(AP)を反応させることにより得られた。^{1,2}

動的粘弾性測定:レオメーター(Viscoanalyzer Var-50/100, Reologica Instrument, AB)を用い、昇温速度2.0 ℃/分、1.0 Hz一定下で実施した。

<u>NMR測定</u>: NMR装置は、PADの10 wt% 2 H₂O溶液の 13 C NMRをAVANCE III 500(Bruker)、 13 C CP/MAS NMRをCMX 300(Chemagnetics)を用い、 2 H 2D $T_{1}-T_{2}$ 及び $T_{2}-T_{2}$ NMR測定 はニューヨーク市立大・物理のVarian 200を用いて測定した。

Thermo-responsive Polymer, Hydrogel, ²H 2D $T_1 - T_2$ Relaxation \bigcirc わたなべ えいじ, さとう ひろこ, せきね そけい, グレゴリー エス ボウティス, あさくら てつお

<結果・考察>

PADの10 wt%水溶液は、温度上昇に伴って、約40 ℃ から粘度が上昇し始め、約60 ℃の時、70 Pa・sに到達し、その後、逆に粘度は徐々に低下した。すなわち、 ゾルーゲルーゾル相転移挙動を示すことがわかる (Figure 1)。各温度において、PADの¹³C 溶液 NMRスペクトルは、ほとんど変化が見られなかった。一方、 ¹³C CP/MAS NMRスペクトルは、25 ℃で一部、観測 されたが、40 ℃以上では、ほとんど観測されなかった。以上の結果から、PADの運動性は総じて高いが、 低い温度で、ポリマー分子鎖が近接し、"節"の様 な構造を形成すると推察される。

一方、PADの重水溶液に ついて、²H 2D T_1 - T_2 及び T_{2} - T_{2} NMRスペクトルの 測定を行った。各温度での 2 H 2D T_{I} – T_{2} \mathcal{T} ロットを Figure 2に示す。20,30 ℃ の時には、自由水のみが観 測されるが、粘度上昇が開 始する40 ℃以上では、 PADとの相互作用の結果、 分布を持った相関時間を 有する重水分子の集合体 が出現する。そして70 ℃ では、自由水とPADと相互 作用した水分子の集団が 明確に2相に分離する。

これらの結果から相転 移に伴うPAD水溶液の変 化をFigure 3にまとめた(球 は水分子を、黒線はPAD鎖 を表している)。



Figure 1. Temperature dependence of the viscosity of 10 wt% aqueous solutions of PAD sample (LA/AP = 20/80).



Figure 2. ⁴H 2D T_{t} – T_{7} ILT maps of PAD sample in D₇O (10 wt%) as a function of temperature. The dashed lines in the images are intended to quide the eve for the region of the 2D map where T_{t} is approximately equal to T_{2} . The signal intensity indicated by the color bar is on a logarithmic scale.



Figure 3. A cartoon representation highlighting the thermal behavior of the agueous PAD as a function of temperature. In the figure, spheres denote water molecules, black lines denote PAD chains, and red is used to indicate restricted motion of the polymer chains due to inter-chain interactions, such as nodes.

以上の様に、ポリマー側の構造変化では解明できなかったPAD水溶液のゾルーゲルー ゾル相転移に対して、重水の²H 2D T_{I} - T_{2} 緩和及び T_{2} - T_{2} 緩和(70 °Cで2相が交換しな いことを証明)の研究により、PAD分子と水分子との相互作用を重水の緩和挙動から 把握することが出来、PAD水溶液の相転移挙動を詳細に検討することができた。 <謝辞>

本研究は一部、農水省「アグリ・ヘルス実用化研究促進プロジェクト」及び平成23 年度科学研究費「基盤研究A課題番号23245045」により実施された。 <参考文献>

[1] E. Watanabe et al, Chem. Lett., 876-878 (2005).

[2] E. Watanabe et al, *Macromol. Symp.*, 249/250, 509–514 (2007).

超高速MAS高分解能¹H固体NMRを用いた一連の絹結晶部 モデルペプチドの構造解析 ○大畑卓也¹,矢澤宏次^{1,2},青木昭宏¹,西山裕介²,西村勝之³, 朝倉哲郎^{1,2} ¹農工大院・工 ²JEOL RESONANCE ³分子研

Structural analysis of model peptide for the crystalline domain of silk fibroin studied with high resolution ¹H solid state NMR by ultra fast MAS

OTakuya Ohata¹, Koji Yazawa^{1,2}, Akihiro Aoki¹, Yusuke Nishiyama²,

Katsuyuki Nishimura³, and Tetsuo Asakura¹

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

²JEOL RESONANCE Inc., Tokyo, Japan.

³Institute for Molecular Science, Aichi, Japan.

The structures of model peptide, $(AG)_{15}$, for the crystalline region of *Bombyx mori* silk and Ala oligomers for the crystalline regions of spider silk and *Samia cynthia ricini* silk were studied with ¹H-DQNMR under ultra fast MAS. The difference between Silk I (before spinning) and Silk II (after spinning) forms was clarified; for example, the amide proton chemical shifts reflecting the inter-molecular hydrogen bonding distance are different between Ala and Gly residues in Silk I, whereas they are indistinguishable in Silk II. The ¹H-DQMAS also used to clarify the difference between anti-parallel and parallel structure of (Ala)₄, showing difference in the correlation peaks in the H α region. It shows that the H α approximates H α nearby molecules in anti-parallel structure and not in parallel structure. Thus, high resolution ¹H solid state NMR by ultra fast MAS is useful for getting information on the structure, especially for intermolecular structure.

[緒言]

絹は蚕やクモの体内では水溶液として存在するが、独自の繊維化機構を経て高強度 な絹繊維となる。この繊維化機構を詳細に理解するためには、繊維化前後の絹フィブ ロインの立体構造の解明が不可欠である。当研究室では、家蚕絹および野蚕絹ならび にクモ絹の結晶部モデルペプチドについて詳細な分子構造の解析を進めてきた。特に、 一般にNMRが不得意である分子間構造の解明は絹構造の解明に当たって重要であり、 そのための新たなNMR構造解析のアプローチが必要である。

本研究では、¹³C核と比較して分子外部に位置するため、分子間に敏感な¹H核に着目 し、¹H 固体NMRを用いて一連の絹結晶部モデルペプチドの分子間構造の解析を行った。 ¹H 固体NMRは分解能が低く、殆ど利用されてこなかったが、超高磁場と超高速試料回 転を組み合わせることによって高分解能化を達成、その構造解析が可能となってきた。

Solid state NMR, Ultra fast MAS, Silk fibroin

○おおはたたくや,やざわこうじ,あおきあきひろ,にしやまゆうすけ, にしむらかつゆき,あさくらてつお

[実験]

家蚕絹結晶部モデルペプチドとしてF-moc固相合成法により(AG)₁₅を合成した。得られたモデルペプチドを9MLiBrに溶解・透析し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。それをギ酸に溶解させ、乾燥させたものを繊維化後のSilkII型結晶部とした。エリ蚕絹結晶部はpoly-Alaからなっているが、その解析のための最初の段階として、逆平行型および平行型の(Ala)₄を用いた。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70kHzで行った。¹H-¹H 近接の観測にはDipolar Homonuclear Homogeneous Hamiltonian double-quantum/single quantum (DQ-SQ) correlation法を用いた。

[結果·考察]

Fig.1に(AG)₁₅のSilkI型および SilkII型の¹H-DQMASスペクトル を示す。アミドプロトンHMの化 学シフトは、水素結合したカルボ ニル基との間の水素結合距離に 依存する。SilkI型ではAla残基と Gly残基のH_w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型では8.7ppm付 近で重なって観測された。これは、 SilkI型では、Gly残基が関わる分 子間水素結合に比較して、Ala残 基が関わる分子内水素結合が弱 く切れやすいこと、一方、主に 逆平行βシート構造を形成する SilkII型では、両残基ともに、 強固な分子間水素結合距離を形 成することを示している。この ことは、家蚕絹の繊維化機構に 関する貴重な情報を与える。

Fig. 2に (Ala)₄の逆平行型お よび平行型 β シート構造の ¹H-DQMASスペクトルを示す。 H_{α}



Fig. 1 ¹H-DQMAS spectra of $(AG)_{15}$ with Silk I (a) and Silk II forms (b) as the models for two kinds of crystalline structures of *Bombyx mori* silk fibroin.



Fig. 2 ¹H-DQMAS spectra of anti-parallel β -sheet (a) and parallel β -sheet structures (b) of Ala₄.

領域における相関ピークの出現の仕方が両構造の間で大きく異なる。逆平行型では隣 り合う分子鎖のH_a同士が近接するのに対し、平行型ではそのような近接は見られない ことがわかる。このように、¹H固体NMRは、絹分子間の構造情報を得るのに適しており、 スペクトルのより定量的な解析を通して多くの絹構造情報が得られると期待される。

[謝辞]

本研究は一部、農林水産省アグリ・ヘルス実用化研究促進プロジェクトならびに平成 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。

延伸ロールで一軸延伸されたPETフィルムの固体NMR構造 解析

○石田宏之,岡田一幸,中田克(株)東レリサーチセンター

Structural Analysis of uniaxial roll drawing poly(ethylene terephthalate) film by Solid-State NMR

○Hiroyuki Ishida, Kazuyuki Okada, Masaru Nakada *Toray Research Center, Inc., Shiga, Japan*.

Higher order structures of poly(ethylene terephthalate) uniaxial roll drawing films (drawn ratio: 2.25~3.5, preheating temperatures: 90, 100°C) are characterized by solid-state ¹³C CP/MAS NMR spectra and synchrotron SAXS/WAXS measurements. The SAXS/WAXS patterns suggest that a smectic state is formed in the drawn films at 90 °C preheating temperature, conversely, a normal crystalline is formed at 100 °C. Solid-state ¹³C CP/MAS NMR spectra reveal that although the ethylene unit transfer from *gauche* to *trans* structure, the terephthalate unit of the drawn films at 90 °C preheating temperature remains the amorphous structure.

【緒言】 高分子のナノスケールでの高次構造制御技術は、高分子の熱的あるいは力学 的な特性を飛躍的に向上させる技術として数多くの研究・開発が行われている。そう した中で、従来から使用されているPET(ポリエチレンテレフタレート)のような高 分子においても、熱処理や延伸工程を工夫することにより形成される高次構造、すな わち結晶の大きさや量、非晶の構造などに関する研究が盛んに行われている¹⁾。

工業的なフィルム製造工程の中で、延伸ロールを用いた一軸延伸では、延伸速度が 数千%/min~数万%/min程度と非常に早い。そのため、ストレッチャーなどによる延 伸のように延伸速度が遅い条件で形成される構造とは異なることが考えられる。そこ で、これまでに延伸ロールを用いて一軸延伸したPETフィルムについてSPring-8での WAXS及びSAXS測定を行った。その結果、予熱温度100°Cの延伸ロールによる一軸 延伸フィルムでは結晶化が起きているのに対して、予熱温度90°Cの一軸延伸フィルム ではWAXS像にsmectic構造に対応するピークが観察された。

そこで今回、予熱温度90°Cで延伸した一軸延伸フィルムにおいて形成が示唆された smectic構造についてより詳細に明らかにするために、固体NMR法による分析を試み た結果を報告する。

【実験】 測定には東レ(株)より入手した未延伸フィルムと、延伸ロールを用いて 予熱温度90°Cと100°Cで延伸倍率2.25~3.5倍(延伸速度:数千%/min~数万%/min) に一軸延伸されたフィルムを用いた。

固体¹³C NMR測定は、Chemagnetics社製CMX300 Infinityにて行った。

PETフィルム, 一軸延伸, 固体¹³C NMR

○いしだひろゆき,おかだかずゆき,なかだまさる

【結果と考察】 予熱温度 90°C または 100°C の条件でロール延 伸した延伸倍率の異なるフィルム と未延伸フィルムについて、¹³C CP/MAS スペクトルの測定を行 った。Fig.1 にはカルボニル炭素 部分の拡大スペクトルの多重プロ ットを、Fig.2 にはエチレン炭素 部分の拡大スペクトルの多重プロ ットを示した。

Fig.1 (a)の予熱温度 90°C の一 軸延伸フィルムでは、カルボニル 炭素のピークの形状は未延伸フィ ルムとほぼ一致しており、カルボ ニル炭素については非晶と同じ状 態にあると推測される。

これに対して、Fig.1 (b)の予熱 温度 100°C の一軸延伸フィルム では、延伸倍率が大きくなるに従 って、非晶ピークよりも高磁場側 の結晶ピーク位置の強度が大きく なる傾向を示した。従って、予熱 温度 100°C では延伸により結晶 化が起きていると考えられる。

次に、エチレン部分のコンホメ ーションに着目すると、予熱温度 90°C (Fig.2 (a))および 100°C

(Fig.2 (b)) 何れにおいても、延 伸倍率が大きくなるに従って、ピ ークトップの高磁場シフトが起き ており、trans コンホメーション の増加が示唆された。

以上の結果より、予熱温度 90°C の一軸延伸フィルムでは、smectic 構造の形成に伴い、エチレン部分 では *trans* コンホメーションの増 加による伸び切りが起きる一方、 テレフタル酸部分では大きな構造 変化はなく非晶の状態のままであ ることが推察された。



Fig.1 Carbonyl carbon resonance peaks in the ¹³C CP/MAS NMR spectra for the undrawn sample and uniaxial roll drawing films of which preheating temperature are (a) 90°C and (b) 100°C.



Fig.2 Ethylene carbon resonance peaks in the ¹³C CP/MAS NMR spectra of the undrawn sample and uniaxial roll drawing films of which preheating temperature are (a) 90°C and (b) 100°C.

[参考文献]

1) 越智隆志, 三輪優子, 繊維学会予稿集, 63(1/2), 90 (2008)

〇北村成史、浅野敦志、黒津卓三 防衛大・応用化学

Anisotropic Properties of ¹³C NMR Spectra and Molecular Motion Change of Rubbers Rolled by MAS

OMasashi Kitamura, Atsushi Asano, and Takuzo Kurotsu Department of Applied Chemistry, National Defense Academy, Kanagawa, Japan.

Anisotropic ¹³C NMR spectra of natural rubber (NR) rolled during MAS were mainly investigated. The ¹³C NMR spectral shape showed the compression ratio dependence of rolled NR. Furthermore, the ¹³C chemical shift of a strip NR cut from the cylindrically rolled NR showed the angle dependence between a plane of the strip and the applied magnetic field. Magnetic susceptibility revealed the ¹³C chemical shift change quantitatively. The molecular motion change between the bulk and the rolled states was also investigated through the temperature dependence of T_1^C . The simulation of T_1^C temperature dependence on the basis of the WLF relation for the correlation time τ indicated that the molecular orientation largely affects the single bond rotation, while the double bond group was not influenced so much.

<諸言>

固体NMR試料管内 (円筒形ローター)に未加硫のゴ ムを入れ、マジック角で高速に回転 (MAS)すると、 充填したゴムはローター内の円周に沿って空洞を生 じ、伸びる (圧延伸長)。MASにより圧延伸長した後 の天然ゴム (NR)をStaticプローブを用いて測定する と、Fig. 1(a)のように圧延伸長前の等方的¹³C NMRス ペクトル (破線)から異方性のあるスペクトル (実線) に変化する^{1,2)}。この変化は、単にNRの中心をくり抜 いて空洞状態にした試料では観測されない (Fig. 1(b))。このことは、試料形状に依存しておこる磁化 率の変化が、¹³C NMRスペクトルを異方的に変化させ たわけではないことを示している。異方的スペクト ルの原因が、圧延伸長によるゴム分子の配向による と考え検討した。さらに、圧延伸長がゴムの分子運 動に与える影響と、MASの内部圧力がゴムの分子運 動に与える影響を検討するため、¹³C核のスピン-格



Fig. 1. Static state ¹³C NMR spectra of (a) rolled NR and (b) deformed (cylindrical cavity) NR. Isotropic spectra depicted by the broken line were obtained from the bulk NR.

子緩和時間(T_1^c)の温度依存性を観測した。 T_1^c の温度依存性を、運動相関時間にWLF 型およびアレニウス型の2種類を仮定した場合について解析し議論した。

<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から提供さ ¹³C NMR、分子配向、分子運動

○きたむらまさし、あさのあつし、くろつたくぞう

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(PB)は、新世代エラストマー技術研究分科会を通じて日本ゼオン(株)から 提供されたcis-1,4-PB (cis-1,4型が97%)を用いた。固体¹³C NMRスペクトルおよび T_1^{C} は、 Varian NMR systems 400 MHz WB型を用いて測定した。試料の圧延度の制御は、長さ を調節したテフロンスペーサーで試料を挟み込み、MAS速度9 kHz、温度60°Cの状態 を12時間以上維持することで行った。固体¹³C NMRスペクトルの測定は、ローターホ ルダーが静磁場と垂直になるStaticプローブを用いて行った。 T_1^{C} の測定は、一般的な 反転回復法を用いて $5T_1^{C}$ 以上の待ち時間で行った。磁化率の測定はQuantum Design社 製のMPMS-SL5を用い、磁場を0から4×10⁶A·mに掃引して行った。

<結果・考察>

1.¹³C化学シフト値、磁化率、圧延度の関係

Fig.2 (a)は、円筒状に圧延伸長したNRを短冊状に切り出して、試料面を磁場に対し て平行および垂直に設置した時の静止状態¹³C NMRスペクトルである。試料の設置方 向によって化学シフト値が変化した。これらの化学シフトは、Fig.1 (a)の異方的スペ クトルの2つに分裂したピークトップの化学シフト値とそれぞれほぼ一致する。この 短冊状NRの静磁場方向と試料面の角度関係と同じ条件で質量磁化率を観測したとこ ろ、Fig.2 (b)の直線(●と〇)を得た。この直線の傾きが質量磁化率 (χ_m)になる。Fig.2 (b) から、静磁場に試料面が垂直になった時の方が、水平になった時より χ_m の絶対値が大 きいことがわかった。このことは、化学シフト値 δ と χ_m との間に相関関係が見出され たことを示す。また、同じ実験をcis-1,4-PBとPIBを用いて行った。cis-1,4-PBは、NR と同様の傾向を示したが、PIBでは、¹³C スペクトルは異方的変化を示したが、 χ_m は 変化を示さなかった(Fig. 2 (b)の▲と△)。PIBは二重結合を持たないので、NRやPBで 観測された試料面と静磁場の角度を変化させた時の χ_m の方向依存性は、π電子の配向 性が大きく寄与しているものと考えられる。

Fig. 3 に、NR の χ_m 、¹³C NMR スペクトルの等方的化学シフト値からの変化量 ($\Delta \delta$)



Fig. 2. (a): Angle dependent ¹³C NMR spectra of a strip obtained from the rolled NR. (b): Observed magnetisms for strip NR (\bullet , \circ) and strip PIB (\blacktriangle , Δ). The solid and open symbols correspond to parallel and perpendicular directions against the magnetic field, respectively.



Fig. 3. Relationship among the degree of compression (ξ) , ¹³C chemical shift difference from the isotropic value $(\Delta \delta)$, and the mass magnetic susceptibility (χ_m) .

と圧延度 (ξ : 未圧延試料の厚さ/圧延試料の厚さ)を 3 次元プロットした。■および □は、それぞれ試料面が、静磁場に対して垂直 (\bot)および平行 (//)になるように設 置した時の値を示している。 χ_m の値は、圧延度の違いに比例して変化した。この現象 を、圧延度が大きいほど分子鎖が均一に配向し、二重結合の磁場に対する遮蔽効果が 大きくなるところで、反磁性が強くなったためと考えた。また、分子の配向方向が磁 場の垂直成分に対してある角度をとっていると考えた。 $\chi_{m\perp} \ge \chi_m // 0 \zeta$ に対する比例定 数より、角度 θ は 25±1°と求められた。化学シフト差 $\Delta\delta$ と質量磁化率 χ_m との関係は、 $\Delta\delta$ と圧延度 ξ との関係を最小二乗フィットにより求め、 $\chi_m \ge \zeta$ との関係を用いることで、 次式のように表すことができた。

 $\Delta \delta_{\perp} = 4.42 - 29 \cdot \tan 25 \, \circ \exp \left(10 \cdot \tan 25 \, \circ \left(\chi_{m \perp} + \, 0.85 \right) \right) \quad \cdots (1)$ $\Delta \delta_{\parallel} = -2.16 + 29 \cdot \exp \left(20 \left(\chi_{m \parallel} + \, 1.05 \right) \right) \qquad \cdots (2)$

これらの式を用いて化学シフトから xmを求めることが可能である。

2. MASや圧延変形の分子運動性への影響

Fig.3 に、NR の CH₂ 基に関して、 MAS (9kHz)下で測定した T_1^{C} の温度 依存性を示した。未変形 NR を - 25℃ から 100℃ まで温度を上昇させなが ら観測した $T_1^{C}(●)$ と、その後、100℃ から温度を下げていった時の $T_1^{C}(○)$ を示している。両者は、異なった温度 依存性を示した。また、 - 25℃ まで 温度を下げた後に再度温度を上昇さ せながら測定すると、〇で示された温 度依存性となった。

 T_1^C を測定する最初の時点で、静止 状態¹³C NMR スペクトルを観測する と、Fig. 1 の破線と同じ等方的スペク トルが観測された。しかし、温度を上



Fig. 3. Temperature dependence of T_1^{C} of CH₂ group for NR at MAS speed of 9 kHz. The vertical axis is logarithmic.

昇させながら T_1^c を測定していき、室温を大きく越えた時点で、静止状態¹³C NMR スペクトルを再度測定すると、Fig. 1(a)の実線に近いスペクトルを観測し、最終的に Fig. 1(a)の実線と同じスペクトルとなった。その後、温度を下げて T_1^c を測定し、途中で静止状態¹³C NMR スペクトルを観測しても圧延伸長されたスペクトルが最後まで観測された。これらの実験結果から、Fig. 3 のように温度上昇時と下降時において T_1^c の温度依存性が異なるのは、MAS 下で T_1^c 実験中に圧延伸長された NR の分子運動が、変化していく過程を観測しているためと結論付けた。

分子運動に与える MAS の内圧の影響と、圧延伸長で生じる分子配向の影響を区別 するため、静止状態で測定した未変形 NR (〇)と圧延伸長 NR (△)、MAS をしながら 測定した圧延伸長 NR (▲)の T_1^{C} の温度依存性を観測した (Fig. 4)。Fig. 4 は、相関時 間 τ を WLF (William-Landel-Ferry)型((3)式)に従うと仮定し、一般的な BPP (Bloembergen-Purcell-Pound)理論の(4)式を用いて実測データをシミュレーションした 結果である。

$$\log \frac{\tau}{\tau_g} = \frac{-C_1 \times (T - T_g)}{C_2 + T - T_g} \qquad \cdots (3)$$

$$\frac{1}{T_1^C} = f \frac{\hbar^2 \gamma_H^2 \gamma_C^2}{r_{CH}^6} \left\{ \frac{\tau}{1 + (\omega_H - \omega_C)^2 \tau^2} + \frac{3\tau}{1 + \omega_C^2 \tau^2} + \frac{6\tau}{1 + (\omega_H + \omega_C)^2 \tau^2} \right\} \dots (4)$$

NRの T_g を200Kに設定した²⁾。静止 状態で測定した未変形NR (○)とMAS により圧延伸長した NR (△)で比較す ると、 sp^3 混成軌道の CH₂では変化が 観測されたが (Fig. 4 (a))、sp²混成軌道 のCH 基では、ほとんど変化が観測さ れなかった (Fig. 4 (b))。 T_g での CH₂ 基の運動の相関時間 τ_gは、未変形で 1.2 s、圧延伸長の場合で 2.0 s と約 2 倍となり(Table 1)、未変形 NR に比べ て遅くなっている。CH2基は、単結合 部位であり、自由に運動できるが、圧 延伸長によりこの運動が束縛された ことが考えられる。一方、二重結合の CH 基は、τg に変化は観測されない。 これは、二重結合部位が平面構造のた め、圧延伸長に関係なく運動がすでに 束縛されており、影響を受けにくいた めと考えられる。

圧延伸長した NR の T_1^c の温度依存 性を MAS 下で測定すると(\blacktriangle)、 τ_g に大 きな変化が観測された。CH₂基では約 1/4 に、二重結合部位の CH 基におい ても、約 1/2 となった。通常、分子全 体の運動モードが変化せずに運動の 相関時間のみが変化すると、 T_1^c の温 度依存性は全体的に左右どちらかに 移動する。しかし、Fig. 4 では、 T_1^c の 温度依存性が高温側、低温側ともに拡 がっている。つまり、MAS の内圧によ り運動モードが変化したと考えられ る。MAS の圧力により、分子鎖全体の 分子運動に影響が及ぼされたと結論 づけられた。



2) 北村成史ら、日本ゴム協会誌,86,(2013) 印刷中



Fig. 4. Temperature dependence of T_1^{C} of NR. Solid line and \circ for bulk NR and dashed line and Δ for rolled NR are obtained without MAS. Dotted line and \blacktriangle are observed under MAS.

Table 1. Parameters used for eqs. (3) and (4) to simulate the observed temperature dependence of T_1^{C} in Fig. 4.

		C1	$C_2(K)$	τ_g (s)	f
	0	9.76	230	1.18	0.645
(a)	Δ	10.1	230	2.00	0.611
	▲	8.45	233	0.50	0.625
	0	9.88	230	1.50	0.455
(b)	Δ	9.90	230	1.50	0.448
	▲	9.05	233	0.71	0.452

固相反応で得られたQuinhydroneの構造研究 〇伊澤研一郎,野田泰斗,竹腰清乃理 京都大学大学院理学研究科

Structural study of Quinhydrone Synthesized by Solid-State Reaction.

OKenichiro Izawa, Yasuto Noda and K.Takegoshi Division of Chemistry, Graduate School of Science, Kyoto University.

Solid-state reaction is important in, for instance, drug chemistry. However, its detailed mechanism has not been explained yet. It is known that quinhydrone (QH) can be synthesized by grinding solid benzoquinone (BQ) and hydroquinone (HQ) together. This may be the simplest material obtained by solid-state reaction. In this work, in purpose of unraveling QH solid-state reaction mechanism, XRD, ¹H relaxation time and ¹³C CP/MAS NMR measurements were done to examine structure of QH.

【序論】溶媒を用いない固相反応は創薬等で重要な位置を占めるが、その詳しい反応 メカニズムは未だ解明されていない。Quinhydrone (QH) は原料であるbenzoquinone (BQ) とhydroquinone (HQ) を粉砕混合することでも合成できる化合物であり (Fig.1)、 monoclinic, triclinicの2つの結晶多形を持つ^[1,2]ことが知られている(Fig.2)。これは固相 反応で得られる最も単純なモデル化合物であり、本研究では固相におけるQHの合成 過程を解明することを目的として、反応経路、結晶多形による動的・静的構造の違い をQHのXRD測定、固体NMRによる¹H緩和時間測定と¹³C CP/MAS測定により検討した。



a) Triclinic. b) Monoclinic.

【実験】測定に用いた試料調製は次の手順で行った。

試料A). 固相反応経由 QH: 等量のBQ, HQを乳鉢で十分に粉砕混合した後、45 $^{\circ}$ で 12 h 加熱し得た。XRDパターンからMono: Tri = 1:2 の混合物であることを確認した。 試料B). 固相反応経由 QH: 試料A)を更に85 $^{\circ}$ で12 h 加熱した。XRDパターンから monoclinic単相であることを確認した。

試料C). 液相反応経由 triclinic QH: 等量のBQ, HQを60 $^{\circ}$ C の水に溶解したのち、ゆっくりと30 $^{\circ}$ C まで冷却し再結晶した。

試料D). 液相反応経由 monoclinic QH: 等量のBQ, HQをアセトンに溶解したのち、ア セトンを2日かけてゆっくりと揮発させて得た。

また、これとは別に重水置換した重HQを用意し、A)~D) について各手順を行うことで、それぞれの重水素化試料を合成した。

Quinhydrone,ドメイン解析,固相反応

○いざわけんいちろう,のだやすと,たけごしきよのり

NMR 実験は7 T 磁場と Chemagnetics 社製5 mm MAS a) probe、OPENCORE NMR 分光 計を用いて行った。¹Hと¹³Cの照 射周波数はそれぞれ301.37 MHz、75.788 MHz、MAS周波 数は10 kHz とした。異なる結晶 多形の緩和時間を区別するた めにCPと飽和回復法を組み合 わせて用い、それぞれの¹³Cの¹ H緩和時間測定を行った。



H板和時間例足を行った。 得られた¹H緩和時間データは磁化の回復の式 $M_Z(t) = M^0 \{1-\exp(-t/T_1)\}$ に従って 最小二乗フィッティングによる解析を行った。

QH from SOLID-state reaction						QH from LIQUID-state reaction										
A).B hea	A).Before Deuterated heating A)		B).A hea	After ting	Deuterated B)			C). Triclinic		Deuterated C)		D). Monoclinic		Deuterated D)		
T ₁ /s	Ratio (%)	T ₁ /s	Ratio (%)	T_1/s	Ratio (%)	T ₁ /s	Ratio (%)		T ₁ /s	Ratio (%)	T ₁ /s	Ratio (%)	T ₁ /s	Ratio (%)	T ₁ /s	Ratio (%)
14	9	14	17	2	9	10	4		5	32	39	27	14	15	14	19
220	91	220	83	230	91	300	96		38	68	290	73	160	85	160	81

Table 1 ¹H Relaxation time of QH polymorphs and their deuterides.

【結果・考察】得られた¹³CのスペクトルをFig.3に示す。Monoclinic QH とtriclinic QH はpeak 2b 部分の化学シフトが異なる。緩和時間の解析結果をTable 1に示す。QHの¹H の緩和メカニズムとして考えられるのは、OH基の運動と、結晶中のベンゼン環がその場で動くlibration運動の2つである。前者であればOH基の重水素化の影響が緩和時間に大きく影響を与え、後者であれば影響は小さいものと考えられる。

Table 1に示した¹H緩和時間測定で各試料のT₁に含まれる短時間成分については、 ¹³Cスペクトルの繰り返し時間依存性の検討から微量に存在する原料のHQ (T₁~0.5 s) によるものと考えられる。T₁長時間成分を見ると液相反応経由のmonoclinic QHは重水 素化の影響をほとんど受けていない一方で、液相反応経由のtriclinic QHは重水素化後 に緩和時間が極めて長くなるという結果となった。従って、液相経由のmonoclinic QH の長い160 s のT₁はベンゼン環の揺らぎによると考えられ、triclinic QHの短い38 s の T₁はOHの運動によると考えられる。

固相反応で得られた両試料(A&B)のT₁ ~ 230 s はいずれも液相反応で得られた monoclinic試料DのT₁~160 s よりも長く、固相経由のmonoclinic結晶におけるQHはベ ンゼン環の運動が制限されるようなpackingになっているのではないかと考えている。 また、固相反応経由のQHについては、加熱後の試料Bはmonoclinicであるにもかかわ らず、重水素化により緩和時間が大幅に延長した。つまり、この系においてOH基の 運動がT₁に顕わになるほど、ベンゼン環の運動によるT₁が遅いことが示唆されている。

以上の様な重水素置換による運動性の変化については重水素のNMR観測や、ベンゼン環の水素の重水素化などによって今後検討する予定である。

[1] T.Sakurai, Acta Cryst., 1965, 19, 320-330.

[2] T.Sakurai, Acta Cryst., 1968, B24, 403-412.

アミノ基を持つ高分子と二酸化炭素の反応

○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

Reaction of polymers which have amino group and carbon dioxide

OKen Takagi¹, Mina Kobayashi¹, Shiro Maeda¹, and Ko-Ki Kunimoto²

¹Division of Applied Chemistry and Biotechnology, Graduate School of Engineering, University of Fukui, Fukui, 910-8507, Japan. ²Division 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 amino groups as a side chain was studied by using liquid and solid ¹³C and ¹⁵N NMR. Some amino groups of polymers 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 the polymers. Carbamate formation by bubbling carbon dioxide gas through poly(ϵ -L-lysine) and poly(allyl amine) aqueous solutions and its reversibility to regenerate amino groups by bubbling nitrogen gas through them were also examined.

【はじめに】微生物産生高分子ポリ(ε-リジン)(ε-PL) (Scheme 1)は水溶液中において,側鎖アミノ基α-NH₂ が空気中の二酸化炭素と反応してカルバメート (-NHCOO⁻)を形成すること,また空気中に数日放置し た水溶液のキャストフィルムにおいて,同時に生成す るプロトン化したε-PLの側鎖α-NH³⁺とのイオンコンプ レックス形成による自己組織化架橋が生じていること を¹³Cおよび¹⁵N 固体 NMR を用いて明らかにした[1]。 また,ε-PL とカルボキシメチルセルロースナトリウム 塩(CMC/Na)の混合水溶液に二酸化炭素をバブリングす ることによって,カルバメート化したε-PL の側鎖アミ ノ基α-NH₂ と CMC のカルボキシアニオンがポリイオ ンコンプレックスを形成してゲルを生成することを見



Scheme 1. Repeating units of poly(ε-L-lysine) (ε-PL).



Scheme 2. Repeating units of poly(allyl amine) (PAA).

出した[2]。ε-PL と同様に側鎖アミノ基α-NH₂を持つポリ(アリルアミン)(PAA) (Scheme 2) においても,DBU を含む水溶液中[3],あるいは有機溶媒中[4]で二酸化炭素をバブリングさせることによってゲルが生成することが知られている。アミジン基

カルバメート,二酸化炭素,NMR

○たかぎけん、こばやしみな、まえだしろう、くにもとこうき

を持つポリマーなども二酸化炭素と反応してゲルやミセルを形成する[5]。

【実験】 平均分子量 5,000 の PAA(ニットーボー メディカル)を用いた。CO₂ をバブリング (200mL/min)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

固体試料を作成した。固体 NMR 測定には Chemagnetics CMX Infinity 300 を用いた。 CO_2 をバブリングした PAA の D_2O 溶液を溶液 NMR 測定に用いた。また、30 秒間 CO_2 バブリング後、 さらに 2 時間種々の温度で N_2 バブリング (200mL/min)を行った試料も同様にして作成し た。

【結果と考察】Fig.1に、PAA水溶液にCO₂バ ブリングしてキャストしたフィルム試料の¹³C スペクトルを示す。バブリング時間35秒で白濁 した試料のスペクトルでは、164ppmにカルバメ ートのカルボニル炭素のピークが現れた。¹⁵N スペクトルでは、PAA側鎖のアミノ基(-NH₂)は 20ppmに、PAA塩酸塩ではNH₃⁺が40ppmに現れ るが、白濁した試料では30ppmにピークが現れ た。一方、バブリング時間75秒で無色透明なD₂O 溶液試料の¹³Cスペクトルでは、164ppmのピー クの他に161ppmにピークが現れた。後者は炭酸 水素イオンHCO₃⁻のピークと思われる。

Fig.2(a)に75秒間CO₂をバブリングしたPAA、 (b)~(e)に75秒間CO₂をバブリングした後、種々 の温度で2時間N₂バブリングしたPAA水溶液の ¹³C溶液NMRスペクトルを示す。Fig.2(e)のスペ クトルはPAAとほぼ同じである。PAA水溶液に CO₂をバブリングすると167ppmにカルバメー ト、163ppmに炭酸水素イオンのピークが現れた。



Fig. 1 ¹³C CPMAS NMR spectra of PAA films cast from PAA aqueous solution with (a) 75 sec (clear solution) and (b) 35 sec (turbid solution) CO_2 bubbling, respectively. Curve fittings for C=O resonances are shown in the insets.



Fig. 2 13 C NMR spectra of aqueous solution of PAA with (a) CO₂ bubbling for 75 sec, and CO₂ bubbling for 75 sec followed by N₂ bubbling for 2 hours at (b) room temperature, (c) 60 °C, (d) 80°C, and (e) 90°C.

さらに常温でN₂バブリングすると炭酸水素イオンのピークが消失した。60℃、80℃ とN₂バブリングする温度を高くするにつれてカルバメートのピーク強度が減少して いき、90℃でほぼ消失した。¹Hスペクトルでも同様な結果が得られた。

REFERENCES

[1] S. Maeda, S. Oumae, S. Kaneko, K.-K. Kunimoto, , Polym. Bull., 68, 745-754 (2012).

[2] S. Maeda, K. Kato, K. Takagi, M. Kobayashi, K.-K. Kunimoto, *Int. J. Mod. Phys. B*, 25, 4315-4318 (2011).

[3] D. Nagai, A. Suzuki, T. Kuribayashi, Macromol. Rapid Commun., 32, 404-410 (2011).

[4] E.Carretti, L. Dei, P. Baglioni, R. G.Weiss, J. Am. Chem. Soc., 125, 5121-5129 (2003).

[5] S. Lin, P. Theato, Macromol. Rapid Commun., 34, 1118-1133 (2013).

固体NMRによる木質素材の乾燥と含浸過程の解析

〇西田雅一¹,田中智子¹,三木恒久²,金山公三²,兼松 渉¹ 産総研・計測フロティア¹,サステナブルマテリアル²

Solid State NMR Analysis of Drying and Impregnation Processes of Woody Materials

OMasakazu Nishida, Tomoko Tanaka, Tsunehisa Miki, Kozo Kanayama, and Wataru Kanematsu

National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Nagoya, Japan.

In order to investigate changing micro-structure of woody materials in a flow molding process based on molecular- and nano-scales, drying and impregnation process of Japanese cedar were examined by ¹H MAS NMR, ¹³C CP-MAS NMR, ¹³C PST-MAS, and T₁H analysis. As a result, addition of phenolic resin into cedar increased hydrophobicity of the woody material. Humidity of impregnation samples did not affect cross-polarization efficacy and T₁H values of cellulose but increased mobility of hemicellulose.

バルク状態の木質素材からでも変形により形状 付与する『流動成形技術』(図1)は、木材を粉砕 せずに一回のプレス成形のみで賦形するだけでな く、成形と同時に接合することもできる技術である。 流動成形技術は成形前の薬剤の含浸や成形後の乾 燥・調湿などの手順で行うが、その流動・固化メカ ニズムについての詳細は不明な点が多い。本発表で は、流動成形の重要因子を明らかにするために、ス ギの乾燥前後とフェノール樹脂の含浸による固体 NMRスペクトルと緩和時間の変化を調べた。

¹H MAS NMRスペクトル(図2)では、4.4ppm付近 のシャープなシグナルと0~10ppmに広がるブロー ドなシグナルが観察された。このシャープなピーク は乾燥によって消失することから、容易に除去が可 能な水分子であると考えられた。一方、フェノール 樹脂を含浸した試料では、調湿過程後(d, e, g)にお いても未処理の試料(a)よりもこの水分子のシグナ ルは弱く、素材の疎水性が大きくなっていると考え られた。また、未調湿試料(f)では水分子のシグナ ルは、乾燥試料同様(b)、ごく小さいものであった。

Relaxation time analysis, Flow molding process, Impregnation process

○にしだまさかず,たなかともこ,みきつねひさ, かなやまこうぞう,かねまつわたる



(e) 20% PhOH 20C_30%_humid (d) 10% PhOH 20C_30%_humid (c) 0% PhOH 20C_30%_humid (b) dried ceder (a) untreated ceder 20 10 0 -10 ppm


図3に示したように、スギの¹³C CP-MAS NMRスペ クトルでは、55ppmにヘミセルロース由来のOCH₃シ グナルが、63~105ppmに糖鎖のシグナルが、110~ 160ppmにリグニンの芳香環のシグナルが観察され た。一方、フェノール樹脂を含浸させた場合には、 150ppm付近にOH末端が結合した炭素のシグナルが、 130ppm付近に反応後のオルト、パラ及びメタ炭素 のシグナルが観察されたが、架橋メチレン炭素の シグナル(30~40ppm)はごく弱いものであった。 糖鎖のシグナル強度は乾燥することで減少するが、 フェノール樹脂が存在する場合(c-g)、調湿の有無 によるシグナル強度の変化はそれほど大きくなく、 調湿における水分子が糖鎖のCP効率に与える影響 は限定的であると考えられた。

続いて、¹³C PST-MAS NMR(図4)では、運動性 の高い部位についての観察に有効である。特に、 OCH₃基のシグナル強度がCP-MASと比較して大きく なっており(a)、ヘミセルロースの運動性が大きい ことがわかった。フェノール樹脂を添加すること により(c-g)、130ppm付近のフェノール炭素のシグ ナルが大きくなるとともにこのOCH₃基のシグナル もさらになっていた。また、調湿により糖鎖のC4 炭素のシグナルは逆に小さくなっていた。

一方、図5に示すように、緩和時間T₁Hは水との 相互作用の影響を受け、乾燥によりT₁Hは大きく増 加する(b)。フェノール樹脂を含浸させることによ ってT₁Hはさらに増加していたが(g)、含浸後の調 湿によりT₁Hは再び減少していた(d, f)。フェノー ル樹脂を添加し、調湿した試料については(d, e, f)、 含浸量、調湿率によるT₁Hの差はほとんど差がなく、 乾燥試料(b)と同等のT₁H値を示していた。固体NMR スペクトルの結果と合わせて考えると、調湿によ る水分子とセルロースとの相互作用はごく小さい ものであると考えられた。

以上の結果から、フェノール樹脂の含浸により、 ヘミセルロースの運動性が増大し、さらに含浸後 に調湿することで、水分子がヘミセルロースへと 浸透していくことが示唆された。今後、これらの 要因が木質素材とフェノール樹脂との相互作用や 流動性に与える影響を調べる予定である。

謝辞:本研究の一部はLIXIL住生活財団の助成金に より行いました。ここに謝意を表します。



¹³C PST-MAS NMR of cedar.



チタン結合性ペプチドのTiO2粒子上におけるNMR構造解析

○鈴木悠¹,芝清隆²,朝倉哲郎^{1,3} ¹農工大院・エ²がん研³分子研

Structure of the Ti Binding Peptide on the Surface of TiO_2 Nano Particles Studied by NMR

○Yu Suzuki¹, Kiyotaka Shiba², Tetsuo Asakura^{1,3}

¹ Dept. of Biotechnology, Tokyo University of Agri. and Tech., Tokyo, Japan.

² Cancer Inst. of JFCR, Tokyo, Japan.

³Institute for Molecular Science, Aichi, Japan

In order to improve the surface of Ti implant, the coating on the surface by silk fibroin is planned. We use hexapeptide, RKLPDA as TiO₂ binding sequence to introduce into silk fibroin and to strengthen the interaction between the Ti surface and silk fibroin. The solution structure of RKLPDA in aqueous solution was determined in the presence of TiO₂ particles using NOE observation. Then the structure of RKLPDA in aqueous solution was examined again with presence of AGSGAG in both sides of the peptide. The solid state structure of AGSG[1-¹³C]AGGRKLPD[3-¹³C]AGGAGSGAG adsorbed on the TiO₂ surface was also studied using ¹³C CP/MAS NMR on the basis of ¹³C conformation-dependent chemical shift.

【緒言】チタンは高強度、生体適合性、耐腐食性に優れ、骨欠損や抜歯窩を補填する インプラント治療を支えている。今後、インプラントと患者の骨との間の一層の固着 を図るためには、インプラント材料の表面を改質することが課題となっている。

そこで我々は、生体適合性が高い構造タンパク質であり、遺伝子組み換えや化学修飾により機能性付与が可能である絹に着目し、チタン結合性を有する配列を導入した 絹をチタンインプラント表面にコートし、骨固着を促進するインプラント材の開発を 進めている。配列として、芝ら¹⁾によって提案された6残基のペプチド配列RKLPDA

(TBP)に着目した。より高いチタン結合能を有する TBP 融合絹フィブロインを設計・作成するためには、TBP がチタン表面とどのように結合するのか、その相互作用 メカニズムを理解することが必要不可欠である。

本研究では、この配列のチタン表面との相互作用メカニズムの解明を目的とし、 酸化チタンナノ粒子が水溶液中で分散した状態において、溶液 NMR を用いて TBP の構造解析を行った。さらに、家蚕絹フィブロインの配列を TBP の両側に配置した ペプチドについて溶液中での構造を検討するとともに、酸化チタン粒子に吸着した状 態での絹配列領域および TBP 領域の構造を、固体 NMR 測定により検討した。

	Table 1 Sequences of Ti Oxide Binding peptides prepared here		
【実験】 Table Tに示す ヘノナドを	TBP	RKLPDA	
Fmoc固相合成法により合成し、	SilkTBP	AGSGAGG RKLPDA GGAGSGAG	
HPLCにて精製した。	labeled-SilkTBP ,	AGSG[1 ^{_13} C]AGG RKLPD[3^{_13}C]A GGAGSGAG	
酸化チタンナノ粒子はDegussa社の	TiO ₂ P25(表面和	漬53 m²/g)を用いた。	
TiO ₂ , peptide, silk fibroin			

○すずきゆう,しばきよたか,あさくらてつお

[溶液NMR測定] TBP 5mg/ml, TiO₂ 1mg/ml を20mMリン酸バッファーに溶解し、 pH7.0に調整した。TiO₂存在下/非存在下において、¹H-¹H TOCSY (mixing time 70 ms), ¹H-¹H NOESY (mixing time 150 ms), ¹H-¹H ROESY(mixing time 250ms)測定を行った。 装置はJEOL ECX400, 4mmプローブを用い、構造計算はCYANAを用いた。 [固体NMR測定] ¹³CラベルSilk-TBPペプチドとTiO₂の混合水溶液を遠心後、沈殿物を 回収、測定試料とした。TiO₂存在下/非存在下で¹³C CP/MAS NMR測定を行った。装置 はBruker Avance400, 4mmプローブを用い、MAS速度8kHzで行った。

【結果・考察】 TBPのみとTBP/TiO₂系 の¹H¹D NMRスペクトルを比較すると、 TiO₂有(TiO2(+))では、無 (TiO2(-))に比 べ、シグナルの線幅がブロードであっ た。このことから、TBPがTiO₂表面と相 互作用し、一部TBPの運動性が低下した と考えられる。

そこで、TiO2表面に結合したTBPの構造を¹H-¹H NOESY測定により検討した。 TiO2の有無によって、TBP のNOESYス ペクトルは著しく異なる。Fig. 1(a)に示 したように、同一測定条件下で、TiO2(-) では交差ピークがほとんど観測されな いのに対し、TiO2(+)では、対角ピーク と同じ正符号の交差ピークが出現した。 さらに、TiO2(+)のNOESYスペクトルに おいて、近距離だけでなく比較的遠距離 のNOEピークが観測された。このことか ら、TiO2とTBP間の相互作用の結果、

TBPが一部、TiO₂表面上で特定の構造を 取っていることが示された。 NOEデー

タ(Fig.1(b))を用いて構造計算を行った結果、Fig.1(c)の溶液構造が得られ、さらに、一部のピークの広幅化を考慮し、Arg 側鎖のグアニジノ基とLys側鎖のアミノ基がTiO2表面のOと 静電的に相互作用している構造モデルを提案できた。

次に、¹³C labeled-SilkTBPをTiO₂上に吸着させた試料の¹³C CP/MAS NMR測定を行った。¹³C安定同位体ラベルを施した TBP配列中のAlaCβピークに着目すると(Fig. 2)、TiO₂吸着有 では無に比ベピークがシャープであり、ある決まった構造を とってTiO₂表面に吸着していることが示唆された。さらに、メインピークの化学シフトがα-helix構造を示すことから、 TBP配列とそれに続く絹結晶部配列(GAGSGAG)の境で、 ねじれた構造の形成が示唆された。

【参考文献】1) Sano K. and Shiba K., J. Am. Chem. Soc.; 125(47) 14234 (2003)



Fig.1 (a) ${}^{1}\text{H}{}^{-1}\text{H}$ NOESY spectra of TBP with TiO₂ (right) and without TiO₂ (left) in 20 mM phosphate buffer in pH 7.0 (b) Number of NOE constraints. white: intra-residue, light gray: inter-residue (R=1), dark gray: inter-residue (R<5) (c) The structure of RKLPDA adsorbed on the surface of TiO₂ nano-particle proposed from NOESY experiment.



Fig.2 Ala C β peaks of ¹³C CP/MAS NMR spectra for ¹³C labeled–SilkTBP (a) and ¹³C labeled–SilkTBP adsorbed on TiO₂ (b).

固体インジウムNMRによる

In-doped ZnO の局所構造解析

 ○大橋 竜太郎¹、川村 祐史¹、宮下 智史¹、井田 朋智¹、 佐藤 渉¹、水野 元博¹、丹所 正孝²、清水 禎²
 ¹金沢大学大学院 自然科学研究科、²物質・材料研究機構

Local structural analysis of In-doped ZnO by solid-state indium NMR

○Ohashi Ryutaro¹, Kawamura Yuuji¹, Miyashita Satoshi¹, Ida Tomonori¹, Sato Wataru¹, Mizuno Motohiro¹, Tansho Masataka², and Shimizu Tadashi².

¹Graduate school of Natural Science and Technology, Kanazawa University.

²National Institute for Materials Science.

In-doped zinc oxide was investigated by solid-state ¹¹⁵In NMR spectroscopy with the two magnetic fields of 21.8 and 11.9 T. The line-shapes of the ¹¹⁵In NMR spectra were analyzed to obtain parameters of quadrupole interaction and chemical shift anisotropy in two chemical sites of indium nuclei in zinc oxide. The obtained parameters of quadrupole interaction were consistent with results of TDPAC methods. Next, density functional theory (DFT) calculation was applied for ¹¹⁵In nuclei doped in zinc oxide to obtain quadrupole interaction of the ¹¹⁵In nuclei. By comparing parameters of quadrupole interaction by the spectral analysis of solid-state NMR with the ones by DFT calculation, we supposed that ¹¹⁵In nuclei doped in zinc oxide have structures of tetrahedral and hexagonal coordination.

【序】酸化亜鉛(ZnO)は、透明伝導性をもつ n 型半導体であり、液晶ディスプレイ等の様々な分野での応用が期待されている。ZnO に不純物をドープした半導体のうち、ZnO 中に In を添加した物質(In-doped ZnO) について、佐藤らにより、摂動角相関法(TDPAC 法)を用いた研究が報告されている[1]。この研究では、粉末X線回折による測定では In-doped ZnO とドープなしの ZnO との差がないにも関わらず、TDPAC 法では ZnO 中の In 周辺が ZnO とは異なる特異的な局所構造の存在を示唆する結果が得られた。そこで本研究では、固体NMRと量子化学計算による In 原子周辺の局所構造解析を行った。

【固体NMR実験】1 at.% In-doped ZnO の粉末試料を 21.8, 11.7 T (¹¹⁵In 203.6, 109.6 MHz)の磁場中で JNM-ECA930 NMR分光器を用いて測定した。 ¹¹⁵In は半整数スピン(I=9/2)であるため、半整数スピンのための四極子エコー法 を用いた[2]。

Indium doped zinc oxide, Local structural analysis, Half integer spin

○おおはしりゅうたろう、かわむらゆうじ、みやしたさとし、いだとものり、 さとうわたる、みずのもとひろ、たんしょまさたか、しみずただし 【NMRスペクトルの線形解析】Fig. 1 の黒線に 21.8 T 及び 11.7 T の磁場で 測定された 1 at%-In-doped ZnO のNMRスペクトルを示す。佐藤らの TDPAC 法を用いた先行研究により、試料中のインジウムのうち、87% (主成分, main site)が $V_{ZZ} = eq = 6.1 \times 10^{21} \text{ V/m}^2$ ($e^2qQ/h = 119 \text{ MHz}$), $\eta = 0.1$ の電場勾配

テンソルを持つことが報告されている[1]。残りの
 13%(副成分, secondary site)の電場勾配はまだ分^{21.81}
 かっていない。この先行研¹⁰⁰⁰
 究の結果に合わせた四極
 子相互作用(電場勾配)と
 化学シフト相互作用の線
 形解析を行い、Fig.1に示した計算スペクトルを得た。

【量子化学計算】ZnO は、Fig. 2(a) に示すようなウルツ鉱型の 結晶構造をとり[3]、Zn 原子は4 配位となる。また、酸化インジウ ム(In₂O₃)が Fig. 2(b) のよ

うな結晶構造をとり、In 原子 は site c, site d と呼ばれる 2 つの 6 配位の構造となる [4]。本研究では、In₂O₃の結 晶構造の 1 部を抜き出した 構造モデル[Fig. 3(a), (b)] 及 び ZnO 中の Zn と In を置換



Fig. 1: Experimental and simulated ¹¹⁵In solid-state NMR spectra of 1 at% In-doped ZnO under magnetic fields of 21.8 and 11.7 T.







(a) site c like
(b) site d like
(c) Zn-In substitute
Fig. 3: Models for DFT calculation similar to site c (a) and site d (b) in In₂O₃, and ¹¹⁵In nuleus substituted by Zn in ZnO (c).

した構造モデルを考え、密度汎関数法(DFT)により電場勾配を計算した。

【結論】¹¹⁵In 固体NMRスペクトルの線形解析と量子化学計算から得られた電 場勾配テンソルの比較から、1 at%-In-doped ZnO の主成分は酸化インジウム の site d 類似構造モデル[Fig. 3(b)]、副成分は Zn-In 置換構造モデル [Fig. 3(c)] に近い構造をとっていることが示唆された。

【参考文献】

- [1] W. Sato, et al., Phys. Rev. B, **78**, 045319 (2008).
- [2] P. R. Bodart, et al., Mol. Phys., 98, 1545 (2000).
- [3] K. Kihara, et al., Canadian Mineralogist, **23**, 647 (1985).
- [4] S. Habenicht, et al., Z. Phys. B, **101**, 187 (1996).

材料開発のための固体NMR活用事例

○新井彩子,西岡大輔,陳海軍,松尾武士,武脇隆彦,小西洋平, 丹那晃央 (株)三菱化学科学技術研究センター

Solid-state NMR applications for material development

○Saiko Arai, Daisuke Nishioka, Haijun Chen, Takeshi Matsuo, Takahiko Takewaki, Youhei Konishi, Akio Tanna

Mitsubishi Chemical Group Science and Technology Research Center, Inc., Kanagawa, Japan.

Solid-state NMR is a powerful tool for material analyses because it gives knowledge of both structural details and dynamics. In this presentation, some solid-state NMR applications for material developments in our company are introduced.

【はじめに】

弊社では無機物・有機物問わず多種多様な材料を開発しており、様々な解析を行っている。その際には得られる情報の質や量のみならず、コストパフォーマンスやスループット性の高さも強く求められるため、固体NMRは他の分析手法に比べて決して有利とは言えない。しかしながら、固体NMRは例えば結晶成分だけでなく非晶質に関する詳細な情報も得られることや、分子運動性に関する考察も出来ることなど、他手法とは一線を画す強力な分析手法と言える。本ポスターでは固体NMRならではの材料解析事例を幾つかご紹介する。

【AQSOA®の構造解析による水蒸気吸脱着耐久性向上因子の解明】

現在、三菱樹脂(株)で低温再生可能なアルミノフォスフェート型ゼオライト吸着材 AQSOA®を販売中であり、ディーゼル車エンジン排ガス中のNO_x還元尿素SCR触媒への応 用を検討中である。実車使用時の環境から、SCR触媒にはNO_x浄化性能と共に水蒸気吸 脱着耐久性が要求される。SCR触媒の結晶性が低下すると水蒸気吸脱着耐久性も悪化 することが見出されていたが、ゼオライトの低結晶性部の詳細な構造を把握すること は困難であった。AQSOA®及び公知法で合成したSAPO-34の固体²⁹Si-NMRスペクトルを Fig. 1に示す。耐久性の良いAQSOA®はQ⁴(4A1)由来のピークのみが観測され、公知法 SAPO-34よりもSi構造が均一であることが確認出来た。これより、Si構造の均一性の 制御が水蒸気の吸脱着耐性向上において特に重要な因子である事が明らかとなった。

Solid-state NMR, Material Analysis, Dynamics

○あらいさいこ、にしおかだいすけ、ちぇんはいじゅん、まつおたけし、たけわきた かひこ、こにしようへい、たんなあきお



このように固体NMRは低結晶性の構造 も観測可能であり、かつ核スピン周り の僅かな構造差を顕著に捉える事が 可能な手法であると言える。

Fig.1 ²⁹Si DD/MAS NMR spectra of (a) AQSOA® and (b) publicly known SAPO-34.

【超高吸水性ゲルの吸水性向上因子の解明】

セルロース系超高吸水性ポリマー(SAP)は衛生材料や土壌改質剤として広く利用さ れており、吸水性能向上に寄与する保水部の構造解析が検討の加速に有用である。今 回、類似の製法にも関わらず吸水性能が異なるSAPを比較した所、乾燥状態では吸水 度による構造差は殆ど見られなかった。Fig.2に重水で膨潤した状態のSAPと乾燥状態 でのSAPの固体¹³C-NMRスペクトルの比較を示す。各種検討の結果、試料を重水で膨潤 して運動性を向上させることで、ピーク分解能を向上させることが出来た。このピー ク分解能の変化は部位毎に異なり、より運動性が高い保水部に相当するピークは運動 性に応じて顕著に先鋭化した。これにより、保水部構造を明確に把握することが出来 るようになった。また、保水部のピークを特に敏感に検出できるようになったため、 Fig.3に示すように吸水度の異なる試料間での構造差を判別可能となった。構造と分 子運動性を同時に考察可能な固体NMRならではの構造解析事例であると思われる。



Water Absorbency Water Absorbency Water Absorbency 200 150 100 50 0 chemical shiftppm

Fig.2 ¹³C MAS NMR spectra of Super Absorbent Polymer (SAP) with (a) wet and (b) dry condition.

Fig.3 ¹³C DD MAS NMR spectra of SAP.

⁶Li/⁷Li 固体 NMR による電極/電解質界面相互作用の研究

○清水俊介¹,村上美和²,竹腰清乃理¹,荒井創²,内本喜晴³,小久見善八² 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 ³京都大学大学院人間環境学研究科

Interfacial interaction at electrode/electrolyte studied by ⁶Li/⁷Li solidstate NMR

○Shunsuke Shimizu¹, Miwa Murakami², Kiyonori Takegoshi¹, Hajime Arai², Yoshiharu Uchimoto³, and Zenpachi Ogumi²

¹Graduate School of Science, Kyoto University.

²Office of Society-Academia Collaboration for Innovation, Kyoto University.

³Graduate School of Human and Environment Studies, Kyoto University.

Lithium manganese dioxide (LiMn₂O₄) 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 ⁷Li NMR [2] experiments have been applied to examine stability of its spinel structure and showed that structural disorder occurs upon storing it in electrolyte solution. In this work, we report in-situ ⁶Li/⁷Li MAS NMR of LiMn₂O₄ with ⁶Li enriched electrolyte to monitor Lithium exchange through the electrode/electrolyte interface.

[序論]

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 放電は電解質溶液から固液界面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おり、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(LiMn₂O₄)が注目されているが、この物質は 電解質との相互作用により構造変化し、充放電サイクル特性が悪くなることが指摘されてい る。本研究では、⁶Liでラベルした電解質を用いたLiMn₂O₄/電解液の固液混合系試料を作 製し、⁶Li/⁷LiのMAS NMR測定を行い、構造変化のin situ観測を行った。さらに一定の浸漬 時間後に固体を取り出して乾燥したものについて、⁶Li/⁷LiMAS NMRで⁶Li⇔⁷Liの固液界面 を介した交換を検討した。

[実験·結果]

アルゴン雰囲気下のグローブボックス中で4 Φ の気密MAS試料管にマンガン酸リチウム (Aldrich社)56.7mg と⁶Liでラベルした電解質溶液41.5mg (LiPF₆-1M/EC:EMC=3:7)を混合 したものを詰め、室温・MAS速度10kHz下で⁶Li/⁷Li-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を電解質溶液に浸し、一定時間経過後にろ 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, あらいはじめ, うちもとよしはる, おぐみぜんぱち 過・乾燥させたものも同様に測定した (MAS回転速度35kHz)。得られた^{6/7}Liス ペクトルをそれぞれFigs. 1&2に示す。

Fig. 1 は気密MAS試料管にマンガン酸 リチウムと電解質溶液を混合した系の ⁶Li-NMRスペクトルの時間変化である。 時間経過とともに0 ppm中心のサイドバン ド化が確認された。これはバルクな磁化 の異方性(BMS)によるものであると考えて いる。また、固体の信号は20hrs程度で変 化し始めているが、混合後1hrでもその強 度は⁶Liの天然存在比のものよりも格段に 大きいことが示唆された。

Fig. 2 はマンガン酸リチウムを一定時 間電解質溶液に浸したのち、ろ過・乾燥 して得られた粉末の⁶Li/⁷Li-NMR スペク トルである。浸した時間が長くなるにつれ、 ⁶Liの信号強度が増大し、⁷Liの信号強度 が減少していっていることがわかる。同様 の変化は混合後の電解質溶液中の ⁶Li/⁷Liの比率の変化からも示された。こ の結果は、マンガン酸リチウムを電解質 溶液に浸すことで、固体中の⁷Liと電解質 溶液中の⁶Liが交換していることを示して いる。また、その交換の時定数は1時間 程度であることが分かった。このLi交換が LiMn₂O₄の安定性に関わっていると考えら れる。



Fig. 1 ⁶Li-NMR spectra of LiMn_2O_4 after immersed in the electrolyte for (a) 1 hour, (b) 20 hours, (c) 40 hours, and (d) 60 hours.



Fig. 2 (a) ⁶Li and (b) ⁷Li-NMR spectra of LiMn_2O_4 dried after immersed in the electrolyte for the designated period.

同様に⁶LiでラベルしたLiClO4の電解質溶

液を用いた系や、正極材として用いられる他の物質を用いた系での実験結果についてはポ スターに示す。

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.;

後藤和馬¹・○伊塚美里¹・新井寿一²・岡田裕実春²・ 武田和行³・石田祐之¹ ¹岡山大院・自然科学 ²ヤマハ発動機 ³京大院・理

In situ solid NMR study for real component lithium ion batteries - Influence of the bulk susceptibility of cathode materials to NMR spectra -

Kazuma Gotoh¹, OMisato Izuka¹, Juichi Arai², Yumika Okada², Kazuyuki Takeda³, Hiroyuki Ishida¹ ¹Graduate School of Natural Science & Technology, Okayama University, Okayama, Japan. ²Yamaha Motor Co., Shizuoka, Japan.

³Division of Chemistry, Graduate School of Science, Kyoto University, Kyoto, Japan.

Understanding the reactions inside a lithium ion battery (LIB) is important to handle it safely and to improve its performance and lifetime. In this paper, we report in-situ ⁷Li NMR of small-sized unmodified cells composed of high-density coated electrodes and a normal liquid electrolyte. The cathode materials tested were LiCoO_2 , LiNiO_2 , $\text{LiNiO}_{44}\text{Co}_{0.33}\text{Mn}_{0.22}\text{O}_2$, and LiMn_2O_4 . By comparing the signals with that measured in a cell assembled with a PET film, it was found that the aluminum layer in the laminate packages did not degrade the spectra. ⁷Li-NMR chemical shifts for Li ion in electrolyte and intercalated into graphite (GIC, LiC_6) were well observed with the cells composed of actual electrodes and components. The chemical shift corresponding to LiC_6 varied with cathode material due to the bulk magnetic susceptibility.

[緒言]

リチウムイオン電池の性能や寿命の改良のためには、電池内部におけるリチウムや 電極物質の状態を把握すること、そして電極における詳細な反応を理解することが欠 かせない。よって、リチウムを電気化学的に導入した電池電極を解体して NMR で観 測することが以前より広く行われている。一方、リチウムイオン電池を NMR プロー ブ中で充放電させながら in situ で Li NMR を測定することにより充放電によるリチ ウムの状態の遷移をより鋭敏に検出できる。近年、炭素負極の解析のために Li 金属 ー炭素ハーフセル¹⁾、または正極材解析のために Li 金属-金属酸化物正極ハーフセ ル^{2),3)}を構築し、これらの in situ 測定による解析を行った結果が報告されてきている。 特にマンガン酸リチウム等の正極では、正極自身の磁化率の影響により、電池が NMR 静磁場となす角度に依存してスペクトルの形状がかわるなどの現象が観測されてい る²⁾。本研究では実際の電池におけるリチウムの挙動を観測しその状態の解析するこ とを目的として、正極にはコバルト酸リチウムやマンガン酸リチウム等の各種金属酸 化物、負極には炭素を用いた実セルについて、 in situ NMR による解析を行った。 [実験]

15 μ m の厚みのアルミ箔上に LiCoO₂, LiNiO₂, LiNi_{0.44}Co_{0.33}Mn_{0.22}O₂, LiMn₂O₄等 を塗工圧縮した正極、および 20 μ m の厚みの銅箔上に人造黒鉛を塗工圧縮した負極 を作製し、市販のリチウムイオン電池と同様の構成にて電池を構成した。正極および 負極につながったアルミ箔、銅箔を外までに引き出して外部接続端子とし、PET フ ィルム、もしくは 80 μ m の厚みのアルミラミネートで密封してシート状セルを作製 した。

in situ ⁷Li NMR は、シート状セルの形状に合うように扁平に巻いた検出用コイル、 および NMR 磁石外の充放電電源に接続されたノイズキャンセリング回路付充放電用 回路を設置した専用プローブを用い、7.0 T の磁場で測定した。飽和 LiCl 水溶液を 0 ppm 標準として用い、シングルパルスまたスピンエコーパルス系列にて測定を行った。 各正極(および黒鉛負極)からなるセルについて、充放電を繰り返しながらスペクト ルの変化を観測した。

[結果と考察]

既存の報告ではNMRパルス電磁波の吸収を低減させるためにメッシュ状の金属箔 を用いた電極が主に使用されているが、本研究においては銅箔およびアルミ箔を用い ても、良好な信号強度を得ることができた。またアルミラミネート外装のセルでも PET のものと比較して大きな信号強度の減衰は観測されず、長期保存や繰り返し充 放電に耐えうる密閉性の高い in situ 測定用セルの作製に成功した。7Li NMR スペク トルにおいては、正極金属酸化物内のリチウムに由来する幅広い信号と負極黒鉛層間 リチウム (LiC_x) に帰属できる信号、電解液や電極表面に存在するリチウムの信号等 が観測された (Fig. 1)。特に LiC_{6~12} リチウムについては、正極の種類によりその ピークのシフト位置が 35~63 ppm の間で通常の 41~44 ppm から大きくずれる現象 を確認した。このずれの大きさは正極がマンガン酸リチウ

ムの際に最も大きく(約63 ppm)、コバルト酸リチウム

等では数 ppm 以内に収まった。 正極と金属リチウムからなるハ ーフセルの in situ 測定において は、マンガン酸リチウムの信号が その磁化率によって大きくシフ トする²⁾。実セルではこの正極の 磁化率の影響が負極にも及び、負 極の信号にも大きな影響を及ぼす ことが明らかとなった。



Fig. 1 ⁷Li static NMR spectra of a $LiMn_2O_4$ /graphite cell (a), and a $LiCoO_2$ /graphite cell (b), using a probe for *in situ* measurement.

2) C.P.Grey et al., Sol. Sta. NMR, 42 (2012) 62-70.

[参考文献]

1) M.Letellier et al., *Carbon*,**61**(2013)140-153.

3) K. Shimoda et al., Electrochim. Acta, 108 (2013) 343-349.

リチウムイオン電池, in situ NMR, 磁化率

ごとうかずま, ○いづかみさと, あらいじゅいち, おかだゆみか, たけだかずゆき, いしだひろゆき

In situ NMR測定によるLiNi_{0.5}Mn_{1.5}0₄電極のリチウムの その場観察 〇下田景士¹,村上美和¹,森島慎¹,荒井創¹,内本喜晴²,小久見善八¹ ¹京大・産官学連携本部 ²京大・人間環境学研究科

In situ NMR measurements of the lithium extraction from $LiNi_{0.5}Mn_{1.5}O_4$ cathode

 \bigcirc Keiji Shimoda¹, Miwa Murakami¹, Makoto Morishima², Hajime Arai¹, Yoshiharu Uchimoto², and Zempachi Ogumi¹

¹Office of Society-Academia Collaboration for Innovation, Kyoto University, Uji, Japan. ²Graduate 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 ⁷Li nuclear magnetic resonance (NMR) measurements during the electrochemical lithium extraction/insertion of LiNi_{0.5}Mn_{1.5}O₄ cathode and examined the lithium de-intercalation mechanism in the operating battery. The ⁷Li 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 LiNi_{0.5}Mn_{1.5}O₄ (mixed with acetylene black and PVDF binder) and a counter electrode of Li foil soaked in 1 M LiPF₆ (EC:EMC=3:7). From the in situ experiments, we successfully observed the very broad signals of lithium ion in the LiNi_{0.5}Mn_{1.5}O₄ cathode, which showed a decrease/increase in intensity according to charge/discharge process.

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。我々は、第51回大会において、電気化学測定を行いながらLiCoO₂正極の in situ ⁷Li NMR測定の結果を報告した。本研究では、常磁性イオンの影響が強く信号 の線幅が広いLiNi_{0.5}Mn_{1.5}O₄を正極材料として、充放電に伴うリチウムの変化について その場観察を行った。

正極活物質にはLiNi_{0.5}Mn_{1.5}0₄粉末(戸田工業)を使用した。対極にはLi箔を使用し、 電解液には1MLiPF₆(EC:EMC=3:7)を用いた。作成したラミネート型電池は10 mm径のコ イル(ワイドボア静止プローブ)にセットされ、14.1 Tの磁場下で充放電測定を行いな がら⁷Li NMR測定を行った。測定にはエコー法を用い、緩和時間0.1 sで20000スキャン

in situ NMR, リチウムイオン電池, LiNi_{0.5}Mn_{1.5}0₄

○しもだけいじ,むらかみみわ,もりしままこと,あらいはじめ,うちもとよしは る,おぐみぜんぱち の積算を行った(一点15分測定)。充放電測定は3.5 Vから5.0 Vまで定電流モード (146.6 mAh/g, C/5レート)で実行し、充電/放電を1.5サイクル繰り返した。

Fig. 1に充放電1サイクルの⁷Liスペクトルを示す。0.3 ppt付近の比較的鋭いピーク はLi負極の信号で、1.5 pptを中心とした0.5 pptから2.5 pptの極めて幅広い信号は 正極活物質であるLiNi_{0.5}Mn_{1.5}0₄の信号である。充電(LiNi_{0.5}Mn_{1.5}0₄からのLiの引き抜き; 上図)によって、LiNi_{0.5}Mn_{1.5}0₄の⁷Li信号強度の減少とピーク位置のシフトが観察され た。一方で、放電過程(Li_{1-x}Ni_{0.5}Mn_{1.5}0₄へのLi挿入;下図)では変化は可逆的であり、 LiNi_{0.5}Mn_{1.5}0₄ピークの強度増加が観察された。これらの結果は最近報告された類似材 料であるLi_{1.05}Mn_{1.92}0₄のin situ ⁷Li NMR測定の結果と整合的である[1]。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。





Fig.1 ⁷Li NMR spectra of LiNi_{0.5}Mn_{1.5}O₄ cathode during a charge/discharge cycle.

²³Na NMRによるナトリウムイオン電池負極の解析

 ○後藤和馬¹,伊塚美里¹,嶋津沙織²,福西美香²,薮内直明², 駒場慎一²,出口健三³,大木忍³,清水禎³,武田和行⁴,石田祐之¹
 ¹岡山大院・自然科学
 ²東京理科大・理
 ³物材機構
 ⁴京大院・理

Analysis of negative electrode in sodium ion batteries using ²³Na NMR

Kazuma Gotoh¹, Misato Izuka¹, Saori Shimadzu², Mika Fukunishi², Naoaki Yabuuchi², Shinichi Komaba², Kenzo Deguchi³, Shinobu Ohki³, Tadashi Shimizu³, Kazuyuki Takeda⁴, Hiroyuki Ishida¹

¹Graduate School of Natural Science & Technology, Okayama University, Okayama, Japan.

²Department of Applied Chemistry, Tokyo University of Science, Tokyo, Japan.

³National Institute for Materials Science, Tsukuba, Ibaraki 305-0003, Japan.

⁴Division of Chemistry, Graduate School of Science, Kyoto University, Kyoto, Japan.

The state of sodium inserted in hard carbon electrode of sodium ion battery having practical cyclability was investigated using solid state ²³Na MAS/MQMAS NMR. The peaks in Na MAS spectra of Na-doped hard carbon created from sucrose precursor shifted from the result of our previous spectra, which had been taken for hard carbon produced petroleum pitch. The ²³Na MQMAS spectrum of a hard carbon sample heated at 1100 degrees showed three distinct sites, whereas another peak was found for hard carbon heated at 1600 degrees. ²³Na MAS spectra of some Sn anode samples for Na ion battery will be also shown in the presentation.

[緒言]

ナトリウムイオン電池は、資源の観点からリチウムイオン電池に替わる新しい蓄電 デバイスとして注目されており、その実用化に向けて近年急速に研究が発展してきて いる。我々は負極にハードカーボン (難黒鉛化性炭素)を用い、適切な電解液およ び添加物を組み合わせることで、十分な繰り返し充放電性を持つナトリウムイオン電 池を作製し、報告した¹⁾。また、このハードカーボン負極内に存在するナトリウムに ついて、固体²³Na NMR により調べて報告している²⁾。MAS NMR 測定からハード カーボン内部の層間の隙間 (void between misaligned graphene sheets) に存在する ナトリウムと空隙 (closed pores) に吸蔵されたナトリウムに帰属できる複数の信号 を確認したが、ハードカーボンに吸蔵されたリチウムで観測されるような半金属クラ スターはナトリウムでは観測されていない。このように、ナトリウムイオン電池での ナトリウムの挙動はリチウムイオン電池のリチウムとかなり充放電挙動が異なるこ とが明らかにされてきている。本研究では、ハードカーボン内のナトリウムの環境を より詳細に明らかにするため、各種焼成温度の異なるハードカーボンを作製し、電気 化学的にナトリウムを導入して MAS NMR および MQMAS NMR 測定を行った。ま た、金属スズを負極とするナトリウムイオン電池についてもとりあげ、この電池のス ズ負極についても ²³Na 核の NMR 測定を行った。 [実験]

スクロースを 180°C で脱水した前駆体をアルゴン雰囲気下で 1100, 1300, 1500, 1600°C で熱処理することでハードカーボンを合成した。合成した炭素と PVdF を 9:1 (重量比) の割合で混合し、電極を作製した。対極には Na 金属を、電解液には 1 mol dm⁻³ NaClO₄ / プロピレンカーボネート (PC) に添加剤としてフルオロエチレンカーボネート (FEC) を 2 % 加えたものを使用し、コインセルを作製した。セルを目的の容量まで充電し、アルゴン雰囲気下で解体して電極物質を取り出し、MAS 用サ

ンプルローターに密閉した。

NMR 測定に 11.7 T マグネットを用いた装置により行った。1M NaCl 水溶液を標 準として用いた。MQMAS 測定には 3QMAS パルス系列を用いた。 [結果と考察]

Fig. 1 に、満充電状態までナトリウムを導入したハードカーボンサンプル(1100℃ 焼成)の MQMAS スペクトルを示す。Y 軸方向に投影した通常の MAS スペクトル (Fig. 1 上部)では、層間または内部細孔のナトリウムに帰属できる3種のピークが 観測されたが、既報のスペクトルとピーク位置には少しずれがみられ、ハードカーボ ンサンプルの種類により、スペクトル形状が異なることが明らかとなった。また MQMAS 測定の結果、通常の MAS 測定では観測されていなかった合計3つ(もしく は4つ)の異なる成分の存在が確認された。さらに 1600℃焼成ハードカーボンにつ いての MQMAS 測定を行ったところ、等方スペクトルの28 ppm 付近に新たな信号 成分が現れることが確認された。リチウムイオン電池では 1100~1300℃程度で焼成 されたハードカーボンが最も高い容量を示すが、ナトリウムイオン電池ではより高温

で焼成されたハードカーボンでも高い容 量を示すことが明らかにされている。本 研究で得られた高温焼成炭素での新たな ピークが、高容量化に寄与するナトリウ ム吸蔵サイトである可能性が考えられる。

スズ負極について MAS 測定を行った ところ、ナトリウムの吸蔵量が増えるに 従って数多くのピークが観測された。こ のことから、ナトリウムは電極内に不均 一に分布しており、局所的に異なる様々 な組成(NaSnx)が存在していることが示 唆された。当日に詳細を報告する。



Fig. 1 ²³Na MQMAS spectrum of Na-doped hard carbon heated at 1100°C.

[参考文献]

S. Komaba, K. Gotoh et al., Adv. Funct. Mater., 21, 3859 (2011).
 K. Gotoh, S. Komaba, H. Ishida et al., J. Power Sources, 225, 137-140 (2013).

ナトリウムイオン電池, ハードカーボン, スズ

○ごとうかずま,いづかみさと,しまづさおり,ふくにしみか,やぶうちなおあき, こまばしんいち,おおきしのぶ,でぐちけんぞう,しみずただし,たけだかずゆき, いしだひろゆき

¹Hおよび²H固体NMRによるEDLC電極中おける水系電解質の細孔 内吸着挙動解析 金 泰坤¹,0出田 圭子¹, 宮脇 仁^{1,2}, 持田 勲³, 尹 聖昊^{1,2} ¹九大・先導研,²九大・総理工,³九大・炭素センター

Adsorption behaviors of aqueous electrolytes in pores of EDLC electrode analyzed by ¹H and ²H solid-state NMR

Taegon Kim¹, °Keiko Ideta¹, Jin Miyawaki^{1, 2}, Isao Mochida³, and Seong-Ho Yoon^{1, 2}

¹ Institute for Material Chemistry and Engineering, Kyushu University, Fukuoka, Japan.

² Interdisciplinary Graduate School of Engineering Sciences, Kyushu University, Fukuoka, Japan.

³ Research and Education Center of Carbon Resources, Kyushu University, Fukuoka, Japan.

Electric double layer capacitors (EDLC) are in high demand as high-power electric storage devices, such as an assist battery for electric vehicles. We have previously found that activated carbon fibers (ACFs) having comparable surface area and pore size, but different surface properties showed remarkably different capacitance. To clarify the reason of the different capacitance, we have applied ²H solid-state NMR technique for aqueous EDLC systems due to an easiness of the measurement, but could not obtain full information about adsorption behaviors of electrolyte ions in pores of carbon materials. In this study, we tried to apply ¹H and ²H solid-state NMR techniques in parallel to investigate adsorption states of aqueous electrolyte ions (H_3O^+ or D_3O^+) in detail. Furthermore, influence of surface functionalities on the adsorption states of the ions in the pores was also studied.

【序論】

電気二重層キャパシタ(EDLC)は電気自動車のアシスト電源など、高出力蓄電デ バイスとして高い需要がある。当研究室でこれまでに表面積や細孔径が異なるあるい は表面構造に差がある活性炭素繊維(ACF)を活物質に用いて検討を行ったところ、 細孔構造が同じであっても表面の違いによってキャパシタンスの発現が大きく異な ることが見出された。しかしその違いが何に由来するかは未だ明らかになっていない。 NMRはACF表面と電解質イオンの相互作用を直接観測できる優れた分析手法であ

NMRはACF表面と電解員イオンの相互作用を直接観測できる優れた分析手伝である。これまで我々は、水系電解液を用いるEDLCでは測定の簡便さから²Hを対象として検討を行ってきたが、観測できない信号が存在し十分でないことがわかってきた。

そこで本研究では、充電前後の電極において水系電解質(H₂SO₄もしくはD₂SO₄) の吸着状態がどのように変化するかを、¹Hおよび²H固体NMRを併用することで詳細 に検討した。また、官能基の影響を詳細に調べるため、表面積とポアサイズが同じで ありながら、官能基量の異なる試料を用いて比較検討した。

電気二重層キャパシタ,¹H 固体NMR きむてごん,oいでたけいこ,みやわきじん,もちだいさお,ゆんそんほ 【実験】

ピッチ系 ACF (OG5A および OG10A, 大阪 ガス(株)) と窒素を含むポリアクリロニトリ ル系 ACF (FE100 および FE300, 東邦テナッ クス(株)) を活物質、ケッチェンブラックを 導電材、ポリテトラフルオロエチレン (PTFE) をバインダーとし、それぞれ8:1: 1 の割合で混練し電極を作成した。作成した 電極に無機電解質溶液 (30%H₂SO₄ 水溶液ま たは D₂SO₄ 重水溶液) を含浸させてコイン セルを作成した。電解質溶液の含浸のみおよ び充電後の正負両極について JEOL ECX400 を用いて¹H および²H 固体 NMR 測定を行 い、スペクトルと緩和時間から電解質イオン の状態を調べた。¹H はバックグラウンドのノ イズを減らすため、エコー法を用いた。



Fig. 1 ¹H solid-state NMR spectra of EDLC electrode only, and anodes at impregnated and charged states.

【結果と考察】

EDLCのキャパシタンスは表面積が大きい方が高くなった。例えば、比表面積650 m²/gのOG5Aのキャパシタンスが0.6 F/gであったのに対し、1200 m²/gのOG10Aは138.8 F/gもの容量を示した。Fig. 1に、充電前(IMP)と充電後の負極(CM)のスペクトルの1例を示す。いずれの活物質においても、ACFからの信号(-1~-2 ppm)、硫酸水溶液とほぼ同じ化学シフトの信号(free,約7 ppm)に加え、これらの中間に吸着イオンの信号(adsorbed)が検出された。これらの信号について縦緩和時間T₁をTable 1に示す。²Hは充電後の方がT₁が短く、¹Hは充電後の方が長いという結果となった。これまでの研究から、²HにおけるT₁短縮は強い吸着による四極子緩和の効果であると考えられる。一方、¹HにおいてT₁が長くなったのは、充電により電解質イオンがACF表面に引き寄せられ、分子運動が制限されたice-likeの状態であることを示唆している。

室系目記基を大重に含有するFE 系のサンプルに至っては全く検 出できなかった。

ポスター発表においては、 OG5AやOG10Aと表面積や細孔 径が同じFE100およびFE300を用 いて両者のキャパシタンスと NMRスペクトルを比較検討した 結果を紹介する。

Table 1. T	relaxation	times	of electrol	vte ions ((sec)
					· · · ·

		OG5A		OG10A	
		IMP	СМ	IMP	СМ
$^{1}\mathrm{H}$	adsorbed	0.085	0.131	0.144	0.420
$^{1}\mathrm{H}$	free	0.027	0.107	0.075	0.398
² H	adsorbed	0.187	0.150	0.253	0.188
² H	free	0.532	0.381	0.340	0.303

【参考文献】

齋藤正規ほか、「多核固体NMRを用いた電気二重層キャパシタにおける電解質イオン挙動の解析」第47回NMR討論会講演要旨集

マロン酸イミダゾリウム結晶の局所構造と分子運動

○千頭和 瑞貴¹、海山 剛史¹、大橋 竜太郎¹、井田 朋智¹、 水野 元博¹、丹所 正孝²、清水 禎² ¹金沢大院自然,²物質・材料研究機構

Local Structure and Molecular Motions in Imidazolium Malonate Crystal

○Mizuki Chizuwa¹, Tsuyoshi Umiyama¹, Ryutaro Ohasi¹, Tomonori Ida¹, Motohiro Mizuno¹, Masataka Tansho², Tadashi Shimizu²

¹Graduate School of Natural Science & Technology, Kanazawa Univ., ²NIMS

Imidazolium salt of dicarboxylic acids is known to show high proton conductivity. Imidazole and dicarboxylic acid are connected by the hydrogen bond and form a two-dimensional network. Although the proton conduction is considered to take place through this hydrogen bond network, the detailed mechanism has not been clarified.

Imidazolium malonate only has the disordering imidazole ring in these salts, and the ratio of order imidazole to disorder one is 2 to 1. In this study, we analyzed the local structure and molecular motion in imidazolium malonate using solid-state ²H, ¹³C NMR in order to elucidate the mechanism of proton conduction.

【序】 ジカルボン酸イミダゾリウムは、結晶 でありながら比較的高いプロトン伝導性を示 すことが知られている^[1]。これらの結晶では、 イミダゾールとジカルボン酸が水素結合でつ ながり、二次元のネットワークを形成しており、 この水素結合ネットワークを介してプロトン 伝導が起こっていると考えられるが、詳細なメ カニズムは分かっていない。Fig.1 にマロン酸 イミダゾリウムの結晶構造を示す。ジカルボン 酸イミダゾリウム結晶のうち、マロン酸イミダ



Fig. 1 Crystal structure of imidazolium malonate^[1]

ゾリウム結晶のみにイミダゾールのディスオーダーが観測されており、オーダー状態 のイミダゾールとディスオーダー状態のイミダゾールの存在比は 2:1 である。本研究 では、固体 NMR を用いてマロン酸イミダゾリウムの局所構造と分子運動について調 べ、高プロトン伝導のメカニズムを考察した。

【実験】固体¹³C NMR は JEOL ECA-500 分光器を用い、共鳴周波数は¹³C:125.764 MHz、 ¹H:500.157MHz とした。²H NMR はイミダゾールの炭素と結合した水素が重水素化さ れた試料を調製し、JEOL ECA-300 分光器を用い、共鳴周波数は 45.282 MHz とした。 スペクトルの測定は Quadrupolar Carr-Purcell-Meiboom-Gill (QCPMG) 法を用いた。

プロトン伝導、QCPMG、分子運動

○ちずわみずき, 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,たんしょまさたか,しみずただし 【結果・考察】Fig. 2 に 300 K でのマロン酸イミダゾリウムのイミダゾール部分の¹³C NMR スペクトルを示す。シミュレーション a,b の 2 種類のローレンツ線形を強度比 2:1 で足し合わせることによって、イミダゾール部分のスペクトルをよく再現することができた(Fig. 2)。a と b の強度比がオーダー状態のイミダゾールとディスオーダー状態のイミダゾールの存在比と一致することから、a がディスオーダー構造のイミダ ゾール、b がオーダー構造のイミダゾールに対応すると考えられる。



Fig.3 にイミダゾール部分の¹³C NMR スペクトルの温度変化を示す。温度が上昇するにつれてピーク全体がブロードになっており、高温ではイミダゾールの分子運動が激しくなっていることが示唆される。スペクトル全体の線幅が一様に変化しているため、¹³C NMR ではオーダー、ディスオーダー間における運動の差は見られない。

Fig. 4 に²H QCPMG NMR スペクトルの温度変化を示す。各温度に対してイミダゾ ールの擬 5 回軸周りの小角回転運動(Fig.5)を取り入れたシミュレーションで、0 kHz 以外の強度と線幅が合うようにスペクトル解析を行った。シミュレーションの結果、 振動の角度は*θ* = 6°、運動の速さは 10⁷~10⁸ Hz であることが分かった(Fig.4(b),(c))。 スペクトルが1種類のイミダゾールの分子運動で再現できたことから、結晶中の2種 類のイミダゾールの運動に大きな違いはないことが分かる。



【参考文献】

- K. Pogorzelec-Glaser, J. Garbarczyk, Cz. Pawlaczyk, E. Markiewicz, *Mat. Sci. Pol.*, 24, 245 (2006)
- [2] Samantha K. Callear and Michael B. Hursthouse, *Crystal Structure Report Archive*, National Crystallography Service, Univercity of Southampton, 2008, DOI: 10.3737/ecrystals.chem.soton.ac.uk/610

固体NMRによるPVPA-イミダゾール複合体のイミダゾール のダイナミクスとプロトン伝導性の解析

〇岩崎彩乃,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

Analysis of dynamics of imidazole and proton conductivity in PVPA – imidazole aggregate by solid-state NMR

OAyano Iwasaki, Tsuyoshi Umiyama, Ryutaro Ohashi, Tomonori Ida, and Motohiro Mizuno Graduate School of Natural Science and Technology, Kanazawa University, Ishikawa, Japan.

PVPA x Im, which takes imidazole (Im) in poly(vinylphosphonic acid) (PVPA), has high proton conductivity, where x is the number of moles of Im per moles of polymer repeat unit. It's assumed that Grotthuss mechanism associated with molecular motion of Im is effective as its proton conductive mechanism. However, details on molecular motion have yet to be revealed. In the present study, we analyzed frequencies and modes of molecular motion of Im in PVPA x Im using solid-state deuterium NMR. The relation between its molecular motion and proton conductivity is discussed.

【序論】

イミダゾール (Im) を有する様々な高プロトン伝導物質 の1つとしてポリビニルホスホン酸 (PVPA) 中にImを取り 込んだ物質であるPVPA x Im (Fig. 1) が挙げられる (こ こでxは高分子の繰り返しユニットに対するImのモル比を 表している)。PVPA x Imでは、xが大きくなるにつれ電 気伝導度が上昇し、x = 2では、400 Kで約5×10⁻³ S cm⁻¹ の電気伝導度を示すことが報告されている。

PVPA x Imのプロトン伝導メカニズムとして、Imが関与した水素結合を介してプロトン移動が起こり、続いてImの分子運動により水素結合の再配列が起こるというGrotthuss機構が考えられている。しかしながら、PVPA x Im



Fig.1 PVPA x Im

中におけるIm分子のどのような運動がプロトン伝導に関与しているかは解明されていない。

そこで本研究では、固体²H NMRを用いてPVPA x Im中のImの分子運動のモードや速 さを解析し、Imの分子運動とプロトン伝導の関係を考察した。

【実験】

試料は、炭素に結合した水素のみを重水素化した $Im-d_3$ および窒素に結合した水素のみを重水素化した $Im-d_1$ を用い、x = 2としてPVPA 2 Imを調整した。なお、 $Im-d_1$ の試料についてはPVPAも重水で再結晶し重水素化処理をしている。²H NMRの測定には分光器JEOL ECA-300を用いて共鳴周波数45.282 MHzで行った。²H NMRスペクトルの測定には四極子エコー法(QE)を用いた。

Imidazole, Proton conductivity

○いわさきあやの, 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

【結果・考察】

Fig. 2にPVPA 2 Im-dおよびPVPA 2 Im-dの²H NMRスペクトルの温度変化を示す。温 度上昇に伴い、0 kHz付近のシャープな成分の強度が増大した。反転回復法による磁 化の回復を測定したところ、PVPA 2 Im-d ではブロードな成分とシャープな成分が一 様に回復しているのに対し、PVPA 2 Im-dではシャープな成分が先に回復し、ブロー ドな成分がその後に回復した。これよりPVPA 2 Im-dのスペクトルは単一の成分であ るが、PVPA 2 Im-d₁のスペクトルはいくつかの成分が重なっていることが分かった。

次に、重水で再結晶し重水素化処理を行ったPVPAについての170 Kにおける²H NMR スペクトルをFig.3に示す。PVPAの磁化の回復はPVPA2Im-dと同様の傾向が見られた ため、ブロードな成分とシャープな成分の重ね合わせとしてスペクトルシミュレーシ ョンを行った。また、PVPA 2 Im-dのスペクトルシミュレーションより、Im分子はPVPA 2 Im中で等方回転運動をしており、温度上昇に伴いその凍さが大きくなっていくこと がわかっている。

PVPAおよびPVPA 2 Im-dの結果をもとに、PVPA 2 Im-dのスペクトルはシャープな 成分(1)とPVPA由来の160 kHz程度のe²aQ/hを持つ成分(2)とIm由来の成分(3)の足し合 わせであるとして解析を行った。Fig. 4に294 Kにおけるシミュレーション結果を示す。 これより、成分(2)の $e^2 qQ/h$ と η はそれぞれ160 kHz、0.1、成分(3)の $e^2 qQ/h$ と η はそ れぞれ120 kHz、0と求められた。各温度の成分(3)にはPVPA 2 Im-dのシミュレーショ ンより得た等方回転運動の速度k_{nt}を用いている。

次に成分(1)(2)(3)の存在比の温度変化をFig.5に示す。Im由来の成分(3)の存在比 は236 Kにおけるシミュレーションにて決定した。これより温度上昇に伴い、成分(1) の存在比は増加し成分(2)の存在比は減少することがわかった。





Fig.5 Temperature dependence of abundance ratio of spectral component (1) (∇) , (2) (\bullet) and (3) (\diamondsuit)



Fig.4 Experimental (solid) and simulated (dot) ²H QE NMR spectra of PVPA 2 Im-d₁ at 294 K (3) $k_{\rm rot} = 3.7 \times 10^3 \, \text{Hz}$





分子性ナノ多孔質結晶に閉じ込められたガスハイドレート 〇須賀亮太,鈴木 陽,齋藤一輝,磯田恭佑,田所 誠 東京理科大学 理学部化学科

Characterization of Artificial Gas Hydrate Confined to Molecular Nanoporous Crystal ORyota Suka, Suzuki You, Kazuki Saitou, Kyosuke Isoda, and Makoto Tadokoro *Faculty of Science, Department of Chemistry, Tokyo University of Science, Tokyo, Japan.*

Gas-Hydrates clathrating gases like CH₄ are stabilized in natural under high pressure (50 atm) and at low temperature (277 K) conditions, which is like a bottom of sea. While, there were many studies for Xe-Hydrate because it was stabilized under mild condition at 263 K (1 atom) in Gas-Hydrates. Therefore, in order to prepare an artificial Xe-Hydrate, we have prepared a nanoporous molecular crystal $\{\{[Ru^{III}(H_2bim)_3](TMA)\}_2(H_2O)_{30}(THF)_3\}_n$ (<u>1</u>) with 1-D nano-channels filled with water molecular clusters clathrating THF molecules. This time, with excluding THF molecules from <u>1</u>, it was confirmed that the Xe gases included to crystal <u>1</u> by measuring the solid-state ¹²⁹Xe NMR.

【緒言】Xe-Hydrate は、氷の多形である Clathrate Hydrate の一種であり、 small cage (5¹² cage) と large cage (5¹²6² cage) の2種類の 多面体水クラスターから つくられた I 型構造をとる。この Xe-Hydrate は、Xe ガスを水面に接したまま、263 K (1 atm)で生成するこ とが可能であり、CH₄やH₂などの Gas Hydrate (GH) と比較して常圧で安定であり、つくりやすい利点が ある。また、Xe-Hydrate は固体の ¹²⁹Xe-NMR (I_{xe} = 1/2) によるスペクトルの検出が容易であり、small cage で は 238 ppm、large cage では 142 ppm にそれぞれピー



Fig. 1 Crystal Structure of 1

クが観測される。^{III} そこで、私たちは従来から研究してきた分子性一次元ナノ多孔質結 晶のチャネル内に安定化された巨大なチューブ状の水ナノクラスター(WNT: water nanotube) に Xe ガスを取り込ませ、人工的な Xe-Hydrate の生成を目的にあげた。この はじめの{{ $[Ru^{III}(H_2bim)_3](TMA)}_2(H_2O)_{30}(THF)_3}_n$ (1)結晶は、 $[Ru^{III}(H_2bim)_3]^{3+}$ (H₂bim = 2,2'-biimidazole) と TMA³⁻ (trimesate) を、H₂O と THF の混合水溶液中で自己組織化して 得られる。(Fig. 1)^{I2I}結晶 1 で安定化された WNT の X 線結晶構造解析による結晶構造 を Fig. 2 に示す。X 線構造解析ではプロトンの位置を直接同定できないため、この WNT の構造は水分子の O…O 間の水素結合距離を結んでいる。この1 つの WNT 単位空孔内に は 3 分子の THF が挿入されており、Xe ガスの挿入にはこの THF 分子のみを湿度の制御 によって取り除いた結晶を用いた。

 【方法】結晶 1 は、[Ru^{III}(H₂bim)₃](NO₃)₃ と K₃TMA を、H₂O/THF = 8/2 の混合水溶液中でゆっくりと拡散させることによって、青緑 色の六角柱状晶として得られる。この結晶 1 を湿度 50 %RH の空 気中で 1 時間風乾処理することで、WNT内部に包接されたTHF分 子を完全に除去した結晶 1'得られることを見いだした。この結晶 1'へ次のようにして Xe ガスの包接を試みた。直径が 4 mm の硬 質ガラスのサンプル管に結晶 1'を 15 mg 前後入れて液体窒素で 凍らせた。この状態のまま、一度サンプル管内を真空に引き、Xe ガスを流し込んだ。液体窒素で冷却しているため、Xe ガスは固体 の Xe になり、ガスバーナーで管を焼き切ることで、十数気圧の Xe ガスに満たされたサンプル管を得た。サンプル管内の圧力は、Xe ガ ス自身のガス圧でNMRピークがシフトするため、管内に存在する



Fig. 2 Structure of Water Nanotube

Xe ガス圧によって標準化した。液体窒素から出したサンプル管は 253 K (24時間)でア ニーリングし、目的とする Xe が包接された結晶 <u>2</u>を得た。固体NMRの測定には CMX300を用い、スペクトルの測定には single pulse 法、スピン-格子緩和時間 (T_1)の 測定には反転回復法を用いた。¹²⁹Xe-NMRの共鳴周波数は83.10 MHzを用いた。

【結果と考察】 Fig. 3に Xe が包接された結晶 <u>2</u> の263 Kにおける¹²⁹Xe-NMRスペクトルを示 す。12.8 ppm にはバルクの Xe ガス由来のピー クが観測された。(サンプル管内の圧力 ~30 atm) また、242 ppm にバルクの Xe ガスとは異なる ピークが観測された。このシフト値は、 Xe-Hydrate の small cage (5¹²) で観測される 238 ppm に近い。これはWNTの比較的狭い空間 内に Xe 原子が取り込まれていることを示唆 している。また、242 ppm のピークの T_1 は、 263 Kで 128 ms と、バルクの Xe-Hydrateのも の (5000 s at 234 K)^[4] と比較すると非常に短い 値を示した。これは、Xeガスを入れた多孔質骨





格に由来する Ru^{III} (S = 1/2)の常磁性による影響を受けている可能性がある。従って、今回観測された 242 ppmのピークは、結晶 2 のWNT内部に包接された Xe のピークであると結論づけた。

[References]

[1] H. Nakayama, D. D. Klug, C. I. Ratcliffe, J. A. Ripmeester, Chem. Eur. J., 9, 2969 - 2973, (2003)

[2] M. Tadokoro, C. Iida, T. Saitoh, T. Suda, Y. Miyazato, Chem. Lett., 39, 186 - 187, (2010).

[3] M. Tadokoro, C. Iida, Y. Shimazaki, K. Isoda, Y. Suzuki, T. Sugaya, Y. Kumagai, M. Mizuno, *RSC Adv.*, **2**, 12101-12104, (2012).

[4] I. L. Moudrakovski, A. A. Sanchez, C. I. Ratcliffe, J. A. Ripmeester, J. Phys. Chem. B, 105, 12338-12347 (2001)

固体NMRによるメソポーラスシリカSBA-16に取り込まれたNaCl水溶液の状態解析

○宮東達也¹, 佐々波康一¹, 大橋竜太郎¹, 井田朋智¹, 水野元博¹, 橘高茂治² ¹金沢大院・自然 ²岡山理大・理

Analysis of NaCl Aqueous Solution Confined to Mesoporous Silica SBA-16 by Using Solid-state NMR

°Tatsuya Miyatou¹, Kouichi Sazanami¹, Ryutaro Ohashi¹, Tomonori Ida¹, Motohiro Mizuno¹, Shigeharu Kittaka²

¹Graduate School of Natural Science and Technology, Kanazawa University, Japan. ²Faculty of Science, Okayama University of Science, Japan.

The concentration-temperature phase diagram of NaCl-water mixture is well-known. Mobility of water molecule in NaCl-water mixture increase at low temperature than that of pure water because of Na⁺ ion-water and Cl⁻ ion-water interaction. Freeze point of Water in Mesoporous silica SBA-16 is very low because of confinement effect. In this work, dynamics of water in NaCl aqueous solution in SBA-16 was investigated by ²H NMR. Those water dynamics is affected by both NaCl-water interaction and confinement effect.

【序】

Fig.1 にメソポーラスシリカ SBA-16 の構造を示す[1]。 SBA-16 は直径数 nm 程度の球形のメソ細孔が 3 次元に架橋し た構造を持つ。またそれに加えて球の表面にコロナ状にミク ロ細孔が分布していることが知られている。過冷却状態で水 は高密度液体(HDL)-低密度液体(LDL)の2 相に相分離し、また 220 K、100 MPa 付近に液-液臨界点が存在することが計算機シ ミュレーションなどから示唆されている[2]。メソポーラス

シリカ内の水は閉じ込め効果やシリカ界面との相互作用の



Fig. 1 Structure of SBA-16[1].

ために結晶化が抑制される。そのため、HDL や LDL の存在や HDL-LDL 転移につい て明らかにするために細孔内の水のダイナミクスや構造がこれまで研究されてきた。 近年、過冷却状態の NaCl 水溶液の水の液体構造やダイナミクスの変化が計算機シ ミュレーションにより調べられ、塩の添加により LDL 構造の不安定化が起こること が示された[3]。しかし、水和による水の構造やダイナミクスの変化と水の HDL-LDL 転移との関係はいまだ明らかでない。そこで本研究では NaCl 水溶液を SBA-16 内に 取り込ませることで結晶化を抑制し、低温での水分子の状態を固体 ²H NMR 法を用い て解析した。

メソポーラスシリカ, NaCl 水溶液,²H NMR

○みやとうたつや, さざなみこういち, おおはしりゅうたろう, いだとものり, みずのもとひろ, きったかしげはる

【実験】

SBA-16の合成条件は文献[4]に示された。球形の細孔の直径が7.8 nm である SBA-16 を用い、濃度 0~4 M の NaCl 重水溶液を SBA-16 と共存させ、脱気し細孔内へ水溶液 を導入したものを測定試料とした。²H NMR の測定は JEOL ECA-300 を用い、共鳴周 波数 45.282 MHz で行った。スペクトルの測定には四極子エコー法を用いた。測定の 繰り返し時間は 0.5 s とし、*T*₁の長い成分を取り除くことで液体状態の水のみを取り 出して観測した。各温度における NMR の信号強度は Curie 則に従い補正した。

【結果と考察】

SBA-16 に取り込まれた NaCl 重 水溶液中の液体状態の水について ²H NMR の信号強度の温度変化を 測定した。Fig.2 に降温過程、Fig. 3 に昇温過程の結果をそれぞれ示 す。信号強度は降温過程 238 K で の信号強度を1に規格化した。図 中の実線は DSC により観測され た球形のメソ細孔内の NaCl 重水 溶液の凝固点及び融点を表す。

濃度0 Mの試料では235 K付近 で球形のメソ細孔内の重水の凍結 が観測された。一方コロナ状のミ クロ細孔内の水分子は200 K付近 で徐々に運動が凍結した。0 M 試 料の信号強度から球形のメソ細孔 内の水とコロナ状のミクロ細孔内 の水の存在割合を求めた。これを 図中に破線で示した。塩濃度4 M の試料では球内の水分子は190 K 付近で運動が凍結することが分か った。またコロナ状のミクロ細孔 内の水分子もまた同じく190 K付 近で運動が凍結することが分かっ た。



Fig. 2 Temperature dependence of ²H NMR signal intensity of liquid component of NaCl aqueous solution in SBA-16. The measurements was carried out at decreasing temperature.



Fig. 3 Temperature dependence of ²H NMR signal intensity of liquid component of NaCl aqueous solution in SBA-16. The measurements was carried out at increasing temperature.

【参考文献】

[1] Y. Sakamoto, M. Kaneda, O. Terasaki, D. Y. Zhao, J. M. Kim, G. Stucky, H. J. Shin, and R. Ryoo, *Nature* **408**, 449(2000).

[2] P. H. Poole, F. Sciortino, U. Essmann, and H. E. Stanley, Nature 360, 324(1992).

[3] D. Corradini, M. Rovere, and P. Gallo, J. Phys. Chem. B 115, 1461(2011).

[4] S. Kittaka, Y. Ueda, F. Fujisaki, T. Iiyama, and T. Yamaguchi, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 13, 17222(2011).

分子性ナノ多孔質結晶内で安定化された包接水和物の ダイナミクス

○鈴木 陽¹・須賀 亮太¹・杉尾 友理恵¹・中村 瑛梨子¹・
 磯田 恭佑¹・熊谷 翼秀²・水野 元博²・田所 誠¹
 ¹東理大 理、²金沢大院 自然

Dynamics of clathrate hydrate stabilized with nanoporous molecular crystal OYou Suzuki¹, Ryota Suka¹, Yurie Sugio¹, Eriko Nakamura¹, Kyosuke Isoda¹, Yoshihide Kumagai², Motohiro Mizuno², Makoto Tadokoro¹

¹ Faculty of Science, Department of Chemistry, Tokyo University of Science, Tokyo, Japan ²Graduate School of Science & Technology, Kanazawa University, Kanazawa, Japan

Clathrate hydrate (CH) is one of inclusion compounds formed from water molecules, and trapped guest molecules in the building pores. In order to create an artificial CH, we have already prepared a nano-porous $\{[Ru^{III}(H_2bim)_3(TMA)]_2 \cdot 3THF \cdot 30H_2O\}_n$ (1) crystal with 1-D nanometer scale channel frameworks included to WNT (water nanotube) clusters containing THF molecules. Furthermore, by excluding THF molecules from crystal 1, some solvent molecules such as MeOH, EtOH, acetone, 1,4-dioxane, *n*-hexane and *cyclo*-hexane can be also clathrated to WNT to give . These obtained single crystals were measured by solid-state ¹H-, and ²H-NMR and motion modes, relaxation times (*T*₁) and activation energies on their artificial CHs were revealed.

【緒言】 Clathrate Hydrate (CH) は内部に THF など の有機小分子をゲストとした水分子の包接結晶であ り、氷の多形とも考えることができる。一般に、この ような CH 化合物は、水の骨格部分(水分子クラスタ ー)が常温常圧で不安定な構造になっているため、圧 力-温度の制御が必要であり、その系統的な研究をす ることが難しかった。一方、私たちは分子でつくられ たナノ多孔質結晶のチャネル内部に、その1次元ナノ サイズをもつ巨大なチューブ状の水分子クラスター (Water nanotube: WNT)を安定化することに成功して いる。⁽¹⁾ 今回、その WNT 内部に THF を包接した新



Fig. 1 The structure of crystal <u>1</u>.

しい形をもった THF-Hydrate のようなものの合成に成功した。さらに研究をすること で、MeOH、EtOH、acetone、1,4-dioxane などの親水性溶媒分子を含むもの、あるいは *n*-hexane や *cyclo*-hexane などの疎水性溶媒分子などを取り込んだ人工包接化合物 (Artificial CH)を合成することに成功した。この種々の Artificial CH の結晶について、 固体の¹H-NMR や²H-NMR の測定を行った。また、その種々の溶媒分子の重水素置 換した TDF、MeOD、EtOD、d⁶-acetone、d⁸-1,4-dioxane、d¹⁴-*n*-hexane、d¹²-*cyclo*-hexane

²H NMR, Clathrate Hydrate, Nanoporous Crystal ○すずき よう、すか りょうた、すぎお ゆりえ、なかむら えりこ、 いそだ きょうすけ、くまがい よしひで、みずのもとひろ、たどころ まこと なども挿入することに成功した。そのため、包接されたゲスト分子や WNT の運動モードや緩和時間 (*T*₁) 測定による活性化エネルギーを明らかにすることに成功した。 その報告を行う。

【実験】Artificial CHの骨格となる分子性の多孔質結晶は、 $[Ru^{III}(H_2bim)_3]^{3+}$ (Hbim⁻ = 2,2'-biimidazolate)と TMA³⁻ (=1,3,5-trimesate)を H₂O/THF = 8 / 2 の混合水溶液中でゆっ くり拡散することで { $[Ru^{III}(H_2bim)_3(TMA)]_2$ ·3THF·30H₂O}_n (1)の六角柱状結晶を合成 した。この結晶の内部には、単位空孔あたり 3 分子の THF が挿入されていることが 分かった。また、重水で置換した { $[Ru^{III}(D_2bim)_3(TMA)]_2$ ·3THF·30D₂O}_n(2)結晶を合成 した。一方、*n*-hexane を導入するためには、結晶 <u>1</u>を湿度 50 %RH (298 K)、3 時間程 空気中で風乾させることで、すべての THF 分子を取り除いた結晶 <u>3</u>を合成し、さら に結晶 <u>3</u>を *n*-hexane に 24 時間漬け込むことで { $[Ru^{III}(H_2bim)_3(TMA)]_2$ ·2(*n*-hexane)· 30H₂O}_n(<u>4</u>)を合成することに成功した。結晶 <u>4</u>も同様に重水置換を行った { $[Ru^{III}(D_2bim)_3(TMA)]_2$ ·2(*n*-hexane)·30D₂O}_n(<u>5</u>)結晶も合成した。得られた結晶はすべて ガラス管に封入し、固体 NMR の測定を行った。固体 ²H NMR の測定には CMX300 を 用い、共鳴周波数 46.12 MHz で行った。スペクトルの測定には四極子エコー法を用い、 スピンー格子緩和時間 (*T*₁)の測定は反転回復法を用いた。

【結果と考察】 結晶 <u>2</u>と<u>5</u>の²H-NMR スペクトルを Fig. 2 に示す。117 K では <u>2</u>と <u>5</u>ともにブロードなピークが観測され、線形が異なっていた。また、<u>2</u>では 208 K 以 上で先鋭化した 1 本の鋭いピークが観測された。<u>5</u>でも 208 K から線形が変化し、238 K 以上では 2 本に分裂した。DSC の測定から <u>2</u>は 217 K に、<u>5</u>は 213 K に相転移が観 測されているため、高温におけるスペクトル

の先鋭化は水分子の運動によるものである。 Fig. 3 に<u>2</u> と<u>5</u>の *T*₁の温度変化を示す。どち らの結晶でも 230 K 付近に極小値を持った曲 線的な挙動を示した。この曲線を BPP 式で計 算することで分子運動の活性化エネルギーを 求めた。その結果、<u>2</u>では 29 kJ/mol、<u>5</u>では 31 kJ/mol と見積もられた。

バルクの THF-Hydrate では、水分子の回転 により H⁺が四面体の頂点を飛び移る運動 (4-site-jump) をもつため、固体でも線幅の狭 い1本のピークとなり、その活性化エネルギ ーは 32.7 kJ/mol であると報告されている。⁽²⁾ <u>2</u>でも THF-Hydrate と同様な変化があり、活 性化エネルギーも近い。そのため、4-site-jump が起こっていると考えられる。また、<u>5</u>は 2 に近い活性化エネルギーをもつが、スペクト ルが 2 本に分裂している。そのため、<u>5</u>では *n*-hexane の影響で、ハイドレート構造が変化 していると考えられる。

M. Tadokoro, *et al.*, *RSC adv.*, 2012, **2**, 12101
 T.M. Kirschgen *et al.*, *PCCP*, 2003, **5**, 5243



Fig. 2 Temperature dependence of solid state 2 H NMR spectra of <u>2</u> (left) and <u>5</u> (right).



Fig. 3 ²H NMR T_1 of \bigcirc 2 and \blacksquare 5 as a function of inverse temperature.

固体NMRによるセメント硬化体の化学構造解析

○髙橋貴文¹、古瀬佑馬²、大窪貴洋² 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 in Cement Pastes Using Solid State NMR

○Takafumi Takahashi¹, Yuma Kose², Takahiro Ohkubo² ¹Advanced Technology Research Laboratories, Nippon Steel & Sumitomo Metal Corporation ²Graduate School of Engineering, Chiba University

Cement has become an important material in iron-making industry, because it is used as a binder to cement various kinds of materials. Since chemical structure and pore structure drastically change depending on curing temperature, mechanism of hydration process remains unclear despite of long-term research. In this study, we have applied solid state NMR to investigate time-dependent changes in chemical structure. As a result of ²⁷Al MAS&3QMAS experiments, it is found that Al structure in initial hydration period changes depending on curing temperature. Furthermore, ²⁹Si MAS NMR shows that polymerization degree of SiO₄ in Calcium Silicate hydrate increases with temperature due to dehydration reaction.

1. 緒言

セメントおよびその組成物は、様々な産業で利用されている。製鉄プロセスに於いて も、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提案されている。セメン トは水と接触すると水和し、溶出イオンと水分子が結合して水和物が生成する。これ らの水和物の種類と量は、時間によって変化し、複雑な反応系となる。これまでにも 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、化学構造と水和の関係は必ずし も明確ではない。こうした複雑な物質の化学構造を明らかにするうえで、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は、非常に強力な解析ツールである。 今回、養生温度の影響を明確にするため、固体NMRを用いてセメント硬化体中の化学 構造を調査するとともに、強度発現との関係を検討した。

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、50°C,80°Cの各温度で養生した。所定時間養生後、 セメント硬化体を脱型した。この成型体を減圧下で繰り返しアセトン置換した後、

40°Cで24時間乾燥した。成型試料は、圧潰 強度試験を実施した後、粉末となるまで粉 砕し、NMR測定に用いた。

²⁷Al MAS/MQMAS 測 定 は、 JEOL-ECA700分光計(静磁場16.4*T*)を用 いた。また、²⁷Al⁻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。 ²⁹Si MASおよび¹H 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。 Table 1 Experimental condition in MAS measurements.

	²⁷ Al	²⁹ Si	$^{1}\mathrm{H}$
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)	$0.9(\pi/2)$
Recycle delay[s] ^{\dagger2}	3	1	5

^{†1} Zirconia (ZrO₂) rotor

^{†2} Recycle delay were selected to satisfy full relaxation.

Cement, Solid State NMR, Hydration

○たかはし たかふみ,こせ ゆうま、おおくぼ たかひろ

3-1.²⁷AI NMRに基づく化学構造変化

異なる温度で養生したセメント試 料の²⁷Al NMRスペクトルをFig.1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、C₃A、 C₄AFさらにC₃Sに微量に含まれるAl である。

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。²⁷Al 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 Figure 1. ²⁷AI MAS NMR spectra of cement pastes cured at 25 and 80°C. 核四極子相互作用を平均化出来ない。



そこで、30MAS法を用いて高分解能スペクトルを測定し、帰属を行った。養生温度 が低い場合には、養生初期にエトリンガイトが観測されている。しかしながら、養生 温度が高いと、初期試料(6h)においてもエトリンガイト(Ca₆Al₂(OH)₁₂(SO₄)₃・26H₂O) は生成せず、モノサルフェート(Ca4[Al(OH)₆]₂SO₄・6H₂O)やその他の6配位Al相(TAP) が観測された。また、4配位Al量も、僅かながら時間と共に増加する傾向が認められ た。4配位Alは、CSHのSiサイトを一部置換したものと考えられる。

3-2.²⁹ Si NMRに基づく化学構造変化

Fig.2に²⁹Si MAS NMR スペクトル を示す。水和前のMASスペクトルに は、約-71ppmを中心としてピークが 観測されている。これは、C₃Sおよび C₂S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 ピークが観測される。これらは時間 とともに増加しており、水和物に起 因するものである。その構造は、化 学シフトから考えるとO²またはO¹の

ネットワーク構造を有すると考えら



Figure 2. ²⁹Si MAS NMR spectra of cement pastes cured at 25 and 80°C.

れる。更に、養生温度が高い程、高磁場側の信号強度が増加しており、脱水反応によ ってSiOHの縮合が進み、四面体SiOaのネットワークが発達したことを示している。 ポスター発表では、化学構造変化と圧縮強度発現との関係についても考察する。

【結言】

²⁹Si固体MMR法を用いて、セメント硬化体中の化学構造の時間変化を追跡した。 ²⁷A1. ✓養生温度を変えることによって、初期のA1化学構造やSi四面体のネットワーク発 達具合に変化が現れることが明らかとなった。

✓²⁹Si MASスペクトル上では、クリンカー(未水和セメント鉱物)と水和物由来の シグナルを概ね区別して観測することが出来る。よって、²⁹Si NMRスペクトルの解析 に基づいて、セメントの水和に関する定量的な考察が期待できる。

References [1]Gan, Z. and Kwak, H.T. J. Magn. Reson. 168, 346-351.

2次元緩和相関¹H NMRによるセメント材料の解析

 ○古瀬佑馬¹,高橋貴文²,出口健三³,大木忍³,清水禎³,前田孝一¹, 岩舘泰彦¹,大窪貴洋¹
 ¹千葉大学大学院 工学研究科
 ²新日鐵住金(株)先端技術研究所
 ³物質・材料研究機構

Cement Materials Analysis by using Two–Dimensional Relaxation Correlation ¹H NMR

○Yuma Kose¹, Takafumi Takahashi², Kenzo Deguchi³, Shinobu Ohki³, Tadashi Shimizu³, Koichi Maeda¹, Yasuhiko Iwadate¹, Takahiro Ohkubo¹

¹Graduate School of Engineering, Chiba University

²Advanced Technology Research Laboratories, Nippon Steel & Sumitomo Metal Corporation ³National Institute for Materials Science

In order to understand hydration process in cement materials, continuous measurements of ¹H T_1-T_2 correlation spectroscopies were applied to cement pastes under 0.5 and 11.7 magnetic field. A typical white cement and white cement with sorbitol as an additive to control hydration time have been targeted to study time-dependent behavior of hydration. For white cement paste without sorbitol, T_1-T_2 correlation spectrum under 0.5 T showed single symmetrical peak at the initial state, a broadened peak along the diagonal line was observed at longer hydration time. On the other hand, two distinct peaks in T_1-T_2 correlation spectrum at 11.7 T were observed at initial and long hydration time. The magnetic-field dependency of peaks on T_1-T_2 correlation spectra is caused by longer ¹H correlation time of water molecules. It is expected that the clear difference of the peak position between 0.5 and 11.7 T results from water in confined space such as C–S–H gels. For the cement paste with sorbitol, a peak ranging from 10^{-3} to 10^{-2} s on T_2 axis was close to the T_1-T_2 the diagonal line. The more "liquid–like" water with shorter correlation time occupied in the pore for long hydration time.

1. 諸言

セメントは水と混練することで容易に強度が発現するユニークな材料である。その 特性は水和反応によって形成される空隙構造に強く支配されるため,養生環境の最適 化や新規セメント材料の設計を目的として水和反応に関係する空隙の形成メカニズ ムや内包される水分子の動的挙動を解明することが試みられている。

セメントはエーライト(3CaO・SiO₂, C3S), ビーライト(2CaO・SiO₂, C2S), アルミネ ート(3CaO・Al₂O₃, C3A), フェライト(4CaO・Al₂O₃・Fe₂O₃, C4AF)の4種類の鉱物と石 膏から構成され, これら鉱物の中でC3SとC2Sが水和反応により生成するケイ酸カル シウム水和物(C-S-Hゲル)が強度発現を担う。水和反応の進行に伴いC-S-Hゲルはセ メント粒子を覆い, 次第に粒間を満たしていく。この際, C-S-Hゲルが満たされずに 緩和時間, セメント水和反応

○こせゆうま,たかはしたかふみ,でぐちけんぞう,おおきしのぶ,しみずただし, まえだこういち,いわだてやすひこ,おおくぼたかひろ 残った空隙をキャピラリー空隙, C-S-Hゲルの層間に相当する空隙をゲル空隙と呼ぶ。

NMRを用いた¹Hの縦および横緩和時間(*T*₁, *T*₂)計測は細孔を充填する流体の運動性 および空隙構造に関する情報を,非破壊に得られる点でセメントの水和反応をモニタ ーできる有効な手法である。実際,これまでにセメント化学の分野においても*T*₁と*T*₂ それぞれと空隙径の関係を利用した構造解析が報告されている^[1]。しかし,セメント の様に多成分かつ複雑な構造を持つ材料は1次元の緩和時間解析で得られる情報に限 界があり,より高分解なNMRスペクトルを得ることが求められる。

NMRの2次元相関法は1次元スペクトルで分解できない複雑な化学種を識別する手法として、広く利用される。同様に $T_1 \ge T_2 \ge 2$ 次元に拡張した手法をセメントの水和反応の解析に適用することは、水分子の特性を特徴付ける詳細な情報を期待できる。そこで本研究は¹H NMRによる2次元 T_1 - T_2 相関測定をセメント材料に対して実施し、得られた2次元 T_1 - T_2 スペクトルから空隙構造および水分子の運動性について考察した。試料はセメントだけの試料と硬化遅延剤として作用するソルビトールを配合した試料を調製し、磁場強度が異なる2種類のNMR装置を用いて、セメントペースト調製直後から経時的に T_1 - T_2 測定を行った。

2. 実験

2.1 試料調製

セメントを構成する鉱物は鉄を 含有するため、NMRで観測される ¹Hの緩和時間はその影響を強く受



Figure 1 A pulse sequence for $T_1 - T_2$ correlation experiments

ける。そこで測定用のセメントペースト試料は鉄含有量の少ないホワイトセメント (太平洋セメント)から調製した。ソルビトール混合セメントはD(-)-ソルビトール(和 光純薬)をセメント重量に対して1.0%添加し調製した。全ての試料は水と固体成分(セ メント+添加剤)の重量比を0.50とし、90秒間の手練り混合により調製した。得られた セメントペーストは11.7 Tの静磁場下の測定はガラス試料管(d=4 mm)および0.5 T下の 測定はテフロン製容器(d=10 mm)にそれぞれ注入し、室温で封緘養生させた。

2.2 T₁-T₂相関測定および2次元ラプラス逆変換によるデータ処理

NMR装置はMARAN ULTRA (Oxford, 静磁場強度:0.54 T)およびECA500(JEOL, 静磁場強度:11.7 T)により,共にソレノイド型コイルのプローブを使用した。測定は¹H

を対象とし反転回復法でエンコー ドした磁化をCPMGトレインでエ コー信号を観測するパルスシーケ ンス(Figure 1参照)を用いて、セメン トペースト調製直後から連続的に 行った。 r_1 は最小値を10 μ s,最大値 を予め反転回復法で計測した T_1 値 の5倍とし、その間隔を $T_1 > 100$ ms の場合は32ポイント、 $T_1 < 100$ ms では64ポイントに分割して設定し た。Figure 2 は調製直後のホワイト セメントペーストから得られたデ ータを示す。この r_1 と r_2 による信号



Figure 2 Decay data as a function of τ_1 and τ_2 measured from white cement paste just after preparing a specimen

強度データに Venkataramananら^[2]が 開発した2次元ラプラ ス逆変換のアルゴリ ズムに基づいた解析 を施し, $T_1 \ge T_2$ を軸に 取る2次元の緩和時間 分布を導いた。

3. 結果·考察

3.1 セメントペース トの測定結果

Figure 3は試料調製 直後(0 h)および24 h 後の試料に対して 0.54 Tと11.7 Tの磁場 強度で得られたスペ クトルを示す。0.54 T の磁場強度で0 hの時 に得られたスペクト ルは $T_1 >> T_2$ となるピ ークが一つ存在する。 このピークは27 hま でに対角線近傍に移 動し、対角線に沿って 広い分布を持つよう になる。一方, 高磁場 で測定した場合は0 h でTっ成分の異なる2つ のピークが現れてい る。いずれのピークト ップは24 hの養生時 間までにT₁成分は1桁 小さくなるが, ピーク dとfを比較するとT2値 はほとんど変化して いない。またピークe はピークfの方向に分 布し, それぞれのピー クは近接している。加 えてピークfは2桁にお よぶ幅広なTI分布を取 ることがわかる。



Figure 3 T_1 – T_2 correlation spectrum of white cement paste cured for 0 and 24 hours measured on different magnetic field strength (Left : 0.54 T, Right : 11.7 T)



Figure 4 T_1 - T_2 correlation spectrum of white cement paste with added 1.0 Wt.% sorbitol cured for 0 and 24 hours measured on different magnetic field strength (Left : 0.54 T, Right : 11.7 T)

3.2 ソルビトールを配合したセメントの測定結果

Figure 4はソルビトールを配合したセメント試料の調製直後(0 h)および24 hで得られたスペクトルを示す。0.54 Tで測定した結果は、0 hでは対角線近傍に単一のピークが現れている。同様に24 h経過後の試料からも対角線近傍に分布を持たない単一のピークが検出された。一方、11.7 Tで測定したスペクトルは同じ*T*1値を持つ2つのピークが確認できる。24 hにおいて、いずれのピークも0.54 Tで観測されたピークと比較して、より小さい*T*1値をとる。この内ピーク*lのT*1は10⁻²から10⁻¹ sに分布を持つ。

3.3 考察

いずれの計測条件においても0hで強度が強く単一の分布を持つピークa, c, g, i が観測された。これは水和反応前のセメント粒子間を満たす自由水に帰属できる。高 磁場下での計測はT₂成分が短く初期強度の小さいピーク*dやj*が観測された。これはパ ルス幅が短いハードパルスを利用し短いリングダウン時間で信号を取得しているた めで、緩和時間の短い成分が観測できたと考えられる。

Figure 3の24 hにおけるピークb, e, fの形状は静磁場強度により大きく異なるが, ピークeはピークb同様に短いT₂の方向へと分布を伸ばしている。このことからピーク fに起因する水分子は非常に長い回転相関時間(τ_c)を有しており,低い磁場の条件では 対角線近傍に観測されうるピークが,強磁場下で長いT₁を持つピークとして検出され たと推察される。 τ_c は分子の粘性や分子径に関連付けられるパラメーターであり, τ_c が大きいほど流体の粘性が高い状態,すなわち運動性が制限された状態の水分子に相 当すると考えられる。

T₁と細孔径の関係は細孔表面と沖合の水分子の早い交換を仮定した場合,下記の様に定式化される。

$$\frac{1}{T_1} = \frac{1}{T_{1,\text{bulk}}} + \rho_1 \left(\frac{S}{V}\right)_{\text{pore}}$$

 $T_{1,bulk}$ はバルクの流体の緩和時間, ρ_1 は表面緩和率,Sは空隙の表面積,Vは流体の体積をそれぞれ表す。第二項のS/Vは空隙構造を球体とみなすと3/rに相当し, T_1 のピーク位置は空隙半径rに比例する。

ここでピーク $f \ge l o$ ピーク位置を比較すると、ソルビトールを添加したことで $T_1 = 10^{-3}$ から 10^{-2} sにかけての分布が消滅している。セメントの強度発現はゲル空隙が 影響することから、ピークfにおける 10^{-3} から 10^{-2} sの分布はゲル空隙に取り込まれた 水分子に起因することが示唆される。セメントのみの試料で観測されたピークは24 h までに T_1 がほぼ1桁短くなっているが、ソルビトールを添加した場合はその減少が小 さい。これはソルビトールによりC-S-Hネットワークの成長が阻害され、セメント粒 間が水和物で満たされていないためと考えられる。

参考文献

[1] A. J. Bohris, *et al.*, *Magn. Reson. Imag.*, **16**, pp.455–461, (1998)
[2] L. Venkataramanan, *et al.*, *IEEE Transactions*, **50**, pp.1017–1026, (2002)

常磁性金属イオンを用いた結晶性多孔質シリカの高分解固体 NMR迅速測定

○稲垣怜史¹,川村出¹,佐々木優吉²,吉田要²,窪田好浩¹,内藤晶¹ ¹横浜国大・大学院工学研究院 ²ファインセラミックスセンター

Sensitivity enhancement in ²⁹Si MAS NMR of porous silicate crystals by paramagnetic doping

 \bigcirc Satoshi Inagaki¹, Izuru Kawamura¹, Yukichi Sasaki², Kaname Yoshida², Yoshihiro Kubota¹, and Akira Naito¹

¹Graduate School of Engineering, Yokohama National University, Kanagawa, Japan. ²Japan Fine Ceramics Center, Nagoya, Japan.

The paramagnetic doping of Cu^{2+} in both mesoporous silica materials and microporous silicate crystals (zeolites) can be used effectively to enhance the signal intensity of ²⁹Si solid state magic angle spinning NMR, as a result of shortening of the spin–lattice relaxation time, T_1 , by the paramagnetic effect, because of the Cu^{2+} electronic relaxation time in the range of 10^{-8} s. This leads to drastically reduced data-collection times, typically 80-fold shorter than that in mesoporous silica.

1. 緒言

ゼオライトは規則的に配列したマイクロ孔をもつアルミノケイ酸塩であり、その結晶構 造に由来する固体酸性質を発現するため、石油精製・石油化学プロセスの触媒として実用 されている機能材料である。また規則性メソポーラスシリカは均一な大きさのメソ孔を有 するシリカ材料であり、そのメソ孔表面への官能基修飾による機能化を経て、固体触媒・ センサー・ドラッグデリバリーなどへの応用が研究されている。いずれの多孔質シリカ材 料でもその表面に位置するシラノール(SiOH)の定性・定量がその機能制御に重要である ため、高分解固体 NMR 測定が強力なツールとして用いられている。しかし²⁹Si 核の固体 NMR 測定では、天然存在比が低い、緩和時間が長い、などの問題がある。例えば規則性メ ソポーラスシリカでは、²⁹Si 核の緩和には 240 秒以上かかる。一方、有機化合物の NMR 測 定では Cu, Fe などの常磁性をもつ元素を極微量添加することで感度の低い核種(¹³C など) の NMR 感度を高める手法が知られている^{1,2)}。またシリカゲルの調製時に Cu 種を dope し ておくことで²⁹Si 核の緩和を促進する効果を利用して、ゼオライト・規則性メソポ ーラスシリカの高分解固体 NMR 測定による構造解析のための迅速測定手法を検討した⁴)。

2. 実験方法

メソポーラスシリカには 2d-hexaonal メソ孔構造を有する MCM-41 及び SBA-15 の2種,

²⁹Si核の緩和時間短縮,規則性多孔質シリカ材料,常磁性金属イオン

○いながきさとし,かわむらいずる,ささきゆうきち,よしだかなめ,くぼたよしひろ, ないとうあきら ゼオライトには酸素 12 員環ミクロ孔をもつゼオライトベータをそれぞれ選んだ。ゼオライトベータは市販の[Al]-beta (HSZ-940HOA (東ソー), Si/Al = 18.5)を酸処理して脱 Al した粉末試料 (deAl-beta, Si/Al > 1000)を用いた。またゼオライト骨格に Fe を含む beta を水熱合成後,580°C で焼成して測定用粉末試料 ([Fe]-beta, Si/Fe = 58)を得た。メソポーラスシリカは界面活性剤を鋳型として水熱条件で合成し、550°C での焼成によって鋳型分子を除去することで粉末試料を得た。Cu²⁺,Co²⁺または Ni²⁺の硝酸塩のエタノール溶液に各ポーラスシリカを浸漬してから数分間撹拌してからエバポレーターでエタノールを留去することで、金属種を担持したポーラスシリカを得た。金属の担持量は 1.0 mmol/g-zeolite をデフォルトとし、必要に応じて 0.3~2.0 mmol/g-zeolite の範囲で担持した試料を別途,調製した。²⁹Si dipolar-decoupling (DD) MAS NMR 測定には AVANCE III (Bruker, 600MHz)を使用し,MAS 速度を 10 kHz とした。ゼオライトベータの NMR 測定では 3, 5, 10, 15, 20, 30 sの繰り返し時間で各々1024 回積算し、メソポーラスシリカでは 3, 5, 10, 15, 20, 30, 60, 120, 240 s の繰り返し時間で各々640 回積算した。

3. 結果·考察

 Cu^{2+} , Co^{2+} または Ni²⁺を含浸担持した deAl-beta で 29Si DD MAS NMR 測定を行った (Fig. 1)。繰り返し時間 30 s のスペクトルを比較すると, Co^{2+} /deAl-beta でピークのブロード化が



Figure 1. ²⁹Si DD MAS NMR spectra of (a) unmodified dealuminated beta (= deAl-beta), (b) $1.0-Cu(NO_3)_2/deAl-beta$, (c) $1.0-Co(NO_3)_2/deAl-beta$, and (d) $1.0-Ni(NO_3)_2/deAl-beta$ by various recycle times of (i) 30 s, (ii) 20 s, (iii) 15 s, (iv) 10 s, (v) 5 s and (vi) 3 s. Accumulation, 1024 times; magic angle spinning rate, 10 kHz; line broadening factor, 20 Hz.

顕著に起きていた。これは Co^{2+} が ²⁹Si 核の spin-spin relaxation (横緩和)を促進したためと 言える。次に繰り返し時間 3~30 s のスペクトルを比較すると、 Cu^{2+} を用いた際に、²⁹Si 核 の spin-lattice relaxation (縦緩和)を飛躍的に促進することができることがわかった。また Ni²⁺では ²⁹Si 核の縦緩和の促進効果は Cu^{2+} に比べるとわずかであった。

[Fe]-beta の ²⁹Si DD MAS NMR スペクトルでは,縦緩和の促進が見られるものの,横緩和 促進によるピークのブロード化も起きていた。これは[Fe]-VPI-8 の既報の結果と一致する ⁶⁾。これらの検討から Cu²⁺が ²⁹Si 核の縦緩和のみを促進するのに適した金属種であること がわかった。Cu²⁺の spin–lattice relaxation time が 10^{-8} s オーダーであるので, ²⁹Si の双極子 相互作用が 10 数 MHz の周波数に変調され,その変調が ²⁹Si のゼーマン相互作用に近づく ためにこのような現象が起こると考えられる。

今回の検討では 1.0 mmol/g-zeolite (Si/Cu = 16.7)の Cu²⁺量となるように担持した deAl-beta (BET 比表面積, 457 m²/g) で ²⁹Si 核の縦緩和を十分に促進することができた。ゼオライ トベータでは結晶構造に含まれる Si 原子はすべてミクロ孔表面に位置しており, 担持した Cu²⁺が近接できない Si 原子は存在しない。従って deAl-beta に高分散に担持された Cu²⁺は 1.32 個/nm² と見積もられ, ゼオライトベータ中の Cu²⁺の ²⁹Si への常磁性効果が届く範囲は 少なくとも 1 nm 程度と言える。

未修飾の規則性メソポーラスシリカ SBA-15 の ²⁹Si DD MAS NMR 測定を繰り返し時間 3 ~240 s の範囲で行った (Fig. 2)。繰り返し時間 240 s のピーク強度に比べて, 3 s でのピーク強度は 1/10 程度にまで減少しており, ²⁹Si 核の縦緩和には 240 s 以上要することを確認 した。次に Cu(NO₃)₂を 1.0 mmol/g-SiO₂ 修飾した SBA-15 の NMR スペクトルでは, 繰り返 し時間 3s のピーク強度は, 240 s のピーク強度の 90%以上を保っていた。また Cu²⁺を担持 した試料でのピークのブロード化はほとんど起きていなかった。このことから SBA-15 で の ²⁹Si 核の縦緩和速度を, 所定量の Cu²⁺を担持することで約 80 倍促進できることを明らか にした。規則性メソポーラスシリカ MCM-41 に Cu²⁺を担持した場合でも同様の縦緩和の促 進効果を得ることができた。



Figure 2. ²⁹Si DD MAS NMR spectra of (a) unmodified SBA-15 and (b) 1.0-Cu(NO₃)₂/SBA-15 by various recycle times of (i) 240 s, (ii) 120 s, (iii) 60 s, (iv) 30 s, (v) 20 s, (vi) 15 s, (vii) 10 s, (viii) 5 s and (ix) 3 s. Accumulation, 640 times; magic angle spinning rate, 10 kHz; line broadening factor, 100 Hz.
次にSBA-15中のシラノール (SiOH) の定量性について検討した (Fig. 3)。SBA-15ではQ⁴, Q³, Q²種 (Qⁿ = (SiO)_nSi(OH)_{4-n} (n = 0~4)) に由来するピークが–109, -102, -91 ppm付近に それぞれ観測された。Cu(NO₃)₂を担持したSBA-15でのQⁿ種の分布は,繰り返し時間240 s (Q⁴:Q³:Q² = 59.4: 34.4: 6.2) から3 s (Q⁴:Q³:Q² = 60.0: 32.5: 7.5) までほとんど変化せず, 繰り返し時間を短縮してもシラノールの定量性が保たれることがわかった。しかし,未修 飾のSBA-15の繰り返し時間240 sでのQⁿ種の分布はQ⁴:Q³:Q² = 55.8: 36.2: 8.0であり, SBA-15にCu(NO₃)₂修飾するとQ², Q³種の量がやや減少していた。これはCu(NO₃)₂修飾の過 程でSBA-15中のシラノール同士の脱水縮合がわずかに進行してしまうためと考えられる。 従ってシラノールの定量性を保つにはCu修飾する手法の改善が今後の課題である。



Figure 3. Peak-area distributions of Q^2 , Q^3 and Q^4 signals by various recycle times from 3 to 240 s. (a) Unmodified SBA-15 and (b) 1.0-Cu(NO₃)₂/SBA-15.

*The broad spectra of 3, 5 and 10 s (recycle time) in unmodified SBA-15 are impossible to deconvolute as Q^2 , Q^3 and Q^4 signals.

- 4. 文献
- 1) S. Ganapathy, A. Naito and C. A. McDowell, J. Am. Chem. Soc., 1981, 103, pp.6011-6015.
- 2) C. P. Jaroniec, Solid State Nucl. Magn. Reson., 2012, 43-44, pp.1-62.
- 3) 閔 庚薰, 宮原 浩嘉, 第 47 回 NMR 討論会講演要旨集, 2008, pp.68-72 (3L7).
- 4) S. Inagaki, I. Kawamura, Y. Sasaki, K. Yoshida, Y. Kubota, A. Naito, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2013, 15, pp.13523–13531.
- 5) K. Wüthrich, *NMR in Biological Research: Peptides and Protein*, North-Holland Publishing Company, Amsterdam, 1976, p. 226.
- C. C. Freyhardt, R. F. Lobo, S. Khodabandeh, J. E. Lewis Jr., M. Tsapatsis, M. Yoshikawa, M. A. Camblor, M. Pan, M. M. Helmkamp, S. I. Zones and M. E. Davis, *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, 118, pp.7299–7310.

パルスNMRによるフィラー界面における分子運動性評価 -シリカ配合SBRの性能発現機構の解明に向けて-〇村上公也¹,早田大祐²,井上芳久²,永田員也²,松田孝昭²,山崎 悟¹ ¹旭化成株式会社 ²旭化成ケミカルズ株式会社

The evaluation of the molecular mobility in the interface between fillers and rubber by the pulsed NMR

○Kimiya Murakami¹, Daisuke Hayata², Yoshihisa Inoue², Kazuyta Nagata², Takaaki Matsuda² and Satoru Yamazaki¹

¹, ASAHI KASEI CORPORATION, Shizuoka, Japan.

², ASAHI KASEI CHEMICALS CORPORATION, Kanagawa, Japan.

Recent years, silica compounded rubber is used as rubber for low fuel consumption tires. Although the aggregation structure of silica particles was revealed by many methods, the molecular dynamics near the filler surface in the silica particles was not revealed enough. Our purpose in this research is revealing the difference of the molecular dynamics between CB compounded rubber and silica compounded rubber by the evaluation of ¹H T₂ relaxation.

In the short T_2 component of CB compounded rubber, sample temperature didn't affect its T_2 very much. On the other hand, in the short T_2 component of silica compounded rubber, its T_2 was affected by the sample temperature. This result indicates that the molecular mobility of CB compounded rubber in the interface between filler and rubber is more restricted than that of silica compounded rubber.

1. 序論

近年、低燃費タイヤ用ゴムとしてシリカ配合ゴムが着目されている。従来、シリカの分散状態と物性の相関が着目されてきた^[1]が、シリカ分散状態だけではなくフィラーとゴムとの界面構造も物性に影響する可能性がある。フィラーとの界面におけるゴムの構造の解析手段の1つとして、パルスNMRによる運動性評価が用いられてきた^{[2][3]}。しかし、CB配合ゴムとシリカ配合ゴムにおける界面構造の違いについては解明されておらず、特にシリカ分散性の改善のために変性を行った変性ゴムについては界面構造がいまだ明らかになっていない。本研究ではシリカ配合ゴムとカーボンブラック(CB)配合ゴムにおけるフィラーーゴム界面構造の違いの解明を目的として、パルスNMRにより未加硫の変性ゴム試料について分子鎖の運動性評価を行った。

2. 実験

変性スチレンーブタジエンゴム(SBR)に対しシリカもしくはCBを50部配合し未加 硫試料とし、未加硫試料をトルエン抽出した残渣をバウンドラバーとした。変性SBR パルスNMR、ゴム、運動性

○むらかみきみや,はやただいすけ,いのうえよしひさ,ながたかずや,まつだたか あき,やまざきさとる においては変性基がシリカ表面と化学的に結合し、未変性SBRに比べて良好なシリカ 分散性を示す。パルスNMR測定にはBruker Biospin社のMq20を用い、ソリッドエコー 法によりT₂を測定した。測定温度は0, 10, 20, 25℃とした。測定結果について式1を用 いて3成分にフィッティングし、緩和時間の短い順にShort成分、Middle成分、Long成 分とした。ワイブル係数Waは1~2の間の定数とし、同一測定温度の場合、各試料の 解析には同じWaを用いた。Cs, Cm, Clは各相の分率、Ts, Tm, Tlは緩和時間を示す。

 $f(t) = Cs^{*}exp(-(1/Wa)^{*}(t/Ts)^{Wa})+Cm^{*}exp(-t/Tm))+Cl^{*}exp(-t/Tl)$ 式1

3. 結果と考察

式1を用いて分離した各相はそれぞれフィラー表面付近の最も強く拘束を受けた分子鎖(Short相)、フィラーによる直接的な拘束を受けないもののフィラー付近の分子鎖の絡み合いの影響を受ける分子鎖(Middle相)、フィラーによる拘束を受けていない分子鎖(Long相)と推測された。

試料温度を上昇させた際のShort、Middle相の緩和時間T₂をFig.1に示す。各試料のバ ウンドラバーと未加硫試料は類似の傾向を示し、トルエン抽出時にフィラー付近の界 面層が溶け出していないことが確認できた。まずShort相に着目すると、CB配合ゴム では緩和時間の増大が確認されずフィラー界面付近において強固な拘束を受けてい ることが確認された。一方、シリカ配合ゴムでは温度上昇に伴って緩和時間が増大す ることから、CBに比べて拘束の緩やかな界面層の存在が示唆された。次いでMiddle 相に着目する。温度上昇に伴いいずれの試料においても緩和時間の増大が確認された が、CB配合試料においてシリカ配合試料に比べ緩和時間の増大量が小さい傾向が確 認された。このことからシリカ配合試料ではフィラーから少し離れた部位における分 子鎖の絡み合いもCB配合試料と比べ疎であると推定される。以上の結果から、シリ カ表面における界面層ではCBの界面層に比べて分子鎖の拘束が弱く、フィラー付近 における分子鎖の絡み合いも少ないCBとは異なる状態の界面層を形成していること が示された。





参考文献

[1] G. P. Baeza et al., *Macromolecules*, **46**, 317-329 (2012).

[2] K. Fujimoto, and T. Nishi, NIPPON GOMU KYOKAISHI, 43, 465-476 (1970).

[3] J. W. ten Brinke et al., Macromolecules, 35, 10026-10037 (2002).

多量子NMRを用いた¹H分布の次元数の決定とその応用 ○最上祐貴¹,山崎悟²,野田泰斗¹,竹腰清乃理¹ ¹京都大学大学院理学研究科 ²旭化成(株) 基盤技術研究所

Dimensionality of ¹H distribution in solids as studied by MQNMR

○Yuuki Mogami¹, Satoru Yamazaki², Yasuto Noda¹, and Kiyonori Takegoshi¹ ¹Division of Chemistry, Graduate School of Science, Kyoto University ²ASAHI KASEI CORPORATION Analysis & Simukation Center

¹H multiple-quantum (MQ) NMR is useful for examination of proton distribution in solid materials. However, due to the difficulty of simulating MQ dynamics for the case of a large number of protons, its application has been rather limited. In this work, a novel approach based on the percolation theory and Monte Carlo methods for analyzing is developed, in which the difficulty of simulation is alleviated by adopting stochastic view for MQ development. It is shown that, using this approach representing ¹H dimensionality in the sample, the observed growth curve of the ratio between the amount of double- and quadruple-quantum coherences I(4)/I(2) can be described satisfactorily. Application of this approach for tobermorite is discussed.

固体における核スピンの多量子(MQ)コヒーレンスの成長を観測するいわゆるMQ counting法は固体におけるスピンの分布を決定できるユニークな方法である。その解析には*N*個のスピンから成るクラスターから現れる*n*量子数の数は₂_N*C*_{Nn}であるという仮定を用いて¹Hの分布を求めることが行われてきた。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違いが現れ、1Dよりも2D、2Dよりも3Dの方が育ち方が早いという報告がある。このようなMQコヒーレンスの時間発展は密度行列を解くことで得られるが、この方法は計算量が大きく、大きな系で使うのは難しい。そ

こで本研究では様々な次元数で無限に広がった系 におけるMQコヒーレンスの育ち方を簡単な統計 モデルを用いることでシミュレーションすること を試みた¹。また、それらのシミュレーションと実 際に1D・2D・3D状に¹Hが分布したサンプルの測 定結果との比較を行った。またこの応用としてコン クリートの原料であるトバモライトについてMQ 測定を行い¹Hがどのように分布しているか検討し た。



用いたMQ countingのパルスシークエンスを Fig.1に示す。このパルスシークエンスでは偶数の Fig.1: The pulse sequence for MQNMR. We measured a amplitude of magnetization with the phase of pulse, φ , varied from 0 to 2π .

多量子NMR, 次元数, トバモライト

○もがみゆうき、やまざきさとる、のだやすと、たけごしきよのり

多量子コヒーレンスを励起することができ、はじめのexcitation時間を長くすること でより大きな多量子コヒーレンスを観測できるようになる。

今回の研究では¹Hが直線に並んだサンプルとしてhydroxyapatite、2Dサンプルとして¹H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。

本研究ではFig.1のパルスシークエンスを用いて得られた2量子と4量子の強度比 *I*(4)/I(2)を比較として用いた。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excitationシークエンスの繰り返し回数*m*を変えて求めた*I*(4)/*I*(2)の *m*依存性を簡単な統計モデルを用いて説明することを試みた。

まず、個々の¹Hを格子点にした格子モデルを考える。これらの格子は簡単のため に最近接のみが双極子相互作用でつながっているとした。格子の形として1次元は直 線、2次元は蜂の巣・正方、3次元としては立方格子を考えた。各格子点間が確率*p*0=1-am でつながると仮定しクラスターの大きさを求めた。*p*0は1サイクルの照射で各¹H間に コヒーレンスが生じる確率でありこれをパラメータとしてシミュレーションした。



Fig.2 "m"-dependence of I(2)/I(4) for (a)hydroxyapatite, (b)Mg(OH)2, and (c)adamantane with simulation of linear, honeycomb, square, and cube.

Fig.2に(a)hydroxyapatite, (b)Mg(OH)₂, (c)adamantaneの結果とシミュレーションの結果を示した。Hydroxyapatiteは1D(直線)に、Mg(OH)₂は2D(蜂の巣または正方)に、adamantaneは3D(立方)によく一致しているのがわかる。

これを用いてトバモライトの水素の分散を調べた。トバモライトとはコンクリート の原料となる物質でその層間距離により3種類(14Å・11Å・9Å)存在していることが 知られている。また11Åのものは加熱処理により9Åへ変化するもの(正規型)と変化 しないもの(異常型)が存在している。

Fig.3に天然トバモライト と人工トバモライトの結果 を示した。今回用いた天然ト バモライトは正規型で人工 トバモライトは異常型であ る。それらの違いがMQコヒ ーレンスの成長速度の違い に現れている。詳細はポス ターで示す。



Fig.3 "m"-dependence of I(2)/I(4) for (a)natural tobermorite, (b)artificial tobermorite with simulation of linear, honeycomb, and cube.

Reference

(1)Y. Mogami et al. Phys. Chem. Chem. Phys., 2013, 15, 7403-7410

P108 ¹H DQ MASを用いた医薬品原薬中の微量フリー体の定量 ~固体NMRの検出限界は?~

○丸吉京介¹, Dinu Iuga², and Steven P. Brown² 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

What is the lowest concentration of a minor free form component that can be detected by ¹H DQ MAS experiments in pharmaceutical solids?

•Keisuke Maruyoshi¹, Dinu Iuga², and Steven P. Brown²

¹Analytical & Quality Evaluation Research Laboratories, Daiichi Sankyo Co., Ltd., Hiratsuka, Japan.

²Department of Physics, University of Warwick, Coventry, U.K.

The limit of detection for free form of cimetidine obtained with ¹H magic-angle spinning (MAS) solid-state NMR is determined. The free form can be detected and quantified in a physical mixture with the salt form down to a concentration of 1% w/w by solid-state NMR experiments recorded at 850 MHz.

Salt formation is an approach to improve the rate of dissolution and aqueous solubility of acidic and basic pharmaceutical products.¹ Approximately a half of all drugs on the market are developed in salt forms nowadays. However, a salt can become unstable chemically and physically during various processing steps, it may transform to a free acid/base form or another polymorph or solvate. The solid state transformation from the salt to free form will alter the properties of the active pharmaceutical ingredient (API) and this is extremely undesired. To investigate the quality of pharmaceutical products, an efficient and high-sensitive method is required. Solid state NMR spectroscopy has become a standard tool for analytical research in pharmaceutics.² Although ¹³C CP MAS is commonly used for pharmaceutical analysis, the potential of applying ¹H solid-state NMR is being increasingly recognised. Concretely, the ¹H double-quantum (DQ) solid-state NMR experiments (DQ MAS and DQ CRAMPS) are powerful methods for obtaining information of dipolar-coupled protons, with DQ peaks being observed for close (typically less than 3.5 Å) through-space H-H proximities.^{3,4} Therefore, two-dimensional ¹H DQ spectra constitute "fingerprints" for the identification of a specific form of an organic molecule.⁵ A drawback of the ¹H DQ CRAMPS method is the presence of spectral noise due to the homonuclear decoupling, i.e., a lower detection limit could be expected in a ¹H DO MAS experiment at high magnetic field. We have recorded ¹H DQ MAS spectra at a ¹H Larmor frequency of 850 MHz and a MAS frequency of 30 kHz for a cimetidine hydrochloride salt/free form mixture (20%, 10%, 5%, 1% and 0.5% free form) samples and determined the limit of detection for the free form component as 1% by following the pair of cross peaks at a 1 H DQ frequency of 7.4 + 11.6 = 19.0 ppm derived from the free form (Figure 1).

¹H DQ MAS, Polymorph, Limit of detection

○まるよしけいすけ, Dinu Iuga, Steven P. Brown

This result is on a level with limits of detection by both powder X-ray diffraction and ¹³C CP MAS NMR for minor polymorph components. This is important for the pharmaceutical industry, e.g., offering the potential to enable polymorph conversion to be detected much earlier in e.g. stability testing.



Figure 1. A comparative map of 2D ¹H DQ MAS (850 MHz, $v_r = 30$ kHz) spectra using one rotor period of BABA recoupling of (a) cimetidine hydrochloride salt, (b) cimetidine free form and (c) 10% free form mixture sample. The experimental times were (a, b) 2 h and (c) 6 h.



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).

References

- [1] Serajuddin, A. T. M. Adv. Drug Deliv. Rev. 2007, 59, 603.
- [2] Harris, R. K. Analyst 2006, 131, 351.
- [3] Brown, S. P. Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc. 2007, 50, 199.
- [4] Brown, S. P. Solid State Nucl. Magn. Reson. 2012, 41, 1.
- [5] Griffin, J. M., Martin, D. R., Brown, S. P. Angew. Chem. Ind. E. 2007, 46, 8036.

MAS下における二重回転照射異種核デカップリングの解析 ○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

Analysis of double-nutation heteronuclear dipolar decoupling under MAS

OAsato Wakisaka¹, Kazuvuki Takeda¹, and K.Takegoshi¹

¹ Division of Chemistry, Graduate School of Science, Kyoto University, Kyoto, Japan.

In solid-state NMR, TPPM decoupling is analyzed in term of double nutation. In this view, all recoupling bands that degrade decoupling efficiency appear along straight lines, giving a simple guideline for the choice of the desirable experimental parameters,

[緒言]

固体NMRにおける^HFデカップリング手法の中でTPPMデカップリングはその簡便さと 効果の高さから広く用いられている。TPPMはcwデカップルと比して高い効果を示すが, これは主デカップル場による一次の平均化に加えてそれと直交する副デカップル場 が二次の平均化を行うことによる。TPPMを実行する際には、パルス幅を主デカップル 場によるフリップ角がπになるように設定した上で、照射ラジオ波の強度と位相の2 パラメータを最適化する必要がある。ここで、デカップル照射によって相互作用ハミ ルトニアンに表れる時間依存性とMASの干渉を避けることが重要である。今回我々は、 二重回転照射デカップリング(Double nutation Decoupling: D-DEC)の考え方を用い たパラメータの最適化について報告する。

[D-DECの原理]

D-DECは、ラジオ波照射によって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。

$$U_{\rm rf}(t) = U_x(t)U_y(t) \quad \text{int} \quad U_\phi(t) = \exp(-2\pi i v_{1\phi} I_\phi t) \tag{1}$$

この $U_{\rm rf}(t)$ により、スピンをx軸とy軸まわりに同時にそれぞれ周波数 v_{1x} , v_{1y} で回転 させることができる。また、時間推進演算子U_{rf}(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。

$$H_{\rm rf} = i \frac{dU_{\rm rf}}{dt} U_{\rm rf}^{-1} \tag{2}$$

2

2

よって、D-DECのrfハミルトニアンは、(1)式と(2)式より求める事ができる。 $H_{\rm sc} = i \frac{dU_{\rm rf}}{dU_{\rm rf}} T^{-1}$

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

[TPPM との対応]

照射強度vで位相が $\pi/2 \pm \phi$,幅 $\tau = \pi/v\cos\phi$ のパルスを交互に照射する TPPM を考える。このときラジオ波のx成分のみが矩形関数状に周期的に変化する形になる。このうちデカップルで有効に働いているフーリエ級数展開の1次項のみを抜き出すと、TPPM における rf ハミルトニアンは以下の式で表される[1]。

$$H(t) = 2\pi \nu \left(\cos\phi I_y + \frac{4}{\pi}\cos(\nu\cos\phi t)\sin\phi I_x\right)$$
(4)

また, x成分の振動はxz平面上の2つの回転の和として表すことができ, そのうち片 方は無視できる。したがって式(4)は

$$H(t) \approx 2\pi \nu \left[\cos \phi I_y + \frac{2}{\pi} \sin \phi \left(\cos(\nu \cos \phi t) I_x - \sin(\nu \cos \phi t) \phi I_z \right) \right]$$
(5)

となる。式(5)は D-DEC の式(3)と同型であることから D-DEC は TPPM と等価であり, 以下の変数変換によって関連づけることができる。

$$\begin{cases} v_{1y} = v\cos\phi \\ v_{1x} = \frac{2}{\pi}v\sin\phi \end{cases}$$
(6)

式(6)に基づいて $v_{1y} - v_{1x}$ 平面上に等v線および等 ϕ 線を描画したものをFig.1(a)に示 す。逆に、 $v - \phi$ 平面上に等 v_{1x} 線と等 v_{1y} 線描画したものをFig.1(b)に示す。



Fig.1. Relationship between D-DEC and TPPM. In (a), constant v lines and constant ϕ lines are mapped in the D-DEC (v_{1y} - v_{1x}) plane. Conversely, constant v_{1y} , v_{1x} lines are mapped in the TPPM (v- ϕ) plane in (b).

[実験]

実験には 9. 4T マグネットと Chemagnetics 社製 3. 2mm T3 MAS プローブ, OPENCORE NMR 分光計を用いた。¹H と ¹³C のキャリア周波数はそれぞれ 400. 2409MHz, 100. 6505MHz で あった。2⁻¹³C ラベルグリシンの粉末試料を用いて、¹H⁻¹³C CPMAS 測定を様々なデカッ プル条件下で行い、CH₂ピークの高さを検証した。D-DEC 照射は、強度、位相、周波数 オフセットを式 (3) のそれぞれ $v_s(t)$ 、 $\phi(t)$ 、 $\Delta v_f(t)$ に従って、1 マイクロ秒毎に変調 して行った。

[結果と考察]

Exp.1. D-DEC と TPPM の対応の妥当性の検証

 v_{1y} =70kHz で v_{1x} を 0kHz から 40kHz まで変化 させた D-DEC と,式(6)により v_{1y} =70kHz に対応 する ϕ =2.5,5,7.5,10 deg の TPPM を用いて NMR 測定を行った。MAS 速度 v_{MAS} は 10kHz に設定し た。Fig. 2 に CH₂基のピーク高さを示す。TPPM のデータは導出された v_{1x} に相当する横軸上 に示した。

予想通り, TPPM のピーク高さは対応するべき D-DEC のものと一致した。

Exp. 2. デカップル効果の v_{1v}, v_{1x} 依存性



Fig.2. Peak heights of the methylene carbon in CPMAS spectrum of 2-¹³C labeled glycine measured under TPPM and D-DEC. v_{1y} of D-DEC was 70 kHz. Correspondingly, v and τ of TPPM were set according to Eq. (6).

Fig. 3に、D-DECの v_{1y} と v_{1x} をそれぞれ1kHzずつ変化させて得られたCH₂ピークの高さを示す。 v_{MAS} =10kHzのときは v_{1y} =20~100kHz、 v_{1x} =0~100kHzにわたって8000個の、また v_{MAS} =23kHzのときは v_{1y} =20~120kHz、 v_{1x} =0~100kHzにわたって10000個のスペクトルを取得した。

また,式(6)に従って対応づけることで,本実験で得られた実験結果をTPPMの*ν*-*φ*平面上に描画することができる。その描画結果をFig.4に示す。



Fig.3. Experimental ¹³C peak heights for the CH₂ group obtained in polycrystalline 2-¹³C labeled glycine under D-DEC with various sets of nutation frequencies v_{1y} and v_{1x} . MAS speed was 10 kHz in (a) and 23 kHz in (b). The data are normalized with that of cw decoupling with v=100 kHz in (a) and 120 kHz in (b).



Fig.4. The same data as those in Fig.3 plotted on the TPPM ν - ϕ plane using the mapping rule of Eq.(6)

Fig.3 中には、MAS との干渉によりデカップル効率が低下する v_{ly} 、 v_{lx} の組み合わせがバンド状に分布している。D-DEC により、 1 H- 13 C 双極子ハミルトニアン中の 1 H スピン演算子は、

$$I_z \to I_z \cos(2\pi v_{1y}t) \cos(2\pi v_{1x}t) + I_y \cos(2\pi v_{1y}t) \sin(2\pi v_{1x}t) - I_x \sin(2\pi v_{1y}t)$$

となり,周波数 v_{ly} , $v_{ly} = v_{lx}$ のフーリエ成分が現れる。これが kv_{MAS} (k = 1,2)に一致するところに明瞭なリカップルバンドが現れていることが分かる。また,他にも高次のリカップルバンドが,以下の条件で現れているのも見て取れる。

$$v_{1y}, v_{1y} \pm v_{1x} = kv_{MAS} \quad (k = 3,4)$$
$$v_{1x}, v_{1y} \pm 2v_{1x}, 2v_{1y} \pm v_{1x} = kv_{MAS} \quad (k = 1,2)$$

D-DECの最大の特徴は、全てのリカップルバンドが直線上に現れる点である。Fig.3 の結果は、リカップルバンドを避けるように v_{ly} 、 v_{lx} の組を選ぶことがデカップル効率 を最適化するポイントであることを示している。Fig.4で示すように、 $v \ge \phi$ をパラメ ータに用いるTPPMでは、これらのリカップルバンドは曲線となり、複雑に交差するこ とになる。

[結論]

 $(\phi = \pi/2$ の場合を除き、)TPPM照射は直交する二軸周りの二重回転照射に帰着する。 デカップル効率を (v,ϕ) のかわりに (v_{1y},v_{1x}) の関数としてプロットすると、MASとの干 渉により効率が低下するバンドは全て直線となる。よって、試料回転速度に対して避 けるべき (v_{1y},v_{1x}) の組み合わせが明確となる。

[参考文献]

[1] Z. Gan and R. R. Ernst, Solid State Nuclear Magnetic Resonance, vol. 8, no. 3, pp. 153–159, May 1997.

Easy tuning of high-resolution ¹**H NMR measurements** <u>Michal Malon</u>¹, Ivan Hung², Zhehong Gan² and Yusuke Nishiyama¹

¹ JEOL RESONANCE Inc., Tokyo, Japan. ² National High Magnetic Field Laboratory, Tallahassee, USA.

We will present two novel practical methods to optimize CRAMPS (Combined Rotation and Multiple Pulse Spectroscopy) pulse sequences for high resolution ¹H NMR (Nuclear Magnetic Resonance) measurements in solid state. There are many parameters which need to be optimized to achieve high resolution, such as rf-field strength, cycle time of CRAMPS, sampling window and spin rate (Figure 1a). If these parameters are adjusted correctly, the spectral resolution is best. In this sense, $T_2 \cdot \kappa_{cs}$ should be optimized to maximize the resolution, where T_2 is the transversal relaxation time and κ_{cs} is the scaling factor of CRAMPS. This optimization is traditionally done by visual inspection of a series of 1D CRAMPS spectra, which is a very time-consuming and tedious procedure.



Figure 1. Pulse sequences used in this study: windowed CRAMPS experiment (a), the spin echo experiment with constant echo delay (b) [1], the new spin echo experiment with variable echo delay (c) and the 1D ¹H-¹³C HMQC experiment (d).

A very useful and robust method to evaluate T_2 ' by a spin echo experiment was reported [1]. Keeping the total echo time τ constant, echo signal is collected with varying CRAMPS parameters (Figure 1b). Then we can easily find the optimum combination of parameters corresponding to the longest T_2 ' where the echo intensity gives the maximum. The 2D plot in Figure 2a shows ¹H spin echo intensity of glycine at 19 kHz MAS at variable rf-field strength v_1 and cycle time τ_c , and gives several conditions where T_2 ' is maximum. However, maximum T_2 ' does not necessarily correspond to maximum T_2 ' κ_{cs} term (*i.e.* resolution). As a consequence, most of these T_2 ' maxima have small κ_{cs} that leads to low resolution in CRAMPS spectra as shown in the middle section of Figure 2.



Figure 2. 2D plots and 1D CRAMPS spectra recorded with the spin echo experiments at 19 kHz on a JNM-ECA600 spectrometer (JEOL RESONANCE Inc.). Constant (a) and variable (b) spin echo delays were used, respectively.

Here we propose an improved method based on the spin echo experiment described above. If the total echo time is modulated so that τ / κ_{cs} is kept constant (Figure 1c), we can easily find the only condition which maximizes T_2 ' κ_{cs} and results in best resolution. It is obvious that κ_{cs} must be known in advance in this new experiment. Although κ_{cs} is traditionally determined from the peak separation in CRAMPS spectra, it has been shown that the scaling factor of wPMLG, TIMES and TIMES₀ homonuclear dipolar decoupling sequences can be predicted and this theoretical scaling factor well agrees with experimental one [2]. Figure 2b shows a 2D plot obtained with the new spin echo experiment. The number of maxima is greatly reduced and the optimum condition can be found easily. Resulting 1D high-resolution spectrum recorded with a long excitation pulse (810°) is also shown [3].

Finally, we propose a new CRAMPS optimization method based on 1D ${}^{1}\text{H}{}^{13}\text{C}$ HMQC (Figure 1d). This experiment requires ${}^{13}\text{C}$ isotopic enrichment of the standard sample, but its advantage over the spin echo experiment described above is that κ_{cs} does not need to be determined in advance. Therefore, it can potentially be applied to optimizing any homonuclear dipolar decoupling sequence.

References:

- [1] K. Mao, M. Pruski, J. Magn. Reson. 203 (2010) 144-149.
- [2] Y. Nishiyama, X. Lu, J. Trebosc, O. Lafon, Z. Gan, P.K. Madhu, J.-P. Amoureux, J. Magn. Reson. 214 (2012) 151-158.
- [3] X. Lu, O. Lafon, J. Trebosc, A.S.L. Thankamony, Y. Nishiyama, Z. Gan, P.K. Madhu, J.-P. Amoureux, J. Magn. Reson. 223 (2012) 219-227.

光を使った固体NMRの汎用高感度化法の開発

○松木 陽, Kris Frost, 笹原久武、藤原敏道 阪大・蛋白研

General Method for Sensitivity Enhancement of Solid-State NMR Using Laser Induced Paramagnetic Species

○Yoh Matsuki, Kris Frost, Hisamu Sasahara, and Toshimichi Fujiwara Institute for Protein Research, Osaka University, Suita, Japan

Laser induced radicals were formed *in situ* in attempt to promote the favorable photo-chemically induced DNP (CIDNP) in solids toward more widely useful technique. So far, we have observed signal enhancement not by DNP but by paramagnetic relaxation enhancement (PRE) of longitudinal magnetization. Laser irradiation of flavin-mononucleotide (FMN) molecules creates excited paramagnetic species, and the fast relaxation of neighboring protons was then transferred throughout the sample matrix via spin diffusion. The ¹H T₁ of the bulk matrix was reduced by a factor of up to ~5, which enhanced the unit-time sensitivity of ¹³C signal accumulated under cross-polarization. Since the laser is off during acquisition, the enhancement is achieved without paramagnetic line broadening. We will also report on our efforts on the creation of a suitable radical pair 'sensitizer' compound to achieve net polarization enhancement via solid-state CIDNP.

[緒言]

光CIDNP現象を使って固体NMR測定の感 度を一般的なかたちで向上できると、 次の点で大変魅力的である。すなわち 比較的安価な光源が使える事、室温に 近い高温条件でも高い核分極が得られ る可能性がある事、信号の取り込み中 は光励起をやめると常磁性種が消滅す るので信号の分解能を悪化させる心配 が無い事などである。光CIDNP法による ヒスチジンやトリプトファンのNMR信 号の増強現象は古くから溶液試料で観 測、利用されてきたが[1]、固体系試料 ではこれまでに光合成中心蛋白質や、 ある種の光受容体蛋白質(LOV1)の活性 部位近辺で観測されているだけである [2,3]。我々はLOV1の活性部位にも存在



Figure 1 About 2.5x S/N gain was obtained via photo-chemically induced paramagnetic (longitudinal) relaxation enhancement (photo-CI-PRE). ¹³C CP spectra of ¹³C-glucose in xylitol matrix recorded with and without laser irradiation. The polarization buildup time is 160s maximizing unit-time sensitivity under illumination. Sugar matrix (xylitol/D₂O=7/3) was doped with 5mM FMN.

し、可視光レーザーで容易に励起できるフラビン色素や、その誘導体などのごくあり

Sensitivity Enhancement, Solid-State NMR, photo-CIDNP

○まつきよう、くりすふろすと、ささはらひさむ、ふじわらとしみち

ふれた小分子だけで構成される「分極剤」を創出することで、固体系光CIDNP現象を もっと一般的に観測、利用できる様にしたいと考えた。「分極剤」は低温で可視光に 透明なガラス状態に転移するグリセロールマトリクスなどに、目的の溶質(蛋白質な ど)と共に溶かしておけば、発生した高い核分極はスピン拡散を通して巨視的な試料 全体に配る事が出来るはずである。

[結果]

まず、マジック角試料回転下でマトリクス中の色素分子を正しく光励起できるか確か めた。色素にはフラビンモノヌクレオチド(FMN)、リボフラビン、カンファーキノン、 マトリクスにはグリセロール/水やキシリトール/水系などを用いた。色素は475nm ダイオードレーザー(400mW)の連続照射で励起し、励起効率は光励起常磁性種による 核の縦緩和時間の促進効果から推測した。試料温度110K、マジック角試料回転4.5kHz の条件において、キシリトールマトリクス中、FMN(5mM)を用いたとき最大の緩和促 進効果が観測され、光照射下でプロトンT₁は約1/5になった。これは単位時間あたり約 2.5倍の感度上昇に相当する(Figure 1)。緩和促進効率は試料温度、マトリクスの種 類、マトリクス中の溶存酸素量、色素のモル吸光係数と相関していた。信号の取り込 み中はレーザー照射をしていない事から、信号のブロードニングやT₂'の減少はまっ たく観測されなかった。また、溶液系のCIDNP実験で問題となった光照射による色素 分子の劣化は、低温固体条件では数時間の連続光照射後でも観測されなかった。

緩和促進による時間あたりの感度向上ではなく、CIDNPによる正味の核分極の増大を 得るには、上述の光受容体蛋白質LOV1の活性中心付近の構造から推察して励起フラビ ン分子の近傍に適当な電子供与体を配置する事が必要と考えられる。そこで共有結合、 またはミセル状構造体を足場として利用しイミダゾール、ヒスチジンやトリプトファ ン分子など潜在的な電子供与体をリボフラビン分子と空間的に近接させる事を考え た。発表ではこれらの試みについても最新のデータを報告する。

[文献]

[1] K. Hun Mok et al. Nature 447, 106- (2007)

[2] S. Prakash et al. *JACS* **128**, 12794- (2006)

[3] S. Surendran et al. JACS 132, 15542- (2010)

MAS下の新CP法:異方性による低効率化の克服

○神原孝之¹,村上美和²,野田泰斗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 ²物質・材料研究機構(現職は京都大学 産官学連携本部)

Novel cross-polarization scheme under magic-angle spinning that can overcome the degrading effect by anisotropies

 \bigcirc Takayuki Kamihara¹, Miwa Murakami², Yasuto Noda¹, Kazuyuki Takeda¹, and K. Takegoshi¹

¹Division of Chemistry, Graduate School of Science, Kyoto University, Kyoto, Japan. ²National Institute for Materials Science, Ibaraki, Japan.

Cross-polarization (CP) is one of the most commonly used solid-state NMR techniques. One well-known problem for CP is as follows. For nuclei with large chemical shift anisotropy and/or quadrupolar interaction, it is known that spin lock under magic-angle spinning (MAS) becomes difficult, leading to inefficient CP.

In this work, we develop a new CP sequence effective for nuclei with large anisotropy. Its key feature is that the new CP does not use spin locking as CP occurs among the Z magnetization modulated by the combination of two pulses with the opposite phases each other. By alternating the phase of the pair pulse synchronous with MAS, one can realize CP, thus avoiding degradation by anisotropic interactions. The CP efficiency of this new pulse sequence is demonstrated on ¹⁹F-¹³C and ¹H-¹³C systems.

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。一般には、磁化をラジオ波(RF)が作る 磁場の方向にとどめておくスピンロックと、Hartmann-Hahn (H-H)条件を満たすことが必要とされている。しかし、異 方性の大きな核に対してmagic-angle spinning (MAS)下で CPを行う場合には、RFの照射強度が不十分であると異方性 のMASによる時間変化のためにスピンロック効率が低下 するため、CP効率が低下してしまうことが以前の研究から わかっている^{[1]-[3]}。ゆえにこれらの核でCPを行う場合には、



Fig. 1 The pulse unit used in a new CP sequence

MASで方向が時間変化するスピンロック磁場に断熱的に磁化を追随させるために極端に弱いRF強度を用いるか、異方性を無視できるほど強いRF強度を用いる必要がある^{[1][2]}。前者ではCP効率が低く、後者では強いRF照射により生じた熱が試料の劣化をもたらす可能性がある。本研究では、異方性によるCP効率の低下を克服する新たなCP法を開発しその効果を検証する。

交差分極,化学シフト異方性,¹⁹F

○かみはらたかゆき,むらかみみわ,のだやすと,たけだかずゆき,たけごしきよのり



Fig. 2 (a) Pulse sequence for the new CP sequence. (b) A diagram of the direction of phase rotation in the new CP sequence.

今回提唱する新CP法ではスピンロックパルスを用いず、代わりに位相をπだけ変え た2パルスの組(Fig. 1)を組み合わせたものを用いる。従来法では異方性によるRF オフセットの時間変化のためにスピンロック効率が低下していたが^[3]、本手法ではCP は縦磁化間で行われるために異方性の時間変化は原理的には影響しない。また、RF パルスを位相反転したペアで用いるために、RF磁場の不均一性の影響を抑えることが できる。

以前に、位相反転した 2 π パルスを組み合わせたCP法として composite 0° pulse cross-polarization (COMPOZER)^[4]を提示し、静止試料に対してその有効性を確認して いたが、COMPOZERではMASによって双極子相互作用が時間依存性を持つことによ りCP効率が大きく損なわれてしまっていた。新CP法はその弱点を克服しており実際 に以下に示すように、MAS条件下での有効性を¹H-¹³C間、¹⁹F-¹³C間で実証することが できた。以降、この新しいCP法をCOMPOZER with Z rotation (CPZ)法と呼ぶ。

2. 理論

COMPOZERでは I - S 間の双極子相互作用の平均ハミルトニアンとして $\tilde{H}_{d} = d(I_{+}S_{-} + I_{-}S_{+})$ 、つまり異種核間flip-flop相互作用を得て、縦磁化間でCPを実現していた。dは双極子相互作用の空間部分であるが、MAS下では時間依存し($d \rightarrow d(t)$)、 平均化されてゼロになるためにCP効率は低下していた。そこで平均ハミルトニアンのスピン部分にz回転を行うことを考えた。

$$\tilde{H}_d = d(t) \cdot (I_+ S_- + I_- S_+) e^{-i\omega t}$$
⁽¹⁾

z方向の回転であるために縦磁化間の交差分極を妨げることはせず、スピン部分のz回転とMAS回転によるd(t)の干渉によりMAS下でCPができると考えた。z軸周りの回転はRFパルスの照射位相を回転させることによって実現した。すなわち、RFパルスの照射位相 Φ_n を $\Phi_n = n \times \pi/4$ とすると、時間推進演算子 $U_0^{(n)}(t)$ は、

$$U_{0}^{(n)}(t) = e^{+i\frac{n\pi}{4}I_{z}}e^{-i\frac{n\pi}{4}I_{z}}e^{-i\frac{n\pi}{4}S_{z}}e^{-i\omega_{1}S_{x}t}e^{+i\frac{n\pi}{4}S_{z}}$$
(2)
と表される。これを双極子相互作用ハミルトニアンに作用させると、
 $\tilde{H}_{d}^{(n)}(t) = \{U_{0}^{(n)}(t)\}^{-1}H_{d}U_{0}^{(n)}(t)$
 $= \{U_{0}^{(n)}(t)\}^{-1}d(t)I_{z}S_{z}U_{0}^{(n)}(t)$
 $= d(t)(I_{z}\cos\omega_{11}t + I_{x}\sin\omega_{11}t\sin\frac{n\pi}{4} + I_{y}\sin\omega_{11}t\cos\frac{n\pi}{4}$
 $+S_{z}\cos\omega_{1s}t - S_{x}\sin\omega_{1s}t\sin\frac{n\pi}{4} + S_{y}\sin\omega_{1s}t\cos\frac{n\pi}{4})$
(3)

となる。 ω_{II} 、 ω_{IS} はそれぞれ I スピン、S スピンのRF照射強度である。d(t)は双極子 相互作用定数であり、以下のように表せる。

$$d(t) = C_1 \cos \omega_r t + C_2 \cos 2\omega_r t \qquad (C_1, C_2 : const.)$$
(4)

ω,はMAS周波数に対応している。式(3)の括弧内を整理すると、

$$\begin{split} \tilde{H}_{d}^{(n)}(t) &= d(t) \times \left\{ a_{zz}^{(n)} I_{z} S_{z} \left(\cos \Sigma t + \cos \Delta t \right) \right. \\ &+ \left(a_{xx}^{(n)} I_{x} S_{x} + a_{xy}^{(n)} I_{x} S_{y} + a_{yx}^{(n)} I_{y} S_{x} + a_{yy}^{(n)} I_{y} S_{y} \right) \left(\cos \Sigma t - \cos \Delta t \right) \\ &+ \left(a_{zx}^{(n)} I_{z} S_{x} + a_{zy}^{(n)} I_{z} S_{y} \right) \left(\sin \Sigma t + \sin \Delta t \right) \\ &+ \left(a_{xz}^{(n)} I_{x} S_{z} + a_{yz}^{(n)} I_{y} S_{z} \right) \left(\sin \Sigma t - \sin \Delta t \right) \right\} \end{split}$$
(5)

となる。ここでは $a_{ij}^{(n)}(i, j = x, y, z)$ は時刻tに無関係な定数とし、 $\Sigma = \omega_{II} + \omega_{IS}$ 、 $\Delta = \omega_{II} - \omega_{IS}$ とおいた。Fig. 2に示すように、RFパルスの照射位相をIスピンとSスピンで逆方向に回転させるようにした。パルスブロックを8個組み合わせたものに対し、 パルス幅を τ として平均ハミルトニアンを求めると、

$$\tilde{H}_{d} \propto f(\Sigma, \Delta, \tau) \left(I_{+} S_{-} + I_{-} S_{+} \right) \tag{6}$$

のようになり、flip-flop項が現れる。このハミルトニアンにより、MAS下でIスピンの縦磁化がSスピンの縦磁化に移る。

3. 実験·考察

3-1.¹H-¹³C間のCP効率の比較

試料としてアダマンタンを用い、MAS周波数を20 kHz、CPZに用いるパルス幅を6.25 μsとして、測定を行った。この幅はMAS周期の1/8に相当し、これにより式(5)中のsin を含む項が相殺される。この条件で平均ハミルトニアンを計算すると、

$$\bar{\tilde{H}}_{d} \propto \int_{0}^{2\tau} (\cos\Delta t - \cos\Sigma t) (C_{1}\cos\omega_{r}t + C_{2}\cos2\omega_{r}t) dt \times (I_{+}S_{-} + I_{-}S_{+})$$
(7)

となり、ハミルトニアンの大きさが Σ と Δ に依存することがわかる。Fig. 3にアダマン タンで¹H-¹³C間のCPプロファイル(¹³CのRF強度を50 kHzと一定にして、CP信号強度 の¹HのRF強度に対する依存性を見たもの)を示す。通常のCP(三角、点線)と比較 すると、H-H条件である Δ =0の位置を中心とした信号の増大が確認でき、さらにH-H 条件からのズレにも強いことがわかる。通常のCPで効率が悪いのはRF磁場の不均一 性のためだと考えられ、CPZは予想通りRF磁場の不均一性に強いことが示されている。



Fig. 3 CP profiles of adamantane for CPZ (circles and bold line) and conventional CP sequence (triangles and dashed line). RF amplitude for ¹³C channel was ca. 50 kHz in both experiments. The signal intensities were normalized by the intensity in its thermal equilibrium.



Fig. 4 CP profiles of poly(tetrafluoroethylene), $(-CF_{2}-)_n$, for CPZ (circles and bold line) and conventional CP sequence (triangles and dashed line). RF amplitude for ¹³C channel was ca. 50 kHz in both experiments. The signal intensities were normalized by the intensity in its thermal equilibrium.

3-2.¹⁹F-¹³C間のCP効率の比較

異方性の影響を検証するために、化学シフト異方性の大きな¹⁹Fに対してCPZを用いた。試料としてテフロン(-CF₂-)_nの粉末試料を用いて、従来のCPとCPZの効率比較を行った。ここではΔ=0でのマッチング条件ではなく、いわゆるサイドバンドマッチングがおこる照射条件を採用した。これは通常のCPではRF強度を大きくする必要があるが、CPZでは弱いRF条件でもCPを起こすことができることを示すためである。

MAS周波数を20 kHz、パルス幅を12.5 μ sとして、測定を行った(Fig. 4)。この幅は MAS周期の1/4に相当し、これにより式(5)中のsinを含む項が相殺される。またこの条 件では、 $\Delta = 0$ のときに cos Δt の項がゼロになるので、照射強度が等しい点では原理的 にはCPが起こらない。全体の信号強度が底上げされているのは、¹⁹F磁化が回復する 間に回復した¹³Cの縦磁化が足し合わされているためである。通常のCPでは効率の悪 くなるRF強度の小さい領域でも、CPZでは十分なCP効率を確保できていることが示さ れた。RF強度が大きい領域(~80 kHz)での効率はCPZのほうが悪い。この理由はま だ判っていないが、この領域でパルス幅が2 π パルス近くになっていることが関係し ているのではないかと考え、現在検討中である。

4. まとめ

MAS条件下において有効な新しいCP法(CPZ)を開発した。¹H-¹³C間のCP実験から、 CPZはH-H条件からのズレに強く、RF磁場の不均一性の影響が少ないことが示された。 また、¹⁹F-¹³C間のCP実験から、通常のCPではスピンロック効率が落ちるためCP効率 が低下していたRF強度の小さな領域においても、RF強度の大きな領域とほぼ変わら ない程度のCP効率を達成できた。

5. 参考文献

[1] Vega, A. J., J. Magn. Reson. 1992, 96, 50-68.

- [2] Vega, A. J., Solid State Nucl. Magn. Reson. 1992, 1, 17-32.
- [3] 神原ら、第51回NMR討論会要旨集 2012, P71, pp. 306-307.
- [4] Fukuchi, M.; Ramamoorthy, A.; Takegoshi, K., J. Magn. Reson. 2009, 196, 105-109.

平均ハミルトニアン理論と最適制御理論に基づく選択平 均パルスの数値的設計法

○陶山雷¹,田渕豊²,根来誠¹,北川勝浩¹ ¹阪大・基礎工学研究科 ²東大・先端科学研究センター

Numerical design method of selective averaging pulses based on averaging Hamiltonian theory and optimal control theory

○Rai Suyama¹, Yutaka Tabuchi², Makoto Negoro¹, Masahiro Kitagawa¹ ¹Graduate School of Engineering Science, Osaka University. ²Research Center for Advanced Science and Technology, The University of Tokyo.

In solid-state NMR, dipolar decoupling is very important. So far, many decoupling pulses have been designed on the basis of averaging Hamiltonian theory or optimal control theory. In this work, by means of numerical design method well based on the above two theories, we have designed a selective averaging pulse that keeps intended couplings and decouples other unwanted couplings like WHH-4 and MREV-8.

高分解能な固体NMR分光のためには不要な双極子相互作用をデカップルすることが 重要である.これを実現する方法として、マジック角試料回転とパルスによるデカッ プリングがある.後者は平均ハミルトニアン理論を基に、古くから研究が続けられて きた[1].近年、最適制御理論に基づいて、数値計算を用いたデカップリングパルス を設計する研究もいくつかなされている[2,3].この数値的設計法では、実験系の 制約で有限の強度と周波数帯域のパルス照射しかできない場合やパルスパラメータ に系統誤差がある場合等においては、デルタ関数パルスを仮定して設計されている古 典的な多重パルス系列より最適な解を見つけることができる.ただし、これまでの数 値的設計法では、系の詳細な情報を基に時間発展を逐一計算して最適な変調パルスを 求めるため、系の大きさにしたがって指数関数的に難しくなる.一方、古典的なアプ ローチでは系の詳細情報を必要としないうえに系の大きさに依存せずに系統的に設 計できる.私たちはこれらの二つの設計アプローチの双方の利点を生かすことのでき る統合的なデカップリングパルスの設計法を提案する[4].

[4]では,双極子相互作用による量子状態の破壊を防ぐため動的デカップリング波形を生成したが,本研究ではWHH-4やMREV-8のように同核双極子相互作用を除去し,残りの相互作用は除去しない選択平均パルスの設計を目指す.

固体中において I スピンの周りに多くの S スピンが存在し, 互いに双極子相互作用 により結合しているような系を考える. 系の状態発展は双極子相互作用による内部ハ ミルトニアンと RF 波による外部ハミルトニアンで記述される. 系の状態発展を理解

Key Words: デカップリング, 平均ハミルトニアン, 最適制御理論

○すやまらい,たぶちゆたか,ねごろまこと,きたがわまさひろ

しやすくするために外部ハミルトニアンによって内部ハミルトニアンを回転させ、ト グリング座標系に移行する、さらにIスピンとSスピンの異核双極子相互作用とSス ピン同士の同核双極子相互作用の平均ハミルトニアンの0次の項を計算すると、

$$\hat{\overline{\mathcal{H}}}_{I-S}^{(0)} = \frac{1}{T} d_{I-S} \sum_{\alpha} \left(\int_{0}^{T} c_{\alpha z}(t') dt' \right) \hat{I}_{z} \hat{S}_{\alpha,1} \qquad (1 \neq 3)$$

$$\hat{\overline{\mathcal{H}}}_{S-S}^{(0)} = \frac{1}{T} \sum_{k < k'} d_{S-S}^{(k,k')} \sum_{\beta,\beta'} \left(\int_{0}^{T} c_{\beta z}(t') c_{\beta' z}(t') - \frac{1}{2} \left(c_{\beta x}(t') c_{\beta' x}(t') + c_{\beta y}(t') c_{\beta' y}(t') \right) dt' \right) \hat{S}_{\beta,k} \hat{S}_{\beta',k'}$$

$$(2 \neq 3)$$

が得られる. Tはデカップリング波形の周期, d_{I-s} , d_{s-s} は結合定数, I_{a} , $S_{a,t}$ はそれ ぞれのスピンのスピン演算子である. c_a(t)は時刻 t におけるシステム変調行列と呼 ばれる.システム変調行列は RF 波のユニタリ行列から容易に求められる. 選択平均 パルスを設計するためには、第1式の括弧内を最大化し、第2式の括弧内を最小化す るような RF 波形を探索すればよい。上式の括弧内の二乗誤差をコスト関数とし、周 期性の条件を課すペナルティ関数を加えて非線形計画問題に帰着させ最適化を行う ことで選択平均パルスを設計した.RF波形をフーリエ級数によって表現し、次数を制 限することで周波数帯域を実現可能な範囲に制限した.

従来の数値最適化によるパルス設計法は、上式において結合定数や角運動量演算子 の形も含めて最適化することに対応し、スピン数に対して指数関数的に計算時間が増 大してしまう.平均ハミルトニアン法に基づいたパルス設計法では,理論家の試行錯 誤によってハミルトニアンの時間平均が零になるようなデカップリング波形を生み 出してきた.本研究で用いた設計法では平均ハミルトニアン法に基づいたパルス設計 法の最も難しい部分に最適制御理論を適用しており、2つのデカップリング波形設計 法の長所を組み合わせたものと言える.

発表では本研究で用いた理論について詳しく議論し、実際に設計した選択平均パ ルスを紹介する.

科研費(新学術領域研究21102004:量子サイバネティクス),科研費(若手研究B 24740273: 高利得スピン増幅の研究),最先端研究開発支援プログラム・量子情報処 理プロジェクト, JST 研究成果最適展開支援プログラムA-STEP (探索タイプ), G-COE プログラムの援助を受けておこなわれた.

References

[1] M. Mehring, "Principles of High Resolution NMR in Solids Second, Revised and Enlarged Edition" (Springer-Verlag, 1983).

[2] D. Sakellariou et al., Chem. Phys. Lett. 253, 319 (2000).

[3] N. Khaneja et al., J. Magn. Reson. 296, 172 (2005).

[4] Y. Tabuchi et al., arXiv:1208.5218 (2012).

*In-situ*マイクロ波照射NMRによる液晶分子の非平衡加熱 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

Observation on non-equilibrium local heating state of liquid crystal molecule by *in-situ* microwave irradiation NMR spectroscopy

○Yugo Tasei¹, Teruaki Fujito², Izuru Kawamura¹ and Akira Naito¹ ¹Graduate School of Engineering, Yokohama National University, Yokohama, Japan. ²Probe Laboratory, Japan.

Microwave heating is extensively used in activation of organic reaction as well as activity enhancement of the enzymes. These effects are considered to exist a 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 liquid crystalline molecules by in-situ microwave irradiation solid-state NMR. ¹H NMR signals of liquid crystal sample were measured under microwave irradiated condition. We have observed a non-equilibrium state appearing as changes of the chemical shift value and line width in the liquid crystalline sample at near the phase transition temperature.

<序論>

マイクロ波は波長が1 mmから3 mのラジオ波より高い周波数の電磁波であり、多く の物質はマイクロ波を照射すると発熱現象が起こる。近年、マイクロ波照射を用いる ことで有機合成の反応速度や酵素の働きに変化が生じることが多く報告されている。 マイクロ波加熱は他の加熱に比べて収率や反応性の向上、またエコロジーの面では必 要なエネルギーの大幅な減少といった様々な点から有用性は高く、加熱方法の一つと して注目されている。これらの現象は温度上昇だけでは説明できないために、マイク ロ波照射によって分子が特有な非平衡状態になっていると考えられている。しかしな がら、マイクロ波加熱による分子に対する直接効果と熱効果との分離が難しいことに 加えて、マイクロ波照射の影響を分子レベルで観測した例や実験方法が非常に少ない ことから分子レベルのマイクロ波加熱機構は詳細に理解されていない。そこで、本研 究では独自に開発した*In-situ*マイクロ波照射NMR分光器を用いてマイクロ波照射に よる物質の加熱機構を分子論的に解明することを目的としている。今回はマイクロ波

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

【In-situマイクロ波照射固体NMR分光器の開発】

In-situマイクロ波照射固体NMR分光器の模 式図をFig.1に示す。この分光器はマイクロ波 温度ジャンプ2DNMR分光器[1]に基づいて開 発しており、既存の固体NMR分光器 (Chemmagnetics CMX-400 infinity)にマグネト ロン(東京電子 1.3 kW, 2.45 GHz)とマイクロ 波共振回路が備えてあるプローブを組み込ん でいる。プローブ(Fig.2 左)ではラジオ波共振 回路の内側にマイクロ波共振回路を組み込み、 両方の周波数を同調させた。マイクロ波は分 光器の外部にあるマグネトロンから発生させ、 導波管を通して、同軸ケーブルに変換しNMR プローブ内に伝送して測定試料に照射される。 測定試料を挿入する電極セル(Fig.2 右)は石英 管の内側にコンダクターとして貼りつけてお り、同調回路とは銅泊を用いて接続している。 このようなマイクロ波とラジオ波の分離をよ くした二重同調回路の開発によってIn-situマイ クロ波照射NMRはマイクロ波照射中の物質を 分子レベルで解析できる実験方法として利用 できるようになった。

【NMR測定】

マイクロ波照射下のNMRスペクトルを観測 するために、測定試料を相転移点が40°Cの液 晶;1-cyano-4-(trans-4-propylcyclohexyl)benzene (PCH3)を用いて連続波(CW)によるマイクロ波 照射NMR測定を行った。PCH3の化学構造式と 等方相(50°C)の¹H NMRスペクトルをFig.3お よびFig.4にそれぞれ示す。¹H NMR測定は400 MHzの共鳴周波数で90°パルスは2.0 μ sで測定 を行った。試料管はマイクロ波を透過するガ ラス管を使用した。

NMR装置に付随している温度可変システム (空気加熱)を利用して液晶相(35 ℃)、液晶相 と等方相の混合状態(45.6 ℃)、等方相(46 ℃) と35 ℃からマイクロ波照射加熱した状態でそ れぞれNMR測定を行った。また、マイクロ波 加熱による液晶相(35 ℃)から等方相に相転移 する様子と、温度可変装置を利用して空気加 熱により液晶相(35 ℃)から等方相になる様子 を10秒ごとに繰り返し時間を0.5秒で8回積算 した。



Fig.1 Apparatus of *in-situ* microwave irradiated NMR



Fig.2 *In-situ* microwave irradiated NMR probe (Left : Probe head Right : Sample tube)



Fig.3 Structure and ¹H NMR spectrum of PCH3 (50 °C)

【結果】

PCH3 の A. 35 °C、B. 35 °C+マイクロ波、C. 45.6 °C、D. 46 °C で測定した ¹H NMR スペクトルを Fig.4 に示す。左側は 40 ppm から-40 ppm、右側は 7.5 ppm から-7.5 ppm の範囲を示している。 A. 35 °C では液晶相を示すブロードな NMR 信号になり、D. 46 °C では等方相を示すシャープな NMR 信号を得ることができた。C. 45.6 °C ではブロ ードな信号の液晶相とシャープな信号の等方相の混合状態を示す NMR 信号が現れた。 B. 35 °C+マイクロ波のスペクトルは液晶相からわずかに溶け出した等方相のピーク が確認できたが、C. 45.6 °C と D. 46 °C の NMR スペクトルに比べて等方相のピーク は 0.65 ppm ほど高磁場シフトしていた。Fig.5 は PCH3 の芳香環にある ¹H の温度によ るプロットであるが、温度が高いほどリニアに高磁場シフトすることがわかる。この 実験では 40 °C の温度上昇で 0.05 ppm のシフトがみられた。これを Fig.4 C の ¹H NMR スペクトルで見られた化学シフト変化にあてはめると 400 °C 以上の温度に相当する 等方相ピークが観測されたことになる。



Fig.4 ¹H NMR spectra of PCH3 (Left : $-40 \text{ ppm} \sim$ 40 ppm, Right : $-7.5 \text{ ppm} \sim 7.5 \text{ ppm}$) A : 46° C B : 45.6° C

 $C: 35^{\circ}C + Microwave irradiation D: 35^{\circ}C$

Fig. 4の結果よりマイクロ波によるNMRスペクトルの変化は液晶相と等方相の混合状態の時に大きな違いがあったので相転移時のスペクトルに注目してみた。そこでマイクロ波回路を再同調した装置で昇温過程における相転移点近傍の¹H NMR スペクトルの比較を行った。温度可変装置(空気加熱)による35℃から50℃の昇温過程ではFig.6. E に示すように110秒後の測定で等方相のピークが現れた。同じく35℃からのマイクロ波加熱による昇温過程ではFig.6. F に示すように120秒後の測定で等方相のピークが現れた。この実験ではピーク位置にシフトはみられなかったが、空気加熱ではブロードな信号になりマイクロ波加熱ではシ



Fig.5 Correlation between ¹H NMR chemical shift (ppm) and temperature (°C)



Fig.6 ¹H NMR spectra of phase transition from liquid crystal phase to isotropic phase (E : air heating 110 seconds, F : MW heating 120 seconds)

ャープな信号が得られ、線幅に顕著な違いが生じた。

【考察】

マイクロ波加熱の過程を観測したところ、液晶相と等方相の混合状態において¹H NMR スペクトルに空気加熱と比べて違いがみられた。これは液晶分子がマイクロ波 によって非平衡局所加熱状態になっていることを示唆している。空気加熱では熱接触 した部位から順々に相転移していくが(Fig.7 上)、マイクロ波加熱では分子がマイクロ 波により直接加熱された非平衡局所加熱状態を経て熱化することで平衡温度が上昇 して相転移していく(Fig.7 下)。相転移点付近で観測できた理由としては相転移の間に 潜熱があるために局所平衡状態に達するのが遅く、液晶相の NMR 信号はブロードに なるので等方相の非平衡局所加熱状態が区別して観測された。等方相のみになってし まうと平衡状態に戻る熱移動が速く、等方相の占有率がはるかに高くなるため平均化 されて観測できなかったと考えられる。



Fig.7 Local heating process and differentiation between thermal heating and microwave heating (Light gray: Local heating molecule, Dark gray: Isotoric phase molecule, Black: Liquid crystalline phase molecule)

今回、観測できた2種類(シフト変化を伴うものと伴わないもの)の非平衡局所加 熱状態の等方相は分子レベルの説明には以下の3つが考えられる。

I. 局所加熱による温度上昇(シフト変化を伴う)

分子が局所加熱され、液晶相と等方相の混合状態にも関わらずに誘電率の高い等方相 は相転移温度よりも非常に高温になっている状態。

Ⅱ. 部分的局所加熱(シフト変化を伴わない)

場所によってマイクロ波照射効率に違いあるとすると効率が悪い場合、部分的に局所 加熱され、等方相になるものの温度上昇は起こらなかった状態。

Ⅲ. マイクロ波の電場による回転運動

マイクロ波照射によって分子は電場の回転に追従しようとする動きによって一部の 分子の部分配向が残り、化学シフトや線幅に変化が起こったと状態。

【まとめ】

液晶試料において相転移点付近で非平衡加熱状態が観測された。この分子状態を特定 するにはさらにマイクロ波照射効率を上げた実験を行うことで明らかになるだろう。 【謝辞】

山上 拓也 学士、丑田 公規 教授(北里大学理学部)、佐藤 元泰 教授(中部大学工 学部)には実験結果について多くの助言を頂きました。

[1] A. Naito et al, Thermotropic Liquid Crystals, (2007) 85-116, Spriger

○高崎智弥,竹腰清乃理,武田和行 京都大学大学院・理学研究科

Susceptibility matching of an RF coil wound with paramagnetic-liquid-filled copper pipe.

○Tomoya Takasaki, K. Takegoshi, and Kazuyuki Takeda Division of Chemistry, Graduate School of Science, Kyoto University.

Even though a microcoil gives better sensitivity for tiny samples compared to typical coils, magnetic field inhomogeneity due to the coil susceptibility can cause serious line broadening. In this work, we propose to wind a microcoil with a thin copper pipe, and fill paramagnetic liquid inside the pipe, in order to cancel the diamagnetic susceptibility effect of copper.

【序論】

マイクロコイルを用いたNMRは、微量試料に対して感度よい測定が可能である。 しかし、コイルの系を小さくすると、コイルの磁化率に起因する不均一な磁場の影響でスペクトルの分解能が低下する。この問題を解消する二つの方法がある。一つ は、反磁性である銅線の周りを常磁性金属でコーティングしたzero-susceptibility wireを用いてマイクロコイルをつくる方法^[1]である。もう一つは、銅と近い磁化率を 持つ溶液(fluorinert)でマイクロコイルと試料の系を浸す方法^[2]である。

本研究では銅線の代わりに銅管を用いてマイクロコイルを巻き、銅管コイル内に常 磁性溶液を満たすことで磁化率の影響を打ち消す方法を提案する。これを用いると、 常磁性溶液の濃度を変化させることで、正味の磁化率を微調整できる。さらに、液 体を流すことによってコイルの温度上昇を抑制する効果も期待される。

【実験と方法】

Figure.1に内径/外径が0.1/0.2 mmの銅管を用いた手巻きソレノイドコイルを示す コイルの内径は0.5 mm、長さは2.5 mmである。

点Pにある磁化Mが、点Qに生成する磁場のZ成分B_zは次式のようになる。

$$B_{z}(Q \leftarrow P) = -\frac{\mu_{0}}{4\pi} M\left(\frac{1}{R^{3}} - \frac{3z^{2}}{R^{5}}\right)$$
$$\vec{R} = \vec{Q} - \vec{P}$$
$$z = (\vec{R})_{z}$$

ここで、 μ_0 は真空透磁率である。

susceptibility matching, microcoil

○たかさきともや、たけごしきよのり、たけだかずゆき

これを用いて、Fig.1のコイルの形状をもとに 磁化率の影響により生じる磁場の分布を計算した。

【結果と考察】

Figure.2にXZ平面内でのコイル内の磁場分布 (ppm単位)を示す。3つの磁場分布図はそれぞれ (a)銅線、(b)中空の銅管、(c)磁化率の影響を打ち 消すのに最適な濃度(2.4 M)を持つ硫酸銅水溶液 で満たされた銅管を用いた場合の結果である。 硫酸銅水溶液が満ちた銅管の正味の磁化率がゼロ になる硫酸銅水溶液の濃度を計算したところ2.3 M であった。つまり、コイルにした場合は銅管の正味



Figure 1. A solenoid coil wound with a copper pipe with inner/outer diameters of 0.1/0.2 mm. The inner diameter of the coil is 0.5 mm.

の磁化率がゼロより少し常磁性を示した方が最適であることがわかった。Fig.2において、全体的に磁場が右に寄っているのは、コイルが螺旋状でありY=0においてコイルが通過しているのが右側であることを意味する。(a)に比べて(b)の方が勾配が小さい。これは、(b)は中空の分だけ銅の磁化による影響が少ないためである。(c)では磁場分布の均一性が1桁以上改善されている。例えば7 Tの磁場で¹H(ラーモア周波数300 MHz)を観測する場合、(a)では10 Hzほどの線幅が生じるが、ここで提案する磁化率マッチング法(c)を用いると線幅は1 Hz以下になると予想される。



Figure 2. Contour plots of the calculated magnetic field in the XZ plane produced by the susceptibility effect of the coil wound with (a) a 0.2 mm copper wire, and (b) a hollow copper pipe with inner/outer diameters of 0.1/0.2 mm. The dimension of the coil described in Fig.1 is assumed. (c) shows field distribution when the pipe is filled with 2.4 M aqueous solution of CuSO₄.

【参考文献】

Zelaya FO, Crozier S, Dodd S, McKenna R, Doddrell DM, *J Magn Reson Ser A* 115:131-136 (1995).
 Olson DL, Peak TL, Webb AG, Magin RL, Sweedler JV, *Science* 270:1967-1970 (1995).

平均場近似を用いた核磁気相転移の解析 ○香川晃徳¹,北野崇博¹,根来誠¹,丸山勲²,北川勝浩¹ ¹阪大・基礎工

²福岡工大・情報工学

Analysis of nuclear magnetic phase transition using mean field approximation

 \bigcirc Akinori Kagawa¹, Takahiro Kitano¹, Makoto Negoro¹, Isao Maruyama², and Masahiro Kitagawa¹

¹Department of Engineering Science, Osaka University, Osaka, Japan.

²*Faculty of Information Engineering, Fukuoka Institute of Technology, Fukuoka, Japan.*

Highly polarized nuclear spin system can exhibit phase transition from paramagnetic phase to antiferromagnetic phase or ferromagnetic phase with domains. Roumpos proposed that quantum simulation can be implemented using multiple pulses, which transform the dipolar Hamiltonian between nuclear spins from Ising type to Hisenberg type.

Recently, we have achieved ¹H spin polarization of 34% in a *p*-terphenyl single crystal by dynamic nulear polarization (DNP) using triplet electron spins at room temperature. We calculated the necessary polarization to produce nuclear magnetic orderings in a *p*-terphenyl crystal using mean-field approximation for several static magnetic field orientations. The polarization with respect to one orientation can be achieved by using our experimental system.

一般的な量子多体問題は系が大きくなると、時間・空間的なリソースが指数的に増加してしまう。そのため通常のコンピュータを使って理論的解析を行うのは非常に困難である。そのような問題には、古典的な計算機に頼るのではなく、対象とする量子系を操作、観測等が容易な別の物理系でシミュレートして解析をすれば良いことがファインマンによって指摘された。そのような手法は量子シミュレーションと呼ばれており、光格子をはじめとする様々な系で実験が行われている[1]。

磁気相転移は、量子多体系で起こるよく知られた現象である。実験的には電子スピンによる磁気相転移の研究が活発に行われているが、核スピンも動的核偏極によって高偏極化した後に回転座標系での断熱消磁を行うことで常磁性相から反強磁性や強磁性相に相転移する[2]。回転座標系での断熱消磁を用いる場合、磁気相転移は試料と静磁場のなす角度やスピン温度に依存して様々な相ができる。また、そのような高偏極化した核スピン系に多重パルス系列を照射することで磁気相転移の量子シミュレーションが行なえるという提案がなされている[3]。これまで我々は動的核偏極により、*p*-テルフェニルにペンタセンをドープした単結晶中のHスピン偏極を室温で34%まで高めることに成功している。そこで、平均場近似を用いて*p*-テルフェニル単結晶

Magnetic phase transition, dynamic nuclear polarization, quantum simulation

○かがわあきのり,きたのたかひろ,ねごろまこと,まるやまいさお,きたがわまさひろ

の磁気相転移に必要な偏極率を求めた。

今回は蜂の巣格子に近い格子を構成で きる図1(a)のような両端の水素以外を重 水素化したp-テルフェニルについて考察 した。重水素でカップリングにより¹H-²Hス ピン間の結合は切れているとし、¹Hスピン のみに注目する。高磁場中での同種核双極 子相互作用ハミルトニアンℋは、

$$\mathcal{H}_{d}' = \sum_{i < j} A_{ij} \left(2I_{i}^{z}I_{j}^{z} - I_{i}^{x}I_{j}^{x} - I_{i}^{y}I_{j}^{y} \right) \quad (1)$$

で与えられる。*A_{ij}はスピンiとスピンj*間の 双極子結合の大きさを表し、*I^{*}_i、I^y_i、I^z_iは* それぞれスピンiのパウリ演算子に対応し ている。平均場近似を用いると双極子相互 作用ハミルトニアンの期待値は、



Fig. 1 (a) d_{12} -*p*-terphenyl. (b) Unit cell of *p*-terphenyl crystal[4]. Spheres indicate ¹H spins . (c) a layer of ¹H spins almost parallel to the a-b plane.

$$E_{d} = \langle \mathcal{H}_{d}' \rangle = \sum_{i < j} A_{ij} \left(2 \langle I_{i}^{z} \rangle \langle I_{j}^{z} \rangle - \langle I_{i}^{x} \rangle \langle I_{j}^{x} \rangle - \langle I_{i}^{y} \rangle \langle I_{j}^{y} \rangle \right)$$
(2)

となる[2]。平均場H_iを

$$H_i^x = \sum_j A_{ij} \langle I_j^x \rangle, \quad H_i^y = \sum_j A_{ij} \langle I_j^y \rangle, \quad H_i^z = -2 \sum_j A_{ij} \langle I_i^z \rangle$$
(3)

と定義する。Liの期待値は平均場Hiの中に置かれたスピン1/2を考えると、

$$\langle \mathbf{I}_i \rangle = \frac{1}{2} \tanh\left(\frac{\beta H_i}{2}\right) \frac{\mathbf{H}_i}{H_i} \tag{4}$$

で与えられる。ここで β は逆温度 $1/k_{\rm B}T$ ($k_{\rm B}$ はボルツマン定数)を表し H_i は ${
m H}_i$ の大きさである。

ある温度 T_c より高温側で $\langle I_i \rangle = 0$ 、低温側で $\langle I_i \rangle \neq 0$ となるような相転移温度 T_c が存在するとする。 $\langle I_i \rangle$ は相転移近傍で十分小さいので、 T_c 近傍では(4)を展開し、

$$\langle \mathbf{I}_i \rangle = \frac{\beta_c \mathbf{H}_i}{4} \tag{5}$$

となる。(5)式を(2)式に代入すると、

$$T_{\rm c} = -\frac{2E_d}{k_B N} \tag{6}$$

となる。ここで、Nは核スピンの総数である。回転座標系での断熱消磁を考えると、 エントロピー一定の条件から局所磁場の大きさをDとすると磁気相転移に必要な偏極 率P_iは、

$$P_{i} \sim \frac{D}{2|k_{B}T_{c}|} = \frac{1}{2|k_{B}T_{c}|} \sqrt{\frac{3}{4} \frac{1}{N} \sum_{i,j} A_{ij}^{2}}$$
(7)

となる[2,5]。相転移温度 T_c から絶対零度まで同じ磁気秩序もつと仮定すると、絶対 零度での安定な磁気秩序から E_d 、Dを求めることによって磁気相転移に必要な偏極率 を見積もることが可能である。但し、スピン温度には正負が存在するため $T \rightarrow \pm 0$ に ついて考える必要がある。

文献[5,6]の方法に基づいて*E*_d、*D*を求めた。磁場を結晶の*a、b、c*軸にかけた時の 磁気秩序を求めた結果、それぞれの磁場方向に対して図2のような磁気秩序が得られ た。図2の(a)、(b)、(c)、(d)の反強磁性の秩序についてはシングルスピンフリップ によるエネルギーの増減を調べて安定な秩序を求めた(モンテカルロ法)。(e)、(f) については予め起こりうるであろう具体的な秩序を仮定してその中から安定なもの を求めた結果である。(e)は静磁場方向に対して磁区が形成されている強磁性サンド イッチ構造となっている。(f)は、(e)の強磁性層を90度回転させたような構造をとっ ており、らせん構造の秩序のエネルギーとも縮退していると考えられる。

これらの磁気秩序から相転移温度と相転移に必要な偏極率を計算した結果を表1に 示す。この中で相転移に必要な偏極率が最も低いものは、磁場を*c*軸にかけ、スピン 温度を負にした(e)で21%であった。この結果と我々がすでに実験から得られている偏 極率を比較すると、室温で(e)の磁気秩序を観測できることが明らかになった。実験 的に得られる偏極率は、DNPを行う静磁場を大きくする、あるいは液体窒素温度程度 まで冷却を行うなどすればさらに上昇する可能性があり、(a)、(d)、(f)の相転移に ついても実験を行えると考えられる。今後は近距離の相関を考慮するなどして、より 正確な磁気相転移の偏極率を調べる予定である。また量子シミュレーションに向けた 多重パルス系列により生成されるハミルトニアン下での解析を行っていきたい。





Table 1 Estimated necessary polarization for nuclear magnetic phase transition.

$\mathbf{B}_0 \parallel \mathrm{to}$	T	$T_c \; (\mu \mathrm{K})$	P_i
a 軸	< 0	-0.228	0.39
a 軸	> 0	0.124	0.71
b 軸	< 0	-0.198	0.61
b軸	> 0	0.245	0.50
c軸	< 0	-0.325	0.21
c軸	> 0	0.163	0.42

【謝辞】

本研究は、科研費(新学術領域21102004:量子サイバネティクス)、科研費(若手B 25800230)、内閣府/日本学術振興会・最先端研究開発支援プログラム、大阪大学G-COE プログラムの支援を受けて行われた。 【参考文献】

- [1] I. Buluta et al., Science, **326** (2009) 108.
- [2] A. Abragam *et al.*, Nuclear magnetism order and disorder, Oxford University Press, (1982).
- [3] G. Roumpos et al., Phys. Rev. B, 75 (2007) 094415.
- [4] H. Rietveld et al., Acta Cryst. B, 26 (1970) 693.
- [5] P. Verheij et al., J. de Phys. I, 3 (1993) 2259.
- [6] J. C. Sprenkels et al., J. Phys. C, 16 (1983) 4425.

核スピン増幅を用いた量子非破壊測定 ○根来誠¹,立石健一郎²,西田辰介³,香川晃徳¹, 森田靖²,北川勝浩¹ ¹大阪大学大学院,基礎工学研究科 ²理研,仁科加速器研究センター ³大阪大学大学院,理学研究科

Quantum Non-Demolition Measurement with Nuclear Spin Amplification

○ Makoto Negoro¹, Kenichiro Tateishi², Shinsuke Nishida³, Akinori Kagawa¹,

Yasushi morita³, and Masahiro Kitagawa¹ ¹Graduate School of Engineering Science, Osaka University ²RIKEN Nishina Center for Accelerator-Based Science ³Graduate School of Science, Osaka University

Abstract: *Quantum non-demolition measurement*, measurement of the state of a quantum system without destroying it, has attracted attention in quantum optics, molecular optics, and quantum information science. *Spin amplification* means amplification of a spin component by copying to surrounding spins. In this work, we have demonstrated quantum nondemolition measurement with spin amplification scalable to a high gain using nuclear spin system.

量子状態の一成分を破壊せずに測定するには、例えばスピンのZ成分の偏極状態を非 破壊測定するには、補助スピンに対して測定したい成分を転写してから補助スピンのZ 成分を破壊して測定することで実現できる.これは量子光学の分野で考えられた方法で あるが、このときの検出器に入ってくる雑音が補助スピンのエネルギーより十分小さく なければ測定結果は正確ではない.一つの補助スピンへと何度も転写と観測を繰り返せ ば、積算回数Nに対して状態推定のSN比は √N で改善される.核スピンは非常に低エ ネルギーの量子状態で(数百 MHz から数十 MHz)ある.もっとも一般的な検出法であ る電磁誘導検出を用いる場合、熱雑音の方がはるかに大きいので単一量子ビットの非破 壊測定は難しい.検出器を数Kオーダーまで冷却したとしても、一つの核スピンからの 信号は 10⁶ 倍以上のエネルギーをもった熱雑音にうもれてしまい、単純な積算ではとて も検出できない.本研究では、このような低感度検出系での量子非破壊測定を可能にす る方法を紹介する.

興味対象のスピン(S)がたくさんのスピン(I)に囲まれている系を考える.このよう な系では、興味対象のスピン成分をまわりに転写してから、転写された側のスピンをま とめて観測すれば、大きな信号で状態測定が可能となる.この方法では転写の回数 N に 対してスピン成分が N 倍に、ならびに信号も N 倍に増幅されるのに対して、検出器の熱

Key Word: 量子非破壊測定,スピン増幅,動的核偏極 ねごろまこと、たていしけんいちろう、にしだしんすけ、かがわあきのり、もりたやす し、きたがわまさひろ



☑ 1: Schematic image of spin amplification.

雑音は一度しか混入しないので、SN 比は N 倍に改善される. この方法はスピン増幅と 呼ばれ、DiVincenzo によって提案された [1]. 以下のような手続きを考える. S スピンの Z 成分をまず I_b スピンというバッファに転写したあと、I_b スピンをまわりの多くの I ス ピンのどれかと Z 成分を交換し、再び S スピンの Z 成分を I_b スピンへと転写、I スピン との交換を繰り返す. このときの Z 成分との交換に固体中でのスピン拡散現象を利用す れば、高利得への拡張化が容易に実現できることが [2] で示された. I スピン数に対して 稼げる利得は線形に増やすことができ、普通に積算する方法に比べてはるかに大きな感 度向上が望める(図1 にスピン増幅のイメージ図を示す).

本研究では、サンプルに1-¹³C, 1-fluoro-*p*-terphenylをドープした*p*-terphenyl単結晶を 用いた.このサンプル中では、¹³C:¹⁹F:¹Hの比が、1:1:58となっている.この系では 光励起三重項電子を用いた動的核偏極 (triplet-DNP) で高偏極化が可能である [3].偏極 率を約 10%まで高めたスピン系を用いて利得 14 倍のスピン増幅をして、¹H スピンを測 定することで間接的に¹³C スピンの状態の非破壊測定を行うことに成功した.もし、偏 極率 100%の一つの補助スピンで非破壊測定するという量子光学の従来方法に比べても、 1.4 倍大きな信号を得ることができているということである.[2] で提案された方法は、 非常に拡張性が高い.拡張可能な高利得スピン増幅の実現は、スピン量子ビットの測定、 極微量スピン分光、スピンセンシング [4] などさまざまな応用を開拓できるであろう.

本研究は科研費(新学術領域研究 21102004:量子サイバネティクス),科研費(若手研究 B 24740273:高利得スピン増幅の研究),最先端研究開発支援プログラム・量子情報処理プロジェクト,JST 研究成果最適展開支援プログラム A-STEP(探索タイプ),G-COE プログラムの援助を受けておこなわれた.

References

- [1] D. DiVincenzo, Fortschr Phys. 48, 771 (2000).
- [2] M. Negoro, K. Tateishi, A. Kagawa, and M. kitagawa, Phys. Rev. Lett. 107, 050503 (2011).
- [3] 立石健一郎,根来誠,西田辰介,香川晃徳,森田靖,北川勝浩,「光励起三重項電子 スピンを用いた DNP による室温下での偏極率 34%の達成」第 52 回 NMR 討論会.
- [4] M. Schaffry, et al., Phys. Rev. Lett. 107, 207210 (2011).

〇大林輝一,赤羽英夫,糸崎秀夫 大阪大学大学院基礎工学研究科

The effect of near conductor on NQR planar antenna

OKouichi Obayashi, Hideo Sato-Akaba, Hideo Itozaki Graduate School of Science Engineering, Osaka University

Nuclear quadrupole resonance (NQR) spectroscopy can be applied to the detection of illicit drugs. Especially, detecting illicit drugs in human body is expected recently. However, conductive material such as human tissues affects the characteristic of the planar antenna. Hence we investigated a change in planar antenna characteristics by measuring the reflection coefficient (S_{11}) of the planar antenna close to the water. In addition, we estimated resistance and the parallel capacitance component which is added to the planar antenna close to the water by using the equivalent circuit representing antenna-water interactions and a circuit simulator.

【はじめに】核四極子共鳴(以下NQR)の計測はNMRで必要な核スピンを整列させるための静磁場が不要であるため、計測装置の簡易化が可能であり、ハンドヘルド型の検査装置など、非接触で化学物質を検知する技術への応用が可能である。特に多くの爆発物や不正薬物にはNQRを観測できる¹⁴Nが含まれることから、セキュリティ分野での利用が期待されている。

NQRによるセンシングを行う際、アンテナに導電性物質が近接することが考えられる。特に体内に隠匿された不正薬物などを対象とする場合、身体のような導電性の組織がアンテナに接近し、その特性に影響を及ぼす。このような影響の研究は生体NMRやMRIの分野で行われているが¹⁾²⁾、NQRによるセンシングを対象とした研究は行われていない。本研究ではNQRによるセンシングを行う際に平面アンテナに近接する導電体が、アンテナの特性に与える影響について検討を行った。

【NQR 用平面アンテナ】実験に用いるアンテナとして、直径 1mm の銅線を用いて直径 18cm、19 巻きの平面スパイラルコイルを作製した。コイルは真空コンデンサにより 1.368MHz で共振し、50Ω 整合となるよう調整した。

【近接導電体によるアンテナ特性への影響】導電性の物質として水道水を用いた。 Fig.1に示すように、作製した平面スパイラルコイルの表面と水道水の距離dを103mm から3mmまで変化させ、ネットワークアナライザにより反射係数(S11)を測定すること で共振特性の変化を観測した。

NQR, 平面アンテナ, 共振周波数シフト

○おおばやしこういち,あかばひでお,いとざきひでお

【実験結果・考察】Fig.2はアンテナと水の距離によ る反射係数(S11)の変化を示している。この結果より、 アンテナ表面と水の距離が近くなるにつれて共振 周波数の低周波側へのシフトと、Q値の低下が見ら れた。これは、コイルから発生する電場が水と電気 的結合することによってコイルに対して並列な容 量成分が増加し、その誘電損失が加わったためであ ると考えられる。近接する水の影響を考慮した共振 回路の等価回路は簡易的にはFig.3のようになる²⁾。 ここでCaは水との結合によって増加する容量成分、 R。は誘電損失を並列抵抗成分で表したものであり、 水とアンテナの距離によってこのパラメータが変 化すると考えている。この等価回路を回路シミュレ ータであるLTspice上で作成し、反射係数の測定結 果のフィッティングを行うことでCa、Raの値を予測 した。Fig.4はシミュレーションにより予測したCa とZaの値を示している。この結果より、アンテナと 水の距離dが小さくなるとCaは増加、Raは減少し、 d=3mmのときにはCa=10.2pF、Ra=200kΩ程度となる ことがわかった。

【結論】平面アンテナを水に近づけ、反射係数の 測定を行うことで特性の変化を観測した。また、 等価回路のシミュレーションを用いて、アンテナ に付加された並列容量成分と抵抗成分の予測を行 った。



Fig.1 Schematic figure of planar antenna and closing water.



Fig.2 The reflection coefficient (S_{11}) of planar antenna with different distance from the water surface.



Fig.3 The equivalent circuit of planar antenna and closing water.



Fig.4 Estimated capacitance C_a and estimated resistance R_a as a function of distance between the planar antenna and water.

参考文献

- 1) D. I. Hoult and P. C. Lauterbur, J. Magn. Reson, 34, 425 (1979).
- 2) D. G. Gadian, J. Magn. Reson, 34, 449 (1979).

P119 低γ核種の観測感度向上に適したクライオコイル MAS の実用化開発

<u>水野 敬¹</u>、戸田 充¹、藤岡 耕治²、竹腰清乃理³ ¹(株)JEOL RESONANCE, ²(株)クライオウェア, ³京都大学大学院理学研究科,

Development of a single-tuned Cryocoil MAS probe suitable for low-gamma nuclei Takashi Mizuno¹, Mitsuru Toda¹, K. Takegoshi², Koji Fujioka³ ¹ JEOL RESONANCE Inc., ² Depatrment of Chemistry, Kyoto University, ³ Cryoware Inc.

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 (5^{th} type) of Cryocoil MAS (4mm 300 MHz single-tuned probe for 7 to 14 Tesla wide-bore SCM, Max. Spinning speed < 18kHz). The attained specification for S/N gain are discussed.

NMRにおける感度向上の方法として、検出系(検出コイル、プリアンプ)の冷却という アイディアは以前から提案・実験されてきた^[1,2,3]。検出コイルの導体金属の熱雑音強度は 温度と高周波抵抗の平方根に依存するから、なんらかの手段で検出系を低温化できれば、 雑音を減らし感度向上ができる。我々は、この原理に基づき、試料を室温下でMAS(マジ ック角試料回転)しつつ検出系を10~20Kの低温下に置いたCryocoil MASプローブを提案・ 開発してきた^[4,5]。初期試作機は、実証機として、無機物(⁶Li: 44.1MHz @ 7T)向けの単 核共鳴プローブとして作製され、感度(対市販機比)4.17倍を達成した^[6]。今回、我々が開発 したCryocoil MAS プローブ試作5号機は、4mm試料管(試料回転速度<18 kHz)を搭載し、 7T, 9.4T, 11.5T, 14Tのワイドボアマグネット(JASTEC製)に対して装着可能で、⁶Li(共鳴周 波数88.3MHz @ 14T)をターゲットとした単核共鳴回路を構成した実用試作機である。

試作機および専用冷凍機の写真を示す(Figure 1)。この他、プローブを磁場中に挿入し 固定した状態で試料管の交換機構と、マジック角の微調整が可能な機構を製作した。性能 のデモンストレーションのために、京都大学竹腰研にてNMR試験を行い、RF磁場強度の向 上度および感度向上率を確認した。パワーアンプの入射電力に対するRF磁場強度の実験デ ータ(Figure 2)を示す。低温化によるコイルQ値の向上(Q=120→465)に相当するRF磁場の 照射効率の向上を確認した。感度向上度を確かめるため、同一試料による同一積算回数で の1パルス測定のスペクトルを比較した(Figure 3)。同一試作機での室温→低温の感度向 上率は、メインピークの強度で比較した場合、信号強度が2.88倍、雑音強度が0.75倍で、3.84 倍となった。雑音強度の低下率が悪いのは、プリアンプを効率よく冷却できなかったため と推定される。そのサイドバンドに注目すると、室温下ではノイズに埋もれていたLiCoO2 のマイナーピークが低温下ではノイズから判別可能な強度が得られていることが分かる。

今後、低γ核種や微量成分等の実用性の高い応用に向けて、チューニングレンジの広帯 域化を図ることを検討している。

Keywords: プローブ、固体NMR、感度向上

○みずのたかし、とだみつる、たけごしきよのり、ふじおかこうじ


Figure 1. Photo of the prototype 5^{th} of Cryocoil MAS probe (a) attached with gaseous helium refrigeration (b) / circulation (c) system through the transfer tube (d) of 2m length.

(a)

(b)

20

10

0

Offset/kHz

-10

-20



Figure 3. For demonstration of sensitivity enhancement, ⁶Li MAS-NMR spectra using the prototype 5th of Cryocoil MAS with the same experimental condition applied for Cryo-temp. operation (a, c), and for Room temp. operation (b, d). The sample is fully labeled ⁶LiCoO₂. (a) and (b) show entire spectra for comparison of noise level, where each spectrum height is scaled as 3.8% for that of main peak, and asterisks (*) correspond to sidebands of main peak. (c) and (d) show the sideband peak of (a) and (b) for high-field side (hatched region), where the noise level of both spectra is scaled as same.

experimental condition: Magnet:14T WB-SCM (JASTEC), Spectrometer: JNM-ECA600. Carrier Freq. (⁶Li): 88.30 MHz. Pulse sequence: 1 pulse, 64 FID accumulated w/ repetition time of 32 s. MAS speed: 17.1 kHz. Sample weight: 170 mg.[Cryo-temp. operation] Coil temp.:15K, ⁶Li Pulse width (90 deg.) : 4.25 us (@input power 88W); [Room-temp. operation] Coil temp.:298 K, ⁶Li Pulse width (90 deg.):8.0 us (@input power 88W).

References [1]D.I. Hoult et al., JMR 24,71 (1976), [2]J. Lepaisant et al., RSI 55,521 (1984), [3]P. Styles et al., JMR 60,397 (1984), [4]T. Mizuno et al., RSI 79, 044706 (2008), [5]T. Mizuno et al., RSI 80, 124702 (2009), [6]T. Mizuno et al., "Sensitivity enhancement of high-resolution solid-state NMR: a Cryocoil MAS probe's approach", 第 49 回 NMR 討論会(2010),東京

X₀シムコイルの性能及び再現性の向上

○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 performance and reproducibility of X₀ shim coil

OMatsunaga Tatsuya¹, Takashi Mizuno², K. Takegoshi¹ ¹Division of Chemistry, Graduate School of Science, Kyoto University, Kyoto, Japan ²JEOL RESONANCE INC, Tokyo, Japan.

Recently we proposed the X_0 shim coil, which is a new method for fine adjustment of the sample spinning angle of Magic Angle Spinning (MAS) by tilting the static filed instead of the spinning axis. In this work, we report modification of the X_0 shim coil to reduce the inhomogeneous magnetic field and the tilting due to the Lorentz force by optimizing its design.

Magic Angle Spinning (MAS)は試料を静磁場に対してマジック角 $\cos^{-1}1/\sqrt{3}$ だけ傾けた軸で試料を高速回転す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

化する手法である。四極子核を始めとする広幅ス ペクトルを持った物質のNMR測定^[1]やSTMAS^[2]の実 験では0.01。以下の試料回転角度誤差がスペクト ルの線型に影響するため精度の高い角度調整を求 められるが、この調整は従来のネジによる機械的 動作に頼る方法では困難であった。そこで、我々 は電磁気的に試料回転角度の調整を行えるX。シム コイルを提案し、開発を行ってきた^{[3],[4]}。これは 静磁場B₀に対して垂直な均一磁場B_xを作ることで 試料の受ける有効磁場Beffの向きを微小角度変化 させる手法である(Fig 1)。前回製作したX。シムコ イルは最大10 Aの電流に対して理論的には範囲± 0.05°、分解能5×10^{-6°}で角度を操作可能であっ たが、隠逸磁場Brの印加に伴う磁場不均一性、お よびローレンツ力によるプローブの傾きによるス ペクトルへの悪影響が顕著であった。

この問題を克服するため対し我々はコイルの作 る磁場分布を計算し、コイル形状を最適化すると 共にX₀シムコイル全体の設計見直しを行った。

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



Fig. 1 Schematic of an X_0 shim coil. 2*a*, 2*l* and 2*a* indicates the coil size; respectively, its diameter, height and gap angle between two opposed arcs. θ is sample spinning angle. *d* axis lays along the sample spinning axis to designate the position in the sample.

Fig. 1において磁場中心では X₀シムコイルが作る 磁場はx軸方向の磁場Brだけだが、中心から外れた位 置ではy,z軸方向に余剰磁場B_v,B_zが発生しB_xは弱く なる。試料回転軸はxz平面上に存在するため、y軸方 向へは試料の分布が少なく、またy軸方向の磁場不均 一性は MAS で平均化されるためByは無視できる。ま た、Bzは直接スペクトルをシフトさせるが、Bxは合成 磁場Beffの強度変化として間接的にスペクトルをシ フトさせるため、その不均一性がスペクトルに与える 影響はB,に比べて小さい。結局B,の不均一性が小さく なるコイル形状が望ましい。

我々は X。シムコイルを直線部分とコイルの上下に 位置する円弧部分に分割し、コイルサイズ2a. 2l.

 2α が与える B_r , B_r の不均一性への影響を計算した。こ れによりコイル高さがコイル半径の約2倍である時、 Bzの不均一性がほぼ0となることが分かった。そこで このコイル高さの最適化条件を用い、巻き数を増やす ことで生成磁場が以前の約2倍となるコイルを製作 した(Fig. 2, 3)。

また、ローレンツ力に対してプローブをマグネット に固定するための固定器具の設計も見直し、固定器具 とコイルを一体化するなどしてローレンツ力によるプ ローブの傾きを以前より小さくすることに成功した。 実際の NMR 測定による X₀シムコイルの性能検証は当日 紹介する。

今回の X_aシムコイルの設計見直しによって磁場均一 性やプローブの安定性を損なうことなくより強いBr磁 場を使えるようになった。これにより X₀シムコイルで 操作出来る角度範囲が増えるだけでなく、より強い静 磁場での X。シムコイルの運用も期待できる。高磁場の 普及により、線幅の広い核種の測定とそれに伴った正 確な角度調整が必要となる場面が多くなる事が予想さ れる。その際の効率的かつ正確な固体 NMR 測定に X₀シ ムコイルが大きく貢献すると考えられる。

本研究は、京都大学と(株) JEOL RESONANCE との共同 研究の一環として行われた。

Reference

- [1] T. Mizuno et al., J. Am. Chem. Soc., 128, 9683-9686 (2006),
- [2] C. Hunuenard et al., J. Magn. Res., 156, 131-137 (2002),
- [3] T. Matsunaga et al., 第 51 回固体 NMR・材料フォーラム P125 (2012)
- [4] K. Takegoshi et al., 特開 2011-075472, US Appl. 12885861.



Fig 2 Calculation of space distribution of the magnetic field produced by the X_0 shim coil, $B_z(d)$ and $B_x(d)$ when 10 A current flows on the new- (square) and the previous -design coil (cross).



Fig.3 Picture of the new designed X₀ shim coil and the retainer. It's inserted in the main magnet from the top and joins with the probe in the magnet.

常磁性シム —可変磁場の空間的均一性の向上

〇一条直規、武田和行、竹腰清乃理 京都大学大学院 理学研究科

Paramagnetic shim

-Improvement in homogeneity of variable magnetic field

ONaoki Ichijo, Kazuyuki Takeda and K. Takegoshi Graduate School of Science, Kyoto University, Kyoto, Japan.

High-resolution NMR experiment requires highly uniform magnetic field. To homogenize the magnetic field, electric current shims (active shims) and/or passive shims are employed. The latter is performed by placing iron pieces inside the magnet bore in such a way that the gradient of the original field is cancelled. In this work, we propose a new passive shimming strategy using paramagnetic pieces. This method is suitable for experiments in which the field value of a superconducting magnet is varied, since the magnetization, and thereby the compensation field, produced by the paramagnetic material is proportional to the main field. It follows that once the shimming has been complete for one field strength, the paramagnetic shim would work for any other field values without changing the configuration of the shim pieces. This work opens the possibility of high-resolution, field-variable NMR.

高分解能NMRには空間的均一性の高い磁場が不可欠である。そのために用いられ る電流シム(能動シム)とは、シムコイルを流れる電流が誘起する勾配磁場によって メインマグネットの補正を行うものである。シムコイルの形状を工夫することで様々 なプロファイルの磁場を生成する能動シムが考案されている[1,2, etc.]。電流シムと並 ぶ方法として、受動シムと呼ばれるものがある。受動シムとは、メインマグネット内 に多数の鉄片を配置し、鉄片が成す磁場によってメインマグネットの不均一性を補償 する手法である[3]。

電流シム、受動シムのいずれも一定強度の磁場の補正を前提としている。現在一 般的に行われている高分解能NMR実験では、磁場強度を変化させることはあまりない。 しかし、磁場強度を変えて行う高分解能NMRもまた、興味深い実験である。我々が最 近開発した、NMRを用いた定量的元素分析法[4]がその一例である。磁場可変NMR実 験では、周波数一定の下で異なる核種にアクセス可能であるため、測定核種によって 測定システムを変更するという煩わしい作業が不要なだけでなく、全ての核種に対し て検出効率が同一となり信号強度比から異種核間の存在比を定量できるという利点 がある。ただし、この研究で用いられた磁場可変型超伝導マグネット(Cryogenic Ltd.) は、磁場の空間的均一性が低く、得られるスペクトルの分解能が制限されるという点 に課題が残った。

可変磁場、受動シム

○いちじょうなおき、たけだかずゆき、たけごしきよのり

本研究の目的は、可変磁場に有効な均一化機構を開発し、磁場可変高分解能 NMR の可能性を拓くことにある。本研究では、鉄片の代わりに常磁性のシム片を用いるこ とで、シムのつくる磁場がメインマグネットの可変磁場に追随するようにし、シムの 材料・サイズ・配置を一切変更することなしに、磁場強度の全可変領域において磁場 均一度を向上させる新たな受動シムのストラテジーを提案する。今回、上記の磁場可 変型超伝導マグネットの中心軸上における磁場補正を行い、この構想の実現可能性を 示す。以下にその具体的な手順を述べる。

常磁性シムの設計は、次の点に基づいて行う。まずシム片は、常磁性体の粉末を 円柱形にプレス成形して作製する。このシムペレットを2個作製し、それらをFig. 1 のように配置する。ただしz軸はマグネットボアの中心軸にとる。このように配置さ れた常磁性シムは、磁束密度 B₀の磁場が印加されると磁化され

で表される磁場をつくる。ただし χ_v は常磁性材料の体積磁化率であり、 $s \equiv d + t$ である。

シムを設計・製作するために、用いたマグネットにおける磁場分布の取得を試みた。このために、マイクロコイルを用いた可動式 NMR プローブを作製した。プロー

ブをマグネット内で精密に動かして、^IHの共 鳴周波数から磁場分布を求めた。これをzの 関数として表し、式(1)との和すなわち補正 後の磁場分布がzに依存しない定数になる ように χ_{v} ,R,d,tの値を定めた。その結果、現 実的な磁化率の値で磁場勾配の補正が可能 であることを見出した。

[1] M.J.E. Golay, Rev. Sci. Instrum., 29, 313 (1958).

[2] E.T. Jaynes, et al., U. S. Patent 3,566,255 (filed: 1959, patented: 1971).

[3] D.I. Hoult, et al., *Rev. Sci. Instrum.*, **56**, 131 (1985).

[4] K. Takeda, et al., J. Magn. Reson., 224, 48 (2012).



Fig.1 常磁性シムの配置と各パラメータ。

周波数可変磁気共鳴装置によるパイ共役系高分子デバイス向 け分子運動測定法の開発 ○福田國統、浅川直紀

群大理工院

Development of a measurement methodology of molecular dynamics for π -conjugated polymer electronics devices by a variable frequency magnetic resonance instrument

○ Kunito Fukuda and Naoki Asakawa

Division of Molecular Science, Faculty of Science and Technology, Gunma University, 1-5-1 Tenjincho, Kiryu, Gunma 376-8515, JAPAN, email: asakawa@.gunma-u.ac.jp

We developed a variable resonance/modulation frequency magnetic resonance instrument for measurements of molecular dynamics. The spectrometer could be useful to study molecular dynamics of π -conjugated polymers that would be correlated with performance of electronic devices in the post-silicon era: organic devices, bio-inspired stochastic devices, spintronics devices, etc.

緒言

P122

パイ共役系高分子は、低コスト・大面積化・フレキシブルといった魅力から電子デ バイス材料として注目を集めている。しかし、パイ共役系高分子では、分子運動がキャリ ア移動度へ影響を与える場合があることが理論的に予測されている。実際に、構造制御型 ポリ(3-ヘキシルチオフェン)は、低温でのキャリアの熱活性トラップ/デトラップ伝導が、 室温より高温側ではチオフェン環のツイスト運動によって阻害されていることが指摘され ている。そのため、その分子運動性を解明することはデバイス開発を効率的に行うために は必要不可欠と考えられる。

しかし、デバイス状態での分子運動の研究は、方法論が限定的であるため殆ど進んで いない。磁気共鳴測定は、その簡便さからデバイスの分子運動の計測にとって有用であ り、周波数可変測定は、ゆらぎのスペクトル密度関数に関する情報の取得という観点から 重要であるにも係わらずほとんど用いられていない。本研究では、共鳴周波数可変磁気共 鳴法および変調周波数可変法による分子運動計測法が、揺らぎの次元性および相関時間の 情報を含むスペクトル密度関数を広周波数領域に取得可能と考え、そのための装置開発を 行っている。

実験

自作した ESR 装置 (Fig.1) により、ESR 測定 として標準物質である 1-ジフェニル-2-ピクリ ルヒドラジル (DPPH)のスペクトルを得た。 次に、共鳴周波数可変装置へと拡張するため に、共鳴周波数を決定づける装置である空洞 共振器の改良を行った。改良方法として空洞 共振器に自作の waveguide window を付け加え た。これにより空洞共振器の長さを段階的に 変化させ、周波数可変の空洞共振器を作製し た。さらに、同一の空洞共振器が持つ異なる 共振モードを利用し、より多くの共振周波数 を持つキャビティを作製した。



Fig. 1: Microwave transmission circuits and an electromagnet part of ESR instrument

 π -conjugated polymer, Molecular dynamics, Organic devices ○ふくだくにと、あさかわなおき

結果・考察

この空洞共振器の寸法と、異なる共振モー ドに対応した周波数において、Qディップ の発生が観測され、これにより周波数可 変の空洞共振器が作製されたことを確認 した。この空洞共振器を組込んだESR 測定装置を開発し、DPPH粉末のESR 測定 を試みた。Fig.2に示されたとおり、それ ぞれの共鳴磁場において、対応した共鳴 周波数によるESR スペクトルを得ること に成功した。

この様な空洞共振器の完全な交換を必要としない、簡便な周波数可変の磁気共鳴装置の開発は、パイ共役系高分子デバイスの伝導機構や、分子運動性の解明に貢献すると考えられる。また、これらESRを部分装置とする光検出磁気共鳴装置への応用も考えられる。



Fig. 2: Variable frequency ESR spectra of a powderd DPPH

さらに、開発した磁気共鳴装置では、 試料に印加されるマイクロ波強度変調(AM)、マイクロ波周波数変調(FM)、磁場変調、あ るいは、励起光強度変調と、複数の変調系を使用可能であり、変調周波数可変の磁気共鳴 測定が可能と考えられる。

この変調周波数可変により、共鳴周波数可変測定では取得が困難なより低周波(100Hz~) 領域における分子運動のスペクトル密度関数が得られると考えられる。スペクトル密度関 数には、その関数型として、Ising、XY、Heisenbergモデルといったスピン自由度の次元 性と、スピン間の連鎖構造の次元性に関する情報が含まれる。これは、デバイス中のスピ ンダイナミクスの議論や金属絶縁体相転移の機構を解明する場合、特に重要となる。パイ 共役系高分子デバイスでは、スペクトル密度関数は分子運動の相関時間の分布に関する情 報をも含むため重要な情報となる。

さらに、観測可能な周波数領域の拡張のみならず、この分子運動計測法の結果が、超 微細結合を積極的に活用した動的核分極法や電子-核二重共鳴法と同じ周波数領域を観測 した場合に、分子運動とキャリアダイナミクスの関係性が異なる形でスペクトルや緩和時 間に現れると考えられる。本発表では、そのための装置開発の現状について報告する。

謝辞

謝辞: 本研究の一部は、科研費基盤研究 (B)(21350125) によって遂行された。

ソフトウェア定義磁気共鳴分光計の開発 (阪大院基)〇佐伯保明、一村裕基、根来誠、北川勝浩

Development of software defined magnetic resonance spectrometer

OYasuaki Saeki, Yuki Ichimura, Makoto Negoro, and Masahiro Kitagawa Graduate School of Engineering Science, Osaka University

Abstract: We have developed a software defined magnetic resonance (SDMR) spectrometer. The SDMR spectrometer has good flexibility of a functional specification such as frequency band because most of functions in the spectrometer are defined by software. By adapting general-purpose measurement apparatus as hardware of the spectrometer, we can expect cost reduction and sustanable development. We have developed a wide range of models, from low-end model to high-end model.

磁気共鳴分光システムは、近年の発展が目覚ましい無線通信システムに似ている。 磁気共鳴分光システムは、スピンを操作するための変調情報をのせたある周波数帯の 電磁波をプローブに送信し、対象となる系の情報がのった電磁波を受信する、いわば スピンとの通信装置といえる。

無線通信の分野において、世 界各地で異なる周波数帯や変調 方式、通信モードに対応するた めにソフトウェア定義無線とい うアイディアが考えられた。こ れは、画一化されたハードウェ アを用いて、出来るだけソフト ウェアで自由度を確保するとい う設計思想である。このような アイディアをもとにしたソフト



Fig1: Diagram of SDMR spectormeter

ウェア定義磁気共鳴 (SDMR: Software Defined Magnetic Resonance) 分光システムを提 案する。ハードウェアとして汎用計測機器を用いることで、広い市場が支える持続可 能な発展や低コスト化が期待できる。具体的には送信部に任意波形発生器(AWG: Arbitrary Waveform Generator)を使用し、受信部にはオシロスコープを使用する。Fig. 1 に全体図を示す。送信波形の強度、位相、周波数の変調や受信信号の復調はディジタ ル処理に任せる。これによって、方式の変更の多くをソフトウェアで吸収できる。

ローエンド用途のために開発したSDMR分光システムは、AWGとして33522A (Agilent社) とオシロスコープとしてDSO-X3012A (Agilent社)を用いる。33522A は帯 域が30 MHzで垂直分解能が16 bitで、ほとんどのNMR分光実験を可能にする。これら の装置の価格はアップダウンコンバータも合わせても100 万円以下と安価である。

Key Word: 分光計、ソフトウェア定義

Oさえきやすあき、いちむらゆうき、ねごろまこと、きたがわまさひろ

測定装置とPCの通信はVISA (Virtual Instrument Software Architecture) という規格が 整備されており、他の測定器への移行も簡単に行える。例えば、帯域 370 MHz で垂 直分解能が 14 bit である AWG5014B (Tektronix 社) と DPO7104 (Tektronix 社) を用い ればより高スペックな分光システムができる。また、帯域 3.5 GHz で垂直分解能力が 14 bit である AWG7102 (Tektronix 社) と DPO7254 (Tektronix 社) を用いれば、さらに 高スペックな分光システムができ、この系を用いて、従来にない任意波形パルス ESR 分光システムを構築した。

近年、そもそも汎用計測器自体をソフトウェア定義化するという流れがある。それ により、汎用計測器を様々な先端計測分野へと対応しやすくすることが目されている。 FPGA (Field-Programmable Gate-Array) ベースで汎用計測器を組むことでこのような 対応を可能にし、市場を広げることでさらなる低コスト化を目指すものである。 FPGAベースの汎用計測器を用いたSDMR分光システムをFig.2に示す。実は、これは

FPGAペースの汎用計測器を用いたSDMR分光システムをFig.2に示す。実は、これは 武田によって提案されたFPGAペースNMR分光システムに他ならない [1]。本研究は この先駆的な研究と計測機器が目指す将来像との間をつなぐ架け橋を目指すもので ある。

本研究は科研費(新学術領域研究21102004:量子サイバネティクス)、最先端研究 開発支援プログラム・量子情報処理プロジェクト、科研費(若手研究B 24740273:高 利得スピン増幅の研究)JST 研究成果最適展開支援プログラムA-STEP(探索タイプ) の援助を受けておこなわれた。著者らはチームSDラボのすべてのメンバーに感謝する。



Fig.2: Diagram of SDMR spectrometer with FPGA.

Reference

[1] K.Takeda, Rev. Sci. Instrum. 78, 033103 (2007)

T2測定およびCOSYにおける入れ子型複合パルスの有用性

○坂東将光¹,市川翼²,近藤康^{1, 3},中原幹夫^{1, 3},鹿野豊⁴ ¹近畿大・総合理工学研究科 ²学習院大・理学部 ³近畿大・理工学部 ⁴分子科学研・協奏分子システムセンター

Usefulness of Concatenated Composiite Pulses in T2 Measurement and COSY Experiment

 \bigcirc Masamitsu Bando¹, Tsubasa Ichikawa², Yasushi Kondo^{1, 3}, Mikio Nakahara^{1, 3}, and Yutaka Shikano⁴

¹Interdisciplinary Graduate School of Science and Engineering, Kinki University, Osaka, Japan.

²Department of Physics, Gakushuin University, Tokyo, Japan.

³Department of Physics, Kinki University, Osaka, Japan.

⁴Research Center of Integrative Molecular Systems, Institute for Molecular Science, Aichi, Japan.

Composite pulses are an important techniques to design robust NMR pulses against one of two dominant errors (pulse length error and off-resonance error) in NMR. In this presentation, we propose a concatenated composite pulse (CCCP) that is robust against two types of errors simultaneously, and show the fidelities of the T2 measurement and COSY experiment with CCCP as the examples.

通常のパルスの代わりに複合パルスを用い ることで、エラーの影響を受け難いNMR測定を 行うことが可能になる. 複合パルスは、Fig.1 のように複数のパルスから構成され、各パル スが互いにエラーの影響を打ち消すように設 計される. NMR測定における特徴的なエラーは パルス長エラーとオフレゾナンスエラーの2 種類であり、従来の多くの複合パルスはその どちらかのエラーに耐性をもつように設計さ れている. 我々が開発した新しい複合パルス である「入れ子型複合パルス」は、2種類の従 来の複合パルスを入れ子状に配置したもので



Fig. 1 Diagram of composite pulse

あり、パルス長エラーとオフレゾナンスエラーの両方に対して同時に耐性をもつこと ができる.

Composite pulse, Error, Numerical Simulation

○ばんどうまさみつ,いちかわつばさ,こんどうやすし,なかはらみきお,しかのゆ たか 本講演では初めに,我々が開発した新しい複合パルスである「入れ子型複合パルス」 の紹介を行う.その後、ハーンエコー法によるT2測定とCOSYの2つを例にして, 我々が行ったシミュレーションの結果を元に,入れ子型複合パルスを取り入れた場合 に何如にエラーを抑制できるかを議論する.

統合化に向けてリニューアルされたBioMagResBank 〇小林直宏¹, 横地政志¹, 岩田武史¹, 高橋あみ¹, 児嶋長次郎¹, 藤原敏道¹ ¹阪大・蛋白研

Web-service renewal of BioMagResBank for integration of databases ONaohiro Kobayashi¹, Masashi Yokochi¹, Takeshi Iwata¹, Ami Takahashi¹, Chojiro Kojima¹, and Toshimichi Fujiwara¹

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

PDBj-BMRB has been collaborating with BMRB (Wisconsin, USA) and the wwPDB to develop and implement deposition and annotation management strategies for database of biomolecular NMR (BioMagResBank). The BMRB mirror server, which provides services in Wisconsin University, has been re-designed interface with an integrated data visualization tool for the submission of NMR data. Recently we have developed BMRBxTool which converts NMR-STAR format into XML format, originally developed at PDBj-BMRB. Combined with the new visualization and support tools, the data submission procedure is greatly enhanced by making it convenient and user friendly.

PDBj-BMRBグループは米国BMRBおよびwwPDBと連携して、NMRデータベースであるBioMagResBank(BMRB)の開発、および登録・公開拠点としてサイトの構築運営を行っている。米国Wisconsin大学と共同でサービスを提供しているBMRBミラーサーバーではデザインの一新を行い、データの可視化ツールを充実させることで登録者のNMR実験データを分かりやすく確認できる機能を実現した。また、アドバンスドサーチの搭載によるより高度で高機能なNMRデータの検索が可能になった(Fig. 1)。



Fig. 1 New mirror server of BMRB and its advanced seach function

Keywords: Database, BMRB, XML, RDF

○こばやしなおひろ,よこちまさし,いわたたけし,たかはしあみ,こじまちょう じろう,ふじわらとしみち さらに、登録者から寄せられた質疑応答などをまとめたFAQページおよび日本語、英語による登録マニュアルページ、独自に開発した支NMRデータ解析支援ツールである MagRO、NMR-STAR形式からXML形式へとファイルの変換を行うBMRBxToolの提供 を新しいポータルサイトより公開を開始した(Fig. 3)。更にBMRBの全エントリーの XMLRDF化、RDF化を行い、データベース統合化へ向けてドキュメントの公開を開始 した(Fig. 3)。



Fig. 2 New portal site of PDBj-BMRB group (left) and graphical instruction page for deposition (right)



Fig. 3 XML and RDF format conversion by BMRBxTool and BMRBoTool

同種核 REDOR NMR 法の理論的研究

○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

Theoretical study for Homonuclear REDOR NMR experiments

- Takahiro Sakuragi¹, Daisuke Kuwahara²
- 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). In the course of the research activities, we explored the use of a simple rotational-echo double resonance technique for homonuclear spins (HN-REDOR) as a means of determining the location of the guest molecules in the host structures. In this study, we calculated the time-evolution operator for HN-REDOR by dividing the evolution period into four periods and determining the average Hamiltonians for these periods. It was found that the average Hamiltonians for HN-REDOR were equivalent to that for the heteronuclear REDOR when the ratio of the chemical-shift difference to the spinning speed was six or more. We finally derived the analytical expression of the reduction signals for the HN-REDOR experiments under the above condition.

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} の運動状態が関係して いることを明らかにした.さらに我々は フラーレンの



層間封入を確認するために シンプルな同種核REDOR MR法 (HN-REDOR) を考案し (Fig.1), その性能



についての検証を行ってきた.昨年度は,発展期間 t_e が $2T_r$ の場合のHN-REDORパルス系列に対する"平均ハミルトニアン"の計算を行った.そしてそれを,一般的な発展期間 $t_e = (n+1)T_r$ のHN-REDORに対する"平均ハミルトニアン"として使用することで,REDOR信号の減衰曲線の計算を行った.しかしながら昨年度の段階では,一般的な発展期間の終わり $t_e = (n+1)T_r$ に得られるREDOR減衰の正確な理論式を導出するまでには至らなかった.

キーワード:同種核, REDOR, 平均ハミルトニアン

○さくらぎ たかひろ, くわはら だいすけ

本研究では、同種核REDOR法の"正確な理論的記述"を完成させるために、一般的な発展期間 $t_e = (n+1)T_r$ に対応するREDOR信号の解析式を導いた.その過程において同種核REDOR法の「適用条件・適用限界」も明らかにした.さらに、発展期間 $t_e = (n+1)T_r$ の中で時間発展する"各種コヒーレンス"が、発展期間の終わりにどのようにリフォーカスするかを、理論的に解明した.

2. パルス系列の区分けと平均ハミルトニアン

本研究では、 $t_e = (n+1)T_r$ における REDOR 信号 の解析式を求めるために、パルス系列を 4 つの区 間 (I)~(IV) に分けて計算を行った(Fig.2). 最 初に各区間における平均ハミルトニアンを計算し、 ハミルトニアン各項の係数値を数値計算した結果、 " $\kappa = \delta / \omega_r \ge 6$ "($\delta : I,S$ の化学シフト差、 $\omega_r : 試$ 料回転周波数)の条件において

 $\overline{\mathcal{H}}_{d}^{(\mathrm{X})} \cong \Omega_{zz}^{(\mathrm{X})} 2I_{z} S_{z} \text{ (X=I, or IV)}$

 $\overline{\mathcal{H}}_{d}^{(X)} \cong \Omega_{zz}^{(X)} 2I_z S_z + \Omega_{yz}^{(X)} 2I_y S_z$ (X=II, or III)



Homonuclear REDOR (HN-REDOR) pulse sequence. The evolution period was divided into four periods, (I)-(IV), to calculate the REDOR reduction at the end of the evolution period.

という形に書けることがわかった.これらのハミルトニアンの表式は, 異種核 REDOR の平均ハミルトニアンと同等な形となっている.さらにそれらの平均ハミルトニアンを基にして,各区間の時間推進演算子を計算し,一般的な発展期間の終わり $t_e = (n+1)T_r$ における REDOR 信号の解析式を求めた:

 $S((n+1)T_{\rm r}) = {\rm Tr} \left\{ S_x^{({\rm III},{\rm IV})} \cdot \left\{ \exp(-i\hat{G}^{({\rm III},{\rm II})}) \exp(-i\hat{P}^{({\rm III},{\rm II})}) \exp(-iG^{({\rm II},nT_{\rm r})}) S_x^{({\rm III},{\rm I})} \right\} \right\}, \quad (1)$

(各種記号の定義は、会場にて説明する).式(1)から、Fig.2の同種核 REDOR 法において、スピン系の実質的なアベレージハミルトニアンは、 $G^{(II;nTr)}/nT_r$ であることがわかる.さらに、 $S_x^{(III)}$ 、 $S_x^{(IIII)}$ の表式から、発展期間においては通常の SQC (single-quantum coherence) に加えて、ZQC と DQC、さらに anti-phase な y-磁化の時間発展が起こり、発展期間の終わりにはそれぞれリフォーカスして、REDOR 信号に寄与することが明らかになった.

3. 結果·議論

n=1,2,3,4対応するFig.2のパルス系列を使っ
て,2種類のL-alanine (共に¹³C labeled samples)
上でREDOR実験を行った結果をFig.3に示す.
実線は区間(II)の平均ハミルトニアン解析式
を使って数値計算したREDOR減衰曲線である.
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,同種核間の距離
測定に資することがわかる.式(1)を用いて
計算したREDOR減衰曲線との比較等,詳細に
ついては会場にて発表する.



[1] N. Sasaki and K. Miura, Jpn. J. Appl. Phys. 43, 4486 (2004).

P127 NMR蛋白質立体構造決定のための新規構造最適化法の開発

○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 ²Goethe-University Frankfurt

Development of a new refinement method for NMR protein structure determination

OManato Shimazaki¹, Teppei Ikeya¹, Masaki Mishima¹, Yutaka Ito¹ and Peter Güntert^{1, 2} ¹Department of Chemistry, Tokyo Metropolitan University, Tokyo ²Institute of Biophysical Chemistry, Goethe-University Frankfurt, Frankfurt am Main, Germany.

NMR protein structure calculation adopts severe simplifications of the nonbonded interactions to rapidly obtain global structures. It is thus necessary to perform the subsequent refinement of the structures with a physical forcefield. While various refinement approaches are proposed using MD simulations, there are a few examples to optimize the NOESY assignment and calibration of the distances from NOE peak intensities based on the refined conformations. Recently, we implemented into the program CYANA a new structure refinement method that recursively improves the structures and NOE assignments, and addresses the calibration based on Bayesian inference. Here, we show the results applying it to several test data and its feasibility for the protein structure refinement.

【序論】

現在広く利用されているNMR蛋白質立体構造計算は、計算の高速化のために非常 に単純な評価関数を用いている.このため、計算の最終段階では、物理ポテンシャル を用いた構造の精密化計算によって、原子間距離や角度等の構造最適化が必要となる. これまでの最適化計算は、その前段階までで得られたNOE帰属情報から、ピーク強 度(*I*)-原子間距離(*r*)の単純な関係式(*I=C/r*の)によって距離拘束を作成し、この拘束条 件下で分子動力学計算(MD)により最終構造決定を行っていた.しかしながら、NOE 帰属とピーク強度からの距離変換は、ともに立体構造情報をもとにするため、各計算 段階シームレスな相互情報交換が必要とある.よって、構造の精密化とNOE解析の再 帰的な計算と、原子間距離への変換項の自動補正が構造の精度向上に寄与すると期待 される.そこで本研究では、立体構造計算プログラムCYANAに 1)構造最適化とNOE 自動解析の再帰的計算、2)ベイズ法による距離変換項の自動補正、の2つの新規手法 を新たに導入した.

ベイズ法を利用した構造計算では,NilgesらによるInferential Structure Determination (ISD)法^{1,2)}をもとに,複数の改良を加えて,CYANAの自動構造計算 アルゴリズムに組み込んだ.これにより,物理ポテンシャルを用いた構造サンプリン Bayesian, 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、 ペーたーぎゅんたーと グから得られるアンサンブル構造を事前確率分布とし,実験値とモデルとの二乗誤差 項を尤度関数で表現できるため,最終構造のアンサンブルを事後確率分布の形で評価 可能となる.

ここでは、CYANAプログラムにCartesian系分子動力学計算(CMD)で広く用いら れているAmberの物理ポテンシャルと、マルコフ連鎖モンテカルロ法(MCMC)を用 いたベイズモデリング法を採用し計算精度の向上を試みた. さらに、いくつかの蛋白 質データにおける従来法との比較、検討、さらにはin-cell NMRデータにも適用させ ることで新規手法の有用性を検証した.

【方法】

CYANA ver3.0にCMD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、二面角空間での計算に最適化させた.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oの対数正規分布でモデル化し、シグマは無情報ガンマ分布 で定義した.説明変数µ、o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 み合わせて行うことで、それぞれの事前確率分布を作成した.これらのサンプリング は、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.この新規計算手法の評価のために、in-cell NMRによる G B1蛋白質について、従来のSimulated Annealing (SA)法とベイズ法で構造計算を 行い、構造比較を行った.

【結果・考察】

in-cell NMRによるG B1蛋白質につ いてSA法とベイズによる立体構造計 算を実行した(Fig.1).従来のSA法では 得られる構造が任意に決められた構造 数に依存するため,得られた構造間の 平均二乗誤差(RMSD)は正確な構造評 価の指標にすることができなかった. 一方,新規手法ではレプリカ交換MC法 により,実験データを満たせる変数空 間を網羅的に探索することで,事後確 率分布に基づく構造を得ることができ

を組み合わせた新規手法の開発も進める予定である.



Fig.1 G B1 structures obtained by the conventional simulated annealing (A) and the Bayesian-based structure calculation (B). 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).

る. Fig.1では事後確率分布の任意の標準偏差内にある全ての構造を表示している. 本手法では、現在の実験データから求まる構造をより客観的に評価することができる. 今後は、さらに多くの蛋白質やデータ数の少ないデータにも適用し、従来法との比 較を行っていく予定である.また、本手法にNOEデータの再帰的帰属アルゴリズム

【参考文献】

- 1) Habeck, M., Nilges, M. & Rieping, W., Bayesian inference applied to macromolecular structure determination (2005) *Phys. Rev. E* **72**, 031912.
- Riepig, W., Habeck, M. & Nilges, M., Inferential Structure Determination (2005) Science 309, 303-306

(東理大·総合研究機構) 遠藤一央、(金沢大院自然研)井田朋智、(東理大·理学部化学科) 鈴木陽, 田所誠

【はじめに】

ガスハイドレートは、氷構造を形成する水分子クラスターに気体分子(不活性気体、メタン、二酸化炭素など)を含有したものである。極性の大きい水分子と無極性の気体分子とが何故混じり 合って hydrate を造るかを先ず双極子モーメントの観点から考えた。n=2~10 までの水クラスタ ーの双極子モーメントを計算し、水20分子や24分子のクラスターの中心では、双極子モーメ ントが0になると類推し無極性の気体分子が入り込むと考える。今回は、sI結晶を構成する(20, 24分子)水クラスター及びそのクラスターに気体分子(Xe, CH4, CO2)が含まれた系の量子化学計 算を行い、電子状態を追究し、核磁気遮蔽テンソルを計算して実験結果と比較検討する。

【計算方法】

量子化学計算法としては、GAUSSIAN09 ソフトのB3LYP/(dgdzvp 及び 6-311++G(d, p))レベル で行った。前者は Xe 関連、後者は (CH₄, CO₂)関連の basis を用いた。下図左は 20H₂O の small cavity と 24H₂O の large cavity の GAUSSIAN09 による構造最適化計算結果である。この計算では、 cavity を構成する酸素骨格は、中性子回折による実験結果を採用し、骨格を固定して計算した。 ガスハイドレートとしては、これらの両 cavity 中に気体分子を入れ (下図右には、large cavity に存在する Xe, CH₄及び CO₂を示した。),構造最適化した。両 cavity の中での{Xe, or (CH₄, CO₂)}NMR 遮蔽定数も、B3LYP/(dgdzvp, or 6-311++G(d, p))レベルで計算した。



【結果及び考察】

1) n=2~10 までの水クラスターの双極子モーメントを計算



上図は、n=2~10までの水クラスターの構造と双極子モーメントの計算結果である。n=4及び 8の水分子クラスター構造の双極子モーメントが0に近いことが分かり、飛躍は有るが、自然 界では水20分子や24分子のクラスターの中心では、双極子モーメントが0になると類推する ことが出来る。

2) ガスハイドレートモデルのゲスト分子の核磁気遮蔽テンソル定数



(イ)ガスハイドレートの構造最適化

水 20 分子と 24 分子のクラスターの酸 素骨格を固定して、気体分子をクラスタ 一内の中心に入れて構造最適化計算を行 った。結果は、全てのゲスト分子は、2 種のクラスター内の中心に存在した。

左図の small cavity における構造最適化結果

は、(Xe, CH₄, CO₂)ゲスト分子がクラスターの中心に存在することが分かる。Large cavity に関しても既に前頁に示したように、ゲスト分子がクラスターの中心に存在していることが分かる。(ロ)ゲスト分子の核磁気遮蔽テンソルの計算

各系について、化学遮蔽定数は、ゲージ不変の原子軌道による coupled perturbed Hatree-Fock (CPHF) 法で計算し、反磁性項と常磁性項を求めた。表1には、シフトの計算結果を示した。

図 1)129Xe 及び 13C CPMAS NMR	表1) 水	クラスター	中のゲス	、ト分子の	の核化学	遮蔽定数
¹²⁹ Xe NMR Spectra		calc(ppm)	1	exp	ot (ppm)	
5 ¹² 5 ¹² 6 ² structure I	Molecule	$\sigma^{ ext{dia}}$	σ^{para}	$\sigma^{ ext{total}}$	$\sigma_{ m calc}$	$\sigma_{ m expt}$
	Xe	5638.85	0.00	5638.85	0.00	0.00
512 Structure II	Xe in s-C	5654.04	-212.08	5441.95	196.9	242
512.64	Xe in I-C	5654.54	-144.68	5509.86	129.0	152
250 200 150 100 50 0 chemical shift / ppm	TMS	249.50	-70.50	179.00	0.00	0.00
Sec. 1	CH ₄	247.25	-56.84	190.41	-11.41	-7.00
Methane Hydrate	CH₄in s-C	269.54	-83.70	185.84	-6.84	-2.84
13C CP/MAS NMR spectrum	CH ₄ in l-C	257.71	-70.26	187.45	-8.45	-5.71
	$\begin{array}{c} CO_2 \\ CO_2 \text{ in s-C} \\ CO_2 \text{ in s-C} \end{array}$	263.61 289.89	-210.33 -236.19	53;28 53.70	125.72 125.30	124.2
40 20 0 -20 ppm	CO_2 in FC	283.90	-230.64	33.26	123.74	

Xe ハイドレートの129Xe 核とメタンハイドレートの13C 核の固体 NMR スペクトル^{1,2)} が図1のように 得られていたので、表1には、CO₂ハイドレートと共に3種のゲスト分子の核化学遮蔽定数及び化学シ フトの計算値と実測値を示した。Xe 核及びC 核の化学シフト値³は、計算結果が実験値を略反映してい ることが分かる。

NMR 化学遮蔽定数の計算からも、Xe 及びメタンのシフト値は、真空中が最も高磁場で、大小の cavity の順に低磁場と続く、Xe と水クラスターの分子間相互作用については、今後の検討が必要である。

CO₂のシフト値は、真空中、大小 cavity の中に存在する場合でもシフト値が、略同じで有るが、これは CO₂の電気陰性度の大きい酸素原子が炭素シフトに大きく起因しているからである。しかし、メタンの シフト値の違いは、それぞれの cavity 内のメタンがクラスターの水分子の酸素と弱い分子間水素結合(平 均水素結合距離は small cavity2.9Å, large cavity3.1Å)している影響と考えている。 文献)

1) C. J. Jameson, D. Stueber, J. Chem. Phys. 120, 10200 (2004).

2) J. A. Ripmeester, C. I. Ratcliffe, J. Phys. Chem. 92, 337(988).

3)T. Ida, K. Endo, D. Matsumoto, N. Kato, M. Mizuno, Y. Suzuki, M. Tadokoro, J. Mol. Struct.1032, 275(2013).



¹²⁹ Xe	······P59
¹²⁹ Xe-NMR ······	··· P80, P100
¹³ C- ¹³ C相関	·····P69
¹³ C NMR ······	······ P14, P86
¹³ C chemical shift tensor	······ L11
¹⁵ N NMR	L4
¹⁹ F	····· P112
¹ H- ¹³ C-HMQC	·····P54
¹ H DQ MAS ······	··· L13, P108
¹ H DOSY ·····	······P46
¹ H high-resolution NMR	······ P110
¹ H T_1 relaxation ······	L6
¹ H 固体NMR	·····P97
²⁷ Al- ²⁹ Si CPMAS ······	L24
²⁹ Si核の緩和時間短縮	······ P105
² H NMR······	···P101, P102
² H 2D $T_1 - T_2$ Relaxation	·····P83
³¹ P-NMR	······ P12, P48

アルファベット

А

Al-MCM-41L24
Amide-proton exchange······L16
Amino Acid AnalysisP16
anisotropic spin interactionsL10
APOBEC3G ·····P18
ATP合成酵素P64
Autophagy ·····P26
В

Banana liquid crystals P78
BASHD P44
BASHD-J-resolved HMBC ······P44
Bayesian P127
bicelle L3
BMRB······P125
Bombyx mori Silk Fibroin L13
Brevibacillus choshinensis ······P43
β -sheet structure P72
С
calbindin-D _{9k} ······P47
carbonateL11

CAST/CNMR ·····P13
CASTEPL13
Catechin derivative P6
Cellular environment P25
Cement ······ P103
chemical diversity index P58
chemical exchange P2
Chemical shift anisotropy P65
Chirabite-AR P8
Clathrate Hydrate P100, P102
Composite pulse P124
CRAMPS P110
CYANA
C核NMR P128

D

DARR ·····	······P72
Database	······ P125
deuterium	······P77
DHFR ·····	······P31
domain rearrangement	······ L10
DPFGSE-NOE ······	Р9
Drug discovery	······P40
Drug-recognition	······ L15
Dynamic Framework	IL3
Dynamic Nuclear Polarization	L23, P116
Dynamics	·· L18, P92
E	

energy conversion HL2 Enol-enol tautomerism P2 Expressed Protein Ligation P42 Error P124 F Fe-nitrogen doped carbon L7 Ficolin P43 Flow molding process P89 folding stability P25 G Gadolinium P75 gas diffusion properties P79 Gas phase ions IL4 Gas-phase NMR spectroscopy IL4

Gas sorption properties -----P81

Gas transport propertiesP82
GFT NMR ·····P68
GIPAWL13
GPI-anchored protein L3
Н

Half integer spin ·····P91
HeLa cells P47
High resolution MAS NMR of
quadrupolar nuclei ······ P120
High-pressure NMR·····P23
Hydration P103
Hydrogel ·····P83
hydrogen bond ····· P2
hydrogen exchange experimentP25
I

Imidazole P99
Impregnation process ······P89
in situ NMR ······P94, P95
in situ 光照射固体NMRP71
In vivo ¹ H スペクトロスコピー
in-cell NMR P25, P47, P55, P75
Indium doped Zinc Oxide ·····P91
Intramolecular allostery P27
Intrinsically disordered protein L16, P42

J

J-resolved HMBC ·····P44

L
layered structure P79
Lead optimization ······P40
Lectin P17
LFampin ·····P66
Ligand binding ······P27
Limit of detection P108
LINE P19
$LiNi_{0.5}Mn_{1.5}O_4 \cdots \\ P95$
Lipid bilayers P65
liposome L3
Liquid crystal ·····P77
Liquid crystalline polyester ······ P79, P81
Local structural analysis
М
macromolecular crowding ·····P25

Magnetic phase transition	P116
Magnetic orientation	····P82
MAS·····	P120
Material Analysis	P92
MDM2	P39
Mechanochemical Structure Change	…L24
Metabolomics	····P58
Metal-Organic Frameworks	···· IL3
Methacrylate copolymer	···· P10
Methyl TROSY	···· P15
micro coil ······	P115
MOF分解法 ····································	···· P46
Molecular dynamics L5	, P122
molecular motor	HL2
MRI	0, P62
Multi-phase NMR	···· P7
multidrug-resistance transcriptional	
regulator ·····	···· L15
Multivariate analysis	···· P10
multivariate statistical analysis	····P58
MurD	L9
Mutation	P27
Ν	
NaCl水溶液······	P101
Nanoporous Crystal P100	, P102
Natural evolution-mimicry	···· P17
NMR ······P10	6, P88
NMR実時間計測法	···· P18
Non-Uniform Sampling	•••• РЗ
Numerical Simulation	P124
NQR	P118
0	
Oligosaccharide IL	5, P15
Oligosaccharyltransferase	···· P15
Organic devices	P122
Oxygen reduction	L7
Р	
π -conjugated polymer	P122
p53	P39
Paramagnetic effect	IL5
Paramagnetic NMR shift	L7

Paramagnetic Relaxation Enhancement

······P75
PBLGP82
PDZドメインP35
PETフィルム
peptide P90
Phase structure P78
Phase transition P77
photo-CIDNP P111
РКСР22
Polycarbonate P80
Polymorph P108
Polyolefin ·····P14
Porous Coordination Polymers IL3
Primary structure P10
Protein Complex P26
protein dynamicsL10
Protein protein interaction inhibitor P40
Protein-ligand interaction P23
Proton conductivity
proton translocation
PXドメイン
0

Q

QCPMG P98
Quantitative P14
quantum simulation P116
Quinhydrone ·····P87

R

RDF P	125
REDOR ······P	126
regioselectively isotope labeling	L23
Relaxation	L16
Relaxation time analysis	P89
RNA	P19

S

S/N比
SAIL method ·····P23
SAIL法L14, P45
Secretory protein ·····P43
Segmental labeling ······P42
selective stable isotope labellingP55
Sensitivity Enhancement P111

sf9 P55		
Sialic acid P17		
Sialo-glycan P9		
silicate meltL11		
Silk L13, P72		
Silk I and Silk II L13		
Silk II structure P72		
Silk fibroin P72, P84, P90		
soft interaction HL2		
Solid-State NMR P103, P120		
solid state NMR L5, L6, P84, P110, P111		
Solid-state NMR L13, P72, P78, P92		
Spin echo P65		
Stable isotope labeling IL5		
Stacking interaction P6		
Structural analysis IL4, P40		
Structure P19		
Structure Determination P26		
structure refinement P127		
susceptibility matching P115		
Т		
Thermo-responsive PolymerP83		
TiO ₂ P90		
TOCSY-HSQC P5		
triplet-DNPL23		
U		
Ulmus parvifolia ·····P16		
Ultra fast MAS ·····P84		
V		
very fast MAS L6		
W		
Water L5		
Water solubility improvement P6		
Х		
Xe核NMR P128		
Xe sorption ·····P80		
XML		
五十音順		
あ行		

アミノ酸	P11
アミノ酸選択的安定同位体標識法 I	L19
アミノ酸分析	P16

アミロイド線維	······P76
アミロイドベータペプチド	·····P36
アルツハイマー病	·····P36
アロステリック阻害	·····P37
安定同位体標識	·· P51, P56, P73
安定同位体標識アミノ酸	······P45
イオン伝導	L2
一軸延伸	·····P85
一次構造解析	······P10
イミダゾール	·····P99
インセル固体 NMR	·····P67
運動性	L15, P106
液晶	L12, P77
液晶性ポリエステル	······ P79, P81
液晶分子	····· P114
液相析出法	······P49
エノール-エノール互変異性	P2
エラー耐性	P124
塩橋	·····P38
温度応答性ポリマー	······P83

か行

解析支援プログラム P68
配位高分子
化学交换 P2
化学シフト P38
化学シフト異方性 P65, P112
拡散NMR L2
可変磁場 P121
カルバメート
癌 ······P39
環境メタボノミクス P1
環境メタボロミクスP56
感度向上 P119
緩和解析 P21, P36
緩和時間 L22, P104
緩和分散P34
規則性多孔質シリカ材料 P105
気体拡散特性
気体収着特性 ·······P81
気体輸送特性
絹P84
機能的核磁気共鳴画像装置P63

キメラタンパク質	····· P41
魚類多様性	P1
共振周波数シフト	····· P118
共重合体	······P10
局所加熱	L12
局所分子運動性	······P81
クエンチング	P61
クラスレートハイドレート	P100
群特異性	P35
ケモカイン	······P37
高圧力NMR	······ P30, P31
高エネルギー状態	······P30
高温超伝導	······P62
光学活性化合物	P8
交差分極	······ P112
高速多次元測定	·····P68
構造解析	P41
構造推定	·····P13
構造形成	L16
構造訂正	·····P13
抗体	L17
高分子量	L17
高分子量蛋白質	L14
光励起三重項電子スピン	L23
抗菌ペプチド	······P66
固相反応	······P87
固体 ¹³ C NMR······	······P85
固体NMR IL2, L23, L25, P	64, P66, P69,
P70, P74, P84, P103	8, P111, P119
固体酸触媒	L25
固体二次元 NMR	······P73
互変異性	L4
ゴム	······ P106
さ行	

最適制御理論 P113
細胞P67
作物残渣
サルコシンP54
シアル酸糖
磁化率P94
磁気相転移 P116
次元数 P107

自己拡散係数	L22
脂質二重膜	······P65
脂質膜	······P76
シトクロム <i>c</i>	·····P29
磁場配向	······P82
嗅覚	······P60
重水素	·····P77
受動シム	P121
準安定構造	P31
純度測定	P11
常磁性緩和効果 P2	0, P22, P32
常磁性緩和促進	······P74
常磁性金属イオン	······ P105
常磁性シフト	·····P29
常磁性プローブ	·····P28
常磁性ランタニドプローブ法	L9
食品分析	P4
試料管理技術開発	······P53
試料管理法開発	······P53
水圏植物バイオマス	······P56
水産資源	······P52
水素結合	P2
水素重水素交换	P33
水和	······ P103
スズ	·····P96
スピンエコー	······P65
スピン増幅	······ P117
スラグ	IL2
ソフトウェア定義	······ P123
制御化合物	·····P37
石炭	IL2
セメント	······ P103
セメント水和反応	······ P104
センサリーロドプシン	·····P71
相互作用	··· P35, P69
層状構造	·····P79
相転移	·····P77
創薬	L17
た行	
代謝動態解析	······P51
代謝ネットワーク	······P57

代謝プロファイリング …… P52, P53

多核NMR····································	P49	
多孔質	P59	
多次元ラプラス逆変換I	22	
多変量解析	P10	
多量子 NMR ······P	107	
多量子カウンティング	L1	
蛋白質動態	P21	
タンパク質ライゲーションI	222	
チタン	9 90	
超高速 MAS····································	P84	
超低磁場核磁気共鳴	P63	
超偏極I	P59	
超偏極 ¹²⁹ Xe-MRII	P61	
低分子化合物 P3, H	235	
定量NMR P4, P11, P12, H	P50	
定量化I	20	
定量法	L8	
デオキシシチジン脱アミノ化酵素I	P18	
デカップリングP109, P1	113	
鉄分布画像	_21	
電気二重層キャパシタ	P97	
天然変性タンパク質]	L16	
天然変性領域]	L18	
同位体シフト効果	233	
同種核	126	
動的核偏極	117	
土壤微生物叢	257	
トバモライト P	107	
ドメイン解析I	287	
な行		
ナトリウムイオン電池	P 96	

ノーランムイオマ 电心	1 30
ナノ多孔質結晶	P100
二酸化炭素	···P88
二次元 ² H T ₁ -T ₂ 緩和	···P83
脳神経活動	···P63

は行

ハードカーボン	/		P96
肺機能診断 …			······P61
パイ共役系高	分子	•••••	······ P122
ハイドロゲル…			······P83
バクテリオロト	・プシン …		P70
薄膜			P49

パルス NMR ······ P106
反応時間依存性P46
光 CIDNP P111
微細藻類
非侵襲的サンプリングP53
ヒトカルシトニン
ヒト主要組織適合複合体P34
ヒト脳L20, L21
不均一サンプリング ······ P3, P5
複合パルス P124
符号理論
腐朽菌 L8
フラビンモノヌクレオチド P111
プロトン伝導 L4, P98, P99
プローブ ······ P119
プローブ分子
分光計 P123
分子運動 P86, P98, P122
分子運動性 P7
分子混雜環境P21
分子進化工学 ······P17
分子認識機構P24
分子配向
平均ハミルトニアン P113, P126
平面アンテナ P118
ペプチド
へム電子構造P24
ヘム配位構造P29
ヘム分解酵素 HO-2L18
包接キラルシフト試薬 P8
ホスファチジルイノシトールP28
ポリアミド
ポリエステル
ポリカーボネートP80
ポリプロピレン P5
ボンドマー解析P73
ま行
マイクロイメージングP62
マイクロ波加熱 L12, P114
マイクロ波照射NMR P114

膜タンパク質 P69, P71
膜蛋白質 P64, P67
末端基P48
マルチドメイタンパク質P20
マンガン酸リチウムP93
マンガン造影法P60
万葉集
ミオグロビン
未利用水産バイオマス P1
無細胞タンパク質合成系L19
メソポーラスシリカ P101
メチル基
木質バイオマス L8
モノマー連鎖分布 IL1

や行

薬剤認識
榆皮 ······P16
有機デバイス P122
ユビキチン
揺らぎ構造L16
溶液 NMR L15
横緩和速度

ら行

ラクトソーム
リガンドスクリーニング L9
リグノセルロース P7
リジンP33
リチウムイオン電池L1, P93, P94, P95
リチウムイオン分布 L1
立体構造P32
立体構造とダイナミックス P9
量子化学計算 P128
量子シミュレーション P116
量子非破壊測定 P117
りんP12
リン系誘導体化試薬P48
リン酸化 P20, P41
レクチン
レチナール

著者検索

アルファベット

А

Abe Yuki	······P76
Aizawa Tomoyasu	······ P68, P74
Akiyoshi Katsutaka	·····P22
Akutsu Hideo	······ HL2, P64
Amano Shinjiro	·····P28
Aoki Akihiro	L13, P72, P84
Arai Hajime	······L1, P93, P95
Arai Juichi	·····P94
Arai Kenzo	······P40
Arai Nao	······P19
Arai Saiko	·····P92
Asakawa Naoki	······ P122
Asakawa Seiko	······P10
Asakura Taiga	······ P52, P58
Asakura Tetsuo	IL1, L13, P72,
	P83, P84, P90
Asano Akira	······P76
Asano Atsushi	······ P72, P86
Asanuma Ryota	·····P79
В	
Bando Masamitsu	······ P124
Baxter Nicola	·····P30
Brown Steven	······ P108
С	
Chen Haijun	·····P92
Chiba Kenichi	······P40
China Hideyasu	P2
Chizuwa Mizuki	·····P98
D	
Date Yasuhiro	P1, P52, P53, P56,
	P57, P58
Deguchi Kenzo	L5, P96, P104
Demura Makoto	······ P68, P74
Doi Nobuhide	·····P39
Dylan T. Murray	IL6
E	
Egawa Ayako	P67, P68, P74, P75

Endo Kazunaka	····· P128
Endo Yumi	·····P78
Esaki Kaori	·····P37
F	
Feig Michael	······P21
Fernando Correa	······ IL7
Frost Kris	····· P111
Fujimoto Yuichiro	······P46
Fujinami Daisuke	······P15
Fujioka Koji	····· P119
Fujito Teruaki	······L12,P114
Fujiwara Toshimichi P3	3,P32,P38,P64,
P67,P68,P74,	P75,P111,P125
Fujiwara Toshinobu	·····P20
Fuke Kiyokazu	······ IL4
Fukuda Kunito	····· P122
Fukunishi Mika	·····P96
Fukunishi Yoshifumi	······P40
Fukushima Kazuhiko	L8
Furihata Kazuo	······P44
Furuita Kyoko	······ P32, P38
Furukawa Ayako	······ L18
Fuziwara Hideaki	······P61
G	
Can Zhehong	P110

Gan Zhehong P110
Gao George P34
Giomar Rivera-Cancel······ IL7
Goda Natsuko P35
Gogota Tadao P8
Gotoh Haruna P60
Gotoh Kazuma ······P94, P96
Gregory S. Boutis P83
Güntert Peter P127

Н

Hamatsu Jumpei ······P55
Hamatsu Junpei P47
Hara Hideyuki L7
Harada Erisa La
Hans Wolfgang Spiess IL11
Haremaki Takahiro P47

Hashimoto Tomoko P78
Hattori Mineyuki P59
Hattori Yoshikazu ·····P38
Hayashi Kokoro P67
Hayashi Shigenobu L24, L25
Hayata Daisuke P106
Hembram Dambarudhar Shiba Sanker ··· P47
Hemmi Hikaru P17, P29
Hidaka TetsurouP71
Higuchi MasanoriP63
Higuchi Tomoaki P80
Hirabayashi Jun P17
Hiraga Takashi P59
Hirakane Makoto P60
Hirano Tomohiro P10
Hiraoki Toshifumi HL1
Hiroaki Hidekazu ·····P35
Horigome MiyakoP70
Horike SatoshiIL3, L2
Horisawa Kenichi P39
Hoshino Reona P1
Hosoya Takahiro P4
Hung Ivan P110
-
Ichijo Naoki P121
Ichikawa Tsubasa P124
Ichimura Yuki P123
Ida Tomonori P77, P91, P98, P99,
P101, P128
Ideta Keiko P97
Ihara Toshihide P11, P12
Iinuma Junya ······P41
Ikeda Keisuke P67
Ikegami Takahisa P3, P38
Ikeya Teppei P47, P55, P127
Imachi Masayoshi ·····P66
Imamura Yoshinori L8
Inagaki Fuyuhiko L9, P28
Inagaki Satoshi P105
Inomata Kohsuke P25

Inoue Atsushi P40
Inoue Jin P47
Inoue Saki ·····P31
Inoue Yoshihisa P106
Inouye Masayori ·····P67
Inukai MunehiroIL3, L2
Ishida Hiroyuki P85
Ishida Hiroyuki
Ishida Norihito ·····P37
Isoda Kyosuke P100, P102
Itho YoshitakaP62
Ito Kengo ·····P56
Ito Moemi-P16
Ito Tatsuhiko P6
Ito Yutaka P20, P22, P41, P47, P55, P127
Itoh-Watanabe HikariP76
Itozaki Hideo P118
Iuga Dinu P108
Iwadate Yasuhiko L22, P104
Iwamoto Jun ·····P82
Iwamoto Shigeto P36, P60
Iwanami Katsuyuki
Iwasaki Ayano P99
Iwasaki Iku ·····P64
Iwata Takeshi P125
Iwaya Naoko P35
Izawa Kenichiro P87
Izuka Misato
J
Jimura KeikoL25
К
Kaga Naohiro P59
Kagawa Akinori L23, P116, P117
Kainosho Masatsune … L14, P23, P33, P45
Kaji HironoriL13
Kajikawa Masaki P19
Kamba Keisuke P18
Kameda Tomoshi P30, P74
Kamihara Takayuki
Kamihira-Ishijima MiyaP76

Komitanho Vuouko	
Kamiya Masakatsu	
Kamo Naoki	1 00, 1 74
Kamoshida Hajime	
Kanaba Tennei	P99 P/1
Kanayama Kozo	1 22, 1 41
Kanehashi Koji	II 2
Kanematsu Wataru	
Kang Su-Jin	
Kang Sungmin	
Kanzaki Masami	
Kasai Takuma	
Katahira Masato	
Katahira Ritsuko	P3
Kataoka Daisuke	I <i>J</i>
Kataoka Saori	
Kato Hisashi	
Kato Koichi	II 5 P30
Kawai Gota	
Kawamura Avano	
	101
Kawamura Izuru	L12 P66 P69 P70
Kawamura Izuru	L12, P66, P69, P70, P71, P76, P105, P114
Kawamura Izuru ······· I Kawamura Yuuii ······	· L12, P66, P69, P70, P71, P76, P105, P114 ······P91
Kawamura Izuru ······ H Kawamura Yuuji ····· Kawano Kejichi ······	· L12, P66, P69, P70, P71, P76, P105, P114 ······P91
Kawamura Izuru I H Kawamura Yuuji Kawano Keiichi Kevin H. Gardner	· L12, P66, P69, P70, P71, P76, P105, P114 ······P91 ······P68, P74 ······ IL7
Kawamura Izuru H Kawamura Yuuji Kawano Keiichi Kevin H. Gardner Khampa Chalermpon	· L12, P66, P69, P70, P71, P76, P105, P114 ······P91 ······P68, P74 ······IL7 ·····P75
Kawamura Izuru I H Kawamura Yuuji Kawano Keiichi Kevin H. Gardner Khampa Chalermpon	L12, P66, P69, P70, P71, P76, P105, P114 P91 P68, P74 IL7 P75 P74
Kawamura Izuru I Kawamura Yuuji Kawano Keiichi Kawano Keiichi Kevin H. Gardner Khampa Chalermpon Kido Kouki Kigawa Takanori	L12, P66, P69, P70, P71, P76, P105, P114 P91 P68, P74 IL7 P75 P74 P74
Kawamura Izuru I H Kawamura Yuuji Kawano Keiichi Kawano Keiichi Kevin H. Gardner Khampa Chalermpon Kido Kouki Kigawa Takanori Kihara Miho	L12, P66, P69, P70, P71, P76, P105, P114 P91 P68, P74 IL7 P75 P75 P74 L19, P21 P40
Kawamura Izuru I H Kawamura Yuuji Kawano Keiichi Kevin H. Gardner Khampa Chalermpon Kido Kouki Kigawa Takanori Kihara Miho Kikuchi Iun	L12, P66, P69, P70, P71, P76, P105, P114 P91 P68, P74 L17 P75 P74 P74 P74 L19, P21 P40 1, P7, P51, P52, P53.
Kawamura Izuru I H Kawamura Yuuji Kawano Keiichi Kevin H. Gardner Khampa Chalermpon Kido Kouki Kigawa Takanori Kihara Miho Kikuchi Jun P	L12, P66, P69, P70, P71, P76, P105, P114 P91 P68, P74 IL7 P75 P75 P74 L19, P21 P40 1, P7, P51, P52, P53, P56, P57, P58, P73
Kawamura Izuru I Kawamura Yuuji Kawano Keiichi Kevin H. Gardner Khampa Chalermpon Kido Kouki Kigawa Takanori Kihara Miho Kikuchi Jun P Kikukawa Takashi	L12, P66, P69, P70, P71, P76, P105, P114 P91 P68, P74 IL7 P75 P74 P74 L19, P21 P40 1, P7, P51, P52, P53, P56, P57, P58, P73 P68, P74
Kawamura Izuru I Kawamura Yuuji Kawano Keiichi Kevin H. Gardner Khampa Chalermpon Kido Kouki Kigawa Takanori Kihara Miho Kikuchi Jun Kikukawa Takashi Kim Taegon	L12, P66, P69, P70, P71, P76, P105, P114 P91 P68, P74 IL7 P75 P74 L19, P21 P40 1, P7, P51, P52, P53, P56, P57, P58, P73 P56, P57, P58, P73 P97
Kawamura Izuru I Kawamura Yuuji Kawano Keiichi Kevin H. Gardner Khampa Chalermpon Kido Kouki Kigawa Takanori Kihara Miho Kikuchi Jun Kikuchi Jun Kikukawa Takashi Kim Taegon Kimura Atsuomi	L12, P66, P69, P70, P71, P76, P105, P114 P91 P68, P74 IL7 P75 P74 P74 P74 L19, P21 P40 1, P7, P51, P52, P53, P56, P57, P58, P73 P56, P57, P58, P73 P57 P68, P74 P97
Kawamura Izuru I Kawamura Yuuji Kawano Keiichi Kevin H. Gardner Khampa Chalermpon Kido Kouki Kigawa Takanori Kihara Miho Kikuchi Jun Kikuchi Jun Kikukawa Takashi Kim Taegon Kimura Atsuomi Kimura Saori	L12, P66, P69, P70, P71, P76, P105, P114 P91 P68, P74 IL7 P75 P74 L19, P21 P40 1, P7, P51, P52, P53, P56, P57, P58, P73 P56, P57, P58, P74 P97 P61 P78
Kawamura Izuru I Kawamura Yuuji Kawano Keiichi Kevin H. Gardner Khampa Chalermpon Kido Kouki Kigawa Takanori Kihara Miho Kikuchi Jun Kikuchi Jun Kikukawa Takashi Kim Taegon Kimura Atsuomi Kimura Saori Kimura Shunsaku	L12, P66, P69, P70, P71, P76, P105, P114 P91 P68, P74 IL7 P75 P75 P74 L19, P21 P40 1, P7, P51, P52, P53, P56, P57, P58, P73 P56, P57, P58, P73 P97 P61 P78 P54
Kawamura Izuru I Kawamura Yuuji Kawano Keiichi Kevin H. Gardner Khampa Chalermpon Kido Kouki Kigawa Takanori Kihara Miho Kikuchi Jun Kikuchi Jun Kimura Atsuomi Kimura Atsuomi Kimura Saori Kimura Shunsaku Kinoshita Kengo	L12, P66, P69, P70, P71, P76, P105, P114 P91 P68, P74 IL7 P75 P74 L19, P21 P40 1, P7, P51, P52, P53, P56, P57, P58, P73 P68, P74 P97 P61 P78 P54 P54
Kawamura Izuru I Kawamura Yuuji Kawano Keiichi Kevin H. Gardner Khampa Chalermpon Kido Kouki Kigawa Takanori Kihara Miho Kikuchi Jun Kikuchi Jun Kikukawa Takashi Kim Taegon Kimura Atsuomi Kimura Saori Kimura Shunsaku Kinoshita Kengo Kira Atsushi	L12, P66, P69, P70, P71, P76, P105, P114 P91 P68, P74 IL7 P75 P74 L19, P21 P40 1, P7, P51, P52, P53, P56, P57, P58, P73 P56, P57, P58, P73 P61 P78 P54 P54 P55
Kawamura Izuru I Kawamura Yuuji Kawano Keiichi Kevin H. Gardner Khampa Chalermpon Kido Kouki Kigawa Takanori Kigawa Takanori Kihara Miho Kikuchi Jun Kikuchi Jun Kikuchi Jun Kimura Atsuomi Kimura Atsuomi Kimura Saori Kimura Shunsaku Kinoshita Kengo Kira Atsushi Kitagawa Masahiro	L12, P66, P69, P70, P71, P76, P105, P114 P91 P68, P74 IL7 P75 P74 P74 L19, P21 P40 1, P7, P51, P52, P53, P56, P57, P58, P73 P68, P74 P97 P61 P78 P54 P54 P56 P54 P56
Kawamura Izuru I Kawamura Yuuji Kawano Keiichi Kevin H. Gardner Khampa Chalermpon Kido Kouki Kigawa Takanori Kihara Miho Kikuchi Jun Kikuchi Jun Kikuchi Jun Kimura Mikashi Kimura Atsuomi Kimura Saori Kimura Shunsaku Kinoshita Kengo Kira Atsushi Kitagawa Masahiro	L12, P66, P69, P70, P71, P76, P105, P114 P91 P68, P74 IL7 P75 P74 L19, P21 P40 1, P7, P51, P52, P53, P56, P57, P58, P73 P56, P57, P58, P73 P68, P74 P97 P61 P78 P54 P54 P54 P54 P35 P66 P117, P123

Kitagawa Susumu ······IL3, L2
Kitahara Ryo ····· P30, P31
Kitamura Masashi ·····P86
Kitano Takahiro P116
Kitazawa Soichiro
Kittaka Shigeharu P101
Kobashigawa YoshihiroP28
Kobayashi Ayaho P20, P41
Kobayashi MinaP88
Kobayashi Nagao P29
Kobayashi Naohiro \cdots P31, P32, P39, P125
Kobayashi Naoki P40
Kobayashi Toshiya P51
Kohda Daisuke P15
Kohno Toshiyuki ······ P36, P43
Koichi Shungo P13
Kojima Chojiro P3, P32, P38, P67,
P75, P125
Kojima Natsuko L25
Komaba Shinichi P96
Komatsu Takanori P7, P51, P56, P73
Komoto MasayaL16
Kondo Sanae ·····P45
Kondo Takashi P16
Kondo TeruyukiP54
Kondo Yasushi ····· P124
Konishi Youhei ·····P92
Konuma Tsuyoshi Verence P26
Kose Katsumi ·····P62
Kose Yuma P103, P104
Koshiba SeizoL19
Koshino HiroyukiP13
Kozawa Yu L8
Kubota Michiyo P4
Kubota Yoshihiro P105
Kumagai Yoshihide P77, P102
Kumazawa Shigenori P4
Kumeta HirovukiP28
Kunimoto Ko-Ki ······P88

Kuroki Shigeki L7
Kurosu Hiromichi P78
Kurotsu Takuzo P86
Kusunoki Hideki ······P43
Kuwahara Daisuke P126
L

Laura B. Motta-Mena I	L7
Lee Masakazu ······P	54
Lili Mao ·····P	67

Μ

Maeda Koichi P104	
Maeda Shiro P88	
Maeda Tomoya ······P10	
Maesaki Ryoko P22	
Maki Hideshi L4, P49	
Makino AkiraP54	
Makino YoshiteruP71	
Malon Michal L6, P110	
Martineau Charlotte L6	
Maruyama Isao P116	
Maruyama Tadashi Version P58	
Maruyoshi Keisuke P108	
Masu Hyuma P9	
Matsubara Koshi P5	
Matsuda Hironori IL1	
Matsuda Takaaki P106	
Matsuki Yoh P111	
Matsumoto Hironobu ·····P61	
Matsunaga Tatsuya P120	
Matsuo Takeshi P92	
Matsuoka ShigeruP65	
Matsushima Kouji ·····P37	
Matsushita Yasuyuki L8	
Miki Tsunehisa P89	
Misawa Takuma ·····P53	
Mishima Masaki ······ P20, P22, P41, P47,	
P55, P127	
Mitsumori FumiyukiL21	
Miyano Hiroshi P16	
Miyanoiri Yohei L14, P23, P45	

Miyasa Ryota ······P70
Miyashita SatoshiP91
Miyatou Tatsuya ····· P101
Miyawaki Jin ·····P97
Miyazaki Kensuke P22
Mizuguchi Mineyuki P42
Mizuhata Minoru L4, P49
Mizukoshi Toshimi VIII P16
Mizuno Motohiro P77, P91, P98, P99,
P101, P102
Mizuno Takashi P119,P120
Mochida Isao P97
Mogami Yuuki ······ L1, P107
Momose Hikaru ·····P10
Morimoto DaichiP26
Morishima Makoto P95
Morita Yasushi
Moriya Jun ·····P40
Moro Fumika ·····P14
Murakami Kimiya P106
Murakami Miwa L1, P93, P95, P112
Murakami Takumi ······P40
Murata Michio ·····P65
Murayama Shin-ichi ·····P32
N

Ν

Nabanita Das ······ IL6
Nabeshima Yuko ······P42
Nagata Kazuya
Nagata Takashi·····P18, P39
Naito Akira L12, P66, P69, P70,
P71, P76, P105, P114
Nakada Masaru ·····P85
Nakahara Mikio
Nakamura Eriko
Nakamura Masahiro P48
Nakamura Takashi·····P62
Nakanishi Saki ·····P78
Nakazawa Yasumoto L13
Namsrai JavkhlantugsP66
Naono TatsuyaP10

Negoro Makoto L23, P113, P116,
P117, P123
Neya Saburo P24
Nishida Masakazu ·····P89
Nishida Shinsuke L23, P117
Nishikawa Ryota ·····P69
Nishimura ChiakiL16
Nishimura Hiroshi ······ L8
Nishimura Katsuyuki L13, P27, P84
Nishimura Ryu ·····P24
Nishioka Daisuke P92
Nishiyama Yusuke L6, L13, P84, P110
Noda Yasuto P87, P107, P112
Nomura Kaoru L3
Noritake Tomoya P8
Norose Nao P19
Numata MasahikoP12
0

Obayashi Kouichi P118	
Ogumi ZempachiL1, P93, P95	9
Ogura Kenji L9, P28	9
Ogura Tatsuki ······P57	9
Ohashi Ryutaro … P77, P91, P98, P99, P101	9
Ohata Takuya P84	9
Ohki Shinobu P96, P104	
Ohki Izuru ·····P38	
Ohkubo TakahiroL22, P103, P104	
Ohmae Eiji ·····P31	
Ohori Yuka ······ L16	
Ohta Yousuke P8	5
Ohtake Norio P59	
Ohtani Hajime P46	
Oishi Risa-P73	9
Okada Kazuyuki ·····P85	
Okada Norihiro P19	
Okada Utaka	
Okada Yumika ·····P94	9
Okamura Hideyasu L8, P21	
Okazaki Honoka	9
Okitsu Takashi P69, P70, P71	9

Okumura ShintarouP61
Okumura Yuzo P49
Okushita Keiko L13, P72
Onda Mitsuhiko P14
Oshimura Miyuki P10
Ota Motonori P35
Otsu Maina P19
Oyama Daisuke P63
Ozawa Snin-ichi P16
Q
Qi Jianxun P34
R
Ramamoorthy AyyalusamyP76
S
Saeki Yasuaki P123
Sai Masahiko P6
Saido Takaomi C. P36
Saio Tomohide L9, P28
Saito Kazuki P100
Saito Naoki ·····P11
Saito Takashi P36
Saito Takeshi P11, P12
Sakao RyuichiP10
Sakata Kenji P56, P58
Sako Nodoka L5
Sakuragi Takahiro P126
Sano Junko P48
Sasahara Hisamu P111
Sasaki Yukichi P105
Sato Hajime P3
Sato Hiroko P14, P83
Satoh Hiroko P13
Sato Wataru P91
Sato Yuho P52
Sato-Akaba Hideo P118
Satoh Ryosuke ·····P20
Sazanami Kouichi P101
Sebera Jakub P38
Seiwa Emiko P55
Seki Hiroko P9

Sekine Sokei	P83
Shang-Te Danny Hsu	······ IL8
Shi Yi	·····P34
Shiba Kiyotaka	·····P90
Shibafuji Yusuke	·····P71
Shibata Tomokazu	······P24, P29
Shigeta Arisu	·····P70
Shiheido Hirokazu	P39
Shikano Yutaka	P124
Shimada Ichio	L15, P40
Shimadzu Saori	·····P96
Shimamoto Keiko	L3
Shimazaki Manato	P127
Shimizu Shunsuke	L1, P93
Shimizu Tadashi … L5, P9	91, P96, P98, P104
Shimoda Keiji	·····P95
Shingai Kyouhei	P8
Shino Amiu	·····P73
Shiozaki Kazuhiro	P32
Shirakawa Kie	P39
Shirakawa Masahiro H	P25, P26, P47, P54
Shirasu Mika	P60
Sogabe Keisuke	P46
Sone Masato	·····P78
Stanley J. Opella	······ IL9
Sudo Yuki	······ P69, P71
Suematsu Makoto	L18
Suganuma Koto	······ IL1
Sugase Kenji	L3, L18, P26, P34
Sugio Yurie	····· P102
Sugita Yuji	P21
Sugiura Reiko	P20
Sugiyama Syusei	P21
Suka Ryota	P100, P102
Sumimoto Hideki	P28
Suyama Rai	····· P113
Suzuki Akihiro	P24
Suzuki Ei-ichiro	P16
Suzuki Toshiharu	P64
Suzuki You	P100, P102, P128

Suzuki Yu ······ L13, P90
Sychrovský Vladimír P38
Т
Tabuchi Yutaka P113
Tadokoro Makoto P100, P102, P128
Tai Hulin P29
Tai Kenji P40
Takagi Ken ·····P88
Takahashi Ami ····· P125
Takahashi Takafumi P103, P104
Takahashi ToshikazuL24
Takasaki Tomoya P115
Takaya Nobuhiro L20, L21
Takeda Kazuyuki P94, P96, P109,
P112, P115, P121
Takeda Mitsuhiro L14, P23, P33, P45
Takegoshi Kiyonori L1, P87, P93, P107,
P109, P112, P115, P119, P120, P121
Takeshima Naomi ·····P50
Takeuchi Koh L15, P40
Takewaki Takahiko P92
Tamada DaikiP62
Tamaki Hajime ······ P68, P74
Tanaka Ayumi P36
Tanaka Takashi P55
Tanaka Tomoko P89
Tanio Michikazu ······ P27, P43
Tanna AkioP92
Tansho Masataka P91, P98
Tasei Yugo L12, P114
Tashiro Mituru P44
Tate Shin-ichi
Tatebe Hisashi ·····P32
Tateishi Kenichiro L23, P117
Taulelle Francis L6
Tenno Takeshi ·····P35
Terao Ryou ·····P19
Terasawa Hiroaki
Terashima Noritsugu
Terashima Yuya ·····P37

Terauchi Tsutomu L14, P23, P33, P45
Tochio Hidehito P25, P26, P54
Tochio Naoya L16, P21
Toda Etsuko P37
Toda Mitsuru P119
Todokoro YasutoP64
Thomas H. Scheuermann IL7
Timothy A. Cross IL6
Tomonaga Yuya ·····P71
Tonegawa Ken ·····P29
Torizawa Takuya
Touhara Kazushige ·····P60
Tsuboi Yuuri ····· P57, P58
Tsujishita Hideki L9
Tsumoto Kouhei ·····P34
Tuchiya Koichi ·····P50
Tutsumi Atsushi ·····P66
Tuzi Satoru ·····P70

U

Uchimoto Yoshiharu L1, P93, P95		
Uchiyama Chika ·····P61		
Uehara Gen·····P63		
Ueno Takamasa P34		
Umegawa Yuichi ·····P65		
Umehara Masahiro P6		
Umeyama Daiki L2		
Umiyama Tsuyoshi Version P98, P99		
Unno Sachiko P17		
Ute Koichi P10, P46		
Uzawa Jun P9		
V		
Victor Ocasio ······ IL7		

W

Wada Akimori P69, P70, P71
Wakisaka Asato P109
Walinda Erik ·····P26
Warren S. Warren IL10
Watanabe Eiji P83
Watanabe Hidehiro L20, L21
Watanabe Junji L5, P78

Watanabe Satoru	L16, P21
Watanabe Takashi	L8
Williamson Mike	······P30
Х	
Xue Xianyu ·····	······ L11
Y	
Yabuuchi Naoaki ······	······P96
Yagi-Utsumi Maho	······P30
Yamada Hisatsugu	······P54
Yamada Kazuhiko	L5
Yamada Shinji 👓	L5
Yamaguchi Hiroto	L9
Yamaguchi Hitomi ······	······P36
Yamaguchi Toshiyuki	······P65
Yamaguchi Yoshiki 🛛	Р9
Yamaki Nao	······P22
Yamamoto Tasuya	······ L18
Yamamoto Yasuhiko	P24, P29
Yamanaka Noriko	······P11
Yamauchi Masahiro	······P81
Yamauchi Yukiko	······P61
Yamazaki Satoru P1	06, P107
Yamazaki Taichi	P11, P12
Yamazawa Akira	P1
Yanae Koji 👓	P6
Yanagawa Hiroshi	······P39
Yanagi Yosuke	······P62
Yanaka Saeko	······P34
Yang Chun-Jiun	······P23
Yasuda Hiroyuki	······L24
Yazawa Koji	L13, P84
Ye Yue Qi ·····	L6
Yimin Miao	IL6
Yirui Guo ·····	IL7
Yokochi Masashi	····· P125
Yokogawa Mariko	······P28
Yokoyama Jun	······ L19
Yomoda Hiroki	······P71
Yoneda Naoki	······P40
Yoon Seong-Ho	······P97

井田	朋智
	P99, P101, P128
市川	翼 ······ P124
一条	直規 P121
一村	裕基 P123
伊塚	美里 ······P94, P96
出田	圭子
伊藤	研悟P56
伊藤	建比古
渡辺(伊藤) ひかりP76
伊藤	萌美
伊藤	隆 P20, P22, P41, P47, P55, P127
伊藤	佳孝P62
糸﨑	秀夫 ······ P118
稲垣	怜史 P105
稲垣	冬彦 L9, P28
犬飼	宗弘IL3, L2
井上	篤P40
井上	沙紀P31
井上	仁P47
井上	正順P67
井上	芳久 P106
猪股	晃介P25
井原	俊英 P11, P12
井町	昌義P66
今村	良教 L8
岩崎	彩乃P99
岩崎	郁P64
岩田	武史 P125
岩舘	泰彦 L22, P104
岩浪	克之
岩本	成人 P36, P60
岩本	純P82
岩谷	奈央子
Walin	da Erik ·····P26
ウイリ	アムソン マイクP30
上野	貴将P34
上原	弦P63
鵜澤	洵 P9
内本	喜晴L1, P93, P95

Yoshida Kaname P105
Yoshida Masasuke P64
Yoshida Naoki P28
Yoshida Seiji P1
Yoshida Takao P58
Yoshimizu Hiroaki P79, P80, P81, P82
Yoshinaga Sosuke P36, P37, P60
Yumen Ikuko P64

五十音順

あ行

相沢	智康	······ P68, P74	
青木	昭宏	L13, P72, P84	
赤羽	英夫	P118	
秋吉	克昂	P22	
阿久津	秀加	推 HL2, P64	
浅川	聖子	P10	
浅川	直紀	P122	
朝倉	大河	······ P52, P58	
朝倉	哲郎	······IL1, L13, P72, P83, P84, P90	
浅沼	諒太	·····P79	
浅野	洸 …	P76	
浅野	敦志	······ P72, P86	
阿部	友樹	P76	
天野	伸治的	兆P28	
新井	謙三	······P40	
新井	彩子	P92	
新井	寿一	·····P94	
新井	直 …	P19	
荒井	創 …	L1, P93, P95	
飯沼	純弥	······P41	
Iuga D)inu ···	P108	
池上	貴久	P3, P38	
池田	恵介	P67	
池谷	鉄兵	P47, P55, P127	
伊澤	研一員	¶SP87	
石島(」	上平)	美弥P76	
石田	規人	P37	
石田	宏之	·····P85	
石田	祐之	······P94, P96	
磯田	恭佑	····· P100, P102	

内山	知香P61
右手	浩一 P10, P46
海山	剛史
梅川	雄一P65
梅原	将洋 ····· P6
梅山	大樹 L2
海野	幸子 ·····P17
江川	文子 ······ P67, P68, P74, P75
江崎	芳P37
遠藤	一央 P128
遠洞	佑美 ·····P78
大石	梨紗P73
大木	出 ·····P38
大木	忍 P96, P104
大窪	貴洋L22, P103, P104
太田	元規P35
大田	陽介 ····· P8
大竹	紀夫P59
大谷	肇P46
大津	舞菜
大橋	竜太郎 ······· P77, P91, P98, P99, P101
大橋 大畑	竜太郎 ······· P77, P91, P98, P99, P101 卓也 ······P84
大橋 大畑 大林	竜太郎 P77, P91, P98, P99, P101 卓也 P84 輝一 P118
大橋 大畑 大林 大堀	竜太郎 P77, P91, P98, P99, P101 卓也 P84 輝一 P118 由佳 L16
大大大大大大大大	竜太郎 P77, P91, P98, P99, P101 卓也 P84 輝一 P118 由佳 L16 英司 P31
大大大大大岡	竜太郎 P77, P91, P98, P99, P101 卓也 P84 輝一 P118 由佳 L16 英司 P31 萌花 L16
大大大大大岡岡	竜太郎 P77, P91, P98, P99, P101 卓也 P84 輝一 P118 由佳 L16 英司 P31 萌花 L16 一幸 P85
大大大大大岡岡岡橋畑林堀前崎田田	竜太郎 P77, P91, P98, P99, P101 卓也 P84 輝一 P118 由佳 L16 英司 P31 萌花 L16 一幸 P85 典弘 P19
大大大大大岡岡岡岡橋畑林堀前崎田田田	竜太郎 P77, P91, P98, P99, P101 卓也 P84 輝一 P118 由佳 L16 英司 P31 萌花 L16 一幸 P85 典弘 P19 豊 P2
大大大大大岡岡岡岡岡橋畑林堀前崎田田田田	竜太郎 P77, P91, P98, P99, P101 卓也 P84 輝一 P118 由佳 L16 英司 P31 萌花 L16 一幸 P85 典弘 P19 豊 P2 裕実春 P94
大大大大大岡岡岡岡岡岡橋畑林堀前崎田田田田村	竜太郎 P77, P91, P98, P99, P101 卓也 P84 輝一 P118 由佳 L16 英司 P31 萌花 L16 一幸 P85 典弘 P19 豊 P2 裕実春 P94 英保 L8, P21
大大大大大岡岡岡岡岡沖橋畑林堀前崎田田田田村津	竜太郎 P77, P91, P98, P99, P101 卓也 P84 輝一 P118 由佳 L16 英司 P31 萌花 L16 一幸 P85 典弘 P19 豊 P2 裕実春 P94 英保 L8, P21 貴志 P69, P70, P71
大大大大大岡岡岡岡岡沖奥橋畑林堀前崎田田田田村津下	竜太郎 P77, P91, P98, P99, P101 卓也 P84 輝一 P118 由佳 L16 英司 P31 萌花 L16 一幸 P85 典弘 P19 豊 P2 裕実春 P94 英保 L8, P21 貴志 P69, P70, P71 慶子 L13, P72
大大大大大岡岡岡岡岡沖奥小橋畑林堀前崎田田田田村津下久見	竜太郎 P77, P91, P98, P99, P101 卓也 P84 輝一 P118 由佳 L16 英司 P31 萌花 L16 一幸 P85 典弘 P19 豊 P2 裕実春 P94 英保 L8, P21 貴志 P69, P70, P71 慶子 L13, P72 善八 L1, P93, P95
大大大大大岡岡岡岡岡沖奥小奥橋畑林堀前崎田田田田村津下久村見	竜太郎 P77, P91, P98, P99, P101 卓也 P84 輝一 P118 由佳 L16 英司 P31 萌花 L16 一幸 P85 典弘 P19 豊 P2 裕実春 P94 英保 L8, P21 貴志 P69, P70, P71 慶子 L13, P72 善八 P61
大大大大大岡岡岡岡岡沖奥小奥奥橋畑林堀前崎田田田田村津下久村村	竜太郎 P77, P91, P98, P99, P101 卓也 P84 輝一 P118 由佳 L16 英司 P31 萌花 L16 一幸 P85 典弘 P19 豊 P2 裕実春 P94 英保 L8, P21 貴志 P69, P70, P71 慶子 L13, P72 善八 L1, P93, P95 慎太郎 P61 雄三 P49
大大大大大岡岡岡岡岡沖奥小奥奥小橋畑林堀前崎田田田田村津下久村村椋見	竜太郎 P77, P91, P98, P99, P101 卓也 P84 輝一 P118 由佳 L16 英司 P31 萌花 L16 一幸 P85 典弘 P19 豊 P2 裕実春 P94 英保 L8, P21 貴志 P69, P70, P71 慶子 L13, P72 善八 P49 賢治 L9, P28
大大大大大岡岡岡岡岡河澳小奥奥小小橋畑林堀前崎田田田田村津下久村村椋倉見	竜太郎 P77, P91, P98, P99, P101 卓也 P84 輝一 P118 由佳 L16 英司 P31 萌花 L16 一幸 P85 典弘 P19 豊 P2 裕実春 P94 英保 L8, P21 貴志 P69, P70, P71 慶子 L13, P72 善八 L1, P93, P95 慎太郎 P61 雄三 P49 賢治 L9, P28 立己 P57
大大大大大岡岡岡岡岡河奥小奥奥小小小橋畑林堀前崎田田田田村津下久村村椋倉澤見	竜太郎 P77, P91, P98, P99, P101 卓也 P84 輝一 P118 由佳 L16 英司 P31 萌花 L16 一幸 P85 典弘 P19 豊 P2 裕実春 P94 英保 L8, P21 貴志 P69, P70, P71 慶子 L13, P72 善八 P49 賢治 L9, P28 立己 P57 真一 P16

小山	大介	P63
恩田	光彦	P14
		か行
甲斐莉	E 正	亘 L14, P23, P33, P45
Gao G	eorge	P34
加賀	尚博	P59
香川	晃徳	L23, P116, P117
葛西	卓磨	L19
梶 弘	公典 …	L13
梶川	正樹	P19
片岡	沙織	P32
片岡	大亮	L4
片平	正人	L8, P18, P39
片平	律子	P3
加藤	晃一	IL5, P30
加藤	尚志	P11
金橋	康二	
金場	哲平	······ P22, P41
金山	公三	P89
兼松	涉	·····P89
上坪	祐介	L2
神原	孝之	P112
神谷	昌克	······ P68, P74
Kham	npa Ch	alermpon ·····P75
亀田	倫史	······ P30, P74
加茂	直樹	P69, P71
鴨志田] -	······ P47
河合	剛太	
河野	敬一	······ P68, P74
河村	綾乃	P61
川村	出 …	L12, P66, P69, P70,
		P71, P76, P105, P114
川村	祐史	P91
姜秀	珍	·····P64
Gan Z	Zhehor	ng P110
姜聲	難 …	·····P78
神崎	正美	L11
神庭	圭佑	P18
木川	隆則	L19, P21
菊川	峰志	
小柴	生造	
-----	-------------------------------	
児嶋	長次郎 ······ P3, P32, P38, P67,	
	P75, P125	
小島	奈津子	
巨瀬	勝美 ·····P62	
古瀬	佑馬 P103, P104	
後藤	和馬	
後藤	はるな	
小西	洋平P92	
小沼	剛P26	
小橋川	敬博P28	
小林	彩保 P20, P41	
小林	俊哉P51	
小林	直樹P40	
小林	直弘P31	
小林	直宏 P32, P39, P125	
小林	長夫 ·····P29	
小林	未奈P88	
小松	功典 P7, P51, P56, P73	
駒場	慎一P96	
近藤	早恵P45	
近藤	高史	
近藤	輝幸P54	
近藤	康 P124	
	さ行	
斎 政	双彦 ····· P6	
斎尾	智英 L9, P28	
齋藤	一輝 P100	
西道	隆臣P36	
斉藤	貴志P36	
齋藤	剛 ······ P11, P12	
吝茈	古樹	

斎	政彦 …	•••••	••••••	······ P6
斎尾	智英			L9, P28
齋藤	一輝			···· P100
西道	隆臣			·····P36
斉藤	貴志			······P36
齋藤	剛 …]	P11, P12
斎藤	直樹			······P11
佐伯	保明			···· P123
坂尾	竜一			······P10
坂田	研二		······ I	P56, P58
櫻木	隆広			···· P126
佐孝	和 …			L5
佐々ス	木優言	E		···· P105
佐々江	皮 康-	<u> </u>		···· P101
笹原	久武			···· P111

菊地	淳 P1, P7, P51, P52, P53,
	P56, P57, P58, P73
北川	進
北川	勝浩 L23, P113, P116, P117, P123
北沢	創一郎 P30, P31
北野	崇博 P116
北原	亮
北村	成史 ·····P86
橘高	茂治 P101
木戸	浩貴P74
木下	賢吾P35
木原	美穂P40
金泰	坤
木村	敦臣 ······P61
木村	沙織P78
木村	俊作P54
Günte	rt Peter P127
吉良	敦史P66
楠 英	樹P43
国本	浩喜P88
久野	敦
久保田	通代 P4
窪田	好浩 P105
熊谷	翼秀 P77, P102
熊澤	茂則 P4
久米田	博之 ······P28
Kevin	H. Gardner IL7
Grego	ry S. Boutis P83
黒木	重樹 L7
黒子	弘道P78
黒津	卓三P86
桑原	大介 P126
小市	俊悟P13
神田	大輔P15
合田	名都子P35
河野	俊之 ······P36, P43
幸元	雅也
後々田	忠夫 ····· P8
小澤	佑 L8
越野	広雪P13

佐藤	→ P3
佐藤	浩子 P14, P83
佐藤	寛子P13
佐藤	有穂P52
佐藤	亮介P20
佐藤	涉P91
佐野	純子P48
塩崎	一裕P32
鹿野	豊 P124
Shang	-Te Danny Hsu ······ IL8
Sychro	ovský Vladimír
Shi Yi	P34
重田	安里寿
篠阿	「弥宇P73
芝 清	隆P90
柴田	友和
柴藤	祐介P71
始平堂	: 弘和P39
嶋崎	真那人 P127
嶋田	一夫
嶋津	沙織P96
島本	啓子 L3
清水	俊介 L1, P93
清水	禎 L5, P91, P96, P98, P104
治村	圭子L25
下田	景士P95
薛 献	字
自川	貴恵P39
白川	昌宏 P25, P26, P47, P54
白須	未香P60
新谷	恭兵 ····· P8
末松	誠L18
須賀	亮太 P100, P102
菅瀬	謙治
菅沼	こと IL1
杉浦	麗子P20
杉尾	友理恵 P102
杉田	有治P21
杉山	修世P21
鈴木	秋弘P24

鈴木	榮一	郎	•••••	······P16
鈴木	俊治	•••••	•••••	P64
鈴木	悠…		•••••	L13, P90
鈴木	陽	•••••	•••••	·· P100, P102, P128
須藤	雄気		•••••	······ P69, P71
住本	英樹	•••••	•••••	·····P28
陶山	雷 …	•••••	•••••	····· P113
清和	恵美	子	•••••	······P55
関 宏	;子 …	•••••	•••••	Р9
関根	素馨		•••••	·····P83
Sebera	a Jakı	ıb	•••••	·····P38
曽我部	8 啓	介	•••••	P46
曽根	正人		•••••	·····P78

た行

田井	健二P40
太 虎	注林 ·····P29
高木	健P88
高崎	智弥 P115
高橋	あみ P125
高橋	貴文 P103, P104
髙橋	利和
高屋	展宏
竹内	恒
竹腰	清乃理L1, P87, P93, P107, P109,
	P112, P115, P119, P120, P121
竹嶋	奈緒美
武田	和行 P94, P96, P109,
	P112, P115, P121
武田	P112, P115, P121 光広
武田 武脇	P112, P115, P121 光広 L14, P23, P33, P45 隆彦P92
武田 武脇 田代	P112, P115, P121 光広 L14, P23, P33, P45 隆彦 P92 充 P44
武田 武脇 田代 田制	P112, P115, P121 光広 L14, P23, P33, P45 隆彦 P92 充 P44 侑悟 L12, P114
武 武 田 脇 代 田 制 楯 真	P112, P115, P121 光広 L14, P23, P33, P45 隆彦 P92 充 P44 侑悟 L12, P114 Ç— L10
武武田田楯伊田脇代制 達	P112, P115, P121 光広 L14, P23, P33, P45 隆彦 P92 充 P44 侑悟 L12, P114 其一 L10 康博 P1, P52, P53, P56, P57, P58
武武田田楯伊立田脇代制 達石	P112, P115, P121 光広 L14, P23, P33, P45 隆彦 P92 充 P44 侑悟 L12, P114 二 L10 康博 P1, P52, P53, P56, P57, P58 健一郎 L23, P117
武武田田楯伊立建田脇代制 達石部	P112, P115, P121 光広 L14, P23, P33, P45 隆彦 P92 充 P44 侑悟 L12, P114 二 L10 康博 P1, P52, P53, P56, P57, P58 健一郎 L23, P117 恒 P32
武武田田楯伊立建田脇代制 達石部所	P112, P115, P121 光広 L14, P23, P33, P45 隆彦 P92 充 P44 侑悟 L12, P114 二 L10 康博 P1, P52, P53, P56, P57, P58 健一郎 L23, P117 恒 P32 誠 P100, P102, P128
武武田田楯伊立建田田田脇代制 達石部所中	P112, P115, P121 光広 L14, P23, P33, P45 隆彦 P92 充 P44 侑悟 L12, P114 二 L10 康博 P1, P52, P53, P56, P57, P58 健一郎 L23, P117 恒 P32 誠 P100, P102, P128 愛弓 P36
武武田田楯伊立建田田田田脇代制 達石部所中中	P112, P115, P121 光広 L14, P23, P33, P45 隆彦 P92 充 P44 侑悟 L12, P114 二 L12, P114 二 L10 康博 P1, P52, P53, P56, P57, P58 健一郎 L23, P117 恒 P32 誠 P100, P102, P128 愛弓 P36 孝 P55

谷生	道一 ······ P27, P4	3
田渕	豊 P11	3
田巻	初 P68, P7	74
玉田	大輝P6	52
丹所	正孝	8
丹那	晃央 ·····P9	92
陳 海	軍P9	92
Qi Jiar	nxun ·····P3	4
千頭和	I 瑞貴P9	8
知名	秀泰 P	2
千葉	健一 P4	0
辻 暁	P7	'0
辻下	英樹 L	.9
土屋	耕一P5	0
堤 敦	:史P6	6
坪井	裕理 P57, P5	8
津本	浩平P3	4
Dylan	T. Murray ······ IL	.6
出口	健三 L5, P96, P10)4
出村	誠 ······ P68, P7	74
寺内	勉 L14, P23, P33, P4	5
寺尾	亮	9
寺沢	宏明 P36, P37, P6	60
寺島	典二 L	.8
寺島	裕也P3	57
天野	剛志P3	5
土居	信英 ······P3	9
東原	和成P6	60
Taulel	le Francis	.6
遠田	悦子 ·····P3	57
戸田	充 P11	9
栃尾	尚哉 L16, P2	21
杤尾	豪人 P25, P26, P5	4
戸所	泰人P6	54
利根川	健P2	29
友永	雄也	'1
鳥澤	拓也L1	7
	な行	
内藤	晶L12, P66, P69, P70	0,
	P71, P76, P105, P11	4

直野	辰哉P10
中澤	靖元L13
永田	員也 ······ P106
永田	崇 ······P18, P39
中田	克 ·····P85
中西	彩季P78
中原	幹夫 P124
中村	瑛梨子 P102
仲村	高志P62
仲村	仁浩P48
Nabar	ita Das ······ IL6
鍋島	裕子P42
ナムズ	ライ ジャフカラントゥクスP66
西岡	大輔P92
西川	亮汰P69
西田	辰介 L23, P117
西田	雅一 ·····P89
西村	勝之 L13, P27, P84
西村	千秋
西村	裕志 L8
西村	龍P24
西山	裕介 L6, L13, P84, P110
沼田	雅彦 ······P12
根来	誠 L23, P113, P116, P117, P123
根矢	三郎P24
野田	泰斗
野村	薫 L3
則武	智哉 P8
野呂瀬	直P19
	は行
バクス	ター ニコラP30
橋本	朋子P78
服部	峰之 ·····P59
服部	良一P38

 濱津 順平
 P55

 浜津 順平
 P47

 林 こころ
 P67

 林 繁信
 L24, L25

 早田 大祐
 P106

 原 英之
 L7

原田	英里砂
晴柀	貴洋 ······P47
坂東	将光 P124
Hans	Wolfgang Spiess IL11
樋口	智章P80
樋口	正法P63
日高	徹朗P71
平沖	敏文 HL1
平賀	隆 ·····P59
平金	真P60
平野	朋広P10
平林	淳P17
廣明	秀一P35
Feig N	Iichael ·····P21
Ferna	ndo CorreaIL7
福島	和彦
福田	國統 P122
福西	美香
福西	快文P40
冨宅	喜代一
藤岡	耕治 P119
藤戸	輝昭 L12, P114
藤浪	大輔P15
藤本	祐一郎P46
藤原	俊伸P20
藤原	敏道 P3, P32, P38, P64, P67,
	P68, P74, P75, P111, P125
藤原	英明P61
Brown	n Steven P108
降旗	一夫 ······P44
古板	恭子
古川	亜矢子
Frost	Kris P111
Hung	Ivan P110
Hemb	ram Dambarudhar Shiba Saukey… P47
逸見	光 P17, P29
星野	玲緒奈 P1
細谷	孝博 P4
堀毛	悟史IL3, L2
堀籠	美也子

健一	·····P39
ま行	
neau Charlotte	L6
綾子	·····P22
孝一	····· P104
史郎	·····P88
智也	······P10
志	L4, P49
顕	·····P54
義輝	·····P71
8雄真	····· P9
武士	·····P92
茂	·····P65
陽	····· P111
泰幸	L8
綱治	·····P37
孝昭	····· P106
裕生	······ IL1
達弥	····· P120
康史	P5
浩伸	·····P61
勲	····· P116
正	·····P58
京介	····· P108
Michal	L6, P110
恒久	·····P89
拓真	·····P53
正規 … P20, P22, P41, H	P47, P55, P127
峰之	······P42
利巳	······P16
敬	·· P119, P120
元博 P77, I	P91, P98, P99,
	P101, P102
穣	L4, P49
文行	L21
亮太	·····P70
健介	·····P22
智史	······P91
達也	······ P101
博	····· P16
	健一 ま行 ま行 neau Charlotte 綾子 之 空 聖 空 型 志 頭 輝 二 一 二 頭 輝 二

山田 真二 L5
山田 久嗣P54
山中 典子
山本 竜也
山本 泰彦
楊 淳竣P23
湯面 郁子P64
尹 聖昊
Ye Yue Qi L6
横川 真梨子P28
横地 政志 P125
横山 順
吉田 要
葭田 征司 P1
吉田 尊雄
吉田 直樹
吉田 賢右P64
吉永 壮佐 P36, P37, P60
吉水 広明 P79, P80, P81, P82
米田 直樹P40
四方田 洋紀P71
ら行
ラマムーシー アヤルサミーP76
李 直和P54

于关	111	1.04
りりい	まお	P67
Laura l	B. Mot	ta-Mena IL7

わ行

P109	脇坂
····· P69, P70, P71	和田
P83	渡部
L16, P21	渡部
L5, P78	渡辺
L8	渡辺
L20, L21	渡邉

宮ノ入	洋平 L14, P23, P45	
宮脇	仁 ·····P97	
村上	公也 P106	
村上	拓己P40	
村上	美和 L1, P93, P95, P112	
村田	道雄P65	
村山	真一	
最上	祐貴 L1, P107	
持田	勲P97	
百瀬	陽 ·····P10	
森島	慎	
森田	靖 L23, P117	
森本	大智P26	
守谷	潤P40	
茂呂	ふみか	
や行		
矢木-	内海 真穂P30	
矢澤	宏次L13, P84	
安田	弘之L24	
柳江	高次 ····· P6	
谷中	冴子P34	
柳川	弘志P39	
柳陽	5介P62	
薮内	直明P96	
山内	雅弘 ······P81	
山内	紬起子P61	
矢巻	菜央 ·····P22	
山口	敏幸P65	
山口	瞳P36	
山口	寛人 L9	
山口	芳樹 P9	
山崎	悟 P106, P107	
山﨑	太一 ······ P11, P12	
山澤	哲 P1	
山田	和彦 L5	

(無断で複製・転載を禁じます) Copyright© 2013 The Nuclear Magnetic Resonance Society of Japan 2013年11月12日発行 Published on November 12, 2013 第52回NMR討論会 会期:2013年11月12日(火),13日(水),14日(木) November 12(Tue)-14(Thu), 2013 会 場:石川県立音楽堂 ISHIKAWA ONGAKUDO 〒920-0856 石川県金沢市昭和町20-1 TEL:076-232-8111(代) 編集・発行:52nd 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 : nmr52@kuba.jp