第54回 NMR討論会（2015）

The 54th Annual Meeting of The Nuclear Magnetic Resonance Society of Japan

講演要旨集

Abstracts

会　期：**2015年11月6日（金），7日（土），8日（日）**
November 6(Fri)–8(Sun), 2015

会　場：**千葉工業大学　津田沼キャンパス**
Chiba Institute of Technology
Tsudanuma Campus
〒275–0016　千葉県習志野市津田沼 2–17–1

主　催：日本核磁気共鳴学会

共　催：千葉工業大学、高分子学会、日本生物物理学会、日本材料科学会
協　賛：日本農芸化学会、日本分析化学会、分子科学会、日本蛋白質科学会、
日本生化学会、日本磁気共鳴医学会
後　援：日本物理学会、日本分子生物学会、日本糖質学会

第54回NMR討論会　プログラム委員会

河合　剛太（千葉工業大学）［委員長］

森山　広思（東邦大学）

西田　紀貴（東京大学）

武藤　　裕（武蔵野大学）

坂本　泰一（千葉工業大学）
（チュートリアル担当）

飯野　正昭（千葉工業大学）

矢沢　勇樹（千葉工業大学）

島崎　俊明（千葉工業大学）

根本　直樹（千葉工業大学）

会場（千葉工業大学 津田沼キャンパス）への交通案内



千葉工業大学　津田沼キャンパス

〒275-0016　千葉県習志野市津田沼2-17-1

○**JR総武線**「津田沼」駅 駅前《南口》（東京駅から快速で28分）。

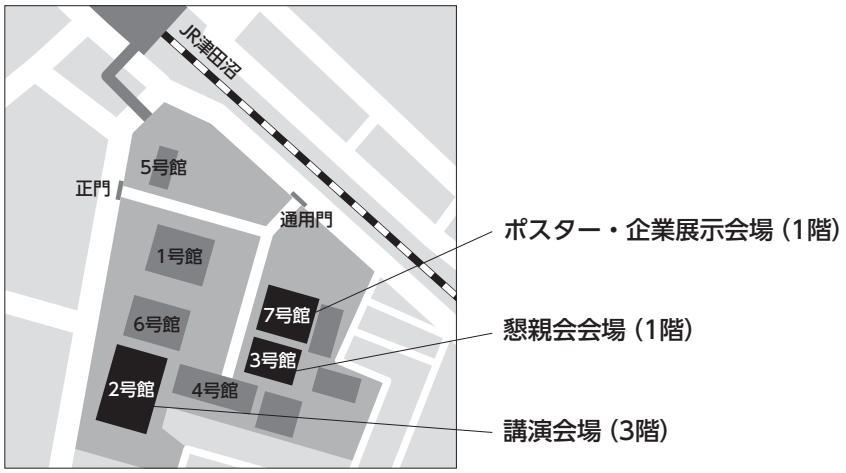
○**京成線**　「京成津田沼」駅下車 徒歩10分（京成上野駅から快速で37分）。

○**新京成線**　「新津田沼」駅下車 徒歩3分。

＊所要時間には乗り換え時間が含まれておりません。また、諸事情により変わる場合がございます。

＊詳細は会場ホームページをご覧ください。

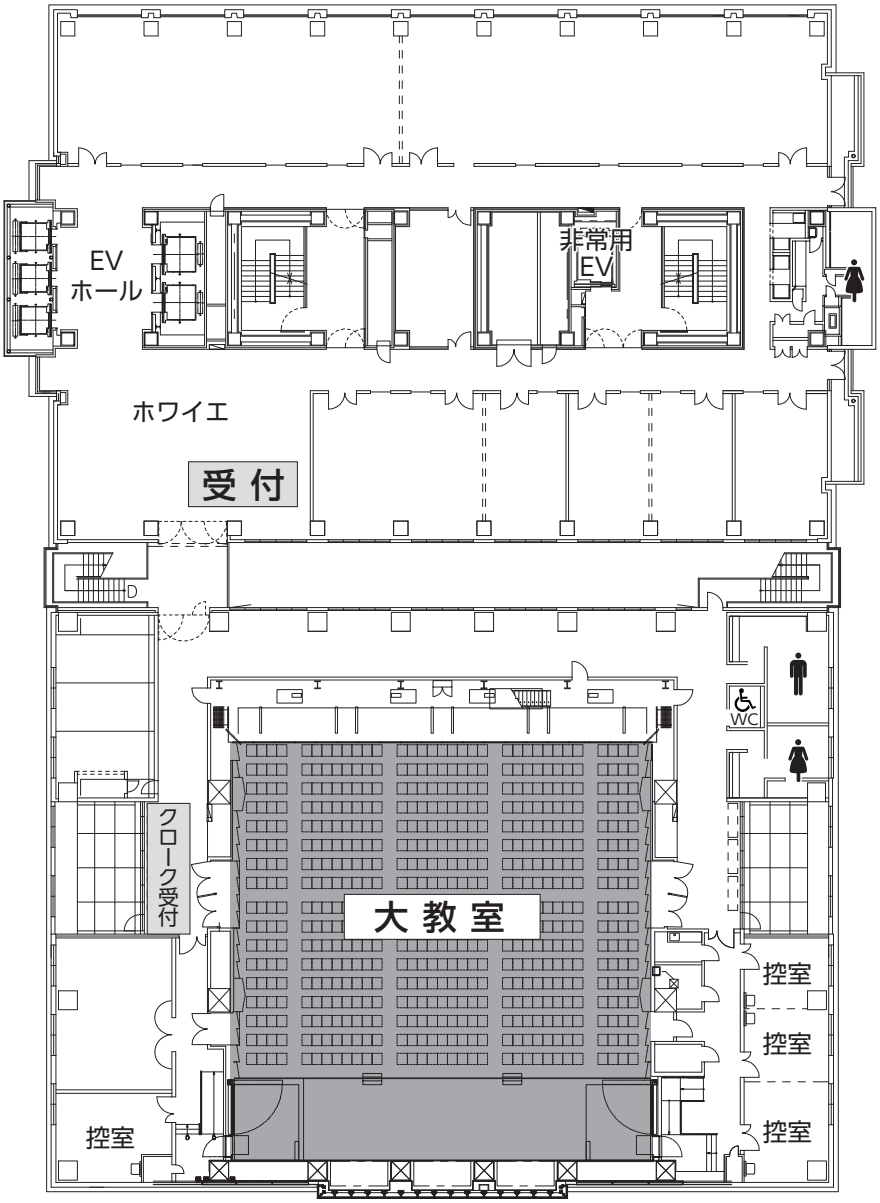
http://www.it-chiba.ac.jp/institute/access/tsudanuma.html



会場の案内図

2号館　3F

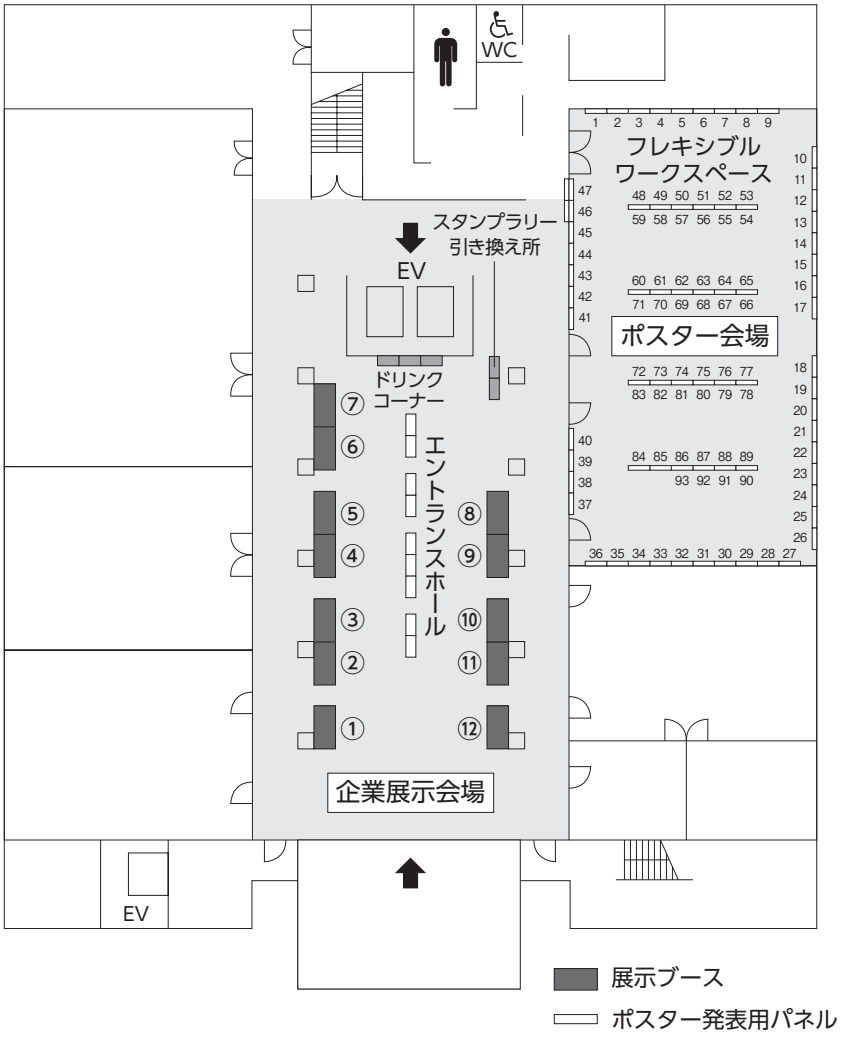
［**大教室**］口頭発表会場、総会会場、クローク
※エレベーターで3階まで上がってください。



ポスター・展示会場詳細図

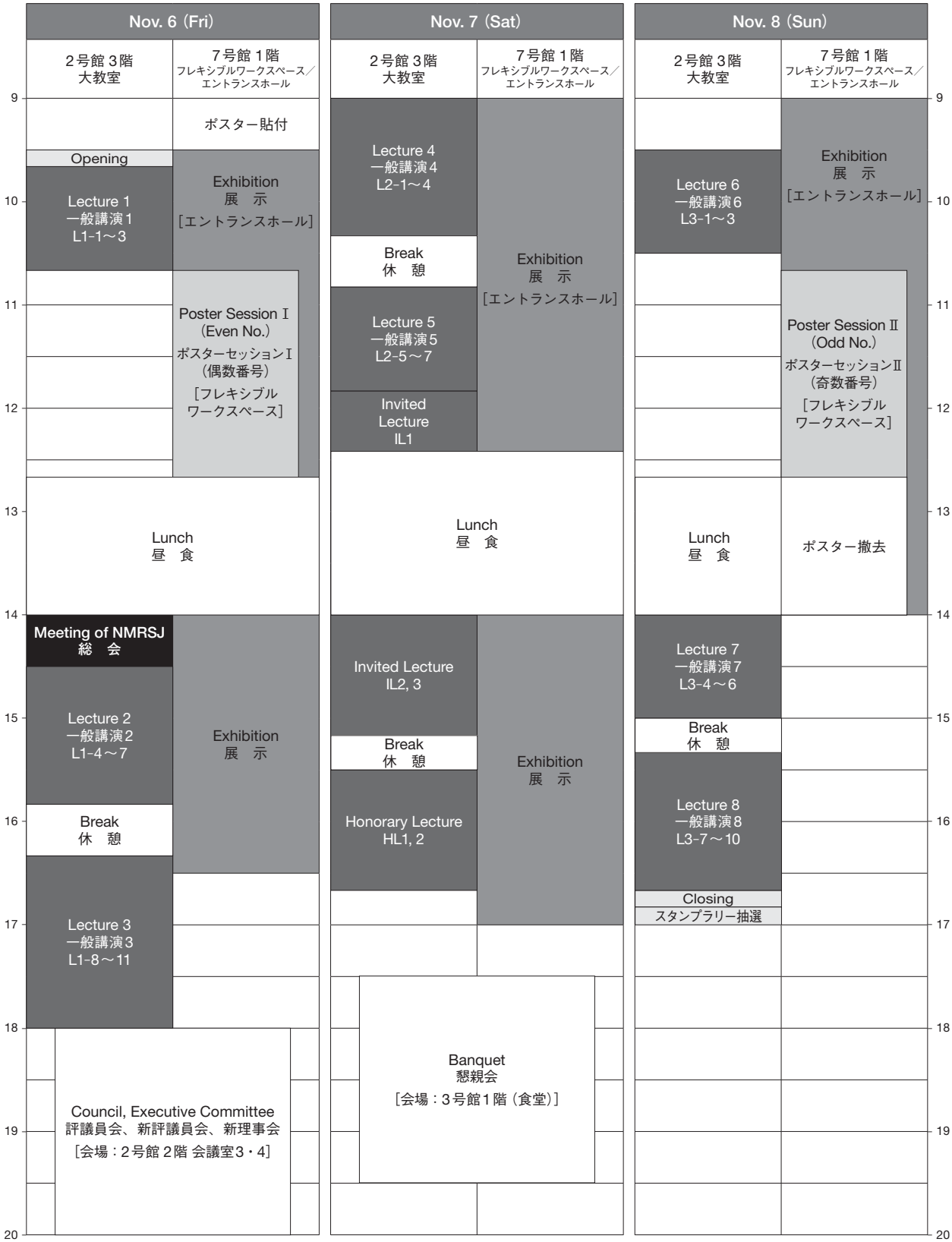
7号館　1F

［フレキシブルワークスペース］ポスター発表会場
［エントランスホール］展示ブース、インターネットコーナー、休憩所、ドリンクコーナー



位置	社　名
①	日本カンタム・デザイン株式会社（Quantum Design Japan, Inc.）
②③	株式会社 JEOL RESONANCE（JEOL RESONANCE Inc.）
④	株式会社エルエイシステムズ（L.A.SYSTEMS, Inc.）
⑤	株式会社エム アール テクノロジー（Magnetic Resonance Technology Ltd.）
⑥	株式会社シゲミ（SHIGEMI Co., Ltd.）
⑦	大陽日酸株式会社（TAIYO NIPPON SANSO CORPORATION）
⑧⑨	ブルカー・バイオスピン株式会社（Bruker BioSpin K.K.）
⑩	SI サイエンス株式会社（SI SCIENCE Co., Ltd.）
⑪	ウェイブファンクション・インク（Wavefunction, Inc.）
⑫	株式会社東京インスツルメンツ（Tokyo Instruments, Inc.）

討論会日程表


Nov. 6 (Fri)
2号館3階 大教室
7号館1階 フレキシブルワークスペース／エントランスホール
ポスター貼付
Opening
Lecture 1 一般講演1 L1-1～3
Exhibition 展 示 [エントランスホール]
Poster Session Ⅰ (Even No.) ポスターセッションⅠ (偶数番号) [フレキシブルワークスペース]
Lunch 昼 食
Meeting of NMRSJ 総 会
Lecture 2 一般講演2 L1-4～7
Exhibition 展 示
Break 休 憩
Lecture 3 一般講演3 L1-8～11
Council, Executive Committee 評議員会、新評議員会、新理事会 [会場：2号館2階 会議室3・4]
Nov. 7 (Sat)
2号館3階 大教室
7号館1階 フレキシブルワークスペース／エントランスホール
Lecture 4 一般講演4 L2-1～4
Exhibition 展 示 [エントランスホール]
Break 休 憩
Lecture 5 一般講演5 L2-5～7
Invited Lecture IL1
Lunch 昼 食
Invited Lecture IL2, 3
Break 休 憩
Honorary Lecture HL1, 2
Exhibition 展 示
Banquet 懇親会 [会場：3号館1階 (食堂)]
Nov. 8 (Sun)
2号館3階 大教室
7号館1階 フレキシブルワークスペース／エントランスホール
Lecture 6 一般講演6 L3-1～3
Exhibition 展 示 [エントランスホール]
Poster Session Ⅱ (Odd No.) ポスターセッションⅡ (奇数番号) [フレキシブルワークスペース]
Lunch 昼 食
ポスター撤去
Lecture 7 一般講演7 L3-4～6
Break 休 憩
Lecture 8 一般講演8 L3-7～10
Closing
スタンプラリー抽選
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20

参加者へのご案内

1．受付と参加登録

◇受　付

受付は2号館3階ホワイエ（大教室前）に設けます。

受付時間：11月6日（金）　8：30～17：30

11月7日（土）　8：30～16：15

11月8日（日）　8：30～16：20

・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、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。

◇講演要旨集

講演要旨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、要旨集本文を第54回NMR討論会ホームページ（http://www.nmrj.jp/NMR2015/）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。

2. 会場内のサービス・施設

◇ クローク

２号館3階大教室前にクロークを設置しています。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(3号館1階食堂)に荷物置き場を設置いたしますので、そちらをご利用ください。

利用時間　11月6日（金）　8：30～18：10
11月7日（土）　8：30～17：10
11月8日（日）　8：30～17：30
（＊講演が延びた場合の終了時間は、最終講演終了の30分後とします。）

◇ 昼　食

11月6日（金）、7日（土）は3号館1階の食堂がご利用いただけます。8日（日）は食堂が閉まっておりますので、津田沼駅周辺の飲食店をご利用ください。受付にランチマップをご用意しておりますのでご自由にお取りください。会場周辺にはたくさんの飲食店がありますので是非ご活用ください。

◇ インターネット

学内全域にて、無償の無線LAN接続をご利用いただけます。ご希望の方は当日受付にてお申し出ください。無線LAN接続の利用案内をご用意しております。また、コンピュータ等の端末は各自ご用意ください。

◇ 呼び出し

会場内での呼び出しは、緊急の場合を除き、原則行いません。

3. 禁止事項

◇ 喫煙・飲食

学内は全て禁煙です。また、大教室内でのお食事は禁止となっております。飲み物はペットボトルに限り持込が可能です。ご理解、ご協力をお願いします。

◇ 携帯電話

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

4. 年会についての問い合わせ

◇ 会期中

総合受付
〒275-0016　千葉県習志野市津田沼2-17-1
千葉工業大学　津田沼キャンパス　2号館3階ホワイエ（大教室前）

◇ 会期外

54th NMR 討論会事務局
〒102-0072　東京都千代田区飯田橋3-11-15　UEDAビル6F
株式会社クバプロ内
TEL：03-3238-1689　FAX：03-3238-1837　E-mail：nmr54@kuba.jp

5. 発表者へのご案内

◇座長の方へ

受付：座長の方は、担当時間の10分前までに、大教室内の「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

講演方法：液晶プロジェクターを用いたプレゼンテーションのみとなります。講演に使用するコンピュータは各自で持参して下さい。なお、音声出力には対応しておりません。バッテリー切れに備えて、必ず電源アダプターを持参して下さい。プロジェクターとの接続は、HDMIとD-subピンに対応しております。また、ワイドサイズの画面表示にも対応しております。一部のノートパソコン（特にMac）では専用の出力変換ケーブルが必要となりますので、必ず持参して下さい。バックアップ用として、発表データをCD-ROMあるいはUSBメモリで持参して下さい。

講演の受付：講演前の休憩時間までに、大教室内の「PC受付」に講演に使用するコンピュータを持参して下さい。なお、スリープモードやスクリーンセーバーの設定は解除して下さい。講演前の休憩時間を利用して、動作確認の試写を行うことができます。ご希望の方はお早めに受付までお越しください。

講演時間：進行は座長に一任されています。持ち時間はHonorary Lecture 35分、Invited Lecture 35分、一般講演20分です。ベルの鳴動時刻は以下の通りです。

	一鈴	二鈴（発表終了）	三鈴（質疑終了）
Honorary Lecture	30分	35分	－※
Invited Lecture	25分	30分	35分
一般講演	13分	15分	20分

※Honorary Lectureには質疑の時間はありません。

◇ポスター発表の方へ

作成要項：ポスター作成の使用言語は英語あるいは日本語とします。ただし、図の説明には、英語を用いてください。タイトル、名前、所属については、英語と日本語を併記してください。発表代表者の氏名には、左肩に小さな○印を付けてください。3m離れた位置からでも、十分に読める文字の大きさを用いてください。図や表もできるだけ大きくしてください。

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

展示場所：7号館1階フレキシブルワークスペースです。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6日（金）9：00～9：30の間に掲示し、11月8日（日）12：40～14：00の間に取り外してください。ポスター撤去時刻を過ぎても取り外されないポスターは事務局で撤去します。

ポスター発表時間：ポスター番号が偶数番号の方（P2, P4,…）は、11月6日（金）10：40～12：40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8日（日）10：40～12：40にポスター討論を行ってください。発表時間の間は、必ずポスターの前に立ち、質問と討論に応じてください。

6. 第54回日本核磁気共鳴学会　総会開催通知

日　時：2015年11月6日（金）　14：00～14：30
場　所：千葉工業大学　津田沼キャンパス2号館3階大教室

第54回日本核磁気共鳴学会総会を開催いたします。必ずご出席ください。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5日（木）18：00より	2号館2階　会議室2
評議員会	11月6日（金）18：00より	2号館2階　会議室3・4
新評議員会		
新理事会		

◇いずれも、食事のご用意がございます。

チュートリアルコース

日　時：11月5日（木）／ Nov. 5, Thu.　13：00～18：00
会　場：千葉工業大学　津田沼キャンパス　431講義室
（受付　431講義室前）

13:00～14:30

「NMR教科書のここがよく分からない」

池上　貴久　先生（横浜市立大学）

初学者は講義や教科書を通してNMRを学んでいきますが、そこに書かれた何気ない記述でつまずいてしまうことが多いです。例えば「溶液NMRでは、分子の回転拡散によりこのようなdipolar相互作用が平均化されて、ピークがシャープになる」などの記述です。「拡散がなぜ回転するの？ 平均化とは？ なぜシャープになるの？ product-operatorのプロダクト（直積）って何？」このような疑問が学習の進行をそこで妨げているかもしれません。一方、熟練者の中にも、分からないままに放置して長い時を経てしまい、ある時に逆に初心者から尋ねられてドキッとする方がいるかもしれません。あるいは、「(3*cos^2(Θ)-1)を積分したら0になるでしょ」のような説明で済ませてしまっているかもしれません。今回はこのようなよく分からない教科書の記述を何点か採り上げ、これらをいつものように図で理解することを目指したいと思います。

14:30～14:40　休　憩

14:40～16:10

「固体NMRによる生体分子構造解析の最近の展開」

川村　出　先生（横浜国立大学）

固体NMR分光法は高分子や固体材料など幅広い分野で活躍している。近年、細胞膜中に存在する膜タンパク質やアミロイド線維など難解な生体分子について固体NMRを利用した構造決定の研究がいくつか成され、固体NMRによるプロテインデータバンク（PDB）への登録数も増加している。このような研究を支える測定技術と合わせて、具体的な最新の研究例を紹介し、解説する。

16:10～16:20　休　憩

16:20～17:50

「NMRはいかに創られたか：9. MRIを中心に」

寺尾　武彦　先生（京都大学名誉教授）

教科書では長年にわたって積み重ねられた多数の研究成果が系統的に整理され、簡潔に淡々と記述されている。しかし、その行間には先人たちの汗と涙がにじみ、フィクションを超えるドラマが潜んでいる。本講演では時代を画したNMRの方法論の研究にスポットを当て、どのような時代背景の下でどういう人物が何をきっかけに歴史的な発想を得たのか、またどんな困難に出くわしてそれをどう解決して研究を完成させたかを人間的なエピソードを交えて話す。若い方々が話を通じて優れた科学者の研究に取り組む姿勢や学問に対する情熱を学んで頂ければ幸いである。今回はMRIを中心に話す予定である。

第54回 NMR討論会(2015)

The 54th Annual Meeting of The Nuclear Magnetic Resonance Society of Japan

会　期：　2015年11月6日(金)～8日(日)
November 6 (Fri) -8 (Sun) , 2015

会　場：　千葉工業大学　津田沼キャンパス
Chiba Institute of Technology Tsudanuma Campus
〒275-0016　千葉県習志野市津田沼2-17-1

第1日目　11月6日(金)／Day 1 (Nov. 6, Fri)

9:00～9:30　**ポスター貼り付け**

9:30～16:30　**展示会**

9:30 ～ 9:40
開会の挨拶　**内藤　晶(日本核磁気共鳴学会会長)**
Opening remarks: Akira Naito (President of the Nuclear Magnetic Resonance Society of Japan)

一般講演1［会場：2号館3階 大教室］
9:40 ～ 10:40　**座長：菅瀬　謙治**

9:40 ～ 10:00
L1-1　新規ランタニドキレート剤を用いた蛋白質のNMR構造解析法の開発
A novel lanthanide-chelator developed for protein structure determination using Paramagnetic NMR
服部 良一[1]，山口 拓実[2,3]，Ying Zhang[2,3]，亀田 倫史[4]，加藤 晃一[2,3]，藤原 敏道[1]，○児嶋 長次郎[1]（[1]大阪大学 蛋白質研究所，[2]自然科学研究機構 岡崎統合バイオサイエンスセンター・分子科学研究所，[3]名古屋市立大学 大学院薬学研究科，[4]産業技術総合研究所 ゲノム情報研究センター）

10:00 ～ 10:20
L1-2　新規拡張model-free解析法により明らかになった分子混雑環境下での蛋白質運動
A novel extended model-free analysis reveals protein dynamics under macromolecular crowding environment
○岡村 英保[1]，栃尾 尚哉[2]，杉山 修世[1,2]，伊東 優拡[1]，渡部 暁[1,2]，優 乙石[3]，フェイグ マイケル[1,4]，杉田 有治[1,3,5]，木川 隆則[1,2,6]（[1]理化学研究所 生命システム研究センター，[2]理化学研究所 生命分子システム基盤研究領域，[3]理化学研究所 杉田理論分子科学研究室，[4]ミシガン州立大学，[5]理化学研究所 計算科学研究機構，[6]東京工業大学 大学院総合理工学研究科）

10:20 ～ 10:40
L1-3　遺伝性大腸がん関連DNAミスマッチ修復蛋白質MutLの溶液NMRによる解析
NMR Characterization of the Interaction of the Endonuclease Domain of MutL with Divalent Metal Ions and ATP.
○水島 良太[1]，金 宙妍[2]，末武 勲[2]，田中 宏明[2]，高井 朋代[2]，神谷 成敏[2]，鷹野 優[2]，三島 優一[2]，田嶋 正二[2]，後藤 祐児[2]，福井 健二[3]，李 映昊[2]（[1]理化学研究所生命システム研究センター，[2]大阪大学蛋白質研究所，[3]大阪医科大学）

10:40 ～ 12:40　**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

ポスターセッション［会場：7号館1階 フレキシブルワークスペース］

12:40 ～ 14:00　**昼食/Lunch（学食および学外）**

14:00 ～ 14:30　**日本核磁気共鳴学会総会 / Meeting of the NMR Society of Japan［会場：2号館3階大教室］**

一般講演2［会場:2号館3階 大教室］

14:30 ～ 15:30　**座長：竹腰　清乃理**

14:30 ～ 14:50

L1-4　鉄を蓄積したヒト脳組織の超高磁場マイクロイメージング
Very high field micro-imaging of brain tissue from a patient with iron overload

○三森 文行[1]，Michael Garwood[2]，宮嶋 裕明[3]，坂尾 万幾子[3]，瀬山 春彦[1]（[1]国立環境研，[2]Univ. Minnesota，[3]浜松医大）

14:50 ～ 15:10

L1-5　$^{6/7}$Li, ^{31}P-固体NMRによる超イオン伝導体$Li_7P_3S_{11}$のダイナミクス解析
Dynamics of super ionic conductor, $Li_7P_3S_{11}$, as studied by $^{6/7}$Li, ^{31}P solid-state NMR

○村上 美和[1]，下田 景士[1]，塩谷 真也[1]，三井 昭男[2]，尾原 幸治[1]，小野寺 陽平[3]，荒井 創[1]，内本 喜晴[4]，小久見 善八[1]（[1]京都大学・産官学連携本部，[2]トヨタ自動車・材料技術開発部，[3]京都大学・原子炉実験所，[4]京都大学大学院・人間・環境学研究科）

15:10 ～ 15:30

L1-6　ゼオライトの^{27}Al-^{29}Si CPMAS実験とHETCOR実験
^{27}Al-^{29}Si CPMAS and HETCOR Experiments of Zeolites

○髙橋利和，清住嘉道，林 繁信，安田弘之（国立研究開発法人 産業技術総合研究所）

15:30 ～ 15:50

L1-7　CP-VC: a simple and robust method to analyze in details the dynamics of materials and biological molecules

O. Lafon[1], J. Trébosc[1], F. Pourpoint[1], P. Paluch[2], M. Potrzebowski[2], T. Polenova[3], A. Vega[3], Y. Nishiyama[4], M. Malon[4], ○JP. Amoureux[1, 5]（[1]Lille-France, UCCS, [2]Lodz-Poland, CMMS, [3]Delaware-USA, [4]Tokyo-Japan, Jeol Res, [5]Shanghai-China, ECNU）

15:50 ～ 16:20　**休　憩**

一般講演3［会場：2号館3階 大教室］

16:20 ～ 17:40　**座長：西田 紀貴**

16:20 ～ 16:40

L1-8　安定同位体標識率等の事前知識を活用するNMRスペクトル解析法
NMR spectral analysis using prior knowledge such as stable isotope labeling ratios

○葛西 卓磨[1]，永田 賢二[2]，岡田 真人[2]，木川 隆則[1, 3]（[1]理化学研究所 生命システム研究センター 生体分子構造動態研究チーム，[2]東京大学 大学院新領域創成科学研究科 複雑理工学専攻，[3]東京工業大学 大学院総合理工学研究科 知能システム科学専攻）

16:40 ～ 17:00

L1-9　Scrambling-freeなアミノ酸選択的^{13}C標識法と^{13}C標識の高選択性を利用したアミノ酸選択的^{15}Nシグナル抽出法の開発
Scrambling-free amino acid-selective ^{13}C labeling method and extraction of ^{15}N resonances of desired amino acid residues utilizing site-specifically incorporated ^{13}C resonances for protein NMR

○杉木 俊彦，藤原 敏道，児嶋 長次郎（大阪大学・蛋白質研究所）

17:00 ～ 17:20

L1-10　NMRデータ解析法の改良による効率的な細胞内蛋白質構造決定
An efficient and robust method for in-cell protein structure determination by improved NMR data analysis

○池谷 鉄兵[1, 2]，花島 知美[1]，細谷 沙織[1]，嶋崎 真那人[1]，池田 思朗[3]，三島 正規[1, 2]，Peter Güntert[1, 2, 4]，伊藤 隆[1, 2]（[1]首都大学東京・理工学研究科，[2]CREST/JST，[3]統計数理研究所，[4]Institute of Biophysical Chemistry, Goethe University Frankfurt，Germany）

17:20 ～ 17:40

L1-11　NMR と因子分析による酵素阻害活性の効果的評価法
Efficient evaluation of inhibitors for enzyme by NMR and factor analysis

山崎 和彦[1]，谷 修[1]，立石 幸寛[2]，田辺 英紀[2]，生田目 一寿[2]，新美 達也[2]，古川 功治[1]，阪下 日登志[1]（[1]産業技術総合研究所 バイオメディカル研究部門，[2]アステラス製薬株式会社 創薬化学研究所）

18:00 ～ 20:00　**日本核磁気共鳴学会 評議員会・新評議員会・新理事会［会場：2号館 2階 会議室3・4］**
（総会で承認された新評議員も出席の必要があります。また、新理事会は新評議員会が終わりしだい開きます）

第2日目　11月7日(土)／Day 2 (Nov. 7, Sat)　English Lecture

9:00～17:00　**Exhibition**

Lecture4［2 building 3 floor, Lecture hall］

9:00 ～ 10:20　**Chairperson: Takanori Kigawa**

9:00 ～ 9:20

L2-1　Ultra-sensitive response of FACT, a chromatin remodeling factor, mediated by multiple-phosphorylation to the intrinsically disordered region (IDR)

Daisuke Aoki[1], Jun-ichi Uewaki[2], Naoya Tochio[2], Akinori Awazu[1,2], and ○Shin-ichi Tate[1,2]
([1]Dept. Mathematical and Life Sciences, Hiroshima University, [2]RcMcD, Hiroshima University)

9:20 ～ 9:40

L2-2　Nitrogen detected TROSY at high field yields high resolution and sensitivity for protein NMR

○Koh Takeuchi[1,2], Haribabu Arthanari [3], Gerhard Wagner[3], and Ichio Shimada[1,4]　([1]Molecular Profiling Research Center for Drug Discovery, National Institute for Advanced Industrial Science and Technology, Japan, [2]JST, PRESTO, [3]Department of Biochemistry and Molecular Pharmacology, Harvard Medical School, USA, [4]Graduate Schools of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo, Japan)

9:40 ～ 10:00

L2-3　Structural studies of HIV-1 restriction factor APOBEC3G

○Hiroshi Matsuo[1], William Solomon[1], Takahide Kouno[1], Elena Harjes[1], Kuan-Ming Chen[1], Megumi Shigematsu[1], Shivender M.D Shandilya[2], Celia A. Schiffer[2] ([1] Department of Biochemistry, Molecular Biology & Biophysics, University of Minnesota, [2] Department of Biochemistry and Molecular Pharmacology. University of Massachusetts Medical School)

10:00 ～ 10:20

L2-4　Deciphering GPCR signal transduction through solution NMR: Challenges and Solutions

○Joshua J. Ziarek[1,2], Franz Hagn[3], Andreas Plückthun[4], Masatsune Kainosho[2], and Gerhard Wagner[1] ([1]Harvard Medical School, Boston, USA, [2]Nagoya University, Nagoya, Japan, [3]Technical University of Munich, Munich, Germany, [4]University of Zurich, Zurich, Switzerland)

10:20 – 10:50　**Break**

Lecture5［2 building 3 floor, Lecture hall］

10:50 ～ 11:50　**Chairperson: Atsushi Asano**

10:50 ～ 11:10

L2-5　Closed-cycle cold helium magic-angle spinning NMR probe system for 16.4 T dynamic nuclear polarization

○Yoh Matsuki[1], Shinji Nakamura[2], Shigeo Fukui[3], Toshitaka Idehara[4], Jagadishwar Sirigiri[5], Hiroto Suematsu[2], and Toshimichi Fujiwara[1] ([1]Institute for Protein Research, Osaka University, Japan, [2]JEOL RESONANCE Inc., Japan, [3]Cryovac Corp., Japan, [4]Research Center for Development of Far-Infrared Region, University of Fukui, Japan, [5]Bridge12 Technologies Inc., MA, USA)

11:10 ～ 11:30

L2-6　Frequency-swept solid-state ^{33}S NMR of an organosulfur compound in an extremely low magnetic field

○Kazuhiko Yamada (Interdisciplinary Science Unit, Multidisciplinary Sciences Cluster, Research and Education Faculty, in charge of Science Research Center, Kochi University)

11:30 ～ 11:50

L2-7 $^{1}H/^{1}H$ homonuclear mixing at ultrafast MAS > 120 kHz: $^{1}H/^{1}H$, ^{1}H CSA/CSA, $^{15}N/^{15}N$, $^{14}N/^{14}N$ correlations interactions

Manoj Kumar Pandey[1], Michal Malon[1, 2], Rongchun Zhang[3], Pingchuan Sun[4], Kamal H. Mroue[3], Bo Gong[3], Erin McNernv[3], David H. Korn[3], Michale D. Morris[3], Ayyalusamy Ramamoorthy[3], ○西山 裕介（Yusuke Nishiyama）[1, 2]（[1]RIKEN CLST-JEOL Collaboration Center, Japan, [2]JEOL RESONANCE Inc, Japan, [3]University of Michigan, USA, [4]Nankai University, China）

Invited Lecture

11:50 – 12:25 **Chairperson: Yoh Matsuki**

IL1 Magic Angle Spinning Solid State NMR Studies of Membrane Proteins in Synthetic Lipids and Cell Membranes

○Vladimir Ladizhansky[1], Shenlin Wang[1], Meaghan Ward[1], I. Kawamura[1], T. Okitsu[2], A. Wada[2], Y. Jiang[3], H. Liang[3], I. Hung[3], P. Gor'kov[4], Leonid S. Brown[1]（[1]Department of Physics and Biophysics Interdepartmental Group, University of Guelph, Ontario, Canada, [2]Department of Organic Chemistry and Life Science, Kobe Pharmaceutical University, Kobe, Japan, [3]Department of Metallurgical and Materials Engineering, Colorado School of Mines, Golden, CO, USA, [4]National High Magnetic Field Laboratory, Florida State University, Tallahassee, FL, USA）

12:25～14:00 **Lunch**

14:00～14:35 **Chairperson: Masato Katahira**

IL2 A hybrid methods approach to determine the structure of *Tetrahymena* telomerase holoenzyme

○Juli Feigon（Department of Chemistry and Biochemistry, University of California, Los Angeles（UCLA））

14:35～15:10 **Chairperson: Taiichi Sakamoto**

IL3 Probing the Conformational Dynamics of the Active and Inactive Forms of the Mitogen-Activated Protein Kinase ERK2

Yao Xiao, Michael P. Latham, Lisa R. Warner, Natalie G. Ahn, and ○Arthur Pardi（Department of Chemistry and Biochemistry, University of Colorado, Boulder, Colorado, USA）

15:10～15:30 **Break**

Honorary Lecture

15:30～16:05 **Chairperson: Akira Naito**

HL1 High Frequency Dynamic Nuclear Polarization

○R. G. Griffin（Francis Bitter Magnet Laboratory and Department of Chemistry Massachusetts Institute of Technology）

16:05～16:40 **Chairperson: Toshimichi Fujiwara**

HL2 From Structural Analysis of Polymers with NMR to Development of Silk Vascular Graft

○Tetsuo Asakura（Department of Biotechnology, Tokyo University of Agriculture and Technology, Koganei, Tokyo, Japan）

HL3 Chemistry of natural products and NMR

○Takashi Iwashita（Suntory Foundation for Life Sciences）

※都合により、来年度に延期

17:30～19:30 **Banquet**

第3日目　11月8日(日)／Day 3 (Nov. 8, Sun)

9:00～14:00　**展示会**

一般講演6［会場:2号館3階 大教室］

9:30 ～ 10:30　**座長：菊地　淳**

9:30 ～ 9:50

L3-1　木質バイオマスの特性を決めるリグニン－多糖結合様式の決定

Determination of the mode of the lignin-carbohydrate linkage that dominates characteristics of wood biomass

神谷 明宏[1,2]，西村 裕志[3,4]，永田 一真[1,2]，永田 崇[1,2,4]，渡辺 隆司[3,4]，○片平 正人[1,2,4]（[1]京都大学・エネルギー理工学研究所，[2]京都大学・エネルギー科学研究科，[3]京都大学・生存圏研究所，[4]JST・CREST）

9:50 ～ 10:10

L3-2　分岐鎖糖鎖の配座空間探査における常磁性効果の活用

Application of paramagnetic effects for exploring conformational spaces of branched oligosaccharides

○山口 拓実[1~3]，Zhu Tong[1~3]，佐藤 匡史[3,4]，加藤 晃一[1~3]（[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]総合研究大学院大学 物理科学研究科，[3]名古屋市立大学大学院 薬学研究科，[4]JST PRESTO）

10:10 ～ 10:30

L3-3　NMRと分子力場計算を併用した糖鎖の立体構造とダイナミクスの研究

Study on 3D structure and dynamics of sialo-glycans using NMR and MD

○鵜澤 洵，加藤 雅樹，山口 芳樹，桝 飛雄真（理研糖鎖構造，千葉大共用機器センター）

10:40 ～ 12:40　**ポスターセッション（奇数番号）／Poster Session (odd numbers)**

ポスターセッション［会場:7号館1階 フレキシブルワークスペース］

一般講演7［会場:2号館3階 大教室］

14:00 ～ 15:00　**座長：村上　美和**

14:00 ～ 14:20

L3-4　平面型マルチサーキュラーシムコイルを用いたリアルタイムシミング装置の開発

Development of a real-time shimming system using a planar multi-circular shim coil

○山田 諒太，寺田 康彦，巨瀬 勝美（筑波大学 数理物質科学研究科 電子・物理工学専攻）

14:20 ～ 14:40

L3-5　^{31}P固体NMRによるDアミノ酸残基を含む抗菌ペプチド ボンビニンの細胞膜との相互作用の解析

Membrane interaction of antimicrobial peptide Bombinin containing a D-amino acid residue as studied by ^{31}P solid-state NMR

○川村 出[1]，北橋 由貴[1]，金田 志穂[1]，Nyamsambuu Altannavch[2]，Javkhlantugs Namsrai[1,2]，上田 一義[1]，内藤 晶[1]（[1]横浜国立大学・大学院工学府，[2]モンゴル国立大学）

14:40 ～ 15:00

L3-6　可溶性ペンタセンを用いた光励起三重項電子スピンによる動的核偏極

Dynamic nuclear polarization with photo-excited triplet electron spins using soluble pentacene derivative

○立石 健一郎[1]，野中 洋[2]，根来 誠[1]，香川 晃徳[1,3]，北川 勝浩[3]，和田 智之[4]，山東 信介[2]，上坂 友洋[1]（[1]理化学研究所・仁科加速器研究センター，[2]東京大学大学院・工学系研究科，[3]大阪大学大学院・基礎工学研究科，[4]理化学研究所・光量子工学研究領域）

15:00 – 15:20　**休　憩**

一般講演８［会場：２号館３階 大教室］

15:20 ～ 16:40　**座長：伊藤　隆**

15:20 ～ 15:40

L3-7　NMR-based metabolomics of elm skins as classical seasonings

○Anh Phan Hong[1], Ei-ichiro Suzuki[2], Yoshinori Kodani[1], Takuya Miyakawa[1], Masaru Tanokura[1]（[1] Department of Applied Biological Chemistry, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, Japan, [2] Department of Medical Life Science, Yokohama City University, Japan）

15:40 ～ 16:00

L3-8　C-Ag（I）-C塩基対を含むメタロDNAの立体構造解析

Structural analysis of a metallo-DNA duplax containing a C-Ag（I）-C base pair

○古板 恭子[1]，大槻 武範[2]，児嶋 長次郎[1]，田中 好幸[2,3]（[1]大阪大学 蛋白質研究所，[2]東北大学大学院 薬学研究科，[3]徳島文理大学 薬学部）

16:00 ～ 16:20

L3-9　タンパク質翻訳量の調節に関与するnon-coding RNAの構造解析

Structural analysis of a non-coding RNA that controlling protein expression

○大山 貴子，高橋葉月，Piero Carninci，山崎俊夫（理化学研究所ライフサイエンス技術基盤研究センター）

16:20 ～ 16:40

L3-10　ランタニドプローブ法を用いたマルチドメインタンパク質の構造推移解析

Paramagnetic lanthanide probe as a tool to visualize ligand-driven conformational transitions of multi-domain proteins

○斉尾 智英[1,2]，小椋 賢治[3]，瀧下 俊平[1]，石森 浩一郎[1]，稲垣 冬彦[4]（[1]北海道大学 大学院理学研究院 化学部門，[2]JST・さきがけ，[3]石川県立大学 生物資源環境部，[4]北海道大学 先端生命科学研究院）

16:40～16:50　**閉会の挨拶（世話人）**

スタンプラリーの抽選

一般ポスター発表／Poster presentation［7号館1階フレキシブルワークスペース］

偶数番号：1日目（2015/11/6）、奇数番号：3日目（2015/11/8）
Y：若手ポスター賞

P1 Sf9細胞のin-cell NMRによる蛋白質の立体構造解析の試み
Toward the structure determination of proteins inside living sf9 cells using a baculovirus protein expression system
○田中 孝[1,2]，池谷 鉄兵[1,2]，濱津 順平[1]，三島 正規[1,2]，Peter Güntert[1~3]，伊藤 隆[1,2]（[1]首都大学東京 大学院理工学研究科，[2]CREST/JST，[3]Goethe-University Frankfurt）

P2 HeLa細胞およびSf9細胞のin-cell NMR測定のためのバイオリアクターシステムの検討
Bioreactor-system for in-cell NMR experiments of proteins in HeLa and Sf9 cells
○石川 真帆[1]，鴨志田 一[1,2]，田中 孝[1,2]，池谷 鉄兵[1,2]，三島 正規[1,2]，伊藤 隆[1,2]（[1]首都大学東京 大学院理工学研究科，[2]CREST/JST）

P3 リジン側鎖の^{13}Cメチル化を用いた高速in-cell NMR測定法の開発
Fast in-cell NMR spectroscopy utilizing ^{13}C-methylation of lysine residues
○中山 大輔，西澤 茉由，森本 大智，菅瀬 謙治，白川 昌宏（京都大学大学院 工学研究科）

P4 ヒト培養細胞を用いた異種核3次元in-cell NMR測定
Heteronuclear multi-dimensional in-cell NMR in cultured human cells
○鴨志田 一[1,2]，井上 仁[1,2]，猪股 晃介[3,4]，新井 崇一郎[1]，池谷 鉄兵[1,2]，三島 正規[1,2]，伊藤 隆[1,2]（[1]首都大学東京 大学院理工学研究科，[2]CREST/JST，[3]理化学研究所 生命システム研究センター，[4]PRESTO/JST）

P5 タンパク質結合状態における低分子化合物の動的構造解析手法の開発
Development of the methodology for dynamic structural analyses of small compounds in complex with target proteins
○徳永 裕二[1]，竹内 恒[2]，滝沢 剛[3]，半沢 宏之[3]，嶋田 一夫[4]（[1]次世代天然物化学技術研究組合，[2]産業技術総合研究所 創薬分子プロファイリング研究センター，[3]第一三共 RD ノバーレ株式会社，[4]東京大学大学院薬学系研究科）

P6 Y 多量子遷移の緩和速度の差を利用した高分子量タンパク質のマイクロ秒からミリ秒オーダーの化学交換の解析法の開発
NMR method for characterizing microsecond-to-millisecond chemical exchanges utilizing differential multiple-quantum relaxation in high molecular weight proteins
○外山 侑樹[1,2]，大澤 匡範[1]，横川 真梨子[1]，嶋田 一夫[1]（[1]東京大学大学院薬学系研究科，[2]日本バイオ産業情報化コンシーシアム）

P7 核緩和最適化SAILアミノ酸を利用した高分子量蛋白質複合体の溶液立体構造解析法の開発
Structural study for larger proteins using relaxation optimized SAIL amino acids
○宮ノ入 洋平[1]，武田 光広[1]，寺内 勉[2,3]，甲斐荘 正恒[1,2]（[1]名古屋大学大学院・理学研究科・構造生物学研究センター，[2]首都大学東京大学院・理工学研究科，[3]SAILテクノロジーズ株式会社）

P8 ヘムと平行型四重鎖DNA の複合体の構造および機能の解析
Structural and functional characterization of complexes between heme and parallel G-quadruplex DNAs.
○片平 祐弥，清水 春那，木下 真志，柴田 友和，山本 泰彦（筑波大学大学院 数理物質科学研究科）

P9 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鎖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]，平林 淳[2]（[1]農研機構・食品総合研究所，[2]産総研・創薬基盤研究部門）

P10 重水素交換実験によるポリユビキチン鎖線維の構造解析
Structural analysis of polyubiquitin fibrils by H/D exchange
○西澤 亮，森本 大智，菅瀬 謙治，白川 昌宏（京都大学大学院 工学研究科 分子工学専攻）

P11 タンパク質–核酸相互作用観測へのDiffusion Filterの応用
Application of diffusion filter experiments to protein-DNA interaction
○栗田 順一，平尾 優佳，西村 善文（横浜市立大学・生命医科学研究科）

P12　NMR法を用いたスペルミンとRNAアプタマーの相互作用解析
Analysis of interaction between spermine and spermine-binding RNA aptamer by NMR
○小黒 明広[1]，柳田 明日美[2]，大津 舞菜[2]，天野 亮[2]，坂本 泰一[2]，河合 剛太[2]，松藤 千弥[1]（[1]東京慈恵会医科大学・分子生物学，[2]千葉工業大学・工学部）

P13　リジン側鎖アミノ基をメチル化したアミロイドβペプチドの凝集様体
The solution and solid state of lysine amino group methylated amyloid β peptide
髙井 朋代，内田 敬子，物部 容子，竹内 昌男，竹内 喜久子，○赤木 謙一（医薬基盤・健康・栄養研究所）

P14　Non-detergent sulfobetaine（NDSB）がタンパク質のダイナミクスに及ぼす効果
Effects of non-detergent sulfobetaines（NDSBs）on protein dynamics
王 海梅[1]，石井 毅[1]，細田 和男[1]，河野 俊之[2]，寺脇 慎一[1]，○若松 馨[1]（[1]群馬大学大学院 理工学府，[2]北里大学 医学部）

P15　転写因子AML1 Runt domainに結合する高親和性RNAアプタマーのNMR解析
NMR analysis of the high affinity RNA aptamer that binds to the transcription factor AML1 Runt domain
○高田 健多[1]，天野 亮[1]，田中 陽一郎[2,3]，永田 崇[4,5]，片平 正人[4,5]，中村 義一[6,7]，神津 知子[3]，坂本泰一[1]（[1]千葉工業大学・工学部，[2]横浜国立大学・機器分析評価センター・RI教育研究施設，[3]埼玉県立がんセンター・臨床腫瘍研究所，[4]京都大学・エネルギー理工学研究所，[5]京都大学・エネルギー科学研究科，[6]東京大学・医科学研究所，[7]株式会社リボミック）

P16　SELEXの各ラウンドのRNAプールのNMR解析
NMR analysis of the RNA pools for each SELEX round
○天野 亮[1]，高田 健多[1]，青木 一晃[2]，宮川 伸[2]，中村 義一[2,3]，神津 知子[4]，坂本 泰一[1]（[1]千葉工業大学 工学部，[2]株式会社リボミック，[3]東京大学 医科研究所，[4]埼玉県立がんセンター 臨床腫瘍研究所）

P17　プロリン異性化酵素Pin1の機能発現および機能制御機構の解明
Expression and regulation of the function for the Proline isomerase, Pin1
○栃尾 尚哉，川嵜 亮祐，玉利 佑，楯 真一（広島大学・大学院・理学研究科）

P18　NMR法によるRMF mRNAの翻訳制御領域とスペルミジンの相互作用解析
NMR Analysis of interaction between the translation regulatory region of RMF mRNA and spermidine
○佐原 潤平[1]，照井 祐介[2]，五十嵐 一衛[3,4]，柏木 敬子[2]，河合 剛太[1]（[1]千葉工業大学・工学部，[2]千葉科学大学・薬学部，[3]千葉大学大学院・薬学研究院，[4]アミンファーマ研）

P19　化学合成法による核酸へのスピンラベルの導入とNMR構造解析への応用
Incorporation of spin label into nucleic acids by the chemical synthesis and its application for NMR structure determination
○菅野 優一[1]，幡野 明彦[1]，大津 舞菜[2]，河合 剛太[2]（[1]芝浦工業大学 工学部，[2]千葉工業大学 工学部）

P20　Y　リアルタイムNMR法の新たな展開―抗HIVタンパク質APOBECG3Gの認識ヌクレオチド、DNA上のスライディング及びエピジェネティクスとの関連に関する新知見―
Novel aspects of real-time NMR methods –New findings in anti-viral protein APOBEC3G concerning sequence-recognition and sliding on the DNA, and its involvement in epigenetics–
○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）

P21　lncRNA結合タンパク質SHARPの構造解析
Structural studies of the lncRNA-binding protein SHARP by NMR
○永井 敢[1]，小林 彩保[2]，伊藤 隆[1,2]，三島 正規[1,2]（[1]首都大学東京 化学コース，[2]首都大学東京 理工学研究科）

P22　Y　LINE RNAの特異性を決定するステムループとペプチドとの相互作用解析
Analysis of specific interaction between the stem-loop of the LINE RNA and the peptide derived from the LINE reverse transcriptase
○大津 舞菜[1]，梶川 正樹[2]，河合 剛太[1]（[1]千葉工業大学 工学部，[2]東京工業大学大学院 生命理工学研究科）

P23　人工塩基対を利用したRNAへのスピンラベルの導入とNMR法による相互作用解析への応用
Incorporation of spinlabel into RNA by an unnatural base pair system and its application for interaction analysis by NMR
○藤田 舜介[1]，大山 貴子[1,*]，染谷 龍彦[2]，木本 路子[2,3]，平尾 一郎[2,3]，河合 剛太[1]（[1]千葉工業大学・工学部，[2]理化学研究所横浜事業所・ライフサイエンス技術基盤研究センター，[3]タグシクス・バイオ株式会社）

P24 Y 抗菌ペプチドthanatinとリポ多糖の相互作用解析
Interaction between an antimicrobial peptide thanatin and lipopolysaccharide
○若松 瞭太[1]，神谷 昌克[1]，相沢 智康[1]，熊木 康裕[2]，菊川 峰志[1]，出村 誠[1]（[1]北海道大学大学院・生命科学院，[2]北海道大学大学院・理学研究院）

P25 アダプタータイプTIRドメインの溶液構造
Solution structures of adaptor-type TIR domain
○久米田 博之[1]，榎園 能章[1]，狩野 裕孝[1]，堀内 正隆[1]，小椋 賢治[1]，瀬谷 司[2]，稲垣 冬彦[1]（[1]北海道大学・先端生命科学院，[2]北海道大学・医学部）

P26 Y NMR $R_{1\rho}$ dispersion法によるユビキチン二重合体の動的構造特性の研究
Dynamic structural properties of diubiquitin by $R_{1\rho}$ dispersion
○西澤 茉由，菅瀬 謙治，森本 大智，Erik Walinda，白川 昌宏（京都大 工学研究科 分子工学専攻）

P27 ^{1}H NMRを用いたニトリラーゼのホモオリゴマー形成の追跡
The use of ^{1}H NMR for probing nitrilase homo-oligomerization
藤澤 哲郎[1,2]，大山 恭平[1,2]，亀山 啓一[1]，吉田 豊和[1]，○鎌足 雄司[3]，石黒 亮[1,2]（[1]岐阜大学 工学部 化学・生命工学科，[2]理研 SPring-8センター，[3]岐阜大学 生命科学総合研究支援センター）

P28 Y HIV-1のRRE RNA断片とRev変異体ペプチドの相互作用のNMR解析
NMR analysis of the interaction between an HIV-1 RRE RNA fragment and a Rev mutant peptide
○武田 有未[1]，天野 亮[1]，高田 健多[1]，Colin A. Smith[2]，坂本 泰一[1]（[1]千葉工業大学・工学部，[2] American University of Beirut）

P29 放線菌の接合伝達タンパク質TraBの構造解析
Structural analysis of the DNA translocase of Streptomyces, TraB
○金場 哲平[1,2]，上埜 大空[2]，前崎 綾子[2]，伊藤 隆[2]，片岡 正和[3]，三島 正規[2]（[1]ブルカー・バイオスピン株式会社，[2]首都大学東京 理工学研究科，[3]信州大学　工学部）

P30 Y マウスのミトコンドリアmRNAのプロセシングに関与するmirror tRNAの二次構造の解析
Secondary structure analysis of mirror tRNA involved in processing of mitochondria mRNA in mouse
○奥居 沙弥[1]，牛田 千里[2]，清澤 秀孔[3]，河合 剛太[1]（[1]千葉工業大学・工学部，[2]弘前大学・農学生命科学部，[3]高知大学・医学部）

P31 小胞体ストレスセンサーIre1p RNaseドメインの基質認識機構
Substrate mRNA recognition mechanism of ER-stress sensor Ire1p RNase domain
○河原 郁美[1,2]，亀田 倫史[3]，池端 悠介[4]，芦原 悠太[2]，古板 恭子[1]，杉木 俊彦[1]，浜田 道昭[5]，藤原 敏道[1]，河野 憲二[4]，田中 好幸[2,6]，児嶋 長次郎[1]（[1]大阪大学 蛋白質研究所，[2]東北大学 薬学研究科，[3]産業技術総合研究所 生命情報工学研究センター，[4]奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科，[5]早稲田大学 理工学術院，[6]徳島文理大学 薬学部）

P32 Y 高圧力NMR法によるユビキチンの局所変性状態の立体構造解析
Structure and dynamics of the locally unfolded state of ubiquitin studied by high-pressure NMR spectroscopy
○若本 拓朗[1]，北沢 創一郎[2]，矢木-内海 真穂[3]，加藤 晃一[3]，Roumestand Christian[4]，Baxter Nicola J[5]，Williamson Mike P[5]，北原 亮[2]（[1]立命館大学大学院生命科学研究科，[2]立命館大学薬学部，[3]岡崎統合バイオサイエンスセンター，[4]Centre de Biochimie Structurale，INSERM，[5]Department of Molecular Biology and Biotechnology，University of Sheffield）

P33 ^{13}C軸の広い周波数領域を活かしたメタボノミクス解析戦略
Analytical strategy in metabonomics using wide frequency domain of ^{13}C
○三澤 拓真[1,2]，小松 功典[1,2]，伊達 康博[1,2]，菊地 淳[1~3]（[1]横市院生命医，[2]理研CSRS，[3]名大院生命農）

P34 Y Pure shift NMRによる生体分子複雑系のデータマイニング高解像度化
High-Resolution Data Mining of Biological Molecular Complexes using Pure Shift NMR
○小松 功典[1,2]，菊地 淳[1~3]（[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]名古屋大学大学院 生命農学研究科）

P35 不連続な分光計測データをドリルダウンした環境水プロファイング
Environmental water profiling by drilling down on discontinuous spectral data
○大島 嵩裕[1]，坪井 裕理[2]，伊達 康博[1,2]，菊地 淳[1~3]（[1]横市院 生命医，[2]理研 CSRS，[3]名大院 生命農）

P36 Y 化学・生物的統合プロファイリングによる水圏環境プローブ生物の生育特性情報抽出
Integral analysis of yellowfin goby Acanthogobius flavimanus in estuarine environment
○魏 菲菲[1]，坂田 研二[1]，朝倉 大河[1,2]，伊達 康博[1,2]，菊地 淳[1~3]（[1]理研CSRS,[2]横市大院・生命医,[3]名大院・生命農）

P37 発汗代謝変動を捉えるデータマイニング法
Data mining methods to capture metabolic variations in human sweat
○筒井 聡志[1]，三澤 拓真[1,2]，伊達 康博[1,2]，菊地 淳[1~3]（[1]横市院生命医，[2]理研CSRS，[3]名大院生命農）

P38 HFIP中におけるAβ(1-42)の二量体形成
Dimer formation of beta amyloid protein 1-42 in 1, 1, 1, 3, 3, 3-hexafluoro-2-propanol
○重光 佳基[1]，岩谷 奈央子[1,2]，天野 剛志[1,3]，合田 名都子[1]，松崎 瑞季[3]，成田 哲博[3]，星 美奈子[4]，廣明 秀一[1,3]（[1]名古屋大学大学院 創薬科学研究科，[2]日本学術振興会，[3]名古屋大学大学院 理学研究科 構造生物学研究センター，[4]京都大学大学院 医学研究科）

P39 抗菌ペプチドnukacin ISK-1とその標的分子lipid IIとの相互作用解析
Analysis of interaction of antimicrobial peptide nukacin ISK-1 with cell-wall precursor lipid II embedded in n-octyl-β-D-glucoside micelles
○藤浪 大輔[1]，Abdullah Al Mahin[2]，長尾 潤一[4]，園元 謙二[2,3]，神田 大輔[1]（[1]九州大学・生体防御医学研究所，[2]九州大学・農学研究院，[3]九州大学・バイオアーキテクチャーセンター，[4]福岡歯科大学・機能生物化学講座）

P40 DQF-COSY法の新しい応用測定―Broad Band Saturation DQF-COSY法について
BB-SAT-DQFCOSY —a new Broad Band Saturation DQF-COSY to saturate huge water and sugars and to observe minor components in foods
○降旗 一夫[1]，佐久間 千勢子[2]，田代 充[3]（東大院農 応生化[1]，東薬大 薬[2]，明星大 理工[3]）

P41 ^{1}H NMRによるポリブチレンサクシネート環状オリゴマーの重合度別シグナル分離
Size-Dependent Signal Separation in ^{1}H NMR Spectrum of Poly（butylene succinate）Cyclic Oligomer
○松原 康史，美濃 公子（三菱化学株式会社 開発研究所）

P42 プロトプラストの再生細胞壁多糖構成の^{1}H-NMRによる分析
^{1}H-NMR analyses of polysaccharide components in regenerated cell wall of protoplast
○関屋 大輔[1]，内金崎 大己[2]，飯野 正昭[2]（[1]千葉工業大学大学院 工学研究科 生命環境科学専攻，[2]千葉工業大学 工学部生命環境科学科）

P43 適したNMR計測法の選択に基づく多様な水産資源評価
Evaluation of diverse marine resources by suitable NMR measurement method
○福地 実[1]，朝倉 大河[1,2]，坂田 研二[2]，伊達 康博[1,2]，菊地 淳[1~3]（[1]横市院生命医，[2]理研CSRS，[3]名大院生命農）

P44 代謝物シグナル帰属支援を目指した構造・化学シフト相関解析の試み
Investigation of structure·chemical shift relationship for supportive assignment of metabolite signals
○尾渕 由佳[1]，小松 功典[1,2]，菊地 淳[1~3]（[1]横市大院・生命医，[2]理研環境資源，[3]名大院・生命農）

P45 NMR法によるイオン液体ガラス転移温度降下メカニズムの研究
NMR study of the mechanism for ionic liquids glass transition temperature drop
○鄭 智海[1]，桑原 大介[2]，持田 智行[3]（[1]電通大 情報理工学研究科，[2]電通大 研究設備センター，[3]神戸大 大学院理学研究科）

P46 Y 代謝混合物のフラグメント集積法による構造生成とその理論化学シフト・スピン結合定数の評価
Structure construction in metabolic mixtures by fragment-assembly approach and evaluation of its theoretical chemical shifts and spin-spin coupling constants
○伊藤 研悟[1,2]，小松 功典[1,2]，伊達 康博[1,2]，菊地 淳[1~3]（[1]横市院生命医，[2]理研CSRS，[3]名大院生命農）

P47 位置選択的多付加型C_{60}およびC_{70}誘導体の合成と^{1}H, ^{13}C NMR
Regioselective synthesis and ^{1}H, ^{13}C NMR characterization of novel multifunctionalized fullerenes
○渡邉 敬太[1]，内山 幸也[1]，高橋 晴夏[1]，与座 健治[2]，森山 広思[1]（[1]東邦大学大学院 理学研究科，[2]ブルカーAXS）

P48 Y かご型炭素クラスターC_{60}および$C_{59}N$に内包されたH_2OとH_2の^{1}HNMR緩和時間
^{1}H NMR Relaxation Times of H_2O and H_2 Entrapped inside Carbon-Cluster Cages of C_{60} and $C_{59}N$
○橋川 祥史[1]，村田 理尚[1]，若宮 淳志[1]，村田 靖次郎[1,2]（[1]京大化研，[2]JSTさきがけ）

P49 PFG-NMR法によるエマルション系の拡散計測
Diffusion Measurements of Emulsion using PFG-NMR Method
○川口 翼[1]，喜多 理王[1]，新屋敷 直木[1]，八木原 晋[1]，福﨑 稔[2]（[1]東海大学大学院総合理工学研究科，[2]東海大学情報通信学部）

P50 Y 定量NMR法によるアシルカルニチンの精確な純度評価のための体系的な条件設定方法の確立
Establishment of a Systematic Protocol on the Condition Setting for Accurate Purity Evaluation of Acylcarnitine by Using Quantitative ^{1}H NMR Spectroscopy
○斎藤 直樹[1]，齋藤 剛[1]，山﨑 太一[1]，鈴木 彰子[1]，藤峰 慶徳[2]，井原 俊英[1]（[1]産業技術総合研究所 物質計測標準研究部門，[2]大塚製薬株式会社 診断事業部）

P51 ^{31}P 固体NMRを用いたペプチドホルモングルカゴンによるDMPC脂質二分子膜の形態変化と線維形成過程の解析
Morphological change of DMPC lipid bilayers caused by glucagon as studied by ^{31}P solid-state NMR
○羽矢 和未，菊池 章江，川村 出，内藤 晶（横浜国立大・院工）

P52 Y 磁場配向微結晶粉末を用いた単結晶法による結晶多形の分析
Analysis of polymorph by the single-crystal NMR measurement by using magnetically oriented microcrystal array
○奥村 学[1]，久住 亮介[1]，木村 史子[1]，木村 恒久[1]，出口 健三[2]，大木 忍[2]，藤戸 輝明[2]，清水 禎[2]（[1]京大 院農，[2]物材機構）

P53 In-situ光照射固体NMRによるD96N-bR変異体の光反応サイクルにおけるM-中間体の解析
Characterization of M-intermediate in the photocycle of D96N-bR mutant by *in-situ* photoirradiation solid-state NMR
○大谷 優人[1]，重田 安里寿[1]，槙野 義輝[1]，宮佐 亮太[1]，川村 出[1]，沖津 貴志[2]，和田 昭盛[2]，辻 暁[3]，内藤 晶[1]（[1]横浜国立大学大学院 工学府，[2]神戸薬科大学，[3]兵庫県立大学大学院 生命理学研究科）

P54 Y 13-*cis*，15-*syn*型バクテリオロドプシンの光中間体の*in-situ*光照射固体NMRによる検出
Photo-irradiating solid-state NMR detection of photo-intermediate in 13-*cis*, 15-*syn* photocycle of bacteriorhodopsin
○重田 安里寿[1]，大島 恭介[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・院・工，[2]神戸薬科大学，[3]兵庫県立大学）

P55 固体NMRによるヒトカルシトニンのアミロイド線維中間体から線維への構造変化の解析
Characterization of structural changes in the process of amyloid fibril formation of human calcitonin through its intermediate as studied by solid-state NMR
○豊田 修平[1]，Lkhamsuren Ganchimeg[2]，Namsrai Javkhlantugs[2]，渡邉（伊藤）ひかり[1]，川村 出[1]，上田 一義[1]，内藤 晶[1]（[1]横浜国大・院工，[2]モンゴル国立大）

P56 Y 延伸ならびに水和に伴う^{13}Cラベル家蚕絹の構造転移に関する固体NMR研究
^{13}C Solid State NMR study on the structural change of ^{13}C labeled *Bombyx mori* silk fibroin induced by stretching or hydration
○亀谷 俊輔[1,2]，青木 昭宏[1]，佐藤 佑哉[1]，磯部 洸太郎[1]，朝倉 哲郎[1]（[1]東京農工大学・工学府生命工学専攻，[2]三井化学分析センター）

P57 ^{13}C固体NMRを用いた細胞膜中に存在するフォボロドプシンのTyr174とTyr199の水素結合変化解析
Hydrogen bond alteration of Tyr174 and Tyr199 in phoborhodopsin which exists in cell membrane as studied by solid-state ^{13}C NMR
○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]，川村 出[1]（[1]横浜国大・院工，[2]神戸薬大，[3]岡山大・院医歯薬，[4]北大・院生命理）

P58 Y 固体NMR法を用いたナトリウムポンプ型ロドプシンの構造解析
Solid-state NMR structural analysis of the sodium ion-pumping rhodopsin
○斉藤 優太[1]，田巻 初[1]，江川 文子[2]，菊川 峰志[1]，神谷 昌克[1]，相沢 智康[1]，藤原 敏道[2]，出村 誠[1]（[1]北海道大学 大学院生命科学院，[2]大阪大学 蛋白質研究所）

P59　固体NMRによるタンパク質測定への圧縮センシングの応用
Application of compressed sensing to solid-state NMR measurements of proteins
○田巻 初[1]，斉藤 優太[1]，江川 文子[2]，菊川 峰志[1]，神谷 昌克[1]，相沢 智康[1]，藤原 敏道[2]，出村 誠[1]（[1]北海道大学 大学院生命科学院，[2]大阪大学 蛋白質研究所）

P60　Y　大腸菌によるユビキチン過剰発現時に合成される単一細胞当りの分子数評価を指向した定量固体NMR法
Quantitative solid-state NMR method for counting the number of molecules synthesized during the overexpression of ubiquitin in an *Escherichia coli* cell
○山田 和哉，江川 文子，藤原 敏道（大阪大学 蛋白質研究所）

P61　*In situ* 光照射固体NMRによる光受容センサー膜タンパク質*p*pR/*p*HtrIIの光活性中間体の解析
Characterization of photo-intermediates of *p*pR/*p*HtrII as revealed by *in-situ* photo irradiation solid-state NMR
○槙野 義輝[1]，友永 雄也[1]，日高 徹朗[1]，川村 出[1]，沖津 貴志[2]，和田 昭盛[2]，須藤 雄気[3]，加茂 直樹[4]，内藤 晶[1]（[1]横浜国大・院工，[2]神戸薬大，[3]岡山大・院医歯薬，[4]北海道大・院生命理）

P62　ポリ（アリルアミン）／ポリ（γ–グルタミン酸）複合体の固体NMR
Characterization of a polymer complex of poly（allyl amine）and poly（γ -glutamic acid）by solid NMR
○柿下 拓史，前田 史郎（福井大院工）

P63　ポリ（アリルアミン）塩酸塩／カルボキシメチルセルロース複合体の固体NMR
Characterization of a polymer complex of poly（allylamine hydrochloride）and carboxymethyl cellulose sodium salt by solid NMR
○川口 健，前田 史郎（福井大院工）

P64　ポリ（アリルアミン）／ポリ（アクリル酸）複合体の固体NMR
Characterization of a polymer complex of poly（allyl amine）and poly（acrylic acid）by solid NMR
○両角 悠作，前田 史郎（福井大院工）

P65　プロトン伝導性無機固体酸塩$Cs_2(HSO_4)(H_2PO_4)$の室温相における水素結合
Hydrogen bonds in the room-temperature phase of proton conductive inorganic solid acid salt $Cs_2(HSO_4)(H_2PO_4)$
○林 繁信，治村 圭子（産業技術総合研究所 物質計測標準研究部門）

P66　Y　ゴム材料の^{1}H-T_2緩和解析：ラプラス逆変換法と主成分解析
A new approach of the ^{1}H-T_2 Relaxation of Rubber Materials : Inverse Laplace Transform and Principal Component Analysis
○角村 将希[1]，浅野 敦志[1]，大窪 貴洋[2]，奥下 慶子[3]（[1]防衛大学校 応用化学科，[2]千葉大学大学院 工学研究科，[3]分子科学研究所）

P67　^{19}F-定量固体NMRを用いたEDLC用活性炭の細孔径による電荷貯蔵効率の評価
Evaluation of charge storage efficiency of EDLC electrode made of activated carbon with different pore size using ^{19}F quantitative solid-state NMR
○出田 圭子[1]，金 斗元[2]，吉 鉉植[1]，中林 康治[1,2]，宮脇 仁[1,2]，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）

P68　規則性メソポーラスシリカの細孔内でのフルフリルアルコールの重合過程の観察
Solid-state NMR investigation of polymerization of furfuryl alcohol within ordered mesoporous silica MCM-48
○稲垣 怜史，中尾 太一，川村 出，窪田 好浩（横浜国立大学大学院・工学研究院／工学府）

P69　固体NMRによるポリヒドロキシアルカン酸成形体の機械特性の解析
Study on mechanical properties of poly（hydroxyalkanoic acid）molded products by solid-state NMR analysis
○西田 雅一[1]，田中 智子[1]，早川 由夫[1]，小倉 崇[2]，西田 政弘[2]（[1]産総研・構造材料，[2]名工大院・機能工学）

P70　固体NMRによるシステイン保護$(CdSe)_{34}$と保護基との相互作用の解析
Solid-State NMR of Interactions between Cysteine-Capped $(CdSe)_{34}$ and the Ligand-Cysteine
○栗原 拓也，野田 泰斗，竹腰 清乃理（京都大院・理学研究科）

P71　固体NMRを用いた鉄鋼スラグ中のエトリンガイトの定量
Quantification of Ettringite in Steelmaking Slag by using Solid-state NMR
○金橋 康二（新日鐵住金・先端研）

P72　高分解能固体NMRを用いた2:1型層状ケイ酸塩の八面体シートにおける配位構造解析
High resolution solid state NMR analysis on coordination structure of octahedral site in 2:1 phyllosilicates
○高橋 貴文，金橋 康二（新日鐵住金株式会社 先端技術研究所）

P73　固体高分解能^{33}Sおよび^{67}Zn-NMRによるゴム材料の構造解析
Structural Analysis of Rubber Materials by High-Resolution Solid-State ^{33}S and ^{67}Zn-NMR
○宇川 仁太[1]，木村 英昭[2]（[1]東洋ゴム工業株式会社 中央研究所，[2]ブルカー・バイオスピン株式会社）

P74　^{67}Zn NMRによるIn –doped ZnOの解析
Analysis of In-doped ZnO by ^{67}Zn NMR
○大橋 竜太郎[1]，佐藤 渉[1]，水野 元博[1]，大木 忍[2]，出口 健三[2]，丹所 正孝[2]，清水 禎[2]（[1]金沢大学・院・自然，[2]物質・材料研究機構）

P75　固体NMRによるプロトン伝導性poly（vinylphosphonic acid）―イミダゾール複合体中のイミダゾールの状態解析
Analysis of states of imidazole in proton conductive poly（vinylphosphonic acid）− imidazole composite by solid state NMR
○成田 貴光，岩崎 彩乃，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）

P76　液晶性ポリエステルが形成するハニカム構造における気体輸送特性のNMR法による研究
A study on the gas transport properties of honeycombed structure of liquid crystalline polyesters by NMR methods
○石神 稜大，吉水 広明（名工大院・工）

P77　BOLD法を用いた匂い刺激によるマウス脳活性化の検出
Activation analyses of the mouse brain evoked by odor stimuli using the BOLD method
舩津 大嗣，○吉永 壮佐，平金 真，岩本 成人，寺沢 宏明（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）

P78　9.4T縦型超伝導磁石MRIを用いた固体イメージングの試み
Solid imaging on an MRI system using a 9.4T vertical bore superconducting magnet
○瀬戸井 綾菜[1]，巨瀬 勝美[2]（[1]筑波大学理工学群応用理工学類，[2]筑波大学数理物質系物理工学域）

P79　二枚貝心拍動周期の光プレチスモグラフィーと7T NMRマイクロイメージングによる解析
Cardiac cycle of bivalves analyzed by photoplethysmography and 7 T NMR microimaging
○瀬尾 芳輝[1]，瀬尾 絵理子[2]，早川 実佳[1]，大橋 好偉[1]，村上 政隆[3]（[1]獨協医科大学・医学部，[2]東京大学・大気海洋研，[3]生理研）

P80　Y　DOSY曲線の一括推定によるMCR-NLR法の高速化
A Fast Method Based on MCR-NLR Method via Combined Estimating Process of DOSY-curve
○田中 勇帆[1]，中尾 朋喜[2]，泉 顕也[2]，内海 博明[2]，古川 利博[1]（[1]東京理科大学 工学研究科，[2]株式会社 JEOL RESONANCE）

P81　ヒトの生活習慣と分光計測で構成されるトランザクションデータの統合解析可視化
Visualization of integration analysis of transaction-data based on human lifestyle and spectroscopic measurements
○塩川 由佳[1]，三澤 拓真[1,2]，伊達 康博[1,2]，菊地 淳[1~3]（[1]横市院生命医，[2]理研CSRS，[3]名大院生命農）

P82　Y　スピン－共振器結合のスピン－格子緩和への影響
Effects of spin–resonator coupling on spin–lattice relaxation
○宮澤 典裕，竹腰 清乃理，武田 和行（京都大学大学院理学研究科）

P83　多量子カウンティングシーケンスにおける化学シフト異方性の影響
Effects of chemical shift anisotropy in Multiple Quantum counting sequence
○賀來 萌，野田 泰斗，竹腰 清乃理（京都大学大学院 理学研究科）

P84 Y *In-situ*マイクロ波照射NMRによるマイクロ波加熱におけるエネルギー移動過程の解明
Process of energy transfer under microwave irradiation revealed 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 工学研究院，[2]プローブ工房）

P85 肉用牛の霜降りの非侵襲計測用片側開放型NMRの開発
Development of a single-sided NMR scanner for the in vivo quantification of live cattle marbling
○中島 善人（産業技術総合研究所）

P86 Y 多重検出磁気共鳴によるπ共役系分子デバイスのスピン依存過程の解明
Spin dependent processes investigated by multiplex detection of magnetic resonance for π-conjugated molecular electronic devices
○福田 國統，浅川 直紀（群馬大学大学院理工学府分子科学部門）

P87 紙に浸透させたインクのパルスＮＭＲによる評価
The observation of physical properties of the ink penetrating three kinds of papers by pulse NMR
○原 英之（ブルカー・バイオスピン株式会社）

P88 Y スーパーナイキスト動作を応用した簡易MRIシステムの開発
Development of simple MRI system applying super-Nyquist MRI operation
○津田 真人，寺田 康彦，巨瀬 勝美（筑波大学大学院数理物質科学研究科）

P89 卓上および高磁場NMR装置を利用した食品加工過程の分析評価情報ツール開発
Analysis tool and database for food processing by using benchtop and high resolution NMR
○近山 英輔[1,2]，山科 椋[1]，小松 桂子[2]，坪井 裕理[2]，坂田 研二[2]，関山 恭代[2,3]，亀山 真由美[3]，菊地 淳[2,4,5]
（[1]新潟国際情報大学・情報システム学科，[2]理化学研究所・環境資源科学研究センター，[3]食品総合研究所・食品分析研究領域，[4]横浜市立大学大学院・生命医科学研究科，[5]名古屋大学大学院・生命農学研究科）

P90 Y 定量NMRにおけるデータ解析の最適化とデータの共同解析
Optimization of data process for quantitative NMR and collaborative data process
○山﨑 太一，斎藤 直樹，齋藤 剛，井原 俊英（産業技術総合研究所 物質計測標準研究部門）

P91 多次元NMRスペクトル再構成法の開発とケモカイン-ケモカイン受容体複合体の転移交差飽和実験への応用
Development of an NMR spectra reconstruction method to elucidate the CCR1- and CCR5- binding modes of MIP-1α
○上田 卓見[1,2]，吉浦 知絵[1]，幸福 裕[1]，松本 昌彦[1]，奥出 順也[1]，近藤 啓太[1]，白石 勇太郎[1]，嶋田 一夫[1]
（[1]東京大学大学院・薬学系研究科，[2]JSTさきがけ）

P92 NMRデータベースBioMagResBankの統合的拡張と公開
Extension and publication of biomolecular NMR data archived at BioMagResBank for integrated database search
○小林 直宏[1]，横地 政史[1]，岩田 武史[1]，本野 千恵[2]，廣明 秀一[3]，児嶋 長次郎[1]，
藤原敏道[1]（[1]大阪大学蛋白質研究所，[2] 産業技術総合研究所 創薬分子プロファイリング研究センター，[3] 名古屋大学大学院 創薬科学研究科）

P93 高磁場DNPによるマジック角回転下での核磁化増大を定量的かつ高速にシミュレーションする方法
Fast quantitative calculation of high field solid-state DNP effectiveness under magic-angle spinning
○深澤 隼，藤原 敏道，松木 陽（大阪大学蛋白質研究所）

第一日目
11月6日（金）
日本語セッション

Day 1 (Nov. 6, Fri)
(Japanese Sessions)

L1-1

新規ランタニドキレート剤を用いた蛋白質の NMR 構造解析法の開発

服部良一[1]，山口拓実[2,3]，Ying Zhang[2,3]，亀田倫史[4]，加藤晃一[2,3]，藤原敏道[1]，○児嶋長次郎[1]
[1] 大阪大学 蛋白質研究所
[2] 自然科学研究機構 岡崎統合バイオサイエンスセンター・分子科学研究所
[3] 名古屋市立大学 大学院薬学研究科
[4] 産業技術総合研究所 ゲノム情報研究センター

A novel lanthanide-chelator developed for protein structure determination using Paramagnetic NMR

Yoshikazu Hattori[1], Takumi Yamaguchi[2,3], Ying Zhang[2,3], Tomoshi Kameda[4], Koichi Kato[2,3], Toshimichi Fujiwara[1], and ○Chojiro Kojima[1]
[1]*Insititute for Protein Research, Osaka University*
[2]*Okazaki Institute for Integrative Bioscience and Institute for Molecular Science, National Institutes of Natural Sciences*
[3]*Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University*
[4]*Computational Biology Research Center, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology*

Anisotropic effects in paramagnetic NMR, such as pseudocontact shift (PCS), provide powerful distance and angular restraints for protein structure determination. In this study, we utilized *o*-phenylenediaminetetraacetic acid (PhDTA)-based lanthanide chelator for paramagnetic NMR analysis of an originally non-paramagnetic protein. Selective chelator labeling to an N-terminus of the protein results to generate enough large and reliable PCSs well correlating to the protein structure. Furthermore, we found PCSs show a 2-state transition depending on pH, suggesting that the additional structural information can be obtained with a single sample only by changing the solution pH.

【序論】

擬コンタクトシフト（PCS）とよばれる常磁性シフトは、長い距離情報や角度情報を得る上で有用である。ランタニド系列の金属イオンがとりわけ強い PCS を引き起こすが、金属結合性ではないタンパク質にランタニドイオンを標識するには、ランタニドイオンを配位するタグ分子を蛋白質に化学修飾する必要がある。また、常磁性中心位置が解析可能であり、かつ十分に大きな PCS をタンパク質分子で観測するには、ランタニド金属がタンパク質に強く固定化されていることが望ましい。そのような固定化の方法として、キレート剤あるいはランタニド結合ペプチドを 2 点固定化する方

常磁性NMR，擬コンタクトシフト（PCS），蛋白質の化学修飾

はっとりよしかず，やまぐちたくみ，いんちゃん，かめだともし，かとうこういち，ふじわらとしみち，○こじまちょうじろう

法が挙げられるが、立体構造に基づくコンストラクトの検討が必要である。そこで本研究では、1 点固定化においても十分に大きな PCS を引き起こすことが期待される分子量が小さくかつ硬直な構造を有するキレート剤をタンパク質に化学修飾し、PCS 解析におけるランタニドプローブとしての性能を評価し、蛋白質の構造解析へ応用した。

【材料と方法】

o-phenylenediaminetetraacetic acid（PhDTA）のアルデヒド誘導体（Fig. 1）と蛋白質 ubiquitin のアミノ基を還元剤 $NaBH_3CN$ の存在下で反応させた。反応は pH 5.5 で行い、N 末端への反応選択性を向上させた。反応物は陰イオン交換カラムを用いて、未反応物および副反応物との分離を行った。精製物に各種ランタニド金属の塩化物を添加後に、限外濾過フィルターを用いて遊離の金属を除去した。

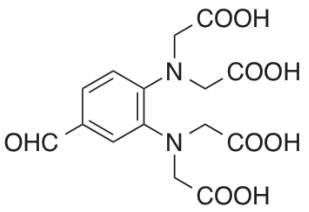


Fig. 1. Chemical structure of an aldehyde derivative of PhDTA.

【結果と考察】

ubiquitin の PhDTA 修飾物を陰イオン交換カラムにかけると、N 末端の修飾物がメジャーな画分として単離された。この N 末端の修飾物では、ランタニド金属を配位させて得られた蛋白質の PCS について実験値と計算値がよく一致し、常磁性中心位置および磁化率の異方性が精度良く決定された。さらに、測定 pH を変化させたところ、PCS が pH およそ 7 を中点として 2 状態の変化を示すことが見出された（Fig. 2）。また pH 6 と 8 で得られた異方性のテンソルが大きく異なっていたことから（Fig. 3）、それぞれの pH で異なる構造情報を取得できることが示唆された。実際に、pH 6 と 8 で得られた PCS を構造精密化に応用すると、単一の pH での PCS のみを用いた場合に比べて、構造計算の収束度が向上した。

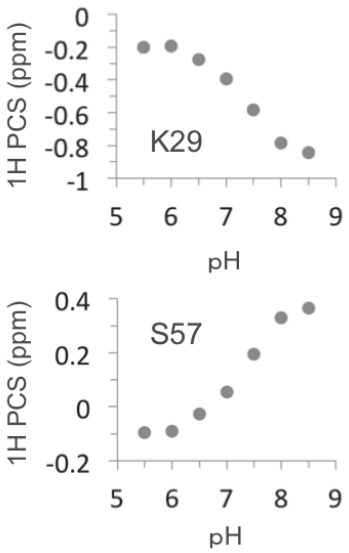


Fig. 2. $1H_N$ PCSs of Tm-PhDTA-modified ubiquitin K29 and S57 plotted against pH.

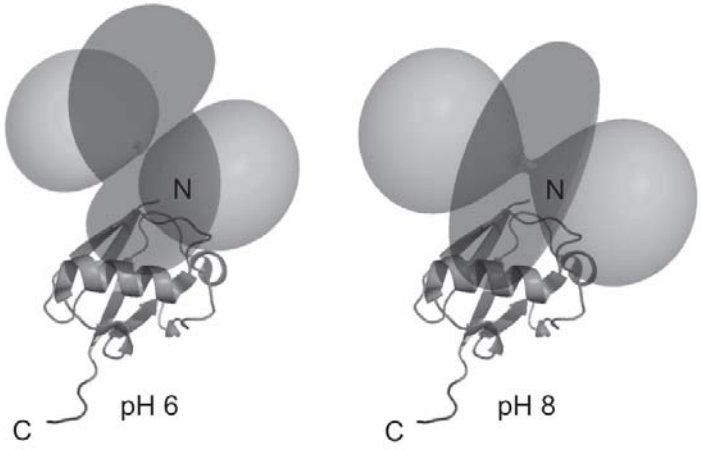


Fig. 3. PCS surface mapping on ubiquitin countered at +0.4 ppm (light gray) and -0.4 ppm (gray) induced by Tm-PhDTA at pH 6 and 8.

L1-2

新規拡張model-free解析法により明らかになった分子混雑環境下での蛋白質運動

○岡村英保[1]，栃尾尚哉[2]，杉山修世[1,2]，伊東優拡[1]，渡部暁[1,2]，
優乙石[3]，フェイグ マイケル[1,4]，杉田有治[1,3,5]，木川隆則[1,2,6]
[1]理化学研究所 生命システム研究センター，[2]理化学研究所 生命分子システム基盤研究領域，[3]理化学研究所 杉田理論分子科学研究室，[4]ミシガン州立大学，[5]理化学研究所 計算科学研究機構，[6]東京工業大学　大学院総合理工学研究科

A novel extended model-free analysis reveals protein dynamics under macromolecular crowding environment.

○Hideyasu Okamura[1], Naoya Tochio[2], Shusei Sugiyama[1,2], Masahiro Ito[1], Satoru Watanabe[1,2], Isseki Yu[3], Michael Feig[1,4], Yuji Sugita[1,3,5], Takanori Kigawa[1,2,6]
[1]RIKEN Quantitative Biology Center, [2]RIKEN Systems and Structural Biology Center, [3]RIKEN Theoretical Molecular Science Laboratory, [4]Department of Biochemistry & Molecular Biology and Department of Chemistry, Michigan State University, [5]RIKEN Advanced Institute for Computational Science, [6]Graduate 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. The model-free analysis for NMR relaxation data is one of the most popular methods for obtaining the dynamic information of proteins. However, the application of the conventional model-free analysis to macromolecular crowding environment has proven problematic. To solve this problem, we have newly developed an extended model-free analysis that is applicable to multiple-exponential decayed rotational diffusion. Currently, by using the extended model-free analysis, we are studying protein dynamics under macromolecular crowding environment. Moreover, we are examining the effect of mutations that modify protein surface electrostatic property or NaCl, NDSB and Arg/Glu on protein dynamics under macromolecular crowding environment.

序論

細胞内は数百mg/mlといわれる分子混雑環境にあり、そこでの蛋白質の振る舞いは希薄溶液環境とは異なる可能性が高い。model-free解析法は蛋白質ダイナミクスを調べる最も一般的な方法であるが、互いの運動が干渉しあう分子混雑環境下での適用には問題があることを、我々は見いだした。そこで、我々はこの問題を解決した新規拡張model-free解析法の開発を進めてきた。現在、この方法を用いて、蛋白質運動が濃度に依存してどのように変化するか、また、その際に分子表面電荷分布がどのように作用しているか、そして、NaCl, NDSB, Arg/Gluなどの蛋白質の溶解性に効果をもつ試薬群がどのように作用しているかなどを調べている。

緩和解析，model-free解析，分子混雑環境

○おかむらひでやす，とちおなおや，すぎやましゅうせい，いとうまさひろ，わたなべさとる，ゆういっせき，ふぇいぐ まいける，すぎたゆうじ，きがわたかのり

結果と考察

我々はVillin head peace sub domain (36aa, 以下、単にVillin)を0.4 ~135 mg/ml濃度で調製することで、希薄溶液環境 (0.4 mg/ml / 0.1 mM) から分子混雑環境 (135 mg/ml / 32 mM) へのモデルシステムとしている。我々の開発した拡張model-free解析法による解析の結果、~1 mM (4 mg/ml)以上の蛋白質濃度での蛋白質分子の回転運動は、希薄溶液環境下での回転運動とほぼ同じ相関時間を持つ速い回転運動と、蛋白質濃度の上昇に応じて出現する、より遅い回転運動との重ね合わせとして表現されることがわかった。そして、これらの2つの回転運動に対して異なる異方性を定義すると、速い回転運動の異方性は、希薄溶液環境下でのそれとほぼ一致した。相関時間もほぼ一定ということと併せると、速い回転運動は水溶液中でのVillin分子が固有にもつブラウン運動による回転運動だと想定される。それに対して、遅い回転運動は蛋白質濃度が高濃度になることで生じるなんらかの蛋白質-蛋白質間相互作用によるものとして考えることができるが、異方性の解析から、それはVillin分子の表面静電ポテンシャル分布と相関があることが示唆された。そこで、我々はこれをさらに詳しく検討するために、Villin分子の表面静電ポテンシャル分布を変更する目的で、4種の変異体, D46A, N60D, N60R, E72Aを調整し、4 mM濃度で400~900 MHz磁場強度の^{15}N NMR緩和パラメーターを取得し、拡張model-free解析を行った。その結果、遅い回転運動の異方性はこれらの変異によって大きな変化が起こることが確認できた(Fig. 1)。さらに、これらの変異は遅い回転運動の相関時間への影響は少ない反面、遅い回転運動の割合(S_R^2)には大きな影響を与えることが分かった(Fig. 1)。また、我々はNaCl, Arg/Glu, NDSB-195などの、蛋白質分子表面に作用することで、蛋白質溶解度へ影響を与えるとされる試薬群の蛋白質運動への影響も調べた。ここでは4 mM Villinに対して、200 mM NaCl, 50 mM Arg/Glu, 500 mM NDSB-195をそれぞれ添加し、同様に拡張model-free解析を行った。その結果、これらに関しても同様に遅い回転運動の相関時間への影響は少ない反面、遅い回転運動の割合(S_R^2)には大きな影響を与えることが分かった(Fig. 1)。我々は、現在、これらの結果の包括的かつ詳細な解釈を行うべく考察を進めている。

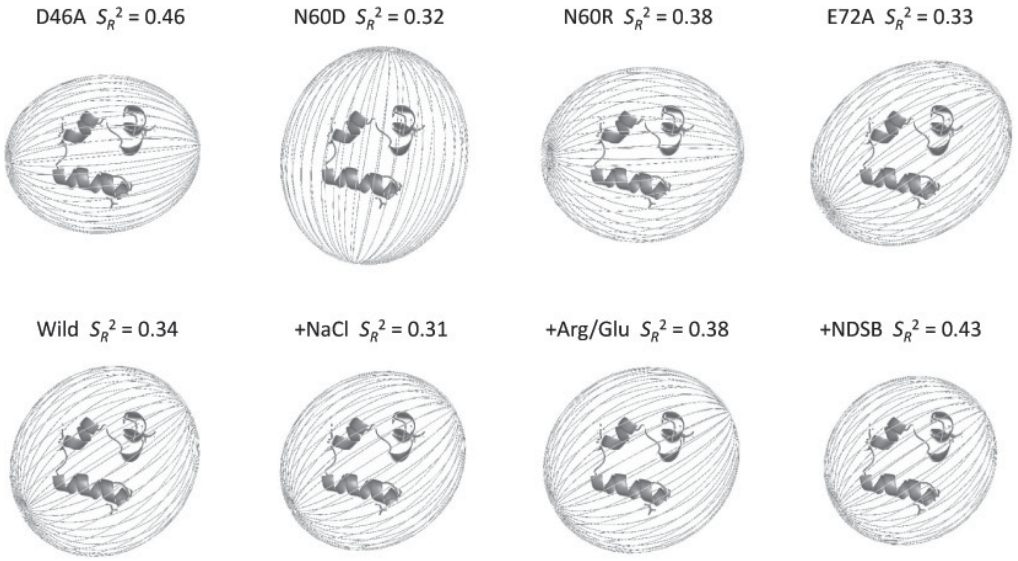


Fig.1. Slow parts of the overall rotational motions elucidated by the extended model-free analysis for macromolecular crowding environment. All NMR relaxation parameters were measured at 4 mM protein concentrations. S_R^2 is the proportion of the slow rotational motion. Ellipsoids represent the amplitude of the slow rotational motion.

L1-3

遺伝性大腸がん関連DNAミスマッチ修復蛋白質MutLの溶液NMRによる解析

○水島 良太[1], 金 宙妍[2], 末武 勲[2], 田中 宏明[2], 高井 朋代[2]
神谷 成敏[2], 鷹野 優[2], 三島 優一[2], 田嶋 正二[2], 後藤 祐児[2],
福井 健二[3], 李 映昊[2]
[1]理化学研究所生命システム研究センター
[2]大阪大学蛋白質研究所
[3]大阪医科大学

NMR Characterization of the Interaction of the Endonuclease Domain of MutL with Divalent Metal Ions and ATP.

○Mizushima Ryota[1], Kim Ju-Yaen[2], Suetake Isao[2], Tanaka Hiroaki[2] Takai Tomoyo[2], Kamiya Narutoshi[2], Takano Yu[2], Mishima Yuichi[2], Tajima Shoji[2], Goto Yuji[2], Fukui Kenji[3], Lee Young-Ho[2]
[1]*RIKEN Quantitative Biology Center (QBiC), Japan.*
[2]*Institute for Protein Research, Osaka University, Japan*
[3]*Osaka Medical College, Japan*

MutL is a multi-domain protein comprising an N-terminal ATPase domain (NTD) and C-terminal dimerization domain (CTD), connected with flexible linker regions, that plays a key role in DNA mismatch repair. To expand understanding of the regulation mechanism underlying MutL endonuclease activity, our NMR-based study investigated interactions between the CTD of MutL, derived from the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus* (aqMutL-CTD), and putative binding molecules. Chemical shift perturbation analysis revealed a novel ATP binding site in aqMutL-CTD. A docking simulation provided a putative scheme for the intermolecular interactions between aqMutL-CTD and ATP. We proposed a mechanical model for the regulation of MutL endonuclease activity in MMR through ATP binding-regulated interdomain interactions between CTD and NTD.

【序論】ミスマッチ塩基対修復（MMR）は、DNA修復系の一つで、DNA複製の精度を２～３桁程度高めているとされる。MMR蛋白質をコードする遺伝子の変異を原因とする遺伝性大腸がんは、リンチ症候群と呼ばれ全大腸がんの２−５％程度がリンチ症候群によるとされる。私はこのMMR蛋白質のうち、MutLの構造生物学的な解析を、NMRを中心として、Circular Dichroism spectroscopy（CD）やドッキングシミュレーションの手法も用いて行なった。MutLには、大腸菌型とヒト型の２つがあり、前者はエンドヌクレアーゼ活性を持たず（MutHがエンドヌクレアーゼ活性を担う）後者はエンドヌクレアーゼ活性を持つ。本研究では超好熱菌*Aquifex aeolicus*由来の後者のMutLを用いた。MutLは、溶液中で安定な二量体を形成するC末端ドメイン（CTD）と、ATP加水分解活性を持つN末端ドメイン（NTD）、両ドメインをつなぐリンカーで構成されている。ATPの結合と加水分解によって、CTDとNTDのドメイン間の相対配置が変化すると考えられている（Fig. 1）。

MutL, Chemical shift perturbation, relaxation analysis

○みずしまりょうた，きむじゅよん，すえたけいさお，たなかひろあき，たかいともよ，かみやなるとし，たかのゆう，みしまゆういち，たじましょうじ，ごとうゆうじ，ふくいけんじ，りよんほ

ヒト型の MutL の CTD は、エンドヌクレアーゼ活性を持ち、ミスマッチ塩基対から数百塩基離れた両側の片方に切れ目（ニック）を入れることで、MMR の起点となる。またエンドヌクレアーゼ活性は Mn^{2+}などいくつかの二価の金属イオンに依存的であり、Zn^{2+}がドメイン間相互作用の制御に関与することが示されている。本研究では、NMR によって、MutL と金属イオン、ATP の相互作用を解析することにより、MutL のエンドヌクレアーゼ活性の制御機構の一端について明らかにすることを目的とする。

【結果】CTD の主鎖連鎖帰属と、選択的アミノ酸残基安定同位体ラベル法により、９５％まで主鎖を帰属することに成功した。NTD についても、同様に主鎖の帰属を行ない、現在８０％程度の帰属率である。X 線結晶構造（M.C. Pillon et al. *Mol. Cell*, 2010）を鋳型として、TALOS+による二次構造予測の結果を拘束条件として加えて、*Aquifex aeolicus* 由来 MutL の立体構造モデルを、Modeller により作成した（Fig. 2）。モデル構造と CTD の主鎖の帰属結果（Fig. 3）を用いて、CTD と金属イオンの結合について解析した。アミノ酸残基レベルでの CTD と金属イオンの結合を調べるため、二次元 ^{1}H-^{15}N HSQC スペクトルの測定を行った。Mn^{2+}が常磁性金属であるために、結合するアミノ酸残基の HSQC スペクトル上のピーク強度が減少することを利用して、Mn^{2+}の存在/非存在下での HSQC スペクトルの強度比(PIR)から、Mn^{2+}の結合部位についてアミノ酸残基レベルで同定した（Fig. ４）。CD 測定による結果から、Zn^{2+}の結合は aqMutL-CTD の熱安定性を高めることが示された (Fig. ５)。また、化学シフト摂動 (CSP)の解析から、これまで ATP 加水分解酵素である NTD にしか ATP は結合しないと考えられていたが、CTD にも ATP が結合することが示され (Fig. 6)、その結合部位についても明らかにした（Fig. 7 左）。また、CSP のデータを拘束条件とした、aqMutL-CTD モデル構造と ATP とのドッキングシミュレーションを Mypresto/Sievgene を用いて行い、図のような結果を得た (Fig. 7 右)。化学シフト摂動の解析と、ドッキングシミュレーションの結果から、エンドヌクレアーゼ活性を持つ MutL で保存されている motif (DQHA(X)$_2$E(X)$_4$、ACRISV、CPHGRPI) を含む α1、α1-α２ loop、α2-β4 loop が形成する表面に ATP の結合部位があると考えられた。これらの結合部位の運動性に関する情報を得るた

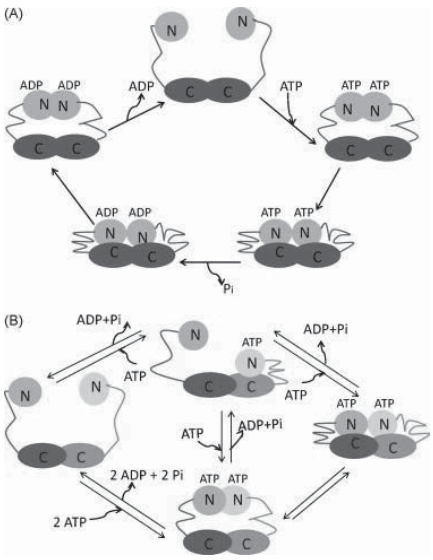


Fig. 1 Interdomain interaction induced by ATPase cycle in *E coli*. type MutL（top） and human type MutL（bottom） [1].

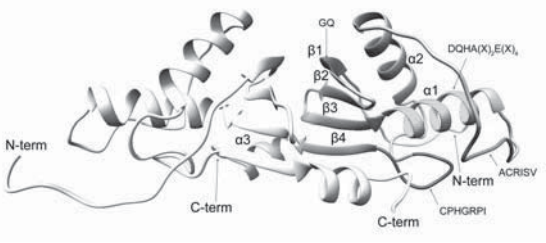


Fig. 2 Three-dimensional structure of aqMutL-CTD obtained by homology modeling

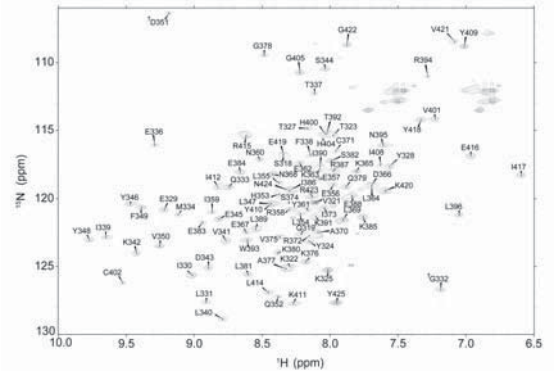


Fig. 3 The result of the sequential backbone assignment of aqMutL-CTD

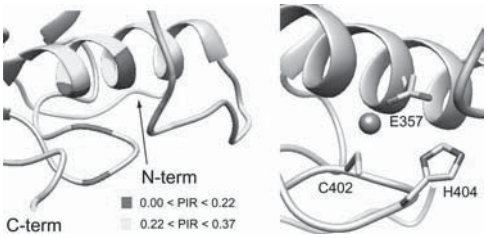


Fig. 4 Residues where PIRs are below the thresholds are mapped on the model structure of aqMutL-CTD (left) and deduced binding sites of Mn^{2+} (right).

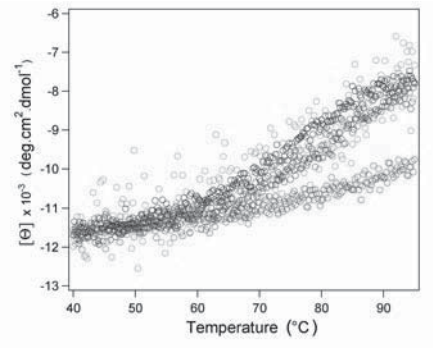


Fig. 5 Thermal titration experiments by CD. aqMutL-CTD only（black）, with Zn^{2+} (red), Mn^{2+} (purple), and ATP (green) .

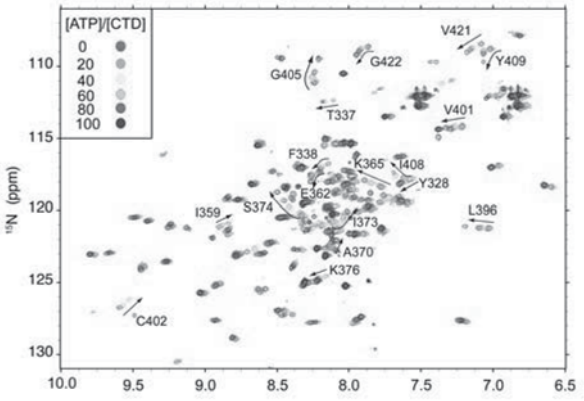


Fig. 6 HSQC spectrum changes induced by ATP titration.

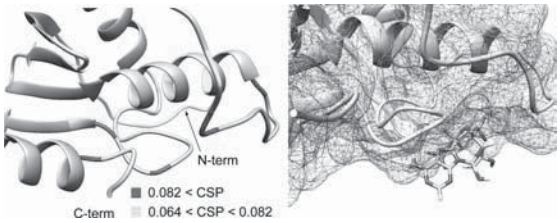


Fig. 7 Residues where CSPs are above the threshold are mapped (left). Results of the docking simulation between aqMutL-CTD and ATP.

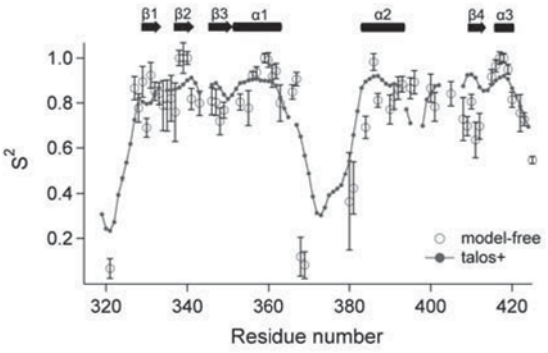


Fig. 8 Values of the order parameters against the residues of aqMutL-CTD.

めにオーダーパラメーター (S^2) の値を各残基について調べた。S^2 は、主鎖帰属の化学シフト情報から、TALOS+を用いて得られる値と、緩和解析で得られた T_1、T_2、NOE の値から model-free 解析を用いて得た値の２つを示した（Fig. 8）。その結果、CPHGRPI motif を含む α2-β４ loop 中のアミノ酸残基は α-helix や β-sheet 中の残基と同程度の S^2 の値 (0.7-0.9) を示しており、従って ps-ns の時間スケールの運動性が loop 構造としては比較的小さく、rigid な構造であることが示された。

【考察】CD による解析から Zn^{2+}、Mn^{2+}、ATP が aqMutL-CTD とその二次構造を変化させることなく結合し、Zn^{2+}のみが顕著に aqMutL-CTD の熱安定性を上げることを示した。aqMutL-CTD は超好熱菌由来のタンパク質であり、構造を維持して機能するために Zn^{2+}と結合していることが必要であると考えられる。Mn^{2+}の MutL-CTD に対する親和性は大変弱く、その結合部位については、アミノ酸置換変異体を用いた活性実験による、間接的な情報しか無かったが、NMR による解析によって、Mn^{2+}が $DQHA(X)_2E(X)_4$ と CPHGRPI の２つの motif の含むアミノ酸残基(E357、C402、H404)

に結合することを示した。 MutL-CTD と ATP が結合することはこれまで知られていなかった。これも Mn^{2+}と同様に、MutL-CTD と ATP の弱い親和性により、NMR 以外の方法で結合を検出することが難しかったためと考えられる。化学シフト摂動法とドッキングシミュレーションによる解析により、aqMutL-CTD と ATP が α1、α1-α2 loop、α2-β4 loop が作る表面に結合することが示された。さらにこの ATP の結合部位が重水素交換マススペクトロメトリーを用いた先行研究で示唆された、aqMutL-CTD の aqMutL-NTD とのドメイン間相互作用部位に含まれることがわかった（Fig. 9）。このことから我々は、CTD-NTD ドメイン間相互作用を ATP が阻害するという仮説を立て、*in vitro* で ATP 濃度を変化させた時のドメイン間相互作用を説明する、“Activation-attenuation model”を提案した (Fig. 10) [3]。このモデルによって、*in vitro* での MutL の ATP 濃度依存的なエンドヌクレアーゼ活性の制御とドメイン間相互作用の関係について、整合的に説明できる。即ち、ATP が高濃度の状態では、NTD と CTD にともに ATP が結合することで、NTD と ATP との結合により（リンカーが α-helix 構造をとることで）促進された CTD-NTD ドメイン間相互作用が CTD と結合した ATP により阻害され、エンドヌクレアーゼ活性が抑制される。一方、ATP が低濃度の状態では、その弱い親和性の為に CTD と ATP がほとんど結合しておらず、NTD のみと ATP が結合した MutL において、エンドヌクレアーゼ活性が促進されることになる。また、このモデルを *in vivo* の状況で考えると、細菌の細胞内で、MutL の濃度は高々数百 nM 程度であり、一方、ATP の濃度は数 mM 程度である。従って細胞内では通常、ATP によるエンドヌクレアーゼ活性が抑制されることで、非特異的な DNA の切断が強く抑制されていると考えられる。一方で、MutS と相互作用した時には、エンドヌクレアーゼ活性は促進されるはずだが、原核生物では ATP の細胞内濃度はほぼ一定であると考えられている。MutL と MutS との相互作用によって、CTD と ATP との結合が阻害されることで、エンドヌクレアーゼ活性が促進されることが考えられるが、今後の研究の課題である。

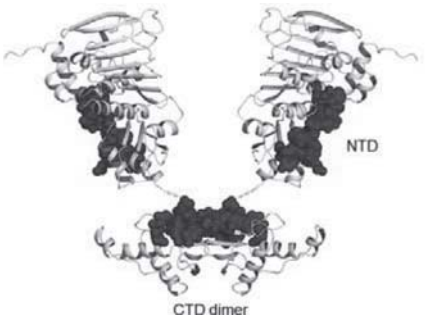


Fig. 9 Interdomain interaction sites of aqMutL suggested by the results of the H-D exchange mass spectrometry analysis [2].

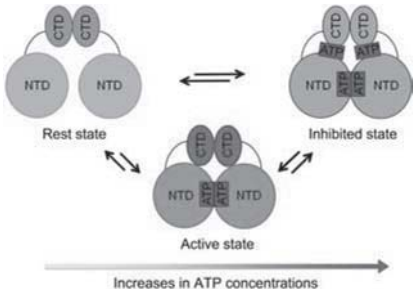


Fig. 10 Activation-attenuation model

引用文献

[1] Polosina YY & Cupples CG. MutL: conducting the cell's response to mismatched and misaligned DNA. *Bioessays*. 2010. 32(1):51-9.

[2]Yamamoto T**.** *et al.* Evidence for ATP-dependent structural rearrangement of nuclease catalytic site in DNA mismatch repair endonuclease MutL. *J Biol Chem.* 2011. 286(49):42337-48.

[3] Mizushima, R. *et al.* NMR Characterization of the Interaction of the Endonuclease Domain of MutL with Divalent Metal Ions and ATP. *PLoS ONE*. 2014. 9(6):e98554.

L1-4

鉄を蓄積したヒト脳組織の超高磁場マイクロイメージング

○三森文行[1], Michael Garwood[2], 宮嶋裕明[3], 坂尾万幾子[3], 瀬山春彦[1]
（国立環境研[1], Univ. Minnesota[2], 浜松医大[3]）

Very high field micro-imaging of brain tissue from a patient with iron overload

F.Mitsumori[1], M.Garwood[2], H.Miyajima[3], M.Sakao[3], H.Seyama[1]
(Natl. Inst. for Environmental Studies[1], Univ. Minnesota[2], Univ. Hamamatsu School of Med.[3])

Contrast of low resolution MR images agreed well with the iron map obtained with XRF at brain tissues from a patient with aceruloplasminemia. It, however, failed to exhibit the granular structure of iron in the Fe map. In order to perform high resolution imaging of the tissue we designed an imaging detector at 16.4T. With this apparatus, spatial resolution of 20 μm is attainable. High resolution images of tissues from the patient's occipital and temporal lobes exhibited the granular structure of low intensity spots, which is well consistent with the iron granules displayed with Berlin-blue staining.

【はじめに】これまで我々は、鉄の存在がヒト脳組織水の横緩和速度の大きな決定要因であることを定量的に示し[1]、この関係式を用いて脳の鉄濃度を in vivo で画像化できることを報告してきた[2]。遺伝的に脳に多量の鉄が蓄積する無セルロプラスミン血症患者では脳内の鉄濃度は健常者脳のおよそ 4 倍に上っている[3]。本発表では、無セルロプラスミン血症患者の脳組織の鉄の存在状態を微視的に明らかにすることを目的として 16.4T の超高磁場 MRI で用いられるイメージング用信号検出器を作製し、マイクロイメージング測定を実施した。

【方　法】16.4T の高磁場で病理組織を高感度で測定するために Alderman-Grant 型[4]の新しい信号検出器をデザインした。アクリル樹脂の筐体に銅箔を用いた共鳴回路を Fig. 1 のように作製した。銅箔のサイズは 10 x 7 mm で極板間のギャップは 6mm である。可変域が 0.5～4pF の非磁性トリマーを用い 700MHz に同調した。回路のマッチング調整にはインダクティブ方式を用いた。脳組織の測定には、水平ボア磁石を備えた Agilent 社の分光計を用い、2 次元または 3 次元のスピンエコー法、勾配エコー法によりマイクロイメージング測定を行った。

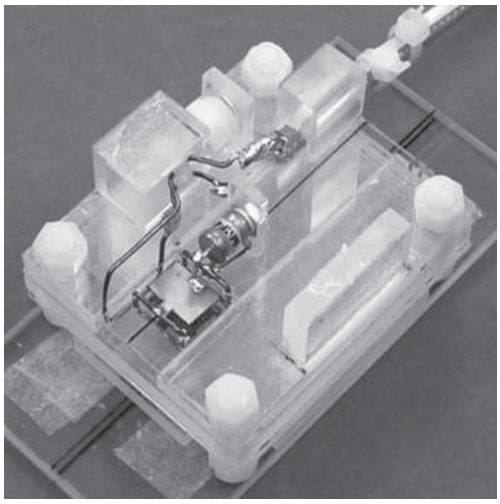


Fig.1. MRI detector for use with histological samples at 16.4T. Upper left coil is one for the inductive matching.

脳の病理試料は無セルロプラスミン血症患者の剖検によりホルマリン固定された組織を用いた。対照試料として神経疾患のない剖検脳より得られた固定組織を用いた。組織の鉄染色にはベルリンブルー染色を用いた。脳組織の蛍光 X 線分析はホルマリン固定試料をシリカゲルデシケータ中で乾燥の後、顕微蛍光 X 線分析装置（Horiba XGT-2000W）を用い、100μm の X 線導管を用いてビームを絞った Rh Kα線を線源として放出される特性 X 線を用いて元素マッピングを行った。

キーワード：高磁場マイクロイメージング、ヒト脳組織、鉄

○みつもりふみゆき、まいけるがーうっど、みやじまひろあき、さかおまきこ、せやまはるひこ

【結果と考察】Fig. 2 に無セルロプラスミン血症患者脳の被殻組織の低分解能 MRI 画像（面内分解能 200μm）と、同試料を乾燥後に蛍光 X 線分析により得た鉄分布画像を示す。乾燥に伴う試料の変形はあるものの、Fig. 2a のスピンエコー画像の低信号域は Fig. 2b の鉄濃度が高い領域(試料左から中央下部)と良い一致を示しており、多量の鉄の存在がスピンエコー

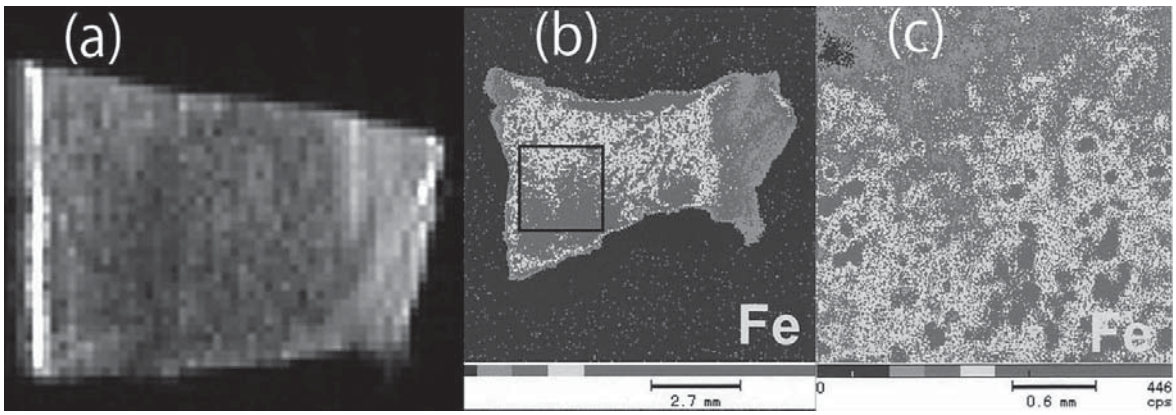


Fig. 2a: Spin echo image (TR/TE 500/13ms) of putamen from a patient with aceruloplasminemia, 2b: Fe map of the dried putamen tissue obtained with XRF, 2c: Zoomed Fe map of the square area shown in 2b.

画像のコントラスト決定に支配的であることが明らかである。この低分解能画像ではそれほど明瞭ではないが、鉄分布画像の拡大図（Fig. 2c）では鉄濃度の高い部分が粒子状に分布していることが見て取れる。この点をより明らかにすべく新しく作製した 16.4T 検出器を用いて高分解能測定を行った。Fig. 3a に 16.4T で測定した患者脳後頭葉組織の高分解能スピンエコー画像(面内分解能 50μm)を示す。画面右半の灰白質部位には低信号のスポットが多数認められる。一方、左側の白質部にはスポットはほとんど認められない。Fig. 3b に示す同組織の鉄染色の結果は、MRI 画像とよく対応した粒子状の鉄の存在を示しており、低信号スポットが粒子状の鉄によるものであることを示している。同様の所見は、側頭葉皮質、角回などでも認められ、高濃度の鉄の蓄積の一般的な分布様式を示すものと考えられる。

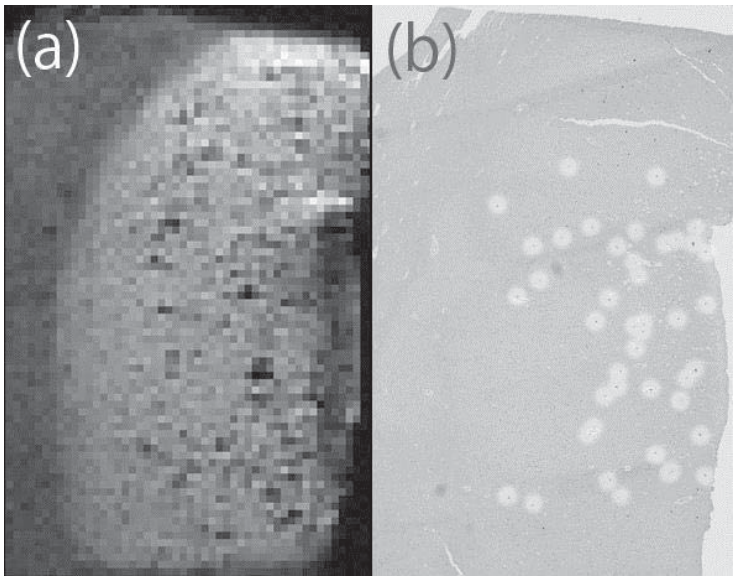


Fig. 3. Comparison of (a) a spin echo image (TR/TE 500/11.4ms) of the occipital lobe tissue from a patient with aceruloplasminemia at 16.4T with (b) its iron staining (Berlin Blue+HE). Blue staining spots are highlighted with white circles.

【文　献】

[1] Mitsumori F, Takaya N, Watanabe H, Garwood M et al: Magn. Reson. Med., 68, 947 (2012).
[2] Mitsumori F, Takaya N, Watanabe H, Miyajima H: ENC2013, TOE 5:10-5:25 (2013).
[3] Miyajima H: Neuropathology, 23, 345 (2003).
[4] Alderman DW, Grant DM: J. Magn. Reson., 36, 447 (1979).

L1-5

$^{6/7}$Li, ^{31}P-固体NMRによる超イオン伝導体$Li_7P_3S_{11}$のダイナミクス解析

○村上　美和[1]，下田　景士[1]，塩谷　真也[1]，三井　昭男[2]，尾原　幸治[1]，
小野寺　陽平[3]，荒井　創[1]，内本　喜晴[4]，小久見　善八[1]
[1]京都大学・産官学連携本部，[2]トヨタ自動車・材料技術開発部
[3]京都大学・原子炉実験所，[4]京都大学大学院・人間・環境学研究科

Dynamics of super ionic conductor, $Li_7P_3S_{11}$, as studied by $^{6/7}$Li, ^{31}P solid-state NMR

○Miwa Murakami[1], Keiji Shimoda[1], Shinya Shiotani[1], Akio Mitsui[2], Koji Ohara[1], Yohei Onodera[3], Hajime Arai[1], Yoshiharu Uchimoto[4], and Zempachi Ogumi[1]
[1]*Office of Society-Academia Collaboration for Innovation, Kyoto University*
[2]*Material Development Division, Toyota Motor Corporation*
[3]*Research Reactor Institute, Kyoto University*
[4]*Graduate School of Human and Environmental Studies, Kyoto University*

High ionic conductivity in the order of 10^{-3} Scm^{-1} at room temperature has been reported for $Li_7P_3S_{11}$ metastable crystal synthesized by annealing $(Li_2S)_{70}(P_2S_5)_{30}$ glass at 513 K.[1,2] By analyzing its synchrotron X-ray powder diffraction pattern, Yamane et al. showed that Li ions are situated between PS_4 tetrahedra and P_2S_7 ditetrahedra.[3] However, not much has been known about the high lithium ionic conduction mechanism. In this work, we applied $^{6/7}$Li and ^{31}P solid-state NMR to examine structural/dynamical features of Li_2S-P_2S_5 samples. NMR lineshapes and spin-lattice relaxation times (T_1) were measured as a function of temperature. Further, we applied ^{31}P-^{31}P dipolar correlation experiment to examine the origin of the ^{31}P linewidth, which is reduced by motion at higher temperature.

序論

Li_2S-P_2S_5系ガラスを加熱結晶化して得られるガラスセラミクスは、組成と熱処理条件により高い導電性を示し、特にLi_2S を70 mol%含むガラスからは$Li_7P_3S_{11}$準安定結晶が析出し、熱処理条件を最適化することにより室温で10^{-3} S/cmに達する高い導電率を示すことが知られている[1,2]。X線/中性子回折リートベルト解析やリバースモンテカルロモデリングなどから、この$Li_7P_3S_{11}$の結晶構造はPS_4単量体とP_2S_7二量体から構成され[3]、Liイオンの伝導パスがあることが示唆されているが[4]、イオン伝導を支える動的構造に関しての知見は少ない。本研究では、^{7}Liと^{31}PのNMR線形やT_1の温度依存性測定、線形解析のための^{31}P-^{31}P同種核双極子相関NMRなど、固体NMRテクニックを駆使した解析を行い、LiとPのダイナミクスとイオン伝導性の関係を検討し、伝導パスを形成する骨格の^{31}Pの動的挙動がLiイオン伝導に密接に関係していることを明らかにした。

実験

$(Li_2S)_x(P_2S_5)_{100-x}$ (mol%; x = 70、75)ガラスはLi_2S (日本化学工業)とP_2S_5 (Aldrich)からメカノカルミリング法により合成した。得られたガラスを290℃で2時間熱処理してガラスセラミクスとした。

固体電解質、ダイナミクス、^{31}P-^{31}P双極子相関

○むらかみみわ，しもだけいじ，しおたにしんや，みついあきお，おはらこうじ，おのでらようへい，あらいはじめ，うちもとよしはる，おぐみぜんぱち

$(Li_2S)_{75}(P_2S_5)_{25}$のガラスセラミクス、$(Li_2S)_{70}(P_2S_5)_{30}$のガラスセラミクスおよびガラスをそれぞれ、75gc、70gc、70gとし、イオン伝導度は6.6×10^{-5} Scm^{-1}、8.7×10^{-4} S cm^{-1}、1.4×10^{-4} S cm^{-1}だった。NMR測定にはJEOL社製ECA600(14 T; ^{6}Li, ^{7}Li, ^{31}Pの共鳴周波数は88.3, 233.2, 243.0 MHz)を用いた。

結果および考察

図1に各試料 の$^{6/7}$Liと^{31}PT_1の温度依存性を示す。70gcは310K以下の低温域では、$^{6/7}$Liと^{31}PT_1は温度の逆数に対してほぼ同じ傾き(~18 kJ/mol)を示し、Pの運動はLiの運動に支配され、P独自の運動は起こっていないことが判る。一方、310K以上の高温域では、^{7}Liの運動はより活発になる一方で、^{31}PT_1の温度依存性は^{7}LiT_1の依存性とは明らかに異なることから、^{31}Pの独自の運動が顕著になっていることが判った。イオン伝導度が低い70gや75gcにはこの様な傾向は見られない。この運動は70gcの^{31}Pの線形にも影響を及ぼしており、図2に示すように高温では線幅が細くなっている(motional narrowing)。特に、低温では構造分布が見られるP_2S_7が340K以上で構造が収束している。低温域でのP_2S_7の信号の線幅の原因を検討するために、^{31}P-^{31}P双極子相関測定(RFDR)を行った結果、PS_4はクロスピークが観測されなかったのに対して、P_2S_7ではブロードなoff-diagonalピークが観測された他、図2で矢印を付けた信号間にもクロスピークを観測した。すなわち、P_2S_7は低温では構造分布を持つが、高温では運動により構造が平均化することが分かった。

これらの結果から、70gc の高いリチウムイオン伝導性は構造の骨格であるリンの運動が、リチウムの拡散をより行いやすくすることで支えられているのではないかと考えられる[5]。

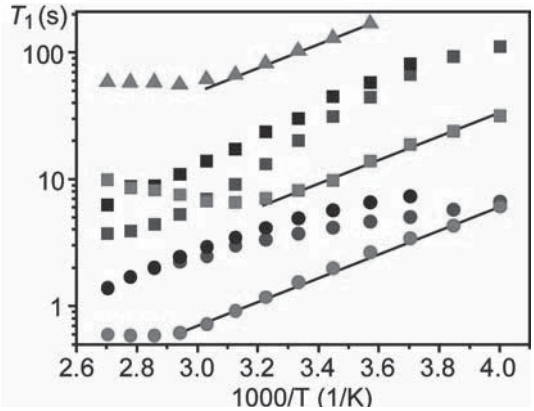


Fig. 1 Temperature dependence of the ^{6}Li (triangle), ^{7}Li (circle), and ^{31}P (square) spin-lattice relaxation times (T_1) for 70gc (red), 75gc (blue), and 70g (black).

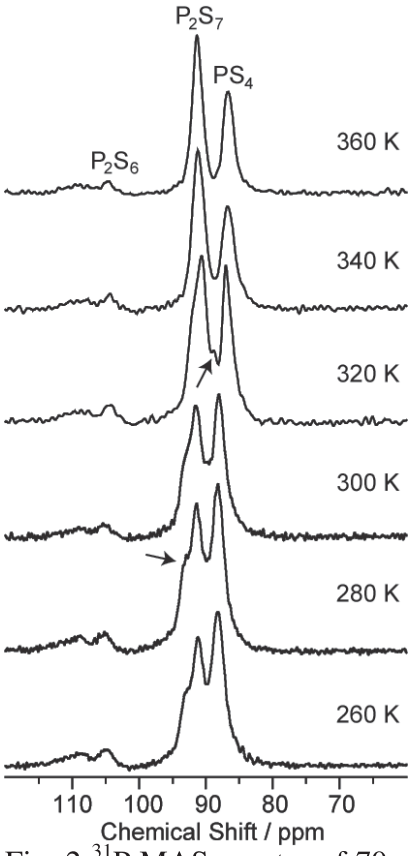


Fig. 2 ^{31}P MAS spectra of 70gc at various temperatures.

引用文献

1) Mizuno, F. et al., *Adv. Mater*. **2005**, *17*, 918-921.

2) Mizuno, F. et al., *Electrochem. Solid-State Lett*. **2005**, *8*, A603-A606.

3) Yamane, H. et al., *Solid State Ionics* **2007**, *178*, 1163–1167.

4) Mori, K. et al., *Chem. Phys. Lett*. **2013**, *584*, 113–118.

5) Murakami, M. et al., submitted for publication.

謝辞

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

L1-6

ゼオライトの^{27}Al-^{29}Si CPMAS実験とHETCOR実験

○髙橋利和[1]，清住嘉道、林　繁信、安田弘之
国立研究開発法人　産業技術総合研究所

^{27}Al-^{29}Si CPMAS and HETCOR Experiments of Zeolites

○Toshikazu Takahashi, Yoshimichi Kiyozumi, Shigenobu Hayashi, Hiroyuki Yasuda
National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

^{29}Si DDMAS, ^{27}Al-^{29}Si CPMAS and HETCOR experiments were performed for K-CHA（K-Chabazite）(Si/Al=2). Using a similar condition to the literature,[1)] we have successfully obtained a good ^{27}Al-^{29}Si CPMAS spectrum. Five separated peaks those assigned to Q^4(0Al) to Q^4(4Al) were observed in ^{29}Si DDMAS spectrum.[2)] In the ^{27}Al-^{29}Si CPMAS spectrum, similarly shaped 5 peaks are also observed at almost the same positions and with a peak heights' distribution of very small difference. On the other hand, the 2D HETCOR spectrum of the same sample showed unprecedented peak separations in both their 2D map and its F2-projection. The separately observed peaks can be ascribed to ^{29}Si signals having the same numbers of neighboring Al's with different geometrical atom distributions around it. The reason why this peak separation was only observed in the 2D spectrum is discussed. This method will have the potential usefulness for analyzing the T-site atom distribution in a particular CHA.

序論

ゼオライトはSi/Al比のみならず、Al配置の分布も触媒性能に大きく影響する可能性がある。例えば横井らはゼオライト内のAlの存在位置を制御する手法を開発し、制御されたゼオライトの触媒性能と構造の相関に関する研究を展開している[3)]。触媒性能のほか、分離・吸着材やイオン交換体としての性能もAlの配置分布の影響を受ける可能性が高い。

固体NMRは^{29}SiにおいてはQ^4(nAl)（Q^m(nAl)はSiのT-サイト＝四面体サイトで4個のSi-O-M結合のMのうちm個がSiかAl、うちn個がAl）のnを区別し、^{27}Alにおいては配位数（AlO_3～AlO_6）を区別して観測するために用いられることを通じて、ゼオライトの構造解析に貢献してきた。[4)] Alの方が分解能が低く、詳細な情報が得られにくい理由は、主に^{27}Al（I=5/2）の四極子結合による。

一方、例えば同じQ^4(1Al)やQ^4(2Al)の中で考えうる複数種の局所構造異性体の分離観測については、主に計算機化学によってその分離識別可能性が追及されてきた。[5)] 元々の結晶構造に幾何構造の異なる複数のT サイトがある場合を除けば、一定のAlを含むゼオライトについては他の分光法（XAFS等）を含めてこれ以上詳細な分離観測を可能にする実験的手段が存在しなかった。例えばK-Chabazite（K-CHA）については1D(1次元)ではQ^4(nAl)のnが分離観測されるに過ぎない。

我々はK-CHAの^{27}Al-^{29}Si HETCOR（2次元空間相関）スペクトルにおいて、１D実験で得られるものよりも細かなピークの分離が、特に^{29}Si軸上に起こることを見出した。ここでは我々が見出した新しい現象について報告し、分離の微視的要因ならびに２D (2次元)スペクトルにおいて分離が見出されるメカニズムについて考察する。なお、本講演予稿においてはK-HCAについてのみ述べるが、ほかにH-CHAについても同様のピーク分離が見出されている。

Zeolite, Chabazite, ^{27}Al-^{29}Si CPMAS, ^{27}Al-^{29}Si HETCOR, Peak separation in 2D NMR

○たかはしとしかず、きよずみよしみち、はやししげのぶ、やすだひろゆき

方法

K-CHA（Si/Al=2）は文献[6]に従って調製したものを湿度約10%のデシケータ中で一定期間保存したものをそのまま用いた。MAS NMRにおいては3 chプローブ（^{1}H/^{19}F-X-Y）および3 ch固体NMR用分光装置（Bruker AVANCEIII WB 400MHz）を用い、4 ㎜ ZrO_2ローターで300 K、12.5 kHzの回転速度で測定を実施した。^{27}Al-^{29}Si CPMAS実験においてはPruskiらの見出したmatching条件（Ref. 1）を参考に選んだ。2D RAPT-VACP-HETCOR実験は、RAPTによる^{27}AlのCT帯（±1/2⇄∓1/2）enhance後、パルス照射により横磁化を作り、スピンロック開始までの待ち時間を展開時間とし、40 μsおきに120枚のFIDのf2スライスをStates-TPPI法で取得し、2D -FTを行った。

結果

1D NMR ― 図1にK-CHA（Si/Al=2.0）の^{29}Si{^{1}H} DDMAS（上段）、^{27}Al-^{29}Si CPMAS（下段）スペクトルをそれぞれ示す。いずれもQ^4(0Al)からQ^4(4Al)までの5本のシグナルが分離観測された。ピーク強度比、線形の違いはわずかに見出された。図2には^{27}Al MAS NMRスペクトルを示す。線幅410 Hzのシャープなピークが61.5 ppmにただ１本観測され、AlO_5, AlO_6に相当するシグナルは全く見出されなかった。また図は割愛するが、^{1}H-^{29}Si RAPT-VACPMASスペクトルにおいては5本のピークはほとんど見出されず、Q^4(3Al)付近にブロードな弱いピークのみが見出される。以上の事実からこの試料が欠陥の少ない良好な結晶であることが確認された。

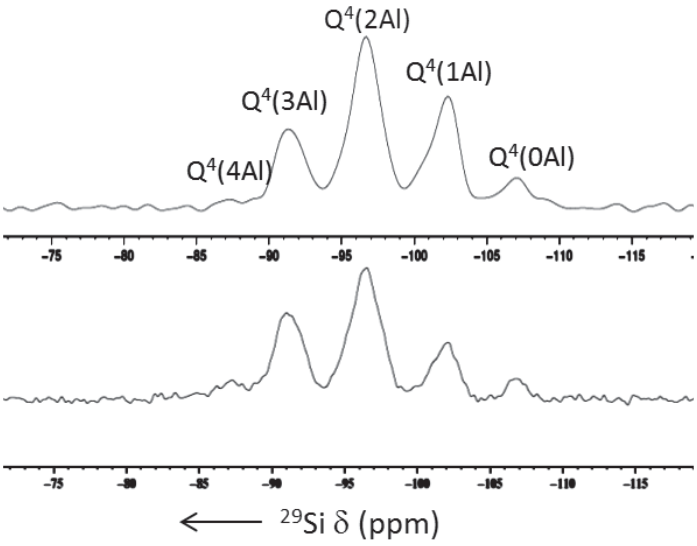


Fig. 1. ^{29}Si{^{1}H} DDMAS and ^{27}Al-^{29}Si CPMAS spectra of K-CHA.

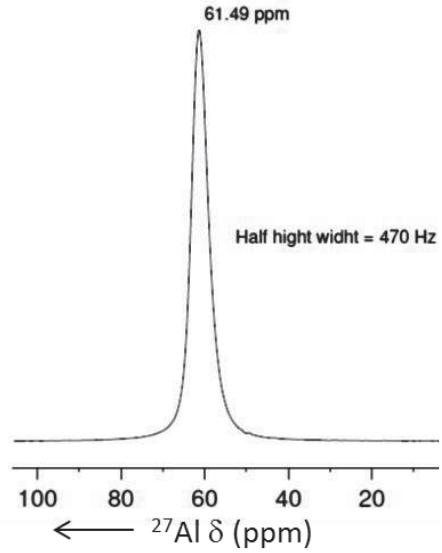
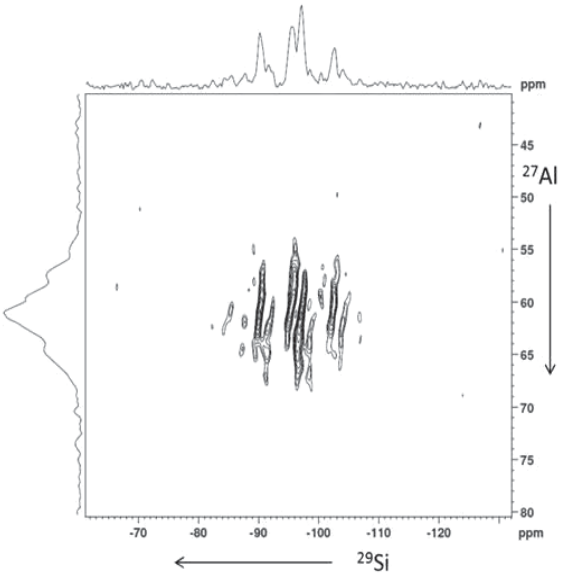


Fig. 2. ^{27}Al MAS spectrum of K-CHA.

2D NMR ― 図３に^{27}Al-^{29}Si HETCORのチャートを示す。このチャートで見出されるF2プロジェクションには1D NMRではそれぞれ１本にまとまっていたQ^4(1Al)、Q^4(2Al)、Q^4(3Al)のピークにあたる位置にそれぞれ2ないし3本に分離したピークが見出される。2Dチャートの対応する位置においても同様に複数のピークが分離観測された。一方F1プロジェクション側はひとつひとつのピーク幅がブロードなため、部分的な分離のみが得られた。また2D チャート上のピークは歪んだ畝状の構造をもって見出され、連なった畝の一部はチャートのF1軸に対してΔF2(^{29}Si)/ΔF1(^{27}Al) = 1 Hz /6~8 Hz 程度の傾きをもっているように観測された。またQ^4(0Al)、Q^4(4Al)に対応する位置にも小さなピークが見出された。



Conditions;
4 mm ZrO_2 rotor.
Rotation: 12.5 kHz ^{27}Al exccitation: 8 kHz
^{27}Al RAPT power: 6.2 kHz
RAPT repitition: 30 times
RAPT pulse duration: 2.3 us
RAPT pulse interval: 0.1 us
^{27}Al spinlock power: 0.6 kHz
^{29}Si spinlock power: 10.6 kHz
2400 x 120 data points

Fig. 3. ^{27}Al-^{29}Si HETCOR of K-CHA.

考察

CHAの基本的な結晶構造の模式図を図4に示す。^{29}Siの2D構造で分離が観測された複数のピークは、まず隣接するAlの配置に基づくと考えられる。

図 5 には同じ Q^4(nAl)に分類される Si サイトの 4 個の隣接 T サイトの原子種を考慮した場合に考えられる、異なる可能な局所構造をすべて示した。なお、結晶の対称性を考慮するとふたつの a サイトは等価で、c サイトと c' サイトはいずれも非等価となる。この考えに立つと、Q^4(0Al)、Q^4(4Al)にはそれぞれ 1 種類、Q^4(1Al)と Q^4(3Al)にはそれぞれ 3 種類、Q^4(2Al)には 4 種類の居所構造に基づく異性体構造が存在することになる。Q^4(2Al)の中心の畝にはおそらく 2 成分（例えば Q^4(2Alaa)と Q^4(2Alcc')）が含まれていると考えられる。このほかそれぞれの畝の中腹にはいくつかの小さなピークも見えており、より遠方の T サイトの原子配置や対イオンである K^+の占めるサイトの違いの影響を受けていることが推定される。また Q^4(0Al)については 2D では 1D とは異なり、ほとんどピークが見えなくなるが、第二隣接位からの磁化移動によりわずかに見えているものと考えられる。

^{29}Si の信号は隣接 T サイトやさらに遠方の多数の T サイトの原子配置の違い基づく数多くの微視的環境の違いに基づく Broadening を含んでいる。1D で分離して見出されないピークが 2D でのみ分離して見出される理由に関しては、現在のところ、以下のように考えている。

（1） 全く同一の構造においても ^{29}Si は近接する ^{27}Al (I=5/2) 核のスピン状態に依存してその Second Order Cross Term の異方性に基づいて一定のブロードニング（~100 Hz）を受けている。[7]

（2） 弱いパルスによる CP 条件では、

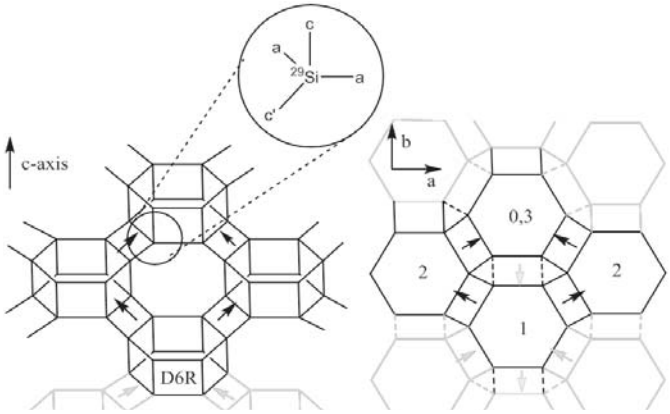


Fig. 4. Structure models of Chabazite, a bird view (left) and an ab-plane projection(right).

四極子核の PAS（主軸系）と MAS の回転軸とのなす角度について一定の範囲にある ^{27}Al 核が選択され、さらに隣接する ^{29}Si との関係についても一定のシグナル選択が働く可能性も考えられ、このメカニズムによって角度が一定範囲にある Al-Si 対が選択されやすくなる可能性がある。[8,9]

（３） 1D の ^{27}Al-^{29}Si CPMAS では弱いパルスを用いているものの、ST 遷移（例えば I = ±1/2 ⇌ ±3/2）からの磁化移動が部分的に混ざる可能性がある。2D ではそのシグナル成分は速やかにデフェーズし消失するため、FT 後、ST からの影響によるブロードニングは見出されなくなる。

特に 1 次元実験と 2 次元実験との違いを説明するためには異方性情報の一部が 2 次元化によって失われることを考慮する必要があり、この現象に関して説明しうるのは（３）のみである。これらの仮説が正しい場合、シグナルにおいては結合方向に関する選択のみが働き、ケミカルに異なるサイトからの情報は失われずに 2D チャート上で得られることになる。

結論

K-Chabazite の ^{27}Al-^{29}Si CPMAS(1D)および HETCOR(2D) スペクトルを得た。1D 実験では Q^4(0Al)から Q^4(4Al)の 5 本に分裂したシグナルが見出されるが、2D 実験では中央の 3 本がそれぞれ更に 2, 3 本に分裂して観測された。Q^4(nAl)サイトの中の Geometry の違いに基づいて分離観測された可能性があり、この仮説が正しければ Chabazite 中の原子分布の違いを見分けるための分析手段としての利用が期待される。

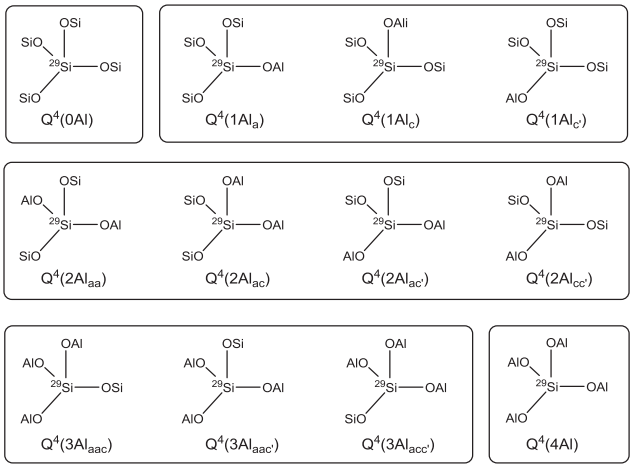


Fig. 5. Possible local structure types of CHA.

References:

1) Y. Cai, R. Kumar, W. Huang, B. G. Trewyn, J. W. Wiench, M. Pruski, and V. S. Y. Lin, *J. Phys. Chem. C*, **2007**, *111*, 1480-1486.

2) D. E. Akporiaye, I. M. Dahl, H. B. Mostad, and R. Wendelbo, *J. Phys. Chem.*, **1996**, *100*, 4148-4153.

3) T. Yokoi, H. Mochizuki, S. Namba, J. N. Kondo, and T. Tatsumi, *J. Phys. Chem. C* **2015**, *119*, 15303-15315.

4) J. Clinowski, *Chemical Reviews*, **1991**, *91*, 1459-1479.

5) J. Dedecek, S. Sklenak, C. Li, F. Gao, J. Brus, Q. Zhu and T. Tatsumi, *J. Phys. Chem.* C **2009**, *113*, 14454-14466.

6) Thomas R. Gaffney, “Verified Synthesis of Zeolite Materials”, Edited. by H. Robson, **2001**, Elsevier Sci. B.V. pp.

7) S. E. Ashbrook, J. McManus, M.J. Thrippleton, S. Wimperis *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, **2009**, *55*, 160-181.

8) A. J. Vega, *J. Magn. Reson.* **1992**, *96*, 50-68; S. Hayashi, and K. Hayamizu, *Solid-state NMR*, **1994**, *3*, 93-101.

9) E. R. H. van Eck and M. E. Smith, *J. Chem Phys,* **1998**, *108*, 5907-5912.

L1-7

CP-VC: a simple and robust method to analyze in details the dynamics of materials and biological molecules.

O. Lafon,[1] J. Trébosc,[1] F. Pourpoint,[1] P. Paluch,[2] M. Potrzebowski,[2] T. Polenova,[3] A. Vega,[3] Y. Nishiyama,[4] M. Malon,[4] JP. Amoureux (慕松公柏)[1,5]

[1] *Lille-France, UCCS.*

[2] *Lodz-Poland, CMMS.*

[3] *Delaware-USA,*

[4] *Tokyo-Japan, Jeol Res.*

[5] *Shanghai-China, ECNU.*

Recently, we have shown that the 2D CP-VC method (Cross-Polarization with Variable Contact time) allows at ultra-fast MAS, ≥ 60 kHz, to measure accurately CH and NH distances in biomolecules; which allows analyzing under high resolution dynamics of materials and biological molecules.[1] In the indirect dimension, one observes the dipolar spectrum and in the second dimension the high resolution ^{13}C or ^{15}N spectrum. This leads to the fact that CP-VC is very robust with respect to rf inhomogeneity, isotropic chemical shifts, offsets, CSA, and mismatch with respect to the Hartmann-Hahn condition.[2] The dipolar scaling factor is at the maximum value of $1/\sqrt{2}$, and the dipolar resolution is therefore so good that CP-VC allows discerning: (i) C or N atoms that bonded to one or two H atoms (Fig.1), and (ii) even hydrogen bindings (Fig.2).

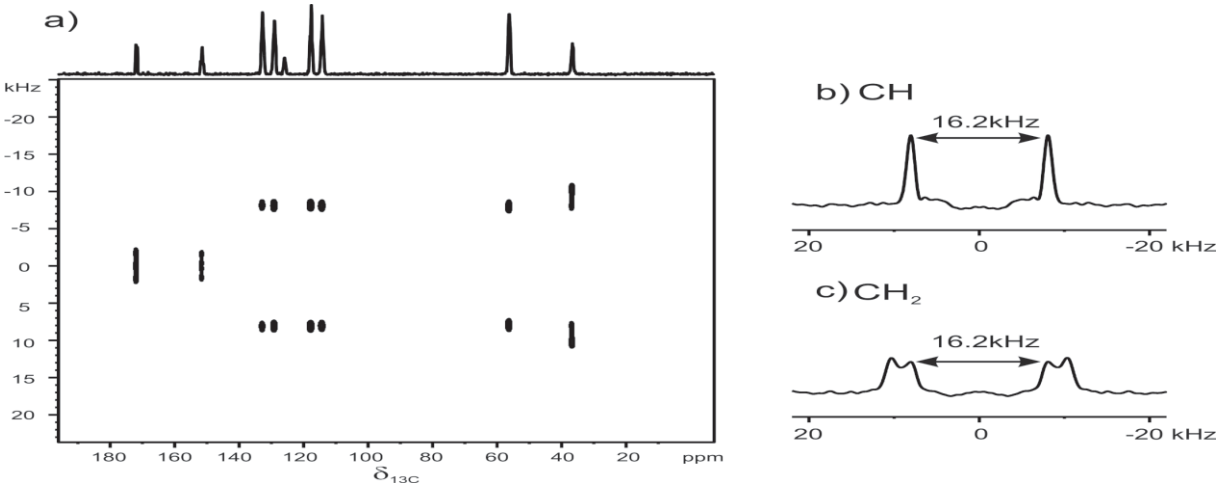


Fig.1. CP-VC of U-^{13}C tyrosine with ν_R = 60 kHz, ν_{1H} = 100 kHz, ν_{13C} = 160 kHz.

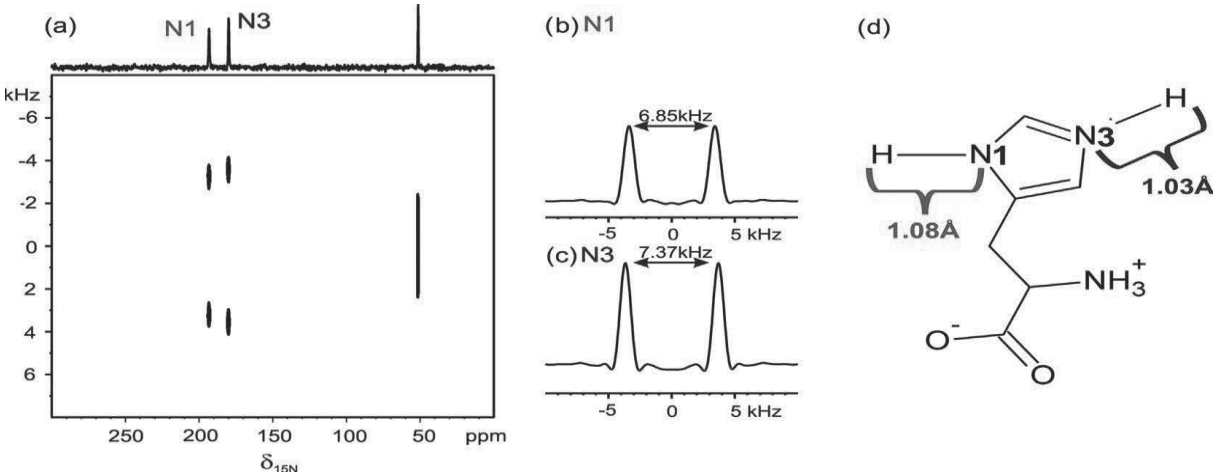


Fig.2. CP-VC of U-^{15}N histidine with ν_R = 60 kHz, ν_{1H} = 50 kHz, ν_{15N} = 110 kHz.

We have recently improved the sensitivity of CP-VC by combining it with an indirect ^{1}H detection. This new method allows gaining with small molecules (for ^{1}H resolution) a factor of 7 or 36 in time, with respect to ^{13}C or ^{15}N detection, which is mandatory when using non enriched samples (Fig.3).[3]

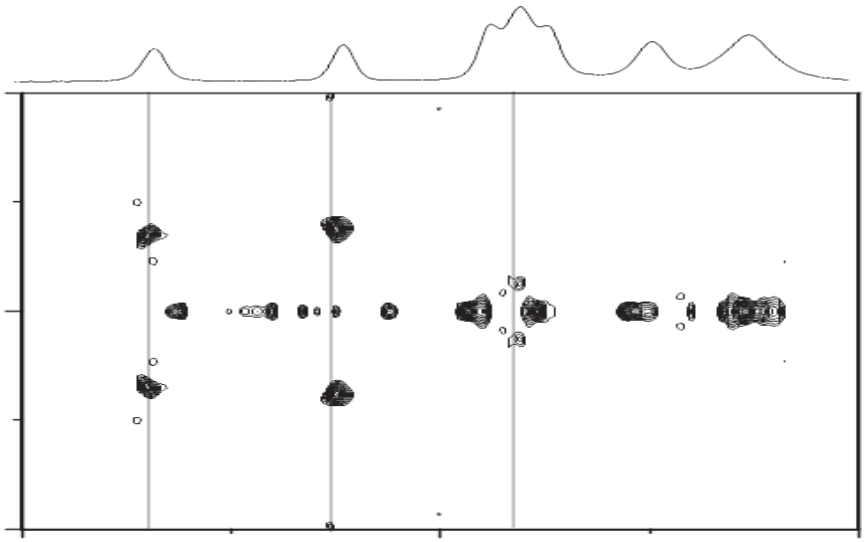
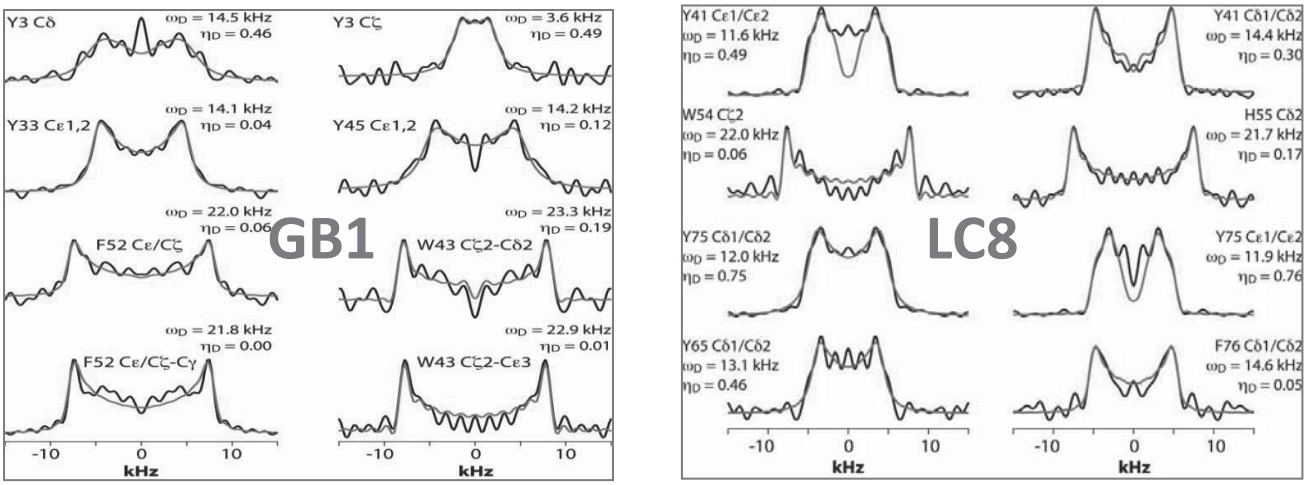


Fig.3. CP-VC of NA-^{15}N histidine with ν_R = 60 kHz, ν_{1H} = 50 kHz, ν_{15N} = 110 kHz.

However, the most interesting application of CP-VC is that with proteins. We have proposed two new 3D methods (^{13}C, ^{13}C, dipolar ^{13}C-^{1}H or ^{15}N, ^{15}N, dipolar ^{15}N-^{1}H) that we have applied to GB1 and DLC8 proteins. One method uses short C-C distances (fp-RFDR) and the other long C-C distances (SHANGHAI+). These 3D methods allow determining the short and long range structure so that the detailed analysis of local dynamics by fitting the dipolar line-shapes with simplified model (Fig.4).[4]



1) Paluch, Pawlak, Amoureux, Potrzebowski, *JMR*, 233 (**2013**) 56-63.
2) Paluch, Trébosc, Nishiyama, Potrzebowski, Malon, Amoureux, *JMR*, 252 (**2015**) 67-77.
3) Nishiyama, Pawlak, Potrzebowski, Malon, Amoureux, *SSNMR*, on the web.
4) Paluch, Pawlak, Jeziorna, Trébosc, Hou, Vega, Amoureux, Dracinsky, Polenova, Potrzebowski, *PCCP*, web

Solid-state NMR; Dynamics in proteins; Unlabeled samples.

L1-8

安定同位体標識率等の事前知識を活用するNMRスペクトル解析法

○葛西卓磨[1]，永田賢二[2]，岡田真人[2]，木川隆則[1,3]
[1]理化学研究所 生命システム研究センター 生体分子構造動態研究チーム
[2]東京大学 大学院新領域創成科学研究科 複雑理工学専攻
[3]東京工業大学 大学院総合理工学研究科 知能システム科学専攻

NMR spectral analysis using prior knowledge such as stable isotope labeling ratios

○Takuma Kasai[1], Kenji Nagata[2], Masato Okada[2], and Takanori Kigawa[1,3]
[1]*Laboratory for Biomolecular Structure and Dynamics, Cell Dynamics Research Core, RIKEN Quantitative Biology Center.*
[2]*Department of Complexity Science and Engineering, Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo.*
[3]*Department of Computational Intelligence and Systems Science, Interdisciplinary Graduate School of Science and Engineering, Tokyo Institute of Technology.*

Amino-acid selective stable isotope labeling (AASIL) is a useful method for main-chain signal assignment of proteins in challenging conditions, such as high molecular weight, limited solubility of the targets and/or in-cell NMR. However, a simple AASIL method requires many kinds of labeled protein samples. We developed Stable Isotope Encoding (SiCode) strategy to reduce the required number of selectively labeled samples by considering AASIL as an “encoding-and-decoding” process. The decoding process of SiCode includes fitting signals to Gaussian functions to obtain precise intensities of signals and to resolve overlapped signals. We improved reliability of decoding of overlapped signals and/or in low signal-to-noise conditions using prior knowledge such as predefined isotope-labeling ratios and amino-acid composition of the target protein, by incorporating replica exchange Monte Carlo method.

＜背景＞

NMRにより高分子量あるいは低溶解度のタンパク質を解析する場合や、in-cell NMRなど困難な環境下で測定をおこなう場合など、三重共鳴法による連鎖帰属だけでは主鎖帰属が難しい場合には、アミノ酸選択的安定同位体標識法が有用である。しかし、単純な選択標識法ではアミノ酸の数と同数の選択標識体の数が必要となり、タンパク質調製の手間・コストやNMR測定時間が大きい。そこで我々は、アミノ酸選択標識を、アミノ酸情報を安定同位体標識率に「符号化」し、NMRスペクトルから「復号」する過程であるとみなす「符号化標識法（SiCode）」を考案した[1)]。この考えに基づくと、標識体あたりに盛り込む情報量を増やすことにより必要な標識体数を削減することができる。例えば、3進数の”0”を0% ^{13}C / 50% ^{15}N、”1”を50% ^{13}C / 75% ^{15}N、”2”を100% ^{13}C / 100% ^{15}Nで表現し、3桁の3進数からなる符号語19個それぞれにアミノ酸を対応させることで、わずか3種類の標識体で19種類のアミノ酸を判別することが可能である（Fig.1）。各標識体について2種類の2次元NMRスペクトル（^{15}N-HSQCおよびHNCO）を測定し、復号の手順としてスペクトルのシグナル強度比から安定同位体標識率を逆算することで、各シグナルのアミノ酸残基（i位）およびN末端側の隣接残基（i-1位）がどのアミノ酸型に由来するかを知ることができる。

アミノ酸選択的安定同位体標識法，符号化標識法，レプリカ交換モンテカルロ法

○かさいたくま，ながたけんじ，おかだまさと，きがわたかのり

＜方法と結果＞

符号化標識法では、シグナルが重複していても複数の二次元ガウス関数に対してピークフィットをおこなうことで分離し、それぞれのシグナル強度を得て復号ができると期待される。出現する安定同位体標識率は一定の離散的な値に限られる（Fig.1）ため、ピークフィットの時点でこのような標識率に関する事前知識を用いることで、より正しく重複シグナルを分離できると期待されるが、従来用いていた単純な勾配法によるピークフィットではこのような事前知識を利用できなかった。

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

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

Fig. 1　Stable isotope labeling pattern of SiCode.

この問題の解決法として、とりうるすべてのアミノ酸の組み合わせについてピークフィットをおこなうことが考えられるが、本法はi位とi-1位双方のアミノ酸を判別することから、1シグナルあたりの考慮すべきアミノ酸の組み合わせの数は数百通りになり、N個のシグナルを分離する場合考慮すべき組み合わせの数はさらに最大でそのN乗となるため、計算量が膨大となり、現実的とは言えなかった。

そこで、レプリカ交換モンテカルロ法によりスペクトル分解をおこない、かつ、シグナル数等のモデルのいずれが正しいかを、自由エネルギーによって客観的に判定する方法[2)]を符号化標識法の復号過程に応用することとした。すなわち、シグナルの強度・位置・線幅のパラメータを、レプリカ交換モンテカルロ法で効率的に全探索し、そのサンプリング過程から算出される自由エネルギーに基づいていずれのアミノ酸であるかを判断するものである。この方法は、アミノ酸の組み合わせを含む膨大な全パラメータ空間を効率的に探索でき、局所解に陥らずに大域解に達することができるという利点もある。BMX SH2ドメインの2つのシグナル(H)N97と(Y)C83が重複した領域を解析すると、元の2つのシグナルに正しく分離された（Fig. 2a）。また、アミノ酸配列上許される4111通りのアミノ酸の組み合わせのうちもっとも自由エネルギーの低いものとして、正しい組み合わせである(H)Nおよび(Y)Cが得られた（Fig. 2b）。

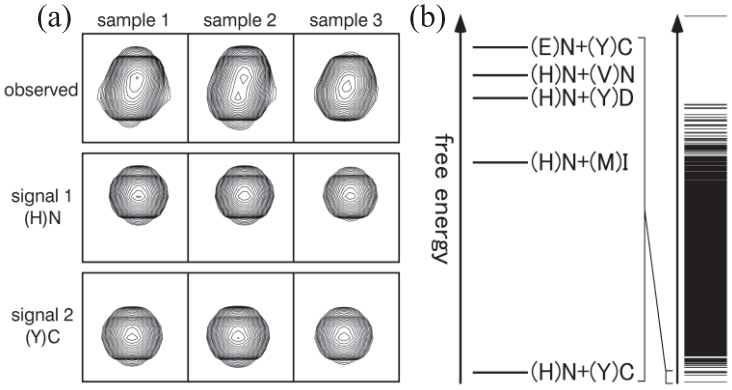


Fig. 2　Analysis of overlapped (H)N97 and (Y)C83 signals of BMX SH2 domain. (a) Observed ^{15}N-HSQC spectra (upper panel) and fitted Gaussian functions (two lower panels). (b) Amino-acid combinations with the lowest free energy are shown.

参考文献

1) Kasai, T. et al., J Biomol NMR. 2015. doi:10.1007/s10858-015-9978-8

2) Nagata, K. et al., Neural Networks. 28, 82-89, 2012. doi:10.1016/j.neunet.2011.12.001

L1-9

Scrambling-freeなアミノ酸選択的^{13}C標識法と^{13}C標識の高選択性を利用したアミノ酸選択的^{15}Nシグナル抽出法の開発

○杉木 俊彦，藤原 敏道，児嶋 長次郎
大阪大学・蛋白質研究所

Scrambling-free amino acid-selective ^{13}C labeling method and extraction of ^{15}N resonances of desired amino acid residues utilizing site-specifically incorporated ^{13}C resonances for protein NMR

○Toshihiko Sugiki, Toshimichi Fujiwara, and Chojiro Kojima
Institute for Protein Research, Osaka University, Japan.

We established a scrambling-free amino acid-selective isotope labeling method for protein NMR studies by combining low-temperature protein expression system utilizing cold-shock promoter of *Escherichia coli* and high-cell density fermentation techniques. Together with the validation of the cultivation protocol, we comprehensively investigated isotope scrambling profiles. It provided us important insight that almost ^{13}C atoms of amino acids, not only the carbonyl group but also C$^{\alpha}$ and side chain carbons, have remarkably less scrambling-prone characters even if ^{15}N of corresponding amino acids is prone to scrambling. Furthermore, utilizing the high selectivity of ^{13}C incorporation into desired amino acid residues, we also established NMR measurement technique to extract ^{1}H-^{15}N resonances of target amino acid residues from ocean of severely scrambled ^{1}H-^{15}N signals.

【序論】

アミノ酸選択的安定同位体標識法は, NMRシグナルの帰属の目的だけでなく，高分子量蛋白質や膜貫通型蛋白質等の高難度蛋白質の立体構造もしくは分子間相互作用の局所的NMR観測においても有用な戦略である．安定同位体標識した目的アミノ酸を培地に添加して大腸菌などの宿主細胞を培養し，目的蛋白質を過剰発現させる手順が最も一般的であり汎用性が高いが，広く直面する困難さとして,宿主細胞によって代謝されることによる安定同位体元素の希釈（目的部位への標識効率の低下）や、目的以外のアミノ酸残基が無視できないレベルで標識されてしまう事（isotope scrambling）が挙げられる．培養時間が長いほどその影響を大きく受けるが，目的蛋白質が中～低温培養でのみ発現し，長時間培養せざるを得ない場合では特に研究の障壁となりうる．

我々は, 15 ℃程度の低温条件下でのみ活性が増強されるcold-shock promoterを目的蛋白質の発現誘導に利用し，それにより大腸菌宿主細胞のバックグラウンド（目的蛋白質以外）の転写翻訳や代謝が顕著に抑制される特徴を持つ“pColdベクター発現系”に着目し，これを利用すれば低温での長時間培養でもisotope scramblingが軽減されるのではと考え，それを可能にする培養法の確立を試みた． またその培養法の検証として，目的アミノ酸の^{15}Nおよび^{13}C（カルボニル炭素を除く全炭素原子）の標識効率とscramblingについて定量的な追跡調査を行った． さらに，その調査結果明らかになった“^{15}Nに比べて^{13}Cのほうが総じてscramblingが弱く,高効率でアミノ酸選択的標識が可能である”という特徴を応用して, scramblingが激しく目的アミノ酸の帰属が困難な^{1}H-^{15}N相関シグナルの中から目的アミノ酸由来のシグナルのみを選択的に検出する測定法の開発を試みた．

Amino acid-selective isotope labeling, pCold vector, High-cell density fermentation

○すぎき としひこ，ふじわら としみち，こじま ちょうじろう

【方法】

pCold1/GB1で大腸菌BL21(DE3)Rosettaを形質転換し, LB培地での数回の中間培養を経て, 菌体を500 mLのM9培地（^{13}C,^{15}N標識された目的アミノ酸を含む）にて懸濁し, ジャーファーメンターを用いた菌体高密度培養により, 7種のアミノ酸（Ile, Leu, Val, Ala, Thr, Tyr, Phe）選択的^{13}C,^{15}N標識GB1蛋白質を大量発現させた. 具体的な培養手順は本討論会にて発表する. 菌体破砕の後Ni-NTAカラムおよびゲル濾過カラムクロマトグラフィーによりGB1蛋白質を高純度に精製し, 1mMに濃縮した試料でNMR測定を行った. NMRスペクトルの測定にはnon-cryogenic TCI probeを装備したAVANCE III 600MHz（BRUKER社）を用い, その解析はNMRPipeとSparkyで行った.

【結果】

培養手順の最適化検討の結果, pColdベクター発現系と高密度培養法を組み合わせた方法により, 長時間の培養でも十分高い効率でアミノ酸選択的安定同位体標識を可能にする培養法を構築することができた.

^{1}H-^{15}Nおよび^{1}H-^{13}C相関シグナルの強度の定量により,^{15}Nおよび全ての^{13}C（scrambling様式が既知であるカルボニル炭素を除く）のアミノ酸選択的標識効率を調べた. その結果, ^{15}Nに比べて^{13}Cは総じて標識効率が高くscramblingしにくい特徴をもつことが明らかとなった. Fig. 1にはLeuの例を示すが, 検討した7種全てのアミノ酸で同様の傾向が認められた.

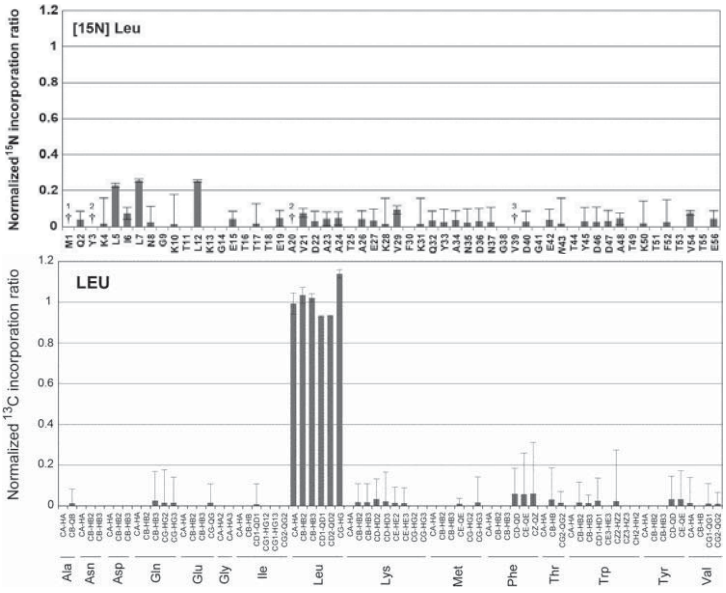


Fig. 1 Efficiency of amino acid-selective ^{15}N and ^{13}C incorporation (Leu).

そこで次に,^{13}Cのアミノ酸選択的標識効率の高さを利用して, 目的アミノ酸の^{15}Nを選択的に抽出する事を試みた. その結果, ^{13}C-edited ^{1}H-^{15}N相関シグナルを観測することにより, scramblingした^{1}H-^{15}N相関シグナルが混在する中から目的アミノ酸由来のシグナルのみを抽出することができた（Fig. 2）. またこの測定方法は, ^{1}H^{N}-^{15}N-^{13}Cの三重共鳴を利用する一般的な方法にくらべて磁化移動のステップが少なく, 感度が30%高いことを見出した（Fig. 2）.

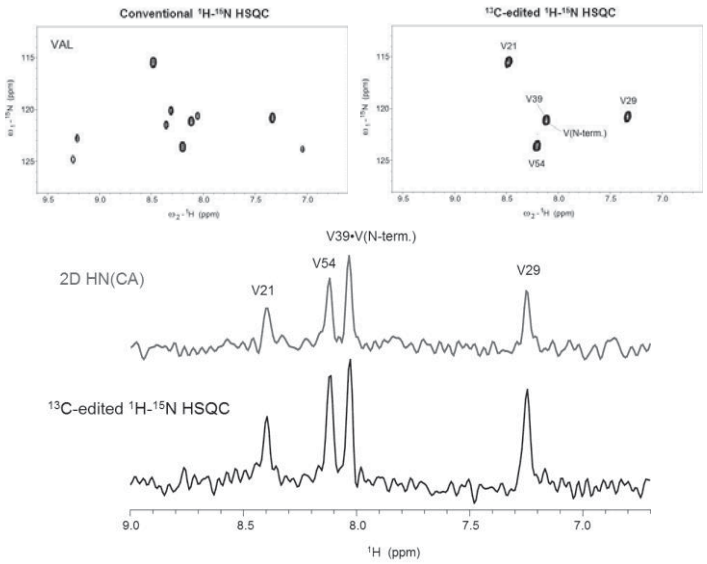


Fig. 2 Filtration of ^{15}N resonances of desired amino acid residues by performing ^{13}C-edited ^{1}H-^{15}N HSQC (Val).

【考察】

本研究で示したアミノ酸選択的安定同位体標識法・測定法, および^{15}N,^{13}C全原子のscrambling様式の知見は, 中～低温培養でのみ発現する高難度蛋白質のNMR測定へ向けたbreakthroughへ繋がるだけでなく, 今後の部位選択的安定同位体標識法の開発に向けても貴重な知見であると考える.

L1-10

NMRデータ解析法の改良による効率的な細胞内蛋白質構造決定

○池谷 鉄兵[1,2]，花島 知美[1]，細谷 沙織[1]，嶋崎 真那人[1]，池田 思朗[3]，三島 正規[1,2]，Peter Güntert[1,2,4]，伊藤 隆[1,2]
[1]首都大学東京・理工学研究科
[2]CREST/JST
[3]統計数理研究所
[4]Institute of Biophysical Chemistry, Goethe University Frankfurt, Germany

An efficient and robust method for in-cell protein structure determination by improved NMR data analysis

○Teppei Ikeya[1,2], Tomomi Hanashima[1], Saori Hosoya[1], Manato Shimazaki[1], Shiro Ikeda[3], Masaki Mishima[1,2], Peter Güntert[1,2,4], and Yutaka Ito[1,2]
[1]Graduate school of Science and Engineering, Tokyo Metropolitan University, Japan.
[2]CREST/Japan Science and Technology Agency, Japan.
[3]The Institute of Statistical Mathematics
[4]Institute of Biophysical Chemistry, Goethe University Frankfurt, Germany

In-cell NMR is a unique tool to elucidate the three-dimensional structure of proteins in living cells. While we demonstrated the first de-novo protein structure determination by in-cell NMR, this was not yet a universal approach applying to various proteins. Here we demonstrated the second 3D structure of protein inside cells, for which the target protein, the B1 domain of protein G was expressed with ten times lower concentration in E.coli cells, ~250 μM. Whereas it can approach structure analysis in more physiologically natural environment, the conventional methods could not achieve objective interpretation of the data and accurate structure determinations due to extremely low sensitivity and resolution of those spectra. Advances in NMR data processing, automatic chemical shift assignment, and structure refinement with Bayesian inference allowed us to extensively analyse in-cell experimental data and determine accurate structures of GB1, and in addition to ameliorate those of TTHA1718 previously reported.

序論

In-cell NMRは，生きた細胞内での蛋白質の構造情報を得ることのできる唯一の手法である．我々は，この手法を用いて2009年に初めてde-novoでの細胞内蛋白質の立体構造決定に成功した[1,2]．一方で，この際のモデル試料として用いたTTHA1718蛋白質に続く新たな構造決定は未だ報告されておらず，これはin-cell NMRによる構造決定が，まだ様々な蛋白質に応用可能な汎用技術となっていないためと考えられる．また，解析には細胞内での試料濃度を3-4mMの高濃度にする必要があったため，生理的細胞環境とは大きく異なる点も問題であった．ここでは，新たなモデル試料として GB1蛋白質を用いて，より生理環境に近い低い蛋白質濃度（250 μM程度）での立体構造決定を試みた．細胞内蛋白質構造決定を，低濃度で，かつより多くの試料に適用可能な汎用的手法に拡張するため，いくつかの新たなNMR測定に加え，新たに1) NMRデータ処理，2) 化学シフト自動解析[3]，3) ベイズ推定を用いた構造最適化，の新手法を開発し，in-cell NMRデータに応用した．

In-cell NMR, 蛋白質立体構造計算, NMRデータ処理

○いけやてっぺい，はなしまともみ，ほそやさおり，しまざきまなと，いけだしろう，みしままさき，ぎゅんたーとぺーたー，いとうゆたか

方法

GB1の大腸菌内大量発現系を用いて細胞内試料を調製し，22℃でNMR測定を行った．蛋白質主鎖及び側鎖由来のNMRシグナルの帰属には$^{13}C/^{15}N$均一標識した細胞内試料について12種類の3重共鳴3Dスペクトル測定を行い，NOE由来の距離情報の収集は^{13}C, ^{15}N, $^{13}C/^{13}C$-separated NOESYと，メチル基選択$^{1}H/^{13}C$試料を用いた$^{13}C/^{13}C$-separated NOESYを測定した．また，大腸菌のNMR試料管内の寿命6時間で測定するために，すべての3D スペクトルは，非線形サンプリング(NLS) によりデータをスパースに収集し，Quantitative Maximum Entropy (QME)によりスペクトルの再構成を行った．主鎖および一部の側鎖の化学シフト帰属は，CCPN Analysisにより手動で解析した．手動解析により帰属できなかった側鎖共鳴シグナルは，CYANAに実装されているFLYAアルゴリズムを用いた自動解析により帰属した．最終構造決定は，CYANAを用いた従来の構造計算で全体構造を決定した後，新たに開発したベイズ推定を用いた手法により構造の最適化を行った．同様の解析手法は，TTHA1718のin-cell NMRデータにも適用し，手法の汎用性について検証した．

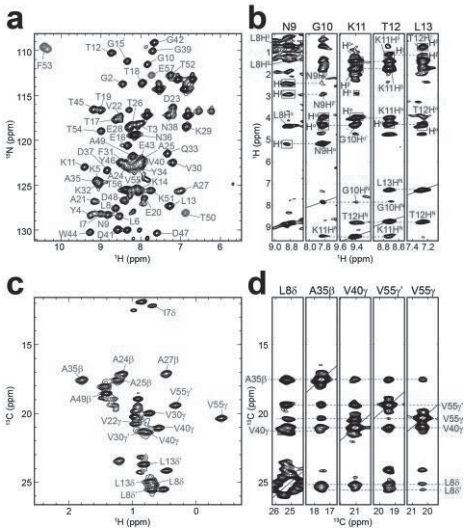


Fig.1 Collection of nuclear Overhauser effect-derived distance restraints in GB1 in living E. coli cells.

結果

QMEを用いることにより，従来のAzaraプログラムによるMaximum Entropyと比較して，かなり多くの追加の信号を得ることに成功した (Fig. 2)．側鎖由来の信号は，通常の三重共鳴スペクトルでは, 細胞内試料の早いT2緩和のために十分な信号が得られなかったが，NOESYスペクトルからは側鎖由来と推定された信号が多く観測されたため，FLYAによりNOESYを解析の軸にした自動帰属を行った．自動帰属により48 ^{1}H, 1 ^{15}N, and 48 ^{13}C 共鳴シグナルの新たな帰属に成功した．立体構造解析は，CYANAの自動NOE解析と構造計算により全体構造を得た後，ベイズ推定を用いた計算により構造の最適化を行った．レプリカ交換モンテカルロ法により得られた多数の構造を，主成分分析によりクラスタリングを行い，最終的に1416個のアンサンブルを最終構造とした．このアンサンブルの平均構造は，*in vitro*構造との主鎖RMSDが1.17 Åであり，*in vitro*とかなり類似した構造の決定に成功した．

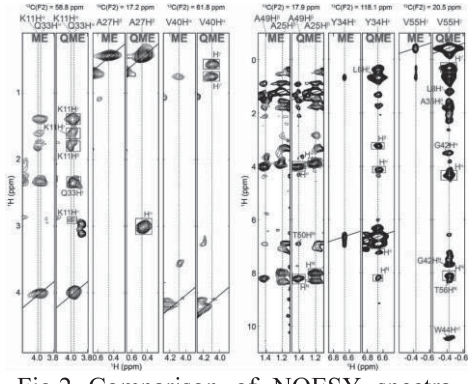


Fig.2 Comparison of NOESY spectra processed by Azara MaxEnt (ME) and QME.

本手法を，TTHA1718のin-cellデータにも適用したところ，手動解析により加えられた水素結合情報を用いることなく，従来よりも高精度の構造決定を達成した．

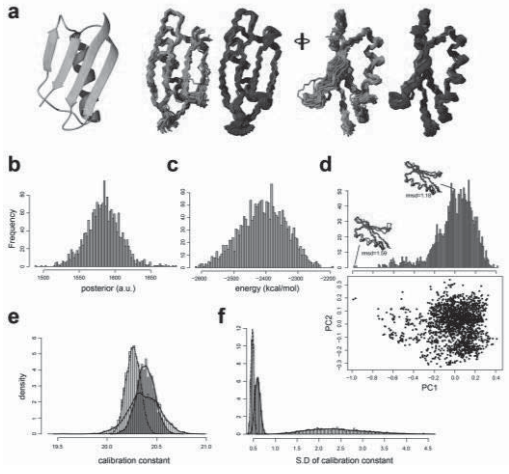


Fig.3 Structure optimization based on Bayesian inference.

参考文献

(1) Sakakibara D., et.al, *Nature* 458, 102-105 (2009), (2) Ikeya T., et al, *Nature Protocols* 5, 1051–1060 (2010), (3) Ikeya, T., et al., *J. Biomol. NMR* 50, 137-146 (2011)

L1-11

NMR と因子分析による酵素阻害活性の効果的評価法

○山崎 和彦[1]、谷 修[1]、立石 幸寛[2]、田辺 英紀[2]、生田目 一寿[2]、新美 達也[2]、古川 功治[1]、阪下 日登志[1]
[1]産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門
[2]アステラス製薬株式会社・創薬化学研究所

Efficient evaluation of inhibitors for enzyme by NMR and factor analysis

○Kazuhiko Yamasaki[1], Osamu Tani[1], Yukihiro Tateishi[2], Eiki Tanabe[2], Ichiji Namatame[2], Tatsuya Niimi[2], Koji Furukawa[1], and Hitoshi Sakashita[1]
[1]*Biomedical Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Japan.*
[2]*Drug Discovery Research, Astellas Pharma Inc., Japan.*

Although NMR in fragment-based drug discovery is utilized almost exclusively to evaluate physical binding between molecules, it should be also powerful in biochemical assay, evaluating inhibitory effect of compounds on enzymatic activity. Inhibitor concentration-dependent spectral change in constant-time reaction was processed by factor analysis, by which IC_{50} value was obtained. We applied this method successfully to spermidine synthase of *Trypanosoma cruzi*, which causes Chagas disease.

【序論】Fragment-based drug discovery (FBDD)は、低分子化合物（分子量およそ300以下）のライブラリーをベースとして、標的タンパク質に対する阻害剤化合物を探索するスキームとして実践されている(文献1)。標的タンパク質・化合物複合体の立体構造決定によって結合の状態を精査し、論理的デザインによる最適化を経て、リード化合物の創出につながる。この時、化合物ライブラリーから、標的タンパク質（主として酵素）の活性ポケットに結合するものを選別する過程が最初の重要なステップとなる。ここでは、タンパク質と化合物の物理的な結合や酵素活性の阻害能など、異なる指標に基づいてスクリーニングすることにより、偽陽性などアーティファクトを最小化することが望ましい。NMRは、FBDDにおいては、saturation transfer difference (STD)法(文献2)に代表されるようなタンパク質と化合物の物理的結合を評価する解析に用いられているが、もちろん、これだけでは、活性ポケット以外への結合などの偽陽性が無視出来ない。本研究では、NMRにより酵素阻害活性の評価を効果的・効率的に行う方法を開発し、FBDDにおける化合物スクリーニングに活用することを目指した。基本的には、反応による基質や生成物のNMRピークの変化により酵素活性の評価を行うが、スペクトル上のより多くの領域を一括して扱うためのアルゴリズムとして、因子分析計算を応用した。発表者らは、NMRと因子分析の組み合わせにより、タンパク質構造の時間的変化を、ベースラインの不安定性やノイズなどと分離して、効果的に解析出来ることを見いだしている（文献3）。今回、標的タンパク質として、「顧みられない熱帯病」の１つであるシャーガス病を引き起こす原虫*Trypanosoma cruzi*由来のspermidine synthase (TcSpdS)を用い、阻害剤*trans*-4-methylcyclohexylamine (4MCHA)による効果を評価した。

【方法】TcSpdSは、大腸菌の系を用いて組換えタンパク質として発現させ、調製した。50 μM

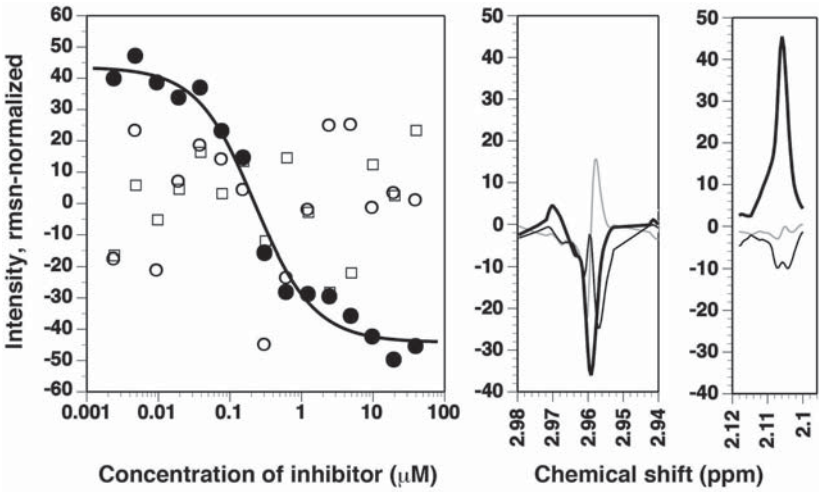
酵素阻害活性、因子分析計算、drug discovery

○やまさきかずひこ、たにおさむ、たていしゆきひろ、たなべえいき、なまためいちじ、にいみたつや、ふるかわこうじ、さかしたひとし

putrescine（基質 1）、100 μM decarboxylated *S*-adenosylmethionine（dcSAM、基質 2）、44 nM TcSpdS、0–40 μM 4MCHA、5% DMSO-d6、100 μM DSS を 100 μL の 100 mM リン酸緩衝液(pH 7.0)に溶解し、96 穴の PCR 用プレート中で、thermal cycler により 25 °C 1 時間の反応と熱処理による反応停止を行った。400 μL の重水を加えた試料を SampleJet（Bruker）用カートリッジに格納し、Avance III 500 分光計（Bruker）を用いて、通常の ^{1}H NMR の連続自動測定を行った。異なる阻害剤濃度での NMR スペクトルをデータマトリックス **D** としてまとめ、mean centering 後、共分散行列 $\mathbf{Z}=\mathbf{D}^T\ \mathbf{D}$（$\mathbf{D}^T$ は **D** の転置行列）に対して固有値解析を行い、複数の因子に対する score vector（濃度依存性に相当）と loading vector（スペクトルに相当）を得た（数理の詳細は文献 4 参照）。最大固有値を持つ第 1 因子の score vector に対して、式

$$V = \frac{V_0}{1+\frac{[I]}{IC_{50}}}$$

（文献5より）に基づくデータフィッティングを行った。ここで、Vは阻害剤存在下での反応速度、V_0は阻害剤非存在下での反応速度、$[I]$は阻害剤濃度、IC_{50}は速度が半分に阻害される濃度である。



panels) after principal factor analysis. Those for the first (closed circles in the left panel or thick lines in the right panels), second (open circles or thinner black lines), and third (open squares or thin gray lines) factors ordered by eigenvalues are shown. By data fitting of the score vector for the first factor, an IC_{50} value of 0.1 μM was obtained. For the loading vectors, the middle and right panels include peaks originating from dcSAM (substrate) and methylthioadenosine (product), respectively.

【結果および考察】因子分析計算によって得られた因子のうち、第 1 因子のscore vectorのみ顕著な阻害剤濃度依存性を示した（Fig. 1）。上述の式に基づくデータフィッティングにより、0.1 μMのIC_{50}値を得た。loading vectorから、この因子は、基質の減少と生成物の増加に由来し、酵素反応の進行を反映していることが判る。一方、第２、第３因子は、ピーク位置あるいはphaseの不安定性に由来すると推察される。

NMRと因子分析により、酵素阻害活性の評価を効果的に行うことができた。特に、96穴plateとPCR用thermal cyclerを用いた処理や、自動連続NMR測定により、多数の試料を一括して扱えるため、FBDDにおける大規模な化合物評価に活用することが可能と考えられる。本発表においては、熱帯病治療薬創出のための取り組みとして、多数の化合物を評価した結果についても紹介したい。

【引用文献】

1) Erlanson, D. A., *J. Med. Chem.* **47**, 3463–3482, 2004.
2) Mayer, M., and Meyer, B., *J. Am. Chem. Soc*. **123**, 6108–6117, 2001.
3) Yamasaki, K. *et al*., *Anal. Chem.* **85**, 9439–9443, 2013.
4) Malinowski, E. R. *Factor Analysis in Chemistry 3rd ed.*, Wiley, 2002.
5) Cheng, Y., and Prusoff, W. H., *Biochem. Phamacol*. **22**, 3099–3108, 1973.

第二日目
11月7日（土）
英語セッション

Day 2 (Nov. 7, Sat)
(English Sessions)

L2-1

クロマチン構造変換因子FACTの天然変性領域に対するリン酸化による超応答機能制御機構

青木大将[1]，上脇隼一[2]，栃尾尚哉[2]，粟津暁紀[1,2]，○楯　真一[1,2]
[1]広島大学・理学部・数理分子
[2]広島大学・クロマチン動態数理研究拠点

Ultra-sensitive response of FACT, a chromatin remodeling factor, mediated by multiple-phosphorylation to the intrinsically disordered region (IDR)

Daisuke Aoki[1], Jun-ichi Uewaki[2], Naoya Tochio[2], Akinori Awazu[1,2], and Shin-ichi Tate[1,2]
[1]*Dept. Mathematical and Life Sciences, Hiroshima University*
[2]*RcMcD, Hiroshima University*.

Ultra-sensitive response of the nucleosome binding ability of FACT, a chromatin remodeling factor, was focused. FACT binding to nucleosome changes according to the extent of phosphorylation to the intrinsically disordered region (IDR) that includes multiple-phosphorylation sites in its DNA binding domain (DBD). The phosphorylation-dependent change, showing a sigmoidal response, is referred to as 'ultra-sensitivity'. We uncovered the hinge-bending motion of two IDRs within the FACT DBD explains the ultra-sensitivity. The results sheds light on the novel functional significance ascribed to the IDRs subjected to the multiple-phosphorylation.

Intrinsically disordered proteins (IDPs) and intrinssically diordered region (IDRs) in proteins have become central focus in protein science.[1] Since the finding that about 50% proteins in mammalian cell are IDP or IDR, a variety of functions specifically associated with the IDPs and IDRs have been explored.[2] The remarkable properties of the IDP and IDR are conceptualized as follows, for examples: mutual folding that allows the IDP for working as a hub in the protein-protein interaction network[3], fly casting to efficiently sense the target by using the extended segment[4], fuzzy-complex that describes the IDP-protein interaction stays in a multiple states, not in a single defined complex structure[5], and ultra-sensitivity that enables sigmoildal resoponse in the garget binding by the use of multiple-phosphorylation to the IDR.[6]

The ultra-sensitivity is of the primal interest in considering of the noise torelance in the functional regulation mediated by the protein-protein interaction inside cells, where the numbers of the engaged protein should vary and the interactions are to be disturbed accordingly. One of the well characterized examples to demostrate the ultra-sensitivity is found in the interaction between the Sic1 – Cdc4, where the binding ability of Sic1 to Cdc4 shows signmoidal chagne: Sic having over six phosphorylation sites can bind to Cdc4, while the Sic1 less phosphorylated does not have significant binding.[6, 7]

Intrinsically disordered protein, segmental isotope labeling, coarse grained model

あおきたいすけ，うえわきじゅんいち，とちおなおや，あわずあきのり，○たてしんいち

We have reported the IDR in FACT (Facilitates Chromatin Transcription), a chromatin remodeling factor, has ten phosphorylation sites and the expressed FACT in cell are fully phosphorylated.[8] The fully phosphorylated form of FACT loses the binding ability to nucleosome.[8] The FACT binding ability was is recovered by reducing the extent of phosphorylation, and the binding ability recovery profile showed sigmoidal, thus ultra-sensitive, response.[9] The two parts of the IDRs in FACT are engaged in the ultra-sensitive response.[9]

In this work, we will show the molecular mechanism for the ultra-sensitive response of the FACT nucleosome binding ability according to the phosphorylation to the IDRs within the protein. In the analyses, we used various NMR experiments, which include segmental labeling, spin relaxation analyses, and structure population predicts, in addition to the FRET and biochemical analyses.

Based on the above data, we succeeded at reproducing the ultra-sensitive response for the nucleosome binding ability of FACT by using the molecular dynamics simulation using the coarse-grained model. The results clearly elaborated how the ultra-sensitivity can be achieved through the intra-molecular IDR-IDR interaction in FACT.

REFERENCE

(1) Dunker, A. K. (1998) Protein disorder and the evolution of molecular recognition: theory, predictions and observations, *Pac. Symp. Biocomput. 3*, 473-484.

(2) Oldfield, C. J., and Dunker, A. K. (2014) Intrinsically Disordered Proteins and Intrinsically Disordered Protein Regions, *Annual Review of Biochemistry 83*, 553-584.

(3) Dyson, H. J., and Wright, P. E. (2002) Coupling of folding and binding for unstructured proteins, *Curr. Opin. Struct. Biol. 12*, 54-60.

(4) Shoemaker, B. A., Portman, J. J., and Wolynes, P. G. (2000) Speeding molecular recognition by using the folding funnel: the fly-casting mechanism, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97*, 8868-8873.

(5) Tompa, P., and Fuxreiter, M. (2008) Fuzzy complexes: polymorphism and structural disorder in protein-protein interactions, *Trends Biochem. Sci. 33*, 2-8.

(6) Mittag, T., Marsh, J., Grishaev, A., Orlicky, S., Lin, H., Sicheri, F., Tyers, M., and Forman-Kay, J. D. (2010) Structure/function implications in a dynamic complex of the intrinsically disordered Sic1 with the Cdc4 subunit of an SCF ubiquitin ligase, *Structure 18*, 494-506.

(7) Borg, M., Mittag, T., Pawson, T., Tyers, M., Forman-Kay, J. D., and Chan, H. S. (2007) Polyelectrostatic interactions of disordered ligands suggest a physical basis for ultrasensitivity, *Proc Natl Acad Sci U S A 104*, 9650-9655.

(8) Tsunaka, Y., Toga, J., Yamaguchi, H., Tate, S., Hirose, S., and Morikawa, K. (2009) Phosphorylated intrinsically disordered region of FACT masks its nucleosomal DNA binding elements, *J Biol Chem 284*, 24610-24621.

(9) Hashimoto, M., Kodera, N., Tsunaka, Y., Oda, M., Tanimoto, M., Ando, T., Morikawa, K., and Tate, S.-i. (2013) Phosphorylation-Coupled Intramolecular Dynamics of Unstructured Regions in Chromatin Remodeler FACT, *Biophysical Journal 104*, 2222-2234.

L2-2

高分解能、高感度な^{15}N窒素核観測を可能にする高磁場TROSY測定

○竹内　恒[1,2]、Haribabu Arthanari[2]、Gerhard Wagner[3]、嶋田　一夫[1,4]
[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]科学技術振興機構・さきがけ
[3]department od Biochemistry and Molecular Pharmacology,Harvard medical School, USA
[4]東京大学・大学院薬学系研究科

Nitrogen detected TROSY at high field yields high resolution and sensitivity for protein NMR

○Koh Takeuchi[1,2], Haribabu Arthanari [3], Gerhard Wagner[3], and Ichio Shimada[1,4]
[1]Molecular Profiling Research Center for Drug Discovery, National Institute for Advanced Industrial Science and Technology, Japan
[2]JST, PRESTO,
[3]Department of Biochemistry and Molecular Pharmacology, Harvard Medical School, USA
[4]Graduate Schools of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo, Japan

Detection of ^{15}N in multidimensional NMR experiments of proteins has little been used because of the presumed low sensitivity of such experiments. Here we show the importance of detecting TROSY components of proton-attached ^{15}N (TROSY $^{15}N_H$) in high-field magnets to take advantage of the slow ^{15}N transverse relaxation and to compensate for the low ^{15}N sensitivity. Theoretical simulations predict that the narrowest line width for TROSY $^{15}N_H$ is obtained at 900 MHz and the sensitivity reaches its maximum around 1.2 GHz. By using TROSY $^{15}N_H$, ^{15}N-detected ^{1}H-^{15}N TROSY-HSQC spectrum can be obtained in 2 hr for 1 mM protein with 40 ns rotational correlation time. Deuteration is not mandatory to benefit ^{15}N-detected TROSY, which facilitates studies of proteins that cannot be deuterated and detections of non-exchangeable amide protons in protein core. These results illustrate the potential of ^{15}N-detected TROSY as a means to exploit the high resolution offered by high field magnets near and above 1 GHz.

Introduction:

Heteronuclear NMR experiments that use nuclei with low gyromagnetic ratio (γ) for detection and benefit from the slower relaxation properties of those nuclei have recently been proposed to expand the utility of NMR in structural and functional studies of macromolecules. Especially, ^{15}N has the lowest γ within NMR active nuclei found in proteins and is expected to yield the narrowest NMR resonances.

Previously, ^{2}H-attached amide ^{15}N ($^{15}N_D$) has been used in ^{15}N-detection experiments of proteins based on the perception of the general line-narrowing effect of deuteration. Here, we present that the TROSY component of ^{1}H-attached amide ^{15}N (TROSY $^{15}N_H$) should be observed to maximize the benefit of the ^{15}N-detection experiments, both in terms of resolution and sensitivity, in high-field magnets >600 MHz.

Results

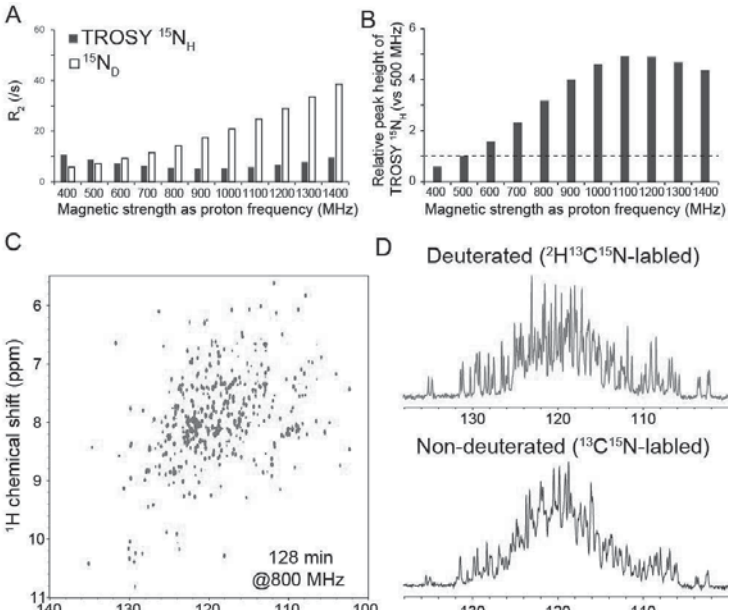
Panel A shows the expected transverse relaxation rate (R_2) for TROSY $^{15}N_H$ (gray) and deuterium-attached

Protein, ^{15}N-detection, TROSY

○たけうちこう，はりばぶあるせなり，げるはるとわぐなー，しまだいちお

nitrogen, $^{15}N_D$, (white) of a protein at indicated magnetic strength in proton frequency. Only at lower magnetic field below 600 MHz in proton frequency, the R_2 is smaller for $^{15}N_D$; however, this is reversed at higher magnetic fields. The R_2 of TROSY $^{15}N_H$ reaches its minimum near 900 MHz (Panel A), while the peak height will be maximized around 1.2 GHz (Panel B).

In order to experimentally observe TROSY $^{15}N_H$ resonances with optimal resolution and sensitivity, a ^{15}N-detected 2D ^{1}H-^{15}N TROSY-HSQC was developed. Panel C shows that ^{15}N-detected TROSY HSQC spectrum of 1 mM β-cyclodextrin (βCD)-bound [U-$^{2}H^{13}C^{15}N$] maltose binding protein (MBP) in an 800 MHz instrument at 278 K (τc = 40 ns). The ^{15}N-detected TROSY HSQC spectra was recorded in 2 hr with a reasonable quality. All the resonances that were observed in ^{1}H-detected TROSY HSQC were observed in the ^{15}N-detected TROSY HSQC spectrum, with the exception of the arginine sidechains, which are outside the spectrum width of the direct dimension in the ^{15}N-detected spectrum.



(A) The calculated R_2 for TROSY $^{15}N_H$ (gray) and $^{15}N_D$ (white) at indicated magnetic strength. (B) Relative signal height of TROSY $^{15}N_H$ resonance at each magnetic strength relative to 500 MHz. (C) The ^{15}N-detected 2D TROSY-HSQC of βCD-bound MBP (D) Comparison of ^{15}N TROSY-HSQC in deuterated (top) and non-deuterated (bottom) conditions.

Importantly, deuteration is not mandatry for ^{15}N TROSY, since the dipole-dipole interactions from surrounding protons are negligible for ^{15}N due to its low γ. In the comparison of the first increment of ^{15}N-detected TROSY HSQC in deuterated (top) and non-deuterated (bottom) conditions (Panel D), there was only a modest loss in peak height for ^{15}N-detected TROSY-HSQC. Interestingly, some of the resonances in ^{15}N-detected TROSY-HSQC spectrum show higher signal height in non-deuterated relative to deuterated conditions, which presumably due to incomplete ^{1}H back exchange in deuterated protein.

Conclusion

Here we illustrated the importance of selecting TROSY $^{15}N_H$ in high field magnets. ^{15}N-detected TROSY-HSQC spectra of 40 ns protein were recorded at 800 MHz with reasonable amount of time (2 hr). The ^{15}N TROSY will be suitable the study of large systems, which often suffer from severe spectral overlap. In addition, unlike conventional TROSY ^{1}H detection, deuteration is not mandatory for the TROSY ^{15}N detection. Therefore, the TROSY $^{15}N_H$ detection reported here would provide a crucial improvement of macromolecular NMR at magnet field near and above 1 GHz.

Reference

Takeuchi K et al., Recent Developments in Biomolecular NMR, Chapter 2, 25-52, (2012)

L2-3

HIV-1抑制タンパク質APOBEC3Gの構造学的研究

○松尾　浩[1]，William Solomon[1], Takahide Kouno[1#], Elena Harjes[1#], Kuan-Ming Chen[1#], Megumi Shigematsu[1#], Shivender M.D Shandilya[2], Celia A. Schiffer[2].

[1] Department of Biochemistry, Molecular Biology & Biophysics, University of Minnesota

[2] Department of Biochemistry and Molecular Pharmacology. University of Massachusetts Medical School

Structural studies of HIV-1 restriction factor APOBEC3G

○Hiroshi Matsuo[1], William Solomon[1], Takahide Kouno[1#], Elena Harjes[1#], Kuan-Ming Chen[1#], Megumi Shigematsu[1#], Shivender M.D Shandilya[2], Celia A. Schiffer[2].

[1] Department of Biochemistry, Molecular Biology & Biophysics, University of Minnesota

[2] Department of Biochemistry and Molecular Pharmacology. University of Massachusetts Medical School

[#] Present addresses: Department of Biochemistry and Molecular Pharmacology. University of Massachusetts Medical School, (T. K.), Institute of Fundamental Sciences Massey University, (E. H.), The European Molecular Biology Laboratory (EMBL) Grenoble, (K-M. C.), Department of Biochemistry and Molecular Biology, Thomas Jefferson University, (M. S.).

The human APOBEC3G (A3G) DNA cytosine deaminase mutates genomes of DNA-based parasites including HIV-1, and restricts infection. The HIV-1 viral infectivity factor (Vif) prevents restriction by triggering A3G degradation by proteasome. Structures of A3G catalytic and Vif-binding domains, and DNA- and Vif-binding mechanisms will be discussed.

序論

Human APOBEC3G (A3G) is capable of altering the HIV genome to genetically inactivate it by deaminating cDNA cytosines to uracils[1]. As a counter-defense mechanism, HIV promotes the ubiquitin-mediated protein degradation of A3G, an event trigged by A3G interaction with the HIV virion infectivity factor (Vif) protein. A major objective of my laboratory is to achieve an atomic level understanding of the DNA cytosine deaminase activity of A3G and of the A3G-Vif interaction.

結果と考察

A3G catalytic domain (CTD) and its interactions with DNA (*Chen et al. Nature 2008, Harjes et al. JMB 2009*)　A3G has two conserved zinc-binding deaminase domains, but only the carboxy-terminal one is catalytically active (A3G-CTD). This protein had resisted structural studies, with a reputation of being intractable due to solubility issues. We developed a strategy in which a functional readout was used to monitor protein activity as we introduced solubility-enhancing changes. Ultimately, we were able to determine the A3G-CTD structure first by NMR and later by X-ray crystallography (**Fig 1a**)[2]. Our NMR structure provided first atomic-level insights into the catalytic mechanism of this enzyme family. In addition, we generated a structural model of the A3G-CTD/ssDNA complex by integrating NMR results with a new computational method developed by Dr. Amr Fahmy at Harvard Medical School (**Fig 1b**)[2]. This collaborative effort led to the prediction of essential interactions between A3G-CTD and ssDNA, and highlighted four arginines surrounding the A3G catalytic site as critical for complex formation.

HIV-1 restriction factor, ssDNA cytosine deaminase, HIV-1 Vif interaction

○まつおひろし，ういりあむそろもん，こうのたかひで、えれーなはーじぇす、かんみんちぇん、しげまつめぐみ、しべんだーしゃんでりあ、しりあしふぁー

The first N-terminal domain structure of an A3 protein reveals where it is targeted by HIV-1 Vif (Kouno et al. NSMB 2015)

The N-terminal domain of A3G (A3G-NTD) is of particular interest therapeutically, as this domain is responsible for HIV-1 binding to Vif. We thus turned our attention to this portion of A3G, using evolution- and structure-guided mutagenesis as a strategy to solubilize it. This strategy was successful and permitted us to solve the NMR structure of a soluble A3G-NTD construct that retained binding to Vif (sA3G-NTD). A smaller zinc-coordinating pocket and altered helical packing distinguishes sA3G-NTD from previously reported catalytic domain structures and helps explain the reported inactivity of A3G-NTD (**Fig 2**). Drs. Shigematsu and Kouno from my laboratory used structure-based mutagenesis in combination with Vif-binding and A3G-degradation assays to define a unique Vif-interacting surface on A3G. This surface is formed by the α1-β1, β2-α2, and β4-α4 loops (**Fig 3a**). Vif also binds to the C-terminal catalytic domain of APOBEC3F (A3F-CTD)[4], similarly triggering A3F degradation. We found that the Vif-binding surface of sA3G-NTD is at a completely different location from that of A3F-CTD (compare **Fig 3a and b**); Vif uses A3F residues that reside on static helices. This information suggests that unique inhibitors may be needed for A3G and A3F.

Fig 1. Structural model of the A3G-ctd/ssDNA interaction. **a**) NMR ssDNA-titration data is summarized on the surface of the A3G-2K3A structure. Residues perturbed upon addition of DNA are colored green. Zn^{2+} binding residues are shaded purple. **b**) Model depicting the interaction between A3G-2K3A and ssDNA (5'-C_1-C_2-T_3-3'). H257 (purple) is shown. Arginines surrounding the positively charged brim of the catalytic site are indicated and highlighted in light blue. ssDNA is colored white (carbon), blue (nitrogen), red (oxygen) and yellow (phosphate) [2].

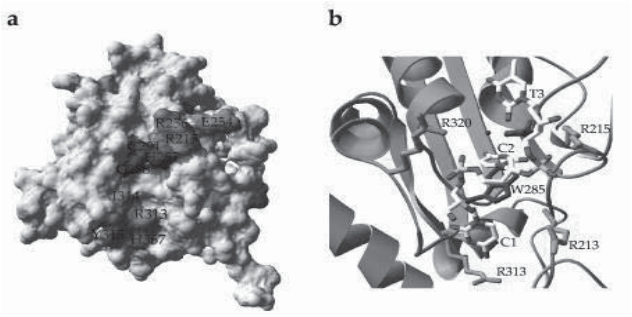


Fig 2. Structure of soluble A3G-NTD (sNTD) and comparison of Zn-binding sites of sNTD and CTD. A3G can be broken into two halves, a catalytic CTD and a non-catalytic NTD that is targeted by Vif. E67 of NTD is solvent exposed, while the analogous E259 of the CTD is buried in the protein interior [3].

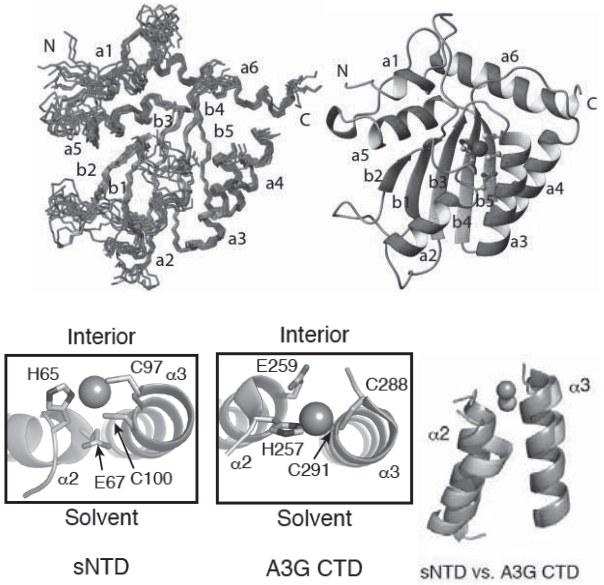
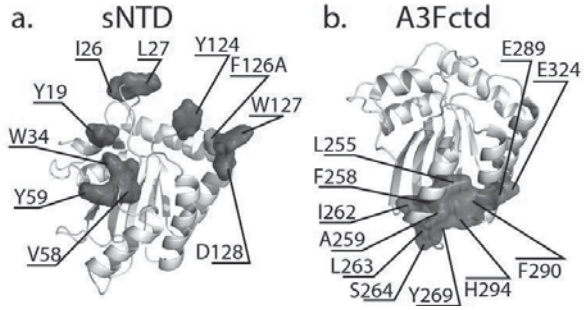


Fig 3. Vif-binding residues of A3G-sNTD and A3F-CTD.



引用文献

1) Sheehy, A.M., Gaddis, N.C., Choi, J.D. & Malim, M.H. Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature* **418**, 646-50 (2002).

2) Chen, K.M. et al. Structure of the DNA deaminase domain of the HIV-1 restriction factor APOBEC3G. *Nature* **452**, 116-9 (2008).

3) Kouno, T. et al. Structure of the Vif-binding domain of the antiviral enzyme APOBEC3G. *Nat Struct Mol Biol* (2015).

4) Kitamura, S. et al. The APOBEC3C crystal structure and the interface for HIV-1 Vif binding. *Nat Struct Mol Biol* **19**, 1005-10 (2012).

L2-4

Deciphering GPCR signal transduction through solution NMR: Challenges and Solutions

Joshua J. Ziarek[1,2], Franz Hagn[3], Andreas Plückthun[4], Masatsune Kainosho[2], and Gerhard Wagner[1]

[1]*Harvard Medical School, Boston, USA.*

[2]*Nagoya University, Nagoya, Japan.*

[3]*Technical University of Munich, Munich, Germany.*

[4]*University of Zurich, Zurich, Switzerland.*

G protein-coupled receptors (GPCRs) constitute one of the largest human protein families and the second-largest class of proteins targeted for drug discovery. Despite great technical advances in structural studies of these membrane proteins – the details of activation remain largely unknown. GPCRs are highly dynamic – possessing a complex energy landscape rather than a binary, 'on or off', activation state. Even in the absence of ligand, receptors exhibit basal activity by sampling conformations consistent with downstream signaling. In the last decade, crystallography has provided the structure of numerous GPCRs. However, diffraction-quality crystals require stable, conformationally-homogenous states, which are typically produced using T4 lysozyme fusions and nanobodies.

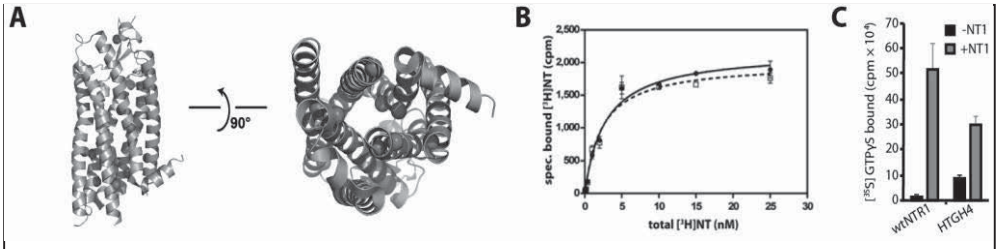


Figure 1. Structure, ligand binding, and signaling of evolved receptor. **A)** HTGH4 crystal structure with mutations highlighted in purple. **B)** Neurotensin (NT) agonist radioligand binding. **C)** Activation of heterotrimeric G protein.

Solution NMR spectroscopy has the potential to monitor native GPCR structure and dynamics. NMR studies probed β_2AR dynamics, but receptor expression in Sf9 insect cells limited the number of NMR-active nuclei to ^{13}C-atoms added by reductive methylation or ^{19}F-atoms attached to free thiols. Recombinant *E. coli* expression enables a vast array of isotopic-labeling schemes; however, overexpression of GPCRs in prokaryotes undoubtedly results in insoluble aggregates that are difficult to refold under aqueous conditions. We recently applied directed evolution to the neurotensin receptor (NTR1) – resulting in milligram quantities in *E. coli*, which enables us to conduct a thorough NMR exploration of GPCR conformational space.

Our NTR1 construct (herein termed HTGH4) possesses 13 mutations that increase protein expression and stability (Fig. 1A). HTGH4 is structurally similar to wtNTR1 and capable of activating both G protein signaling and β-arrestin recruitment – demonstrating a receptor with minimally altered function from wildtype (Fig. 1). The large molecular weight of the HTGH4:micelle construct requires various expression schemes

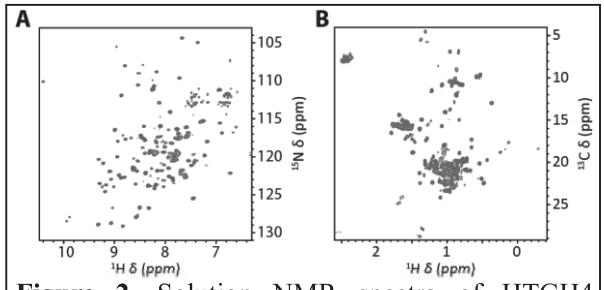


Figure 2. Solution NMR spectra of HTGH4 GPCR. **A)** ^{15}N TROSY-HSQC and **B)** ^{13}C HMQC.

including deuteration and selective isotope labeling. Using modern spectroscopy techniques, such as Poisson-Gap non-uniform sampling and Iterative Soft Threshold reconstruction, we have obtained high resolution triple-resonance spectra and are currently assigning the resonances of the agonist-bound receptor (Fig. 2). We are simultaneously assigning HTGH4 in complex with a small molecule antagonist. Chemical shift perturbations and NOEs are being assessed to characterize local structural differences. However, incomplete exchange of amide deuterons to protons has led to problems with traditional resonance assignment methods that rely on backbone amides. We have developed a suite of experiments that bypass this problem by directly detecting the amide nitrogen rather than proton (Fig. 3).

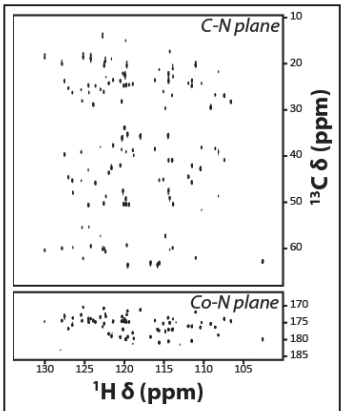


Figure 3. ^{15}N-detected experimental suite. 2D planes from a 3D CCoN spectra.

An important advantage of NMR over other structural techniques is that reaction kinetics and the thermodynamics can often be obtained. A suite of relaxation experiments have been collected to probe the backbone amide and sidechain methyl dynamics on the picosecond-nanosecond and millisecond-microsecond timescales. ^{15}N- and ^{13}C-CPMG relaxation dispersion experiments, in particular, can identify structural motions on 'biologically-relevant' timescales (Fig. 4). When a protein populates only one conformation the relaxation dispersion profile is a line at a single $R_{2,eff}$ rate (Fig. 4A, *large dashed line*). However, when multiple conformers exist the dispersion profile decreases exponentially as a function of the population of each conformation, the rate of conformational exchange, and the chemical shift difference between the species (Fig. 4A, *small dashed line*). As illustrated in Figure 4B, HTGH4 exhibits ligand-specific motions and the dispersion profiles are currently being globally fitted to elucidate concerted structural dynamics. Combining these dynamic parameters with crystal structures and molecular dynamics simulations will unveil the kinetic landscape of ligand binding and signal transduction.

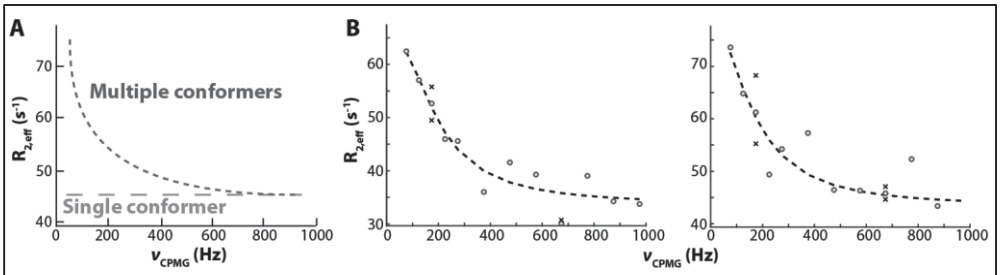


Figure 4. Evolved HTGH4 GPCR remains conformationally dynamic. **A)** Example relaxation dispersion profiles for a resonance with one (*large dashed line*) or more (*small dashed line*) conformations. **B)** Dispersion profiles from two representative HTGH4 resonances.

Keywords: G protein-coupled receptors (GPCRs), low-gamma nuclei method development, membrane-protein in micelles and nanodiscs

L2-5

循環型 極低温ヘリウム駆動DNP-MAS-NMRプローブの開発と応用

○松木　陽[1]，中村新治[2]，福居滋夫[3]，出原敏孝[4]，Jagadishwar Sirigiri[5]，末松浩人[2]，藤原敏道[1]

[1] 大阪大学・たんぱく質研究所

[2] (株)JEOL RESONANCE

[3] (株)クライオバック

[4] 福井大学・遠赤外領域開発研究センター

[5] Bridge12 Technologies Inc, MA, USA

Closed-cycle cold helium magic-angle spinning NMR probe system for 16.4 T dynamic nuclear polarization

○Yoh Matsuki[1], Shinji Nakamura[2], Shigeo Fukui[3], Toshitaka Idehara[4], Jagadishwar Sirigiri[5], Horoto Suematsu[2], and Toshimichi Fujiwara[1]

[1]*Institute for Protein Research, Osaka University, Japan*

[2]*JEOL RESONANCE Inc., Japan*

[3]*Cryovac Corp., Japan*

[4]Research Center for Development of Far-Infrared Region, University of Fukui, Japan

[5]*Bridge12 Technologies Inc., MA, USA*

Sensitivity enhancement using dynamic nuclear polarization (DNP) is becoming increasingly popular at moderate external field strength (B_0 < 9.4 T) and temperatures (T > 90 K), but less accepted at higher field conditions. High field condition is crucial for gaining spectral resolution and basic NMR sensitivity, but decreases the DNP efficiency. To compensate for the loss of efficiency, we here developed a novel helium-cooling and -spinning MAS DNP NMR probe system, where cryogenic helium gas is circulated in a closed loop. This enabled us to sustain stable MAS (4 kHz) at cryogenic temperatures (40 K) for an extended period of time (>10 days) without consuming the cryogen gas. Some preliminary results on DNP at B_0 = 16.4 T will also be presented, demonstrating improved DNP efficiency at low temperatures.

強い電子スピン分極をマイクロ波照射によって核スピンに移しNMRの感度を向上する動的核分極(DNP)法の効率はしばしば高磁場条件で大きく悪化する。これは高価な高磁場DNP装置の費用対効果比を下げるし、蛋白質の様な多信号系の解析では高磁場-高分解能条件が命だからこれは由々しき問題である。一方、高磁場で有効に働く「交差効果」によるDNP効率は、特定の電子スピン遷移を飽和できると最大にできることから、従来用いられるよりもずっと低い温度(T≪100 K)で実験できるなら、DNP効率を大きく改善できると考えられる。よって極低温マジック角試料回転(MAS)-NMRプローブの技術は高磁場DNP法の核心にある。

感度向上、固体NMR、極低温ヘリウムMAS

○まつきよう，なかむらしんじ，ふくいしげお，いではらとしたか，じゃがでぃしゅわーしりぎり，すえまつひろと，ふじわらとしみち

一般に100Kより低温のMASには冷却ヘリウムガスが用いられるが、従来型のヘリウムMASプローブは、回転周波数や試料温度の長期安定性やコストその他の点で技術的な問題が多く、近年の応用例は非常に少ない。2012年、我々は液体ヘリウムを沸騰させて低温スピナーガスを製造するタイプのDNPプローブシステムを作製、B_0 = 14.1 Tにおいて500倍以上の感度向上が実現できると示した[1]。最近我々はこれを更に発展させ、高価なヘリウムを消費しない完全循環型プローブを開発した[2]。本発表では新プローブシステムの性能と700 MHz (B_0 = 16.4 T) DNP-NMRへの応用について報告する。

新システムでは始めに導入したヘリウムガスを再圧縮、再冷却しながら循環させ、原理的にヘリウムを全く消費する事なく長期(>10日間)の極低温MASが維持できる。また回転用ガスの全経路にわたって液化-気化のサイクルが無いため、条件の安定性は本質的に非常に高く、試料温度、回転周波数はそれぞれおよそ±0.5 K、±5 Hzに維持できた。現時点で最長の連続MAS時間は40 Kにおいて14日間で、多次元測定を多用する生体系への応用にも十分である。運転経費はほぼガス冷却用のGifford McMahon冷凍機にかかる電気代(¥300/hr)だけで、これは従来の1/50以下である。これほど安価に長期安定な低温MASを実現する装置は世界的にも類を見ない。また、プローブ部は市販のシムスタックに収まる設計で、従来と同様の高分解能測定が可能である(Fig.1)。

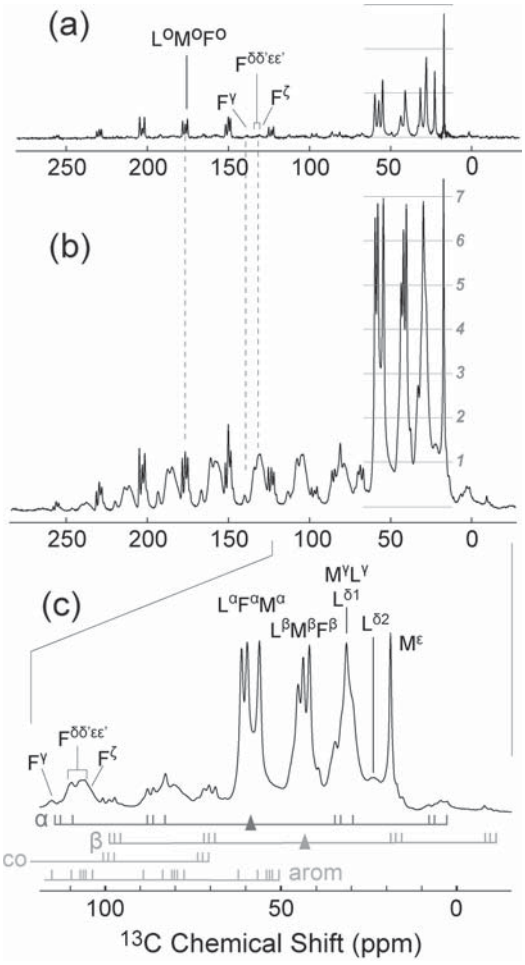


Figure 1 {^{1}H}-^{13}C CP spectra of crystalline tripeptide *N-formyl*-Met-Leu-Phe (MLF) taken at B_0 = 16.4 T, ν_R=4.7 kHz. (a)T = 300 K, (b and c) T = 40 K. At 40 K, the integral spectral intensity was 7.1 times greater, and the noise level was 1.3 times lower than at 300 K. Locations of spinning side bands are indicated below. Spectra are vertically scaled for the unit time noise amplitude. Taken from ref. [2].

長期安定性とともに極低温における感度向上効果も注目に値する。試料と共にコイルやコンデンサも30-40 Kに冷却されており、DNPをする以前に、ボルツマン分極の増大と熱雑音の低下から約10倍の感度向上が実現した(Fig.1)。DNPの感度向上効果はこれと相乗的に加算できるので更に強力である。発表ではB_0 = 16.4 T (700 MHz)における最新のDNPデータと合わせて報告する。

［謝辞］
本研究は科学技術振興機構、先端計測分析技術・機器開発プログラムと、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る援助を受けて行われた。

［文献］
[1] Matsuki Y. et al., *J. Magn. Reson.* **225**, 1-9, 2012.
[2] Matsuki Y. et al. *J. Magn. Reson.* **259**, 76-81, 2015. (Open Access)

L2-6

Frequency-swept solid-state ^{33}S NMR of an organosulfur compound in an extremely low magnetic field

○Kazuhiko Yamada[1]

[1]*Interdisciplinary Science Unit, Multidisciplinary Sciences Cluster, Research and Education Faculty, in charge of Science Research Center, Kochi University, Oko Campus, Nankoku city, Kochi 783-8505, Japan*

Frequency-swept solid-state ^{33}S nuclear magnetic resonance (NMR) spectra of a ^{33}S-enriched organosulfur compound, [^{33}S]-diphenyl disulfide, are presented. The NMR spectra were acquired at extremely low magnetic fields, 0.06 and 0.10 T, which correspond to Larmor frequencies of 0.1959 and 0.3265 MHz, respectively. The quadrupole coupling constant, C_Q, and the asymmetry parameter, η_Q, for [^{33}S]-diphenyl disulfide were found to be C_Q = 43.3 ± 1.9 MHz and η_Q = 0.70 ± 0.20, respectively. T_1 measurements of [^{33}S]-diphenyl disulfide were performed between 60 and 300 K using nuclear quadrupole resonance signals, and a compromise observation temperature was found to be 300 K. Quantum chemical calculations were performed and the results demonstrated that the quadrupole frequencies and C_Q values were highly sensitive to the changes in dihedral angles of disulfide bonds.

Solid-state ^{33}S NMR is expected to become one of the most powerful tools for investigating the chemical properties of organosulfur compounds. However, despite this importance, there has been little research concerning solid-state ^{33}S NMR of organosulfur compounds. This is not surprising because the unfavorable nuclear properties of ^{33}S (I = 3/2, natural abundance = 0.75%, $\gamma = 2.055 \times 10^7$ rad $T^{-1}s^{-1}$, $Q = -5.5 \times 10^{26}$ m^{-2}) have made ^{33}S NMR experiments rather difficult. Although low sensitivity problems, which arise from the low Larmor frequency and natural abundance, may be overcome by ^{33}S-isotope enrichment using organic synthesis, the large quadrupole interactions, which depend on the molecular symmetry, potentially preclude NMR measurement. In general, inorganic compounds, in which molecular symmetry is high, tend to have relatively small quadrupole interactions, while organosulfur compounds have much larger interactions, which broaden the spectral width.

Traditionally, there have been two ways to record broadened NMR spectra, *i.e.*, frequency- and field-swept types of NMR experiments. Recently, our group reported a field-swept solid-state ^{33}S NMR method for a compound forming covalent bonds. The merit of this method is that there is no limitation of spectral width. This implies that almost all of the quadrupole nuclei in the periodic table could be measured as long as a sensitivity issue is resolved. Conversely, O'Dell et al. demonstrated the usefulness of a frequency-swept NMR method combined with a higher magnetic field, 21.1 T.

In this presentation, I discuss, as an alternative to the current methods of solid-state ^{33}S NMR for organosulfur compounds, a new type of frequency-swept solid-state ^{33}S NMR that uses an extremely low magnetic field (~0.10 T). The advantage of the present method is that spectral width is expected to be much narrower than that at higher magnetic fields; that is, the experimental conditions become much closer to

Sulfur NMR, Organosulfur compounds, Low magnetic field

○ やまだ　かずひこ

those of quadrupole nuclear resonance (NQR) experiments where a sharp signal is generally observed. The ^{33}S-enriched organosulfur compound, [^{33}S]-diphenyl disulfide, is newly synthesized and I briefly present the relation between ^{33}S NMR parameters and the dihedral angles in disulfide bonds on the basis of quantum chemical calculations.

The experimental and best-fit calculated ^{33}S NMR spectra of [^{33}S]-diphenyl disulfide observed at (a) 0.06 and (b) 0.10 T, which correspond to the Larmor frequencies of 0.1959 and 0.3265 MHz, respectively, are shown in Figure 1. The spectral width was experimentally limited so that only the central regions were observed for both cases. Assuming that there was a single sulfur site, the analysis of the NMR spectra combined with quantum chemical calculations (which will be discussed in the presentation) yielded the following parameters: $C_Q = 43.3 \pm 1.9$ MHz and $\eta_Q = 0.70 \pm 0.20$.

It is evident that the NMR method presented here can be applied to any ^{33}S-enriched organosulfur compounds and potentially ^{33}S-enriched rubbers, and the implication of the present study is that solid-state ^{33}S NMR and NQR experiments are, in addition to conventional NMR such as ^{1}H, ^{13}C, and ^{15}N, potentially useful as a new nuclear probe in the study of organosulfur compounds and rubbers.

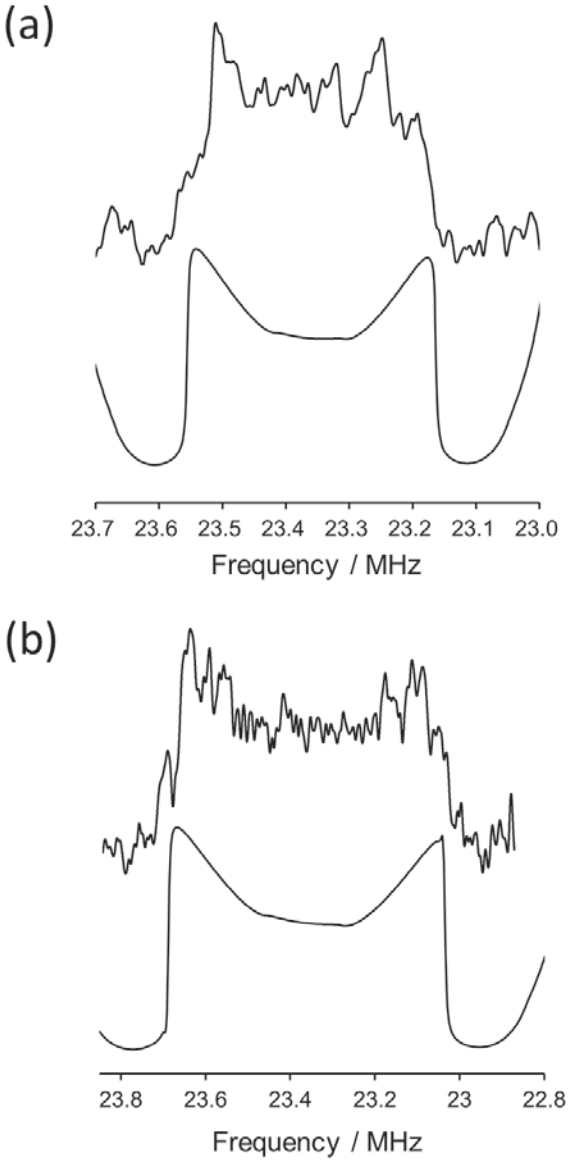


Figure 1 Experimental (upper trace) and best-fitted calculated (lower trace) frequency-swept ^{33}S NMR spectra of [^{33}S]-diphenyl disulfide, acquired at (a) 0.06 and (b) 0.10 T.

Acknowledgments

This work was supported by SENTAN Program of Japan Science and Technology Agency. KY also thanks JSPS KAKENHI Grant Number 2641007.

References

[1] K. Yamada, K. Kitagawa and M. Takahashi, *Chem. Phys. Lett*. **618,** 20 (2015).
[2] K. Yamada, D. Aoki, K. Kitagawa and T. Takata, *ibid*. **630**, 86 (2015).

L2-7

$^{1}H/^{1}H$ homonuclear mixing at ultrafast MAS > 120 kHz: $^{1}H/^{1}H$, ^{1}H CSA/CSA, $^{15}N/^{15}N$, $^{14}N/^{14}N$ correlations interactions.

Manoj Kumar Pandey[1], Michal Malon[1,2], Rongchun Zhang[3], Pingchuan Sun[4], Kamal H. Mroue[3], Bo Gong[3], Erin McNernv[3], David H. Korn[3], Michale D. Morris[3], Ayyalusamy Ramamoorthy[3], ○西山 裕介(Yusuke Nishiyama)[1,2]

[1]*RIKEN CLST-JEOL Collaboration Center, Japan*
[2]*JEOL RESONANCE Inc, Japan*
[3]*University of Michigan, USA,*
[4]*Nankai University, China*

Recent advances in magic angle spinning (MAS) technology have enabled ultrafast MAS above 120 kHz using 0.75 mm rotors. Such a fast MAS allows us to add ^{1}H high-resolution dimensions in NMR measurements of rigid solids with enhanced sensitivity. The main advantage of ultrafast MAS is longer ^{1}H T_2 relaxation leading to narrow line width and longer coherence lifetime due to better suppression of ^{1}H-^{1}H dipolar interactions. Nevertheless, ultrafast MAS simultaneously suppresses spin diffusion among ^{1}Hs which hampers the measurement of $^{1}H/^{1}H$ homonuclear correlations.

In order to correlate several isotropic and anisotropic nuclear interactions, here we demonstrate the utility of $^{1}H/^{1}H$ recoupling through enhanced $^{1}H/^{1}H$ spin diffusion process during RFDR mixing under ultrafast MAS. $^{1}H/^{1}H$ dipolar interactions can be restored by applying pulses synchronous to sample spinning. We have experimentally and theoretically investigated the role of phase cycling in radio frequency-driven recoupling (RFDR) for ^{1}H spin networks. The $XY4^{1}_{4}$ ($XYXY\ Y\overline{X}Y\overline{X}\ \overline{X}Y\overline{X}Y\ Y\overline{X}Y\overline{X}$) with stronger rf field strength gives the best performance in terms of better preservation of ^{1}H longitudinal magnetization and quicker magnetization transfer between ^{1}Hs because of better tolerance to rf-inhomogeneities and chemical shift offsets [1, 2]. The use of proper phase cycling gives stronger $^{1}H/^{1}H$ correlations in 2D RFDR exchange spectra. The application of RFDR during repetition delay reduces optimal repetition time, enhancing the sensitivity per unit time [3]. Here we applied RFDR to reveal the molecular structures of bone collagen in an atomic level by using $^{1}H/^{1}H$ RFDR correlation spectra (Fig. 1).[4] The quick build-up of NH/$H^{2}O$ cross peak clearly shows that water is tightly bound to the backbone of the collagen.

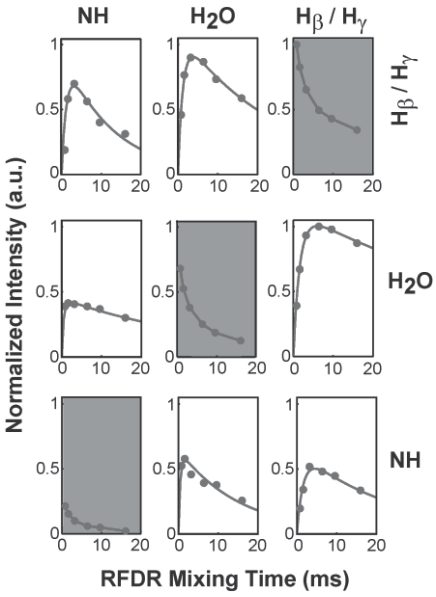


Fig. 1 $^{1}H/^{1}H$ RFDR build-up curve of bone collagen measured at 100 kHz MAS.

ultrafast MAS, homonuclear correlation, solid-state NMR

まのじくまーるぱんでぃ、みはるまろにゅ、ろんちゅんちゃん、ぴんちゅんさん、かまるろー、ぼーごん、えりんまくねるん、でいびっどこーん、みかるもーりす、あいやるさみーらまむーしー, ○にしやまゆうすけ

One can utilize $^{1}H/^{1}H$ spin diffusion to correlate not only ^{1}H isotropic chemical shifts but also other nuclear interactions. (1) $^{15}N/^{15}N$ chemical shift correlation can be obtained by relayed transfer via $^{1}H/^{1}H$ spin diffusion from RFDR at ultrafast MAS. This correlation is extremely challenging to achieve otherwise due to negligible ^{15}N-^{15}N dipolar interactions [5]. The ^{1}H magnetization is first transferred to ^{15}N (first CP) to record ^{15}N chemical shifts and then back transferred to amide ^{1}H nuclei (second CP) followed by RFDR mixing to transfer the magnetization to the other amide ^{1}Hs. The ^{15}N chemical shifts are recorded after magnetization transfer from ^{15}N to ^{1}H (third CP), and the signal is observed in a 3D way, i.e. $^{15}N/^{15}N/^{1}H$, via ^{1}H detection after the fourth CP from ^{1}H to ^{15}N. (2) We successfully obtained the first $^{14}N/^{14}N$ correlation by adopting a similar approach. The only difference here is the replacement of two two-way transfers between ^{1}H and ^{15}N achieved by four CPs to two HMQC magnetization transfer between ^{1}H and ^{14}N (Fig. 2)[6, 7]. The introduction of RFDR mixing between two HMQC transfers gives clear cross peak between two ^{14}NH nitrogen signals which is absent in the spectra without RFDR mixing. (3) Two ^{1}H CSA tensors can successfully be correlated by RFDR mixing, that results in relative orientation among them [8]. Herein, ^{1}H CSA tensors are recoupled by symmetry based sequence [9] and correlated by $^{1}H/^{1}H$ mixing. This clearly helps in the better interpretation of molecular structure in the 3D space. The $^{1}H/^{1}H$ CSA/CSA correlation spectrum of two COOH protons in citric acid clearly shows the 2D powder pattern (Fig. 3). The numerical fitting gives the relative orientation of two ^{1}H tensors to be β=38 degree.

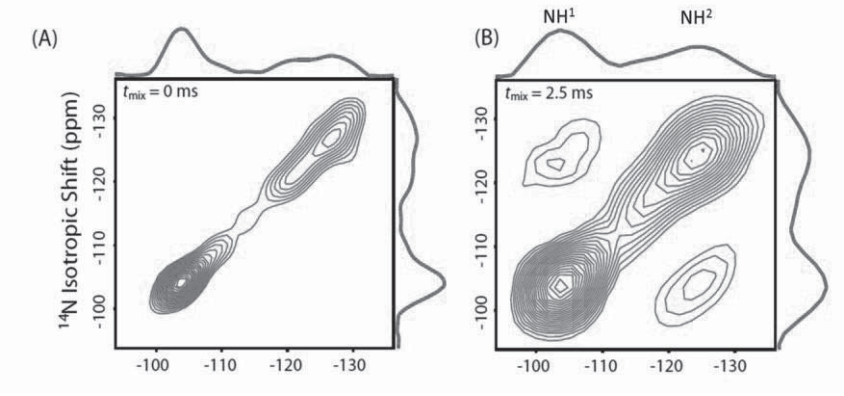


Fig. 2 $^{14}N/^{14}N$ correlation spectra of L-histidine.HCl.H_2O with(A)/without(B) $^{1}H/^{1}H$ RFDR mixing.

References
[1] Y. Nishiyama et al., J. Magn. Reson. 243 (2014) 25-32.
[2] R. Zhang et al., J. Magn. Reson. 252 (2015) 55-66
[3] Y.Q. Ye et al., J. Magn. Reson. 239 (2014) 75-80.
[4] K. Mroue, et al., Scientific Rep. 5 (2015) 11991.
[5] Y. Nishiyama et al., J. Magn. Reson. 244 (2014) 1-5.
[6] Y. Nishiyama et al., J. Magn. Reson. 208 (2011) 44-48.
[7] M.K. Pandey et al., J. Magn. Reson. 258 (2015) 96-101.
[8] M.K. Pandey et al., Solid State Nucl. Magn. Reson. in press.
[9] M.K. Pandey et al., J. Magn. Reson. 250 (2015) 45-54.

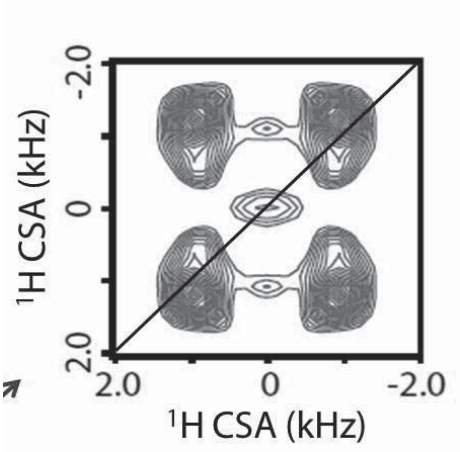


Fig. 3 ^{1}H CSA/CSA correlation spectrum of two COOH protons of citric acid.

IL1

Magic Angle Spinning Solid State NMR Studies of Membrane Proteins in Synthetic Lipids and Cell Membranes

Vladimir Ladizhansky,[1] Shenlin Wang,[1] Meaghan Ward,[1] I. Kawamura,[1,$] T. Okitsu,[2] A. Wada,[2] Y. Jiang,[3] H. Liang,[3] I. Hung,[3] P. Gor'kov,[4] Leonid S. Brown.[1]

[1]*Department of Physics and Biophysics Interdepartmental Group, University of Guelph, Ontario, Canada.*

[2]*Department of Organic Chemistry and Life Science, Kobe Pharmaceutical University, Kobe, Japan*

[3]*Department of Metallurgical and Materials Engineering, Colorado School of Mines, Golden, CO, USA.*

[4]*National High Magnetic Field Laboratory, Florida State University, Tallahassee, FL, USA.*

[$]*Current address: Faculty of Engineering, Yokohama National University, Yokohama, Japan*

Membrane proteins play many critical roles in cells and are involved in many physiological processes. Many important aspects of their structural and dynamic organization have been revealed by X-ray crystallography and solution NMR. More challenging for these methods are the studies of membrane proteins under nearly physiological conditions of a lipid bilayer or in cell membranes. Recent technological and methodological developments in solid-state NMR have led to the possibility of conducting structural analysis of large polytopic membrane proteins. I will describe our recent progress in this area, with particular emphasis upon structural insights derived from our studies of a 27 kDa retinal-binding seven-helical (7TM) photoreceptor Anabaena Sensory Rhodopsin (ASR).

Using a combination of Paramagnetic Relaxation Enhancement (PRE) solid-state NMR and biochemical and spectroscopic methods, we have determined an oligomeric state of ASR, and this state was later confirmed using Double Electron-Electron Resonance measurements. ASR was found to form highly symmetric trimers, which were structurally similar to those formed by Bacteriorhodopsin (BR). Furthermore, Small Angle X-ray Scattering (SAXS) measurements revealed that ASR trimers form hexagonal lattice in DMPC lipids, similar to that formed by BR. Interatomic distances determined from a series of proton-driven spin diffusion and homogeneously broadened rotational resonance spectra have resulted in a high resolution structure of the protein with well defined 7TM core and the oligomeric interface.

Three-dimensional CANCO and NCACB solid-state NMR spectra of ASR in the *E.coli* membrane (in the presence of endogenous lipids and resident membrane proteins) were compared to those of ASR in the synthetic DMPC lipid bilayer, and revealed only minor chemical shift perturbations, indicating high degree of structural conservation. Visible range CD spectra of retinal binding proteins are sensitive to their oligomeric state. Visible CD spectra of ASR have similar bilobe shapes in DMPC lipids and in the *E.coli* membrane, indicating similar trimeric arrangement in both environments. This conclusion is fully supported by the invariance of the chemical shifts of the residues located at the oligomeric interface.

Solid-state NMR, Membrane proteins, Structure

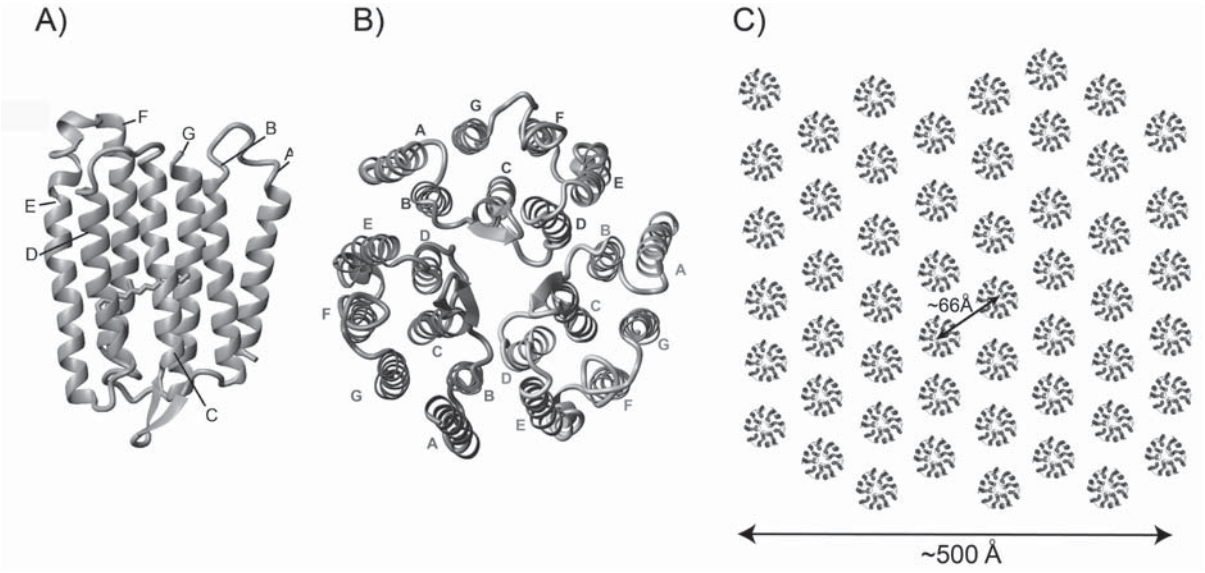


Figure 1. Structural hierarchy of ASR. A) Structure of a monomeric 7TM ASR bundle determined by ssNMR (PDB 2M3G);[1] B) ASR monomers are organized into symmetric trimers;[2] C) ASR trimers are arranged in 2D crystalline domains of hexagonal symmetry.[3]

References

(1) Wang, S.; Munro, R. A.; Shi, L.; Kawamura, I.; Okitsu, T.; Wada, A.; Kim, S. Y.; Jung, K. H.; Brown, L. S.; Ladizhansky, V. *Nature Methods* **2013**, *10*, 1007.

(2) Wang, S.; Munro, R. A.; Kim, S. Y.; Jung, K. H.; Brown, L. S.; Ladizhansky, V. *J Am Chem Soc* **2012**, *134*, 16995.

(3) Ward, M. E.; Wang, S.; Munro, R. A.; Ritz, E.; Hung, I.; Gor'kov, P. L.; Jiang, Y.; Liang, H.; Brown, L. S.; Ladizhansky, V. *Biophys J* **2015**, *108*, 1683.

IL2

A hybrid methods approach to determine the structure of *Tetrahymena* telomerase holoenzyme

Juli Feigon
Department of Chemistry and Biochemistry, University of California, Los Angeles (UCLA), Los Angeles, CA 90095-1569

Telomerase is an RNA-protein complex that extends the ends of linear chromosomes, and is a highly regulated determinant of cellular aging, stem cell renewal, and tumorigenesis. We are using a combination of NMR spectroscopy, X-ray crystallography, and electron microscopy to study the structure and function of telomerase. We determined the 3D structure of endogenously assembled *Tetrahymena thermophila* telomerase holoenzyme at 25 Å resolution using negative stain electron microscopy (EM). Six of the 7 protein subunits and the stem-loop 2 region of TER were localized in the 3D structure by affinity labeling. Fitting with the available high-resolution structures, including RNA structures determined by NMR and a p65-TER complex determined by combining NMR and X-ray crystallography, revealed the organization of TERT, TER, and p65 in the RNP catalytic core. Among the other holoenzyme proteins, p50 has an unanticipated role as a hub between the RNP catalytic core, p75-p19-p45 subcomplex, and the DNA-binding Teb1. A complete *in vitro* holoenzyme reconstitution correlates activity with structure. This first physical and functional network architecture of a telomerase holoenzyme provided the first view into the structure of the RNP catalytic core and revealed the organization of holoenzyme subunits that confer processivity and bridge telomerase to telomeres. Progress toward obtaining a high resolution cryoelectron microscopy structure and detailed protein and RNA domain structures and interactions using NMR, crystallography, electron microscopy, and modeling will be discussed.

Acknowledgements: This work was supported in part by grants from the National Institutes of Health (NIH) (GM048123) and National Science Foundation (NSF) (MCB1022379) to J.F.

Telomerase, RNA, NMR, electron microscopy

IL3

Probing the Conformational Dynamics of the Active and Inactive Forms of the Mitogen-Activated Protein Kinase ERK2

Yao Xiao[1], Michael P. Latham[1], Lisa R. Warner[1], Natalie G. Ahn[1], and Arthur Pardi[1]

[1]*Department of Chemistry and Biochemistry, University of Colorado, Boulder, Colorado, USA*

Mitogen-activated protein (MAP) kinase ERK2 is a key player in the MAP kinase signal cascade. ERK2 controls many cellular processes such as gene expression, proliferation, and differentiation. The aberrant activation of ERK2 is observed in many diseases, including cancer and heart disease. X-ray studies of active and inactive ERK2 show very similar 3D structures, thus it has been proposed that regulation of ERK2 activity involves changes in protein dynamics. ^{13}C relaxation experiments were used here to probe microsecond to millisecond conformational dynamics in inactive and active ERK2. The first step in the NMR studies of ERK2 was methyl resonance assignments on selectively Isoleucine, Leucine and Valine (ILV) $^{13}CH_3$-labeled protein. A structure-based approach was developed that maps the largest observed "NOE-methyl cluster" onto the known X-ray structure. The combination of identification of ILV methyl type with mapping of the NOE-methyl clusters greatly simplified the assignment process leading to assignment of 60% of the methyls, including 90% of Ile residues. ^{13}C relaxation dispersion experiments were then used to probe millisecond dynamics for selectively-labeled ILV methyls in the active and inactive forms of MAP kinase ERK2. Inactive, unphosphorylated ERK2 shows only local ILV methyl dynamics (individual k_{ex} values ranged from 900-2200 s^{-1}). ERK2 is activated by dual phosphorylation and the dispersion data demonstrated that active ERK2 undergoes global conformational dynamics. Analysis using the Carver-Richards equation showed that residues throughout the kinase core interconvert between two major conformations with $k_{ex} \approx 300$ s^{-1} and populations of 20%:80%. Although wild-type inactive ERK2 showed only local methyl dynamics, a mutant of unphosphorylated ERK2, designed to increase backbone flexibility at the hinge connecting the N- and C-terminal domain, also showed global dynamics with $k_{ex} \approx 500$ s^{-1} and populations of 97%:3%. Thus, activation of ERK2 by phosphorylation leads to a dramatic shift in global conformational exchange, likely through release of constraints at the hinge. These studies of ERK2 dynamics have been extended to complexes with peptide substrates and ATP analogues as well as several inhibitors that represent lead compounds for human therapeutics. Changes in methyl dynamics in these various complexes will be presented and discussed in the context of how dynamics affect the mechanism of catalysis in ERK2.

MAP Kinase, Methyl Dynamics, Relaxation Dispersion

HL1

High Frequency Dynamic Nuclear Polarization

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

Over the last few years we have developed cyclotron resonance maser (a.k.a. gyrotron) microwave sources that operate at frequencies of 140-527 GHz that permit DNP enhanced NMR (DNP/NMR) experiments in magnetic fields of 5-18.8 T (^{1}H NMR frequencies of 211-800 MHz, respectively). We review the instrumentation used for these experiments, which include new NMR probe designs and tunable gyrotron oscillators and a gyroamplifier based on a photonic bandgap cavity. Collectively, these advances in instrumentation have recently yielded significant improvements in the observed DNP enhancements

Second, using narrow line radicals (BDPA and sulfonated BDPA) we have recently detected Overhauser enhancements in insulating solids. Thus, the Zeeman field profile exhibits a strong enhancement at the position of the narrow EPR line as well as transitions due to the solid effect. Most previous investigations of the Overhauser DNP employed samples with mobile electrons -- for example liquids, metals or conducting solids. Thus, this is the first example of Overhauser enhancements in insulators. The process is mediated by modulation of the e^--^{1}H hyperfine coupling and the experimental data show a field dependence that scales weakly as ω_{0I}. This is in contrast to the inverse field dependence associated with the cross and solid effects, ω_{0I}^{-1} and ω_{0I}^{-2}, respectively.

Third, we describe a new generation of biradical polarizing agents that appear to circumvent the inverse field dependence exhibited by nitroxide biradicals. We refer to these as TEMTriPol's since they consist of a trityl radical covalently bonded to a TEMPO. The exchange interaction may be the mediating factor that leads to a improved field dependence.

Finally, we report new time domain DNP experiments using the NOVEL condition. These pulsed experiments should not display the inverse field dependence exhibited by CW irradiation. In particular, these experiments are typically performed in the electronic rotating frame, and the electron Zeeman term is removed from any matching conditions and transition moments. Thus, much like Hartmann-Hahn CP, these mechanisms theoretically *do not scale* with ω_{0I}. Because of the strong coupling of the electron to the lattice ^{1}H's the microwave field profiles exhibit a broad matching condition. We discuss the instrumentation required to implement time domain DNP at high magnetic fields.

HL2

From Structural Analysis of Polymers with NMR to Development of Silk Vascular Graft

○Tetsuo Asakura

Department of Biotechnology, Tokyo University of Agriculture and Technology, Koganei, Tokyo, Japan

1. Empirical NMR chemical shift calculation

In 1972, I started studying NMR under the guidance of Profs. Atsuo Nishioka and Isao Ando as a graduate student of Tokyo Institute of Technology. The project was to interpret ^{1}H NMR peak splitting due to the stereoregularity of polypropylene in solution by empirical chemical shift calculations on the basis of the C-C bond anisotropies (parameters) as the origin of the chemical shift shielding, and a rotational isomeric state model for representing random coil structure in solution.[1] Then, in 1974, as a PhD student, I developed an empirical chemical shift calculation of this type with several shielding parameters to interpret the ^{1}H NMR chemical shifts of polyalanine with defined secondary structures.[2] This empirical chemical shift calculation was developed from 1990 by collaboration with Prof. Mike Williamson (University of Sheffield) using ^{1}H and ^{13}C chemical shifts for structural determination of proteins with unknown structure.[3-6]

From 1981, I moved to Tokyo University of Agriculture and Technology as an Associate Prof.. I started working on silk as it will be described in the second section, while I also continued chemical shift calculations, on polyolefin. ^{1}H NMR was not effective for polyolefin compared with ^{13}C NMR because of severe peak overlapping due to both a narrow chemical shift range and strong spin-spin coupling. Thus I targeted ^{13}C NMR spectra of polyolefin. As the chemical shift shielding origin, the γ-gauche ^{13}C NMR parameter was very effective to correlate the ^{13}C NMR chemical shift with the local conformation. The empirical chemical shift calculation was successfully used to make the stereo-regularity assignment for polyolefin with a longer tacticity level, which are not easy to assign experimentally, and to verify the time-averaged random coil conformation reproduced by the rotational isomeric state model, including the model itself.[7-9] In addition, the ^{13}C NMR observations of polyolefin which are difficult to understand could be well-interpreted by these theoretical calculations.

2. NMR of silks

I was interested in whole body NMR studies of living silkworms developed by Profs. Shizuo Fujiwara (Tokyo University) and Masatsune Kainosho (Tokyo Metropolitan University) since 1979. Tokyo University of Agriculture and Technology was a key university of silk research in Tokyo. I therefore started with living silkworms by whole body NMR from 1981 for the next 15 years. The silk fibroin structures of *Bombyx mori* and *Samia cynthia ricini* (a wild silkworm) were studied *in vivo* as well as the mechanism of synthesis of the silk fibroins by ^{13}C solution NMR.[10] An interesting and important project in the field of silk research was also started from 1981. This was the structure determination of Silk I (the structure of silk fibroin from *B. mori* before spinning) which gives an answer to how silkworms can produce a very strong and tough fiber from an aqueous solution of silk fibroin

stored in the middle silkgland at room temperature. I started to collaborate with Profs. Hajime Saito (Himeji Institute of Technology) and Isao Ando, and later with Mike Williamson on the basis of conformation-dependent ^{13}C chemical shifts.[11-13] Moreover, in 1990, I had a good opportunity to collaborate with Profs. Timothy A. Cross (Florida State University) and Linda Nicholson (Cornell University) for one year at Florida State University as a visiting Prof..[14,15] Later, I collaborated with Profs. Beat Meier (ETH),[16] Anne Ulrich (University Karlsruhe)[17,18] and Terry Gullion (West Virginia University)[19,20]about the determination of both Silk I and Silk II (the silk structure after spinning) of *B. mori* silk together with silk from wild silkworms as well. In 2001, we were able to propose the Silk I structure as shown in Figure 1.[21] This is a simple, but very interesting structure which will be a key structure for answer of the previous question.[22,23]

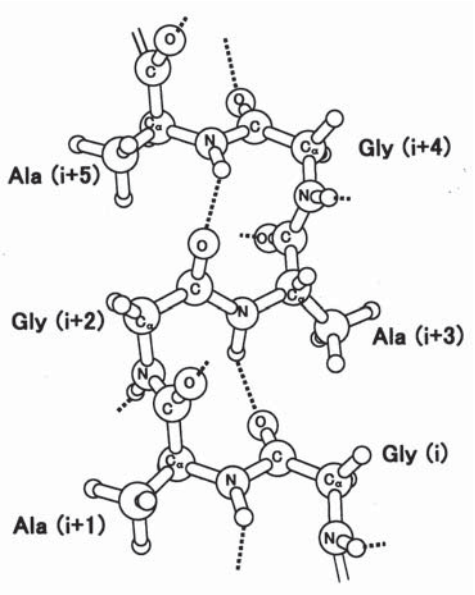


Figure 1 Silk I (Repeated type II β-turn) structure

Other silk structures including Silk II,[24] wild silkworms[25] and spider silks[26] have been also reported. These works became the basis of biotechnological applications of silks where much attention has been paid from textile engineers to polymer chemists and biomedical scientists including our group.[27,28]

3.Application of silk to Biomaterials, especially vascular graft with small diameter

Since 1997, we could be supported by large project "Elucidation of Structure-Property Relationship of Silk Fibroin and Application to Biosensing Technology System" from Bio-oriented Technology Research Advancement Institution. This was a good opportunity to start application of silk to biomaterials. Namely, silk fibroin fiber is a well known textile material, and silk is also attractive for use as a biomaterial because of its many inherently superior qualities such as its mechanical properties, environmental stability, biocompatibility, low immunogenicity and biodegradability. In addition, the recombinant silk fibroins which are more suitable to biomaterials could be designed and produced by *E. coli* and transgenic silkworm in large scale. From these research background, we could develop small diameter vascular graft with high patency rate and remodeling with native tissues.[29,30] The research is in progress.

I am grateful for the collaboration with NMR researchers who were marked in bold in the reference list below.

References

1. Asakura, T., **Ando, Isao**. and **Nishioka, Atsuo**., Theoretical Study on Proton Chemical Shifts of Polypropylene*, Makromol. Chem*,, 177, 523-548, **1976**.

2. Asakura, T., Ando, I. and Nishioka, A., Proton Chemical Shifts of α Helical Poly-L-Alanine*, Makromol. Chem*,, 178, 1111-1132, **1977**.

3. Asakura, T., Nakamura, E., Asakawa, H. and **Demura, Makoto**., Ring Current Effects and Magnetic Anisotropy Effects of Carbonyl Groups on the α-CH Proton Chemical Shifts of the Basic Pancreatic Trypsin Inhibitor and Tendamistat, *J. Magn. Reson.,* 93, 355-360, **1991**.
4. **Williamson, Michael P**., Asakura, T., Nakamura, E. and Demura, M., A Method for the Calculation of Protein α-CH Chemical Shifts*, J. Biomol. NMR*, 2, 83-98, **1992**.
5. Williamson, M. P., **Kikuchi, Jun**. and Asakura, T., Application of ^{1}H-Nmr Chemical-Shifts to Measure the Quality of Protein Structures*, J. Mol. Biol.,* 247, 541-546, **1995**.
6. Asakura, T, **Iwadate, Mitsuo**., Demura, M. and Williamson, M. P., Structural analysis of silk with ^{13}C NMR chemical shift contour plots, *Int. J. Biol. Macromol.,* 24, 167-171, **1999**.
7. Asakura, T., Omaki, K., Zhu, S-N. and **Chujo, Riichiro**., The C-13 Nmr Chemical Shift of Poly(1-butene) Referring to That of 2,4,6,8,10,12,14,16,18-Nonaethylnonadecane and a Comparison of the Chemical Shifts between Poly(1-butene) and Polypropylene*, Polym. J.*, 16, 717-726, **1984**.
8. Asakura, T., Demura, M., Yamamoto, K. and Chujo, R., Polymerization Mechanism and Conformation of Poly(1-butene)*, Polymer,* 28, 1037-1040, **1987**.
9. Asakura, T., Nakayama, N., Demura, M. and **Asano, Atsushi**., C-13 Nmr Spectral Assignments of Regioirregular Polypropylene Determined from 2 Dimensional Inadequate Spectra and Chemical Shift Calculations*, Macromolecules,* 25, 4876-4881, **1992**.
10. Asakura, T., Suzuki, H. and Watanabe, Y., Conformational Characterization of Silk Fibroin in Intact *B. mori* and *P. c. ricini* Silkworms by ^{13}C Nmr Spectroscopy*, Macromolecules,* 16, 1024-1026, **1983**.
11. **Saito, Hazime**., Tabeta, R., Asakura, T., Iwanaga, Y., Shoji, A., Ozaki, T. and Ando, I., High-Resolution ^{13}C Nmr Study of Silk Fibroin in the Solid State by the Cross Polarization Magic Angle Spinning Method - Conformational Characterization of Silk I and Silk II Type Forms of *B. mori* Fibroin by the Conformation-Dependent ^{13}C Chemical Shifts*, Macromolecules,* 17, 1405-1412, **1984**.
12 .Asakura, T., Kuzuhara, A., Tabeta, R. and Saito, H., Conformation Characterization of *B. mori* Silk Fibroin in the Solid State by High-Frequency C-13 Cross Polarization Magic Angle Spinning Nmr, X-Ray-Diffraction, and Infrared-Spectroscopy*, Macromolecules,* 18, 1841-1845, **1985**.
13. Yoshimizu, Hiroaki. and Asakura, T., The Structure of *Bombyx mori* Silk Fibroin Membrane Swollen by Water Studied with ESR, C-13-NMR, and FT-IR Spectroscopies*, J. Appl. Polym. Sci.*, 40, 1745-1756, **1990**.
14. **Nicholson, Linda. K**., Asakura, T., Demura, M. and **Cross, Thimosy. A**., A Method for Studying the Structure of Uniaxially Aligned Biopolymers Using Solid-State N-15 Nmr - Application to *B. mori* Silk Fibroin Fibers*, Biopolymers,* 33, 847-861, **1993**.
15. Demura, M., Minami, M., Asakura, T. and Cross, T. A., Structure of *B. mori* Silk Fibroin Based on Solid-State NMR Orientational Constraints and Fiber Diffraction Unit Cell Parameters*, J. Am. Chem. Soc.*, 120, 1300-1308, **1998**.
16. Beek, J. D. v, Beaulieu, L., S., Demura, M., Asakura, T. and **Meier, B. H**., Solid-state NMR determination of the secondary structure of *S. c. ricini* silk, *Nature*, 405, 1077-1079, **2000**.
17. Asakura, T., **Yao, Juming**., **Yamane, Tsutomu**., Umemura, K. and **Ulrich, Anne. S**., Heterogeneous structure of silk fibers from *B. mori* resolved by ^{13}C solid-state NMR spectroscopy*, J. Am. Chem. Soc.*, 124, 8794-8795, **2002**.
18. Asakura, T., Suita, K., **Kameda, Tsunenori**., Afonin, S. and Ulrich, A. S., Structural role of

tyrosine in *B. mori* silk fibroin, studied by solid-state NMR and molecular mechanics on a model peptide prepared as silk I and II, *Magn. Reson. Chem.*, 42, 258-266, **2004**.
19. **Terry, Gullion**., Raghuvansh, K. and Asakura, T., Determining dihedral angles and local structure in silk peptide by ^{13}C ^{2}H REDOR, *J. Am. Chem. Soc.*, 125, 7510-7511, **2003**.
20. **Yamauchi, Kazuo**., Okonogi, M., **Kurosu, Hiromichi**., Tansho, M., **Shimizu, Tadashi**., Terry, G. and Asakura, T., High field ^{17}O solid-state NMR study of alanine tripeptides, *J. Magn. Reson.,* 190, 327-332, **2008**.
21. Asakura, T., **Ashida, Jun**., Yamane, T., Kameda, T, **Nakazawa, Yasumoto**., **Ohgo, Kosuke**. and Komatsu, K., A repeated beta-turn structure in poly(Ala-Gly) as a model for silk I of *B. mori* silk fibroin studied with two-dimensional spin-diffusion NMR under off magic angle spinning and rotational echo double resonance, *J. Mol. Biol.*, 306, 291-305, **2001**.
22. Asakura, T., Ohgo, K., Komatsu, K., Kanenari, M. and Okuyama, Kenji., Refinement of repeated beta-turn structure for silk I conformation of *B. mori* silk fibroin using ^{13}C solid-state NMR and X-ray diffraction methods, *Macromolecules,* 38, 7397-7403, **2005**.
23. Asakura, T., **Suzuki, Yu**., **Yazawa, Koji**., Aoki, A., **Nishiyama, Yusuke**., **Nishimura, Katsuyuki**., Suzuki, F., and **Kaji, Hironori**., Determination of Accurate ^{1}H Positions of $(Ala\text{-}Gly)_n$ as a Sequential Peptide Model of *B.mori* Silk Fibroin before Spinning (Silk I). *Macromolecules*, 46, 8046-8050, **2013**.
24. Asakura, T., Ohata, T., Kametani S., **Okushita, Keiko**., Yazawa, K., Nishiyama, Y., Nishimura, K., Aoki, A., Suzuki, F., Kaji, H., Ulrich, A.S. and Williamson, W.P., Intermolecular Packing in *B. mori* Silk Fibroin: Multinuclear NMR Study of the Model Peptide $(Ala\text{-}Gly)_{15}$ Defines a Heterogeneous Antiparallel Antipolar Mode of Assembly in the Silk II Form, *Macromolecules*, 48, 28–36, **2015**.
25. Nakazawa, Y. and Asakura, T., Structure determination of a peptide model of the repeated helical domain in *S. c. ricini* silk fibroin before spinning by a combination of advanced solid-state NMR methods, *J. Am. Chem. Soc.*, 125, 7230-7237, **2003**.
26. Asakura, T., Okonogi, M., Horiguchi, K., Aoki, A., Saito, H., Knight, D. P.and Williamson, M. P., Two different packing arrangements of antiparallel polyalanine, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 51, 1212-1215, **2012**.
27. Asakura, T., Suzuki, Y., Nakazawa, Y., Yazawa, K., Holland, G.P. and Yarger, J.Y., Silk structure studied with nuclear magnetic resonance, *Progs. NMR Spec.*, 69, 23-68 , **2013**.
28. Asakura, T., Okushita, K., and Williamson, M.P., Analysis of the Structure of *B. mori* Silk Fibroin by NMR, *Macromolecules,* 48 , 2345-2357, **2015**.
29. Enomoto, S., Sumi, M., Kajimoto, K., Nakazawa, Y., Takahashi, R., Takabayashi, C., Asakura, T. and Sata, M., Long-term patency of small-diameter vascular graft made from fibroin, a silk-based biodegradable material, *J. Vasc. Surg.*, 51, 155-164, **2010**.
30. Aytemiz, D., Sakiyama, W., Suzuki, Y., Nakaizumi, N., Tanaka, R., Ogawa, Y., Takagi, Y., Nakazawa, Y. and Asakura, T., Small-Diameter Silk Vascular Grafts (3 mm Diameter) with a Double-Raschel Knitted Silk Tube Coated with Silk Fibroin Sponge, *Adv. Healthcare Mater.*, 2, 361-368, **2013**.

第三日目
11月8日（日）
日本語セッション

Day 3 (Nov. 8, Sun)
(Japanese Sessions)

L3-1

木質バイオマスの特性を決めるリグニンー多糖結合様式の決定

神谷　明宏[1,2]，西村 裕志[3,4]，永田 一真[1,2]，永田 崇[1,2,4]，渡辺　隆司[3,4]，
○片平　正人[1,2,4]
[1]京都大学・エネルギー理工学研究所，[2]京都大学・エネルギー科学研究科，
[3]京都大学・生存圏研究所，[4]JST・CREST

Determination of the mode of the lignin-carbohydrate linkage that dominates characteristics of wood biomass

Akihiro Kamiya[1,2], Hiroshi Nishimura[3,4], Kazuma Nagata[1,2], Takashi Nagata[1,2,4], Takashi Watanabe[3,4] and
○Masato Katahira[1,2,4]
[1]Institute of Advanced Energy, Kyoto University, Japan, [2]Graduate School of Energy Science, Kyoto University, Japan, [3]RISH, Kyoto University, Japan, and [4]CREST, JST, Japan.

Three major components of wood biomass, a promising alternative of fossil fuels, are cellulose, hemicellulose and lignin. Lignin is covalently bound to carbohydrate, mainly hemicellulose, to form lignin-carbohydrate complexes (LCCs). The knowledge on the mode of the lignin-carbohydrate (LC) linkage is crucial to develop separation and conversion processes of wood biomass for its utilization. However, the mode of the LC linkage is poorly understood. Here, we unequivocally determined the mode of the LC linkage by NMR. We concentrated the LC bonds in LCCs using enzymatic treatment and column chromatography. First, the LC linkage was qualitatively analyzed by HSQC, which is a way used in previous reports. Then, the solider information was obtained on the basis of long-range correlations by HMBC. 2D and 3D HSQC-TOCSY in combination with methylene-edited HSQC gave further information on the linkage. Thus, the presence of the benzyl ether LC linkage was clearly demonstrated.

序論

木質バイオマスは、石油等の化石燃料を代替するものの一つとして有力視されている。木質バイオマスの３大主要成分はセルロース、ヘミセルロース及びリグニンである。前２者はバイオエネルギーの産生、そしてリグニンは化成品の産生に適している。リグニンはカーボハイドレート、特にヘミセルロースと共有結合で結ばれてlignin-carbohydrate complex (LCC)を形成している。木質バイオマスの分離過程・物質変換過程を確立して有効活用を図る為には、lignin-carbohydrate (LC)結合の様式に関する知見が不可欠であるが、これまで十分な知見は得られていない。NMR法は、木質バイオマスの構造解析において、他の手法では得られない詳細な情報を与える[1),2)]。今回LC結合の様式をNMR法によって決定したので報告する。

方法

アカマツから抽出したLCC画分をヘミセルラーゼで処理する事で糖鎖を短くした。これをカラムクロマトグラフィによって疎水性と分子サイズに基づいて分画する事で、LC結合が濃縮された画分を得た。この画分に関して各種NMR法を適応する事で、LC結合の様式を決定した。

木質バイオマス, LCC, リグニン

かみやあきひろ, にしむらひろし，ながたかずま，ながたたかし，わたなべたかし，
○かたひらまさと

結果と考察

まず最初に試料のHSQCを測定した。LCCを形成しているリグニンのCαに由来すると考えられるCα-Hα相関ピーク[3]が、(^{13}C, ^{1}H)=(80 ppm, 4.5 ppm)に強く現れた(Fig. 1)。酵素処理と分画を施す前の試料のHSQCにおいては、このピークの強度は弱く、当該処理によってLC結合が濃縮された事が確認された。従来の研究においてはLCCに関連したピーク強度が弱い為に、これ以上の解析を行う事が妨げられていたが[3]、今回はこの試料を用いて更なる解析を行った。

当該試料に関しては、良好なHMBCが取得できた(Fig. 1)。HMBCにおいて、リグニン内のCα-GH2、Cα-GH6、Cα-Hγ等に関して、ロングレンジの相関を確認する事ができた。これらに加えて、リグニンとヘミセルロースの間にも、ロングレンジの相関を確認する事ができた(Fig. 1)。メチレン編集HSQCを測定した結果、ヘミセルロース側に関しては、糖のCH_2基がLC結合の結合位置である事が分かった。さらに2次元及び3次元HSQC-TOCSYを用いた解析によって、当該糖のシグナルをすべて帰属する事ができた。

以上の解析によって今回解析したLCC画分には、ベンジルエーテル型のLC結合(Fig. 2)が形成されている事が、示された[4]。従来のHSQCのみを用いた解析においては、LC結合の様式は推定に過ぎず、確かな根拠には乏しかった。今回の解析によって、LC結合の様式を厳密に決定する事が初めて可能となった。

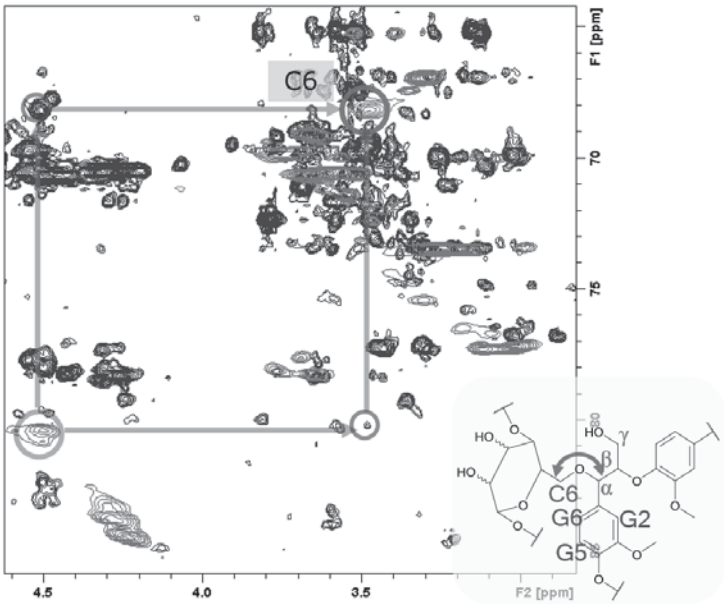


Fig. 1 Overlay of HSQC and HMBC of LCC. Long-range correlations between lignin and hemicellulose, Cα-H6 and C6-Hα, are detected.

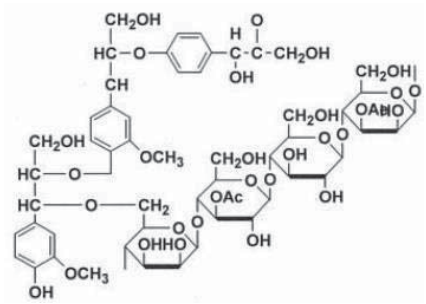


Fig. 2 The benzyl ether LC linkage identified in this study.

引用文献

1) Mansfield, S.D. et al., *Nature Protoc*. **7**, 1579-1589, 2012.

2) 片平正人, *細胞工学* **33**, 837-842, 2014.

3) Balakshin, M. et al., *Holzforschung* **61**, 1-7, 2007.

4) Nishimura, H. et al., *International Symposium on Wood Science and Technology*, Tokyo, 2015.

L3-2

分岐鎖糖鎖の配座空間探査における常磁性効果の活用

○山口 拓実[1,2,3]，Zhu Tong[1,2,3]，佐藤 匡史[3,4]，加藤 晃一[1,2,3]
[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]総合研究大学院大学 物理科学研究科
[3]名古屋市立大学大学院 薬学研究科
[4]JST PRESTO

Application of paramagnetic effects for exploring conformational spaces of branched oligosaccharides

○Takumi Yamaguchi[1,2,3], Tong Zhu[1,2,3], Tadashi Satoh[3,4] and Koichi Kato[1,2,3]
[1]Institute for Molecular Science and Okazaki Institute for Integrative Bioscience, National Institutes of Natural Sciences, Japan.
[2]School of Physical Sciences, SOKENDAI (The Graduate University for Advanced Studies), Japan.
[3]Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University, Japan.
[4]JST, PRESTO, Japan.

Oligosaccharides play crucial roles in a variety of biological systems. Despite their physiological and pathological importance, elucidation of structural mechanisms of biological functions of the oligosaccharides remains as tasks with more challenges. In view of this situation, we have been developing systematic methods for depicting the dynamic conformations of oligosaccharides in solution at atomic level. Here we present our strategy based on paramagnetism-assisted NMR techniques in conjunction with molecular dynamics simulation. We designed lanthanide-chelating probes so as to determine the geometrical arrangements of individual nuclei in the target oligosaccharides. The NMR-validated simulation enabled atomic descriptions of dynamic behaviors of the triantennary high-mannose-type oligosaccharides, which harbor intracellular glycoprotein-fate determinants in their branched structures.

序論

糖鎖は，生命現象の様々な局面で重要な働きをしている．例えば，自然界に存在するタンパク質の半数以上は糖鎖による修飾をうけていると見積もられており，タンパク質の高次機能の制御と生体内運命の決定に糖鎖が寄与していることが明らかとなりつつある．このように糖鎖の生物機能の重要性が広く認知されているにもかかわらず，糖鎖の立体構造の詳細な解明は立ち遅れてきた．これは，糖鎖が複雑な分岐構造と高い内部運動の自由度をもち，水中でそのコンフォメーションを絶えず変化させることに起因する．糖鎖の立体構造を正しく理解するためには，静的な安定構造を捉えるののみならず，3次元構造の揺らぎを含めた動態としての描象を得ることが求められる．

一般に，糖鎖はタンパク質などに比べてプロトンの密度が低く，核オーバーハウザー効果による原子間距離情報の収集が容易ではない．また，官能基の多様性に乏しいためNMR信号の重なり合いが激しい．こうした問題に対し私たちは，常磁性効果を活用したNMR解析と分子動力学（MD）シミュレーションを組み合わせることで，複雑な糖鎖のダイナミクスを描き出すための方法論を

糖鎖，常磁性効果，分子シミュレーション

○やまぐちたくみ，しゅとん，さとうただし，かとうこういち

築いてきた[1]．本研究では，ランタニドイオンの導入による擬コンタクトシフト（PCS）計測により，複雑に分岐した糖鎖の3次元構造情報を取得し，得られた実験データと分子シミュレーションを組み合わせて糖鎖の配座空間を探査した．これにより，糖タンパク質の細胞内運命の決定に関わる一連の高マンノース型糖鎖のダイナミックな3次元構造の変化を明らかにすることができた．

結果および考察

糖転移酵素および糖分解酵素をコードする遺伝子を欠損させた酵母変異株を用いることにより，分泌経路においてタンパク質の品質を提示する役割を担う分岐鎖糖鎖を，均一かつ大量に調製することができる[2]．変異酵母を[$^{13}C_6$]グルコースを炭素源として含む培地で培養することによって，糖鎖を^{13}Cで均一に標識した．こうして得られた高マンノース型糖鎖M9にエチレンジアミン四酢酸誘導体を連結した後，常磁性プローブとしてランタニドイオンを導入した．調製した糖鎖の^{1}H-^{13}C HSQC計測を通じて，PCSを観測した．M9はマンノース（Man）9残基を含む11糖であり，その非還元末端にいずれも共通する糖鎖構造（Manα1-2Man）を含む3本の分岐鎖を有している．通常，これらのピークは縮重してしまいスペクトル解析に困難を生じるが，PCSによりすべての糖残基の信号を良好に観測することができるようになった（Fig. 1）．さらに，PCS計測から求めた構造情報と照らし合わせてシミュレーション結果を評価することによって，糖鎖の配座空間の探査を行った．特に，レプリカ交換MDシミュレーションを用いることで，複雑に枝分かれした糖鎖の実際の構造を正しく反映することが可能となった．その結果，M9糖鎖の3本の分岐鎖のコンフォメーションは有意に異なっており，一部の枝を還元末端側に向けたフォールドバック構造を取ることが示された（Fig. 2）[3]．また，M9にグルコース1残基を付加した際には3次元構造はほとんど変化しないのに対し、M9から末端のマンノース1残基をとり除いただけで，糖鎖のコンフォメーション空間が顕著に広がることが明らかとなった．これらの一連の分岐鎖糖鎖は，糖鎖を認識する一連のレクチンとの相互作用を通じて糖タンパク質のフォールディング・輸送・分解といった運命の決定に関わる目印の役割を果たしている．こうした機構において，糖鎖の動的なコンフォメーションの差異が，レクチンとの相互作用に重要な役割を演じていることが予想される．

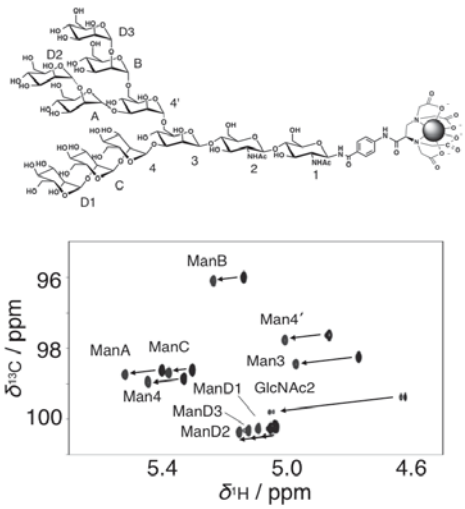


Fig. 1. ^{1}H–^{13}C HSQC spectra of the anomeric region of the M9 oligosaccharide tagged with Tm^{3+} (paramagnetic) and La^{3+} (diamagnetic).

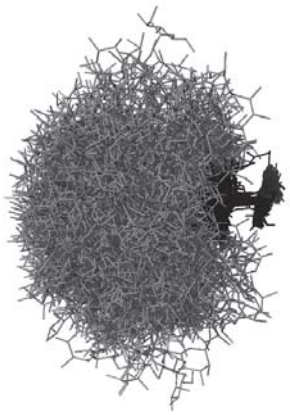


Fig. 2. Superimposition of 240 conformers derived from the NMR-validated replica exchange MD simulation results of the M9 oligosaccharide.

引用文献

1) Yamaguchi, T. and Kato, K., *Glycoconju. J.* in press, 2015.
2) Kamiya, Y. et al., *J. Biomol. NMR* **50**, 397-401, 2011.
3) Yamaguchi, T. et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* **53**, 10941-10944, 2014.

L3-3

NMR と分子力場計算を併用した糖鎖の立体構造とダイナミクスの研究

鵜澤 洵、加藤雅樹、山口芳樹、桝 飛雄真
理研　糖鎖構造、千葉大共用機器センター

Study on 3D structure and dynamics of sialo-glycans using NMR and MD

Jun Uzawa[1], Masaki Kato[1], Yoshiki Yamaguchi[1], Hyuma Masu[2]
[1]Structural Glycobiology Team, RIKEN, [2]Center for Analytical Instrumentation, Chiba University

Abstracts

To obtain the information on 3D structure and dynamics of sialo-glycans, we took an approach to combine NMR data and molecular dynamics simulations. Inter-glycosidic $^{3}J_{C,H}$ coupling constants were obtained through a series of HMBC experiments. MD simulations were performed to estimate the populations of each glycan conformer, and the $^{3}J_{C,H}$ coupling constants were interpreted in light of the conformer populations obtained from the MD simulations. Conformational dynamics were also examined from temperature-dependent changes of $^{3}J_{C,H}$ coupling constants.

序論

昨年の本討論会[1)]での発表に引き続き、主としてシアル酸を持つ３糖の立体構造とそのダイナミックスについて、HR-HMBC[2)]、FG-SIMBA[3)]、^{13}C selective-HR-HMBC[1)]を中心としたNMRスペクトルの解析結果と分子力場計算（Molecular Dynamics, 以下MD と略す）による配座割合を比較検討している。Glucose (Glc)、Mannose (Man)[4)]、Galactose (Gal)のβ1-3 結合の場合、NOE/ROE と HMBC スペクトルを解析することによって配座はほぼ決まることが知られている。これに対して 1-6 結合においては、ϕ、ψに加えてωが加わるので配座解析は困難を伴う。ω については大類らの発表[5)]に譲るとして、本発表では 1-6 結合または Neu2-6 結合の ψ を中心に温度を変えた時の $^{3}J_{C,H}$ の変化 と MD 法による配座割合の変化について取り上げる。

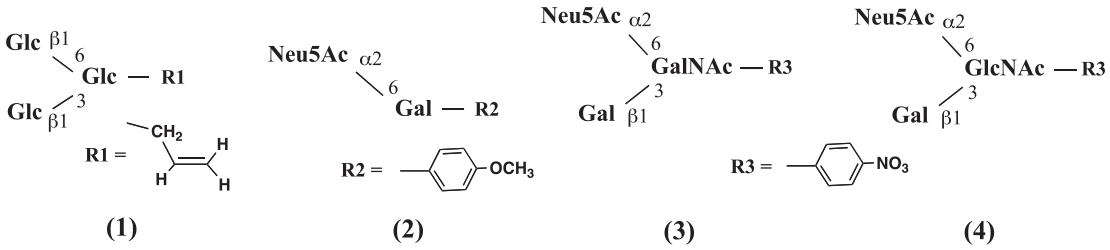
実験

本発表に使った試料を以下に示す。**(1)**は理研・細胞制御研（小川智也主任）より譲

キーワード：Sialo-glycan, ^{13}C selective-HR-HMBC and SIMBA, 3D structure and dynamics

○うざわ じゅん、かとう まさき、やまぐち よしき、ます ひゅうま

り受けた。**(2)**、**(3)** および **(4)** は（株）東京化成より購入し、（株）シゲミ製の対称型試料管に重水 0.15 ml に溶解して測定に用いた。すべて ^{13}C ラベルなしである。



(1) **(2)** **(3)** **(4)**

装置は JEOL-ECA-600 に Royal プローブを付属させて測定した。データ解析は Alice を用いた。HR-HMBC の解析は現報によった。FG-SIMBA のスペクトルは絶対値表示の積分値で比較した。

結果と考察

化合物 **(1)** の HR-HMBC による結果の一部を **Fig.1** に示す。

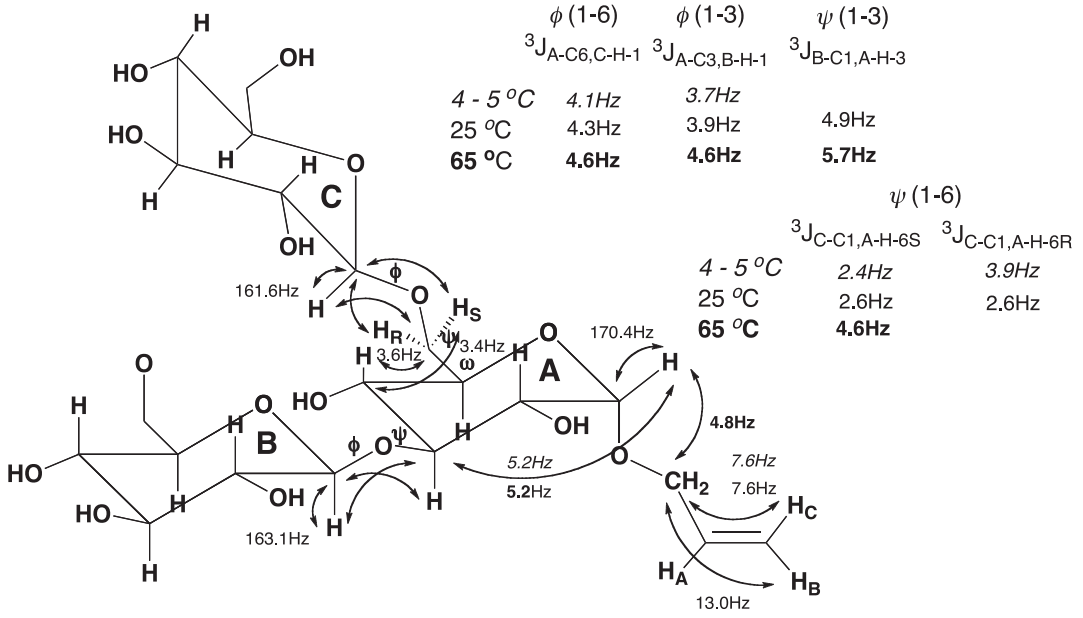
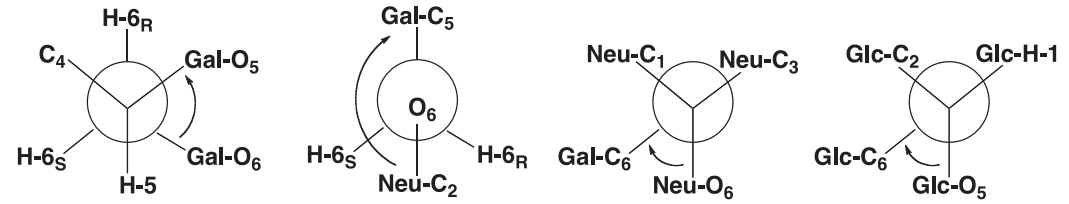


Figure 1. Observed $^{3}J_{C,H}$ values obtained at the probe temperature 4-5 °C (italic), 25 °C (plain), and 65 °C (bold).

先ず、ϕ (1-6) は温度を変えると **$^{3}J_{C,H}$** は 4.1 Hz から 4.6 Hz となった。配座が少し変化したと考えられる。ψ (1-6) は温度と共に一方は増加し、一方は減少している。配座の変化があると考えられる。また、B 糖と A 糖のβ (1-3) 結合部分は少し変化している。この温度範囲で NOE/ROE が観測されるので、基本的にはそれぞれのプロトンが同一平面に近い配座をとっているが、温度によって平均的な角度は違うと考えられる。ここで、MD 法などで定義されている配座と NMR で使う配座の対象図を **Fig. 2** に、上下で対応するように並べて示す。

(a)



ω (omega) : O6-C6-C5-O5　　ψ (psi) : C2-O6-C6-C5　　ϕ (phi) : O6-C2-O6-C6,　O5-C1-O6-C6

(b)

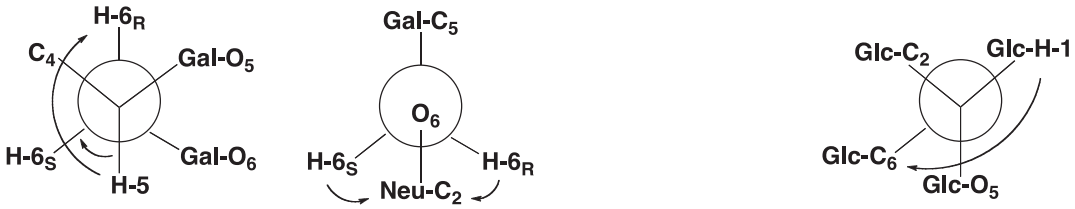


Figure 2. (a) Definition of dihedral angles for MD. (b) Correlation of dihedral angles and $^{3}J_{C,H}$ for Neu2-6Gal and Glc1-6Glc.

化合物 **(2)**、**(3)** および **(4)** について、^{13}C selective による HR-HMBC 法と FG-SIMBA による結果をまとめると、$^{2}J_{Neu2,H-3ax}$ は 7.6 Hz (7.3-8.1)、$^{2}J_{Neu2,H-3eq}$ は 4.4 Hz (3.8-5.1)であり、温度を変えても系統的な変化はみられなかった。括弧内は検出範囲である。他の糖鎖でも経験したが、糖残基内では変化は見られなかった。

(a)　　(b)

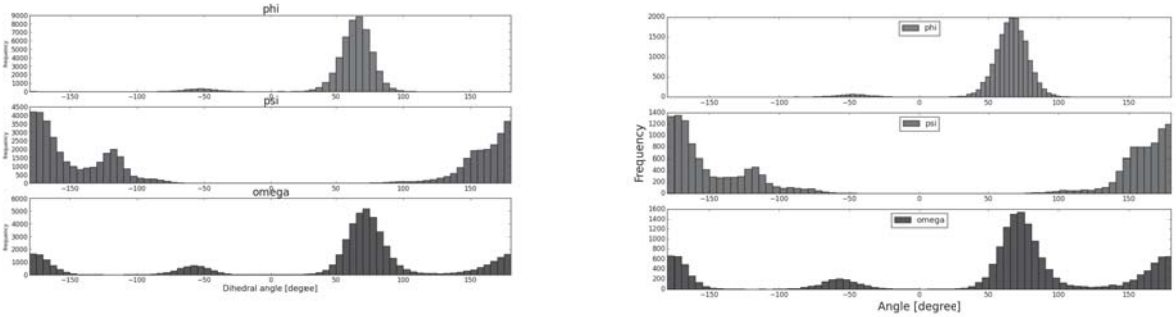


Figure 3. Dihedral angle distribution of (a) Compound **2** and (b) Compound **3**.

化合物**(2)**と**(3)**の MD 法によるϕ、ψ、ωの分布割合を **Fig.3** に示す。この分布割合のψとスピン結合定数の解析による配座割合に相関が見られた。

MD 法による計算結果は **Fig. 3(a)**に示す通り、ψについて、150 度と-120 度に 24%程度の極大値を示している。これに対して、化合物 **(3)** では**(b)**に示す通り、それぞれ 18%および 30%と異なっている。いずれも 180 度が 52%と最も多い。これを H-C スピン結合定数で比較するために、**Fig.4** を使って説明する。化合物**(2)**の $^{3}J_{Neu2,H6R}$ と $^{3}J_{Neu2,H6S}$ はいずれも 4.4 Hz であった。

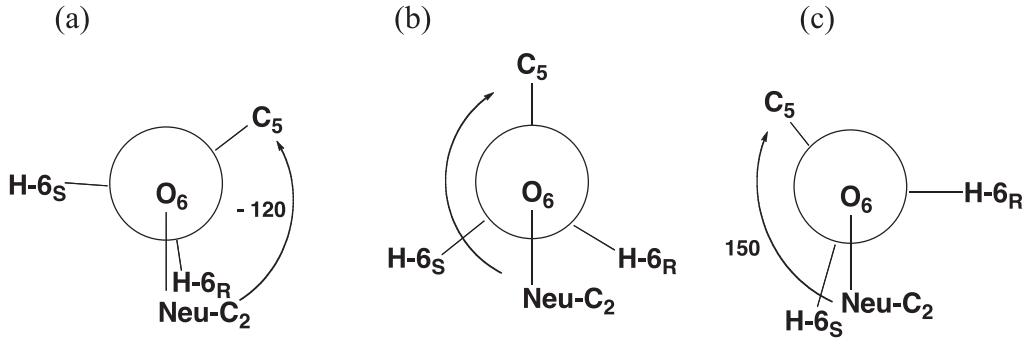


Figure 4. Dihedral angle related to $^{3}J_{Neu2,Gal\text{-}H\text{-}6R,S}$.

スピン結合定数は運動の平均値として観測されるはずであり、**Fig.4** の(a)と(b)の存在割合と(b)と(c)の存在割合がほぼ等しいためと考えられる。これに対して、化合物 **(3)** では $^{3}J_{Neu2,H6R}$ =3.5 Hz、 $^{3}J_{Neu2,H6S}$ =4.0 Hz と異なっている。これは (b)と(c)の割合が(a)と(b)より多いと考えられる。

化合物 **(3)** と **(4)** について、$^{3}J_{Neu2,H6R}$ と $^{3}J_{Neu2,H6S}$ は GalNAc と GlcNAc で温度を変えた時の挙動が異なる。温度を 15、25、65℃と変えたとき、$^{3}J_{Neu2,GalNAc\text{-}H6R}$ は 3.1、3.5、3.0 Hz となるが、$^{3}J_{Neu2,GalNAc\text{-}H6S}$ は 3.3、4.0、3.0 Hz となるのに対して、$^{3}J_{Neu2,GalcNAc\text{-}H6R}$ は 3.8、4.0、3.0 Hz となり、$^{3}J_{Neu2,GlcNAc\text{-}H6S}$ は 3.1、2.8、3.8 Hz となる。すなわち、GalNAc では温度を上げたとき、ほぼ同じ値になるのに対して、GlcNAc では大小が逆転することがわかった。

結語

ω については大類らの発表の他にも多数あるが、φ と ψ については見当たらない。本発表のように、$^{3}J_{C,H}$ 情報を用いることによって、MD 法による情報と相補的に配座に関する手がかりが得られることを示した。研究の目的に合わせてパルス系列を開発し、効用と限界をチェックし条件を選んで測定した。HR-HMBC 法などの測定法を駆使すれば、有益な情報が得られることを示した。測定値の精度についてはマシンタイムの制限などから限界があった。

最後に、試料 **(1)** の使用を快諾していただいた小川智也博士に深謝します。

参考文献

1. 鵜澤 洵、加藤雅樹、関 宏子、桝 飛雄真、山口芳樹；第 53 回 NMR 討論会要旨集 p-160、大阪、2014.
2. K.Furihata, M.Tashiro and H.Seto, Magn.Reson.Chem., **48**, 179(2010).
3. F.G.Vogt and A.J.Bennet, J.Magn.Reson., **132**, 214(1998).
4. Y.Kubota, H.Hori, R.Sawa, H.Seki and J.Uzawa, Magn.Reson.Chem., **50**, 659(2012).
5. H.Ohrui, Y.Nishida, H.Hori and H.Meguro, J.Org.Chem., **56**, 1726(1991).

L3-4

平面型マルチサーキュラーシムコイルを用いたリアルタイムシミング装置の開発

○山田 諒太，寺田 康彦，巨瀬 勝美
[1]筑波大学　数理物質科学研究科　電子・物理工学専攻

Development of a real-time shimming system using a planar multi-circular shim coil

○Ryota Yamada, Yasuhiko Terada, and Kose Katsumi
[1]*Institute of Applied Phisics, University of Tsukuba*

The static magnetic field used in MRI is generated by a permanent magnet or a superconducting magnet. The homogeneous magnetic field over space to be imaged is required because the field inhomogeneity causes image artifacts such as distortion and signal loss.

In recent years, a shimming method using a cylindrical multi-circular coil has attracted attention. This method uses multiple simple circular coils placed on a cylindrical surface, in which the current flowing in each coil is controlled independently. This enables one to correct the complex magnetic field inhomogeneity which includes higher-order terms. In this study, we designed and manufactured the planar-type, multi-circular shim coil (MCSC) for a 1.0 T magnet. The experimental results showed that the proposed planar-type MCSC corrected the magnetic field inhomogeneity effectively.

研究背景・製作した装置

MRIに必要な静磁場は永久磁石や超伝導磁石によって生成されるが，その磁場強度は撮像空間全体にわたって均一なものが求められる．

静磁場強度が不均一であると，歪みや信号の欠損などの偽像(image artifact)が引き起こされる．近年，円筒型のマルチサーキュラーコイル(MCSC)を使ったシミング法(Fig1)が注目を集めている．この方法では，単純な円形コイルを円筒状に配置し，それぞれに流す電流を独立に制御することで，より高次の項を含む複雑な静磁場不均一性を補正することが可能である．しかし複雑な電源系や高度な制御系が必要であり，実証例は限られていた．

そこで今回は片側のシムコイル面に12個，両面で計24個の円形コイルからなる対向平板型MCSCを設計した(Fig.2)．各円形コイルの直径は35mmであった．導線の線径を0.26 mm，各円形コイルのターン数を3とした．円形コイルの半径や個数は，あらかじめ数パターンの候補に対してシミュレーションを行って，評価領域でなるべく補正磁場が均一となるようなものを選んだ．また，MCSC用に24chの出力が可能な電源を設計および製作した．

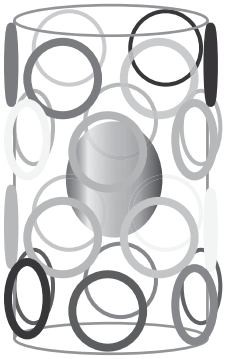


Fig.1: Cylindrical MCSC

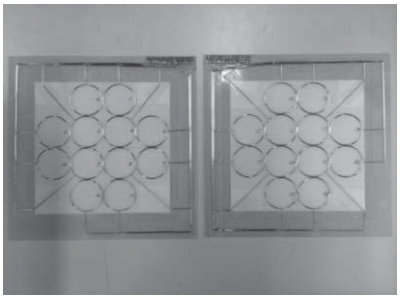


Fig.2: Designed and fabricated multi-circular shim coil

shimming, multi-coil, magnetic field

○やまだりょうた，てらだやすひこ，こせかつみ

結果と考察

実験サンプルは硫酸銅水溶液とし，評価領域(ROI)は直径40 mmの球内とした．実験の結果，今回製作したMCSCを使うことにより，不均一性ΔB_0のroot mean square(RMS)値は0.37から0.30 ppmへ，peak-to-peak (PP)値は5.69から2.91 ppmへと減少し，不均一性が改善されていることがわかる．Fig. 3に示すように，特にROI境界付近での改善が著しかった．また，Fig. 4のヒストグラムから，ROI全体でも静磁場の不均一性が改善されたことがわかる．このように，対向平板型のコイル配置でも，磁場不均一性が有効に改善可能であることが示された．

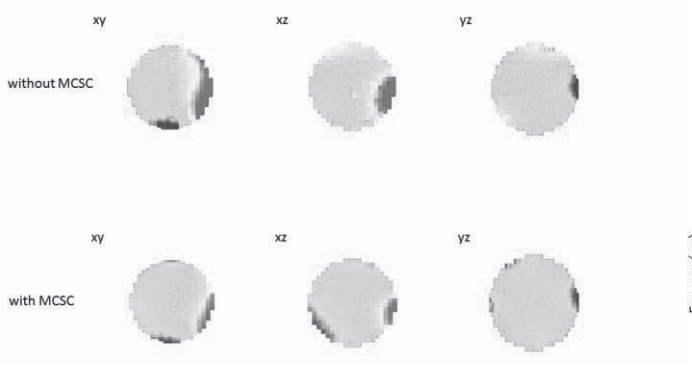


Fig.3: Magnetic field distribution
without (upper) and with (lower) MCSC
Color scale = -1.5 ppm ～ +1.5 ppm

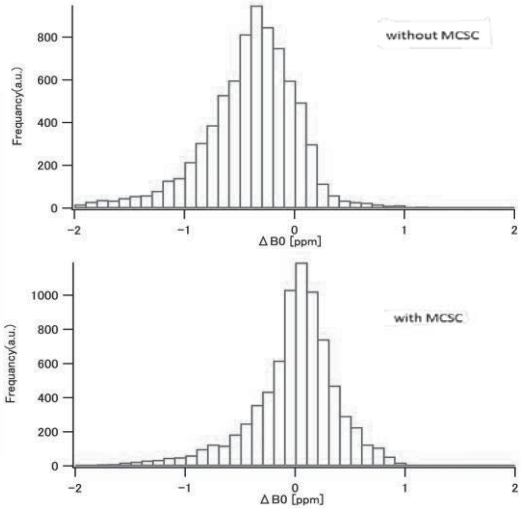


Fig.4: Histogram of ΔB_0
without (upper) and with (lower) MCSC

今後の展望

現状ではいくつかの課題がある．まず，本研究で設計及び製作した24ch電源は，シム電流値を設定するため，ポテンショメータを手動で調整せねばならず，甚大な労力と時間を要する．また，磁場計測や計算などには誤差があるが，その補正を行っていない．加えて撮像時の発熱や，環境温度の変化によって引き起こされる，静磁場強度や分布の時間変動には対応していない．

これらの問題を解決するには，リアルタイムで静磁場分布を計測しながら，シム電流をフィードバック制御する必要がある．

今後の展望として，まずDigital-Analog Converter (Fig.5)を用いた電子制御を取り入れることで，シム電流の設定精度の向上と効率化を図る．さらに，磁気フィールドカメラなどを用いて撮像と同時に磁場分布計測を行うことで，撮像中随時フィードバックが可能な，リアルタイムシミングが可能な装置の開発を目指す．



Fig.5: Digital - Analog Converter
(made by NATIONAL INSTRUMENTS)

引用文献

1) Juchem, C. et al., *Journal of Magnetic Resonance* 204 (2010), 281-289.
2) Juchem, C. et al., *Journal of Magnetic Resonance* 236 (2013), 95-104.
3) Terada, Y. et al., *Appl. Phys. Express* 6 (2013) 026701.

L3-5

^{31}P固体NMRによるDアミノ酸残基を含む抗菌ペプチド ボンビニンの細胞膜との相互作用の解析

○川村　出[1], 北橋 由貴[1], 金田 志穂[1], Nyamsambuu Altannavch[2], Javkhlantugs Namsrai[1,2], 上田 一義[1], 内藤 晶[1]
[1]横浜国立大学・大学院工学府
[2]モンゴル国立大学

Membrane interaction of antimicrobial peptide Bombinin containing a D-amino acid residue as studied by ^{31}P solid-state NMR

○Izuru Kawamura[1], Yuki Kitahashi[1], Shiho Kaneda[1], Nyamsambuu Altannavch[2], Javkhlantugs Namsrai[1,2], Kazuyoshi Ueda[1], and Akira Naito[1]
[1]*Graduate School of Engineering, Yokohama National University, Japan,*
[2]*National University of Mongolia, Mongolia.*

Bombinin H4 containing a D-allo-isoleucine at the 2nd residue, which is generated by post-translational modification of H2 consisting of L-amino acids, is a cationic antimicrobial peptide from yellow-bellied toad *Bombina variegata* skin secretion. Interestingly, H4 has stronger antimicrobial and hemolytic activity. Here, we showed the interaction of H4 with some membrane systems by ^{31}P solid-state NMR experiments. The spectral patterns of H2 or H4-DMPC lipid bilayer systems showed a decrease in ^{31}P CSA and an obvious phase separated state below Tc. In addition, DMPC-H4 vesicles strongly oriented parallel to the static magnetic field such as magnetically oriented vesicle systems of melittin-DMPC. Using by mimetic bacterial membranes with reference to *Staphylococcus aureus*, we observed an isotropic NMR signal at 0.0 ppm deduced from forming small discoidal particles induced by membrane disruption.

序論

キバラスズガエル*Bombina variegata*の皮膚分泌物由来のカチオン性抗菌ペプチド ボンビニンH4はその2残基目にD体のアロ-イソロイシンを持っており、L体で構成されるボンビニンH2の2残基目のL-Ileが翻訳後修飾を受けて産生される。細菌に対して抗菌性を有し、H2よりもH4の方がほとんどのケースで数倍から十数倍ほど強い活性を示すことが報告されている[1]。H4の一次構造を以下に示すが、たった1残基の立体配置の違いによって、H2とH4の活性が異なることは興味深い。さらに、我々はH2とH4を等量混合した系では、大腸菌に対して相乗的な抗菌活性が示唆されるデータを報告した[2]。

●ボンビニンH4の一次構造 (中性)

NH_3^+-Ile-**(D-allo-Ile)**-Gly-Pro-Val-Leu-Gly-Leu-Val-Gly-Ser-Ala-Leu-Gly-Gly-Leu-Leu-Lys-Lys-Ile-NH_2

本研究ではこのような抗菌活性の分子機構を明らかにすることを目的とし、^{31}P固体NMR測定によって細胞膜との相互作用を調べた。また、DMPCの系に関しては、MDシミュレーションによりH2とH4の細胞膜に対する相互作用の違いを調べた。

^{31}P固体NMR, Dアミノ酸, 抗菌ペプチド

○かわむらいずる, きたはしゆき, かねだしほ, にゃんさむぶ あるたなばっふぁ,
じゃぶからんたぐす なむずらい, うえだかずよし, ないとうあきら

実験方法

ボンビニンH2およびH4はフルオートマイクロ波照射型ペプチド合成機を用いて、固相法により合成した。ペプチドおよび脂質試薬をクロロホルムに溶解させ、エバポレーターで減圧し、乾燥させクロロホルムを完全に除去した。脂質は100 mM NaCl, 20 mM Tris buffer (pH=7.4)で水和し、ペプチド:脂質を1:20のモル比で多重膜リポソームを調製した。実験では，ペプチドはH2, H4およびH2:H4=0.5 : 0.5の混合試料を使用し、DMPC, DMPC/DMPG=3:1および黄色ブドウ球菌膜を模倣したDMPG/DMPC/カルジオリピン(CL)=65:25:10のモル比の割合の脂質二重膜を調製した。^{31}P NMR測定は、CMX 400-infinity 固体NMR分光器を使用し、静止状態で測定した。測定温度は40℃, 30℃, 20℃, 10℃, 20℃, 30℃, 40℃の順で変化させた。

結果と考察

DMPCの系ではペプチドが存在することで、脂質分子の軸対称回転運動を乱すような効果を与え、^{31}P化学シフト異方性(CSA)が減少した。特に、H2/H4の混合ペプチド試料において、異方性の減少が大きく、2つのペプチドによる相乗的な効果が示唆された。また、ゲル液晶相転移温度以下では、液晶相とゲル相が相分離したスペクトルパターンが得られ、この現象も混合試料の場合に顕著に現れた。再び40℃で測定したところ、H4とH2/H4混合試料において、δ⊥の位置にシャープな信号が現れ、メリチン-DMPC系で発見されたMagnetically Oriented Vesicle system (MOVs)[3]と同様に、静磁場に対して配向した楕円型リポソームを形成していることがわかった。これはH4およびH2/H4が脂質膜を乱し、脂質の再配列を促したことによると考えられる。

DMPC/DMPGの系では、ペプチドが存在する場合にDMPGのピークが選択的にシフトしていることがわかった。DMPGの負電荷とペプチドの正電荷によって相互作用していることが判明した。この系においてもH4とH2/H4において液晶相とゲル相の相分離スペクトルパターンが観測された。

黄色ブドウ球菌模倣膜であるDMPG/DMPC/CL (=65:25:10)の系では、ゲル液晶相転移温度以下で0.0 ppmに等方ピークが観測されたことから、ペプチドによって膜分断現象を引き起こしたことが判明した。膜分断については、DMPCおよびDMPC/DMPGの系では観測されなかったことから、CLの存在によってペプチドとの相互作用が変化し、膜に対して新たな欠損を与えたと考えられ、細菌膜との選択性を理解する上で、重要な結果である。

最後に、MDシミュレーションにより、DMPC膜中でのH2とH4の膜結合状態を評価した。細胞膜との相互作用エネルギーや膜に対するヘリックスの傾き角度などはほとんど同じものであった。しかしながら、H4の2残基目のD-allo-Ileの側鎖がシミュレーションの間、膜界面に露出し、アミドプロトンがリン酸基と水素結合を形成し、特異的な相互作用であることがわかった。この現象はL体のIleをもつH2では起きていないことも確認した。今後、固体NMRを用いて実験的に膜結合構造を明らかにしたい。

引用文献

[1] M.L. Mangoni, (2013) *Curr. Protein Pept. Sci.* **13** 734-743.

[2] Y. Kitahashi et al，IDAR2014，Sep. 2014, Utunomiya.

[3] A. Naito et al. (2000) *Biophys. J.* **78** 2405-2417.

L3-6

可溶性ペンタセンを用いた光励起三重項電子スピンによる動的核偏極

○立石　健一郎[1]，野中　洋[2]，根来　誠[1,3]，香川　晃徳[1,3]，北川　勝浩[3]，和田　智之[4]，山東　信介[2]，上坂　友洋[1]
[1]理化学研究所・仁科加速器研究センター
[2]東京大学大学院・工学系研究科
[3]大阪大学大学院・基礎工学研究科
[4]理化学研究所・光量子工学研究領域

Dynamic nuclear polarization with photo-excited triplet electron spins using soluble pentacene derivative

○Kenichiro Tateishi[1], Hiroshi Nonaka[2], Makoto Negoro[1,3], Akinori Kagawa[1,3], Masahiro Kitagawa[3], Satoshi Wada[4], Shinsuke Sando[2], and Tomohiro Uesaka[1]
[1]*Nishina Center for Accelerator-Based Science, RIKEN, Japan.*
[2]*Graduate school of Engineering, Tokyo University, Japan.*
[3]*Graduate school of Engineering Science, Osaka University, Japan.*
[4]*Center for Advanced Photonics, RIKEN, Japan.*

The sensitivity of NMR can be dramatically improved by Dynamic Nuclear Polarization (DNP). DNP using photo-excited triplet states of molecules (pentance in most cases), called as “Triplet-DNP”, is quite attractive because of its excellent feature that the technique is applicable at high temperature of 100 K to room temperature. We succeeded in utilizing pentacene derivative (6, 13-diphenyl pentacene) as a new polarizing agent, which can be soluble in organic solvents. The ^{1}H spins in the glass of the mixture of ethanol-d_6/water and toluene-d_8/benzene were polarized in 0.65 T and 100 K. The new polarizing agent opens a way to NMR with an enhanced sensitivity.

序論

動的核偏極(Dynamic Nuclear Polarization: DNP)は、電子スピンを用いて核スピン系を高偏極化（高感度化）する手法である。ラジカル中の熱平衡電子スピンを用いる従来法では、偏極率を10%以上に高めるには極低温設備が必須であった。一方で、光励起三重項電子スピンのような非平衡電子スピンを偏極源に使用すれば、この電子スピンの偏極率は磁場や温度に依存しないので、極低温装置は必ずしも必要ではなくなる。我々はそのようなDNPをtriplet-DNPと呼び[1]、ペンタセンの励起電子スピンを偏極源に用いて研究を行ってきた[2]。

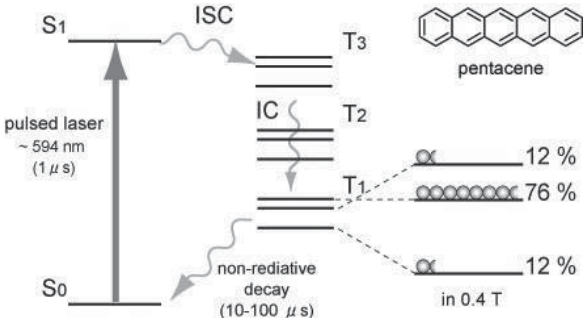


Figure 1: Energy diagram of pentacene

動的核偏極，光励起三重項電子スピン，可溶性ペンタセン

○たていし　けんいちろう，のなか　ひろし，ねごろ　まこと，かがわ　あきのり，きたがわ　まさひろ，わだ　さとし，さんどう　しんすけ，うえさか　ともひろ

ペンタセンの三重項電子は70%を超える高い偏極率と、数十μsのTriplet-DNPに最も適した寿命を併せ持ち(Fig. 1)、これまで唯一の偏極源とされていた。しかしながら、ペンタセンは有機溶媒にほとんど溶けず、従来分析手法との相性が良くない。そこで我々は、有機半導体用に開発された可溶性ペンタセン[3]を試し、Triplet-DNPの新たな偏極源として6,13-ジフェニルペンタセンを見出した(Fig. 2(a))。本発表では、UV-Vis測定とESR測定による6,13-ジフェニルペンタセンの励起三重項電子スピンの特性評価と、Triplet-DNPによる^{1}Hスピンの高偏極化実験の詳細について述べる。

方法

6,13-ジフェニルペンタセンはシグマ・アルドリッチ社から購入した。これをエタノール-d_6と水の混合液、トルエン-d_8とベンゼンの混合液に溶かし、急冷して、ガラス化させた試料をUV-Vis、ESR、triplet-DNP実験に使用した。ESR、triplet-DNP実験には、励起用レーザーには波長589 nm、パルス幅126 nsの自作のレーザーおよび、自作の18 GHzマイクロ波システムを使用した。

結果・考察

まず、UV-Vis測定を行い、6,13-ジフェニルペンタセンの吸収波長を調べた。ペンタセンの最低次励起波長(589 nm)と比べて、エタノール-d_6と水の混合液中では598 nm、トルエン-d_8とベンゼンの混合液中では605 nmへレッドシフトしているが、既存のレーザーで十分励起できることを確認した。

次に、時間分解ESR測定を行い、励起電子の偏極率と寿命を調べた。これらはペンタセンとほぼ同じ値で、偏極源とて同等の性能を持つことを確認した。

最後に、上記の結果を踏まえて、triplet-DNPを15秒間行い、高偏極^{1}Hスピン信号の観測に成功した(Fig. 2(b), (c))。実験は、0.67 T, 100 Kで行った。本実験では、^{1}Hのスピン一格子緩和時間が高偏極化のボトルネックになっており、試料の純化などによる緩和時間の延長などでさらなる高偏極化が達成が示唆された。

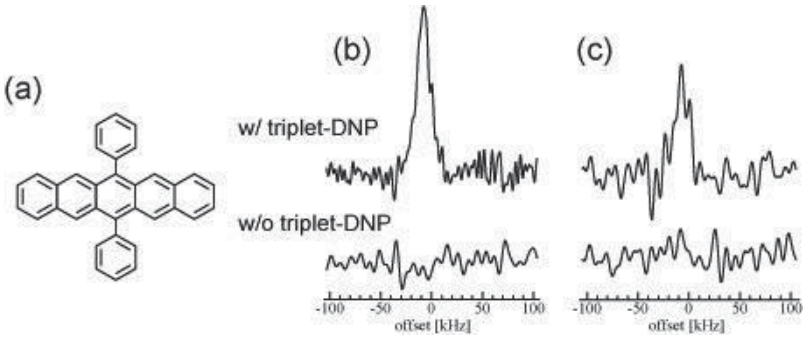


Figure 2 : (a) Soluble pentacene derivative (6,13-diphenyl pentacene) (b) ^{1}H signal in mixture of ethanol-d_6/water (c) ^{1}H signal in mixture of toluene-d_8/benzene.

本研究は、これまで量子情報処理や原子核実験などの特殊な用途に限定されてきたtriplet-DNPをNMR分析に応用するための道を開いた、非常に重要な成果である。従来DNPより高温で大きな偏極を得られる利点を生かして、今後、タンパク質や天然物の解析に応用することを目指して研究を進めていく。

引用文献

[1] K. Takeda, *Triplet State Dynamic Nuclear Polarization*, (VDM Verlag, 2009)

[2] K. Tateishi *et. al*., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 111 (2014) 7527.

[3] I. Kaur *et. al*., J. Am. Chem. Soc. 130 (2008) 16274.

L3-7

NMR-based metabolomics of elm skins as classical seasonings

Anh Phan Hong[1], Ei-ichiro Suzuki[2], Yoshinori Kodani[1], Takuya Miyakawa[1], and Masaru Tanokura[1]

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

[2] *Department of Medical Life Science, Yokohama City University, Japan.*

Elm skin was listed as an umami seasoning in the Man-yo-shu Waka Collection. NMR spectroscopy is a powerful tool used to detect primary metabolites of a certain food sample due to its simplicity, quickness and reproducibility. In this study, NMR-based metabolomics was applied to 3 types of elm skins that enabled the detection of 8 amino acids, 7 organic acids, 3 saccharides and 2 other compounds. Improved sample preparation method has been applied for a more effective way to detect sample metabolites. Elm skins contained considerably high amount of both glutamate and sucrose. Arginine was also contained as much as glutamate and contributes to the bitterness that may modify the taste of elm skins. According to the amount of glutamate, Akinire has the highest potential for an umami seasoning among studied elm skins. These results obtained from NMR are slightly different from those that were achieved by amino-acid analyzer and the reason should be uncovered.

Introduction

NMR spectroscopy is a powerful tool used to detect primary metabolites in the food sample of interest due to its simplicity, quickness and reproducibility. By taking advantage of the technique, we have investigated the chemical compositions of various foods including milk, coffee, fruit juices and rice wines to develop applicable methods for evaluating food geographic origins, food processing and sensory functions.

Chinese elm (Akinire, *Ulmus parvifolia*), Japanese elm (Harunire, *Ulmus davidiana* var. *japonica*) and Cut-leaf elm (Ohyounire, *Ulmus laciniata*) are deciduous/semi-deciduous trees. Elm skin was listed as an umami seasoning used in the Imperial Court of the Nara Period, as recorded in the Man-yo-shu Waka (Japanese poems) Collection encyclopedia. In the previous study(1), hot water extract of elm skin has been reported to contain as high amount of aspartic acid and glutamic acid as in seaweed. In the present study, we have improved the method of sample preparation by using deuterated water at room temperature instead of hot water and applied to 3 types of elm skins to determine their compositions. The absolute concentrations of various elm skin compounds were measured by the ^{1}H NMR spectra.

Materials and Methods

The elms were provided by The University of Tokyo Hokkaido Forest. The elm skins were peeled off and air-dried at 60ºC for 2 days. Dried elm skins were ground to fine powder by the food processor in prior to being soaked in D_2O for 1 hour at concentration 0.1 g of sample per 2 mL of solvent. The mixture was then subjected to centrifugation (10,000×*g*) at 4ºC for 30 min. The vicouos supernatants were filtered through syringe filter. Finally, DSS-d_6 was added to each supernatant filtered as an internal reference.

^{1}H NMR spectra were measured at 20ºC and 600 MHz on an Agilent Unity INOVA-600 spectrometer equipped with a cryogenic probe. Signals were assigned by different types of 2D NMR spectra as follows: ^{1}H-^{1}H DQF-COSY, ^{1}H-^{13}C HMBC and ^{1}H-^{13}C HSQC NMR spectra. The integral values of the

Metabolite analysis, Quantification, Gustatory compounds

signals from individual constituents were measured to calculate the concentrations.

Results

Twenty compounds determined from ^{1}H NMR spectra (Fig. 1) with detailed signal assignments were composed of 8 amino acids (glycine, glutamate, arginine, serine, glutamine, GABA, aspartate and alanine), 7 organic acids (citrate, acetate, formate, lactate, malate, fumarate and pyruvate), 3 saccharides (fructose, sucrose and glucose) and 2 others (ethanol and methanol). Concentrations of these 20 compounds have been determined. Accordingly, elm skin contained high amount of glutamate, a well-known amino acid that produces umami taste. Arginine, which corresponds to the bitterness, was contained as much as glutamate. In the group of amino acids that contribute to the sweetness, glycine accounted for the greatest portion, followed by serine, alanine and glutamine in all 3 elm skin samples. In addition to glycine, high amount of sucrose has been considered a significant contributor to the sweet taste of elm skins. Citrate and malate appear most abundant among NMR-visible organic acids and their contents were greater than aspartate, which has sour taste.

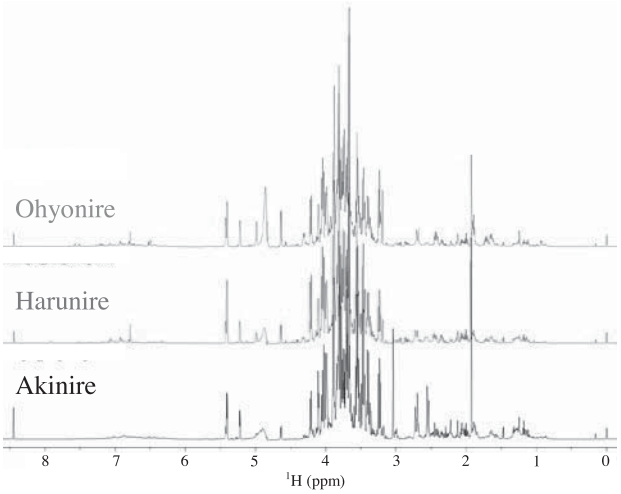


Fig. 1 ^{1}H NMR spectra of 3 types of elm skin

Discussion

Eight amino acids have been detected in water extracts of skins of all 3 elm species. Other amino acids including essential amino acids were not observed by NMR, even though their presence has been proved by utilizing amino acid analyzer (AAA). It can be considered by the reason of their trace concentrations. Prospective studies aims to clarify primary reasons behind these differences.

Glutamate was the most abundant amino acid in elm skins that is consistent with the previous report[(1)]. The result suggests the promising potential for an umami seasoning of elm skins. However, high content of arginine may modify the overall taste of elm skins. Additionally, citrate and malate, may significantly contribute to the sour taste of elm skins. Sucrose was the main carbohydrate in elm skin samples but most abundant in Harunire and least abundant in Akinire. This stands a total contrast to organic acids in elm skins in terms of total contents, where Akinire comes first, followed by Ohyonire and Harunire. The result proposes a hypothesis that the less the content of sucrose is, the more contents of sourness-contributing organic acids are. It could be explained due primarily to the fact that the degradation of sucrose significantly gives rise to the formation of organic acids and hence, contributes to the increase of sourness.

In summary, according to the amount of glutamate and other NMR-visible compounds in elm skin extracts, this study suggests that Akinire has the highest potential for an umami seasoning among 3 major elm skins in Japan.

Reference

1) Suzuki, E. et al., The 52th Annual Meeting of the Nuclear Magnetic Resonance Society of Japan, Abstract 160–161, 2013.

L3-8

C-Ag(I)-C塩基対を含むメタロDNAの立体構造解析

○古板　恭子[1]，大槻　武範[2]，児嶋　長次郎[1]，田中　好幸[2,3]
[1]大阪大学　蛋白質研究所
[2]東北大学大学院　薬学研究科
[3]徳島文理大学　薬学部

Structural analysis of a metallo-DNA duplax containing a C-Ag(I)-C base pair

○Kyoko Furuita[1], Takenori Dairaku[2], Chojiro Kojima[1] and Yoshiyuki Tanaka[2,3]
[1] *Institute for Protein Research, Osaka University, Japan.*
[2] *Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University, Japan.*
[3] *Faculty of pharmaceutical Sciences, Tokushima Bunri University, Japan.*

A cytosine-cytosine mismatch base-pair selectively capture Ag(I) ion, and forms C-Ag(I)-C metallo-base-pair. In this study, in an effort to obtain structural information on a DNA duplex containing a C-Ag(I)-C base pair, we performed solution NMR studies of the DNA duplex. Using ^{1}H-^{1}H NOESY, DQF-COSY and natural abundance ^{1}H-^{13}C HSQC spectra, most of the proton resonances were successfully assigned. The NOE pattern suggested that the DNA duplex has a right-handed helical structure and the C-Ag(I)-C base pair is stacked in the DNA duplex. Then the sugar puckerings were analysed using the DQF-COSY spectrum. The sugar rings of CYT residues in the C-Ag(I)-C base-pair were mostly in the C3'-endo conformation, though those of the other residues are in the C2'-endo conformation. The B-form structure of the DNA duplex may be disrupted at the C-Ag(I)-C base pair site.

【序論】

金属イオンを介した塩基対（メタロ塩基対）を含むDNAは、ナノテクノロジーに利用しうる素材として、近年注目されている。メタロ塩基対はほとんどの場合、人工的な塩基を用いて作成される。しかしながら、自然界に存在するT-TおよびC-CミスマッチはHg^{2+}およびAg^{+}イオンをそれぞれ特異的に結合し、T-Hg(II)-TおよびC-Ag(I)-Cメタロ塩基対を形成することが知られている。T-Hg(II)-T塩基対を含むDNAはその立体構造が解明されており、ナノマテリアルとして利用するための構造基盤が得られている[1,2]。一方で、C-Ag(I)-Cを含むDNAの立体構造はまだ報告されていない。本研究では、溶液NMRを用い、C-Ag(I)-C塩基対を含む15塩基対からなるDNAの立体構造研究を行った。

【方法】

C-Ag(I)-C塩基対を含むDNA（Figure 1）のNMRサンプルは濃度2.0 mM、90/10% H_2O/D_2OあるいはD_2O中で調製された。化学シフトの帰属のための測定は全てBruker社製 AVANCE III 950 MHz NMR装置を用い、298Kにおいて行った。化学シフトの帰属は90/10% H_2O/D_2Oサンプルの^{1}H-^{1}H NOESYスペクトル（混合時

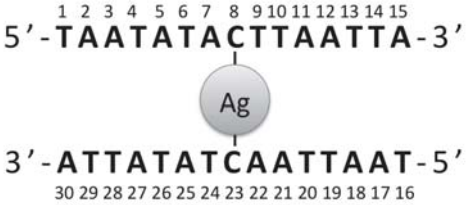


Figure 1. The sequence of the DNA duplex used in this study.

メタロ塩基対、立体構造、核酸

○ふるいた　きょうこ、だいらく　たけのり、こじま　ちょうじろう、たなか　よしゆき

間120 ms）、D_2Oサンプルの^1H-^1H NOESYスペクトル（混合時間120 msおよび50ms）、DQF-COSYスペクトル、およびnatural abundance ^1H-^{13}C HSQCスペクトルを用いて行った。

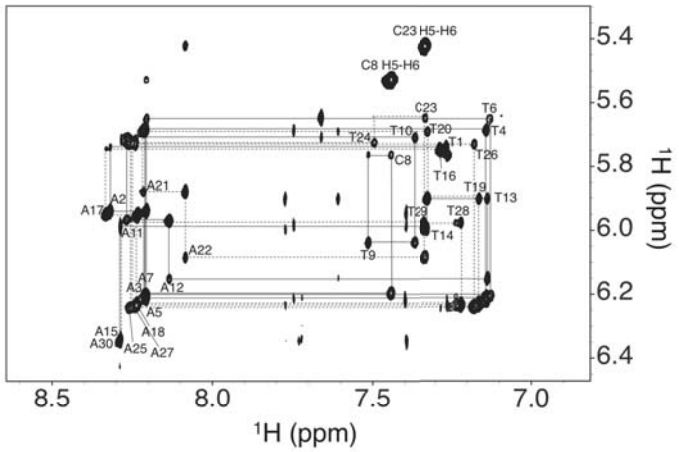


Figure 2. H6/H8-H1' cross-peaks in the ^1H-^1H NOESY spectrum of the duplex. Sequential walk using H6/H8 –H1' cross-peaks is shown by solid (T1-A15) or dashed (T16-A30) lines. Intra-residue NOE H6/H8–H1'cross peaks are labelled with the residue numbers.

【結果と考察】

C-Ag(I)-C塩基対を含むDNAの化学シフトの帰属を行った[3]。C-Ag(I)-C塩基対以外はA-T塩基対のみという多様性の低い配列ながら、950 MHz NMR装置で測定した高分解能スペクトルを用いることで、270個の非易動性プロトンのうちの254個、および末端を除く全てのイミノプロトンの帰属を達成した。Figure 2に^1H-^1H NOESYスペクトルのH6/H8-H1'相関領域を示す。両鎖ともに、シチジンを含め、鎖全体に渡り、H6/H8およびH1'によるsequential walkが可能であった。また、２つのシチジンとその隣接残基の間に塩基間のNOEが観測された。これらのことから、C-Ag(I)-C塩基対を含むDNAは全体として通常の右巻きらせん構造をとり、C-Ag(I)-C塩基対は二本鎖中でスタックしていることが示唆された。

DQF-COSYスペクトルのH1'-H2'/H2"交差ピークの形状をもとに糖のパッカリングについて検討した。H2'/H2"の立体特異的帰属は、混合時間50 msの^1H-^1H NOESYスペクトルのH1'-H2'/H2"間NOEのピーク強度をもとに行った。その結果、アデノシンおよびチミジンに関してはB-form DNAにみられるC2'-endoのコンホメーションを持つと考えられたが、シチジンはC3'-endoコンホメーションを持つと考えられた。

T-Hg(II)-T塩基対を含むDNAは、Hg(II)イオンにより安定化され、全体がB-form構造をとる[1,2]。これに対し、本研究で用いたC-Ag(I)-C塩基対を含むDNAは、NOEのパターンおよび糖のパッカリングから、C-Ag(I)-C塩基対付近では標準的なB-form構造が崩れている可能性がある。発表では、立体構造解析の結果をもとに、C-Ag(I)-Cを含むDNAの構造の詳細について議論する予定である。

【結論】

C-Ag(I)-C塩基対を含むDNAは全体として右巻きらせん構造をとり、C-Ag(I)-C塩基対は二本鎖中でスタックしている。C-Ag(I)-C塩基対付近では標準的なB-form構造が崩れている可能性がある。

引用文献

1) Yamaguchi, H. *et al*., *Nucleic Acids Res.* **42**, 4094-4099, 2014
2) Kondo, J. *et al*., *Angew. Chemie - Int. Ed.* **53**, 2385–2388, 2014
3) Dairaku, T. *et al*., *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*., *in press*.

L3-9

タンパク質翻訳量の調節に関与するnon-coding RNAの構造解析

○大山 貴子[1]、高橋葉月[1]、Piero Carninci[1]、山崎俊夫[1]
[1]理化学研究所ライフサイエンス技術基盤研究センター

Structural analysis of a non-coding RNA that controlling protein expression

○Takako Ohyama[1], Hazuki Takahashi[1], Piero Carninci[1], Toshio Yamazaki[1]
[1]*RIKEN Center for life science Technologies*

Ubiquitin carboxyl terminal hydrase (UCHL-1) is one of deubiquitinase that localized in neural cells. In recent years, it is reported that anti sense RNA of mouse Uchl-1 (AS Uchl-1) plays a role in increasing protein expression[1)]. But the mechanism is unclear. By using secondary structure prediction program, we predicted the secondary structure of AS Uchl-1 and some other RNAs that have similar function to AS Uchl-1,and estimated a consensus sequence. Then we prepared some RNAs involving estimated consensus sequence. Some of the structural features derived by the NMR analysis will be discussed.

序論

ユビキチンカルボキシ末端加水分解酵素UCHL-1は脱ユビキチン化タンパク質の一種で、神経細胞に多く存在する。UCHL-1はパーキンソン病や腫瘍の転移に関与することが報告されている。最近、マウスのUchl-1のアンチセンスRNA(AS Uchl-1)は、UCHL-1タンパク質の発現量を増幅させることが報告された[1)]。AS Uchl-1にはSINE B2が含まれている。AS Uchl-1の部分欠損実験から、タンパク質の発現量の増加にはSINE B2が関与していることが示されたが、その作用機構は不明である。そこで我々は、RNA二次構造予測プログラムを用いてAS Uchl-1および同様の機能をもつと示唆される数種の配列について、二次構造予測を行い、得られた結果から機能に関与する共通配列を推定した。この共通配列と推定した部分を含む数種類のRNA部分配列を調製し、ゲルシフトアッセイにて、RNAがフォールドしているものを選んだ。さらにそれらのコンストラクトの^{1}H-^{1}H NOESYのイミノプロトンシグナルの解析から、構造に関する知見を得たのでそれらについて議論する。

方法

RNA試料はT7 RNAポリメラーゼを用いた試験管内転写法により調製した。^{13}C,^{15}N標識RNAについても同様にNTPを^{13}C,^{15}N標識NTPに換え、T7 RNAポリメラーゼを用いた試験管内転写法により調製した。精製はポリアクリルアミド電気泳動にて行った。ゲルシフトアッセイでは、分離ゲルを12.5 % ポリアクリルアミドゲルとし、150 V定電圧にて電気泳動を行った。NMR測定には、8 %重水を含む20 mM MES緩衝液(pH 6.0)を用いた。

結果と考察

まずはじめに、AS Uchl-1のSINEB2について、特定の2次構造を形成する部分の構造予測を行った。二次構造予測にはvsfold5[2)]を用いた。得られた予測結果から、７塩基対からなるステムの

---

long non-coding RNA

○おおやまたかこ、たかはしはづき、ぴえろかるにんち、やまざきとしお

形成が強く示唆された。そこで、このステムを含む複数のRNA断片とSINE B2全領域を調製し、ゲルシフトアッセイにて、単一にフォールドする部位を探した。その結果、SINE B2全領域は単一にフォールドしていることが示唆された。また、SINE B2断片についても単一にフォールドしているものがあった。

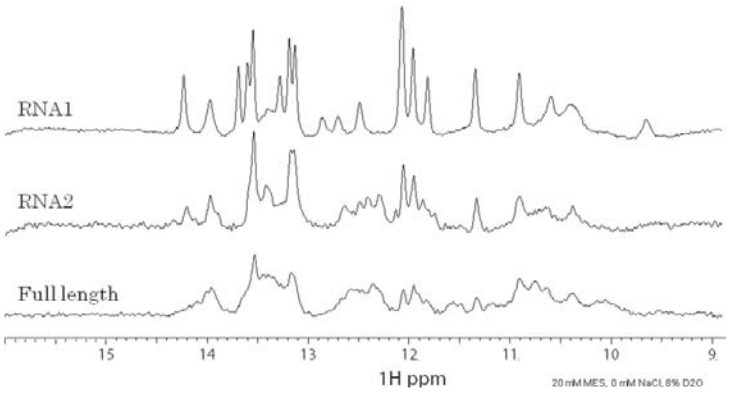


Figure 1 Portions of ^{1}H NMR spectrum of SINE B2 full length(bottom) and it's fragments RNA1(top) and RNA 2(middle) measured at 298 K.

そこで、SINE B2全領域とそのRNA断片について1D ^{1}H NMR測定を行った。RNAは、塩基対を形成していると、9-15 ppmの領域にイミノプロトン由来のシグナルが観測される。このイミノプロトン領域をFigure 1に示す。各RNA断片のイミノプロトンシグナルは、一部は化学シフト値が一致した。このことから、これらのRNA断片は一部が共通のフォールドをとっていることが示唆された。また、SINE B2全長と各断片のシグナル比較から、SINE B2全長の部分構造と考えられる断片はRNA2であると考えられる。

さらに各断片の2次構造を確認するため、^{1}H-^{1}H NOESY測定を行った。その結果、各断片で化学シフトが一致したシグナルは、2次構造予測にてステム構造が予測された部分であることが分かった。

結論

AS Uchl-1のSINE B2は単一にフォールドしていることが示唆された。また、NMRによって安定なステムを形成する部位が確認された。この部位は二次構造予測結果と一致した。

引用文献

1) Claudia Carrieri, Marta Biagioli, Laura Cimatti, Anne Beugnet, Isidre Ferrer, Silvia Zucchelli, Stefano Biffo, Allistar Forrest, Piero Carninci, Elia Stupka, and Stefano Gustincich. (2012) "Long non-coding antisense RNA controls Uchl1 translation through an embedded SINEB2 repeat".Nature, 491, 454–457

2) Dawson, W., Fujiwara, K., and Kawai, G. (2007). Prediction of RNA pseudoknots using heuristic modeling with mapping and sequential folding. PLoS One, 2, 905. http://www.rna.it-chiba.ac.jp/~vsfold/vsfold5/

L3-10

ランタニドプローブ法を用いたマルチドメインタンパク質の構造推移解析

○斉尾　智英[1,2]，小椋　賢治[3]，瀧下　俊平[1]，石森　浩一郎[1]，稲垣　冬彦[4]
[1]北海道大学 大学院理学研究院 化学部門
[2]JST・さきがけ
[3]石川県立大学 生物資源環境学部
[4]北海道大学 先端生命科学研究院

Paramagnetic lanthanide probe as a tool to visualize ligand-driven conformational transitions of multi-domain proteins

○ Tomohide Saio[1,2], Kenji Ogura[3], Shunpei Takishita[1], Koichiro Ishimori[1], and Fuyuhiko Inagaki[4]
[1]*Department of Chemistry, Faculty of Science, Hokkaido University, Japan*
[2]*JST, PRESTO*
[3]*Division of Food Science, Ishikawa Prefectural University, Japan*
[4]*Faculty of Advanced Life Science, Hokkaido University, Japan*

Proteins, especially multi-domain proteins, often undergo drastic conformational changes upon binding to ligands or by post-translational modifications, which is a key step to regulate their function. However, the detailed mechanisms of such dynamic regulation of the functional processes are poorly understood because of the lack of an efficient tool. We here demonstrate detailed characterization of conformational changes of MurD, a 47 kDa protein enzyme consisting of three domains, by the use of paramagnetic lanthanide probe. Quantitative analysis of pseudocontact shifts has characterized conformational transitions of MurD that regulate the affinity to the ligands (Fig. 1). Practical aspects such as resonance assignment using domain-parsing strategy and design of the constructs for the lanthanide-binding tag will be also discussed.

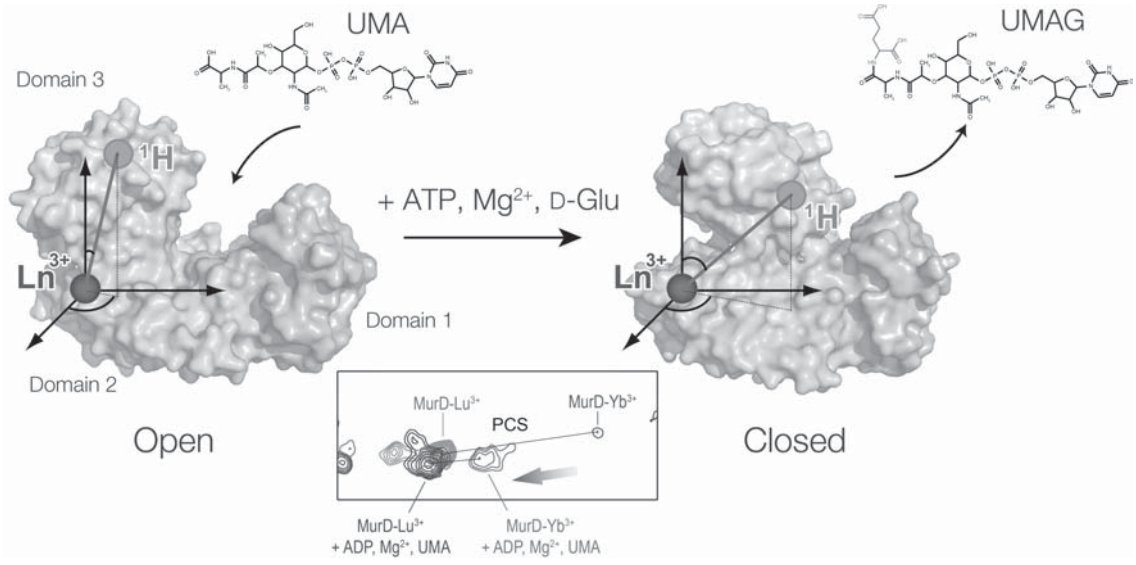


Fig. 1 Ligand-driven conformational changes of MurD detected by pseudocontact shift.

Paramagnetic lanthanide probe, pseudocontact shift, conformational change

○さいおともひで，おぐらけんじ，たきしたしゅんぺい，いしもりこういちろう，いながきふゆひこ

序論

生体内における分子機械として，タンパク質は他の分子と複合体を形成し，柔軟にその立体構造を変化させながら多様な機能を果たしている．中でもマルチドメインタンパク質はリガンドの結合やリン酸化などの翻訳後修飾によって立体構造を大きく変化させ，他の分子との結合・解離や酵素活性などを制御している．このようなタンパク質の動きや変化の詳細を明らかにすることは生命現象の分子レベルでの理解に不可欠であるにもかかわらず，有効な手法の欠如によってこれまで研究が進んでいなかった．本研究では常磁性ランタニドプローブ法を駆使し，3つのドメインから構成される47 kDaマルチドメインタンパク質MurDの立体構造の変化を迅速かつ定量的に解析することを試みた．

方法

47 kDa MurDに対してドメイン分割による信号帰属を行った．Domain 1+2, domain 2, domain 3の3種のコンストラクトを作成し，三重共鳴法を主体とした一般的な手法によってドメインごとに主鎖アミド信号の帰属を行った．全長MurDに対しても三重共鳴測定，NOESY測定を行い，ドメインごとの帰属を参照しながら信号帰属を行った (Fig. 2)．リガンド結合に伴うMurDの構造変化を解析するために常磁性ランタニドプローブ法を用いた．常磁性ランタニドイオンを対象タンパク質に結合させることで，イオンを中心として約40 Å以内という広範囲においてpseudocontact shift (PCS) などの常磁性効果を観測し，そこからタンパク質中の観測核の位置情報を得ることができる (Saio *et al.* 2010 and 2011)．ランタニドイオンの固定にはCaged Lanthanide NMR Probe-5 (CLaNP-5) (Keizers et al. 2008) を用いた．MurDの立体構造に基づいて，domain 2上の互いに近接した2つのアミノ酸残基をシステインに変異させ，タグを導入した．常磁性ランタニドイオンとしてYb^{3+}またはTm^{3+}をMurDに固定し，反磁性ランタニドイオンLu^{3+}を固定した場合との化学シフト差をとることでPCSを観測した．ランタニドイオンを固定したMurDに対してリガンド (ATP, ADP, UMA, D-Glu) を滴定し，そのときのPCS変化を観測した．各種リガンドに対する親和性をNMR滴定実験とITCによって検証した．

結果・考察

ランタニドイオンを固定したMurDに対して各種リガンドの滴定を行ったところ，domain 3由来の信号から大きなPCS変化が観測された (Fig. 1)．これよりリガンドの結合によってdomain 3の配向が大きく変化していることが示唆された． より詳細な解析から，MurDのdomain 3は溶液中で主にopen状態として存在し，リガンドの結合によって，semi-closedまたはclosedの状態をとることが明らかになった．また，ATPやADPの結合によってUMAへの親和性が高くなり，ADPとUMAの結合によってD-Gluへの親和性が高くなることがITCならびにNMR滴定実験より明らかになった．各状態においてdomain 3の配向状態が異なることから，MurDはリガンドとの結合に伴ってdomain 3の配向を大きく変えることにより，他のリガンドとの親和性を変調し，すなわちリガンドの結合の順序を制御していると考えられる．

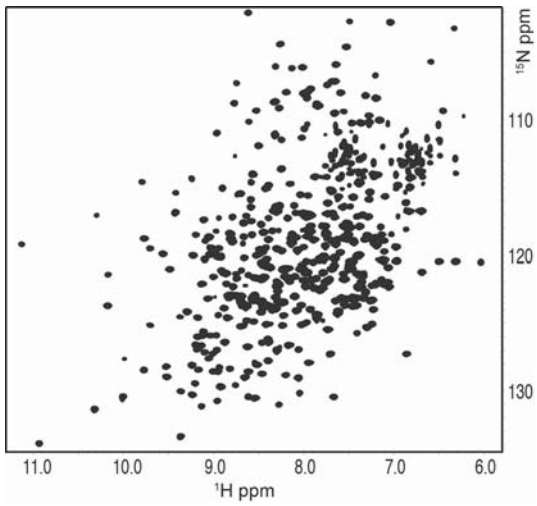


Fig. 2 $^{1}H^{15}N$-TROSY-HSQC of $^{2}H^{15}N$ MurD.

引用文献

Keizers PH *et al. J Am Chem Soc.* **130**, 14802-12 (2008)
Saio *et al. J Biomol NMR*. **46**, 271-280 (2010)
Saio *et al. J Biomol NMR*. **51**, 395-408 (2011)

ポスター発表要旨

Poster Abstracts

P1

Sf9細胞のin-cell NMRによる蛋白質の立体構造解析の試み

○田中　孝[1,2], 池谷　鉄兵[1,2], 濱津　順平[1], 三島　正規[1,2], Peter Güntert[1,2,3], 伊藤　隆[1,2]

[1]首都大学東京　大学院理工学研究科, [2]CREST/JST

[3]Goethe-University Frankfurt

Toward the structure determination of proteins inside living sf9 cells using a baculovirus protein expression system

○Takashi Tanaka[1,2], Teppei Ikeya[1,2], Jumpei Hamatsu[1], Masaki Mishima[1,2], Peter Güntert[1,2,3] and Yutaka Ito[1,2]

[1]Department of Chemistry, Tokyo Metropolitan University, Tokyo, Japan.

[2]CREST/JST

[3]Institute of Biophysical Chemistry, Goethe-University Frankfurt, Frankfurt am Main, Germany

Abstract

We have introduced a novel approach for eukaryotic in-cell NMR experiments by employing the sf9 cell/baculovirus system, and demonstrated that approximately 80 % of the backbone NMR resonances of *Streptococcus* protein G B1 domain (GB1) could be assigned exclusively from the in-cell NMR spectra. Further the extended life time of sf9 cells during the NMR experiments by using the BIOREACTOR system has enabled us to observe well resolved 3D NOESY spectra of GB1 in sf9 cells.

In this presentation, we present the assignments of side-chain $^{1}H/^{13}C$ resonances of GB1 in sf9 cells by analysing the 3D triple-resonance NMR spectra. Trial structure calculations of GB1 in sf9 cells from NOE-derived distance restraints will also presented. Although further refinement processes with additional restraints are required, the emerged 3D structures from CYANA calculations were well-converged with a backbone root mean squared deviation of 0.95Å to the mean coordinates.

【序】

真核細胞のin-cell NMRは, 最初にカエル卵母細胞[1,2]で行われたのち, ヒト培養細胞[3,4,5]を用いた測定の報告がなされ, 現在では様々な生命現象の解析に適用されるに至っている. 一方で, これらの手法では, 標的蛋白質を外部から細胞内へ導入するために, 高濃度に濃縮可能で安定な蛋白質にのみ適用可能という制約があった. この問題を解決し, in-cell NMR解析が可能な蛋白質の範疇を広げるための一つのアプローチとして, 真核細胞内発現系を用いた手法の開発が行われてきた.

真核細胞発現系を用いたin-cell NMRは, 2012年にBartrandらによってメタノール資化性酵母*Pichia pastoris*を用いた2D ^{1}H-^{15}N HSQC測定が報告された[6]のとほぼ同時期に, 私たちのsf9/baculovirusの系[7]およびHEK293細胞の系[8]が報告された. 私たちは non-linear samplingとQMEを用いることで, sf9内で発現させた連鎖球菌protein G B1ドメイン（GB1）の良好な3D triple-resonance NMRスペクトルの測定に成功し, in-cell NMRスペクトルのみを用いて主鎖シグナルの約80%の帰属を行った. また, BIOREACTORシステム[3]を用いたところ, 大幅な測定時間の伸長が可能となり, より高感度で高分解能

---

in-cell NMR, sf9, structure determination

○たなか　たかし, いけや　てっぺい, はまつ　じゅんぺい, みしま　まさき, ぺーたー　ぎゅんたーと, いとう　ゆたか

なNOESYスペクトルの取得にも成功した.
今回は, BIOREACTORシステムを用い, 側鎖シグナル解析のための3D triple-resonance NMRスペクトル測定と解析を行った結果, $^{1}H^{\alpha}$, $^{1}H^{\beta}$, $^{13}C^{\beta}$シグナルの約70%の帰属に成功した. また, 3D NOESY測定によって現在までに得られているNOE情報を用い, 立体構造計算を試みたので, これも併せて報告する.

【実験】

試料調製は以下のように行った. GB1遺伝子をポリヘドリンプロモーター下に組み込んだbaculovirusを, 3.0×10^{7}個のsf9細胞に接種し振盪培養した. 24 hr後に$^{13}C/^{15}N$標識培地に交換し, 更に24 hr培養した. 得られたsf9細胞は, 遠心分離によって培地を取り除いた後, 200 μLのMebiol gelに懸濁した. これをNMR試料管に封入し, BIOREACTORシステムを構築した.

NMR測定は以下のように行った. $^{1}H^{\alpha}$, $^{1}H^{\beta}$, $^{13}C^{\beta}$の帰属のために, 3D HCACO, 3D HBHA(CBCACO)NH, 3D CBCA(CO)NHの測定を行った. 測定は全てnonlinear samplingを用いて行い, データ処理はAzaraおよびQMEソフトウエアを, スペクトルの解析はCcpNmr Analysisを用いた. 測定前後には試料の安定性等の確認のため, 2D ^{1}H-^{15}N SOFAST-HMQCを測定した.

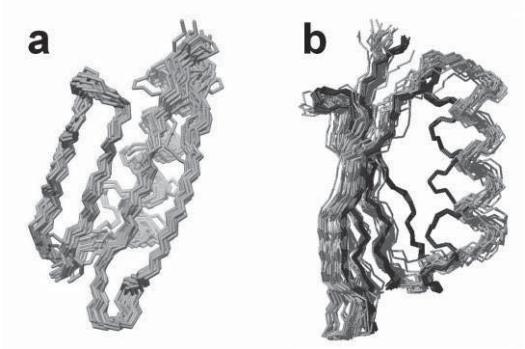


Figure 1. a. A superposition of the 20 final structures of GB1 in living sf9 cells, showing the backbone (N, C^{α}, C') atoms. **b.** A comparison of GB1 structures in living sf9 cells (grey) and *in vitro* (black).

【結果および考察】

HCACO, HBHA(CBCACO)NH, CBCA(CO)NHとも比較的良好なスペクトルを得ることに成功した. 試料の安定性の観点からは, 測定前後で主鎖アミドシグナルのパターンに大きな変化は無く, 測定後の細胞試料の生存率も80%程度と良好であった. これらの3D triple-resonance NMRスペクトルを解析した結果, $^{1}H^{\alpha}$については84%, $^{1}H^{\beta}$については60%, $^{13}C^{\beta}$については72%程度の帰属に成功した.

^{15}N標識sf9試料を用いて測定した3D ^{15}N-separated NOESYスペクトルと, メチル基選択的$^{1}H/^{13}C$標識sf9試料を用いて測定した3D $^{13}C/^{13}C$-separated NOESYスペクトルを用いたこれまでの解析から, 約140の距離情報が得られている. 解析の際に用いた側鎖^{1}Hの帰属は, 今後同程度の帰属が可能であると仮定し, 大腸菌内GB1の帰属を用いて補完した. これらのNOE由来の距離情報と, TALOS由来の主鎖2面角の拘束条件, および3D ^{15}N-separated NOESYの解析から推定された水素結合に関する距離情報を用い, CYANAによる立体構造計算を行ったところ, 20個の構造アンサンブルの主鎖RMSDで0.95Å程度の構造を得た(Fig.1a.). sf9細胞内GB1の2D ^{1}H-^{15}N HSQCスペクトルにおける各クロスピークの化学シフトは試験管内とほぼ同一であることから, sf9細胞内のGB1の立体構造は試験管内と同一と考えられる. しかし, 両者の構造解析結果を比較すると, βシート構造に対するαヘリックスの相対配置などに有意な差がみられる. これは, 正確な立体構造を算出するに足る高次構造がまだ不足しているためであると考えている. 今後は, 更に良好なNOESYスペクトルの取得に取り組むとともに, 側鎖シグナル帰属のために3D HCCH-TOCSY等の測定・解析を進め, sf9細胞内GB1の帰属データのみに基づく正確な立体構造解析を目指す.

References: [1] Selenko, P. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 11904-11909 (2006); [2] Sakai, T. et al. *J. Biomol. NMR* **36**, 179-188 (2006); [3] Kubo, S. et al. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **52**, 1208-1211 (2013); [4] Inomata, K. et al. *Nature* **458**, 106-10(2009); [5] Ogino, S. et al. *J. Am. Chem.Soc.* **131**, 10834-10825 (2009); [6] Bertrand, K. et al. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 12798-12806 (2012); [7] Hamatsu, J. et al. *J.Am. Chem. Soc.* **135**, 1688-1691 (2013); [8] Banci, L. et al. *Nat. Chem. Biol.* **9**, 297-299 (2013).

P2

HeLa細胞およびSf9細胞のin-cell NMR測定のためのバイオリアクターシステムの検討

○石川　真帆[1], 鴨志田　一[1,2], 田中　孝[1,2], 池谷　鉄兵[1,2], 三島　正規[1,2]
伊藤　隆[1,2]
[1]首都大学東京　大学院理工学研究科
[2]CREST/JST

Bioreactor-system for in-cell NMR experiments of proteins in HeLa and Sf9 cells

○Maho Ishikawa[1], Hajime Kamoshida[1,2], Takashi Tanaka[1,2], Teppei Ikeya[1,2], Masaki Mishima[1,2], and Yutaka Ito[1,2]
[1]Department of Chemistry, Tokyo Metropolitan University, Tokyo, Japan.
[2]CREST/JST

Recent developments in in-cell NMR techniques have allowed us to study proteins in detail inside living eukaryotic cells. The lifetime of in-cell NMR samples is however much shorter than that in culture media, presumably because of the nutrient depletion in the anaerobic environment within the NMR tube. The bioreactor-system, which provides fresh culture media into the NMR tube continuously, has been proved to be effective for extending the life time of HeLa S3 cells.

In this study, we tried to optimise the various parameters of the bioreactor-system for the in-cell NMR experiments using another eukaryotic cultured cells, HeLa and Sf9. By assessing the cell viability and the protein leakage from the cells we could established the conditions suitable for the in-cell NMR studies using HeLa and Sf9 cells with longer experimental duration.

【序論】

In-cell NMRは, 生細胞内蛋白質の立体構造や相互作用を原子分解能で解析可能な現存する唯一の手段である. まず大腸菌の系で確立され, 現在では真核細胞の系でも可能になった[1,2,3,4,5]. しかし, 試料管中で高密度な状態で存在している細胞は, 溶存酸素濃度の減少や栄養分の枯渇により寿命が短いことが知られており, この問題が良好なNMRスペクトルを取得する妨げとなっていた. これに対して, HeLa細胞の亜種であり, 浮遊状態で培養可能なHeLa.S3細胞を, メビオールゲルを用いて固定し, 新鮮な培地を供給し続けるバイオリアクターシステム[1]によって, より長時間のin-cell NMR測定が可能になることが既に報告されている.

私たちはこれまで, 昆虫細胞Sf9（標的蛋白質を細胞内で発現）[6]やHeLa細胞（膜透過性ペプチドや電気穿孔法を用いて標的蛋白質を導入）[4]を用いたin-cell NMR解析を行ってきたが, バイオリアクターシステムをこれらの系にも適用することで, HeLa.S3細胞と同様に長時間のNMR測定が可能になることが期待される. 今回は, これらのin-cell NMRの系についての, バイオリアクターシステムの種々の条件の最適化について報告する.

In-cell NMR, Bioreactor-system

○いしかわ　まほ, かもしだ　はじめ, たなか　たかし, いけや　てっぺい, みしま　まさき, いとう　ゆたか

【実験および結果】

(1)HeLa細胞の系

ゲルと細胞を懸濁したものを，試料管内でコイル状に巻いた試料と，巻かずに円筒形に固定した試料を用い(**Figure 1**)，バイオリアクターシステムの有無による生存率の比較を行った．その結果，バイオリアクターシステムを用いた場合，試料調製から12時間後においても約80%生存していたことから，予想通り測定時間の大幅な伸長が可能であることが判明した．また，コイル状固定試料と，円筒形固定試料の生存率を比較したところ，コイル状固定試料の方が高い生存率を示した．実際にコイル状固定試料を用いて2D ^{1}H-^{15}N SOFAST-HMQCスペクトルを測定し,この手法の有用性を検証した．

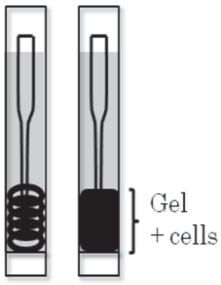


Figure 1. Schematic drawings of Mebiol gel-encapsulated cells in NMR tubes: cylindrical (right) and coiled (left) shapes.

(2)Sf9細胞の系

In-cell NMR測定のためのSf9細胞試料は，濱津らの報告[6]にしたがって調製した．得られたSf9細胞は，培地を取り除いた後，150~200μLのメビオールゲルに懸濁した．NMR試料管に封入した後に，バイオリアクターシステムを構築した．

HeLa細胞の場合と同様に，コイル状固定試料と，円筒形固定試料を作成し，バイオリアクターシステムを用いて生存率の比較を行った結果，HeLa細胞の結果とは異なり，Sf9細胞の系では，ゲルの形状による有意な生存率の変化は観測されなかった．

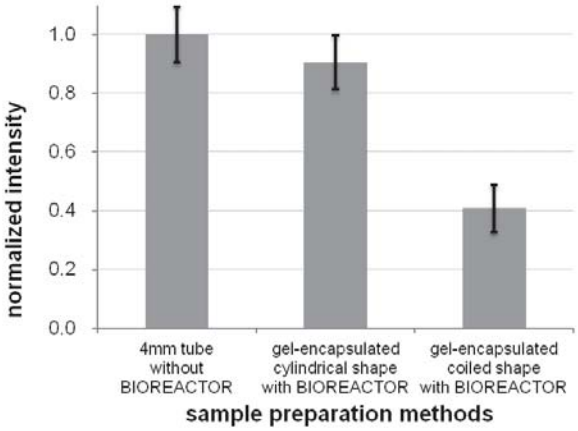


Figure 2. The comparison of the protein leakage level between three different sample preparation methods.

バイオリアクターシステムの利点の一つとして，細胞から漏れ出した標的蛋白質がNMR試料管にとどまらないために，細胞外蛋白質のスペクトルへの寄与が無視できることが挙げられている．そこで，細胞外への標的蛋白質の漏れ出しの観点からゲルの形状による比較を行った．具体的には，試料調製終了後から12時間ないし24時間後の測定試料について，NMR試料管に残っている上清を遠心によって回収し，2D ^{1}H-^{15}N SOFAST-HMQCスペクトルを測定した．結果として，円筒状固定試料では漏れ出し蛋白質が多くゲル内にとどまっているのに対し，コイル状固定試料では大きく軽減されていることが判明した(**Figure 2**)．

【考察】

HeLa細胞とSf9細胞の両方の系においてバイオリアクターシステムを用いた場合，当初予想していた通りに生存率が向上し，長時間のin-cell NMR測定が可能であることが示された．ゲルによる封入条件では，HeLa細胞に関してはコイル状の方が高い生存率を示しが，Sf9細胞に関しては大きな差が得られなかった．しかし，細胞からの蛋白質の漏れ出しを比較した場合，コイル状固定の方が優れていることが分かった．以上の結果から，HeLa細胞とSf9細胞どちらの系においても，ゲルをコイル状に巻いてバイオリアクターシステムを用いた方がよいということが示された．

Reference: [1] Kubo, S. et al. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **52**, 1208-1211 (2013); [2] Selenko, P. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 11904-11909 (2006); [3] Sakai, T. et al. *J. Biomol. NMR* **36**, 179-188 (2006); [4] Inomata, K. et al. *Nature* **458**, 106-10(2009); [5] Ogino, S. et al. *J. Am. Chem.Soc.* **131**, 10834-10825 (2009); [6] Hamatsu, J. et al. *J.Am. Chem. Soc.* **135**, 1688-1691 (2013)

P3

リジン側鎖の^{13}Cメチル化を用いた高速in-cell NMR測定法の開発

○中山　大輔[1]，西澤　茉由[1]，森本　大智[1]，菅瀬　謙治[1]，白川　昌宏[1]
[1]京都大学大学院・工学研究科

Fast in-cell NMR spectroscopy utilizing ^{13}C-methylation of lysine residues

○Daisuke Nakayama[1], Mayu Nishizawa[1], Daichi Morimoto[1], Kenji Sugase[1], and Masahiro Shirakawa[1]
[1]*Graduate School of Engineering, Kyoto University, Kyoto, Japan.*

In-cell NMR spectroscopy is a method to introduce target proteins into living cells and to observe them inside cells. Because in-cell NMR spectra should be measured within 3 hours, it is difficult to detect NMR signals of high molecular weight proteins in cells and to obtain their high-dimensional structural information. In this study, we aim to measure in-cell NMR spectra of high molecular weight proteins in a short time. Using ^{13}C-methylation of lysine residues in a protein, methyl-TROSY spectra are easier to detect, compared with other conventional isotope labeling schemes. We used ubiquitin as a model protein and observed in-cell NMR signals of its methylated lysine residues in 5 minutes. This method will be applied for high molecular weight proteins.

緒言

In-cell NMRとは、生きた細胞に観察対象のタンパク質を導入しNMRスペクトルを測定し、タンパク質の構造情報を取得する測定方法である。現在、in-cell NMRは、生きた細胞を用いるため測定時間は3時間以内と限られている。この時間的制約のために、高次元の構造情報を得ること、分子量の大きなタンパク質を測定することが困難である。そこで、細胞内における分子量の大きなタンパク質の測定をするため、methyl-TROSY法を用いた新たなin-cell NMR測定法の開発を目指した。メチル基は速く回転し、3つの^{1}Hスピンの化学シフト値が重なるために感度が他の官能基よりも高くなっている。さらにTROSY法では、スピン結合で分裂したコヒーレンスの中で緩和が遅いコヒーレンスのみを選択的に検出することで、高い分解能のスペクトルを得ることができる。本研究では、methyl-TROSY法を用いて^{13}Cメチル化リジンの測定を行うことで、ヒト細胞内の目的タンパク質を高速に測定することを目的とした。

実験方法

モデルタンパク質としてユビキチン(L8A, I44A, V70A変異体)を用いた。ユビキチンに^{13}C標識ホルムアルデヒドとDMAB　(dimethylamine-borane complex)を加えることで、ユビキチンに存在する7つのリジン側鎖とN末端を^{13}Cジメチル化した (ref. 1)。質量分析により、メチル化反応前後の分子量を測定することで、7つのリジン側鎖とN末端が完全にメチル化されていることを確認した。

その後、この^{13}Cメチル化したユビキチンを細胞数2×10^{6} cell、タンパク質濃度500 μMの条件で、エレクトロポレーション（電気穿孔）法を用いてHeLa細胞に導入した。導入後、37℃で5時間培養した後、細胞をディッシュから剥離し、NMR測定管に充填し、SOFAST-methyl-TROSYスペクトルを5分間で測定した (ref. 2)。測定後の細胞生存率は87%であった。また、測定後の上清、細胞破砕液、ユビキチンを導入していない細胞についても、同様の条件の下で、SOFAST-methyl-TROSYスペクトルを測定した。

in-cell NMR

○なかやまだいすけ，にしざわまゆ，もりもとだいち，すがせけんじ，しらかわまさひろ

実験結果と考察

^{13}Cメチル化ユビキチンを導入したHeLa細胞のNMRスペクトルにおいて、導入したユビキチンのリジン側鎖に付加したメチル基のシグナルが確認できた (Fig. a)。また、測定後の上清を測定すると、^{13}Cメチル化ユビキチンに由来するシグナルは確認されなかった (Fig. b)。この結果より、観測されたシグナルはHeLa細胞内に導入した^{13}Cメチル化ユビキチンのシグナルであると考えられる。したがって、methyl-TROSY法を用いることによって細胞内のユビキチンを5分という短時間で測定することに成功した。また、K11とK27のピークにおいて、細胞内と試験管内で顕著に違いが観察できた。これはユビキチンが細胞内物質と相互作用し、リジン側鎖の環境に差異が生じたためと考えられる。

今後、本実験によって開発された測定法を用いて、細胞内で高分子量タンパク質の測定を行う予定である。

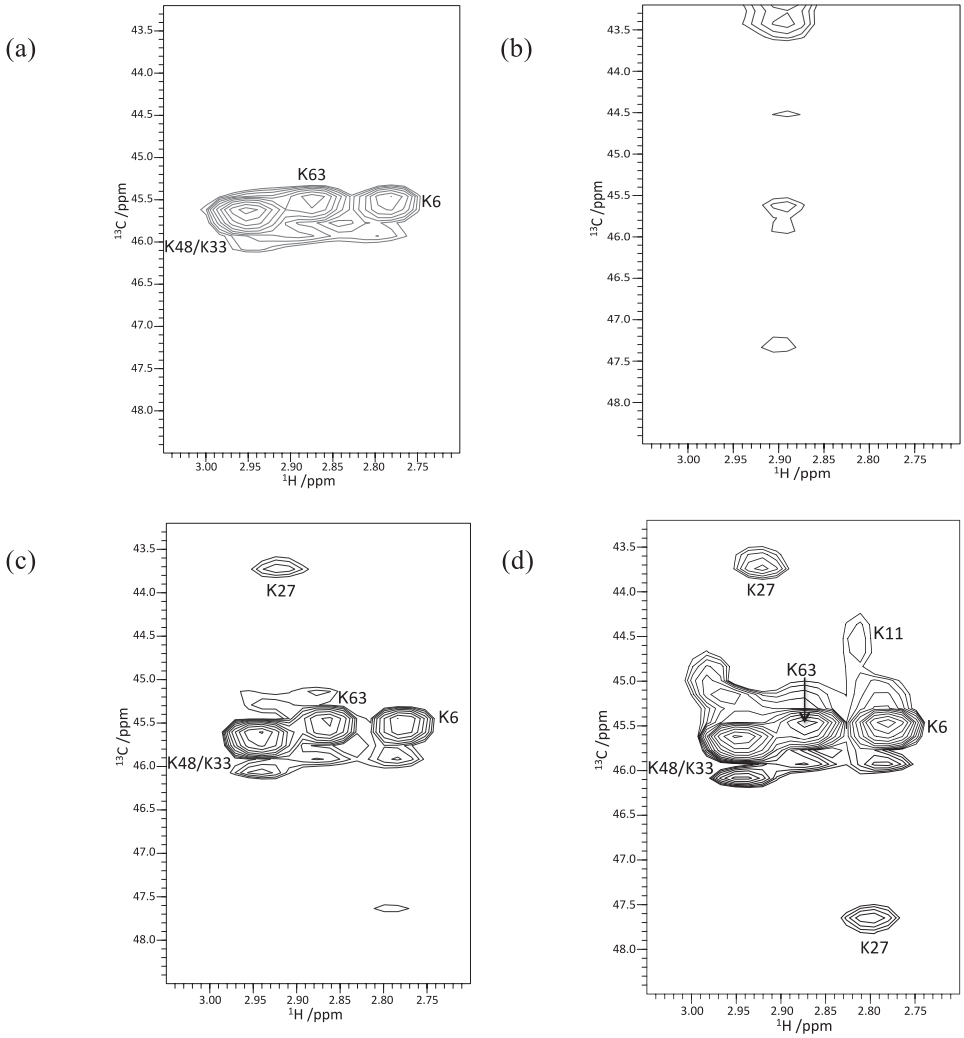


Figure. SOFAST-methyl-TROSY spectra of ^{13}C-methylated ubiquitin.

a, in-cell (5 min); **b**, supernatant; **c**, lysate; **d**, *in vitro* (100 μM).

***a**, **c** : NMR spectra were processed by subtracting NMR spectra of untreated cells.

参考文献

[1] Hattori, *et al. J Biomol NMR*. 2013. **55**. 19-31.

[2] Amero, *et al. J. Am. Chem. Soc.* 2009. **131**. 3448-3449.

P4

ヒト培養細胞を用いた異種核 3 次元 in-cell NMR 測定

○鴨志田　一[1,2], 井上　仁[1,2], 猪股　晃介[3,4], 新井　崇一郎[1], 池谷　鉄兵[1,2], 三島　正規[1,2], 伊藤　隆[1,2]

[1] 首都大学東京　大学院理工学研究科, [2]CREST/JST

[3] 理化学研究所　生命システム研究センター, [4]PRESTO/JST

Heteronuclear multi-dimensional in-cell NMR in cultured human cells

○Hajime kamoshida[1,2], Jin inoue[1,2], Kohsuke Inomata[3,4], Souichiro Arai[1], Teppei Ikeya[1,2], Masaki Mishima[1,2] and Yutaka Ito[1,2]

[1]Department of Chemistry, Tokyo Metropolitan University, Japan, [2]CREST/JST

[3]Quantitative Biology Center, RIKEN, [4]PRESTO/JST

Recent developments in in-cell NMR techniques have allowed us to study proteins in details inside living eukaryotic cells. However the low intracellular concentration of target proteins which are incorporated into cells from outside and the short life time of cells in NMR tubes have so far prevented us from performing high resolution nD NMR experiments, such as 3D triple-resonance NMR.

In this study, to the best of our knowledge, the measurement of 3D HNCO spectra was accomplished with reasonable sensitivity in cultured human cells for the first time. We have used *Streptococcus* protein G B1 domain as a model system. The optimisation of electroporation parameters and the rapid data collection using nonlinear sampling were key for the success of this approach.

【緒言】

In-cell NMR は, 生細胞内蛋白質の立体構造やダイナミクスを高分解能で観測できる唯一の手法として注目されている. 大腸菌を用いた in-cell NMR では, 標的蛋白質を安定同位体標識培地中で大量発現させ, 異種核多次元 NMR を用いて解析を行う. 大腸菌の in-cell NMR 解析例としては, 私たちのグループにおいて, 高度好熱菌 TTHA1718 遺伝子産物[1]および連鎖球菌 protein G B1 ドメイン（GB1）について, 詳細な立体構造が既に決定されている.

真核細胞の in-cell NMR 実験の際には, 細胞内で安定同位体標識蛋白質を発現させる方法と, 精製した標識蛋白質を細胞外から導入する方法がある. 前者の例としては, 私たちのグループによる Sf9/baculovirus の系[2]が, 後者の例としては細胞膜透過性ペプチド（CPP）や細胞膜破壊酵素 SLO を用いてヒト培養細胞に標識蛋白質を導入する方法が既に実用化されている. しかし, これらの手法を用いて外部から蛋白質を導入する場合, 通常は達成できる標的蛋白質の細胞内濃度が低く, 結果として, 例えば 3D NMR 測定技術を駆使した詳細な解析は不可能であった. 一方で, 真核細胞における様々な蛋白質の動態変化を詳細に解析するために, 異種核多次元 in-cell NMR スペクトルの誤りのない帰属を可能にする手法の確立が望まれていた. 私たちは, 様々な要素技術を改良することによって, ヒト培養細胞に導入した蛋白質の 3D triple-resonance NMR 測定と, それを用いた蛋白質主鎖 NMR シグナルの帰属を実現することを目指している.

電気穿孔法, GB1, HNCO

○かもしだ　はじめ, いのうえ　じん, いのまた　こうすけ, あらい　そういちろう, いけや　てっぺい, みしま　まさき, いとう　ゆたか

【方法】

ヒト培養細胞としては，HeLa 細胞および HeLa.S3 細胞を用いた．細胞内に導入する蛋白質としては，TTHA1718，GB1，ヒト calbindin D_{9k} などを用いた．細胞内導入法としては電気穿孔法を選択し，invitrogen 社の Neon 装置を用いて種々の条件検討を行った．In-cell NMR 測定による細胞内導入効率の検討は，Bruker 社 Avance III 600MHz 装置（cryoprobe 装備）を用い，^{1}H-^{15}N SOFAST-HMQC スペクトルを測定することで行った．良好な試料／条件については 3D HNCO スペクトルの測定を試みた．NMR データの取得の際は nonlinear sampling を用い，データ処理は Azara および QME ソフトウエアを用いた．データ解析は CcpNmr Analysis ソフトウエアを用いた．

【結果】

条件検討の結果，標的蛋白質として GB1 を用い，電気穿孔の条件として，1300V／30msec／1pulse（HeLa 細胞），1700v／20msec／1pulse（HeLa.S3 細胞）を用いた際に最も良好な結果が得られた．Fig.1 には，HeLa 細胞を用いた際の 2D ^{1}H-^{15}N SOFAST-HMQC スペクトルを示した．次に NMR 測定時の生存率が 80%以上であること，および細胞外への標的蛋白質の漏れ出しが無視できるほど小さいこと，の 2 点を指標にして，通常の NMR 試料管を用いた際の測定可能な時間を見積もった結果，HeLa 細胞および HeLa.S3 細胞とも 3～4.5 時間となった．次に，上記の最適条件を用いて GB1 を HeLa.S3 細胞に導入し，測定時間 3 時間で 3D HNCO スペクトルの測定を行ったところ，良好なスペクトルが得られた（Fig.2）．

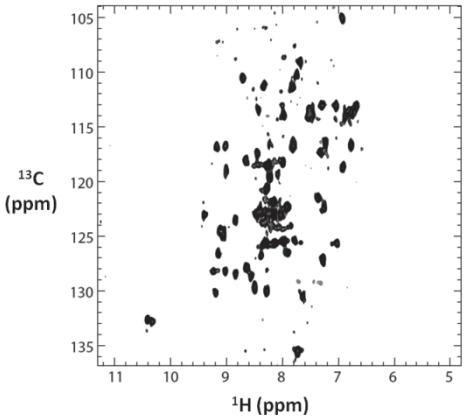


Fig.1. 2D ^{1}H-^{15}N SOFAST-HMQC spectrum of GB1 in HeLa cells. The ^{15}N-labelled GB1 was incorporated by electroporation.

【考察】

HeLa.S3 細胞を用い，最適化された条件で電気穿孔による蛋白質導入を行うことで，良好な 3D HNCO スペクトルの測定が可能であることが示された．GB1 よりも導入効率が低い蛋白質については，BIOREACTOR システムなどを用いて細胞の生存率を上げ，長時間測定を行うことで，3D HNCO スペクトルの取得が可能になると考えられる．さらに，GB1/HeLa.S3 の系で，3D HNCA の測定を試みたが，現在のところ良好な 3D スペクトルの取得には至っていない．現在，GB1 試料の安定同位体標識法，NMR 測定法などの種々の要素技術の検討を行っており，3D HNCA スペクトルを用いた世界初のヒト培養細胞内蛋白質の主鎖 NMR シグナルの帰属を目指している．

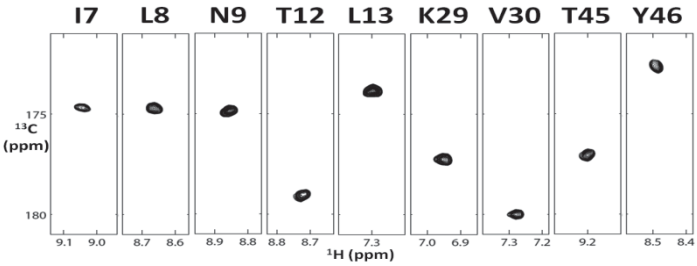


Fig.2. 2D (^{13}C'-^{1}H^{N}) strips of a 3D HNCO spectrum of GB1 in HeLa.S3 cells. The ^{13}C/^{15}N-labelled GB1 was incorporated into cells by electroporation.

【参考文献】

1. Sakakibara, D. et al., *Nature* 458, 103-105 (2009)
2. Hamatsu, J. et al., *J. Am. Chem. Soc.* 135, 1688-1691 (2013)

P5

タンパク質結合状態における低分子化合物の動的構造解析手法の開発

○徳永 裕二[1]，竹内 恒[2]，滝沢 剛[3]，半沢 宏之[3]，嶋田 一夫[4]
[1]次世代天然物化学技術研究組合
[2]産業技術総合研究所　創薬分子プロファイリング研究センター
[3]第一三共 RD ノバーレ株式会社
[4]東京大学大学院薬学系研究科

Development of the methodology for dynamic structural analyses of small compounds in complex with target proteins

○Yuji Tokunaga[1], Koh Takeuchi[2], Takeshi Takizawa[3], Hiroyuki Hanzawa[3], and Ichio Shimada[4]
[1]*Technology Research Association for Next Generation Natural Products Chemistry*
[2]*Molecular Profiling Research Center for Drug Discovery, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology*
[3]*Daiichi Sankyo RD Novare Co., Ltd*
[4]*Department of Pharmaceutical Sciences, the University of Tokyo*

Atomic-resolution information about dynamics and spatial complementarity of small compounds in the binding pocket of target proteins is essential for the optimization of drug candidates. Here, we developed a solution NMR-based approach for obtaining such information by utilizing the forbidden coherence transfer (FCT) among the three equivalent protons of CH_3 moieties. We applied the FCT strategy to inhibitors in the binding pocket of MAP kinase p38α. The methyl order parameters (S^2_{axis}) of a non-labeled compound in deuterated p38α bound state were successfully determined from one-dimensional FCT experiments. In addition, site-specific $^{13}C/^{2}H$ labeling of compounds enabled the determination of S^2_{axis} with high accuracy. The spatial complementarity was estimated by using partially protonated p38α samples. Based on these data, we discuss dynamic aspects of the compounds, which would not be elucidated from a static picture deduced from crystallography.

序論

薬剤の標的タンパク質に対する特異性および変異抵抗性を向上させる最適化を経た化合物は、特異的結合の導入によるエンタルピーの寄与増大と化合物運動性低下によるエントロピーの寄与低下により熱力学的に特徴づけられることが経験的に明らかとなってきている．したがって、タンパク質結合時の低分子化合物の運動性および空間相補性情報、即ち“動的構造情報”の活用により、創薬における化合物最適化過程の大幅な加速・効率化が期待される．しかしながら、低分子化合物の多様かつ複雑な化学構造における部位特異的な動的構造情報を、標的タンパク質に結合し高分子量化した状態にて解析する技術は存在せず、新規技術の開発は喫緊の課題である．本研究では、溶液 NMR 法を用い、化合物メチル基の禁制コヒーレンス遷移（FCT）効率の測定から、当該メチル基の運動性を反映するオーダーパラメータS^2_{axis}、および空間相補性を反映する周辺プロトン密度を決定する方法論を考案した(図 1a)．本手法をキナーゼの阻害化合物に適用することにより、結晶構造からは分からない化合物の結合ポケットにおける運動性情報を取得した．

低分子化合物，動的構造解析，禁制コヒーレンス遷移

○とくながゆうじ，たけうちこう，たきざわたけし，はんざわひろゆき，しまだいちお

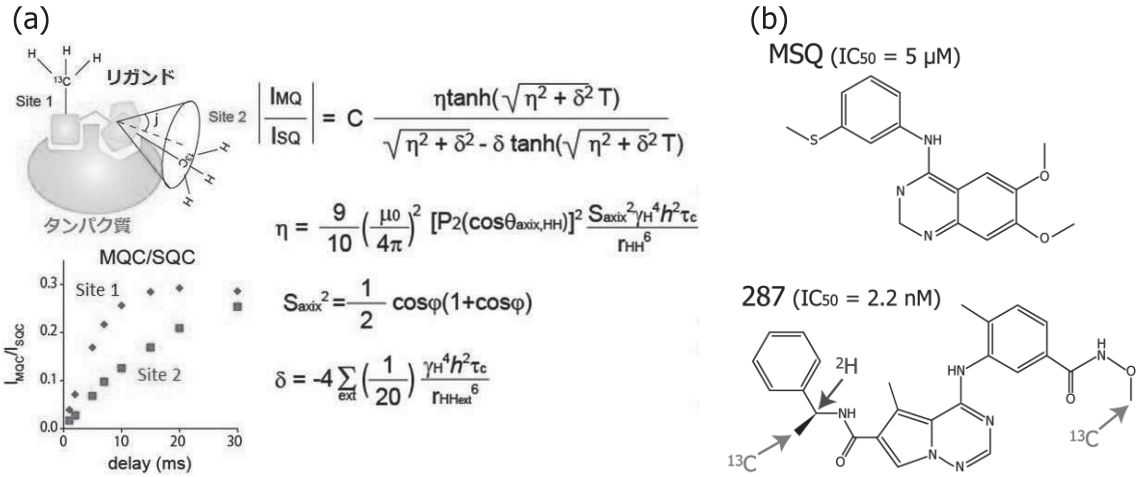


Figure 1. (a) A schematic image of the FCT analysis. (b) Chemical structures of p38α inhibitors. Isotope labeling sites in 287 are indicated by arrows.

方法

FCT 解析では、一量子コヒーレンス（1QC）遷移および三量子コヒーレンス（3QC）遷移効率の相対比 3QC/1QC 比を測定した．FCT 効率は回転相関時間に依存するため、見かけの分子量が増大する標的タンパク質結合時の化合物の情報が選択的に得られる．また、FCT 効率は当該メチル基の可動域を反映するS^2_{axis}、およびメチル基周辺、即ち近接するタンパク質上のプロトンとの双極子間相互作用（プロトン密度）に依存するため、FCT 効率のデータには運動性および空間相補性の情報が反映される（図 1a；それぞれ η および δ 項）．標的タンパク質としては MAP キナーゼ p38α を用いた．阻害化合物として、分子内に複数のメチル基を有し、かつ p38α との複合体結晶構造が報告されている MSQ および 287 を用いた（図 1b）．p38α のILV メチル基の化学シフト摂動実験より、これらの化合物が結晶構造における p38α の結合部位に結合していることを確認した．287 については、メチル基選択的 ^{13}C 標識および部位特異的重水素標識を施した．S^2_{axis}は、重水素化 p38α 結合状態における 3QC/1QC 比の混合時間依存性データを理論式にフィッティングすることにより決定した．一方、プロトン密度は、p38α の重水素化率を変化させた条件における FCT 解析より決定した．

結果

(1) 非標識 MSQ を対象とした一次元 FCT 解析による S^2_{axis} の決定

まず、重水素化 p38α 結合状態における非標識 MSQ の FCT 解析を実施した．p38α が重水素化された条件では、一次元スペクトル上にて化合物メチル基のシグナル強度を定量可能であった（図 2a）．得られた 3QC/1QC 比の混合時間依存性解析から、メチル基の S^2_{axis} を決定することに成功した（図 2b）．一方、1QC スペクトル上では、重水素化 p38α の残余プロトンに由来するバックグラウンドシグナルがベースラインを上昇させ、化合物シグナルの正確な定量の障害となった．そこで、[U-^{2}H/^{13}C] p38α を用いた ^{13}C フィルター実験を検討した．この結果、^{13}C 核とのカップリングを持たない MSQ のメチルシグナルは 80% 以上の強度を保持した一方、p38α に由来するバックグラウンドシグナルは 20% 以下に低下し、より高精度での FCT 解析が可能となった（図 2c）．同様に、拡散フィルターによるバッファーシグナルの除去も検討した．この結果、p38α 結合状態の MSQ シグナル強度の減少率は約 50% に留まった一方、水および DTT に由来するシグナルはほぼ消失し、Tris バッファーに由来するシグナルは約 25% に抑制され、化合物シグナルをより選択的に解析可能となった（図 2d）．各種フィルター実験から得られた S^2_{axis} は、フィルター無しの場合と同等であった（図 2e）．

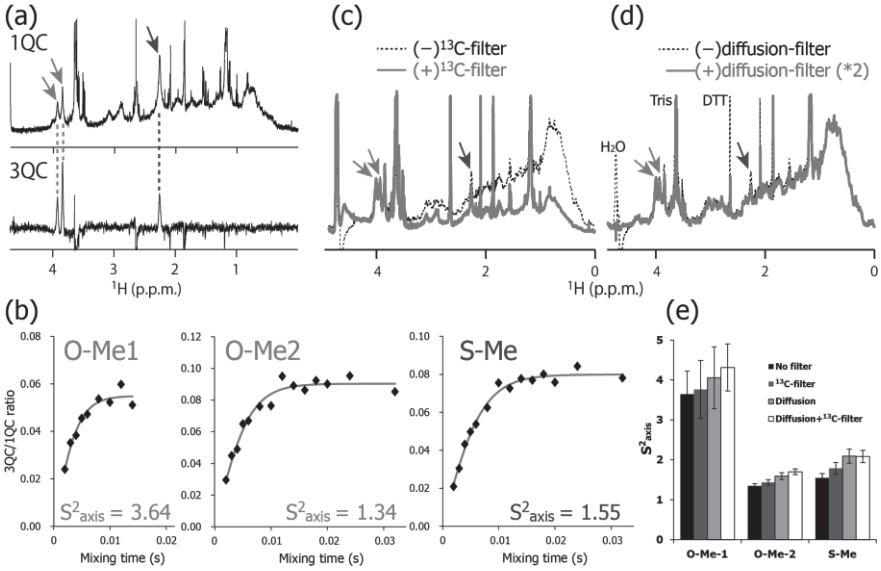


Figure 2. 1D-FCT analysis of the unlabeled MSQ. (a) 1QC and 3QC spectra. (b) 3QC/1QC ratio of three methyl signals of MSQ dependent on the mixing time. (c, d) Removal of background signals by introducing (c) ^{13}C and (d) diffusion filters.

(2) [methyl-$^{13}C_2$, $^2H_1$] 287 を対象とした二次元 FCT 解析による動的構造情報の取得

次に、安定同位体標識を施した 287 を用いて、二次元 ^{1}H-^{13}C 相関スペクトルに基づく FCT 解析を実施した．まず、2 箇所のメチル基への ^{13}C 標識導入の結果、287 のメチルシグナルは二次元 ^{1}H-^{13}C 相関スペクトル上にて p38α 等に由来するバックグラウンドシグナルと完全に分離して観測可能となった（図 3a）．特に、重水素化されていない非標識 p38α 結合状態においても 287 のメチルシグナルを分離観測可能となったことから、p38α の重水素化率を変化させることによりメチル基周辺のプロトン密度情報を取得することが可能となる．標識メチル基の二次元 FCT 解析を実施した結果、O-Me の S^2_{axis} を決定できた一方、ali-Me の 3QC/1QC 比のプロファイルは単調な立ち上がりを示さず、フィッティングが困難であった（図 3b）．この原因は、ali-Me のメチルプロトンと、根元の不斉炭素原子に結合したプロトンの間の $^3J_{HH}$ のコンタミネーションであると考えられた．そこで、次に、当該プロトンを重水素に置換し、$^3J_{HH}$ を除去した条件にて FCT 解析を実施した．この結果、ali-Me においても S^2_{axis} を高精度に決定できた（図 3c）．さらに、部分的に軽水素を含む p38α を用いた実験より、287 メチル基周辺の p38α のプロトン密度を決定した（図 3d）．

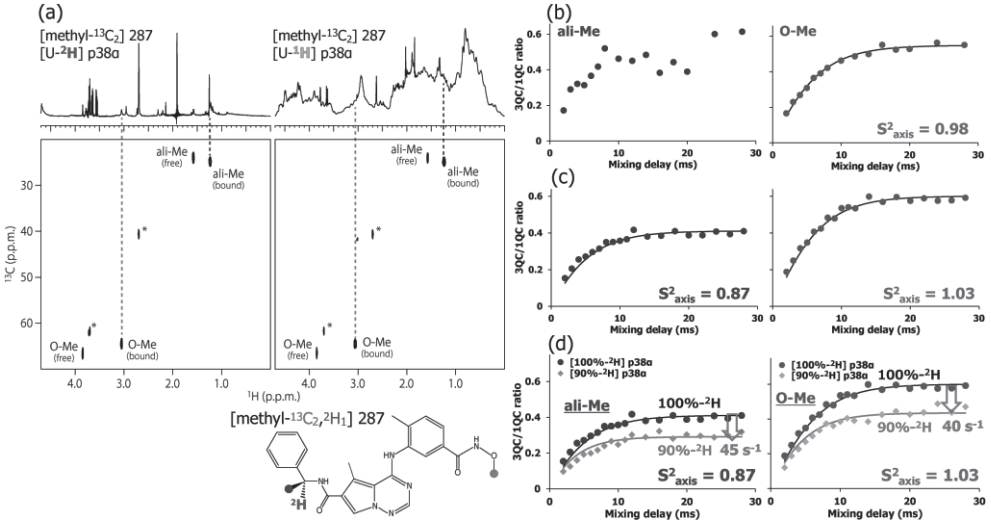


Figure 3. 2D FCT analysis of the isotopically labeled 287. (a) ^{1}H-^{13}C HSQC spectra of [methyl-$^{13}C_2$] 287 in complex with p38α. (b-d) 3QC/1QC ratio profiles of 287. (b) [methyl-$^{13}C_2$] 287 in complex with [U-^{2}H] p38α. (c, d) [methyl-$^{13}C_2$, $^2H_1$] 287 in complex with (c) [U-^{2}H] and (d) [90%-^{2}H] p38α.

考察

MSQ の S^2_{axis} は 1 を超え、定量的な解釈が困難であった．これは MSQ の凝集性に起因する分子量増大が原因と考えられるため、今後、溶媒条件の工夫等により凝集性を改善する、または凝集状態における見かけの回転相関時間を決定することにより、定量的解釈に堪えるデータを取得することが必要である．結晶構造中では同等の温度因子を有する MSQ の 2 個の O-Me 基は、FCT 解析では顕著に異なる S^2_{axis} を示した（3.64 および 1.34）．これら 2 個の O-Me の運動性の違いは、結晶構造中にて一方は p38α に、他方は溶媒側に向いている環境の差異に由来すると考えられる（図 4a）．このように、FCT 解析により、結晶構造には反映されない溶液中での化合物の部位特異的な運動性情報を取得可能であることが示された．

287 では、ポケット深部（O-Me）および表面に露出した（ali-Me）メチル基は、いずれも高い S^2_{axis}（1.03 および 0.87）を示し、顕著に運動性が抑制されていた．Ali-Me 部分の不斉結合についてのエナンチオマーは p38α 阻害活性が 100 分の 1 に低下することから、当該不斉結合周辺の厳密な原子配置は決定的である（図 4b, c）．したがって、表面に露出した官能基といえども、活性最適化のためにはその動的挙動を把握する重要性が示唆された．また、FCT 解析から得られた、O-Me の周辺プロトン密度を反映する双極子間相互作用の大きさ（$\delta = 40\ s^{-1}$）は ali-Me（45 s^{-1}）と同等であった．このことから、O-Me はポケット深部でありながら、さらに構造を伸長させる余地のあることが示唆された．実際に、O-Me 部分を 6 員環に拡大した化合物 P39 は、p38α に対し、287 と比較して約 5 倍の親和性にて結合する先行知見と一致する（図 4b）．この時、p38α の Phe-169 は溶媒側へ露出し、ポケットが拡大した特異な構造を形成する（図 4d）．上記の FCT 解析にて 287 の O-Me の δ 項が小さかったことは、このようなポケットの拡大した特異な構造との構造平衡に由来する可能性が考えられる．

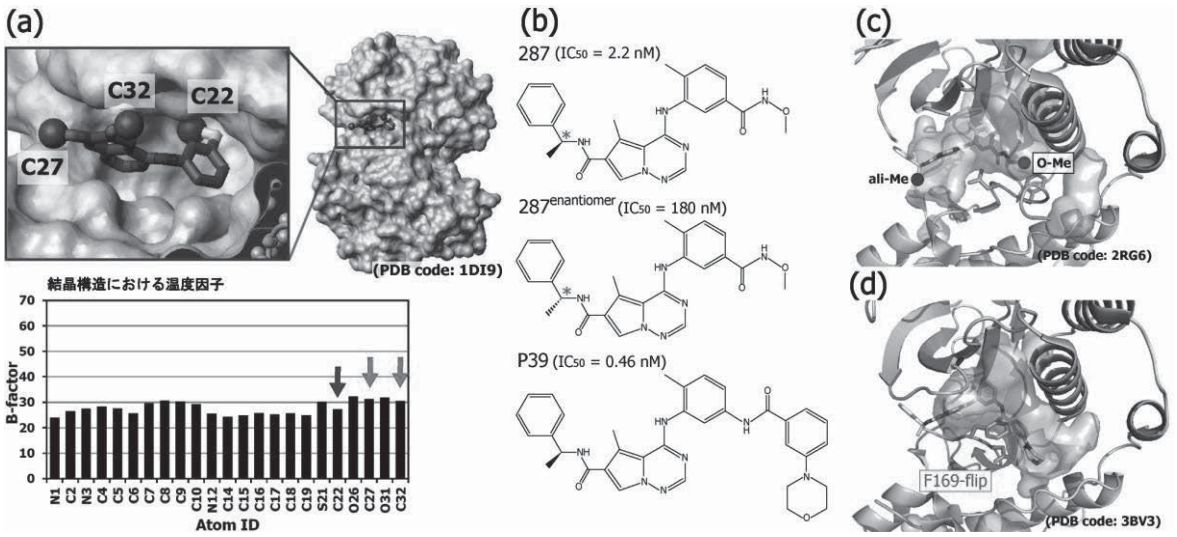


Figure 4. Interpretation of the FCT data. (a) The crystal structure of p38α-MSQ complex (PDB code: 1DI9) and the temperature factor of MSQ. (b) Chemical structures and inhibitory concentrations of 287 and its analogues. (c, d) Crystal structures of p38α in complex with inhibitors (c) 287 (PDB code: 2RG6) and (d) P39 (PDB code: 3BY3). Regions around the inhibitor binding site are shown.

P6

多量子遷移の緩和速度の差を利用した高分子量タンパク質のマイクロ秒からミリ秒オーダーの化学交換の解析法の開発

○外山 侑樹[1,2]，大澤 匡範[1]，横川 真梨子[1]，嶋田 一夫[1]
[1]東京大学大学院薬学系研究科
[2]日本バイオ産業情報化コンシーシアム

NMR method for characterizing microsecond-to-millisecond chemical exchanges utilizing differential multiple-quantum relaxation in high molecular weight proteins

○Yuki Toyama[1,2], Masanori Osawa[1], Mariko Yokogawa[1], and Ichio Shimada[1]
[1]Graduate School of Pharmaceutical Sciences, the University of Tokyo, Tokyo, Japan.
[2]Japan Biological Informatics Consortium (JBIC), Tokyo, Japan

Chemical exchange processes of proteins with the order of microsecond (μsec) to millisecond (msec) are found to be critical for biological functions. Developments of methyl transverse relaxation optimized spectroscopy (methyl-TROSY) have enabled the study of biologically important large proteins, however, the analysis of the μsec to msec chemical exchange processes based on methyl-TROSY principle is still challenging, due to the relaxation properties of slowly relaxing ^{1}H-^{13}C multiple quantum (MQ) coherences. Here, we present a new methyl-based NMR method for characterizing the chemical exchanges utilizing differential MQ relaxation. The method enables quantitative evaluations of the chemical exchange processes, involving both ^{1}H and ^{13}C chemical shift differences, which have been difficult to be characterized by the conventional relaxation dispersion based approaches. The versatility of the methodology is demonstrated with the application to KirBac1.1 with an apparent molecular weight of 200 K.

【序論】

タンパク質は多数の構造の間の化学交換にあり、一過的に形成される存在割合の低い構造が機能に重要な役割を果たしている例が数多く報告されている。特にマイクロ秒 (μsec)からミリ秒 (msec) オーダーの化学交換はフォールディング反応や酵素反応をはじめとする多様な機能とタイムスケールが一致していることから、μsecからmsecオーダーの化学交換を検出し、定量的に解析することはタンパク質の機能を明らかとするうえで重要な課題である。

溶液NMR法はタンパク質の化学交換を原子レベルの分解能で解析することが可能な手法であり、これまで数多くのタンパク質の化学交換の解析と、それに基づく機能メカニズムの解明に応用されてきた。膜タンパク質やタンパク質複合体などに代表される生物学的に重要な高分子量タンパク質を溶液NMR法にて解析する場合、選択的に^{1}H, ^{13}C標識した側鎖メチル基の^{1}H-^{13}Cの多量子 (MQ) 遷移を観測するmethyl transverse relaxation optimized spectroscopy (methyl-TROSY) 法による感度向上を利用することが望ましい。しかしながら、methyl-TROSY法に基づきμsecからmsecオーダーの化学交換を解析する手法は、MQ遷移を観測する必要があるという制約のために、十分に確立されていない。

既存の手法として唯一、MQ Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) 緩和分散法 [1] が報告されているものの、^{1}Hと^{13}C両核の化学シフト値が変化する部位ではCPMGパルス系列により零量子（ZQ）

multiple quantum coherence, relaxation, chemical exchange

○とやまゆうき，おおさわまさのり，よこがわまりこ，しまだいちお

遷移と二量子 (DQ) 遷移の寄与が平均化されるため、化学交換が見かけの緩和速度の変化として観測できず、解析対象となるメチル基が大幅に限られるという問題があった。したがって、溶液NMR法により高分子量タンパク質の機能メカニズムを明らかとするうえで、側鎖メチル基を対象として包括的な解析が可能な化学交換解析法を開発することが必要であると考えた。

本研究では高分子量タンパク質の側鎖メチル基を対象として、μsecからmsecオーダーの化学交換を解析するための新規NMR手法を開発することを目的とした。

【結果】

多量子遷移の緩和速度の差から化学交換の寄与を算出するmethyl-HDR法を考案した。

本研究ではDQ遷移の緩和速度（R_{DQ}）とZQ遷移の緩和速度（R_{ZQ}）の差ΔR_{MQ} ($=R_{DQ}-R_{ZQ}$) が化学交換の存在を鋭敏に反映することに着目した。ΔR_{MQ}の大きさのうち化学交換に由来する成分$\Delta R_{MQ,ex}$は、2状態間の化学交換かつ化学シフト差よりも交換速度が大きい場合を仮定した場合、状態間の交換速度k_{ex}, マイナー状態の存在割合p ($0 < p < 0.5$), ^{1}H, ^{13}Cの化学シフト差$\Delta\omega_H$, $\Delta\omega_C$を用いて、下記の式で近似することができる [2]。

$$\Delta R_{MQ,ex} = \frac{4p(1-p)\Delta\omega_H\Delta\omega_C}{k_{ex}}$$

$\Delta R_{MQ,ex}$は^{1}Hと^{13}C両方の化学シフト差に対して比例する。そのため、既存のMQ CPMG緩和分散法では検出することが困難であった^{1}Hと^{13}C両方の化学シフト差が存在する部位の化学交換を検出し、かつ定量的に評価することが可能である。しかしながら、ΔR_{MQ}の観測値には$\Delta R_{MQ,ex}$だけでなく、メチル基の^{1}Hと空間的に近接する^{1}H, ^{2}Hとの双極子-双極子相互作用、ならびにメチル基^{1}H, ^{13}C間の化学シフト異方性相互作用の交差相関緩和項が同時に観測される。本研究で対象とする高分子量タンパク質においては、前者の寄与が化学交換の寄与$\Delta R_{MQ,ex}$と同程度の大きさになるため、$\Delta R_{MQ,ex}$の定量的な算出が困難であることが問題であった。

そこで、$\Delta R_{MQ,ex}$の寄与のみを選択的に抽出するmethyl heteronuclear double resonance法 (methyl-HDR法) を考案した (Fig.1) 。Methyl-HDR法は、(1) 化学交換よる位相の散逸よりも十分に速い周波数でスピンロックすることにより、化学交換の寄与を選択的に抑制し定量すること、(2) 多量子コヒーレンス状態をスピンロックするためにheteronuclear double resonance (HDR) パルス法 [2] を用いることを特色とし、$\Delta R_{MQ,ex}$を定量的に算出することを可能とする手法である。

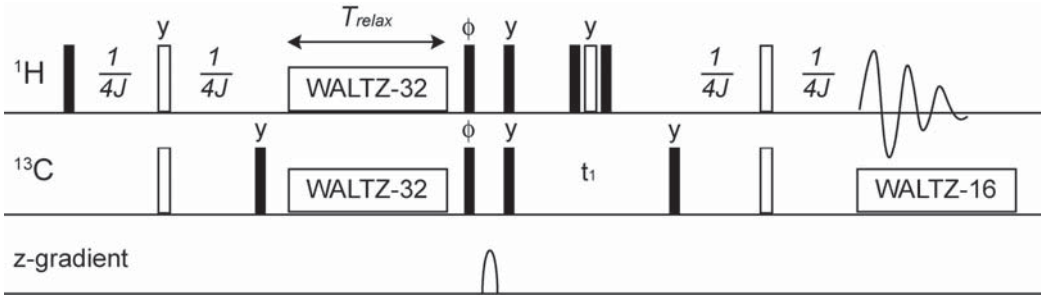


Fig.1 Pulse sequence of methyl-HDR experiment

Phase φ is set to y for observing $2C_xH_x$ and x for observing $2C_yH_y$. WALTZ-32 coposite pulse sequence during T_{relax} is replaced for spin echo sequence for reference experiment.

Fig.1にはmethyl-HDR法のパルスプログラムを示した。メチル基^{1}H-^{13}C相関における$2C_xH_x$コヒーレンス（ZQ＋DQ）と$2C_yH_y$コヒーレンス (ZQ－DQ) をそれぞれ位相φを変えることで選択的に観測し、緩和時間T_{relax}における両コヒーレンスの交差緩和速度からΔR_{MQ}を算出した。T_{relax}の間にWALTZ-32コンポジットパルス系列からなるHDRパルスを照射した条件と、HDRパルスを照射しない条件でそれぞれΔR_{MQ}を測定し、その差を算出することで化学交換の寄与$\Delta R_{MQ,ex}$を算出した。

モデルケースとしてMBPならびにFFドメインにmethyl-HDR法を適用し、化学交換の寄与$\Delta R_{MQ,ex}$を十分な精度で算出可能であることを明らかとした。また、既存の手法では解析が困難であった部位もmethyl-HDR法により化学交換の寄与を検出できることが分かった。

考案した手法が妥当であることを示すことを目的として、顕著な化学交換が存在しないとされている分子量40 Kのマルトース結合タンパク質（MBP）のイソロイシン側鎖δ1メチル基にmethyl-HDR法を適用した。各メチル基の$\Delta R_{MQ,ex}$を算出した結果、その大きさは全てのメチル基で2.5 s^{-1}未満となり顕著な化学交換がないことを支持する結果が得られた。以上より、methyl-HDR法によって疑陽性の$\Delta R_{MQ,ex}$が検出されず、$\Delta R_{MQ,ex}$を定量的に算出することができることが示された。

次に、基底構造とフォールディング中間構造との間を2,000 s^{-1}程度の交換速度で化学交換していること、ならびに一量子遷移を観測する緩和分散実験から各メチル基の^{1}H, ^{13}C化学シフト差が既知であるHYPA/FBP11 FFドメイン（以降はFFドメインと略記）のイソロイシン側鎖δ1メチル基、ロイシン側鎖δ1, δ2メチル基、バリン側鎖γ1, γ2メチル基を対象にmethyl-HDR法を適用した。各メチル基の$\Delta R_{MQ,ex}$を算出した結果、多くのメチル基で10 s^{-1}以上の顕著な$\Delta R_{MQ,ex}$が算出され、化学交換が存在することを示す結果が得られた。また、算出された$\Delta R_{MQ,ex}$の大きさは既知の化学シフト差を用いて算出した理論値と一致していたことから、methyl-HDR法によって$\Delta R_{MQ,ex}$を定量的に算出可能であることが示された。

FFドメインのmethyl-HDR法による解析結果を既存のMQ CPMG緩和分散法の結果と比較した。^{1}Hと^{13}C両方向の化学シフト変化を伴う残基番号52のロイシンδ1メチル基に着目したところ、MQ CPMG緩和分散法ではCPMGパルス周波数依存的な緩和速度の変化が観測されなかったのに対し、methyl-HDR法では7.1 s^{-1}の顕著な$\Delta R_{MQ,ex}$の寄与が検出され、化学交換の寄与を明瞭に検出することが可能であった。化学交換が存在する全10メチル基中、8メチル基で同様にmethyl-HDR法でより顕著に化学交換の寄与を検出できる傾向がみられた。以上の結果から、既存の手法で解析が困難であった部位も、methyl-HDR法によって化学交換を解析できるようになることが示された。

見かけの分子量が約200 Kの膜タンパク質KirBac1.1にmethyl-HDR法を適用し、化学交換が存在する部位を同定することに成功した。

KirBac1.1はヒトにおいて心拍数や神経伝達速度の調節などに関与する内向き整流性カリウムイオンチャネルの類鼻祖菌由来のホモログタンパク質である。膜貫通領域と細胞内領域を含む全333残基からなるサブユニットが4量体を形成し、可溶化のためのミセル分子を合わせると見かけの分子量は200 K程度となる。そこで、methyl-HDR法をKirBac1.1のイソロイシン側鎖δ1メチル基に適用し、高分子量タンパク質でも有効であることを示すこととした。

Methyl-HDR法による解析を行ったところ、全15残基存在するイソロイシンのうち8残基について$\Delta R_{MQ,ex}$を算出することが可能であった。各イソロイシンの$\Delta R_{MQ,ex}$を比較したところ、残基番号39, 279のイソロイシンには40 s^{-1}以上の、残基番号138, 163, 232のイソロイシンには8.0 s^{-1}を超える顕著な$\Delta R_{MQ,ex}$が検出された。これらのイソロイシンは、N末端側の細胞内領域（残基番号39）、膜貫通ヘリックス（残基番号138）、細胞内領域のβストランド上（残基番号163, 232, 279）に位置しており、これらの部位にμsecからmsecオーダーの化学交換が存在することが明らかとなった。

以上の結果から、見かけの分子量が200 K程度の高分子量タンパク質であっても、methyl-HDR法により$\Delta R_{MQ,ex}$を定量的に算出することが可能であり、化学交換が存在する部位を同定できることが示された。

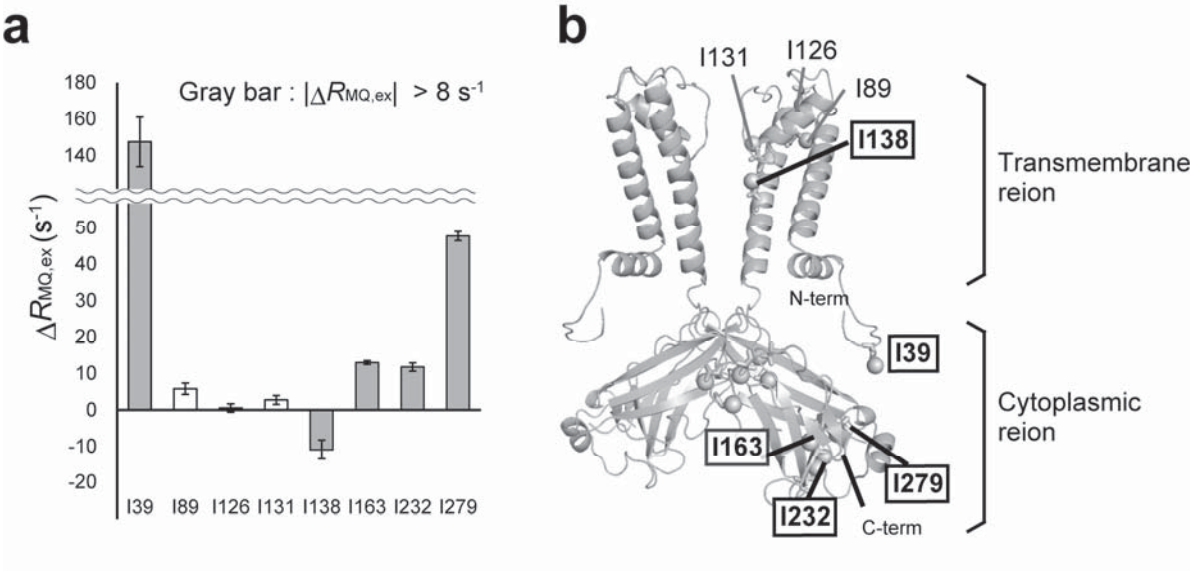


Fig.2 Methyl-HDR analysis of KirBac1.1
(a) Plot of $\Delta R_{MQ,ex}$ rates of Ile methyl groups in KirBac1.1. (b) Ile methyl groups with $|\Delta R_{MQ,ex}|$ values larger than 8 s^{-1} are mapped onto the structure of KirBac1.1 (PDB ID: 1P7B) [4].

【考察】

本研究では高分子量タンパク質の側鎖メチル基を対象として、多量子遷移の緩和速度の差における化学交換の寄与$\Delta R_{MQ,ex}$を算出するmethyl-HDR法を考案した。また、考案した手法により十分な精度で$\Delta R_{MQ,ex}$を算出できること、ならびに見かけの分子量が約200 Kの高分子量タンパク質であっても解析できることを示した。

高分子量タンパク質で化学交換を解析する既存のMQ CPMG緩和分散では^{1}H, ^{13}Cの両方の化学シフト差がある部位で解析が困難であったのに対し、methyl-HDR法において算出する$\Delta R_{MQ,ex}$は^{1}H, ^{13}Cの両方の化学シフト差がある部位で顕著に変化することを特徴とする。これまでにMQ CPMG緩和分散では解析できなかった部位が解析可能となることにより、高分子量タンパク質の化学交換の解析の適用範囲を大きく拡大するものであると考える。

さらに、メチル基の^{1}H, ^{13}C化学シフト値はそれぞれ近接する芳香環の配向、側鎖のχ角と相関することが知られている。そのため、$\Delta R_{MQ,ex}$は化学交換の存在を鋭敏に反映するのみならず、状態間の遷移に伴い生じるタンパク質の構造変化の情報を含有する。$\Delta R_{MQ,ex}$の符号や大きさを結晶構造と対応させて評価することにより、一過的にしか形成されないマイナー状態の構造的特徴を議論することが可能となり、タンパク質の動的な構造変化が機能を発揮する分子機構の解明に繋がることが期待される。

【引用文献】

[1] Korzhnev, D. et al., *Journal of American Chemistry Society* **126**, 3964-3973, 2004.
[2] Kloiber, K., and Konrat, R., *Journal of Biomolecular NMR* **18**, 33-42, 2000.
[3] Ulzega, S. et al., *Journal of Chemical Physics* **131**, 224503, 2009.
[4] Kuo, A. et al., *Science* **300**, 1922-1926, 2003.

P7

核緩和最適化SAILアミノ酸を利用した高分子量蛋白質複合体の溶液立体構造解析法の開発

○宮ノ入 洋平[1]，武田 光広[1]，寺内 勉[2,3]，甲斐荘 正恒[1,2]
[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]首都大学東京大学院・理工学研究科
[3]SAILテクノロジーズ株式会社

Structural study for larger proteins using relaxation optimized SAIL amino acids

○Yohei Miyaoiri[1], Mitsuhiro Takeda[1], Tsutomu Terauchi[2,3] and Masatsune Kainosho[1,2]
[1]*Structural Biology Research Center, Graduate School of Science, Nagoya University, Japan.*
[2]*Graduate School of Science and Engineering, Tokyo Metropolitan University, Japan*
[3]*SAIL Technologies, Inc.*

At present, the solution NMR spectroscopy of large molecular proteins (>50 kDa) relies exclusively upon the information obtained from the backbone NH and side-chain CH_3 signals, which are not sufficient for precise structural studies. In order to overcome this situation, we have been trying to further optimizations of the isotope labeling patterns for stereo-array isotope labeled (SAIL) amino acids. And we also have been developing efficient and practical protocols of *E.coli* protein expression system to prepare SAIL labeled proteins. In this presentation, we introduce a precise structural analysis of 80 – 900 kDa large molecular protein and protein-protein complexes by using the relaxation optimized SAIL-NMR method.

［序論］

これまで、分子量50kDaを超える高分子量蛋白質に関する溶液NMR研究においては、主鎖アミド基($^1H^{15}N$)やメチル基($^1H_3{}^{13}C$)に関する限定的な構造情報しか得ることができなかった。そのため、高分子量蛋白質および蛋白質－蛋白質複合体が有する高次な生命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。このような問題を解決する為に我々は、独自の技術である立体整列同位体標識（stereo-array isotope labeling: SAIL）法を駆使し、高分子量蛋白質の精密立体構造解析法の開発を進めてきた。昨年度の年会までに、従来のSAILアミノ酸について更なる改良を施した核緩和最適化SAILアミノ酸を開発し、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$^1H^{13}C$相関シグナルを高感度に観測し、帰属に成功してきた。また、試料調製の面においても、汎用性の高い大腸菌蛋白質発現系を用いて、SAILアミノ酸をはじめとする高度に安定同位体標識されたアミノ酸を高効率かつ選択的に目的蛋白質へ標識する新たな手法を確立してきた。その結果、従来のアミノ酸前駆体を利用した手法では為し得なかったバリン(Val)およびロイシン(Leu) 残基メチル基をアミノ酸特異的かつ立体特異的に標識する方法を確立し、高感度かつ高精度にNOEシグナルを得ることにも成功をおさめてきた[1)]。

今回は、様々なアミノ酸に対して核緩和最適化SAILアミノ酸を新たに開発し、MSGおよび分子量900kDaのシャペロニン(GroEL/ES)複合体に導入し、NMRシグナルを高感度に観測する事に成功した。本発表では、これら高分子量蛋白質複合体における、核緩和最適化SAIL法を利用した精密な溶液立体構造解析法について紹介する。

SAIL法，高分子量蛋白質複合体，大腸菌蛋白質発現系

○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

[方法]

高分子量蛋白質複合体の精密な立体構造解析に向けて、主に芳香族アミノ酸およびメチル基含有の疎水性アミノ酸を対象に、芳香環、メチル基及び脂肪族の$^{1}H^{13}C$ シグナルの観測に適した核緩和最適化SAILアミノ酸を設計し、SAILテクノロジーズ社により合成した(Fig.1a)。これら核緩和最適化SAILアミノ酸は、大腸菌蛋白質生合成系を利用してMSGおよび高度好熱菌(*Thermus thermophilus*) GroEL/ES複合体へ取り込ませた。培養培地にはM9最少培地 (核緩和最適化SAIL, [U-^{2}H]-グルコース, [^{15}N]-塩化アンモニウム, 99.8% 重水) を利用し、観測対象以外のアミノ酸は高度に重水素化標識した。また宿主大腸菌には、ルトガース大学・井上研究室で作製されたイソロイシン(Ile), Val, Leu 要求性 BL21(DE3)を使用した。調製された試料の各種NMRスペクトルの測定には、cryoprobeを装着したBruker AVIII-900及び600を使用した。

[結果と考察]

従来の手法では、分子量 50kDa以上の高分子量蛋白質や蛋白質複合体については、主鎖アミド基と、メチル基しか情報を得ることが出来ず、精密な立体構造解析は困難であった。我々の開発した核緩和最適化SAIL法を用いることで、新たに芳香環や脂肪族の$^{1}H^{13}C$についても高感度にNMRシグナルを観測する事に成功した(Fig.1b)。実際に、分子量82kDaのMSGについても、立体構造決定に必要なNOEシグナルを多く観測する事に成功した。また、核緩和最適化SAILアミノ酸は、部位特異的かつ立体特異的に安定同位体標識が施されているため、多数のNOEシグナルの帰属を一義的に簡便に行うことができる。このことから、原子間距離を高精度に決定できるだけでなく、各アミノ酸の側鎖コンフォメーションについても、正確に情報を与える事が可能となった。これらの束縛条件をもとに構造計算を行った結果、従来のアミド基とメチル基のみのNOEシグナルの計算と比較して、構造計算の収束度（RMSD）が大幅に改善している事が示された。

また、分子量900kDaのGroEL/ES複合体についても、本手法を適用する事で高感度に$^{1}H^{13}C$シグナルを観測する事に成功した。このことから、緩和最適化SAIL法は様々な高分子量蛋白質複合体に適用可能であり、次世代の構造生物学研究の発展に大きく寄与する事が期待できる。

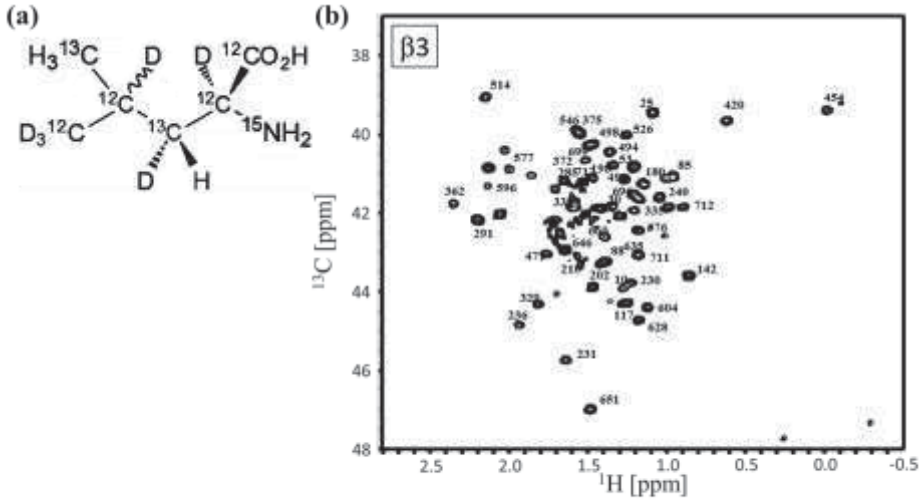


Fig. 1 a: Structure of relaxation optimized SAIL-Leu.
b: aliphatic CH (Leu β3) HSQC spectrum of MSG

[文献] 1) Y. Miyanoiri, *et al.* (2013), *J. Biomol. NMR,* **57**: 237-249

[謝辞] 本研究成果は科研費（若手(B), 基盤(C)、文部科学省及び国立研究開発法人日本医療研究開発機構 創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業（創薬等支援技術基盤プラットフォーム事業）の支援により得られました。

P8

ヘムと平行型四重鎖 DNA の複合体の構造および機能の解析

○片平 祐弥、清水 春那、木下 真志、柴田友和、山本泰彦
筑波大学大学院 数理物質科学研究科

Structural and functional characterization of complexes between heme and parallel G-quadruplex DNAs.

○Yuya Katahira, Haruna Shimizu, Masashi Kinoshita, Tomokazu Shibata, and Yasuhiko Yamamoto
Department of Chemistry, University of Tsukuba

A single repeat of the human telomere, d(TTAGGG), has been shown to form all parallel G-quadruplex DNA i.e., $(d(TTAGGG))_4$, in the presence of appropriate concentrations of K^+. We have shown that $(d(TTAGGG))_4$ and heme form a stable complex, i.e., "heme-DNA complex". In this study, we have characterized the molecular structures of heme(Fe^{3+})-$(d(TTAGGGA))_4$ and heme(Fe^{3+})-$(d(TTAGGGT))_4$ complexes in order to investigate the effect of the addition of an extra 3'-terminal A and T on structural properties and peroxidase activity of the complex. We found that hemes(Fe^{3+}) in both the complexes are accommodated between G6 and the 3'-terminal base. We also found that the peroxidase activity of the complex possessing A7 is larger by a factor of ~12 than that of the other, suggesting that the 3'-terminal base is involved in the catalytic mechanism of the complex.

序論　ヒト染色体末端のテロメア部位に存在する繰り返しDNA塩基配列の基本単位であるd(TTAGGG)は、高濃度K^+存在下で、四つのGが同一平面内で水素結合により環状に連結したGカルテット(**Fig. 1**) の形成を通して、平行型四重鎖DNAを形成する[1)]。平行型四重鎖DNAのGカルテットは、鉄ポルフィリン錯体ヘム(**Fig. 2**)とπ-πスタッキング相互作用などにより特異的に結合し"ヘム-DNA複合体"を形成する[2)]。

本研究では、d(TTAGGG)の3'末端に、A、Tを追加したd(TTAGGGA)、d(TTAGGGT)のヘム(Fe^{3+})-DNA複合体の立体構造を、NMRにより解析した。そして、ヘム(Fe^{3+})-DNA複合体が示すペルオキシダーゼ活性の発現機構を、得られた構造に基づいて考察した。

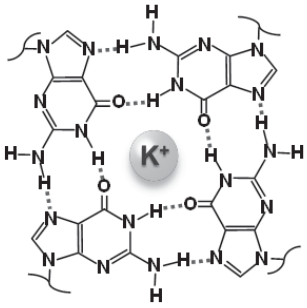


Fig. 1. Structure of G-quartet.

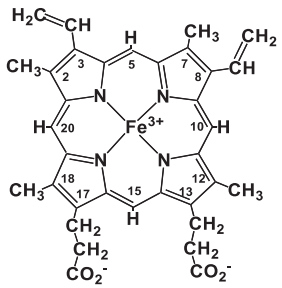


Fig. 2. Structure of heme.

結果・考察　四重鎖DNAの^{1}H NMRスペクトルでは (**Fig. 3A**)、それぞれのGカルテットのイミノプロトンに由来するシグナルは、水素結合の形成によって10 ppmよりも低磁場に観測される(**Fig. 3B & D**)。一方、ヘム(Fe^{3+})-DNA複合体のスペクトルでは、ヘム近傍のプロトンに由来するシグナルがヘム鉄の不対電子の影響を受けて、8.5 - 10.5 ppmに新たなシグナルが観測された(**Fig. 3C & E**)。飽和移動差スペクトル(**Fig. 4**)などによりこれら複合体由来シグナルの帰属を行った結果、d(TTAGGGA)、d(TTAGGGT)のいずれのヘム(Fe^{3+})-DNA複合体でも、ヘム(Fe^{3+})はG6 Gカルテット

ヘム-DNA複合体、常磁性シフト、ペルオキシダーゼ活性

○かたひらゆうや、しみずはるな、きのしたまさし、しばたともかず、やまもとやすひこ

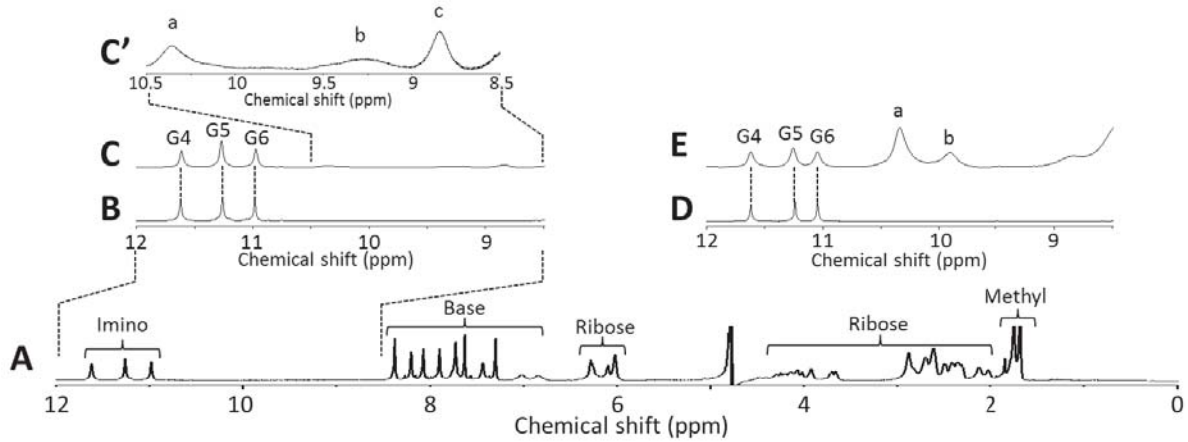


Fig. 3. ^{1}H NMR spectra of parallel G-quadruplex DNA formed from d(TTAGGGA), i.e., $(d(TTAGGGA))_4$ (A) and downfield-shifted portions, 8.5 – 12 ppm, of $(d(TTAGGGA))_4$ (B), heme(Fe^{3+})-$(d(TTAGGGA))_4$ (C), $(d(TTAGGGT))_4$ (D), and heme(Fe^{3+})-$(d(TTAGGGT))_4$ (E) in 90% $^{1}H_2O$/10% $^{2}H_2O$, 300 mM KCl, 50 mM potassium phosphate buffer at pH 11.0 and 25 ºC. Y-gain of the shift range, 8.5-10.5ppm, of trace C is expanded by ×30 in trace C'.

と3'末端の塩基との間に挿入されていることが明らかになった(**Fig. 5**)。これら複合体のペルオキシダーゼ活性の計測から、3'末端がAの方がTの場合より約12倍高いことが示され、ヘム(Fe^{3+})-DNA複合体のヘム鉄の反応性は、3'末端塩基によって調節できることが示された。ヘム(Fe^{3+})に結合した配位子の交換反応（Fe^{3+}-H_2O ⇄ Fe^{3+}-OH^- + H^+）の "pK_a" は、3'末端がAの場合はTより約0.7上昇することから、A7塩基の非共有電子対をもつ1位の窒素原子がヘム鉄に結合したH_2Oと水素結合を形成していると考えられる。したがって、報告されているペルオキシダーゼの触媒機構[3]に基づくと、複合体のA7塩基は塩基触媒として作用していると推測される。

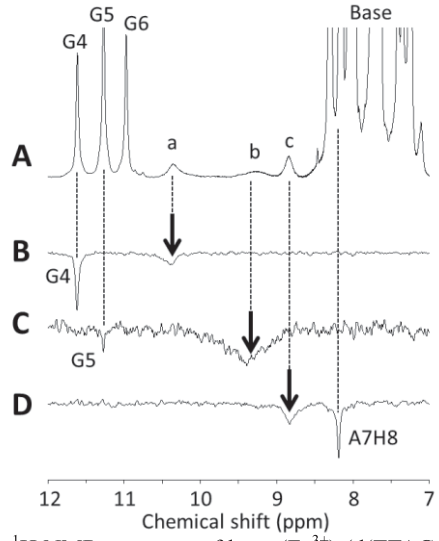


Fig. 4. ^{1}H NMR spectrum of heme(Fe^{3+})-$(d(TTAGGGA))_4$ complex, in 90%H_2O/10%D_2O, pH 11.0, at 298 K (A) and saturation transfer difference spectra upon saturation of signals a (B), b(C), and c (D).

結論　ヘム-DNA複合体のペルオキシダーゼ活性は、DNA塩基配列を通して調節できることが明らかになった。アデニン塩基を塩基触媒として活用する分子設計が、ヘム-DNA複合体の機能調節に有用であることが示唆された。

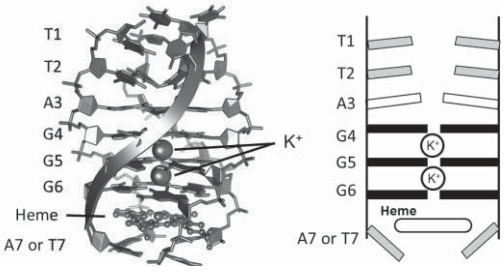


Fig. 5. Structures of heme(Fe^{3+})-$(d(TTAGGGT))_4$ and heme(Fe^{3+})-$(d(TTAGGGA))_4$ complexes.

Reference

1) Y. Wang and D. L. Patel, *Biochemistry,* **1992**, 31, 8112-8119.
2) K. Saito, H. Tai, H. Hemmi, N. Kobayashi, and Y. Yamamoto, *Inorg. Chem.*, **2012**, 51, 8168-8176; H. Shimizu, H. Tai, K. Saito, T. Shibata, M. Kinoshita, and Y. Yamamoto, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **2015**, 88, 644-652.
3) O. Shoji and Y. Watanabe, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2014**, 19, 529-539.

P9

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鎖結合メカニズムに関するNMR解析

○逸見　光[1]，久野　敦[2]，平林　淳[2]
[1]農研機構・食品総合研究所
[2]産総研・創薬基盤研究部門

NMR analysis of a novel sialic acid-binding lectin mutant from the C-terminal domain of an R-type lectin from earthworm

○Hikaru Hemmi[1], Atsushi Kuno[2], and Jun Hirabayashi[2]
[1] *National Food Research Institute, NARO, Japan*.
[2] *Biotechnology Research Institute for Drug Discovery, AIST*.

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 SRC, the SRC/lactose complex, and the SRC/6'-sialyllactose complex, respectively, 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 assigned chemical shifts of SRC in the sugar-free state, in the lactose-bound state, or in the 6'-sialyllactose-bound state, and we also performed ^{15}N-relaxation experiments. The results suggested that the binding mechanism of SRC with 6'-sialyllactose in solution state may be different from that in the crystal state. Further, the internal motion of the loop region in subdomain γ of SRC remarkably changed from that of the corresponding region in subdomain γ of the wild type lectin EW29Ch, indicating that the internal motion change is important in the sialic acid –binding mechanism of SRC.

序論

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（サブドメインα中のG148とサブドメインγ中のS239）が形成されることを示した。その新たに形成された２つの水素結合のうちの１つは、サブドメインγの糖結合能が消失したのと引き換えに、サブドメインγ中の１つのループがサブドメインαの糖結合部位付近へシフトすることにより可能になったシアル酸との水素結合である［3］。しかしながら、その特異的なシアル酸糖鎖結合能獲得メカニズムについては十分に解明できていない。その解明の一環として、今回、遊離状態、ラクトース結合状態、およびシアル酸糖鎖（6'－シアリルラクトース）結合状態でのSRCについて、ダブル

Lectin, sialic acid, natural evolution mimicry

○へんみひかる，くのあつし，ひらばやしじゅん

ラベル体SRCを用いて、遊離状態および糖結合状態（ラクトースおよび6’－シアリルラクトース）での主鎖および側鎖のNMRシグナルの完全帰属とケミカルシフト変化の解析、さらに、分子内運動解析と野性体EW29Chとの比較により、シアル酸糖鎖結合メカニズムについて解析を行ったので報告する。

方法

SRC改変体は野性体EW29Chに比べ不安定であることから、遊離状態でも安定な^{15}N, ^{13}Cラベル体SRCを調製した。大腸菌発現系を用いて^{15}N-, ^{13}C-SRCを発現した後、タンパク質の精製過程でラクトースを含むバッファーを用い精製後、脱塩・バッファー交換用カラムでラクトースを除去した。遊離状態SRCに加え、ラクトースを添加したSRCおよび6’-シアリルラクトースを添加したSRCを調製し、それらラベル体SRCを用いて、Bruker社製Avance600MHzにより、15℃で、^{1}H-^{15}N HSQCスペクトル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、主鎖および側鎖のNMRシグナルを帰属した。さらに、同様な方法で調製した^{15}Nラベル体SRCを用いて、^{15}N緩和測定法（R_1, R_2, {^{1}H}-^{15}N NOE）を行い、分子内運動の解析も行った。

結果および考察

今回、ダブルラベル体SRCを用いて、遊離状態SRC、ラクトース結合状態SRC、および6’－シアリルラクトース結合状態SRCの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。それらのケミカルシフトを比較した結果、ラクトース結合状態でのSRCのNMRシグナル変化がEW29Chと同じような変化が観測されたことから、SRCのサブドメインαでのラクトースの結合状態がEW29Chのラクトース結合状態とほぼ同じあることが示唆された。一方、6’－シアリルラクトース結合状態SRCでのケミカルシフト変化が遊離状態およびラクトース結合状態を大きく異なることから、すでに報告されているSRC/6’－シアリルラクトース結晶構造での結合状態と異なることが示唆された。次に、15℃で、^{15}N緩和解析より、遊離状態および糖結合状態でのSRCのサブドメインγのループ領域において{^{1}H}-^{15}N 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。また、6’－シアリルラクトース結合状態では、サブドメインγ中のループ領域中の残基A240で分子内運動が抑制されたことから、結晶構造に観測されたS239とシアル酸との水素結合形成によるものと推測された。

以上の結果から、すでにSRC－6’－シアリルラクトース複合体のX線結晶構造解析により、その結合様式が報告されているが、今回のNMRによる動的構造解析により、結晶状態におけるSRCの6’－シアリルラクトースとの結合状態が溶液状態では異なること、および進化工学的手法による改変により生じたSRCのサブドメインγ中のループ領域の分子内運動の著しい変化がシアル酸との結合に重要であることが、新たに判明した。

引用文献

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。

P10

重水素交換実験によるポリユビキチン鎖線維の構造解析

○西澤 亮[1]，森本 大智[1]，菅瀬 謙治[1]，白川昌宏[1]
[1]京都大学大学院 工学研究科 分子工学専攻

Structural analysis of polyubiquitin fibrils by H/D exchange

○Ryo Nishizawa[1], Daichi Morimoto[1], Kenji Sugase[1], Masahiro Shirakawa[1]
[1]*Graduate School of Engineering, Kyoto University, Kyoto, Japan.*

Ubiquitin, consisting of 76 amino acids, exists in any eukaryotic cells and is related to various biological events. However, polyubiquitin chains form amyloid-like fibrils associated with neurodegenerative diseases. It is difficult to analyze structure of amyloid fibrils by conventional methods such as solution NMR spectroscopy and X-ray crystallography. Therefore, the structure of polyubiquitin fibrils has not been unraveled. To obtain structural information of polyubiquitin fibrils, we performed hydrogen/deuterium-exchange experiments of diubiquitin fibrils. The H/D-exchanged fibrils were dissociated in DMSO and then the degree of exchange was estimated by measurement of ^{1}H-^{15}N HSQC spectra. Based on NMR assignment of denatured monoubiquitin in DMSO, we analyzed structural changes of polyubiquitin chains caused by fibril formation.

【背景・目的】

アルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患は徐々に神経細胞死が進行し、認知障害、ふるえ、筋力の低下など特有の症状を示す病気である。この病気の発症機構や本質的な治療法は未だ解明されておらず、高齢化が加速する現代社会において治療法の確立が急がれている。神経変性疾患の患者の組織や器官には、アルツハイマー病の老人斑やパーキンソン病のレビー小体などのアミロイド線維と呼ばれるタンパク質の異常な凝集が沈着物として見られ、神経変性疾患の発症と関連があると考えられている。

アミロイド様線維を形成し、凝集しうるタンパク質の１つとしてユビキチンが知られている。老人斑やレビー小体など、ユビキチンを含んだ多くの凝集体が神経変性疾患の患者の脳内で確認されていることから、ユビキチンと神経変性疾患との関連が注目されている。ユビキチンは 76 個のアミノ酸から構成され、あらゆる組織や細胞に存在して不要なタンパク質の分解や DNA 修復など多様な生命現象に関わっている。先行研究からユビキチン単体ではアミロイド様線維を形成しないが、ポリユビキチン鎖はアミロイド様線維を形成することがわかった。しかしこの線維は水に不溶なタンパク質であり、高分子量で非晶質なため、X 線結晶解析や溶液 NMR による構造解析が困難である。そのためポリユビキチン鎖の構造はほとんど明らかになっていない。

そこで本研究では、重水素交換を用いたユビキチン二重合体の解析によってポリユビキチン鎖線維の構造を明らかにすることを目的とした。タンパク質を重水に晒すとタンパク質の表面にあるアミド軽水素は重水素に交換されやすく、タンパク質の内側にあるアミド軽水素、もしくは水素結合を形成しているアミド軽水素は重水素に交換されにくい。アミド軽水素が重水素に交換されると NMR シグナル強度が低下するため、重水素交換を利用することでタンパク質の立体構造の情報を定量的かつアミノ酸レベルで得ることができる。

---

ubiquitin, amyloid fibrils, H/D exchange

○にしざわりょう，もりもとだいち，すがせけんじ，しらかわまさひろ

【実験方法および結果】

本研究ではカルボキシル末端ユニット(基部)側のみを ^{15}N 標識したユビキチン二重合体を用いて NMR 測定を行った。二重合体の調製には非標識の GST-ユビキチン(ユビキチンのアミノ末端側に GST タグが付いたもの)と ^{15}N 標識したユビキチン G75A, G76A 変異体(ユビキチンの 75 番目と 76 番目のグリシンをアラニンに変異させたもの)を用いた。ユビキチンリガーゼ LUBAC を用いた酵素反応により、GST-ユビキチンのカルボキシル末端とユビキチン G75A, G76A 変異体のアミノ末端をアミド結合し、プロテアーゼ HRV3C により GST タグを切断し、基部のみ ^{15}N 標識した直鎖型のユビキチン二重合体を調製した。

このユビキチン二重合体を 90 ℃で 15 分加熱して、ユビキチン二重合体の線維を作製した。得られた線維を凍結乾燥した後、軽水（H_2O）あるいは重水（D_2O）を加え 37 ℃で 42 時間インキュベートした。重水素交換した線維を溶解させて溶液 NMR を測定するために、溶媒として 99.9％ d_6-DMSO, 0.1％ TFA を用いた。また、対照実験のため、線維化させていないユビキチン二重合体（以下、非線維）についても同様の条件で重水素交換実験を行い、DMSO に溶解させた後 NMR スペクトルを測定した。各アミノ酸の NMR シグナルを帰属するために、DMSO 中でアンフォールドした状態のユビキチン単量体の NMR スペクトルの解析も行った。^{13}C, ^{15}N 標識したユビキチン G75A, G76A 変異体を DMSO に溶解させて 3 次元 NMR 測定（CBCA(CO)NH, HNCACB, HNCO, HNCACO）を行った。これらのデータをもとに DMSO に溶解したユビキチン G75A, G76A 変異体のピーク帰属を連鎖帰属法により行った。

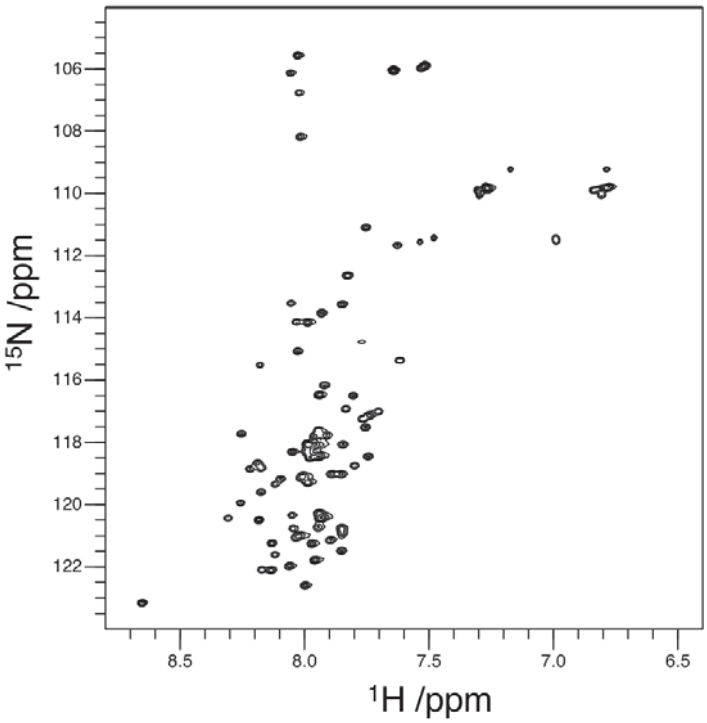


Figure. ^{1}H-^{15}N HSQC spectrum of denatured monoubiquitin in d_6-DMSO containing 0.1% TFA.

解析の結果、α-ヘリックスとその周辺のアミノ酸は、非線維に比べ線維において、より重水素交換がされることが分かり、線維状態でより溶媒に露出していることが示唆された。

【考察】

アミロイド線維はβ-シートを豊富に含んだ構造を形成するという報告があることから、線維化によりα-ヘリックスが構造変化を起こし、新たにストランド-ループ-ストランド構造が形成された可能性が考えられる。これらのユビキチン二重合体線維の重水素交換解析は、ポリユビキチン鎖におけるアミロイド様線維の形成機構を解明する上で重要な知見であり、神経変性疾患の本質的な治療法の解明の一助となり得るだろう。

P11

タンパク質-核酸相互作用観測へのDiffusion Filterの応用

○栗田　順一[1]，平尾　優佳[1]，西村　善文[1]
[1]横浜市立大学・生命医科学研究科

Application of diffusion filter experiments to protein-DNA interaction

○Jun-ichi Kurita[1], Yuuka Hirao[1], and Yoshifumi Nishimura[1]
[1]Graduate School of Medical Life Science, Yokohama City University, Japan.

Diffusion filter experiment is one of effective molecular sieve experiments of NMR. However, common spectrometer has several limitations, amplitude, irradiate time and so on, in pulse field gradient system. Using week pulse field gradient, it is difficult that diffusion filter is applied to large molecular system due to emphasized convection effect during long diffusion delay. In the present study, we will show an application of diffusion filter to DNA-protein complex using bipolar pulse pair stimulated echo with convection compensation.

序論

現在では、磁場勾配パルスはNMRの測定になくてはならない手法となっており、磁場の均一性を上げるグラジエントシムから多次元NMRにおけるコヒーレンス選択、そして分子の拡散係数測定等に応用されている．Diffusion Filter[1)]は、グラジエントエコーにおいてシグナル強度の減衰が分子の拡散速度に依存することを利用しているが、一般的なNMR装置において掛けられる最大磁場勾配は50～100G/cm程度と小さく高分子量化合物同士でのDiffusion Filter実験はこれまで行われてはいない．これは比較的小さい磁場勾配で僅かな拡散速度の違いを強調することは、グラジエントエコーに長い遅延時間を挿入することを意味し、この長い遅延時間中における試料の対流効果が顕著になることと得られるシグナル自体の感度が低くなることに起因する．

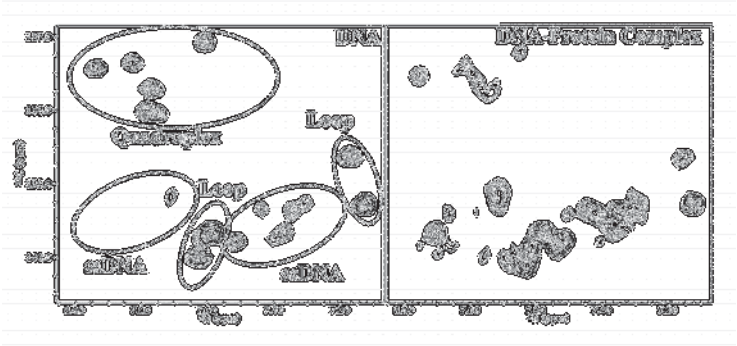


Fig. 1 ^{1}H-^{13}C CT-HSQC of aromatic region
tr12(TTAGGGTTAGGG)$_2$ quadruplex (left)
tr12(TTAGGGTTAGGG)$_2$-TRF2 DBD complex (right)

タンパク質-核酸の相互作用観測は、タンパク質にDNAを滴下あるいはDNAにタンパク質を滴下しHSQCなどを測定することで一般的には行われるが、構造を持たない少量の一本鎖DNAが存在していると、比較的横緩和時間が長いため、相互作用し分子量が増大した複合体のシグナルに比べ、シグナルが強調される(Fig. 1)．このため、少量の一本鎖DNAのシグナルに覆い隠されることさえある．このような分子量篩のフィルターとして良く使われるT_1,T_2 Filterなどの緩和時間を用いたFilterでは複合体であっても局所的な運動性は様々であり、複合体のシグナルのみを得ることに適してはいない. 本研究ではDiffusion Filterによるタンパク質-核酸複合体シグナルの分離を試みた．

Diffusion Filter, protein-DNA interaction
○くりたじゅんいち，ひらおゆうか，にしむらよしふみ

方法

$^{13}C/^{15}N$安定同位体標識アミダイトユニット(大陽日酸社)を用いた化学合成法にて得られたtr12 (TTAGGGTTTAGGG) を75mM KCl, 50mM リン酸カリウム緩衝液(pH 6.8)に溶解し、95度から室温、65度から室温の二段階のアニーリングを行い試料に用いた．試料にすでに確立した大腸菌大量発現系[2]にて得たTRF2DBDを滴下しNMRスペクトルの測定を行った．NMRスペクトルの測定にはAVANCE III HD 950MHz(BRUKER社)を用い、CT-HSQCに対しbipolar pulse pair stimulated echo (BPPSTE)の対流補正型をDiffusion Filterとして適用し(Fig. 2)、Δ=200ms、G1=30G/cm;2.5msec.として測定を行った．

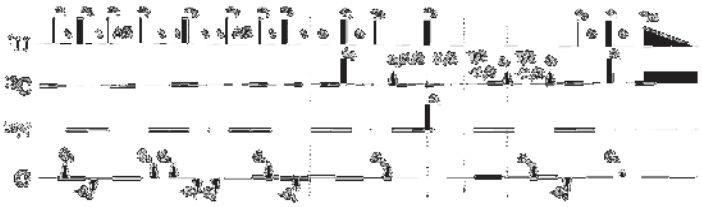


Fig. 2 $^{1}H-^{13}C$ CT-HSQC with diffusion filter

結果

ssDNA由来のシグナルが消去され、 複合体のみのシグナルを明瞭に観測することができた．特にssDNAのシグナルと重なりが顕著であったLoopのT8シグナルにおいてもその化学シフト変化を観測することができた．

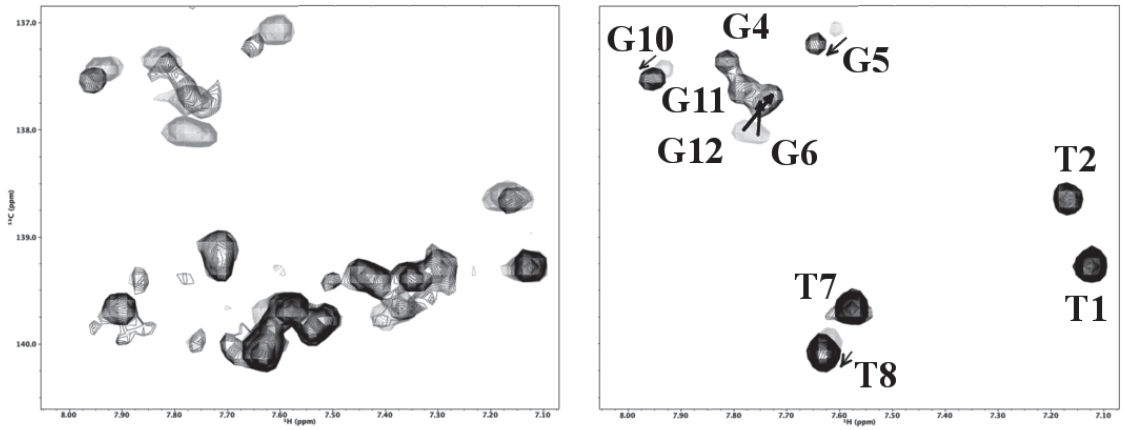


Fig. 3 NMR titration experiment
$^{1}H-^{13}C$ HSQC (left) $^{1}H-^{13}C$ HSQC with diffusion filter (right)

考察

市販の50G/cmのシステムであっても、対流補正型を用いれば、概ね10k～20kDaにDiffusion Filterが適応できることが示された．また、特に今回の複合体形成などのように観測すべきターゲットの分子量がより大きくなるような反応にはDiffusion Filterは非常に有効な手段であることが示された．

引用文献

1) Esturau, N. et al. *J Org Chem*.2006 71, 4103-4110.
2) Hanaoka, S. et al. *Protein Sci*. 2005 Jan;14(1):119-130.

P12

NMR法を用いたスペルミンとRNAアプタマーの相互作用解析

○小黒 明広[1]，柳田 明日美[2]，大津 舞菜[2]，天野 亮[2]，坂本 泰一[2]，
河合 剛太[2]，松藤 千弥[1]
[1]東京慈恵会医科大学・分子生物学
[2]千葉工業大学・工学部

Analysis of interaction between spermine and spermine-binding RNA aptamer by NMR

○Akihiro Oguro[1], Asumi Yanagida[2], Maina Otsu[2], Ryo Amano[2], Taiichi Sakamoto[2], Gota Kawai[2], and Senya Matsufuji[1]
[1]*Department of Molecular Biology, The Jikei University School of Medicine, Japan.*
[2]*Faculty of Engineering, Chiba Institute of Technology, Japan.*

Polyamines (putrescine, spermidine, and spermine) bind the specific position in RNA molecules via multiple non-covalent interactions though polyamine-binding RNA motif is poorly understood. The technique of SELEX has been used to isolate high affinity oligoribonucleotides (aptamers) from randomized RNA libraries. Selected aptamers are useful in exploring sequences and/or structures in RNAs for binding molecules. In this study, to analyze the effect of spermine on RNA aptamer structure, we investigated Isothermal Titration Calorimetry (ITC) analysis, NMR analysis and UV melting analysis. From ITC analysis, specific 1:1 interaction between spermine and aptamer was detected. The K_D value was estimated to be 27.2 μM. Several resonances in NMR spectra were disappeared or shifted, and the thermo melting temperature was shifted to higher degree in the presence of spermine. These results suggest that spermine induced a dynamic conformational change of this aptamer and stabilized the aptamer-spermine complex.

序論

生理活性物質ポリアミン（プトレッシン、スペルミジン、スペルミン）は細胞内でmRNAの特定の領域に結合してRNAの構造変化を誘導し、翻訳レベルでの制御に関与していることが知られている。しかし、ポリアミンが結合するRNAの配列／構造については詳しく分かっていない。RNAアプタマーは標的分子と強い親和性を持つ機能性RNAであり、標的分子の検出・解析ツールとして利用されたり、標的の結合配列／モチーフの解析に用いられる。我々はポリアミンとRNAの相互作用機構を解明する目的で、真核細胞の主要なポリアミンであるスペルミンに結合するRNAアプタマーを取得してきた（#5 SL_2, Fig. 1）[1)]。スペルミンアフィニティーカラムを用いた結合アッセイでは、末端側のステムの内部ループ側に存在するAU塩基対をGC塩基対に置換すると（#5 SL_2 GC, Fig. 1）、スペルミンへの結合が低下す

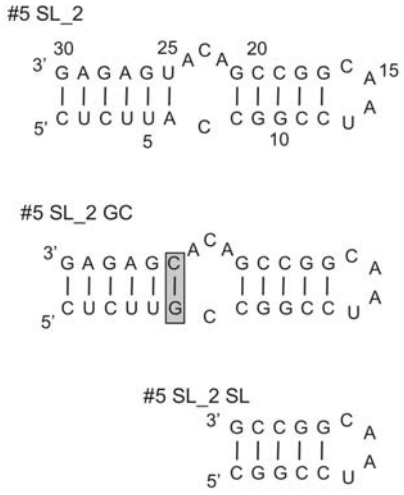


Fig. 1, Secondary structure of #5 SL_2, #5 SL_2 GC and #5 SL_2 SL

RNAアプタマー，スペルミン，ポリアミン

○おぐろあきひろ，やなぎだあすみ，おおつまいな，あまのりょう，さかもとたいいち，かわいごうた，まつふじせんや

ることが分かった[2)]。今回、スペルミンとRNAアプタマーの結合定量解析を行う目的で、等温滴定型カロリメーター（ITC）を用いて結合の熱力学的反応を観測した。さらに、スペルミンによるRNAアプタマーの構造への影響を解析する目的で、NMR法、およびUV吸収による融解温度（T_m値）の測定を行ない、スペルミンとRNAアプタマーの相互作用解析を行った。

方法

RNA試料は化学合成法あるいは試験管内転写法で調製した。ITCの測定はクエン酸でpHを7.0に合わせた20mMリン酸緩衝液の条件下で、MicroCal iTC 200（マルバーン社）を用いて測定した。NMRスペクトルの測定、およびT_m値の測定の溶液条件は50 mM NaClを含む20 mMリン酸緩衝液に、条件により$MgCl_2$、さらに各種ポリアミンを加えて測定した。NMRスペクトルの測定にはAVANCE600（ブルカー・バイオスピン社）を用いた。

結果と考察

ITC 解析より、#5 SL_2 とスペルミンの相互作用において発熱が観測された。これは#5 SL_2 GCとスペルミンの相互作用では観測されなかったため、アプタマーとスペルミン間の特異的な結合に由来する発熱と考えられた。この測定結果より、アプタマーとスペルミンは１：１で結合し、K_D 値は 27.2 μM と算出された。

また、NMR 解析によって、まず#5 SL_2 SL（Fig.1）のシグナルを帰属し、その結果をもとに#5 SL_2 と#5 SL_2 GC のシグナルを解析したところ、いずれにおいてもループ側のヘアピン構造が形成されていることが確かめられた。しかし、#5 SL_2 では末端側のステムは 298K で揺らいでおり、NMR シグナルが広幅化していた。一方、#5 SL_2 GC では末端側のステムに由来するシグナルもシャープであり、ほぼ全てのシグナルを帰属することができた。イミノプロトンの解析から、スペルミンの添加により幾つかのシグナルの消失もしくはシフトが確認できた（Fig. 2）。スペルミン添加時にも観測されるイミノプロトンシグナルがループ側のステムに由来することから、スペルミンは立体構造の揺らぎの大きい末端側ステムおよび内部ループに主に結合しており、#5 SL_2 GC ではステム構造が安定化することによってスペルミンとの結合が低下していることが示唆された。

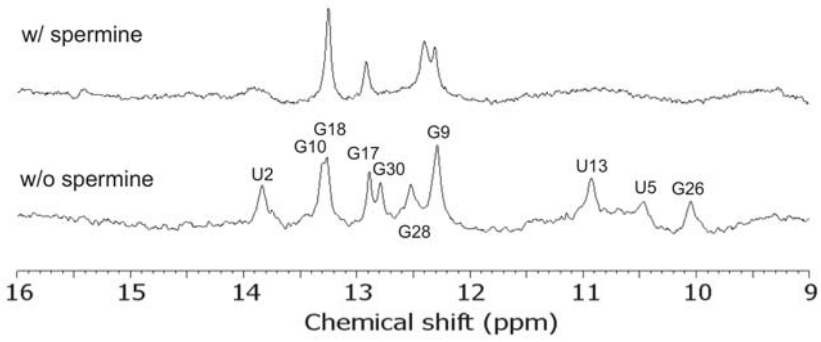


Fig. 2, ^{1}H-NMR spectra of #5 SL_2 with or without spermine

さらに UV 吸収による T_m 値測定の結果、#5 SL_2 はスペルミンと結合することで安定性を増していた。この結果より、スペルミンは RNA アプタマーと結合することでその構造変化を促し、より安定な形態へと遷移させることが示唆された。

引用文献

1) Oguro, A. et al., RNA 2011 sixteenth annual meeting of the RNA society, June 2011, Kyoto.
2) 小黒ほか，第35回日本分子生物学会年会，2012年12月，福岡.

P13

リジン側鎖アミノ基をメチル化したアミロイドβペプチドの凝集様体

髙井 朋代[1]，内田 敬子[1]，物部 容子[1]，竹内 昌男[1]，竹内 喜久子[1]，
○赤木 謙一[1]
[1]医薬基盤・健康・栄養研究所

The solution and solid state of lysine amino group methylated amyloid β peptide

Tomoyo Takai, Keiko Uchida, Yoko Monobe, Masao Takeuchi, Kikuko Takeuchi, and ○Ken-ichi Akagi
National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition

From the point of view of the innovating drug development of Alzheimer's dementia, it is important to reveal the solute state structure information of amyloidβ(Aβ). In this study, we were able to obtain the Aβ42 peptide using *E. coli* expression system. The amino group of lysine's side chain methylated Aβ42(MeAβ) was made of the obtained Aβ42 in chemical reaction. ^{15}N-^{1}H correlation signals could be assigned by using of the conventional three dimensional NMR experiments. This result indicated that the near to N terminal amide group were perturbed. It was suggested that the lysine's side chain was interacted with the residues located adjacent to N terminal regions.

序論

アルツハイマー型認知症発症メカニズムは未だ解明されておらず，対処療法としてアリセプトなどの製薬品もあるが根治薬開発には至っていない．この疾患の原因物質の一つであると考えられているアミロイドβペプチド（以下Aβ)は，アミロイド前駆体蛋白質がβ，γセクレターゼなどによって加水分解を受けることにより，主に40，あるいは42アミノ酸残基のペプチドとして生成される．Aβ凝集物（アミロイド）が原因となり神経細胞を死滅させているとするアミロイド仮説や，可溶性Aβ（オリゴマー）が神経細胞にダメージを与えているとされるオリゴマー仮説などが提唱されている．固体NMR法により，Aβアミロイドの構造モデルが数多く提唱されている一方で，可溶性Aβの溶液中での振る舞いは依然として判然としない．

今回我々は，凝集能，細胞毒性が共に高いとされるAβ42を遺伝子組み換え大腸菌より取得し，Lys残基側鎖アミノ基をメチル化した試料（MeAβ42)を調製することに成功した．溶液NMR法は，ある溶媒条件下における分子の平均像を信号として捉えることができるが，Aβ42とMeAβ42のスペクトルの違いから，メチル基を分子中に挿入したことによる摂動がどのアミノ酸残基に影響を及ぼすのかを観測するとにより，Aβ42分子間の相互作用部位推定を試みた．アミロイド凝集能を評価するためにチオフラビンTアッセイを行いメチル化によるアミロイド凝集に与える影響を観察した．またMeAβ42アミロイドの形状は透過型電子顕微鏡を用いたネガティブ染色像を取得することにより確認した．

アミロイドβ，メチル化，摂動

たかいともよ，うちだけいこ，ものべようこ，たけうちまさお，たけうちきくこ，○あかぎけんいち

実験

Aβ42は遺伝子組み換え大腸菌を用いることにより，His-tagユビキチンとの融合蛋白質として発現，精製を行いプロテアーゼ処理，HPLC精製，凍結乾燥，HFIP処理等を経て調製した．多核種多次元溶液NMR測定用には，^{15}N,あるいは^{15}N/^{13}C安定同位体標識ラベル体として調製した．MeAβ42は，精製したAβ42に対してホルムアルデヒドを加えてメチル化反応を行い調製した[1), 2)]．メチル化の確認にはMALDI-TOF-MSを用いた．Aβは最終濃度50μMになるように500μlの1/2 PBS緩衝液（(株)日本ジーンCode No. 314-90185組成: 1370mM NaCl, 81mM Na_2HPO_4, 26.8mM KCl, 14.7mM KH_2PO_4，pH7.4,を20分の1希釈して調製）を用いて可溶化した後，5mm標準試料管を用いて277Kにて各種測定を行いシグナルの帰属を行った．NMR測定にはAvanceII800（BRUKER社）を用いた．ネガティブ染色像取得には日立H-7650透過型電子顕微鏡を用いた．

結果

Aβ42とMeAβ42のアミド水素－窒素相関スペクトルにおいて顕著にケミカルシフトの異なる残基が確認された（Fig.1)．シグナル帰属の結果，N末端領域の主鎖アミドシグナルが摂動を受けていることが確認された．チオフラビンTアッセイの結果から，MeAβ42はAβ42と比較すると凝集能が抑えられていることが判明した．MeAβ42アミロイドは時間経過と共に球状, 芋虫状, シート状形態が観察された(Fig.2).

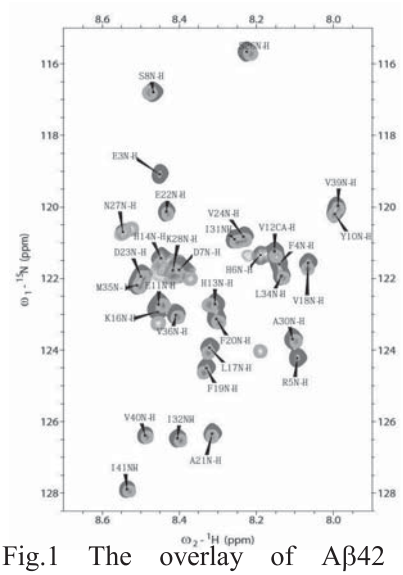


Fig.1 The overlay of Aβ42 and MeAβ42 ^{1}H-^{15}N so-fast hmqc spectra

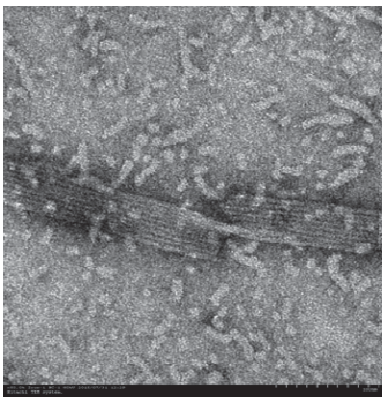


Fig.2 MeAβ42 negative stain image

考察

Aβ42とMeAβ42のNMRシグナルの比較から，Lys側鎖周辺がN末端領域に近い箇所において分子間接触が生じていることが示唆された．このことから，固体状態の構造モデルにおいては, N末端領域は構造形成に寄与していないモデルが多いが，凝集核を形成する初期の段階では, N末端領域が核形成に関与している可能性がある．今回実験に使用したMeAβ42は，N末端アミノ基及びK16, K28 の側鎖アミノ基がメチル化を受けていると考えられる．そこで, N末端アミノ基メチル化の影響を排除するために, N末端アミノ基をメチル化しない試料調製が必要である．またK16, K28のいずれの側鎖領域が関与しているのかを判別するためにK→Rに変異をいれたものを作成し，どちらのLysがより分子間相互作用に影響を及ぼしているか観測することも今後の課題である．

1) I. Rayment, Reductive alkylation of lysine residues to alter crystallization properties of proteins, Methods in Enzymology, 276, 171-179, 1997.
2) 大木，タンパク質の化学修飾による13Cラベル導入法 ～リジン残基のメチル化～ 2012.12.20 v1.4 http://bsw3.naist.jp/kojima/images/contents/557/lysine-13c-methylation.pdf

P14

Non-detergent sulfobetaine (NDSB) がタンパク質のダイナミクスに及ぼす効果

王 海梅[1]，石井 毅[1]，細田 和男[1]，河野 俊之[2]，寺脇 慎一[1]，○若松 馨[1]
[1]群馬大学大学院　理工学府
[2]北里大学　医学部

Effects of non-detergent sulfobetaines (NDSBs) on protein dynamics

Haimei Wang[1], Takeshi Ishii[1], Kazuo Hosoda[1], Toshiyuki Kohno[2], Shin-ichi Terawaki[1], and ○Kaori Wakamatsu[1]
[1]*Department of Molecular Science, Gunma University, Japan.*
[2]*Department of Biochemistry, Kitasato University School of Medicine, Japan.*

To gain insight into the mechanisms whereby non-detergent sulfobetaines (NDSBs) protect proteins from denaturation and aggregation, we analyzed the effects of NDSBs on the dynamics of proteins. NDSB-195, but not trimethylammonium N-oxide (TMAO), increased the isomerization rate between conformers of yeast ubiquitin. NDSB-256, but not TMAO, increased the cis-trans isomerization rate of Gly-Pro dipeptide. Different effects of NDSBs from osmolytes such as TMAO on protein dynamics will be discussed in terms of their different effects on protein refolding.

序論

種々のストレスによって引き起こされるタンパク質の変性や凝集を防止する事は，基礎科学的にも創薬科学的にも重要である．タンパク質の安定化剤としては硫酸アンモニウムのような無機塩やグリセロールのようなオスモライトが以前より知られているが，比較的新しい安定化剤としてNon-detergent sulfobetaine (NDSB) がある（Fig. 1）．オスモライトには見られないNDSBの機能としてリフォールディングの促進，結晶化の促進，アミロイド化の防止[1)]などがある．このようにNDSBは多岐にわたる機能を発揮するが，そのメカニズムには不明な点も多い．そこで，NDSBがタンパク質のダイナミクスに及ぼす効果をNMRで解析した．まず，ダイナミクスに関して多くの報告があるユビキチンについて，NDSB-195の効果を解析した．また，タンパク質のダイナミクスで最も遅い過程であるPro残基のcis-trans異性化の速度に及ぼす各種NDSBの効果を解析した．

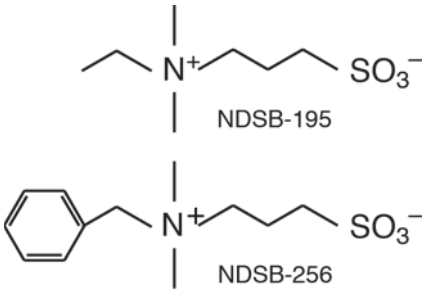


Fig. 1　Structure of NDSB

方法

ユビキチンは酵母由来の物を^{15}Nでラベルした．溶液条件は25 mM リン酸ナトリウム，50 mM NaCl, pH 6.4, 303 Kとした．用いた装置のプロトン共鳴周波数は^{15}NのR_2測定については600 MHz, アミド水素の線幅測定については500 MHzである． 線幅はTopspin 3ソフトウェアのpeakwコマンドで求めた．

non-detergent sulfobetaine, protein, dynamics, cis-trans isomerization

○わんはいめい，いしいたけし，ほそだかずお，こうのとしゆき，てらわきしんいち，わかまつかおり

Pro残基のcis-trans異性化の速度はGly-Proジペプチド（100 mM in 20 mM Tris-d_{11}, pH 8.0, D_2O, 333 K）について解析した．この条件においてGlyのαH_2はtrans異性体とcis異性体とで化学シフトもstrong couplingのパターンも異なり容易に区別できる．trans-αH_2とcis-αH_2の間のEXSY cross peak強度のmixing time依存性を解析することにより異性化速度を求めた．

結果

ヒトユビキチンのGly53のアミドシグナルはブロードであること，その原因はAsp24側鎖COO^-とGly53主鎖HNとの水素結合が原因であること[2]が報告されている．このシグナルはNDSB-195の濃度依存的にシャープになった．また，NDSB-195の添加により Gly53だけ^{15}NR_2が有意に増大した（Fig. 2）．これらのことから，NDSB-195はユビキチンのコンフォマー間の異性化速度を増大させることがわかった．

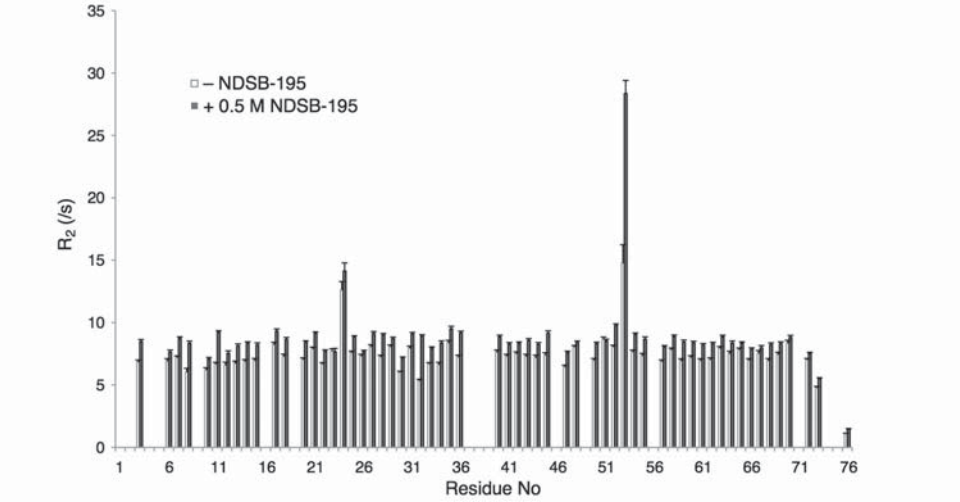


Fig. 2　Effects of NDSB-195 on ^{15}N R_2 of ubiquitin

Pro残基のcis-trans異性化速度はNDSB-256の添加で増大した（Fig. 3）.またその程度は既に異性化効果が報告されているイミダゾールと同程度であった．一方，NDSB-195は異性化速度を減少させた．

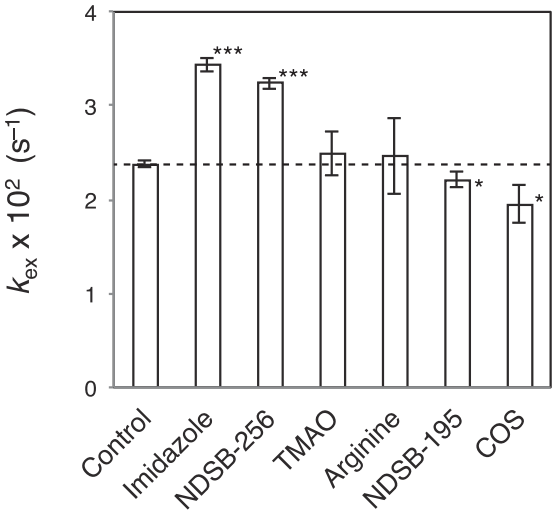


Fig. 3　Effects of NDSB on the cis-trans isomerization of Gly-Pro dipeptide

考察

NDSB-195にはtrimethylammonium N-oxide (TMAO)のようなオスモライトと同様にタンパク質をコンパクトにする効果がある．しかし，TMAOはNDSB-195とは異なりGly53の線幅に影響を与えなかった．またTMAOはProのcis-trans異性化速度に影響を与えなかった．従来のオスモライトには見られないNDSB特有の効果はタンパク質のダイナミクスに与える効果の違いに起因している可能性が考えられる．

引用文献

1) M. Hagihara, et al., *FEBS Open Bio* **2**, 20–25 (2012).
2) A. Sidhu, et al., *J. Mol. Biol.* **411**, 1037–1048 (2011).

P15

転写因子AML1 Runt domainに結合する高親和性RNAアプタマーのNMR解析

○高田 健多[1]，天野 亮[1]，田中 陽一郎[2,3]，永田 崇[4,5]，片平 正人[4,5]，
中村 義一[6,7]，神津 知子[3]，坂本泰一[1]

[1]千葉工業大学・工学部，[2]横浜国立大学・機器分析評価センター・RI教育研究施設，[3]埼玉県立がんセンター・臨床腫瘍研究所，[4]京都大学・エネルギー理工学研究所，[5]京都大学・エネルギー科学研究科，[6]東京大学・医科学研究所，[7]株式会社リボミック

NMR analysis of the high affinity RNA aptamer that binds to the transcription factor AML1 Runt domain

○Kenta Takada[1], Ryo Amano[1], Yoichiro Tanaka[2,3], Takashi Nagata[4,5], Masato Katahira[4,5], Yoshikazu Nakamura[6,7], Tomoko Kozu[3], Taiichi Sakamoto[1]

[1] Faculty of Engineering, Chiba Institute of Technology, [2]Facility for RI Research and Education, Instrumental Analysis Center, Yokohama National University, [3]Research Institute for Clinical Oncology, Saitama Cancer Center, [4]Institute of Advanced Energy, Kyoto University, [5]Graduate School of Energy Science, Kyoto University, [6]Department of Basic Medical Sciences, Institute of Medical Science, University of Tokyo, [7]RIBOMIC Inc.

AML1 protein is a transcription factor that is involved in the development of hematopoietic cells. Several genetic aberrations that disrupt the function of AML1 have been frequently observed in human leukemia. To develop a new therapeutic agent for human leukemia, we obtained RNA aptamers that bind to the AML1 Runt domain. To characterize the properties of one of the aptamers, we analyzed the interaction between the Runt domain and the aptamer by using SPR and analyzed the secondary structure of the aptamer by using NMR. It was suggested that the multi-branched loop of the aptamer is important for binding to the Runt domain.

序論

AML1タンパク質（AML1）は造血細胞の分化に関わる転写因子である．急性骨髄性白血病において，AML1の様々な変異が見つかっている．また，AML1はRunt domainとよばれるDNA結合領域をもち，標的DNA（5’-TGTGGTT-3’/5’-AACCACA-3’）に結合する．X線結晶構造解析およびNMR解析によって，Runt domainは２つのループを含む領域とC末端領域で標的DNAに結合することが明らかになっている．

私たちは，急性骨髄性白血病の治療薬を開発する目的でRunt domainに対して特異的に結合するRNAアプタマーの開発を行っている．これまでに，Runt domainに対して標的DNA（K_d = 9.6 nM；Fig.1 a）よりも強く結合するRNAアプタマー(Apt1-S, K_d = 0.99 nM；Fig. 1 b)を取得し，その部分構造が標的DNAを擬態していることを明らかにしてきた．本研究では，より厳しい選別条件下で

AML1 (RUNX1), SELEX, aptamer

○たかだけんた，あまのりょう，たなかよういちろう，ながたたかし，
かたひらまさと，なかむらよしかず，こうづともこ，さかもとたいいち

SELEXを行うことにより，さらに高親和性のアプタマー(AptS4, K_d = 40 pM ; Fig. 1 c)を取得した．そこで，そのアプタマーとRunt domainの相互作用機序を明らかにすることを目的とした．

方法

構造解析を容易にするため，取得したアプタマーを短鎖化し(AptS4-S, K_d = 0.29 nM ; Fig. 1 d)，T7 RNAポリメラーゼを用いた*in vitro* transcription法により調製した．Runt domainについては，大腸菌による大量発現系を用いて調製した．試料濃度は0.35 mMとし，溶液条件は20 mMリン酸緩衝液(pH 6.5)を用いた．NMRスペクトルの測定にはAVANCE600 (Bruker BioSpin社) を用いた．NOESYスペクトルにより，アプタマーのシグナルの帰属及び二次構造を解析した．さらに，AptS4-Sの変異体を作製し，Runt domainに対する結合活性を表面プラズモン共鳴(SPR)を用いて測定した．SPRの測定には，Biacore X (GE Healthcare 社)を用いた．

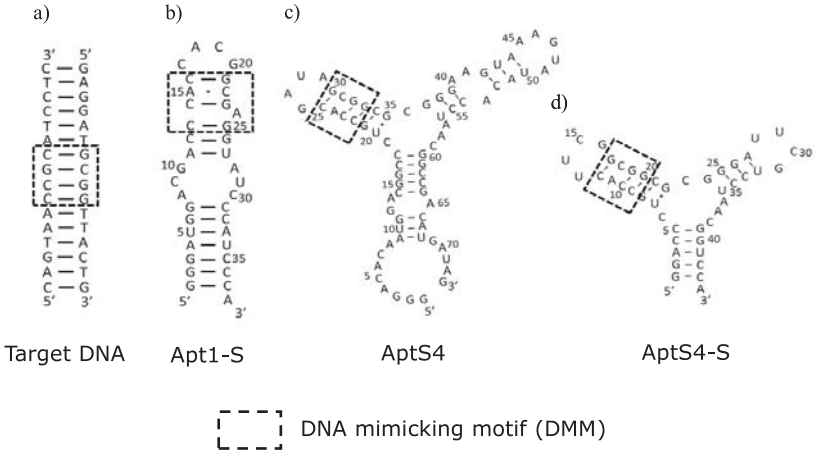


Fig. 1 The secondary structure of the target DNA (a), previously developed aptamer (b) and the new aptamer (c) and a truncated variant of the new aptamer (d).

結果および考察

NOESYスペクトルを測定し，イミノプロトンシグナル間のNOEシグナルを連鎖帰属することにより，AptS4-Sのイミノプロトンシグナルを帰属した(Fig. 2)．その結果，標的DNAの類似配列(DMM)をもち，２つのhairpin loop構造とmulti-branched loop構造をもつことが示唆された．また，multi-branched loopに近接するU7:G22塩基対の形成を確認することができたが，G24:U35塩基対を確認することはできなかった．

一方で，AptS4-SのDMMおよびmulti-branched loop部分に変異を導入したところ，結合活性を失った．このことから，AptS4-SとRunt domainの相互作用において，DMMとmulti-branched loop構造が重要であると考えられる．現在は，NMRを用いて取得されたアプタマーとRunt domainの相互作用を解析し，アプタマーとの結合に重要なアミノ酸残基の同定を進めている．

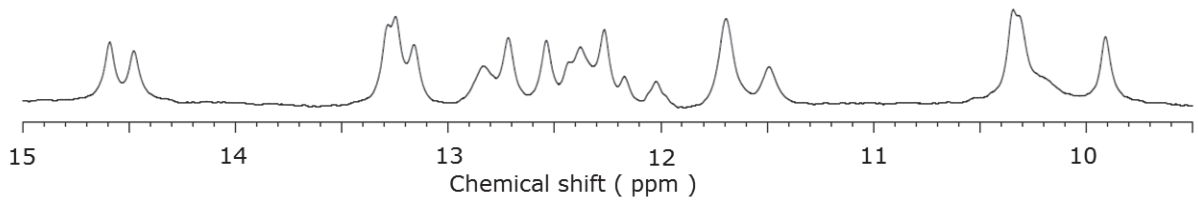


Fig. 2 The imino proton region of the ^{1}H NMR spectrum of AptS4-S

引用文献

1) Fukunaga J., *et al*, *RNA*, **19**, 927-936 (2013)

2) Nomura Y., *et al*, *J. Biochem.*, **154**, 513-519 (2013)

P16

SELEXの各ラウンドのRNAプールのNMR解析

○天野亮[1]，高田健多[1]，青木一晃[2]，宮川伸[2]，中村義一[2,3]，神津知子[4]，坂本泰一[1]
[1] 千葉工業大学・工学部，[2] 株式会社リボミック，[3] 東京大学・医科学研究所，[4] 埼玉県立がんセンター・臨床腫瘍研究所

NMR analysis of the RNA pools for each SELEX round

Ryo Amano[1], Kenta Takada[1], Kazuteru Aoki[2], Shin Miyakawa[2], Yoshikazu Nakamura[2, 3], Tomoko Kozu[4] and Taiichi Sakamoto[1]
[1]Faculty of Engineering, Chiba Institute of Technology, [2]RIBOMIC Inc., [3] Department of Basic Medical Sciences, Institute of Medical Science, University of Tokyo., [4]Research Institute for Clinical Oncology, Saitama Cancer Center

RNA aptamers are RNA molecules that bind to a specific target molecule, which are selected from single strand RNA libraries typically comprising up to 10^{15} different sequences by an iterative process of selection and amplification, called Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment (SELEX). The diversity of the RNA pools decreases by several SELEX rounds. Thus, the follow-up of the convergency of the RNA pools is essential for successful selection of aptamers with good binding affinities and specificities. In this study, we carried out NMR analysis to estimate the structure convergency of the RNA pools during SELEX against the AML1 Runt domain.

序論

試験管内分子進化法（SELEX）は，ランダムな配列をもつ一本鎖RNA poolから任意の標的分子に結合するRNAアプタマーを選別する手法である（Fig. 1）[1,2]．SELEXでは，標的分子に結合するRNAの「選別」と，選別されたRNAの「増幅」の過程を10回程度反復して行うことで，RNA poolの多様性を徐々に減少させていき，最終的には，標的分子と結合するRNAアプタマーの配列を同定する．ただし，最適な選別条件は標的分子ごとに異なるため，何度も試行錯誤が必要となる

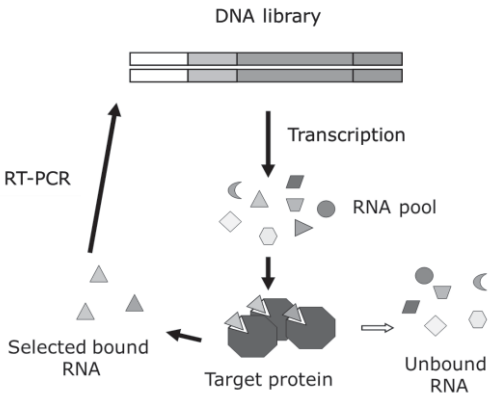


Fig. 1 Overview of SELEX

したがって高い親和性・特異性をもつアプタマーを効率的に取得するためには，RNA poolの収束具合を観察し，選別条件を最適化することで，選別効率を上げる必要がある．

そこで，我々は，SELEXの各選別ラウンドのRNA poolの構造多様性の変化をNMRにより分析することを目的とした．

SELEX, RNA, aptamer

○あまのりょう，たかだけんた，あおきかずてる，みやかわしん，なかむらよしかず，こうづともこ，さかもとたいいち

方法

転写因子AML1のRunt domainに対して行った全8ラウンドのSELEXのRNA poolおよび単離されたRNAアプタマー（S1）についてNMR解析した．各ラウンドの一本鎖RNA poolおよびS1をT7 RNAポリメラーゼを用いた*in vitro* transcription 法により合成した．その後，フェノール/クロロホルム処理およびエタノール沈殿により精製した後，水に溶かした．次に，90 ℃で5分間保温した後に急冷することで，RNAの構造を形成させた．さらに，限外ろ過膜 vivaspin 3000 MWCO（Sartorius）を用いて， 20 mMリン酸ナトリウム緩衝液（pH 6.5）にNMR試料を溶解した．NMRスペクトル測定に用いる各ラウンドのRNAプールとS1の濃度はそれぞれ0.1-0.2 mMとした．測定温度は298 Kとした．NMRスペクトルの測定にはAVANCE600（Bruker BioSpin）を用いた．

結果

全8ラウンドのSELEXにおけるRNA poolおよびS1の1Dイミノプロトンスペクトルを測定し，比較した（Fig. 2）．未選別の0ラウンドのRNA poolにおいても多くのシグナルが観測された．さらに，0ラウンドと1ラウンドのRNA poolのスペクトルを比較したところ，10.5-11.5 ppmのシグナルが消失したことがわかった．また，選別を重ねた8ラウンドのRNA poolのスペクトルには，S1に観測される10-12 ppmのシグナルが観測されるようになった．

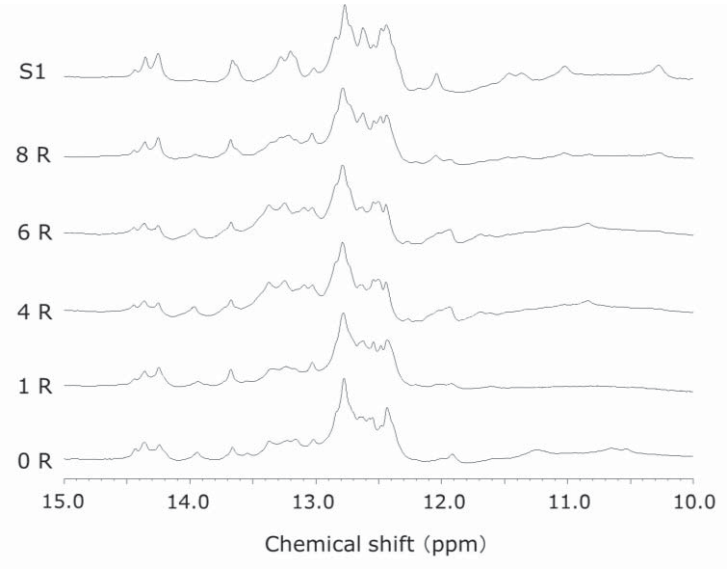


Fig. 2 1D imino proton spectra of S1 aptamer and the RNA pools for each SELEX rounds

考察

イミノプロトンシグナルは，塩基対を形成した場合など，イミノプロトンと水のプロトンの交換が遅い場合に観測される．したがって，未選別の0ラウンドのRNA poolにおいて多くのイミノプロトンシグナルが観測されたことから，0ラウンドのRNA poolに含まれる多くのRNAは構造を形成していることが示唆された．また，10-11 ppm付近のイミノプロトンシグナルは，非ワトソンクリック型の塩基対に由来するシグナルであることが多い．したがって，未選別の0ラウンドと1ラウンドのRNA poolを比較したところ10.5-11.5 ppmのシグナルが消失したことから，１回の選別によって，RNA pool中の非ワトソンクリック型の塩基対をもつRNAの存在割合が減少したと考えられた．さらに，ラウンドを重ね，選別を繰り返すことによって，S1に観測されるシグナルと同じ化学シフトにシグナルが観測されるようになったことから RNA pool内においてS1が濃縮されていることが示唆された．

現在，表面プラズモン共鳴法と次世代シーケンサーを用いて，ラウンドごとのRNA poolの結合親和性および配列多様性の変化を解析し，NMRを用いて分析した構造多様性の変化と比較することにより，SELEXにおけるRNA poolの変化を多角的に理解することを試みている．

引用文献

1) Ellington AD, Szostak JW., *Nature*. **346**, 818-822, 1990.

2) Tuerk C, Gold L., *Science*. **249**, 505-510, 1990.

P17

プロリン異性化酵素Pin1の機能発現および機能制御機構の解明

○栃尾 尚哉，川嵜 亮祐，玉利 佑，楯 真一
広島大学・大学院・理学研究科

Expression and regulation of the function for the Proline isomerase, Pin1

○Naoya Tochio, Ryosuke Kawasaki Yu, Tamari, Shin-ichi Tate
Department of Mathematical and Life Sciences, Graduate School of Science, Hiroshima University

Pin1 is a phosphorylation-specific peptidyl prolyl *cis*/*trans* isomerase (PPIase). Pin1 is composed of two independently moving domains connected by the unstructured linker: the phosphor peptide binding WW domain and the catalytic PPIase domain. Pin1 specifically recognizes and isomerizes the pSer/pThr – Pro motif where is the target site for both the WW and PPIase domains. In this study, we investigated the changes of the domain-specific binding affinity and the isomerase activity for a series of the mutants with the different linker length. Consequently, we found that the Pin1 isomerase activity was regulated by the stochastic dynamics of the WW domain through the linker. In addition, we observed the decrease in the isomerase rates by the H/D solvent isotope effect, which probably suggested that the hydrogen bond was involved in the catalytic transition state.

Pin1はリン酸化特異的異性化酵素であり，pSer/pThr – Proモチーフを認識/異性化することで，細胞周期など様々な生物イベントのシグナル伝達に関与している．Pin1は特定の立体構造をもたないリンカーによって結ばれた独立して運動する2つのドメインから構成されている：リン酸化ペプチド結合能を有するWWドメインと異性化酵素活性を担うpeptidyl propyl isomerase (PPIase)ドメインである(Fig. 1)． つのドメインはどちらもPin1の標的配列であるpSer/pThr – Proモチーフを認識する．そのため，リン酸化ペプチド結合能の高いWWドメインは，全長Pin1の標的配列への結合能の向上を担っていると考えられた．一方で，WWドメインを含む全長Pin1よりむしろWWドメインを含まない単独のPPIaseドメインの方が高い異性化活性を示した[1,this study]．この一見相反するような結果については未だ十分な説明はなされていない．

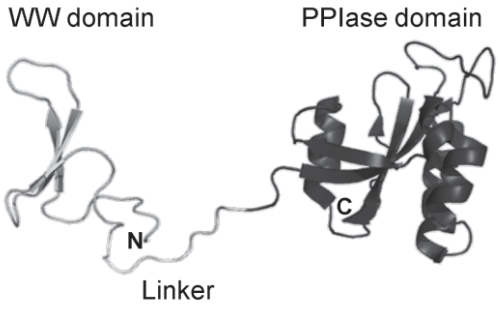


Fig. 1. Ternary structure of Pin1.
WW domain shown as left light agrey; PPIase domain as right dark grey (PDBID: 1NMW).

本研究では，リンカーの長さの異なった複数の変異体を作成し(，WWドメインとPPIaseドメイン各々のドメイン選択的に結合する非天然アミノ酸を含んだ二価性ペプチドとの結合実験を行った．二価性ペプチド添加に伴ったPin1のNMRシグナルの軌跡は曲線的であり，単純な結合 – 非結合の2状態変化ではない(Fig. 3)．化学シフト変化の主成分分析の結果は，この系が少なくとも1つの中間状態を含んでいることを示した．そこで，3状態を仮定してフィッティング

プロリン異性化酵素，同位体効果

○とちおなおや，かわさきりょうすけ，たまりゆう，たてしんいち

を行ったところ，曲がったシグナルの軌跡をよく再現でき解離定数の異なる2つの結合過程を見出した．リンカー変異体についても解析を行ったところ，弱い結合過程では大きな変化はなく，強い結合過程で違いが見られた．各変異体での強い結合過程における変化の傾向は，リガンド非存在下での変異体と野生型での化学シフト値の変化の傾向と一致したことから(Fig. 2)，特定の構造をもたないリンカー領域を介したWWドメインの確率的な動態が結合に影響を与えていることが示唆された．Pin1の標的配列を含んだモデルペプチドを用いた異性化活性実験を行ったところ，野生型が最も活性が低く，先に示したリンカー変異体で変化が観測された強い結合過程において，その結合が弱くなるに従って活性の向上が見られた．WWドメインの確率的な動態による結合状態の変化が，機能調節を行っていると考えられる．

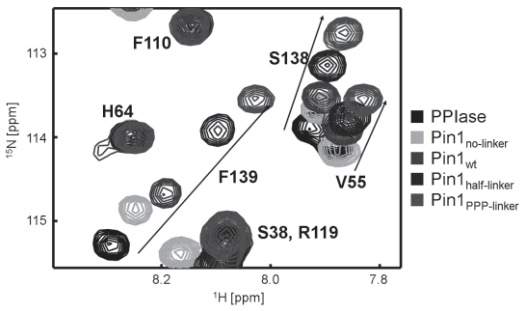


Fig. 2. ^{1}H,^{15}N HSQC spectra of a series of Pin1 mutants.

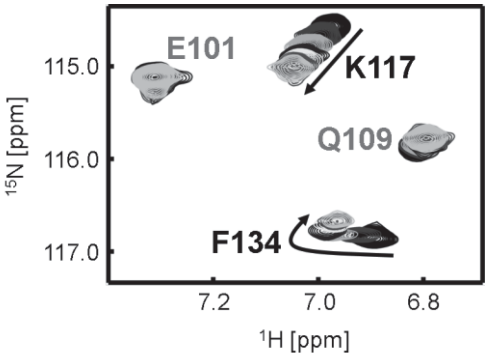


Fig. 3. NMR titration experiments of the bivalent peptide against the wild type Pin1.

Pin1の異性化過程について，近年Pin1内部および標的配列であるリガンド分子内部での水素結合の重要性が報告されている[2–4]．我々はEXSY法を用いた異性化活性実験を複数の温度で行い，アイリングプロットから活性化に係る熱力学的パラメータの算出を行った．同様の実験を重水中で行うことで，H/D solvent isotope effectの見積もりを行った．重水素による明らかな異性化速度の低下と活性化エネルギーの上昇がみられ，活性化状態における水素結合の関与が明らかとなった．

References

(1) Wilson, K. a, Bouchard, J. J., and Peng, J. W. (2013) Interdomain Interactions Support Interdomain Communication in Human Pin1. *Biochemistry 52*, 6968–6981.

(2) Mercedes-Camacho, A. Y., Mullins, A. B., Mason, M. D., Xu, G. G., Mahoney, B. J., Wang, X., Peng, J. W., and Etzkorn, F. a. (2013) Kinetic isotope effects support the twisted amide mechanism of Pin1 peptidyl-prolyl isomerase. *Biochemistry 52*, 7707–7713.

(3) Barman, A., and Hamelberg, D. (2014) Cysteine-mediated dynamic hydrogen-bonding network in the active site of Pin1. *Biochemistry 53*, 3839–3850.

(4) Wang, J., Tochio, N., Kawasaki, R., Tamari, Y., Xu, N., Uewaki, J., Utsunomiya-Tate, N., and Tate, S. (2015) Allosteric Breakage of the Hydrogen Bond within the Dual-Histidine Motif in the Active Site of Human Pin1 PPIase. *Biochemistry 54*, 5242–53.

P18

NMR法によるRMF mRNAの翻訳制御領域とスペルミジンの相互作用解析

○佐原 潤平[1]，照井 祐介[2]，五十嵐 一衛[3,4]，柏木 敬子[2]，河合 剛太[1]
[1]千葉工業大学・工学部，[2]千葉科学大学・薬学部，
[3]千葉大学大学院・薬学研究院，[4]アミンファーマ研

NMR Analysis of interaction between the translation regulatory region of RMF mRNA and spermidine

○Junpei Sahara[1], Yusuke Terui [2], Kazuei Igarashi[3,4], Keiko Kashiwagi [2], and Gota Kawai[1]
[1]Faculty of Engineering, Chiba Institute of Technology, Japan, [2]Faculty of Pharmacy, Chiba Institute of Science, [3]Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba University, [4]Amine Pharma Research Institute.

Translation of ribosome modulation factor (RMF) depends on the polyamine and this translational regulation by polyamine is not observed for the mutant with a single mutation at 6 residues upstream of the initiation codon. In order to elucidate the mechanism of this translational regulation, interactions between RNAs corresponding to the 5' untranslated region (UTR) of *rmf* mRNAs, wildtype and the mutant, and spermidine (Spd) were analyzed by PAGE, UV-melting and NMR method. NMR analysis indicated that different base pairs are formed for the wildtype and mutant, suggesting that the mutation affect the structure of the 5' UTR of *rmf* mRNA. NMR spectra of the both RNAs were changed by adding 1 mM Spd. Further analysis is in progress.

序論

大腸菌において，定常期における細胞の生存力の少なくとも一部はポリアミンによるribosome modulation factor（RMF）の翻訳量の上昇に依存することが示されている．野生型ではポリアミンが欠乏するとRMFの翻訳量が低下するが, RMFの開始コドンから6 残基上流のCをGに変えた変異体では翻訳量がポリアミンに依存せず高いレベルで維持されることが確認されている[1)]．本研究では，*rmf* mRNAとポリアミンの相互作用をNMR法によって解析し，*rmf* mRNAの構造変化と翻訳量の変化との関係を解明することを目的としている．これまでの研究では，標準的な二次構造予測プログラムであるMFOLDによる予測結果に基づいて，SD配列を含むステムループに相当するRNAを用いて解析が行われたが，スペルミジン（Spd）による構造の変化は確認されなかった[2)]．そこで，二次構造予測プログラムvsfold5によって予測を行ったところ，野生型において，MFOLDとは異なるステムループの形成が予測された．そこで，新たに予測されたステムループに相当するRNA（RMF64-WT，RMF64-60G）をデザインした．T7 RNAポリメラーゼによる転写において，5'末端の配列はGGであることが望ましいが, ステムループの末端をGGとすると予測される二次構造が異なるため，目的のステムループの末端はそのままとし，その5'末端側にGGで始まる短いステムループ（RMF_SL1）を付加した（Fig. 1）．なお，*rmf* mRNAにおいて，該当する位置にはUを挟んでステムループが存在している．これらのRNAの二次構造およびSpdとの相互作用をNMR法によって解析した．

polyamine modulon, spermidine, Ribosome Modulation Factor

○さはらじゅんぺい，てるいゆうすけ，いがらしかずえい，かしわぎけいこ，かわいごうた

方法

RMF64-WTおよびRMF64-60Gについては，試験管内転写合成法で調製した．RMF_SL1については北海道システム・サイエンス（株）に化学合成を委託した．

溶液条件を50 mM 塩化ナトリウムを含む20 mMリン酸緩衝液とし，298 KでNMRスペクトルの測定を行った．RMF64-WT，RMF64-60G，RMF_SL1の濃度はそれぞれ0.15 mM，0.08 mM，0.30 mMであった．測定にはAVANCE600（ブルカー・バイオスピン.）を用いた．

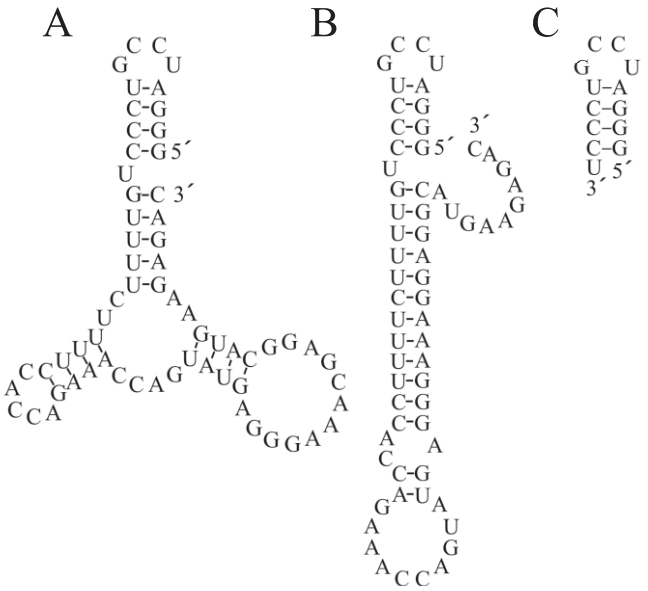


Fig. 1　Predicted secondary structures
A: RMF64-WT, B: RMF64-60G, C: RMF_SL1

結果および考察

Fig. 2に，RMF64-WT（A），RMF64-60G（B）およびRMF_SL1（C）のNMRスペクトルのイミノプロトン領域を示した．RMF64-WTおよびRMF64-60GのいずれのスペクトルにおいてもRMF_SL1と同じ位置にシグナルが観測されていることから，デザインした通りに，5'側のステムループが形成されていることが示唆された．RMF64-WTとRMF64-60GのNMRスペクトルを比較すると，パターンが大きく異なっていることから，2つのRNAで異なる塩基対を形成していることがわかった．

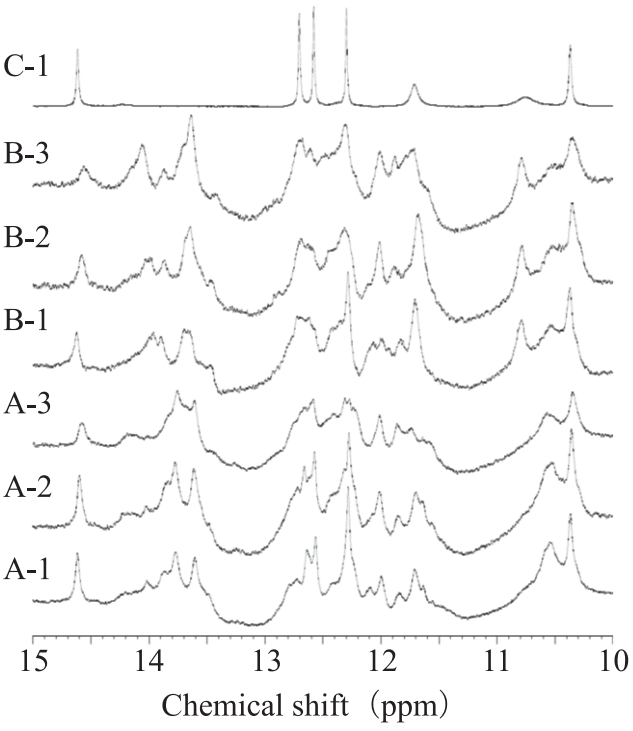


Fig. 2　^{1}H-NMR spectra
A: RMF64-WT, B: RMF64-60G, C: RMF_SL1,
1: free RNA, 2: +Mg^{2+}, 3: +Mg^{2+}, +Spd

RMF64-WTでは，終濃度で1 mMのMg^{2+}の添加によってスペクトルは大きくは変化しなかったが，RMF64-60Gでは，Mg^{2+}の添加によってスペクトルの一部が変化した．いずれのRNAにおいても，終濃度で1 mMのSpdを添加した場合のスペクトルの変化は小さかった．したがって，Spdの結合による二次構造の大きな変化は観測されなかった．

現在は，非交換性プロトンについて，Spdによる影響を調べており，ゲルシフト法および*T*mの解析結果と合わせて，Spdによる翻訳制御のメカニズムについて議論したい．

引用文献

1) Terui Y. et al., *J Biol Chem*, **285**, 28698-28707 (2010)

2) 木村ほか，ポリアミンと核酸の共進化，2014年6月，慈恵医大

P19

化学合成法による核酸へのスピンラベルの導入とNMR構造解析への応用

○菅野 優一[1]，幡野 明彦[1]，大津 舞菜[2]，河合 剛太[2]
[1]芝浦工業大学・工学部，[2]千葉工業大学・工学部

Incorporation of spin label into nucleic acids by the chemical synthesis and its application for NMR structure determination

○Yuichi Kanno[1], Akihiko Hatano[1], Maina Otsu[2], and Gota Kawai[2]
[1] *Faculty of Engineering, Shibaura Institute of Technology, Japan.*
[2] *Faculty of Engineering, Chiba Institute of Technology, Japan.*

Recently, incorporation of spin label into specific positions and measurements of paramagnetic relaxation enhancement (PRE) are introduced into the protein structure determination. In the present study, spin label moiety was incorporated into the nucleic acid bases by the chemical synthesis and oligomers with the spin label in the specific position was obtained by conventional solid state synthesis. This method was applied to two kinds of RNA stem-loops and NMR spectra were measured.

序論

近年，スピンラベルを生体高分子に導入し，常磁性緩和促進（PRE）によって長距離情報を得る手法が有効であることが示され，すでにさまざまなタンパク質に応用されている．本研究では，スピンラベル分子をヌクレオシド構造内に導入し，オリゴマー合成を行うことで特定の位置をフリーラジカルで標識することが可能となり，NMR 法を用いて核酸などの立体構造解析に利用することをめざしている．スピンラベルを導入した化学合成ユニット（ホスホロアミダイトユニット）が供給できれば，比較的短い DNA あるいは RNA であれば，自動合成機によって，任意の位置にそれを組み込むことが可能になる．

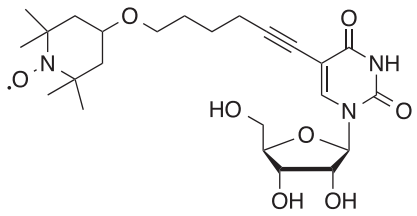


Fig. 1 Modified nucleoside used in this study

今回は，Fig. 1 に示したスピンラベルを有した化合物を有機化学的に合成した．本化合物は，ウラシル塩基の 5 位にアルキンおよびブチル基を介してニトロキシルラジカルの一種である 2,2,6,6- テトラメチルピペリジン 1- オキシル（TEMPO）が付加されている．この塩基は，アデノシンとA=U 塩基対を形成することができるため，スピンラベルをループのみならず，ステム領域にも導入することができる．ステム導入した場合には，スピンラベル（TEMPO）は主溝側に露出する．今回は，この修飾ヌクレオチドをホスホロアミダイトユニット化し，通常の自動合成機による固相合成によって，3種類のRNAステムループに導入した．Fig. 2 はそのうちのひとつ（PASL2-GC）を示しており，丸はスピンラベルの導入位置を示している．

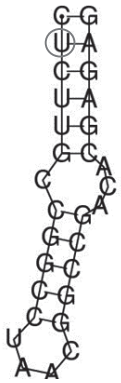


Fig. 2 PASL2-GC

スピンラベル，核酸，化学合成

○かんのゆういち，はたのあきひこ，おおつまいな，かわいごうた

方法

スピンラベルを有したヌクレオシドは，Fig 3 のルートに従って合成を行った。ヨウ化ウリジンの 5′ 位をジメトキシトリチル化，2′ 位を *t*-ブチルジメチルシリル基で保護し，塩基部位の 5 位に薗頭カップリングによりスピンラベル部位である TEMPO を導入した．最後に，3′ 位をホスホロアミダイト化することで，核酸自動合成機に導入可能とした。

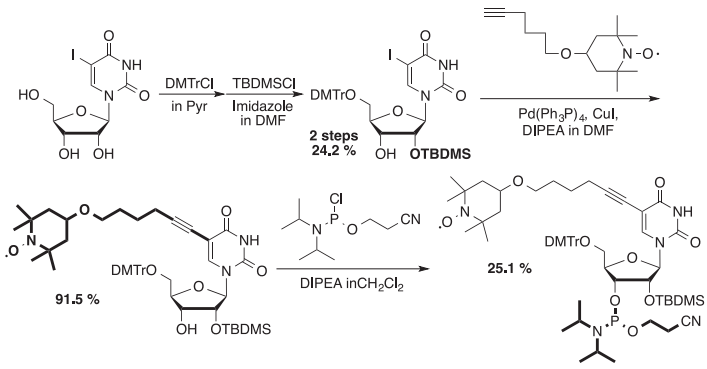


Fig. 3 Synthetic route of spin labeled nucleoside

スピンラベルを特定の位置に導入した RNA を核酸合成機により調製し，NMR スペクトルの測定を行った．測定には Avance600 分光計（ブルカー・バイオスピン）を用い，298 K において行った．

結果および考察

Fig. 4 は，スピンラベルを導入していない PASL2-GC および２番目の位置に導入した PASL2-GC-U2s の二次元 HOHAHA スペクトルの一部である．この領域では，ピリミジン残基の H5-H6 に由来するクロスピークが観測される．PASL2-GC の NMR シグナルについては，通常の方法でほぼ帰属が終わっている．

U2 にスピンラベル残基を導入したことにより，U2 に由来するクロスピークが消失していることが分かる．２つのスペクトルを比べると，スピンラベルを導入していない RNA では，多くのクロスピークがほぼ均一の強度で観測されているが，一方，スピンラベルを導入したRNAでは，クロスピークの強度のばらつきが大きいことがわかる．これは，スピンラベルによる常磁性緩和促進（PRE）の効果によるものと考えられ，現在，定量的な解析を進めている．

PASL2-GC は，ポリアミンの一種であるスペルミンに対する RNA アプタマーの変異体であり，慈恵会医科大学の小黒博士によって取得されたものである．今後，スピンラベルを導入した試料を用いて，小黒博士との共同研究として，RNA とスペルミンとの相互作用解析も進める予定である．また，スピンラベルを導入した他のステムループについても解析を進めている．

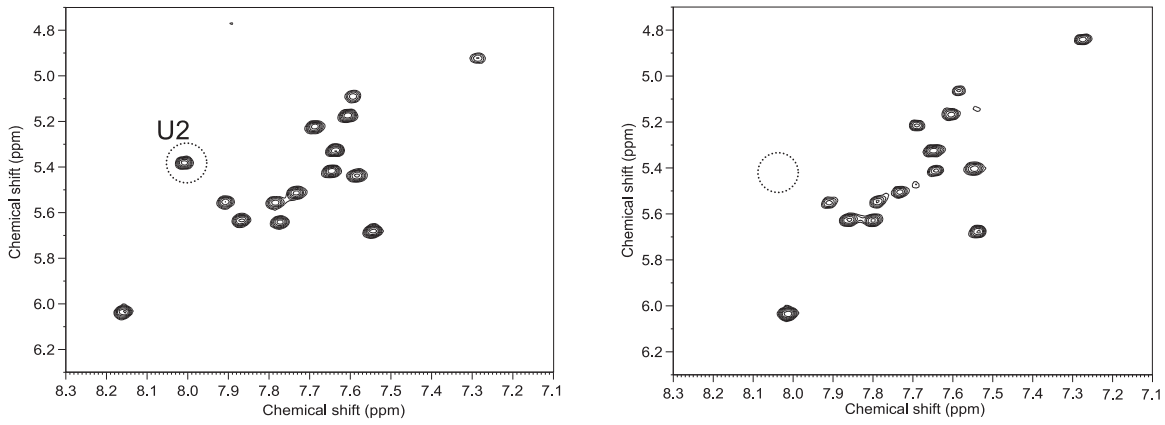


Fig. 4 HOHAHA spectra of PASL2-GC. Left: without spin label, Right: spin label at position 2 of U2

P20

リアルタイムNMR法の新たな展開 ー抗HIVタンパク質APOBECG3Gの認識ヌクレオチド、DNA上のスライディング及びエピジェネティクスとの関連に関する新知見ー

○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

Novel aspects of real-time NMR methods –New findings in anti-viral protein APOBEC3G concerning sequence-recognition and sliding on the DNA, and its involvement in epigenetics–

○Keisuke Kamba[1,2], Takashi Nagata[1,2], and Masato Katahira[1,2]
[1]*Institute of Advanced Energy, Kyoto University, Japan.*
[2]*Graduate School of Energy Science, Kyoto University, Japan.*

Human APOBEC3G (A3G), an anti-viral factor that restricts HIV infection, deaminates cytosine (C) into uracil (U) within the viral cDNA. Although the structures of several constructs of A3G were determined, the mechanism of the interaction between A3G and single-stranded DNA (ssDNA) are yet to be elucidated. We previously developed a real-time NMR method that can monitor A3G's deamination reaction involving sliding along DNA. Here, we present new findings obtained by this method. Firstly, we have shown that A3G recognizes 5 consecutive nucleotides of ssDNA. Secondly, the electrostatic interaction between A3G and the phosphate backbone of ssDNA turns out to be the key for sliding. Finally, we have applied this method to 5-methylcytosine (*5mC*), an epigenetic marker, or 5-hydroxymethylcytosine (*5hmC*) containing DNA and demonstrated for the first time that A3G can deaminate *5mC*.

［序］ ヒトAPOBEC3Gタンパク質 (A3G) はHIVのゲノムに変異を導入し無力化する抗ウイルス因子である。A3Gは一本鎖DNA中のシトシンを脱アミノ化しウラシルに変換する[1)]。特にシトシントリプレット (CCC) 配列 の3番目のシトシンに対し強い活性を示す。CCC配列が複数ある場合、A3Gは5'端に近いCCC配列ほどより強く脱アミノ化する (3'→5' polarity)。これまでに我々はA3Gの脱アミノ化反応をリアルタイムNMR法により実時間計測する方法を確立した。そして酵素活性がスライディングの方向に依存することを導入する事で、3'→5' polarityが説明できることを示した[2)]。しかしA3GとssDNAの相互作用は高度に動的なうえ、互いの結合が弱い (解離定数100 μM～1 mM程度) ため、いくつかのグループによりA3G単体の構造が決定されているにも関わらず、A3GによるCCC配列の認識機構及びスライディング時におけるA3G-ssDNA相互作用機構については、未だ不明である[1)]。本研究では、リアルタイムNMR法を用いてさまざまな核酸基質と溶媒条件でA3Gの脱アミノ化反応活性を比較し、A3Gと相互作用する1本鎖DNA上の領域を特定した[3)]。またスライディングを支える相互作用に関する情報も得た[3)]。近年、エピジェネティックな遺伝子発現制御に関わる修飾塩基 (5-メチルシチジン；*5mC*、5-ヒドロキシメチルシチジン；*5hmC*) もA3Gの基質となることが示唆されている[4)]。そこでA3Gがこれらの修飾塩基を脱アミノ化するかどうかもリアルタイムNMR法により検証した[3)]。

リアルタイムNMR法, 酵素反応, 認識部位

○かんばけいすけ，ながたたかし，かたひらまさと

［結果と考察］ ①CCC配列を1つ含む10残基のDNAに関し、一残基ずつ系統的にRNAに置換して脱アミノ化活性を比較したところ、CCCとその前後1つを置換した際に顕著な活性の低下がみられた(Fig. 1)[3]。これによりA3Gは連続した5ヌクレオチドを認識することが明らかになった。

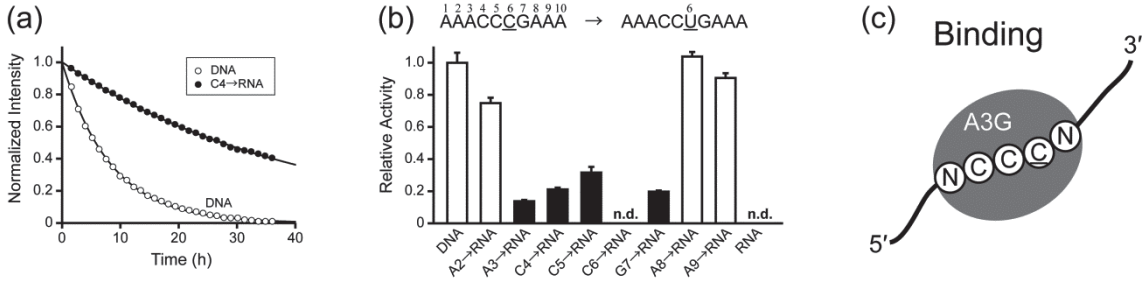


Fig. 1 Deamination for substrates containing a single DNA→RNA substitution. (a) Time course of the decay of C6 due to deamination. (b) Relative deamination activity. (c) Scheme of the nucleotide recognition.

②二つのCCCをリンカーでつないだ38merの1本鎖DNAを基質として、3'→5' polarityに関する解析を行った。リンカー配列をRNAあるいはAbasic DNAに置換しても、 3'→5' polarity に変化は見られなかった。また3'→5' polarityは塩濃度が高くなるに従い減少し、逆に塩濃度が低い程上昇した (Fig. 2) [3]。以上の結果は、高塩濃度ではリン酸基が関与した静電相互作用が弱まりA3GがDNAから容易に脱落してスライディングが中断されてしまうが、低塩濃度では静電相互作用が強まりスイライディングが有効に機能し、この結果高い3'→5' polarityがもたらされたと解釈される。

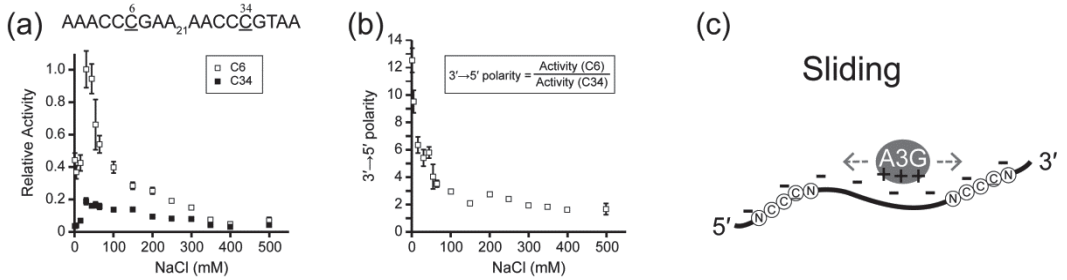


Fig. 2 The effect of NaCl on the deamination activity and 3'→5' polarity. (a) Relative deamination activity. (b) 3'→5' polarity. (c) Scheme of the sliding.

③CX配列 (ただしXはC、*5mC*、または*5hmC*) を1つ含む10残基のDNAを基質とし、A3Gの脱アミノ化活性を比較した。A3Gが*5mC*を脱アミノ化することを、リアルタイムNMR法により初めて検出できた (Fig. 3) [3]。一方*5hmC*は脱アミノ化されない事も分かった (Fig. 3)。

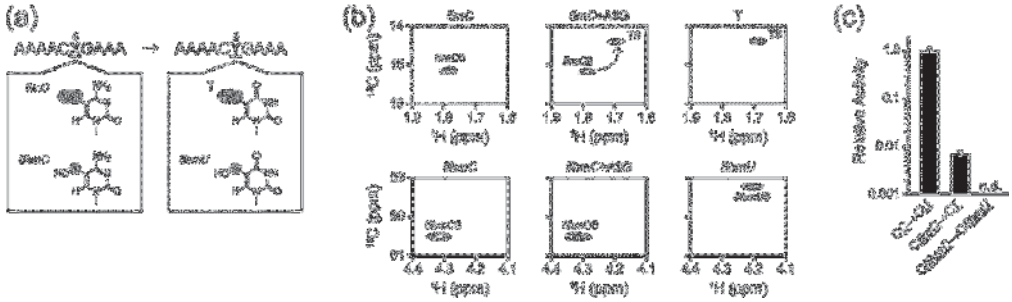


Fig. 3 Deamination reactions for substrates containing *5mC* or *5hmC*. (a) Scheme of the experiments. (b) ^{1}H-^{13}C HSQC spectra of DNA containing *5mC* (upper) or *5hmC* (lower). (c) Relative deamination activity.

［参考文献］ 1) Aydin, H. *et al*., *Structure* **22**, 668-684, 2014.
2) Furukawa, A. *et al*., *Angew.Chem.Int.Ed.Engl*. **53**, 2349-2352, 2014.
3) Kamba, K. *et al*., *PLoS One* **10**, e0124142, 2015.
4) Bhutani, N. *et al*., *Cell* **146**, 866-872, 2011.

P21

lncRNA結合タンパク質SHARPの構造解析

○永井　敢[1]，小林　彩保[2]，伊藤　隆[1,2]，三島　正規[1,2]
[1]首都大学東京　化学コース
[2]首都大学東京　理工学研究科

Structural studies of the lncRNA-binding protein SHARP by NMR

○Kan Nagai[1], Ayaho Kobayashi[2], Yutaka Ito[1,2] and Masaki Mishima[1,2]
[1]*Department of Chemistry, Tokyo Metropolitan University*
[2]*Graduate School of Science and Engineering, Tokyo Metropolitan University*

SHARP (SMRT/HDAC1-associated repressor protein), a transcriptional co-repressor, which possesses N-terminal RNA recognition motifs (RRMs) and a highly conserved C-terminal domain, SPOC domain. The RRM domains of SHARP is known to bind a lnc (long nonconding) RNA, SRA. Meanwhile, SPOC domain binds to SMRT, a component of HDAC (histone deacetylase complex). Previously, we reported that the tertiary structure of the SPOC/phosphorylated SMRT complex[1)]. We also found that the interaction is phosphorylation dependent[1)]. Recently, it revealed that SHARP binds to the lncRNA XIST RNA which is an essential factor for dosage compensation [2)3)]. Crystal structure of the RRM2-3-4 of SHARP was already reported[4)], but structure of the SHARP/Xist complex was not reported. To reveal the molecular recognition of Xist by SHARP, we try to determine the SHARP/Xist complex.

序論

ヒトSHARP (SMRT/HDAC associated repressor protein) は、N末端側に4つのRRMドメインとC末端側にSPOCドメインを持つ。N末端領域のRRMドメインでlnc (長鎖ノンコーディング) RNAであるSRA (steroid hormone receptor RNA activator)と結合し、一方、C末端のSPOCドメインでは、HDAC (histone deacetylase complex) に含まれるSMRT (silencing mediator of retinoic and thyroid hormone receptors) と直接相互作用することで、HDACをリクルートし、転写が抑制される。我々は現在までにこのSPOCドメインとリン酸化されたSMRTとの複合体の立体構造を決定し、その結合がリン酸化依存的であることを報告している。

大変興味深いことに、ごく最近、SHARPがlncRNAであるXIST RNAと直接相互作用し、HDACをリクルートすることが明らかになった[2)3)]。XISTは哺乳類における遺伝子量補正に必須のlncRNAであり、カウンターパートとの複合体の構造解析は、生物学的に極めて重要である。SHARPのRRMドメインについては、RRM2-4単独の結晶構造が報告されているが[4)]、本研究では、SHARP/XIST RNA複合体の立体構造解析によって、SHARPとXIST RNAの相互作用の詳細を理解する。

参考文献
1) Mikami S. *et al.*, *Structure* 2014, 22, 35-46, 2) McHugh CA. *et al.*, *Nature* 2015, 521, 232-6, 3) Chu C. *et al.*, *Cell* 2015,161, 404-16, 4) Arieti, F. *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 2014 42, 6742-6752

○ながい　かん、こばやし　あやほ、いとう　ゆたか、みしま　まさき

実験

大腸菌の発現系を用いて安定同位体標識 SHARP の RRM 領域の発現、精製を行った。タイトレーションに用いた RNA は化学合成により調製した。RRM1 については、3D HNCACB, CBCA(CO)NH, HN(CA)CO, HNCO, C(CO)NH, H(CCO)NH, 4D HC(CO)NH, HCCH-TOCSY の測定を行い、主鎖、側鎖 NMR シグナルの帰属を行った。また距離情報の取得のため ^{15}N- NOESY-HSQC と ^{13}C-NOESY-HSQC の測定を行った。15% ^{13}C ラベルのサンプルと constant time ^{1}H-^{13}C HSQC を用いてバリン、ロイシンのメチル基の立体特異的な帰属を行い、側鎖χ1 角は HNHB、HACAHB を用いて解析を行った。主鎖二面角は TALOS+を用いて計算し、構造計算には CYANA を用いた。

結果

【RRM2-4 と Xist との相互作用】

SHARP の RRM2-4 の発現系と安定同位体標識試料を作成し、2D ^{1}H-^{15}N HSQC を測定したところ信号の分離のよいスペクトルが得られた(Fig. 1)。同位体標識 RRM2-4 を用いて、非標識 Xist RNA のタイトレーションを行ったところ、信号の変化が観測されている。しかしながら RNA 添加に依存して、試料の凝集が起きた。

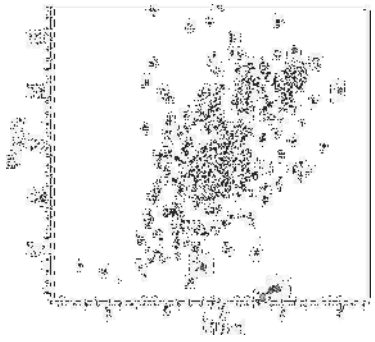


Fig. 1 ^{1}H-^{15}N HSQC spectrum of SHARP RRM2-4
RRM2-4 comprises 290 a.a. provided well dispersed signals.

【RRM1 の調製と構造解析】

現在までに相互作用解析、立体構造解析の報告のない RRM1 についても、試料調製と立体構造解析を行った。主鎖の帰属、側鎖の帰属、距離情報、角度情報をもとに CYANA を用いて SHARP RRM1 の立体構造を決定した(Fig. 2)。立体構造は典型的な RRM フォールドであった。

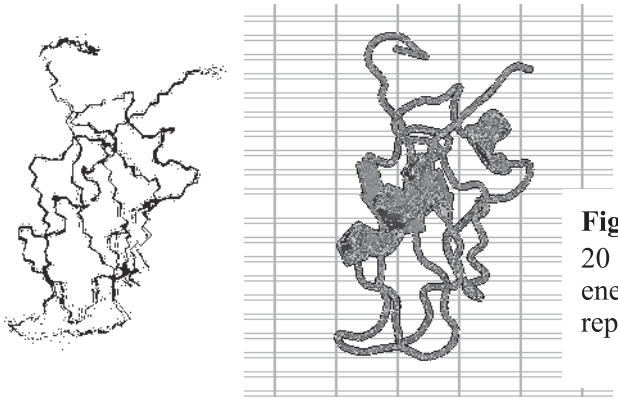


Fig. 2 Structure of the SHARP RRM1
20 ensemble structures with lowest energies (left). Ribbon drawing of the representative structure (right).

本討論会では RRM 各ドメインと Xist との相互作用の解析の詳細や、条件検討、RRM1 の立体構造、SHARP/Xist 複合体の構造解析の取り組みについて議論したい。

P22

LINE RNAの特異性を決定するステムループとペプチドとの相互作用解析

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

Analysis of specific interaction between the stem-loop of the LINE RNA and the peptide derived from the LINE reverse transcriptase

○Maina Otsu[1], Masaki Kajikawa[2], and Gota Kawai[1]
[1] *Faculty of Engineering, Chiba Institute of Technology, Japan.*
[2] *Graduate School of Bioscience and Biotechnology, Tokyo Institute of Technology, Japan.*

Long interspersed nuclear element (LINE) is known to be transposed by the reverse transcription using its RNA transcript. Recognition of the 3' stem-loop of LINE RNA by its reverse transcriptase (RT) is the important step of the retrotransposition. In order to elucidate the specific recognition mechanism of LINE RNA by the RT, we are analyzing the tertiary structures of RT recognition sites of two related LINE RNAs from zebrafish. Among several LINEs found in the zebrafish genome, ZfL2-1 and ZfL2-2 are similar to each other but RT of ZfL2-1 does not recognize the RNA of ZfL2-2, and vice versa. In the present study, structure of the RT recognition site of the LINE RNA from zebrafish (2-1) was determined. The interaction between the RNAs and peptides derived from RTs was also analyzed.

序論

様々な生物種が様々な種類のLong interspersed nuclear element（LINE）を持っていることが知られている．本研究で用いているLINEは鳥で最初に発見された繰り返し配列（Chicken repeat 1; CR1）に近縁なLINEである．LINEが占める遺伝子中での割合やLINEの配列は生物種で特徴があるため，LINEを知ることで生物が持つ特徴の由縁や新しい機能の獲得について解明できるかもしれないと考え，本研究を進めた．

LINEは自身にコードされた逆転写酵素によりRNAを介して逆転写することで新たな位置に挿入されることが知られているが，逆転写酵素によるLINE RNAの認識機構の詳細は解明されていない（Fig. 1）．そこで本研究では，LINEの逆転写に重要だと考えられているRNAの領域およびLINEタンパク質の領域について立体構造解析および相互作用解析を行うことで，その認識機構を解明することを目的としている．

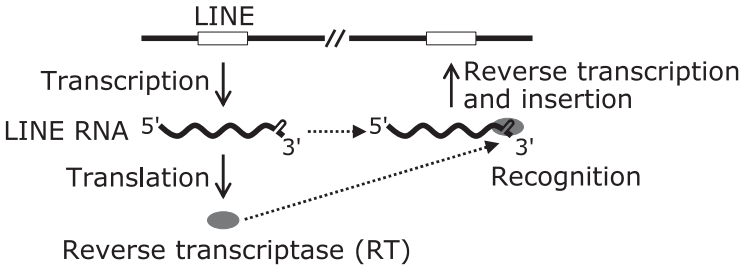


Fig. 1 Retrotransposition

LINE，逆転写酵素，RNA

○おおつまいな，かじかわまさき，かわいごうた

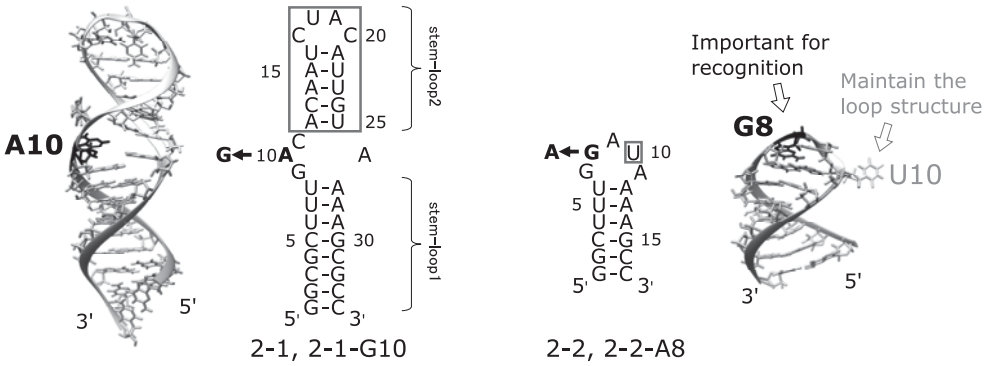


Fig. 2 RNAs used for the NMR analysis, the solution structures of 2-1 (left) and 2-2 (right, PDB ID: 1wks[1])

本研究では，CR1クレードに近縁なL2クレードのゼブラフィッシュ由来のLINEで，互いによく似ているが逆転写酵素の認識の特異性が異なるZfL2-1とZfL2-2の2つのLINEに着目している．これまでに，これらのLINE RNAのステムループ構造の立体構造解析を行ってきた．ZfL2-2については，ウナギにも同一の配列が見つかっており，これに由来するLINE RNA（2-2）の立体構造をすでに決定し（PDB ID：1wks[1]），さらにZfL2-1由来のLINE RNA（2-1）について暫定構造を決定した[2]（Fig. 2）．また，2-2ではループ部分の1残基（G8）が認識に重要だと推測している．

一方，逆転写酵素については，RNA認識に関与する最も短い領域（48アミノ酸残基）が特定されており，これに相当するペプチドにおいても一定のRNA認識の特異性が示されている[3]．本研究では，この領域を新しいRNA recognition motifと考え，L2-RRM2とした（Fig. 3）．

今回は，溶液NMR法によるLINE RNAと逆転写酵素に由来するペプチドとの相互作用解析および複合体の立体構造解析について報告する．

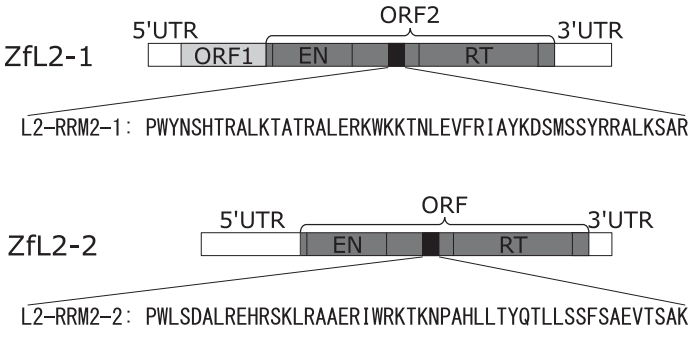


Fig. 3 Regions of L2-RRM2-1 and L2-RRM2-2

方法

【$^{13}C/^{15}N$標識RNAの調製】

これまでに，非標識RNAや全残基$^{13}C/^{15}N$標識RNAのNMRスペクトルの測定および解析を行い，2-1の暫定構造を決定した[2]．

今回は，これまでの解析を確実にするため，$^{13}C/^{15}N$標識されたNTPを用いて残基特異的に$^{13}C/^{15}N$標識したRNAを転写合成法により調製し，NMRスペクトルの測定および解析を行った．スペクトルの解析後，NOEの強度を基に距離の拘束条件を作成し，立体構造計算を行った．

逆転写酵素による特異的な認識に重要だと考えている2-1の10番目のA残基を標識するため，A標識RNAを調製した（2-1_A-label）．また，2-2では認識に重要だと推測している残基がG残基であるため，2-1の10番目のA残基をG残基に置換した配列（2-1-G10）も解析に用いた．これにより2-1においてA残基をG残基に置換することで逆転写酵素による認識の特異性を比較することができると考えている．2-1-G10では10番目の残基はG残基であるためG標識RNAを調製した（2-1-G10_G-label）．さらに，2-1と2-1-G10で比較を行うため，2-1のG標識RNA（2-1_G-label），2-1-G10のA標識RNA（2-1-G10_A-label）も調製した．調製した4種類のRNAの^{13}C-^{1}H SQCスペクトルを測定し，それぞれを比較することで帰属の確認を行った．

【RNAの立体構造計算】

$^{13}C/^{15}N$標識RNAを用いてシグナルの帰属を確認した後，立体構造計算を行った．立体構造計算にはCNS_SOLVE（Ver. 1.3, Yale University）を用いた．

今回は，計算結果から拘束条件を見直すことで構造情報を増やし，立体構造を収束させた．まず，計算によって得られた立体構造と計算に用いた拘束条件を比較し，計算した立体構造では距離が近いが拘束条件に入れていない残基を探した．次に，その残基をNMRスペクトルで再度確認し，明らかにNOEが無い場合は4 Å以上になるように拘束条件に加えた．なお，NOEがある場合には帰属した．

計算後，残余双極子相互作用（RDC）を用いて立体構造の精密化を行った．配向テンソルの推定はXPLOR-NIH（NIH）によるグリッドサーチで行った．また，計算によって得られた立体構造を用いて，PALES（NIH）によるRDCのシミュレーションを行った．

【ペプチドの解析】

ZfL2-1，ZfL2-2由来の2種類のペプチド（L2-RRM2-1，L2-RRM2-2）を解析に用いた．

標識ペプチドは，無細胞タンパク質合成系においてSUMOタンパク質との融合タンパク質として発現させ，プロテアーゼによる切断を行って調製した（大陽日酸株式会社との共同研究として理化学研究所に合成を委託．無細胞合成系による合成．13-700-007，14-700-012）．また，非標識ペプチドは北海道システム・サイエンス株式会社に化学合成を委託した．それぞれのペプチドについてNMRスペクトルの測定を行った．また天然非変性領域の予測をPONDR（Molecular Kinetics, Inc.）によって行った．

【RNAとペプチドの相互作用解析】

2-1および2-1-G10とL2-RRM2-1およびL2-RRM2-2を用いて，ゲルシフト法およびNMR法による相互作用実験を行った．ゲルシフト法による解析では，RNAとペプチドのモル比が1：2になるように試料を調製し，12%非変性PAGEを行った．NMR法による解析では，2-1および2-1-G10とL2-RRM2-2を用いて，RNA：ペプチドが1：1になるよう調製し，NMRスペクトルを測定した．

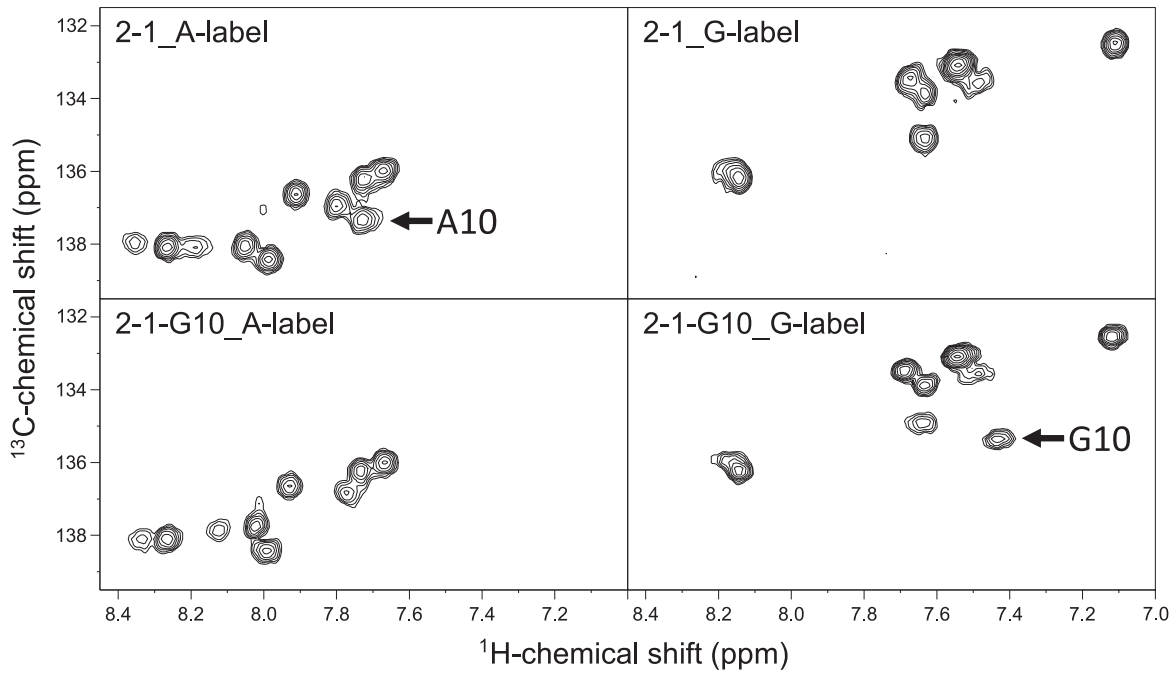


Fig. 4 ^{13}C-^{1}H SQC spectra of 2-1_A-label, 2-1_G-label, 2-1-G10_A-label and 2-1-G10_G-label

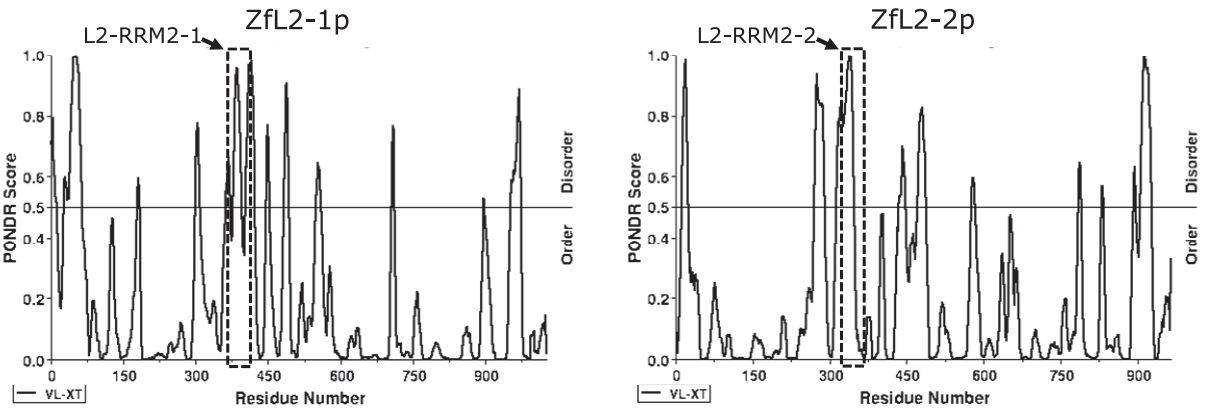


Fig. 5 Analysis of the naturally disordered region by PONDR

結果および考察

【$^{13}C/^{15}N$標識RNAの調製】

$^{13}C/^{15}N$標識RNAを調製しNMRスペクトルを比較することで帰属の確認を行うことができ，解析の難しい内部ループのシグナルを帰属することができた（Fig. 4）．変異させた残基以外によるシグナルの化学シフトはほぼ一致しており，分子全体の立体構造が変化していないことが分かった．

【RNAの立体構造計算】

計算した立体構造と拘束条件を効率的に比較することで，解析の確認や新たなNOEの帰属を行うことができ，立体構造をより収束させることができた．

【ペプチドの解析】

PONDRによるフォールディングの予測から，RNA認識に関与している領域が天然変性領域であることが示唆された（Fig. 5）．また，標識ペプチドのNMRスペクトルの化学シフトから，このペプチドがランダムコイル状態であることが支持された．

【RNAとペプチドの相互作用解析】

ゲルシフト法による解析では，2-1および2-1-G10でL2-RRM2-2を加えた場合のシフトに違いがあることから，A10からG10に置換することで認識の特異性が変化することが示唆された．NMR法による解析では，2-1にL2-RRM2-2を加えた場合はイミノプロトンシグナルに変化がなかったが，2-1-G10とL2-RRM2-2の場合には変化が見られた．2-1-G10の内部ループに近い塩基対のイミノプロトンシグナルが変化したことから，内部ループが認識に関与していることが示唆された．

以上のことから，A10およびG10が認識の特異性に重要な残基であることが示唆された．

今後の展望

現在は，NMR法によるRNAとペプチドの相互作用解析および立体構造解析を試みている．標識RNAに非標識ペプチドを加え，標識RNAのシグナルの変化を観測することで特異的な結合について推察する予定である．

また，無細胞タンパク質生合成系（無細胞くん，大陽日酸株式会社）による高濃度の標識ペプチドの調製も試みている．

【引用文献】

1. Baba S. et al., *RNA* **10**, 1380–1387 (2004)
2. 大津ほか，第53回NMR討論会，2014年11月，大阪；大津ほか，第17回日本RNA学会年会，2015年7月，札幌
3. Hayashi Y. et al., *Nucleic Acids Res*. **42**, 10605-10617 (2014)

P23

人工塩基対を利用したRNAへのスピンラベルの導入とNMR法による相互作用解析への応用

○藤田舜介[1]，大山貴子[1,*]，染谷龍彦[2]，木本路子[2,3]，平尾一郎[2,3]，河合剛太[1]
[1]千葉工業大学・工学部，[2]理化学研究所横浜事業所・ライフサイエンス技術基盤研究センター，[3]タグシクス・バイオ株式会社

Incorporation of spinlabel into RNA by an unnatural base pair system and its application for interaction analysis by NMR

○Shunsuke Fujita[1], Takako Ohyama[1], Tatsuhiko Someya[2], Michiko Kimoto[2,3], Ichiro Hirao[2,3] and Gota Kawai[1]
[1]Faculty of Engineering, Chiba Institute of Technology, [2]RIKEN Center for Life Science Technologies, [3]TagCyx Biotechnologies

For structural studies of RNA by using NMR, longer RNA that has unique structure was often broken down to structure units consisting of around 50 residues to determine their structures in most of previous works. However, to elucidate the structures and functions of the newly found functional RNA domains, it is fundamental to develop a new method for structural analysis of long RNA on atomic resolution by intact form. Paramagnetic tagging is a promising method to obtain structural information from the long RNA. In the present study, an unnatural base pair system was applied to a riboswitch found in *Thermus thermophilus* HB8 to incorporate the spinlabel into the specific position of RNA.

序論

本研究では，100残基程度の機能性RNAのモデルとして*Thermus thermophilus* HB8において発見されたリボスイッチを解析対象とし，比較的長いRNAの構造解析の手法の開発を進めている[1)]．この配列は，*Thermus thermophilus* HB8のマイクロアレイ解析によって，特定の栄養状態の時にこの領域の下流に存在するTPP生合成系の7つの遺伝子の転写量が増大することから発見したもので，これまでに知られているコンセンサス配列との比較から，TPPリボスイッチであると推定した．現在までに，さまざまなリボスイッチについて，X線結晶構造解析によってリガンド分子との複合体の立体構造解析がなされているが，リガンド未結合の状態での立体構造はいまだ決定されていない．そこで本研究では，リガンドのbound/unboundによるリボスイッチの立体構造変化の詳細な解析を試みている．今回は，100塩基を超えるRNAの構造解析に有用と考えられる常磁性プローブの導入を，人工塩基対システムを利用して実現し，そのNMRスペクトルを測定した．

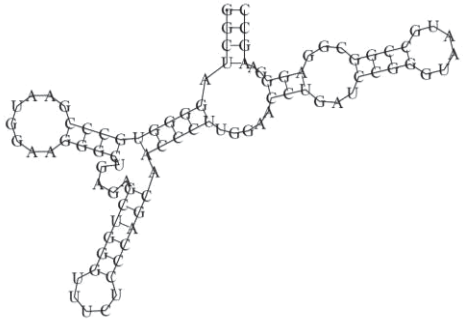


Fig. 1 Secondary structure of the possible TPP riboswitch from *Thermus thermophilus*

スピンラベル，RNA，人工塩基対

○ふじたしゅんすけ，おおやまたかこ，そめやたつひこ，きもとみちこ，ひらおいちろう，かわいごうた

方法

人工塩基対システムを利用し，スピンラベルを任意の位置に導入させた．まず，スピンラベル化する部位に相当する位置に人工塩基Dsを導入した鋳型DNAを化学合成およびプライマー伸長により調製した．そしてT7 RNAポリメラーゼによって，人工塩基Dsに対して相補的に取り込まれるエチニル基を持つ人工塩基PaをRNAの特定位置に導入した．RNA調製後，クリック反応によりスピンラベル化した．

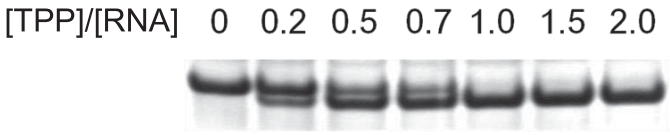


Fig. 2 Gel shift assay of the TPP riboswitch

NMRスペクトルの測定は，Avance600分光計（ブルカー・バイオスピン）を用い，298 Kにおいて行った．

結果および考察

Fig. 2は，試験管内転写法によって調製した91残基のRNAとTPPの相互作用をゲルシフト法で解析した結果であり，リボスイッチとTPPはモル比1:1で結合して泳動度が変化していることがわかる．このことから，このRNAがTPPと結合することによってコンパクトな構造に変化することがわかり，したがって，TPPリボスイッチであることが強く示唆された．

Fig. 3は，通常の試験管内転写法によって調製したTPPリボスイッチおよび人工塩基対システムによってスピンラベルを特定の位置に組み込んだTPPリボスイッチのイミノプロトンスペクトルであり，TPPを若干過剰に加えてある．9.2 ppmおよび11.0 ppmの遊離のTPPに由来するシグナルは両者で変化していないが，11.3 ppmおよび13.7 ppmのRNAに結合したTPPに由来するシグナルはスピンラベルを導入することによって強度が減少した．このことから，TPPが導入したスピンラベルから比較的近い位置に結合していることが示唆された．

現在，TPPリボスイッチ上の異なる位置にスピンラベルを導入したRNA試料を4種類調製しており，これらのRNAを用いて，TPPの結合位置を二次構造上にマップしたいと考えている．

今後の展望

人工塩基対を利用した転写反応によって特定の残基にスピンラベルを導入する本手法は，これまでに例のない画期的なものである．今後，この手法を100残基を超えるようなさまざまなRNAに適用し，NMR法によるRNAの構造機能解析の新しい可能性を開拓したいと考えている．

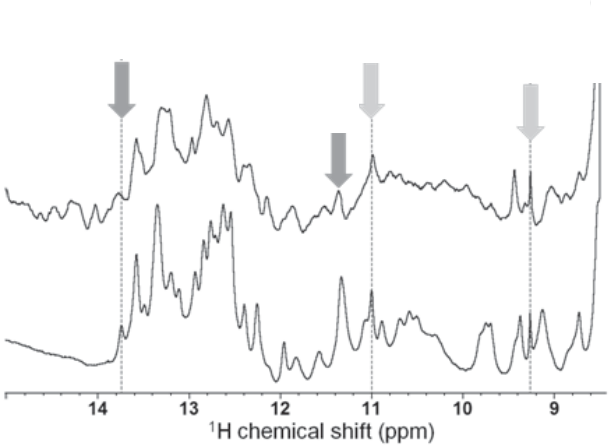


Fig. 3 Effect of spinlabel incorporated by the unnatural base pair system
Upper: with spinlabel. Lower: without spinlabel.

【引用文献】
1. 大山貴子， 河合剛太，“100残基を超える機能性RNAのNMR法による立体構造解析”第51回NMR討論会，2012年11月，名古屋

*現所属：理化学研究所ライフサイエンス技術基盤研究センター

P24

抗菌ペプチドthanatinとリポ多糖の相互作用解析

○若松 瞭太[1], 神谷 昌克[1], 相沢 智康[1], 熊木 康裕[2], 菊川 峰志[1], 出村 誠[1]
[1]北海道大学大学院・生命科学院
[2]北海道大学大学院・理学研究院

Interaction between an antimicrobial peptide thanatin and lipopolysaccharide

○Ryota Wakamatsu[1], Masakatsu Kamiya[1], Tomoyasu Aizawa[1], Yasuhiro Kumaki[2], Takashi Kikukawa[1], Makoto Demura[1]
[1]Graduate School of Life Science, Hokkaido University, Hokkaido, Japan.
[2]Graduate School of Science, Hokkaido University, Hokkaido, Japan.

Thanatin, a 21-residue antimicrobial peptide isolated from the hemipteran insect *Podisus maculiventris*, has a broad antimicrobial activity against Gram-negative and Gram-positive bacteria and fungi. Thanatin adopts an antiparallel β-sheet structure at its C-terminal region. T15S thanatin, substituting Thr-15 with Ser, has higher antimicrobial activity with low hemolytic activity than wild type.

Lipopolysaccharide (LPS), also known as endotoxin, is a major component of the outer membrane of Gram-negative bacteria. LPS-binding peptide can neutralize LPS activity, thus it is expected to be treatment for septic shock or endotoxin removal agent. However, the details of interaction between thanatin and LPS are still not clear. In this study, we performed TrNOE and STD measurement to elucidate the interaction between thanatin and LPS.

【序論】

thanatinは、カメムシ由来の21残基からなる抗菌ペプチドであり、グラム陰性菌・陽性菌、真菌に対して幅広い抗菌活性を持つことが知られている。thanatinの水中における構造は既に溶液NMRにより決定されており、N末端領域はフレキシブルであり、C末端領域は1組のジスルフィド結合により逆平行βシート構造をとる。また、15番目のThrをSerに置換したT15Sの変異体が野生型に比べ、高抗菌活性、低溶血活性を示すことが報告されている。

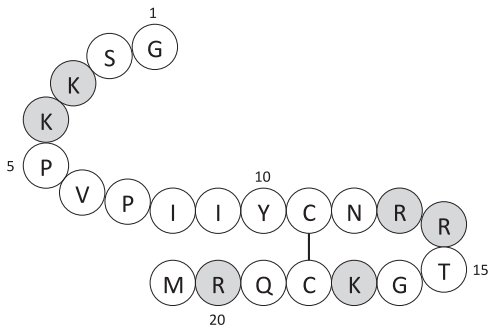


Fig. 1 Amino acid sequence of thanatin

リポ多糖(LPS)は、グラム陰性菌の外膜を構成する主成分であり、敗血症の原因物質と言われている。LPS結合能を有するペプチドは、敗血症治療薬の開発や、エンドトキシン除去剤としての応用が期待されている。抗菌ペプチドとLPSの相互作用様式の解明は、これらの応用を目指す上で不可欠である。しかし、抗菌ペプチドの活性メカニズムやLPSとの相互作用の詳細については、未だ解明されていない。

抗菌ペプチド、LPS

○わかまつりょうた、かみやまさかつ、あいざわともやす、くまきやすひろ、きくかわたかし、でむらまこと

本研究では、LPS存在下におけるthanatinの立体構造の決定と相互作用部位の同定を目的とした。また有望な変異体であるT15Sを中心に、いくつかの変異体を用いてペプチドの構造と活性の相関を明らかにする。これらの知見は、LPS結合能を高めたペプチドをデザインすることやグラム陰性菌に対する活性メカニズム解明の手がかりとなる。

【実験】

化学合成されたペプチドを空気酸化の後、RP-HPLCで精製したものをNMRサンプルとして用いた。ペプチド試料のpHは3.8に合わせた。ペプチドにLPSを加え278 Kで2D TrNOEを測定した。相互作用部位同定のため、1D Saturation Transfer Difference (STD) NMRを303 Kで測定した。LPSの解析のために^{31}P NMRを測定した。スペクトル解析にはSparkyを用いて帰属し、構造計算にはCYANAを用いた。また、いくつかの変異体についても同様の測定を行った。全てのNMR測定は、Bruker Avance III HD 600 MHzを用いて行われた。

【結果・考察】

LPSの滴定により1D ^{1}H NMRのthanatin由来のピークの幅広化が観察された。TrNOE測定から得られた距離情報をもとに、LPS存在下におけるthanatinの立体構造を決定した (Fig. 2a)。主鎖の立体構造は水中とLPS存在下の比較において大きな変化は見られなかった。^{31}P NMRでは、ペプチドの添加によりLPS由来信号の幅広化が観察され、LPSのリン酸基部分とペプチドとの相互作用が示唆された。

次に、1D STD-NMRによるthanatinのLPS相互作用部位の同定を行った。1D STD-NMR の結果、βシート構造の末端周辺の5残基とループ部分のThr15がLPSとの相互作用に重要であることが示唆された (Fig. 2b)。T15Sの変異体が高い抗菌活性を示すことからも、15番目の残基のLPS相互作用が抗菌活性の発現プロセスに大きく関与する可能性が示された。

さらに、STDの結果をもとにデザインした変異体を用いて各種NMR測定を行った。LPS滴定実験の結果は、変異体によってLPSとの親和性に違いを生じることが示唆された。現在T15Sの帰属、構造計算を進めており、討論会では、変異体のデータと合わせて結果の詳細について報告する。

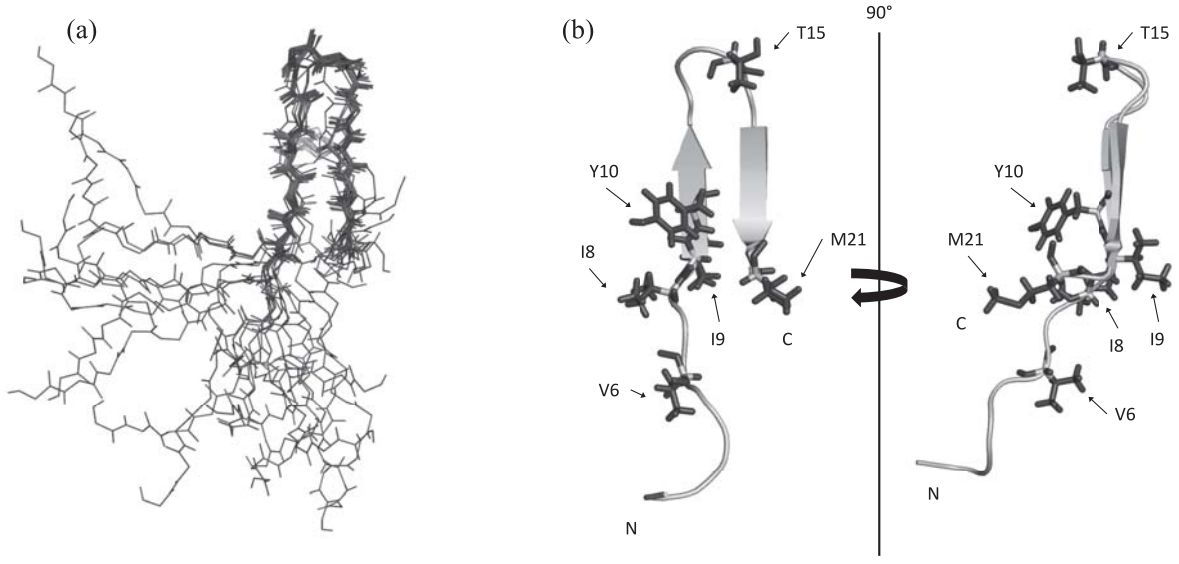


Fig. 2 (a) Backbone ensemble of the 20 lowest-energy structures of thanatin in the presence of LPS. (b) Mapping of STD effects onto LPS-bound structure. The residues observed STD effects are shown as a stick model.

P25

アダプタータイプTIRドメインの溶液構造

○久米田　博之[1]，榎園　能章[1]，狩野　裕孝[1]，堀内　正隆[1]，小椋　賢治[1]，瀬谷　司[2]，稲垣冬彦[1]
[1]北海道大学・先端生命科学院
[2]北海道大学・医学部

Solution structures of adaptor-type TIR domain

○Hiroyuki Kumeta[1], Yoshiaki Enokizono[1], Hirotaka Kano[1], Masataka Horiuchi[1], Kenji Ogura[1], Tsukasa Seya[2], and Fuyuhiko Inagaki[1]
[1]*Faculty of Advanced Life Sciencs, Hokkaido University, Japan.*
[2]*Graduate School of Medicine, Hokkaido University, Japan..*

Toll / interleukin-1 receptor (TIR) domain is a key mediator in the Toll-like receptor (TLR) signaling. TIR containing adaptor protein-1 (TICAM-1) is established as the adaptor controlling both TLR3- and TLR4-mediated IFN production signal. TICAM-2 functions as a bridging adaptor, which plays TICAM-1-recruiting to TLR4. The adaptor protein MyD88 adapter-like (Mal) is involved in the MyD88-dependent pathway downstream of TLR2 and TLR4. It acts as a bridging adapter between the receptor and the sorting adapter MyD88. The homo- and hetero-oligomerization of the TIR domains of these receptors and adaptors brings about the activation of NF- κ B and IRF-3, which regulate the synthesis of pro-inflammatory cytokines and IFN-b, respectively.

Here, we solved the solution structures of the homo-oligomerization defective mutant of TIR domain of TICAM-1, TICAM-2 and Mal, and will discuss the TIR-TIR interaction of the TLRs and adaptor proteins.

Toll / interleukin-1 receptor (TIR)ドメインは自然免疫応答である Toll-like receptor (TLR)シグナルにおいて重要な役割を担っている．膜外領域で病原体由来刺激を受けた TLR は，刺激依存的にホモまたはヘテロ二量体を形成し，その結果，細胞内領域にある TIR ドメインが近接する事で活性化する. 活性化した TLR の TIR ドメインは細胞内アダプター分子の TIR ドメインとヘテロオリゴマーを形成し，下流へとシグナルを伝達する．

TIRドメインを含む細胞内アダプター分子には，Myeloid differentiation primary response gene88 (MyD88)，MyD88 adaptor-like (MalまたはTIRAP)，TIR containing adaptor molecule-1 (TICAM-1またはTRIF)および2（TICAM-2またはTRAM），とsterile α-motif and HEAT/armadillo repeats (SARM)の５種がある．MalはTLR-1/TLR-2またはTLR-6/TLR-2ヘテロダイマーおよびTLR4の下流に存在し，MyD88を経由しNF-κBを産生する．TICAM-1はTLR3またはTLR4の下流に存在し，Mal / MyD88経路とは独立に機能し，インターフェロンを産生する．TICAM-2はTLR-4からTICAM-1へのシグナル伝達を仲介する．このように各TIRドメインは，厳密に相互作用相手となる他のTIRドメインを識別してシグナルを正確に下流へと伝達する．

TIR domain, origomer, TLR signaling

○くめたひろゆき，えのきぞのよしあき，かのうひろたか，ほりうちまさたか，おぐらけんじ，せやつかさ，いながきふゆひこ

これらのアダプターTIRドメインのうちMyD88の構造が他のグループから既に報告されており，TICAM-1,2 MalのTIRドメイン単体溶液構造についてNMR討論会にて報告した．本発表では以下のことを報告する．yeast two-hybrid法を用いてTICAM-1,2 TIRのhomoおよびhetero相互作用面を決定した．得られた相互作用面情報からTICAM-2 TIR dimerおよびTICAM-1 TIR monomerによるhetero-trimerモデル構造を構築した．また，Mal-TIRのhomo-dimerモデル構造を構築し，MyD88 TIRとのhetero相互作用面を推察した．これら，アダプターTIRドメインのhomeおよびhetero oligomerモデル構造からTLR下流におけるTIRドメインを介したシグナル伝達機構全般について考察を行った．

[結果・考察]

野生型TICAM-1,2およびMal TIRドメインは高濃度（数百μM）かつ室温条件下において自己相互作用によりゲル状となる．変異実験の結果，TICAM-1,2 TIRではBB-loopにある残基の変異体（TICAM-1 TIR P434H, TICAM-2 TIR C117H）, Mal TIRではEE-loopにある残基の変異体（Mal TIR R200E）において，ゲル化は解消された．またその$^{13}C/^{15}N$ラベル体を用いた各種NMR実験によって各TIRドメインの単体溶液構造を決定できた．この単体立体構造および各変異箇所からhomo相互作用面を決定し，すでに明らかになっているレセプターTIRドメインのhomo-dimer構造からアダプターTIRドメインのhomo-dimerモデル構造を構築した．yeast two-hybrid法によりTICAM-1,2 TIRドメイン間のhetero相互作用面を検証したところ，TICAM-1 TIRドメインの塩基性面，TICAM-2 TIRドメインの酸性面が関与していることが示唆された．このTICAM-2 TIRドメイン酸性面はhomo-dimerモデル構造において相反する面に位置しており，かつ，もう一方の分子に隣接している．この隣接している面に位置する残基について，さらなるyeast two-hybrid法による検証を行ったところ，TICAM-1 TIRはTICAM-2 TIRのhomo-dimer化によって形成される２分子にまたがった面と相互作用することが示唆された．これらの結果から，TICAM-1,2 TIRドメインのhetero-trimerモデル構造を構築した（Figure. 1 left）．Mal TIRドメインhomo-dimerモデル（Figure 1 right）において，２分子にまたがる広い酸性面が確認された．すでにMyD88の塩基性残基がMalとの相互作用面に寄与していることが明らかになっており，Mal TIRドメインにおいてもこの２分子にまたがる塩基性面がMyD88 TIRドメインと相互作用していると考えられた．

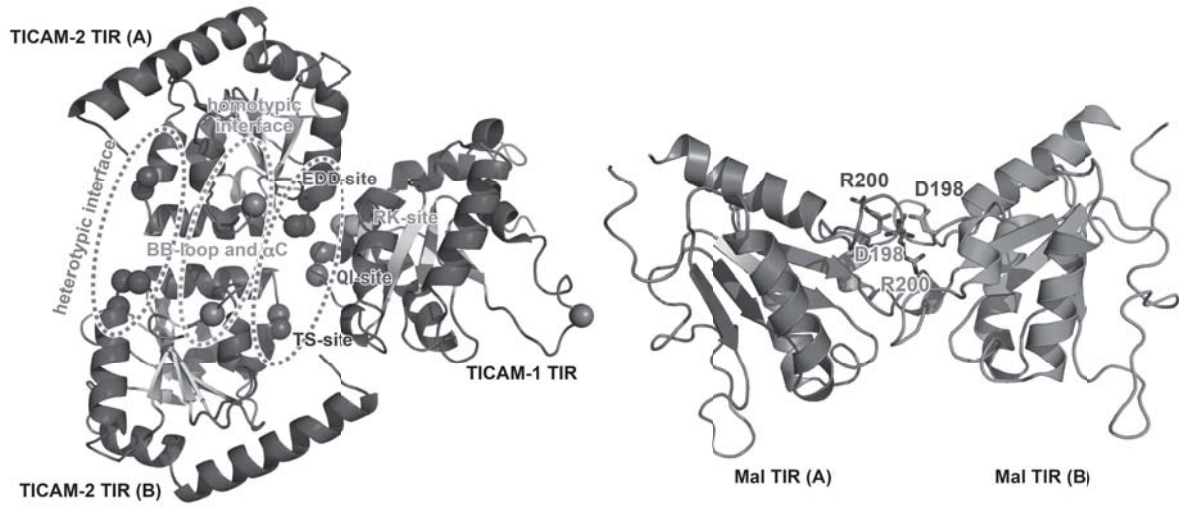


Figure 1. TICAM-1,2 TIR domain hetero-trimer (left) and Mal TIR domain homo-dimer (right) model structure

参考文献

Enokizono et al., *Proc Natl Acac Sci U.S.A.*, **110**, 19908-19913, 2013.

P26

NMR $R_{1\rho}$ dispersion法によるユビキチン二重合体の動的構造特性の研究

○西澤茉由[1],菅瀬謙治[1],森本大智[1], Erik Walinda[1],白川昌宏[1]
[1]京都大・工学研究科・分子工学専攻

Dynamic structural properties of diubiquitin by $R_{1\rho}$ dispersion

○Mayu Nishizawa[1], Kenji Sugase[1] , Daichi Morimoto[1], Erik Walinda[1] and Masahiro Shirakawa[1]
[1]*Graduate School of Engineering, Kyoto University, Kyoto, Japan.*

All eukaryotes use the small signaling protein ubiquitin, which is recognized by downstream proteins, to control a wide variety of functions such as intracellular localization, protein lifetime. In particular, ubiquitin exerts its important biological roles as a multi-domain protein.
In a previous study, it was revealed that ubiquitin exhibits greatly reduced heat stability when it is covalently linked to form diubiquitin. However, it is still unknown by what kind of mechanism the heat stability is decreased. Therefore, in this study I analyzed the dynamic characteristics and structural fluctuations of diubiquitin using R1ρ relaxation dispersion measurements to elucidate the structural destabilization mechanism.

【緒言】

真核生物のあらゆる細胞において、76個のアミノ酸から成るユビキチンという小さなタンパク質が存在する。ユビキチンは細胞内で標的タンパク質に幾つも鎖状に結合し、そのタンパク質の機能や局在、寿命を制御している。この制御機構の不全は、癌や神経変性疾患などの病気を引き起こす。最も興味深い点は、標的タンパク質に形成するポリユビキチン鎖の多様性である。ポリユビキチン鎖は、ユビキチンの7個のリシン残基 (K6, K11, K27, K29, K33, K48, K63)や、N末端のアミノ基を介して形成されるため、合計8つの種類が存在する。

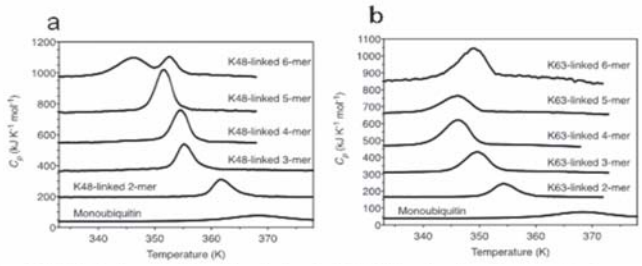


Fig.1 Heat stability of ubiquitin chain
a:K48 linked polyubiquitin chains b:K63 linked polyubiquitin chains

先行研究において、ユビキチンは結合様式に関わらず熱安定性が下がり、さらに穏やかな撹拌等によって凝集体形成することを明らかにした。特に二重合体の形成時に大きく熱安定性が低下した（Fig. 1）。しかし、なぜ熱安定性が低下するのかは未だに不明である。

$R_{1\rho}$ dispersion 法、ユビキチン

○にしざわまゆ、すがせけんじ、もりもとだいち、ヴぁりんだえりっく、しらかわまさひろ

そこで本研究では、$R_{1\rho}$ dispersion 法を用いてユビキチン二重合体の動的特性、すなわち構造揺らぎを観測することによって、構造不安定化のメカニズムを解明することを目的とする。$R_{1\rho}$ dispersion 法とは、マイクロ秒からミリ秒のタイムスケールにおけるタンパク質の構造変化の速度や構造変化の大きさ、さらには各状態の存在比を部位特異的に定量解析できる NMR 緩和実験法である

【結果】

本研究では、細胞内における存在比の高いユビキチン二重合体の種類である K48 結合型と K63 結合型を用いた。基部のユビキチンだけを ^{15}N 標識した二重体を調製し、^{15}N アミド基を対象として $R_{1\rho}$ dispersion 測定を行った。

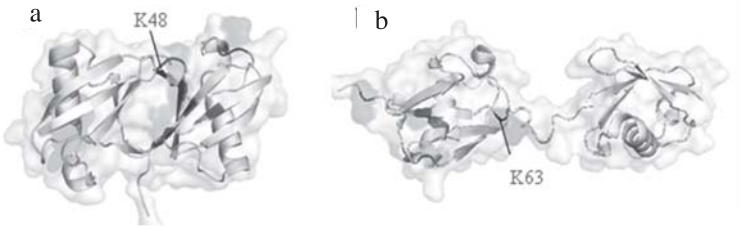


Fig.2 fluctual changes of diubiquitin red: $R_{1\rho}$ dispersion
a:K48 linked diubiquitin　b:K63 linked diubiquitin

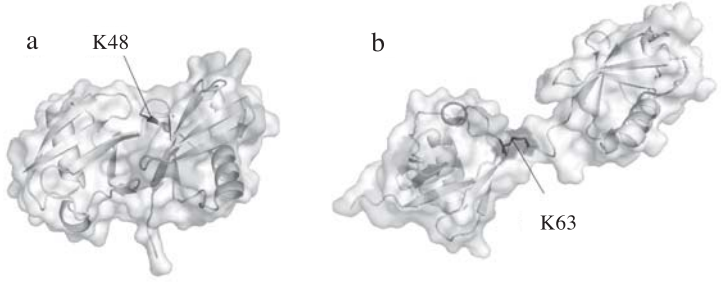


Fig.2 fluctual changes of diubiquitin green: CLEANEX-PM
a:K48 linked diubiquitin b:K63 linked diubiquitin

その結果、$R_{1\rho}$ dispersion 法により、K48 結合型二重合体、K63 結合型二重合体の両者ともに 10^{-6}~10^{-3}（sec）に minor 構造 が存在し、K48 結合型では 10 残基、K63 結合型では 5 残基の構造揺らぎを観測できた（Fig. 2）。これらをより詳細に解析すると、K48 結合型二重合体は二重合体界面で構造が揺らぎ、K63 結合型二重合体は C 末端、α ヘリックスにおいて構造が揺らいでいることが分かった。

また、$R_{1\rho}$ dispersion データとともに CLEANEX-PM 法という溶媒中の水とアミドプロトンの交換速度を観測する NMR 測定法を用いることによって、多元的にユビキチン二重合体の構造揺らぎを解析した。観測した交換速度を解析すると、K48 結合型二重合体、K63 結合型二重合体の両者ともにαヘリックスの内側により速い水素交換が確認できた。加えて、βシートにおいても速い交換が観測され、二重合体の構造の一部が解け、より溶媒に露出した構造を形成していることが示唆された。今後は、これらの結果をもとに構造不安定化のメカニズム解明に迫る。

【参考文献】

Morimoto, *et al*., *Nat Commun*. **2015,** 6, 6116

P27

^{1}H NMR を用いたニトリラーゼのホモオリゴマー形成の追跡

藤澤　哲郎[1,2]，大山　恭平[1]，亀山　啓一[1]，吉田　豊和[1]，○鎌足　雄司[3]，石黒　亮[1,2]

[1]岐阜大学・工学部

[2]理研・SPring-8 センター

[3]岐阜大学・生命科学総合研究支援センター

The use of ^{1}H NMR for probing nitrilase homo-oligomerization

Tetsuro Fujisawa[1,2], Kyouhei Oyama[1], Keiichi Kameyama[1], Toyokazu Yoshida[1], ○Yuji O. Kamatari[3], and Ryo Ishiguro[1,2]

[1]*Faculty of Engineering, Gifu University, Japan.*

[2]*SPring-8 Center, RIKEN.*

[3]*Life Science Research Center, Gifu University, Japan*

Supramolecular structure formation of proteins in relation to the function is one of the important issues in protein science. Nitrilase is an industrial enzyme whose enzymatic function is tightly linked with its homo-oligomerizatin. We have extensively studied the temperature-dependent oligomerization by small-angle x-ray scattering (SAXS) technique. In the present study we report ^{1}H NMR analysis on the nitrilase from *Rhodococcus rhodochrous* (J1-NTase). In spite of its large molecular weight (more than 80kDa), J1-NTase displayed sharp ^{1}H NMR peaks in methyl, Cα, and aromatic chemical shift regions, that points the J1-NTase is structurally fluctuated. Upon heating, the peaks are diminished. The spectral change is discussed together with SAXS and other spectral data.

序論

ニトリル化合物は中間原料として広く利用されており, 化学工業において有用な物質である. ニトリラーゼは様々なニトリル化合物を, カルボン酸とアンモニアに加水分解する酵素で, 温和な条件下で基質に対して位置・立体選択的に作用することから, 工業用生体触媒としての応用が幅広く検討されてきた. ニトリラーゼの中でも *Rhodococcus rhodochrous* J1 由来のニトリラーゼ（以下 J1-NTase)は最も調べられてきた. 長澤らは SEC や DLS 法を用いて, J1-NTase が温度や基質, 添加塩などにより, 不活性なダイマーから活性を持つ 10 量体へ会合することを観測した [1)]. また Thuku らによって J1-NTase のらせん会合体も報告されている [2)] (Fig.1). 我々の X 線小角散乱実験においても, 温度, 添加塩, タンパク質濃度増加によって J1-NTase の会合数が増加することを確認されている [3)] .

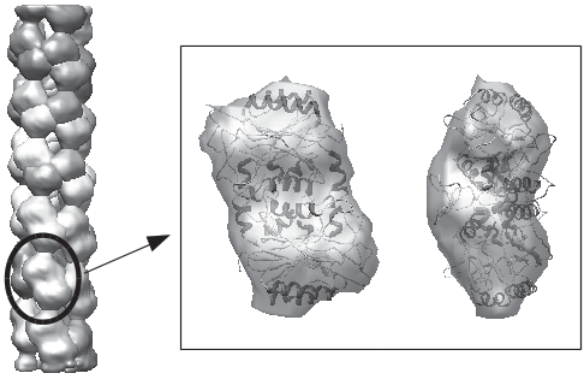


Fig.1 EM image of J1-NTase oligomer (EMDB-1313) and homology model of its protomer

ニトリラーゼ、オリゴマー形成、X 線小角散乱

ふじさわてつろう，おおやまきょうへい，かめやまけいいち，よしだとよかず，○かまたりゆうじ，いしぐろりょう

本発表では，不活性な低温状態から活性のある高温状態への J1-NTase の会合過程を ^{1}H-NMR を追跡した.

方法

J1-NTase 試料は，大腸菌で発現したものを精製した．NMR 測定は 800/600MHz NMR Bruker Biospin AVANCE III 800 + クライオプローブを用い、溶媒は 10 mM KPB, 1 mM DTT, 200 mM KCl で測定直前に総体積の 1%になるように D_2O を添加した．測定温度は 4-40℃で、4℃では温度平衡化時間を 45 分それ以外の温度では温度平衡化時間を 15 分と設定した. データの解析は ^{1}H-NMR ピーク値の積分強度と X 線小角散乱データの相関をとることにより行われた.

結果と考察

X 線小角散乱の結果からプロトマーであるダイマー(80kDa)が主成分となる 4℃における J1-NTase の ^{1}H-NMR スペクトルを Fig.2 に示す．4.8ppm は水のシグナルで，その他のシグナルは小さいが, メチル基(0.7ppm), メチレン(1ppm), C-α(4ppm), 芳香族(8ppm)などのシグナルが確認された．構造揺らぎとこの化学シフト領域でのシグナルとがどのように関係しているかを示すために，分子量の近い BSA(66kDa)についても参照測定をおこなった(Fig.3)．J1-NTase のピーク強度は尿素変性 BSA に匹敵しており、変性蛋白質に匹敵する自由な揺らぎ構造を持っているためと考えられる。

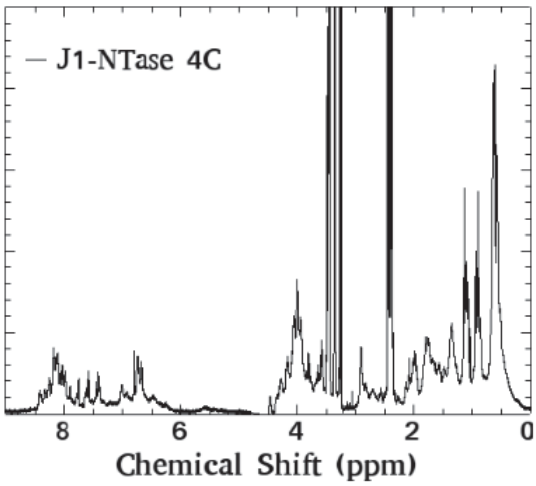


Fig.2 1H-NMR spectrum of inactive J1-NTase

Fig.2 で示されるシグナルの積分値は 4℃から 40℃へと温度上昇に伴う会合ですべて同期して減少していった．温度に伴うシグナルの変化は J1-NTase のゆらぎ構造の変化と会合に伴う分子量の変化の 2 つの因子が関与している．NMR スペクトルに対する両者の寄与を評価するために，X 線小角散乱で得られた分子量情報を用いた。Fig.2,3 の測定条件における 4℃から 40℃の温度範囲においては、X 線小角散乱の結果より，2 量体と 10 量体の 2 成分系ではなく，すべて 3 種類の会合種成分からなる 3 成分系である事がわかった [4)]．討論会では，X 線小角散乱による重量分率を用いて ^{1}H-NMR の解析を行った結果を報告する。

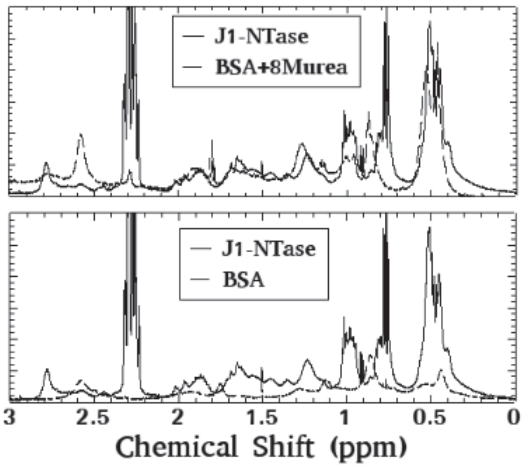


Fig.3 1H-NMR spectra of J1-NTase and BSA

引用文献

1) Nagasawa T. et al, *Eur. J. Biochem*. **267,** 138-144, 2000.
2) Thuku R.N. et al, *FEBS J.*, **274**, 2099-2018, 2007.
3) 筒井ほか，第 12 回日本蛋白質科学会年会，2012 年 6 月，名古屋.
4) 藤澤ほか，第 55 回高圧討論会，2014 年 11 月，徳島.

P28

HIV-1のRRE RNA断片とRev変異体ペプチドの相互作用のNMR解析

○武田 有未[1]，天野 亮[1]，高田 健多[1]，Colin A. Smith[2]，坂本 泰一[1]
[1]千葉工業大学・工学部
[2] American University of Beirut

NMR analysis of the interaction between an HIV-1 RRE RNA fragment and a Rev mutant peptide

○Yumi Takeda[1], Ryo Amano[1], Kenta Takada[1], Colin A. Smith [2], and Taiichi Sakamoto[1]
[1]Faculty of Engineering, Chiba Institute of Technology, Japan.
[2] American University of Beirut, Lebanon

The binding of the arginine-rich motif (ARM) of HIV Rev protein to its high-affinity site in the Rev response element (RRE) is involved in regulation of splicing and transport of HIV-1 RNA from nucleus. Many structural studies of the Rev-RRE interaction have been reported, and it was revealed that ARM of Rev adopts α-helical conformation and bind to the major groove of an internal loop region of RRE RNA. In the previous study, randomized-codon libraries of Rev ARM were assayed for their ability to bind RRE using a bacteriophage λ N-nut anti-termination reporter system. Despite the essential role of Rev R35 and N40 in RRE recognition, Rev double mutant peptide R35G-N40V (GV) was found to bind to RRE. In this study, to investigate the binding mechanism of GV peptide to RRE, we carried out NMR study for the interaction between RRE RNA fragment and GV peptide.

序論

HIV-1のRev タンパク質のarginine-rich motif (ARM) とそれが結合するRev response element (RRE) の結合は，核からの HIV-1のRNAの輸送やスプライシングの制御に関与している．RevとRREの相互作用については，多くの構造生物学的研究が行われており，ARMがαヘリックス構造を形成し，RREの内部ループの主溝に結合することが明らかとなっている[1,2]．

λバクテリオファージのN-nut anti-termination reporter systemを用いて，ランダムペプチドライブラリとRREとの結合を調べた結果(Fig.1)，Rev二重変異体ペプチドR35G-N40V (GV)がRREと結合することが明らかとなった[3]．一方で，アミノ酸残基 R35，R39，N40，R44 の一か所に変異が導入した Rev 変異体ペプチドの RRE 結合能は著しく低下した．

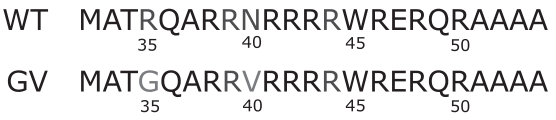


Fig.1 Amino acid sequence of wild-type Rev peptide and GV peptide. Important amino acid residues for Rev binging to RRE are shown in blue. Mutated residues are shown in red.

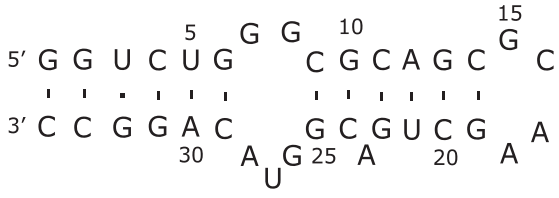


Fig. 2 Secondary strucuture of RRE34

RRE，Rev，RNA

○たけだゆみ，あまのりょう，たかだけんた，こりんすみす，さかもとたいいち

本研究では，RRE と GV プチドの相互作用について NMR 法による解析を行い，相互作用機序を明らかにすることを目的とした．

方法

RRE34 については，化学合成した鋳型 DNA と T7 RNA ポリメラーゼを用いて試験管内転写法で調製した．さらに，12 % 変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動により精製した．GV ペプチドについては，北海道システムサイエンス社に化学合成を委託して購入した．NMR 試料を溶解する緩衝液として， 50 mM 塩化ナトリウムを含む 20 mM リン酸ナトリウム (pH 6.5) を用いた． RRE34 の試料濃度を 0.5 mMとし，GV ペプチドを RRE34 に 1 : 1 になるように加えた．298 K あるいは 283 K の測定温度で，2D NOESY スペクトルおよび 2D TOCSY スペクトルを測定した．NMR スペクトルの測定には AVANCE600（ Bruker BioSpin 社 ）を用いた．

結果

RRE34 単体の 1D イミノプロトンスペクトルを測定した後，GV ペプチドを加えたところ，NMR スペクトルが変化することがわかった（Fig. 3）．さらに，2D NOESY スペクトルを測定し，イミノプロトンシグナルを帰属したところ，G8:G26塩基対に由来するシグナルが新たに観測され，内部ループ近傍の残基に由来するシグナルがシフトしていることが明らかとなった．また，GV ペプチドの側鎖のプロトンと U5:A30，G6:C29 および G8:G26 塩基対のイミノプロトンの間に分子間 NOE が観測された．

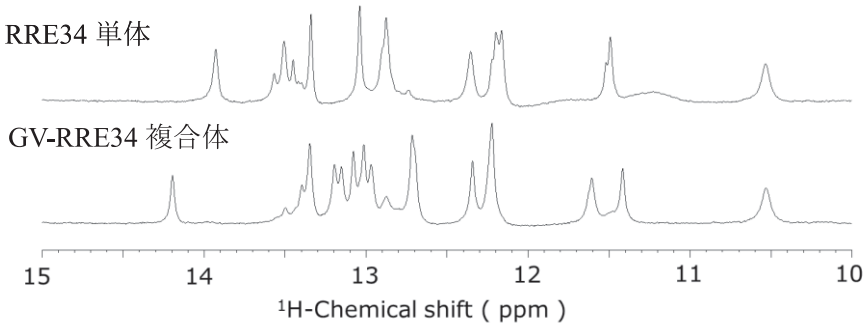


Fig. 3 1D imino proton spectra of RRE34 and GV-RRE34 complex

考察

G8:G26 塩基対に由来するシグナルが新たに観測されたことから，GV ペプチドの結合によって RRE34 の内部ループの構造が安定化したと考えることができる．このような内部ループの構造の安定化は，Rev ペプチドと RRE の相互作用においても観測されている．一方，等温滴定型カロリメトリ（ITC）による相互作用解析によって，GV ペプチドは Rev ペプチドよりエンタルピー変化の大きい相互作用をしていることが示唆されている．

現在， RRE34-GV 複合体の NMR スペクトルを解析し，分子間 NOE の帰属を試みており，今後，安定同位体標識により詳細な NMR 解析を行なう計画である．

引用文献

1) Battiste JL., *et al*., *Biochemistry* **33**, 2741-2747, 1994

2) Peterson RD., *et al*., *Biochemistry* **33**, 5357-5366, 1994

2) Possik EJ., *et al*., *Journal of Molecular Recognition*. **6**, 286-296, 2013.

P29

放線菌の接合伝達タンパク質TraBの構造解析

○金場　哲平[1,2]，上埜　大空[2]，前崎　綾子[2]，伊藤　隆[2]，片岡　正和[3]，
三島　正規[2]
[1]ブルカー・バイオスピン株式会社
[2]首都大学東京　理工学研究科
[3]信州大学　工学部

Structural analysis of the DNA translocase of Streptomyces, TraB

○Teppei Kanaba[1,2], Hirotaka Ueno[2], Ryoko Maesaki[2], Yutaka Ito[2], Yutakkazu Kataoka[3], and Masaki Mishima[2]
[1]Bruker BioSpin K.K.
[2]Graduate School of Science and Engineering, Tokyo Metropolitan University
[3]Faculty of Engineering, Shinshu University

Conjugal transfer is a major way of horizontal gene transfer which drives the evolution of bacterial genomes. In Streptomyces, antibiotic resistance genes are spreading from resistant cell to other cell by conjugation systems. Streptomyces transfer DNA in a unique process involving a single plasmid-encoded protein TraB and a plasmi, pSN22. It is known that TraB consists of the N-terminal trans-membrane domain involving the FtsK-like ATPase domain and the C-terminal DNA binding domain. Electron microscopy showed that TraB protein forms the hexameric ring-shaped structures with a central pore on the membrane. However, the molecular function of TraB in DNA transfer is still unclear. To understand the detail of molecular mechanism of the conjugal transfer by TraB, we determined the solution structure of the C-terminal DNA binding domain of TraB (TraB-C) using NMR spectroscopy. Our structure analysis revealed that the TraB-C adopts winged helix-turn-helix motif which is a common protein fold in eukaryotes and prokaryotes.

序論

接合伝達は、細胞膜上に位置するタンパク質群によって、プラスミドのような巨大DNAが細菌の間で輸送される現象である。細菌の接合伝達は突然変異や選択よりもはるかに効率よく形質を転換させる。そのため接合伝達は細菌の進化や、薬剤耐性の伝播において非常に重要なプロセスである。放線菌プラスミドpSN22の接合伝達においてはTraBタンパク質が接合伝達を支配する因子であることが知られている(1)。TraBはN末端にATP結合領域を含むFtsK/SpoIIIE ドメインを持ち、またC末端領域にはDNA結合領域を持つ。電子顕微鏡による解析からTraBは細胞膜上で六量体を形成しており、ATP駆動的にプラスミドを伝達すると考えられている(2)。しかし、そのドメインの構造や、TraBがどのような分子機構で接合伝達を行っているのかはいまだに明らかにされていない。本研究はTraBによる接合伝達の詳細な分子機構を明らかにすることを目的とし、TraBのC末端領域の多次元NMR法を用いた構造解析を行った。

TraB, 接合伝達, DNA結合タンパク質

○かなば　てっぺい、うえの　ひろたか、まえさき　りょうこ、いとう　ゆたか、かたおか　まさかず、みしま　まさき

実験

限定分解により同定した TraB の C 末端領域(563-651, 以下 TraB-C と表記)の発現系を作成し、大腸菌の発現系を用いて安定同位体標識 TraB-C の発現、精製を行った。得られた NMR サンプルについて、2D ^{1}H-^{15}N HSQC, 3D HNCACB, CBCA(CO)NH, HN(CA)CO, HNCO, C(CO)NH, H(CCO)NH, 4D HC(CO)N, HCCH-TOCSY の測定を行い、TraB-C の主鎖、側鎖 NMR シグナルの帰属を行った。また距離情報の取得のため ^{15}N- NOESY-HSQC と ^{13}C-NOESY-HSQC の測定を行った。15% ^{13}C ラベルのサンプルと constant time ^{1}H-^{13}C HSQC を用いてバリン、ロイシンのメチル基の立体特異的な帰属を行い、側鎖χ1 角は HNHB、HACAHB を用いて解析を行った。主鎖二面角は TALOS+を用いて計算し、構造計算には CYANA を用いた。

結果

TraB-C の主鎖、側鎖 NMR シグナルの帰属を行った。Fig.1 に ^{1}H-^{15}N HSQC スペクトルを示す。NMR を用いて TraB-C の立体構造を決定することに成功した(Fig.2)。NMR による構造解析の結果、TraB-C は原核、真核生物の転写因子において広くみられる winged helix-turn-helix (wHTH)型の立体構造を形成していることが明らとなった。

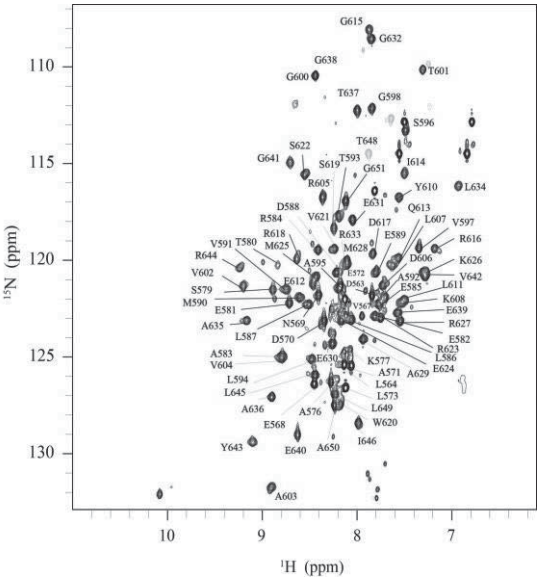


Fig.1 ^{1}H-^{15}N HSQC spectrum of TraB-C

考察

wHTH モチーフでは helix3 が DNA の結合に重要であることが知られている。DNA との複合体の立体構造が報告されている他の wHTH モチーフタンパク質の helix3 のアミノ酸配列と、TraB-C の helix3 のアミノ酸配列の比較を行うと、配列の類似性は低いことが分かる(Fig.3)。TraB は独特の DNA 認識を行っていると予想されるが、その分子機構の詳細を明らかにするためには、今後 DNA と TraB-C の構造解析が必要である。

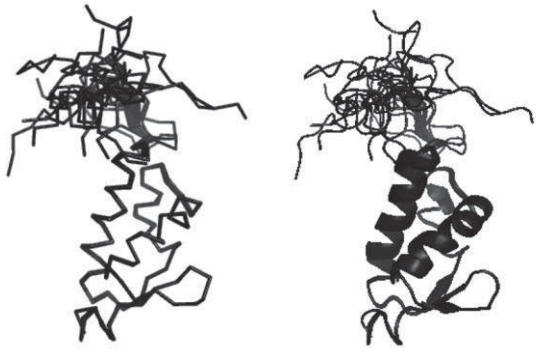


Fig.2 Solution structure of Tra-B

TraB							R	S	W	V	S	R	E	M	K	R	M	A	E	E
HNF3γ						N	Q	Q	R	W	Q	N	S	I	R	H	S	L	S	F
E2F4							K	R	R	I	Y	D	I	T	N	V	L	E	G	I
DP2	Y	D	Q	K	N	I	R	R	R	V	Y	D	A	L	N	V	L	M	A	
ADAR1							K	K	E	I	N	R	V	L	Y	S	L	K	A	

Fig.3 Alignment of the helix3 of the wHTH proterins

Important residues in DNA binding are shown in dark.

参考文献

(1) Kataoka, M. et al., J. Bacteriol (1991) 173, 4220-4228

(2) Vogelmann, J. et al., EMBO J (2011) 30, 2246-2254

P30

マウスのミトコンドリアmRNAのプロセシングに関与するmirror tRNAの二次構造の解析

○奥居 沙弥[1]，牛田 千里[2]，清澤 秀孔[3]，河合 剛太[1]
[1]千葉工業大学・工学部，[2]弘前大学・農学生命科学部，[3]高知大学・医学部

Secondary structure analysis of mirror tRNA involved in processing of mitochondria mRNA in mouse

○Saya Okui[1], Chisato Ushida[2], Hidenori Kiyosawa[3] and Gota Kawai[1]
[1]Faculty of Engineering, Chiba Institute of Technology, Japan, [2]Faculty of Agriculture and Life Science, Hirosaki University, Japan, [3]Kochi Medical school Kochi University, Japan.

MsncR-11 is one of the novel small structured RNAs that were found by the next-generation sequencing analysis. MsncR-11 corresponds to the reverse strand of tRNA genes located upstream of the cytochrome oxidase I (COXI) gene in mitochondrial genome and most sequences of MsncR-11 overlapped to the mirror $tRNA^{Tyr}$. The mechanism of mRNA maturation in mammalian mitochondria is known as the punctuation model. In this model, the 5' and 3' processings of tRNA produce the mature mRNA and rRNA. The secondary structure of the mirror tRNA, called MsncR-11-T, was predicted by computer programs and the fragments of MsncR-11-T were analyzed by NMR. The results indicated that MsncR-11 formed a tRNA-like secondary structure, suggesting that MsncR-11 is involved in the mRNA processing in the mitochondria.

序論

未知の低分子RNAを網羅するため，マウスの脳から得た低分子RNA画分を次世代シーケンサー（illumina）により解析した．得られた約1億個の配列からrRNAやsnoRNAなど既知のRNAを取り除いたのち，約70万配列について，予測された二次構造のパターンと残基数によるクラスタリングを行ったところ，それぞれ10配列以上を含む216個のサブグループが得られた．各サブグループに分類したRNAについてさらに塩基配列の相動性による分類を行い，それぞれのグループの代表的な配列をゲノムデータベース（UCSC Genome Browser）あるいはsnoRNAデータベース（snOPY）上にマッピングして既知のRNAを排除した。その結果，新規低分子RNA候補として16個のRNAを見出した[1)]．今回は，得られた候補の一つであるMsncR-11の二次構造解析について報告する．

MsncR-11はミトコンドリアゲノムのcytochrome oxidase I （COXI）の上流と一致する配列をもつ．次世代シーケンサーによって得られた配列のうち，158配列がこの領域の配列と一致した．それぞれの鎖長は40-122残基であったが，多くは$tRNA^{Cys}$の相補鎖（mirror $tRNA^{Cys}$）の途中から$tRNA^{Tyr}$の相補鎖（mirror $tRNA^{Tyr}$）を含む約90残基のものであった．これらの配列の5’末端は不ぞろいであるのに対し，3′末端は$tRNA^{Tyr}$の相補鎖（mirror $tRNA^{Tyr}$）の末端から3残基前までに対応しており，その後ろにpoly(A)が付加されていた（Fig. 1）．

RNA, secondary structure, mitochondria

○おくいさや，うしだちさと，きよさわひでのり，かわいごうた



Fig. 1 Location of MsncR-11 on the mitochondria genome

Upper sequence is the mitochondria DNA sequence. The second is the representative sequence of MsncR-11. The rest sequences are the examples of sequences related to MsncR-11.

ミトコンドリアゲノムにおいて，rRNAとmRNAの成熟化のメカニズムとして〝punctuation model〞が知られている[2]．このモデルは，rRNAとmRNAのコード領域の上流と下流にコードされているtRNAがプロセスされることによって，成熟したrRNA，mRNAが形成されるメカニズムである．しかし，COXIでは上流・下流ともにtRNAはコードされていない．そこで，tRNA^{Tyr}の相補鎖にあたるMsncR-11がtRNA様の構造を形成することで，COXI mRNAの成熟に関与しているのではないかと考えた．実際に，シーケンサー解析より得られた多くの配列が，mirror tRNA^{Tyr}に相当する配列を含んでいた．また，MsncR-11の3'末端に付加されたpoly(A)を含まず，ゲノムにコードされているCCTを付加した配列について二次構造予測を行ったところ，mirror tRNA に対応する領域ではtRNA様の構造が予測された（Fig. 2A）．

ヒトのミトコンドリアtRNAのプロセシングでは，5′末端側についてはRNase Pによって前駆体のリーダー配列が切断される[3]．一方，3′末端側については，RNase Zがアクセプターアームを認識して一本鎖部分を切断し，その後，CCA配列が付加する[4]．したがって，もしMsncR-11がアクセプターアームを持つtRNA様の二次構造を形成していれば，RNase Z等の酵素により切断され，mRNAの成熟に関与する可能性がある．そこで，mirror tRNA^{Tyr}の二次構造をNMR法によって解析することとした．

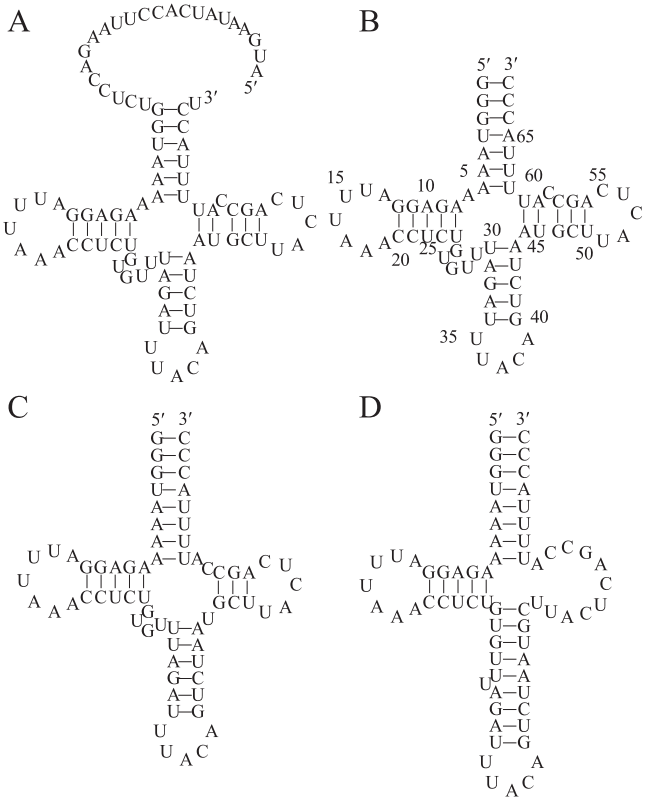
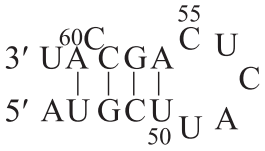


Fig. 2 Predicted secondary structures of MsncR-11 (A) and MsncR-11-T (B-D)

方法

二次構造予測は，vsfold5によって行った．転写で目的RNAを調製するための配列については，転写効率を上げるため末端にGC塩基対を付加した．RNA試料の調製には，試験管内転写法と化学合成法を用いた．残基特異的に^{13}C/^{15}N標識した試料は，安定同位体標識アミダイトユニット（大陽日酸社）を用いた試験管内転写法によって調製

MsncR-11-IV



MsncR-11-I.IV

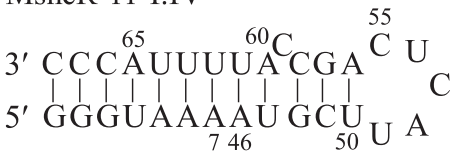


Fig. 3 Secondary structures of RNA variants

した．NMRスペクトルの測定時の溶液条件は50 mM NaClを含む20 mMリン酸緩衝液とし，RNA濃度は0.04 mM～0.6 mM，装置はAVANCE600（BRUKER社）を用いた．

結果

解析するRNAの設計

mirror tRNA^{Tyr}の配列に転写の効率を上げるためにGC塩基対を1つ付加した配列をもつRNAをMsncR-11-Tとした．このRNAについて複数のプログラムによって二次構造を予測したところ，Tアームを形成する構造と形成しない構造が予測された．また，Tアームを形成する構造には，バルジアウトを持つものと持たないものの2種類が予測された（Fig. 2B-D）．MsncR-11-Tが実際にどの二次構造を形成するのかわからないため，Tアームに対応するMsncR-11-IVおよびアクセプターーTアームに対応するMsncR-11-I.IV（Fig. 3）を作成し解析することとした．さらに，MsncR-11-IVのステムにバルジアウトが出来ているかを確認するため，C58の置換体も作成した．MsncR-11-IVは16残基と短く，ステムの形成が非常に不安定なため，末端に安定な塩基対を加えた変異体も作成した．MsncR-11-TとMsncR-11-I.IVでもバルジアウトの位置を決め，比較するため，C58あるいはC59の4種類の置換体を作成した．

Tアームの解析（MsncR-11-IV）

MsncR-11-IVおよびその変異体のスペクトルの解析によって，C59がバルジアウトしていることが分かった．C58をAに置換するとスペクトルが大きく変化し，安定なステムループを保持することができなくなった．このことから，MsncR-11-TにおいてMsncR-11-IVのステムループを形成していれば、C58に変異を入れることでシグナルが大きく変化し，バルジアウトが同じ位置にあることを示唆できることがわかった．

アクセプターーTアームの解析（MsncR-11-I.IV）

次に，tRNAの3′末端切断時に認識するアクセプターーTアームを形成しているかを確認するため，MsncR-11-I.IVの解析を行なった．MsncR-11-IVと同様なバルジアウトを持つことを確認するため，NOESYスペクトルの帰属を行なった(Fig. 4)．MsncR-11-I.IVの解析だけでは，どの塩基がバルジアウトしているかわからなかったため，置換体のNOESYス

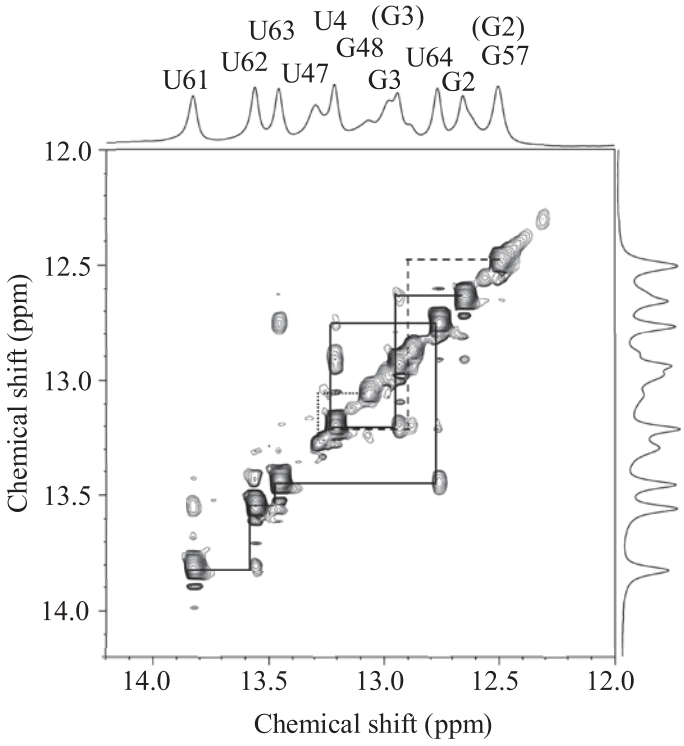


Fig. 4 NOESY spectrum of MsncR-11-I.IV measured at 288 K

ペクトルを解析したところ，MsncR-11-I.IV-A58においてもG57 のシグナルが大きく移動した．したがって，MsncR-11-I.IVにおいても，59番目の塩基がバルジアウトしていることが分かった．

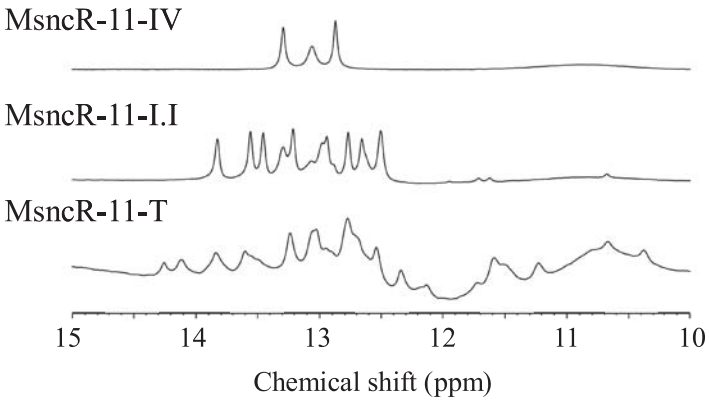


Fig. 5 ^{1}H-NMR spectra of MsncR-11-T and its fragments measured at 288 K

Mirror tRNAの解析（MsncR-11-T）

MsncR-11-Tと各断片のスペクトルを比較し，二次構造においてアクセプターーTアームを形成しているかを調べた（Fig. 5）．MsncR-11-Tのシグナルの重なりが激しく，一次元スペクトルだけではアクセプターーTアームを形成しているのか判断できなかったため，2つの方法によりその形成を確認した．まず，MsncR-11-Tにおいて，MsncR-11-I.IVと同様な4種類の置換体を調製した．MsncR-11-I.IVとMsncR-11-Tにおいて，塩基置換とスペクトルの変化を比較したところ， C58A，C59U，およびC59Gのいずれの変異においてもスペクトルの変化が類似していた．さらに，MsncR-11-TとMsncR-11-I.IVについて安定同位体標識試料の^{15}N-^{1}H HMQCスペクトルを測定したところ，MsncR-11-I.IVで観測されたシグナルの多くが，MsncR-11-Tにおいて観測された．これらのことから，MsncR-11-Tにおいて，Fig. 2Bに示したアクセプターーTアームが形成されていることが示唆された．

考察

MsncR-11-Tの構造を解析した結果，予測したいくつかの二次構造の中で，Tアームにバルジアウトを持つmirror tRNA構造を形成していることが分かった．二次構造予測において，Tアーム以外のステムループについては共通する二次構造が予測されていたことから，全体の二次構造としてはFig. 2Bが妥当であると考えられる．MsncR-11アクセプターTアームを形成していることから，tRNAの立体構造を認識する酵素がこの領域を認識し，3′末端をプロセシングする可能性が高い．このことから，MsncR-11がミトコンドリアのCOXI mRNAのプロセシングの過程で生成したことが示唆された．

3′末端側が揃っていることから，pre-mRNAのmirror tRNA^{Tyr}の領域がFig. 2Aのような二次構造を形成し，それを認識する酵素がUUAとCCUの間で切断し，その後，ポリAが付加されたと考えられる．これに対し，5′末端側は不揃いなことから，特定のプロセシングを受けず，末端から分解されている可能性がある．今後は，シーケンサー解析により見出された他の新規低分子RNA候補についても，NMR法を用いた構造解析を進め，新規低分子RNAの構造と機能を明らかにしていきたい．

引用文献

1) Kiyosawa, H., Okui, S., Ushida, C., Kawai, G., *Genomic*s **106**, 122-128, 2014.
2) Ojala, D. et al., *Nature* **290**, 470-474, 1981
3) Sanchez, M.I. et al., *Cell Cycle* **10**, 2904-2916, 2011.
4) Brzenziak, L.K. et al., *RNA Biol.* **8**, 616-626, 2011.

P31

小胞体ストレスセンサーIre1p RNaseドメインの基質認識機構

○河原　郁美[1,2]、亀田　倫史[3]、池端　悠介[4]、芦原　悠太[2]、古板　恭子[1]、杉木　俊彦[1]、浜田　道昭[5]、藤原　敏道[1]、河野　憲二[4]、田中　好幸[2,6]、児嶋　長次郎[1]

[1]大阪大学　蛋白質研究所、[2]東北大学　薬学研究科、[3]産業技術総合研究所 生命情報工学研究センター、[4]奈良先端科学技術大学院大学　バイオサイエンス研究科、[5]早稲田大学 理工学術院、[6]徳島文理大学　薬学部

Substrate mRNA recognition mechanism of ER-stress sensor Ire1p RNase domain

○Ikumi Kawahara[1, 2], Tomoshi Kameda[3], Yusuke Ikebata[4], Yuta Ashihara[2], Kyoko Furuita[1], Toshihiko Sugiki[1], Michiaki Hamada[5], Toshimichi Fujiwara[1], Kenji Kohno[4], Yoshiyuki Tanaka[2, 6] and Chojiro Kojima[1]

[1]Institute for Protein Research, Osaka University, Japan, [2]Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University, Japan, [3]Computational Biology Research Center, Advanced Industrial Science and Technology, Japan, [4]Graduate School of Biological Sciences, Nara Institute of Science and Technology, Japan and [5]Faculty of Science and Engineering, Waseda University, Japan, [6]Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokushima Bunri University, Japan

Ire1p protein cleaves mRNA site-specifically under ER-stress conditions, and induces spliceosome-independent splicing in yeast cells. Here, in an effort to analyze the structural feature of Ire1p substrate, Ire1p substrate HAC1 mRNA containing Ire1p recognition consensus sequence CNGNNGN were analyzed by NMR. NMR data showed that this substrate RNA formed hairpin structure. We also found the formation of GC base-pair between the conserved residues within the loop. MD simulation and secondary structure prediction showed that this intra-loop GC base-pair was widely conserved among other known mRNA substrates. In addition, mutation analysis suggested that this base-pair structure is important for substrate processing in HeLa cells.

序論

Ire1pは出芽酵母で同定された小胞体膜貫通タンパク質で、細胞質側にkinaseドメインとRNaseドメインをもつ。小胞体ストレス存在下において、RNaseドメインは基質HAC1 mRNAを部位特異的に2カ所切断することでスプライソソーム非依存的なスプライシングを引き起こし、その結果小胞体ストレス応答を誘導する。Ire1pの認識配列としてCNGNNGNからなる7塩基のコンセンサス配列が知られており、Ire1pは1つめのグアノシンの3’側を切断する。また、Ire1pが担う基質mRNAのスプライシング並びに基質コンセンサス配列は、酵母からヒトまで幅広く保存されている（Fig 1a）。

今回我々は、Ire1pによる基質認識メカニズムを解明するため、コンセンサス配列を含む21-ntのHAC1 mRNAの安定同位体選択標識体を作成し、NMRを用いて切断部位に見られる構造特性を検討した。また、MDシミュレーション、細胞内におけるスプライシング解析を行い、確認された構造モチーフの選択性、有用性を確認した。

RNA、安定同位体選択標識、RNase

○かわはら　いくみ、かめだ　ともし、いけばた　ゆうすけ、あしはら　ゆうた、ふるいた　きょうこ、すぎき　としひこ、はまだ　みちあき、ふじわら　としみち、こうの　けんじ、たなか　よしゆき、こじま　ちょうじろう

方法

基質RNAの構造特性をNMRを用いて解析するために、非標識の基質HAC1 mRNA（5’-CGUAAUCCAGCCGUGAUUACG-3’）をFASMAC社から化学合成品を購入した。また、コンセンサス配列（CNGNNGN）中の6塩基目のグアノシン（G888）^{15}N選択標識体はT7 RNA polymeraseを用いた方法で調製した（芦原ら、投稿準備中）。NMR測定はそれぞれ1 mM, 0.2 mMのRNAを用いて289Kで行った。MDシミュレーションはレプリカ交換法を用いた。二次構造予測にはCentroidFoldソフトウェアを用いた。細胞中におけるスプライシング解析は、Ire1pのヒトホモログであるIRE1αを過剰発現させたHeLa細胞とその基質であるXBP1 mRNAを用い、スプライシング効率の判定は小胞体ストレス応答の効率とXBP1 mRNAの切断効率で判断した。

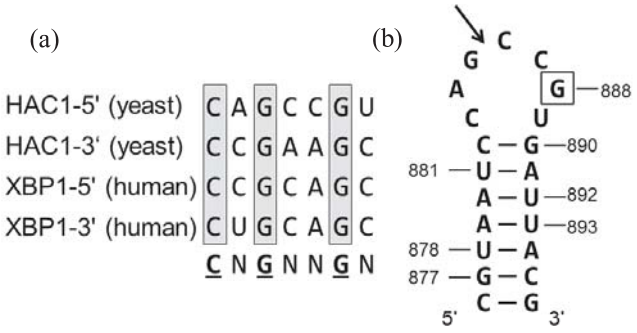


Fig 1. (a) RNA sequence of substrate of Ire1p/IRE1α. Gray boxes indicate the conserved residues. (b) Secondary structure of 21-nt HAC1 substrate RNA. Nitrogen-15 labeled residue is indicated by box, and cleavage site is shown by arrow.

結果・考察

切断部位近傍21-ntの基質RNAのイミノプロトンの帰属結果より、このRNAはコンセンサス配列をループとするヘアピン構造を取ることが分かった。加えて^{15}N選択標識体の^{1}H-^{15}N HSQCスペクトルより、G888がワトソン-クリック型の塩基対を形成していることが示された（Fig 1a and Fig 2）。また、MDシミュレーションより、G888はコンセンサス配列中保存残基C883とGC塩基対を安定に形成することが示された。このことから、コンセンサス配列からなるループ部位にはその保存配列から形成されるintra-loop塩基対が存在すると考えられた。細胞内においてこの塩基対がスプライシングに与える影響を評価するために、C883をアデニンまたはウラシル、G888をウラシルまたはアデニンに変更した変異体とG888をシトシンに変更した変異体を作成し、スプライシング解析を行った。その結果、塩基対を形成可能であるAU/UA変異体ではスプライシング活性が保持されていたにもかかわらず、CCミスマッチ変異体ではスプライシング活性の低下が認められた。このことからこの保存残基間で形成される塩基対はIre1p/IRE1αの基質切断反応において重要な働きを示す事が示唆された。実際に、HAC1 mRNA全長中には合計10カ所のCNGNNGN配列が含まれるが、二次構造予測からこのようなintra-loopをもつヘアピン構造を取り得るのは基質となりうる2カ所のみであった。このことからも、この基質部位に特徴的に観察されたintra-loop構造は基質の選択性に寄与していると考えられる。

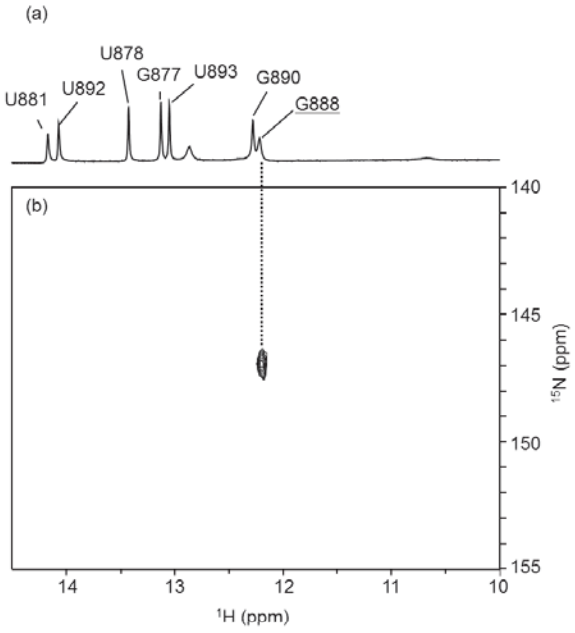


Fig 2. (a) One dimensional ^{1}H NMR spectrum of imino proton of the 21-nt substrate. (b) Two dimensional ^{1}H-^{15}N HSQC spectrum.

P32

高圧力NMR法によるユビキチンの局所変性状態の立体構造解析

○若本　拓朗[1]，北沢創一郎[2]，矢木-内海　真穂[3]，
加藤　晃一[3]，Roumestand Christian[4]，
Baxter Nicola J[5]，Williamson Mike P[5]，北原　亮[2]
[1]立命館大学大学院生命科学研究科
[2]立命館大学薬学部
[3]岡崎統合バイオサイエンスセンター
[4]Centre de Biochimie Structurale, INSERM
[5]Department of Molecular Biology and Biotechnology, University of Sheffield

Structure and dynamics of the locally unfolded state of ubiquitin studied by high-pressure NMR spectroscopy

○Takuro Wakamoto[1], Soichiro Kitazawa[2], Maho Yagi-Utsumi[3], Koichi Kato[3], Roumestand Christian[4], Baxter Nicola J[5], Williamson Mike P[5] and Ryo Kitahara[2]
[1]Graduate School of Life Science, Ritsumeikan University
[2]College of Pharmaceutical Sciences, Ritsumeikan University
[3]Okazaki Institute for Integrative Bioscience and Institute for Molecular Science, National Institutes of Natural Science
[4]Centre de Biochimie Structurale, INSERM, France
[5]Department of Molecular Biology and Biotechnology, University of Sheffield, United Kingdom

We have shown that ubiquitin populates at least two high-energy conformations: an alternatively folded conformation N_2 and locally unfolded conformation I. Although the structure of N_2 has previously been determined by high-pressure NMR spectroscopy[1], the structure of I is still unknown. Here, we investigate structure and backbone dynamics of I of ubiquitin Q41N variant using high-pressure NMR spectroscopy. The I state shows locally disordered conformation at residues 33-42. Interactions between the α-helix and the rest of the protein are substantially weakened, which results in large displacement of the α -helix.

高圧力 NMR，高エネルギー構造，構造解析

○わかもとたくろう，きたざわそういちろう，やぎ-うつみまほ，かとうこういち，
るーめすたんどくりすちゃん，ばくすたーにこら，うぃりあむそんまいく，きたはらりょう

［目的］近年、蛋白質の天然状態よりも高いギブズ自由エネルギーをもった状態(高エネルギー状態)と、分子認識や蛋白質の機能発現との関わりが注目されている。高エネルギー状態は存在率が低いため通常は分光学的に観測困難であるが、高圧力 NMR 法を用いる事により圧力下でその分布率を増加させ観測可能にできる[1-3]。高圧力 NMR 法により、ユビキチンは 2 つの高エネルギー状態(準安定状態 N_2,局所変性状態 I)を持つ事が明らかになっている[1]。変異体 Q41N を用いた研究から、298 K,2500 bar, pH 7.0 下で N_2 状態の分布率が 97%にまで増加し、3 次元 NMR 測定に基づいた高精度な立体構造解析に成功している[2]。一方、I 状態は 33-42 残基のループ及びβシート領域が局所的に不安定な構造をとると考えられているが[3]、詳細な立体構造解析には至っていない。本研究では、高圧力 NMR 法を用い I 状態の立体構造の解明を目的としている。

［方法］変異体 Q41N を用いて低温 (278 K) ・酸性(pH4.0)条件下で、0.1-250 MPa までの範囲で $^{1}H/^{15}N$ HSQC 測定を行い、信号強度の変化から I 状態の分布率を算出した。距離情報(NOE)と主鎖二面角情報(TALOS+)を基に CYANAversion3.97 を用いて立体構造解析を行い、^{15}N スピン緩和法(hNOE)により主鎖の運動性を調べた。

［結果と考察］加圧とともに、HSQC 中のクロスピークの信号強度に減少が見られ、同時に変性状態(D)のポリペプチド鎖に典型的なスペクトル領域に多数の信号が出現した。33-41 残基では、他の領域に比べ信号強度の減少が顕著であることから、33-41 残基が変性した局所変性状態の分布率が増加したことがわかる。信号強度の解析から、250 MPa (278 K, pH 4.0)では、I 状態の分布率は約 70%、D 状態は約 30%と算出した。I 状態では、33-41 残基は変性していると考えられ、^{15}N-NOE 値が 0-0.5 であることからアンフォールド様の高い運動性を持つことが示唆される。一方、他の領域は N 状態と類似の運動性であることがわかった。I 状態と D 状態は遅い交換であり、ほぼ全ての残基がフォールド状態とアンフォールド状態由来の２つのクロスピークを与える。I 状態の構造解析においては、その構造状態に応じた化学シフト値を用いて NOE 帰属を行い、855 の距離制限と 74 の角度制限を用いた。I 状態では、N 状態と類似の 2 次構造を持つが、β3-β5 間の一部の水素結合が消失し、C 末端側領域で秩序性が低下していることがわかった(下図)。また 33-41 残基とその他の領域間の NOE は観測されず、αヘリックスが外側に開いたコンフォメーションを取ることもわかった。



高エネルギー状態の原子座標解析は、化学シフト情報を用いた構造モデリング法(CS-ROSETTA 法)に止まっており、NOE を用いた精密構造解析に成功した例は、高圧力 NMR 法によるユビキチンの N_2 構造[1,2]と本研究による I 構造の結果だけである。これまでの研究により、N_1-N_2-I 状態へと揺れ動く立体構造変化が可視化された。

引用文献

1)*Kitahara, R., et al., J. Mol. Biol. 347, 277-285 (2005),* 2)*Kitazawa S. et al., Biochemistry 53, 447-449 (2014),* 3)*Kitahara, R., Akasaka, K PNAS, 100, 3167-3172 (2003)*

P33

^{13}C軸の広い周波数領域を活かしたメタボノミクス解析戦略

○三澤 拓真[1,2]，小松 功典[1,2]，伊達 康博[1,2]，菊地 淳[1,2,3]
[1]横市院生命医，[2]理研CSRS，[3]名大院生命農

Analytical strategy in metabonomics using wide frequency domain of ^{13}C

○Takuma Misawa[1,2], Takanori Komatsu[1,2], Yasuhiro Date[1,2], and Jun Kikuchi[1,2,3]
[1]*Graduate School of Medical Life Science, Yokohama City University, Kanagawa, Japan.*
[2]*RIKEN CSRS, Kanagawa, Japan.*
[3]*Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University, Nagoya, Japan.*

Nuclear magnetic resonance (NMR)-based metabonomics is a powerful tool for discovery of biomarker from big data. Commonly, ^{1}H NMR was used in the metabonomic analyses due to high sensitivity, although the resolution is very low. Consequently, some overlapped peaks derived from metabolites such as macromolecules are one of the disadvantages for the metabonomic analyses. In contrast, ^{13}C NMR has very high resolution with very low sensitivity because natural abundant of ^{13}C is about 1% and gyromagnetic ratio of ^{13}C is four times lower than ^{1}H. To overcome the problem, we advanced an analytical method accomplished high signal-noise ratio in ^{13}C NMR by combination of peak alignment with summation techniques based on statistical approach for metabonomic analysis. These methods enable to expand the scope of the metabonomic analyses by discovering low intensity signals covered by noise and to enhance the annotation on 1D NMR spectra.

【背景・目的】

メタボノミクス研究において高い網羅性を持つNMRは非常に強力なツールであり、代謝物の定量からバイオマーカーの探索まで広く使われている。[1] しかしながら現在の主流である^{1}H NMRは糖や脂質といった、類似構造を持った物質において多くのシグナルオーバーラップを引き起こす。そこで高分解能を有する^{13}C NMRが近年注目を集めている。[2, 3] しかしながら^{13}Cは天然存在比が約1%と非常に低く、また磁気回転比も^{1}Hの1/4程度であることから、感度の向上が喫緊の課題となっている。そこで本研究では^{13}C軸の広い周波数領域を活かし、^{13}C NMRの弱点である感度不足を克服する解析戦略及び量子化学計算を利用した低強度シグナルに対する帰属方法の構築を目的とした (Fig. 1)。

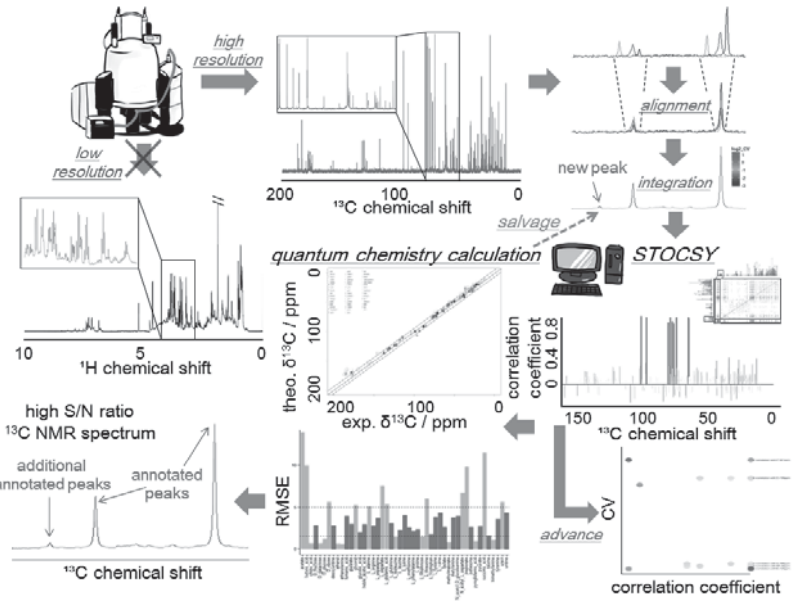


Fig. 1: The concept of this study.

non-bucketing metabonomics, lipid, quantum chemistry calculation

○みさわたくま，こまつたかのり，だてやすひろ，きくちじゅん

【実験方法】

^{13}C最適化プローブであるDCHプローブを使用し、ヒトの体内環境を反映することが広く知られている健常人の糞便をKPi/D_2O抽出した試料の^{13}C NMRスペクトルを取得した。[4] 得られたスペクトルデータの32kポイント全てを数値化し、ピークアライメント技術及びスペクトルの足し合わせを応用することで、擬似的に高S/N比 (signal-noise ratio)を有した^{13}C NMR スペクトルを得た。また各ケミカルシフトの変動係数に注目し、R言語を用いて独自に作成した改良版STOCSY (statistical total correlation spectroscopy)を用いて帰属を行い、[5] 足し合わせにより出現した低強度シグナルはSTOCSYの結果を量子化学計算により算出した理論ケミカルシフト値でサポートすることにより帰属を行った (Fig. 2)。[6]

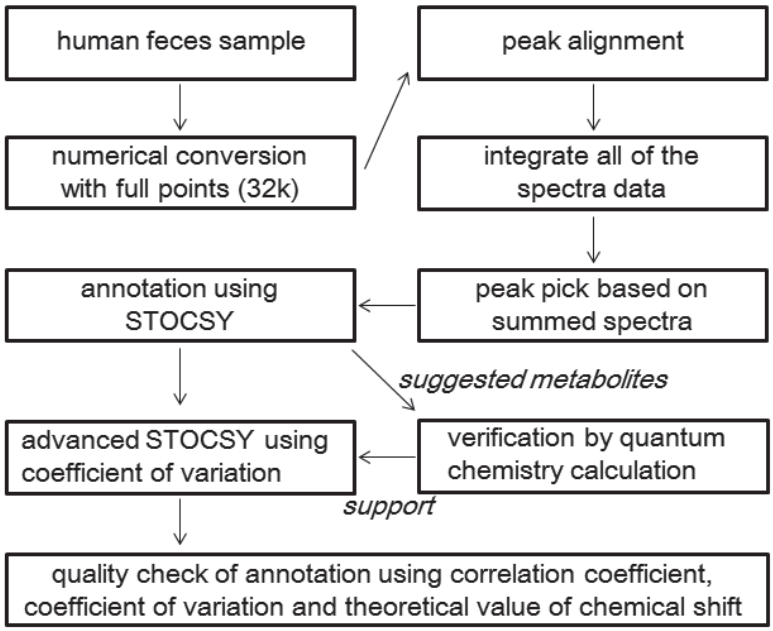


Fig. 2: Schematic flows in this study.

【結果・考察】

NMRメタボノミクスは網羅的に得た多数のデータから重要な代謝反応を統計的に見出す研究であり、必然的に大量のスペクトルデータを計測することになる。本研究ではこの大量データを利用しNMR測定における積算の概念を多検体に応用することで、新たに測定を行わずに約10倍のS/N比を有する^{13}C NMRスペクトルを得ることに成功した (Fig. 3)。一般にNMRの積算を2倍にするとS/N比は$\sqrt{2}$倍となることが知られており、180枚のスペクトルデータを用いた本研究では、理論上約13倍のS/N比向上が期待されたが、混合物における全てのピークトップをアライメントにより完全一致させることは困難なため10倍程度に留まったと考えられる。

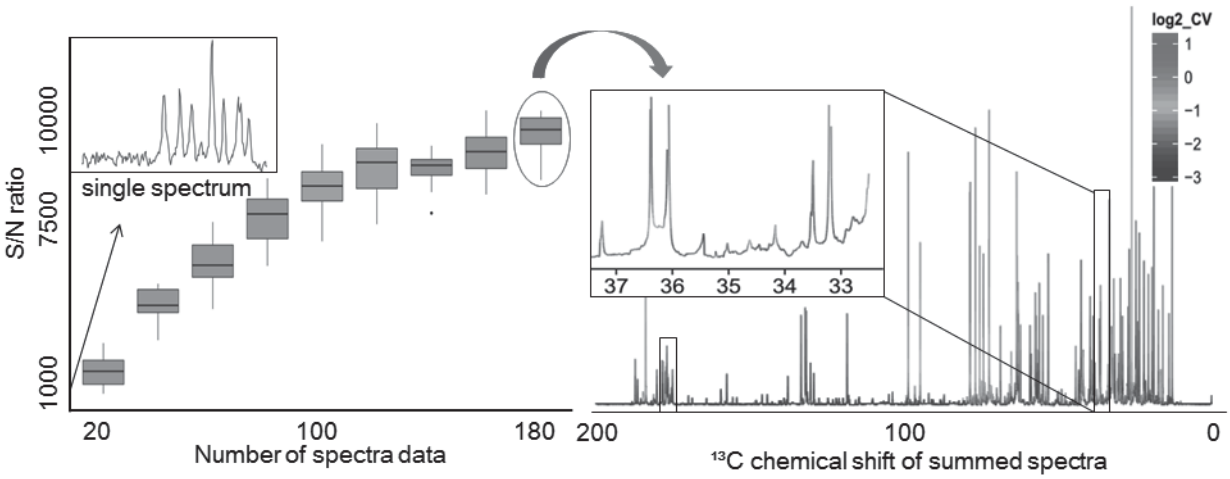


Fig. 3: The box plot of number of spectrum data vs S/N ratio (left) and ^{13}C NMR spectrum with high S/N ratio obtained by this method (right).

また、新規測定が必要ないという利点を活かすために、1次元NMRにおける最も一般的な帰属方法であるSTOCSYを応用した高精度帰属技術の開発も試みた。従来のSTOCSYでは、pHや温度等に起因するケミカルシフトのずれや、シグナルオーバーラップの影響により、精度が著しく下がるという問題があった。しかしながら我々が用いた方法では、高分解能を有する^{13}C NMRを対象としていることに加え、ピークアライメント技術の適用によるケミカルシフトの補正を行っているため、STOCSYが極めて効果的であった。更に、同じ物質由来の各シグナルは強度のばらつきが一致することに着目し、変動係数と組み合わせることでより高精度の帰属を可能にした。

しかしながらスペクトルの足し合わせにより出現したシグナルは、各スペクトルデータにおいてノイズレベルのシグナル強度であるためSTOCSYのように相関係数を利用した統計手法では帰属が困難であった。そこでSTOCSYの結果から推測された代謝物のケミカルシフトを量子化学計算ソフトウェアであるspartanを用いて算出し、その理論値を用いてSTOCSYで相関が出なかったシグナルの追加帰属を行った。また、確からしさの指標としてRMSE (root mean squared error)を用いて実測値と理論値の誤差を評価した (Fig. 4)。今回用いた量子化学計算環境では水中を想定した計算が行えず、電離状態を計算に反映できないことからカルボニル炭素は正確な予測値が算出されない。実際、カルボニル炭素が検出される160~200ppmにおいて実測値と理論値の乖離が大きくRMSEの大幅な増加が確認された。これによりカルボニル炭素を持つAcetic acid (AcA)やButyric acid (BtA)等の代謝物は計算上の誤差として設定した値を超えてしまったが、これらの代謝物はSTOCSYにおいて各ケミカルシフト間で高い相関が出ていることに加え、今回用いているヒト糞便中には高濃度に含まれていることが知られていることから帰属は確からしいと考えられる。本研究では180枚のスペクト

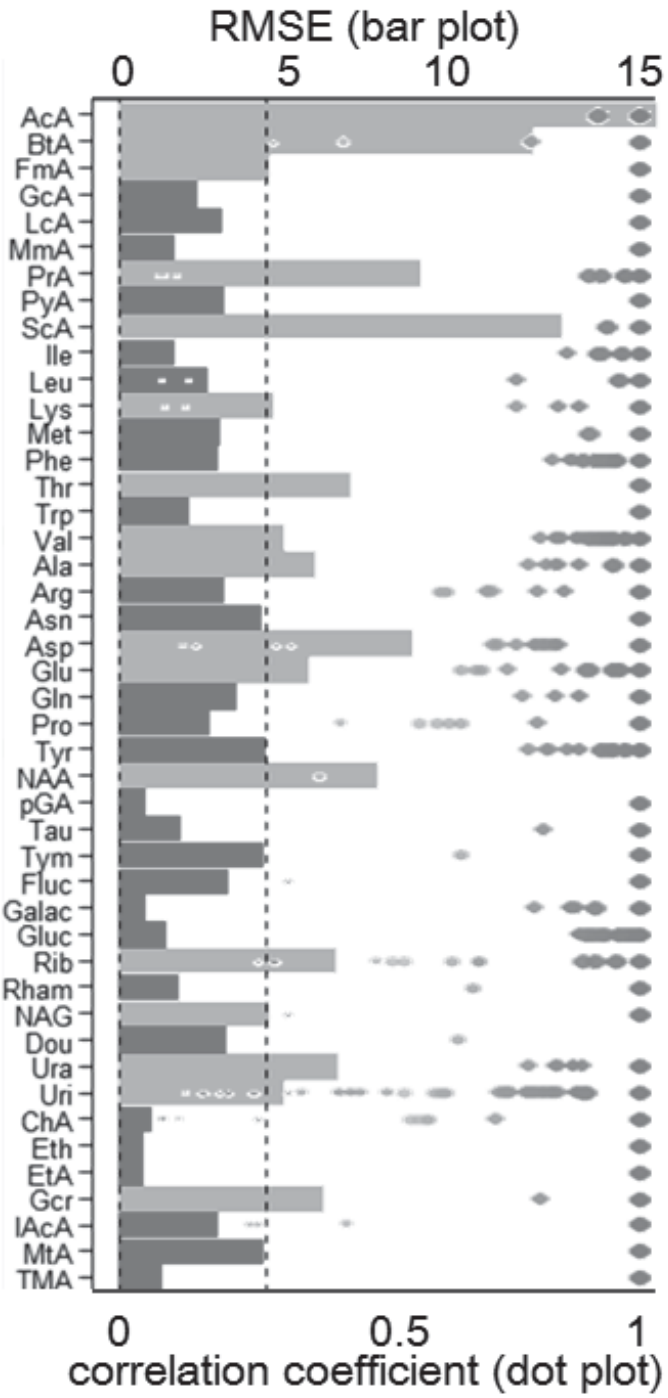


Fig. 4: RMSE (bar plot) and correlation coefficient (dot plot) of each metabolite. In bar plot, the color is discriminated by the value of 3.82 (dot line) which is the potential error of quantum chemistry calculation with our environment. In dot plot, the contrast and point size indicate the value of correlation coefficient. The higher correlation coefficient indicates deeper color and bigger size.

ルデータを用いて全503ピークを見出した。その内STOCSYのみで144ピーク、量子化学計算のサポートにより計253ピークの帰属に成功した。特に^{1}H NMRでは0.7ppm付近にブロードなシグナルとして観察され、^{13}C NMRでも低強度であることから帰属が困難であったcholic acid (ChA)を始めとする従来の方法では帰属が困難であった多数のシグナル帰属に成功したことからも当技術の有用性が示された。[7] 当技術の帰属精度はピークアライメント技術と量子化学計算の精度に依存している。両分野は現在も盛んに研究が行われていることから、これらの技術の発展に伴い当技術の更なる精度向上が見込まれ、将来的な発展・改良による更なる有用性・利便性の向上が期待される。

本研究により高分解能を保ったまま^{13}C NMRの弱点である感度不足を克服することが可能となったことから、いままで見逃されてきた代謝物を検出することで新たなバイオマーカーの発見や現状の技術では帰属が困難であった1次元NMRにおける脂質や糖の帰属も行える可能性が示唆された。現在は高分解能^{13}C NMRを基盤とした1次元NMR脂質簡易帰属法の開発を行っており、本会では当技術の詳細に加え、食用油を用いた脂質混合物に対する簡易帰属の試みについても議論したい。

【参考文献】

1. Misawa, T.; Date, Y.; Kikuchi, J., Human metabolic, mineral, and microbiota fluctuations across daily nutritional intake visualized by a data-driven approach. *J Proteome Res* **2015,** *14* (3), 1526-34.

2. Bingol, K.; Zhang, F.; Bruschweiler-Li, L.; Bruschweiler, R., Carbon backbone topology of the metabolome of a cell. *J Am Chem Soc* **2012,** *134* (21), 9006-11.

3. Clendinen, C. S.; Lee-McMullen, B.; Williams, C. M.; Stupp, G. S.; Vandenborne, K.; Hahn, D. A.; Walter, G. A.; Edison, A. S., ^{13}C NMR metabolomics: applications at natural abundance. *Anal Chem* **2014,** *86* (18), 9242-50.

4. Kato, T.; Fukuda, S.; Fujiwara, A.; Suda, W.; Hattori, M.; Kikuchi, J.; Ohno, H., Multiple omics uncovers host-gut microbial mutualism during prebiotic fructooligosaccharide supplementation. *DNA Res* **2014,** *21* (5), 469-80.

5. Cloarec, O.; Dumas, M. E.; Craig, A.; Barton, R. H.; Trygg, J.; Hudson, J.; Blancher, C.; Gauguier, D.; Lindon, J. C.; Holmes, E.; Nicholson, J., Statistical total correlation spectroscopy: an exploratory approach for latent biomarker identification from metabolic ^{1}H NMR data sets. *Anal Chem* **2005,** *77* (5), 1282-9.

6. Mori, T.; Chikayama, E.; Tsuboi, Y.; Ishida, N.; Shisa, N.; Noritake, Y.; Moriya, S.; Kikuchi, J., Exploring the conformational space of amorphous cellulose using NMR chemical shifts. *Carbohydr Polym* **2012,** *90* (3), 1197-203.

7. Saric, J.; Wang, Y.; Li, J.; Coen, M.; Utzinger, J.; Marchesi, J. R.; Keiser, J.; Veselkov, K.; Lindon, J. C.; Nicholson, J. K.; Holmes, E., Species variation in the fecal metabolome gives insight into differential gastrointestinal function. *J Proteome Res* **2008,** *7* (1), 352-60.

P34

Pure shift NMRによる生体分子複雑系のデータマイニング高解像度化

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

High-Resolution Data Mining of Biological Molecular Complexes using Pure Shift NMR

○Takanori Komatsu[1,2] and Jun Kikuchi[1,2,3]
[1] *RIKEN CSRS, Japan*
[2] *Graduate School of Medical Life Science, Yokohama City University, Japan*
[3] *Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University, Japan*.

Pure shift NMR techniques were applied in the NMR metabolome analysis to enhance performance in data mining process. As a feasibility study, pure shift NMR spectra of water soluble metabolites in ripening fruits of *Persea americana* were recorded as fine ^{1}H-NMR spectra in which there was less spectral overlap than conventional way. Especially in sugar region of these spectra, signals from sucrose, preseitol, pectin digests were successively resolved in pure shift NMR spectra. And these spectra also indicated dynamic sugar metabolic change in ripening fruits in which pectin digests increased and energy substrates decrease with ripening. And we will discuss how pure shift NMR spectra improve the data mining process in metabolomics.

【緒言】NMRメタボロミクスでは，多検体から得られた^{1}H-NMRスペクトルを数値マトリックスとして扱い，多変量解析をおこなうことで特徴的な変数を探索する。NMRには，溶液・固体に関わらず混合物を非分離のまま計測できる利点があるが，一方，混合物ではNMRシグナルのオーバーラップが問題となる [1-5]。計測スペクトル上でNMRシグナルがオーバーラップした場合，その化学シフト変数は，多成分の合成となるため，個々の成分の変動を正確に反映しない。スペクトルの分解能を向上させることで，個々の成分の変動をより正確に反映したマトリックスを取得することが可能となり, 後の多変量解析において, より成分の変動を反映した結果が期待できる。

NMRスペクトルの分解能を向上させる試みとして，磁石の高磁場化が挙げられる。NMRシグナルのオーバーラップには，スピン-スピン結合によるシグナルの分裂が問題となる。2次元*J*分解スペクトル (2D-J) を，投影化した1次元スペクトルを利用することで，シグナルの分裂が取り除かれるため，結果的に高分解能化と同じような効果が得られる [6]。しかしながら，通常の2次元*J*分解スペクトルは絶対値モードでフーリエ変換する必要があるため，スペクトルの定量性および分散成分の混入に伴う幅広化が問題である。

そこで，本研究ではPCYCHE [7]やZangger-Sterk (ZS) 法 [8]などのpure shift法に着目した。Pure shift法では，磁場勾配とシェープドパルスの巧みな組み合わせによって水素核間の同種核デカップリングをおこなう。この方法では，分解能において有利な吸収型の波形でNMRシグナルが取得でき, なおかつ, 定量性はある程度担保されることが報告されている。本研究では, 種々のpure shift法による超高分解能のNMRスペクトルをNMRメタボロミクスへと適用した。糖は，化学構造の類似によってNMRシグナルのオーバーラップが激しく, これまでのNMRメタボロミクスでは解析が困難であった。そこで，クリマクテリック型果実のアボカド (*Persea americana*) の追熟過程における水溶性糖が増減する系をモデル試料としてpure shift NMRの有用性を実証した (**Figure 1**)。

PSYCHE, multivariate analysis, sugar mixture

○こまつたかのり，きくちじゅん

【実験】

PSYCHE, ZS, PSYCHE-TOCSY [9], および pure shift NMR の再構成プログラムは Manchester NMR methodology groupのwebページ (http://nmr.chemistry.manchester.ac.uk/) から，ZSによる吸収モードの2D-J (ZS-Jres) [10]のパルスプログラムは，Keeler groupの web ページ (http://www-keeler.ch.cam.ac.uk/) から入手した。パルスシーケンスによるスペクトルの比較は，ナンヨウアブラギリ (*Jatropha curcas*) の種子の水溶性代謝産物を用いた。糖変動代謝のモデル試料として*P. americana* を使用した。市販されている*P. americana*の果実を購入した。果実は20℃の恒温器に静置し，自発的に追熟させた。購入後，定期的に試料を回収し直ちに凍結した。果実から水溶性画分を抽出し，乾固した後に，リン酸緩衝液に再溶解させNMR計測をおこなった。

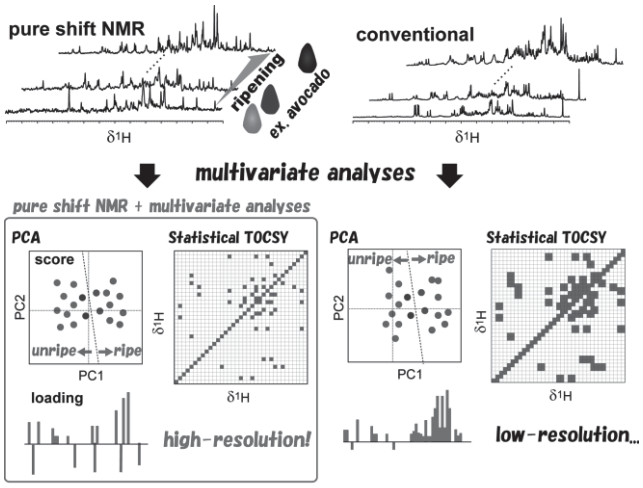


Figure 1. Concept: high-resolution data mining of biological molecular complexes using pure shift NMR.

【結果と考察】

まず，種々のpure shift NMR法からNMRメタボロミクスに適切な計測法の選定をおこなった。PSYCHE，ZS，ZS-Jres，および絶対値モードの2D-Jを投影した1次元スペクトル (Abs-Jres) による

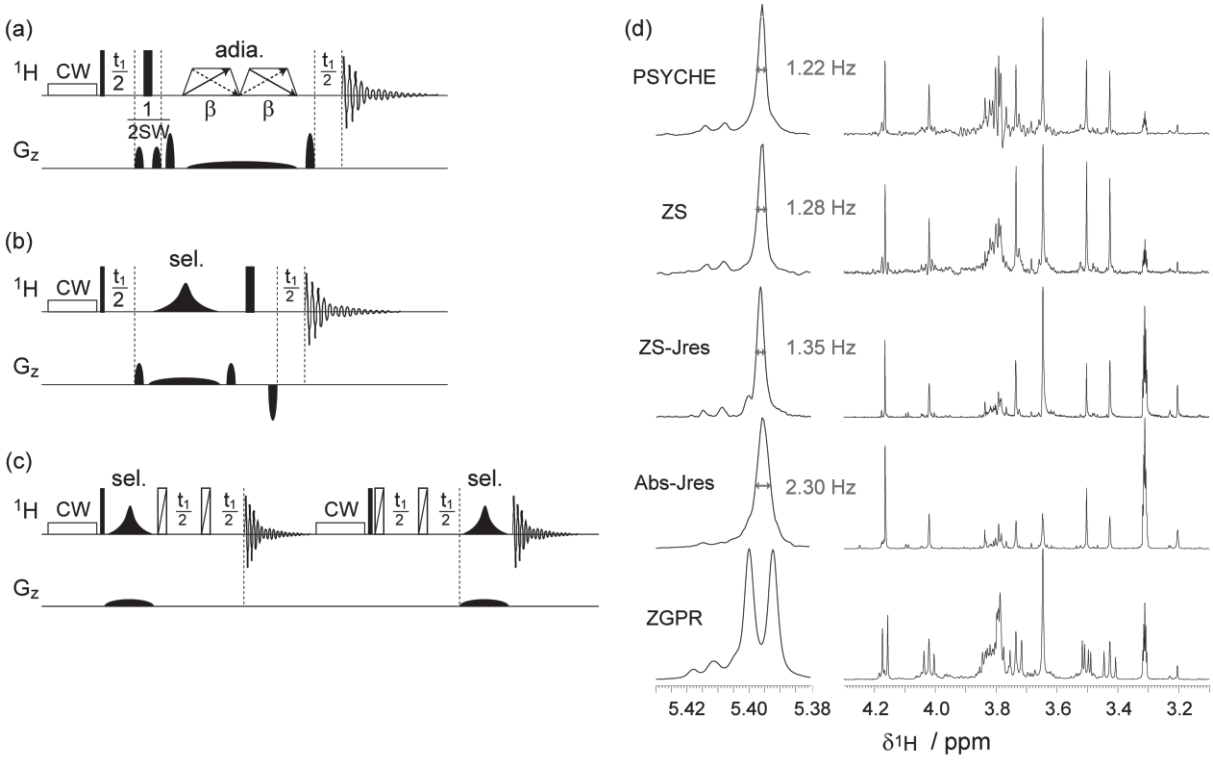


Figure 2. Comparison of pure shift NMR method and J-resolved spectroscopy. Pulse sequences of (a) PSYCHE, (b) ZS, and (c) ZS-Jres. See detail in these original papers [4,5,6]. (d) Spectra of water soluble metabolites extracted with kernel of *Jatropha curcas* recorded by PSYCHE, ZS, ZS-Jres, absolute-mode J-res, single pulse with presaturation. In PSHCHE spectrum, two 20° adiabatic pulse (β) were used under 79.5 mG/mm of field gradient along with z-axis. In ZS and ZS-Jres spectra, gauss-shaped 180 °selective pulse were used under 79.5 mG/mm of field gradient along with z-axis.

Jatropha curcas の種子の水溶性代謝産物の ^{1}H-NMRスペクトルを **Figure 2** に示す。PSYCHE, ZS, およびZS-Jresのスペクトルの線幅は，Abs-Jresのそれと比較し小さかった (**Figure 2(d)**)。これは，前述したようにAbs-Jresではsine-bell関数を適用したとしても，分散波形によって幅広化してしまうためである。また，スペクトルの感度はAbs-J, PSYCHE, ZS, ZS-Jの順であった。pure shift NMR法では，大多数の核スピンを受動スピンとして検出しないため低感度化が避けられない。KeelerらによるとAbs-JresにおけるZS能動スピンは0.3%程度と推定されており（これは原理上，選択パルスの励起幅，グラジエント強度に依存する, **Figure 2(b,c)**）ZSも同程度であることが予想される [10]。一方，PSYCHEでは20度の2つの小角プリップ角パルス (β) によって核スピンを反転させた場合，能動スピンは$\sin^2(20°)*100 = 11.7\%$程度でありZS-JresおよびZSと比較し，10倍以上の感度が期待できる (**Figure 2(a)**) [6]。低濃度代謝産物の検出のために感度は必要不可欠であるため，PSYCHE法をNMRメタボロミクスに採用した。

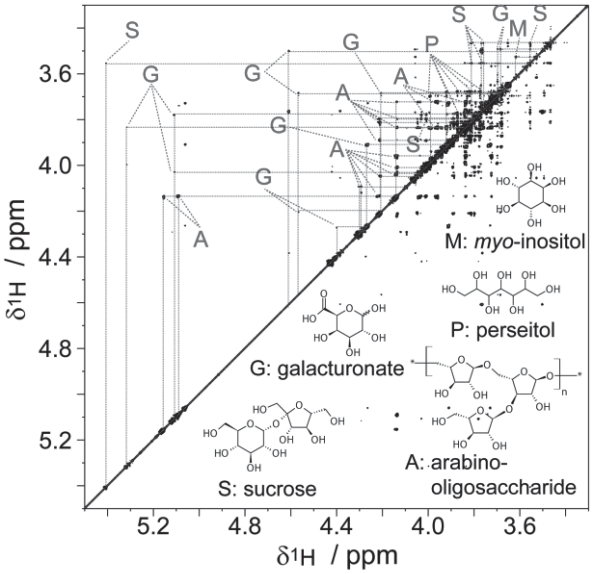


Figure 3. Resonance assignment and metabolite identification in PSYCHE-TOCSY spectrum. 50 ms of spinlock was used, and other parameters were the same as PSYCHE in Figure 2. A, G, M, P, and S represent resonance from arabinooligisaccharide, galacturonate, myo-inositol, perseitol, and sucrose, respectively.

PSYCHE-TOCSYスペクトルを使って*P. americana*中の水溶性糖の同定をおこなった (**Figure 3**). PSYCHE-TOCSYスペクトルでは，F1においてPSYCHEを適用し，indirect covariance法でプロセスすることによりF1およびF2の両軸でJ_{HH}による分裂がないシグナルが得られるため[9], オーバーラップが激しい糖の同定が容易になった。結果として, sucrose, ペクチンの分解産物 (galacturonic acid, homogalacturoninc acid，arabinooligosaccharide)，C7糖アルコールのperseitol（およびC7糖のmannoheptuose) が同定された。これまでに^{13}Cによる安定同位体標識をおこなうことでより化学シフトの分離がよい^{13}C-NMRによる生体分子の同定が報告されている [1-5]。しかしながら，安定同位体標識実験は，コストが高く，また，安定同位体標識できる試料系は，実験室系の試料に限られる。一方，今回示したPSYCHE-TOCSY法による代謝産物の同定は，天然存在比が高い^{1}Hのみを利用するため，安定同位体標識の必要がなく，適用範囲が広い。

未熟，半熟，熟成した*P. americana*の果実の水溶性糖の1D-PSYCHEスペクトルおよびpresaturationしたシングルパルスのスペクトルを**Figure 4**に示す。1D-PSYCHEスペクトルでは，糖のシグナルが分離し，熟成に伴いペクチン分解産物が増大が確認できた。果実の熟成過程の生化学研究によると，熟成は，エチレン濃度の増大によってはじまり，つづいて，ペクチンメチルエステラーゼやポリガラクツロナーゼなどの活性が増大しペクチンが分解し, 1次壁が崩壊することで果実が軟化することが明らかになっている [11]。したがって, 今回観測されたペクチン分解産物の増大は，この知見と合致する。一方，perseitol および mannoheptuose のC7糖は，$^{14}CO_2$ を使ったトレース実験から，主な光合成産物のひとつであることが判明しており，また，熟成を抑止する働きが推定されている [12]。しかしながら，今回得られた結果からは，perseitol 量の変動の傾向が捉えられていない。多検体の計測をおこない，この傾向にも着目して解析する予定である。

シングルパルスのスペクトルではこれらの糖の信号のオーバーラップが激しいため多変量解析からこれらの情報を引き出すのは困難であるが，PSYCHEスペクトルを使うことでこれらの情報

を引き出すことができるようになることが期待できる。討論会当日は，PSYCHEがいかにデータマイニングを改善できるかを討論する。

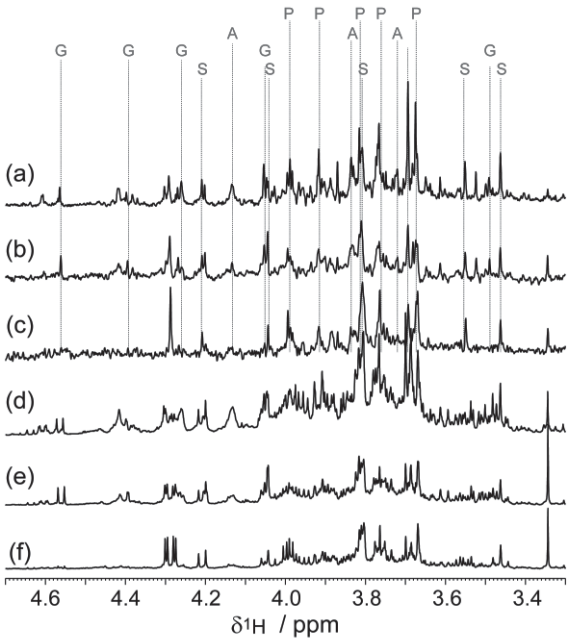


Figure 4. PSYCHE and conventional single pulse spectra of water soluble metabolites from (a, d) dark-ripe, (b, e) medium-ripe, and (c, f) flesh *P. americana*. (a, b, c) PSYCHE and (d, e, f) conventional single pulse spectra. Abbreviations in the spectrum were agreed with Figure 3.

【引用文献】

[1] Komatsu, T., Kobayashi, T., Hatanaka, M., Kikuchi, J., "*Profiling Planktonic Biomass Using Element-Specific, Multicomponent Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*", Environ. Sci. Tech. **49** (2015) 7056-7062.

[2] Komatsu, T., Ohishi, R., Shino, A., Akashi, K., Kikuchi, J., "Multi-spectroscopic analysis of seed quality and ^{13}C-stable-iotopologue monitoring in initial growth metabolism of Jatropha curcas L.". Metabolites **4** (2014) 1018-1033.

[3] Komatsu, T. and Kikuchi, J., "*Comprehensive Signal Assignment of ^{13}C-Labeled Lignocellulose Using Multidimensional Solution NMR and 13C Chemical Shift Comparison with Solid-State NMR*", Anal. Chem. **85** (2013) 8857-8865.

[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) 2279-2283.

[5] Komatsu, T., Ohishi, R., Shino, A., Kikuchi, J., "*Metabolomic structure compiling by 2D and 3D-NMR connectivities using 13C-labeled tree, Rhododendron japonicum*" (in prep., 第53回NMR討論会要旨P)

[6] Ludwig, C., J. Easton, M., Lodi, A., Tiziani, S., Manzoor, S., Southam, AD., Byrne, JJ., Bishop, LM., He, S., Arvanitis, TN., Günther, UL., Viant, MR., "*Birmingham Metabolite Library: A publicly accessible database of 1-D 1H and 2-D ^{1}H J-resolved NMR spectra of authentic metabolite standards (BML-NMR)*" Metabolomics **8** (2012) 8-18.

[7] Foroozandeh, M., Adams, RW., Meharry, NJ., Jeanneratz, D., Nilsson, M., Morris, GA., "*Ultrahigh-resolution NMR Spectroscopy*" Angew. Chem. Int. **53** (2014) 6990-6992.

[8] Zangger, K., Sterk, H., "Homonuclear Broadband-Decoupled NMR Spectra" J. Magn, Reson. **124** (1997) 486-9.

[9] Foroozandeh, M., Adams, RW., Nilsson, M., Morris, GA., "*Ultrahigh-resolution Total correlation NMR Spectroscopy*" *J. Amer. Chem. Soc.* **136** (2014) 11867-11869.

[10] Pell, AJ., Keeler, J., "*Two-dimensional J-spectra with absorption-mode lineshapes*" J. Magn. Reson. **189** (2007) 293-299.

[11] Bapat, VA., Trivedi, PK., Ghosh, A., Sane, VA., Ganapathi, TR., Nath, P., "Ripening of fleshy fruit: Molecular insight and the role of ethylene" Biotech. Adv. **28** (2010) 94-107.

[12] Lui, X., Sievert. J., Arpaia, L., Madore, A., "*Postulated Physiological Roles of the Seven-carbon Sugars, Mannoheptulose, and Perseitol in Avocado*" J. Amer. Soc. Hort. Sci. **127** (2002) 108-114.

P35

不連続な分光計測データをドリルダウンした環境水プロファイリング

○大島嵩裕[1]，坪井裕理[2]，伊達康博[1,2]，菊地淳[1,2,3]
[1]横市院・生命医、[2]理研・CSRS、[3]名大院・生命農

Environmental water profiling by drilling down on discontinuous spectral data

○ Takahiro Oshima[1], Yuuri Tsuboi[2], Yasuhiro Date[1,2], Jun Kikuchi[1,2,3]
[1]Grad. Sch. Med. Life Sci., Yokohama City. Univ. Japan, [2]RIKEN CSRS, Japan, [3]Grad. Sch. Bioagri. Sci., Nagoya Univ. Japan.

Novel environmental water profiling based on chemical, microbial and weather data is proposing this study. To do this, we collected surface water in various parts of Japan, such as fresh water, estuarine, and sea water. Organic matter and minerals in the collected water samples were measured by NMR and ICP–OES spectrometers. In addition to this, 16S and 18S ribosomal RNA genes from bacteria and microalgae were analyzed with next generation sequencer. We integrated these chemical and microbial data with weather information for further multivariate analyses. Furthermore, we focused on environmental profiling to visualize the change of planktonic population in the summer at Tokyo Bay. Some organic and amino acid signals from NMR showed relatively good predictive value on vector auto regressive (VAR) modelling of environmental variations, suggesting that the certain organic matter is an important factor for environmental variation.

＜序論＞　近年、経済活動の進展に伴い、河口や内湾、湖沼等の公共用水域の水質汚濁が社会問題になっている。こういった人類の産業活動を含めた自然界における環境変動は、生活・産業排水による有機物、無機物の流入や、気温、水温、風速、降水量のような様々な環境変動因子が互いに影響し合い引き起こしていると考えられる。そのため、我々を取り巻く環境やそこに生息する生態系から持続的な恩恵を享受するためには、こういった環境変動に重大な影響を与える環境

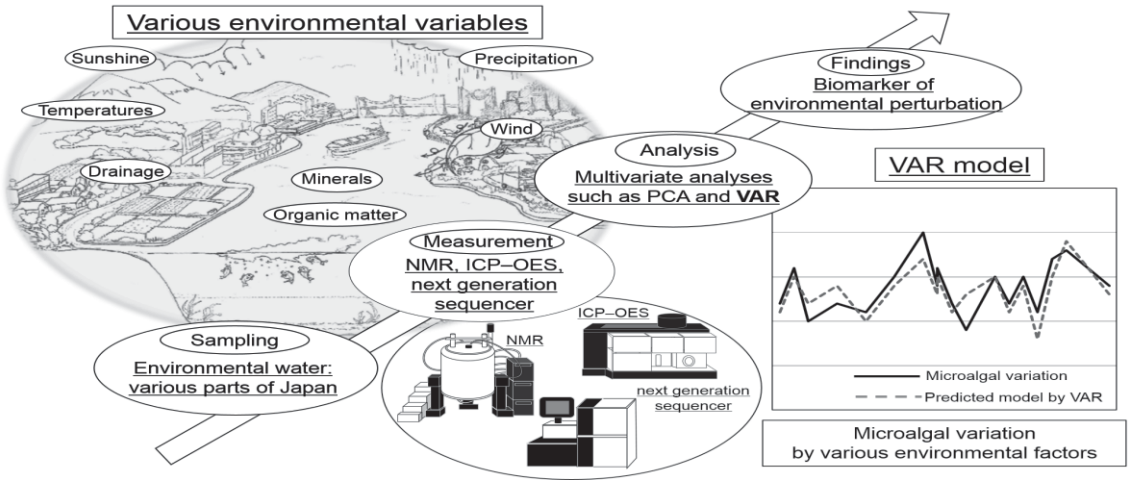


Fig. 1 Conceptual diagram of environmental water profiling by assisted with VAR model.

地域性、モデル構築、環境メタボロミクス

○おおしまたかひろ，つぼいゆうり，だてやすひろ，きくちじゅん

変動因子を特定し、その因子を利用した環境変動評価・予測技術の構築が急務の課題である(Fig.1)。既に我々は、環境試料中に存在する有機物、無機物等の化学的情報、微細藻類や微生物群集等の生物学的情報の統合解析に成功しており[1-6]、今回は更に気温、水温、降水量等の気象学的情報をも活用し、多変量解析や時系列解析等のデータマイニング手法を駆使して包括的データを細部へとドリルダウンし、初夏の東京湾において赤潮の原因とされている微細藻類の変動予測を試みた。

＜方法＞　日本各地における河口や内湾、湖沼等の環境水サンプルをNMR、ICP-OES、次世代シーケンサー等で計測した。また、各サンプリング地点の気象および海洋データは気象庁と国土交通省から入手した。得られたデータは、フリーソフトウェアRを用いて主成分分析(PCA)などの多変量解析に供試し、各サンプリング地点における特性評価を行った。

＜結果・考察＞　各種分光計測データおよび気象・海況データを多変量解析により評価した結果、地域間の特性や淡水・河口・海水等における水域の特徴を鳥瞰することが可能であった。そこで、東京湾の試料へとドリルダウンし、初夏のプランクトン増殖の変動を可視化する環境水プロファイリングを試みた。NMRにより計測された環境水中の有機物プロファイル(Fig. 2a)を基軸とし、微細藻類との相関解析を行ったところ、いくらかの有機・無機物質および気象・海況データにおいて正および負の相関関係が認められた。さらにVARモデルを用いて微細藻類の増減を予測可能な環境変動因子の探索を試みたところ、有機酸やアミノ酸等に由来すると考えられるNMRシグナルを用いたVARモデルが比較的良好な予測値を示した(Fig. 2b)。以上のことから、特定の有機物質等が環境変動因子として重要であることが示唆された。あわせて、このモデルに更なる精査を加えることによって得られた環境変動因子とそのモデル構築に関する最新の知見についても本会で議論したい。

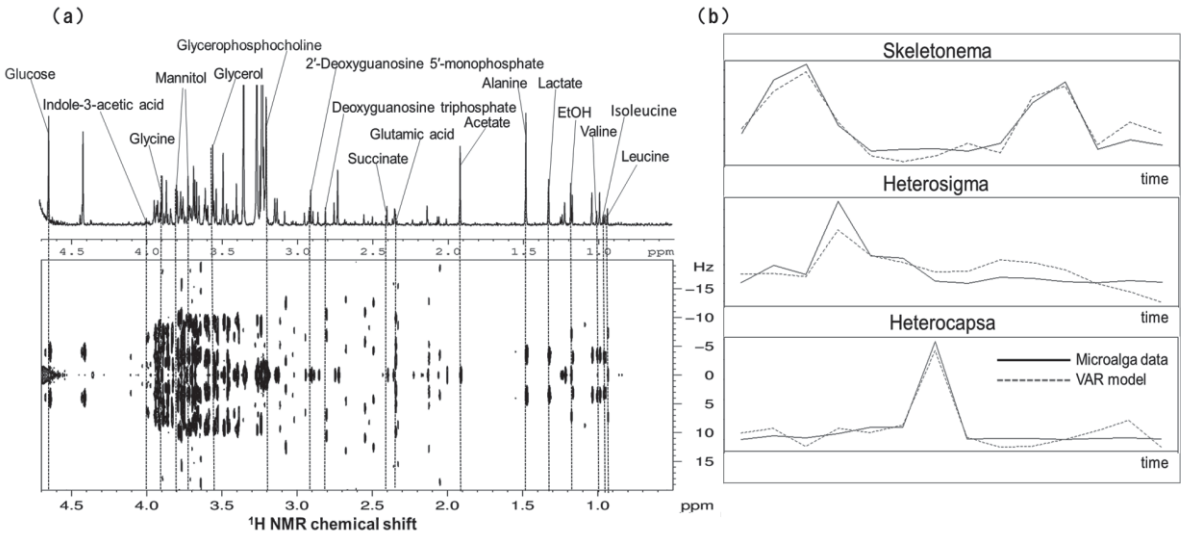


Fig. 2 Environmental water profiling. (a) Representative 2D-JRES NMR spectrum of Tokyo Bay. (b) VAR modelling of microalgae variations based on NMR-based organic matter profiles.

＜参考文献＞

(1) Everroad, R. C.; Yoshida, S.; Tsuboi, Y.; Date, Y.; Kikuchi, J.; Moriya, S. *J Vis Exp* **2012**, e3163.

(2) Asakura, T.; Date, Y.; Kikuchi, J. *Anal Chem* **2014**, *86*, 5425-5432.

(3) Ogawa, D. M.; Moriya, S.; Tsuboi, Y.; Date, Y.; Prieto-da-Silva, A. R.; Radis-Baptista, G.; Yamane, T.; Kikuchi, J. *PLoS One* **2014**, *9*, e110723.

(4) Ito, K.; Sakata, K.; Date, Y.; Kikuchi, J. *Anal Chem* **2014**, *86*, 1098-1105.

(5) Wei, F.; Ito, K.; Sakata, K.; Date, Y.; Kikuchi, J. *Anal Chem* **2015**, *87*, 2819-2826.

(6) Yoshida, S.; Date, Y.; Akama, M.; Kikuchi, J. *Sci Rep* **2014**, *4*, 7005.

P36

化学･生物的統合プロファイリングによる水圏環境プローブ生物の生育特性情報抽出

○魏　菲菲[1]，坂田　研二[1]、朝倉　大河[1,2]、伊達　康博[1,2]、菊地　淳[1,2,3]
[1]理研CSRS，[2]横市大院・生命医，[3]名大院・生命農

Integral analysis of yellowfin goby *Acanthogobius flavimanus* in estuarine environment

○Feifei Wei[1], Kenji Sakata[1], Taiga Asakura[1,2], Yasuhiro Date[1,2], and Jun Kikuchi[1,2,3]
[1]RIKEN Center for Sustainable Resource Science, Yokohama, Japan; [2] Grad. Sch. Medbio. Sci., Yokohama City Univ., Yokohama, Japan; [3] Grad. Sch. Bioagr. Sci., Nagoya Univ., Nagoya, Japan.

Yellowfin goby *Acanthogobius flavimanus* is a common benthic inhabitant of estuarine mudflat native to northern Asia and Japan and is believed to be strongly associated with environmental variables influenced by coastal conditions and upland freshwater drainage. In this study, an NMR-based integral analysis was applied to investigate the temporal, spatial and growth characteristics on the metabolic, mineral and microbial profiles of yellowfin goby and its potential utilization as the probe animal of estuarine environments.

【背景・目的】人間は自然が持つ自己修復性を超える負担をかけ、自然の自己修復能力を損なう行為を繰り返してきた。その結果、自然修復が遅れ、人為修復するには莫大な投資が必要となってします。そのため、生態系のバランスが崩れる前に環境の変動を捉えるバイオマーカーやプローブ生物を見出す基盤技術の構築が重要である。一方、河口・沿岸域の水圏環境は里域環境と人間活動に大きな影響を与えられている。河口・沿岸域の砂泥底や砂底に生息しているマハゼは、水質や底質などの環境変化等の影響を受けやすいものの、汚濁への耐性は非常に強く、汚染された都市の河川やその沿岸にも数多く生息しているため、沿岸域水圏環境を評価するプローブ生物として活用できると考えられる(1-3)。本研究では、異なる河口・沿岸域の環境から採取した水棲生物のマハゼとそれを取り巻く環境を比較し、化学・生物的統合プロファイリングによる水棲生物と生育環境の関係性を見出すための解析法を試みた(4)。

【材料・方法】本研究では2012年から2015年、北海道から中国地方の約20河川の河口・沿岸に生息するマハゼ(n=1036)、それと代表的な棲息地の水(n=42)や底泥(n=38)の採集を行った。以下の2つの分析内容を計画した：1) プールした試料の統合解析。地域・季節の特徴を明らかにするため、粉末化したサンプルを地域・季節ごとにプールし、筋肉組織の^{1}H-NMR (2DJ)、^{13}C-NMR、ICP-OES、腸内容物の^{1}H-NMR (2DJ)、^{13}C-NMR、ICP-OES、腸内微生物叢解析のMiSeq、底泥及び環境水のICP-OESの分析を行った。^{1}H、^{13}Cのシグナルを帰属するために^{1}H-^{13}C HSQC-TOCYの計測や、STOCSY法及びSHY法の2次元相関解析法などを用いた。得られた多検体データは数値・マトリックス化した後、フリーソフトRを用いてPCA、相関係数等の多変量解析によって評価した；2) 個別試料のNMR解析。1036個体のマハゼを解剖後、筋肉組織を凍結乾燥し、シェイクミキサーによって破砕し、得られた粉末のMeOD可溶化成分の^{1}H-NMR (2DJ)計測を行った。得られたデータは数値・マトリックス化し、RによるPCA、OPLS-DA、アソシエーション分析等で評価した。

SHY，ネットワーク解析、環境応答

○うぇいふぇいふぇい，さかたけんじ，あさくらだいが，だてやすひろ，きくちじゅん

【結果・考察】まず、マハゼ筋肉組織のMeOD画分のNMRシグナルの帰属には、従来法の^{1}H-^{13}C HSQC-TOCSY以外に^{1}H-^{1}H/^{13}C-^{13}C STOCSYと^{1}H-^{13}C SHYといった2次元相関解析法も有用性を示した。Fig.1にピークピックした1次元^{1}Hと^{13}C NMRスペクトルのマトリクスに基づいて計算した^{1}H-^{13}C SHYと実測した^{1}H-^{13}C HSQC-TOCSYの結果を重ねて示した。^{1}H-^{13}C SHYでは、同じ化合物に由来するシグナル以外にも、同調して変化する代謝物に由来するピークも高い相関が示されたり、特に実測のスペクトルでは観測困難な4級炭素との相関性も確認できたため、帰属に価値のある情報が多く得られていた。

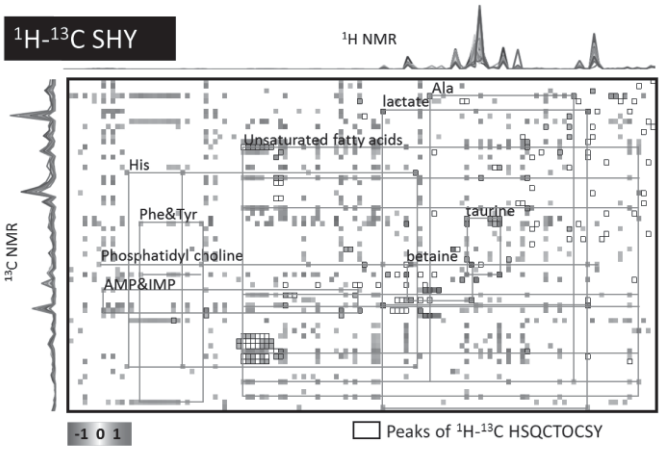


Fig.1 A comparison of peaks in ^{1}H-^{13}C HSQCTOCSY and correlations in ^{1}H-^{13}C SHY of yellowfin goby.

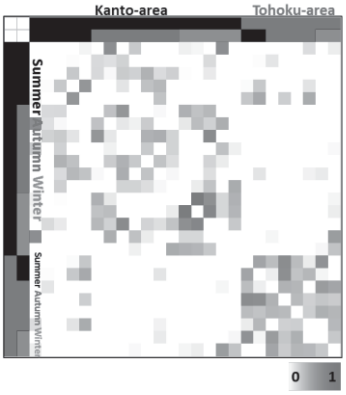


Fig.2 Correlations between yellowfin goby samples pooled according to their habitats and sampling seasons.

さらに、棲息地・季節ごとにプールしたマハゼサンプルの統合解析を行い、相関解析の結果(Fig.2)から、同じ関東地方にある河川・沿岸域で生息したマハゼ同士の間に比較的高い化学・生物的な相関性が見られ、マハゼの地域特性が示唆された。一方、地域特性と同様に、同じ季節に採集したマハゼ同士の間にもより高い相関性を示し、マハゼが時期の特性も有することが示唆された。

最後に、約1000匹のマハゼのNMRデータに基づいた多変量解析を行ったところ、地域や季節の特性以外にも、マハゼの生育特性に関する情報も抽出できた。Fig.3のPCAの結果から、雌でも無卵のマハゼより、抱卵したマハゼがPC1負の方向にプロットされた。OPLS-DAやボルケーノロットによって、冬の繁殖期に入ってから抱卵するマハゼの筋肉組織にtaurineが蓄積しやすい傾向を捉えることができた。

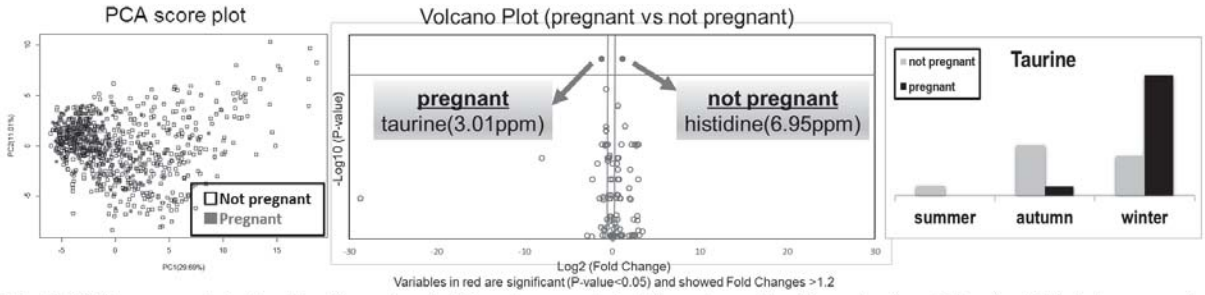


Fig.3 PCA score plot of yellowfin goby (left); volcano plot of female yellowfin goby in winter (middle); temporal changes of taurine in muscle of yellowfin goby (right).

【引用文献】

1. Asakura, T., Sakata, K., Yoshida, S., Date, Y. and Kikuchi, J. PeerJ, 2, e550 (2014).
2. Asakura, T., Date, Y. and Kikuchi, J. Anal. Chem., 86, 5425-5432 (2014).
3. Yoshida, S., Date, Y. and Kikuchi, J. Sci. Rep., 4, 7005 (2014).
4. Wei, F., Ito, K., Sakata, K., Date, Y. and Kikuchi, Anal. Chem., 87, 2819-2826 (2015).

P37

発汗代謝変動を捉えるデータマイニング法

○筒井 聡志[1]，三澤 拓真[1,2]，伊達 康博[1,2]，菊地 淳[1,2,3]
[1]横市院生命医，[2]理研 CSRS，[3]名大院生命農

Data mining methods to capture metabolic variations in human sweat

○Satoshi Tsutsui[1], Takuma Misawa[1,2], Yasuhiro Date[1,2], Jun Kikuchi[1,2,3]
[1]*Graduate School of Medical Life Science, Yokohama City University, Kanagawa, Japan.*
[2] *RIKEN CSRS, Kanagawa, Japan.*
[3] *Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University, Nagoya, Japan.*

NMR-based metabonomics is a powerful tool for evaluating homeostatic fluctuations from metabolic mixtures. In human metabonomics, plasma, feces and urine are widely used for healthcare research due to strongly reflecting homeostatic information. In this study, we focused on human sweat as non-invasive sample, like feces and urine. In addition, sweat was known as closely connected to plasma in terms of circular metabolism. However, there were few reports on sweat study using NMR. Therefore, we evaluate the difference of metabolic profiles derived from eccrine and apocrine sweat gland and the metabolic fluctuations in intra- and inter-individuals with annotating the signal derived from human sweat.

【序論】

近年、メタボノミクス研究は飛躍的な進歩を遂げており、特に NMR は高い網羅性に加えサンプル調製が簡便であることから広く用いられている。[1] また、ヒトを対象としたメタボノミクス研究では血液や尿、糞便といった体内環境を強く反映する試料が広く研究されており、[2] 生活習慣による体内環境の変化から疾患マーカーまで様々な知見が報告されてきた。ヒト由来の試料の中にはいまだ報告されていない有益な代謝物が含まれており、既存報告の無い試料を NMR 分析することで新たなバイオマーカーの発見に繋がるのではないかと考えた。そこで我々は尿や糞便と同様に非侵襲的な採取が可能であり、体内環境を反映することが知られている汗に注目した。汗は尿や糞便よりも早く血液から即時に産生、排出されることから、より短期間の体内環境を反映することが期待できる。これにより、新たな疾患マーカーの発見や健康状態などをより簡易的かつ非侵襲的に調べることが可能ではないかと考えた。

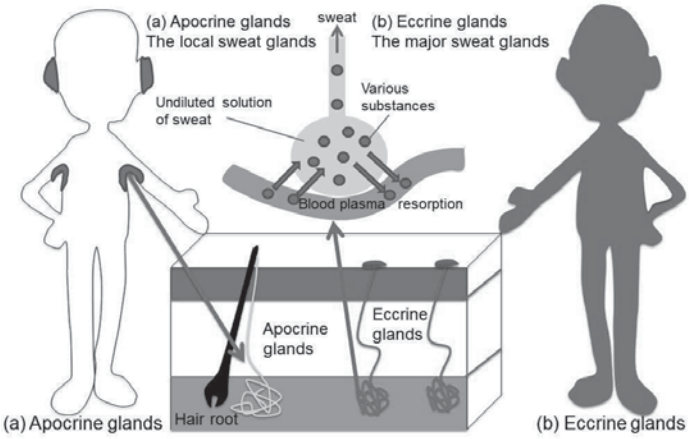


Fig.1 Apocrine and eccrine glands in sweat metabolisms.

非侵襲的サンプリング, 汗腺, メタボノミクス

○つついさとし，みさわたくま，だてやすひろ，きくちじゅん

しかしながらヒトの汗を対象としたメタボノミクス研究は殆んど行われておらず、NMR による汗分析プロトコルすら確立されていない。そこで本研究では汗の NMR 分析プロトコルを確立し、代謝プロファイルに基づくデータマイニング法を援用することでエクリン腺とアポクリン腺の違い (Fig. 1) といった個体内変動や、個人差や生活習慣に起因する個体間変動の評価を目的とした。

【実験】

NMR 分析に必要な汗の量を確保するため、セルロース由来の吸水シートを用い、独自に最適化した KPi/D_2O 抽出プロトコルを用いて NMR 分析を行った。試料は 8 人のボランティアから、日時と採取部位に関する情報も添えて提供された。Non-uniform sampling(NUS)を用いた NMR 計測によって得られたデータに対し、フリーの統計解析ソフトウェアである R を用いて解析を行った。シグナル帰属は 2D-J による測定を行い、当研究室で開発したデータベースであり ^{1}H ケミカルシフトと *J* 値の値から候補代謝物の検索が可能である SpinCouple や SpinAssign などを用いるとともに、既存報告も参考にして帰属を行った。[3-4]

【結果・考察】

1D-NOESY および 2D-J のスペクトルから 25 種以上の代謝物の帰属に成功し、汗には糞便や尿などと同様にリジンやフェニルアラニンといった各種アミノ酸に加え乳酸といった有機酸が多く含まれていることが分かった（Fig. 2）。これは汗を直接採取し帰属を行った既存報告とも一致することから、吸水シートを用いて採取を行った我々の方法が妥当であることを示唆している。また、2 種類の汗腺から採取したスペクトルの比較により、エクリン腺由来の汗の方が多くのシグナルを検出できる事が分かった。これはアポクリン腺由来の汗は多くのタンパク質や脂質を含むため、本研究で行った KPi/D_2O 抽出では NMR による検出が困難であったことに由来すると考えることができ、これにより水溶性の代謝物を NMR で検出する際はエクリン腺由来の汗を用いることで低分子に着目した分析が行えることが示唆された。[5] 本会では、汗腺の違いをはじめとする個体内変動だけでなく個人差等の個体間変動を捉えるデータマイニング法についても議論したい。

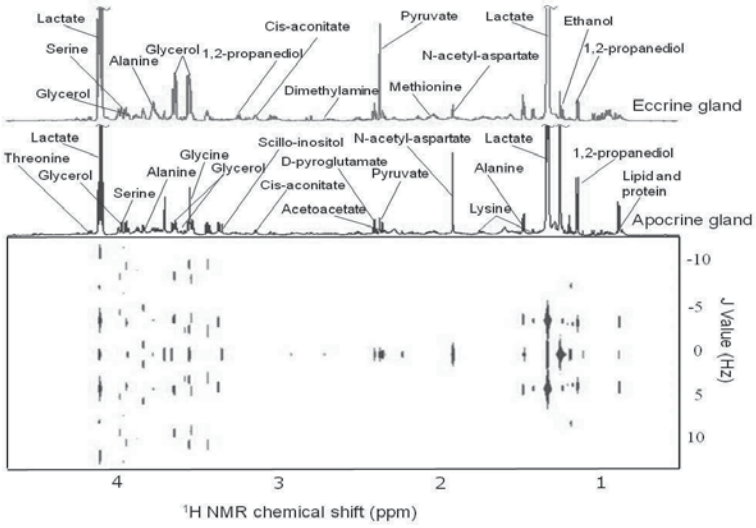


Fig. 2 Comparison of 1D-NOESY spectra of human sweat collected from eccrine (upper) and apocrine (lower) grands. 2D-J spectrum was also used for metabolic annotations.

【参考文献】

(1) Misawa, T.; Date, Y.; Kikuchi, J. *J Proteome Res* **2015**, *14*, 1526-1534.

(2) Kato, T.; Fukuda, S.; Fujiwara, A.; Suda, W.; Hattori, M.; Kikuchi, J.; Ohno, H. *DNA Res* **2014**, *21*, 469-480.

(3) Harker, M.; Coulson, H.; Fairweather, I.; Taylor, D.; Daykin, C. A. *Metabolomics* **2006**, *2*, 105-112.

(4) Kutyshenko, V. P.; Molchanov, M.; Beskaravayny, P.; Uversky, V. N.; Timchenko, M. A. *PLoS One* **2011**, *6*, e28824.

(5) Tobin, D. J., *Chem. Soc. Rev*. **2006,** *35*(1), 52-67

P38

HFIP 中における Aβ(1-42)の二量体形成

○重光佳基[1]，岩谷奈央子[1,2]，天野剛志[1,3]，合田名都子[1]，松崎瑞季[3]，
成田哲博[3]，星美奈子[4]，廣明秀一[1,3]
[1] 名古屋大学大学院　創薬科学研究科
[2] 日本学術振興会
[3] 名古屋大学大学院　理学研究科　構造生物学研究センター
[4] 京都大学大学院　医学研究科

Dimer formation of beta amyloid protein 1–42 in 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol

○Yoshiki Shigemitsu[1], Naoko Iwaya[1,2], Takeshi Tenno[1,3], Natsuko Goda[1], Mizuki Matsuzaki[3], Akihiro Narita[3], Minako Hoshi[4] and Hidekazu Hiroaki[1,3]
[1] *Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya University, Aichi, Japan*
[2] *Japan Society for the Promotion of Science, Tokyo, Japan*
[3] *Structural Biology Research Center, Graduate School of Science, Nagoya University, Aichi, Japan*
[4] *Graduate School of Medicine, Kyoto University, Kyoto, Japan*

Alzheimer's disease (AD) is considered to be caused by accumulation of senile plaques, in which filamentous aggregates of amyloid beta (Aβ) peptides are deposited. Recent studies have demonstrated that oligomerization pathways of Aβ peptides may be more complicated. For physicochemical studies, the starting material should be monomer, and the existing Aβ aggregates must be eliminated before use. Although 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP) treatment has been used for sample preparation of Aβ(1-42) monomer[1], several reports suggest that the "seed" is not completely monomerized during HFIP treatment[2,3]. We found Aβ(1–42) dissolved in HFIP displayed a monomer–dimer equilibrium and we also assigned its dimerization interface by solution NMR. The initial concentration of Aβ(1–42) in HFIP seemed to be both important. This finding is generally useful for the experimental design of Aβ(1–42) peptide studies in terms of reproducible results.

【緒言】
これまでの研究から，アミロイドβタンパク質(Aβ)はアルツハイマー型認知症(AD)の主要因である事が強く示唆されている．Aβの調製時に混入する極微量の凝集核(シード)が，*in vitro*においてAβが高い凝集性を示す要因となり，実験の再現性に影響を与えている．1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol(HFIP)への曝露(HFIP処理)は，Aβを含むペプチドの単量体化を誘導する試薬として広く用いられているが[1]，近年、AFM等によりHFIP中においてAβがオリゴマー形成することが観察された[2,3].
我々は，前年度にHFIP中においてAβ(1-42)が単量体–二量体の平衡状態にあることを報告した．本年度は，二量体化のインターフェイスを特定したこと，ならびにHFIP処理に伴うAβ(1-42)の濃度について仮説を構築したことを報告する．

---

amyloid β(1-42), solution NMR
○しげみつよしき，いわやなおこ，てんのたけし，ごうだなつこ，まつざきみずき，なりたあきひろ，ほしみなこ，ひろあきひでかず

【方法】

大腸菌 *E.coli* BL21(DE3)を用いて$^{13}C/^{15}N$標識したAβ(1-42)を6×His-酵母ユビキチン融合タンパク質として発現させ封入体として得た．精製は，アフィニティカラム精製・6×His-酵母ユビキチンタグ切断・HPLCの順で行った．得られた目的物を凍結乾燥した後，0.1 mMとなるようにHFIPを加えて分注し，再度凍結乾燥を行い最終精製物とした．目的物の確認はウェスタンブロット及びMALDI TOF-MSを用いて行った．上記$^{13}C/^{15}N$-Aβ(1-42)を95% HFIP / 5% d_6-DMSOにペプチド濃度が300 μMとなるように溶解させ，主鎖帰属のための測定を行った．主鎖帰属より得られた化学シフト値からTALOS-Nを用いて二次構造予測を行った．また， Aβ(1-42)の濃度が0.05 mM・0.1 mM・1 mMとなるようにHFIP処理を行った試料を用いて，チオフラビンT(ThT)アッセイを行った．

【結果と考察】

主鎖帰属の結果，D1・F20・A21を除くAβ(1-42)のアミノ酸主鎖の帰属に成功した(Figure 1)．二次構造予測の結果，A2-G25およびA30-V36の2つの領域でα-ヘリックスを形成していることを示唆する結果が得られた．80% HFIP / 20% 水の系でAβ(1-42)の立体構造が既に報告されているが，その二次構造に類似性が認められた．さらに，膜環境下中においてアミロイド前駆体タンパク質(APP)が膜貫通領域で二量体化するシミュレーションの結果が報告されている[4,5]．これらシミュレーションによる二量体化のインターフェイスは，我々が得たAβ(1-42)の二次構造予測のうち2番目のα-ヘリックス領域を含んでいる．HFIPは水より誘電率が低いことから，HFIP中では疎水的な環境である膜環境を模しており，HFIP中に存在するAβ(1-42)はAPPと同様に二量体を形成しうるのではないかと考えられる．ThTアッセイの結果，1 mMのAβ(1-42)濃度でHFIP処理を行った試料は他の2つとは異なる挙動を示した．我々は以上のことを踏まえ，HFIP処理時のAβ(1-42)濃度に関してFigure 2のようなモデルを構築した．

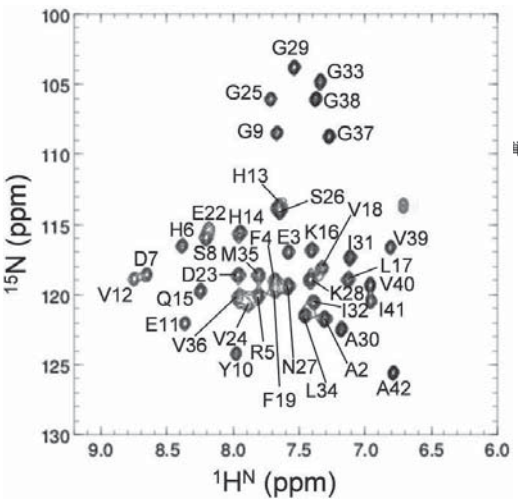


Figure 1. Assignment of Aβ(1-42) in 95% HFIP / 5% d_6-DMSO.

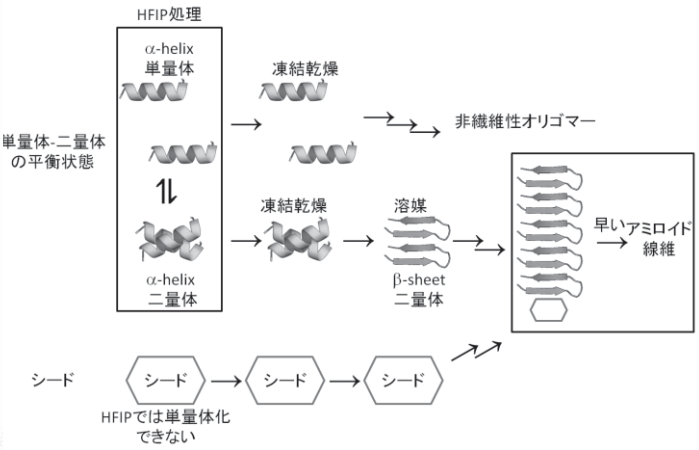


Figure 2. Hypothesis model for HFIP treatment of Aβ(1-42).

参考文献

1. Stine *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **278**, 11612-22 (2003)
2. Pachahara *et al.*, *J. Pept Sci.*, **18**, 233-41 (2012)
3. Fülöp *et al.*, *Nanopages*, **1**, 69-83 (2006)
4. Russ *et al.*, *J. Mol. Biol*, **296**, 911-919 (2000)
5. Miyashita *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 3438-3439 (2009)

P39

抗菌ペプチドnukacin ISK-1とその標的分子lipid IIとの相互作用解析

○藤浪　大輔[1]，Abdullah Al Mahin[2]，長尾 潤一[4]，園元　謙二[2,3]，神田　大輔[1]

[1]九州大学・生体防御医学研究所

[2]九州大学・農学研究院

[3]九州大学・バイオアーキテクチャーセンター

[4]福岡歯科大学・機能生物化学講座

Analysis of interaction of antimicrobial peptide nukacin ISK-1 with cell-wall precursor lipid II embedded in n-octyl-β-D-glucoside micelles

○Daisuke Fujinami[1], Abdullah Al Mahin[2], Jun-ichi Nagao[4], Kenji Sonomoto[2,3] and Daisuke Kohda[1]

[1]*Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University.*

[2]*Faculty of Agriculture, Graduate School, Kyushu University.*

[3]*Bio-Architecture Center, Kyushu University.*

[4]*Department of Functional Bioscience, Fukuoka Dental College.*

Nukacin ISK-1 is a ribosomally synthesized antimicrobial peptide containing unusual amino acids, such as dehydrated, aminobutyric acid and lanthionine residues. Nukacin ISK-1 binds to cell-wall precursor lipid II, resulting in the inhibition of the peptidoglycan biosynthesis and the disruption of microbial membranes. In the present study, the interaction between nukacin ISK-1 and lipid II was analyzed by NMR in n-octyl-β-D-glucoside micelles. ^{1}H-^{15}N HSQC spectrum of the ligand-free nukacin ISK-1 showed two sets of cross peaks corresponding to two conformational states of nukacin ISK-1. EXSY spectrum indicated that these two states were chemical exchanged in a millisecond time scale. One of the two states of nukacin ISK-1 showed relatively large chemical shift perturbations during lipid II titration.

序論

Nukacin ISK-1は表皮ブドウ球菌*Staphylococcus warneri*により産生される抗菌性ペプチドであり、分子内に異常アミノ酸であるジデヒドロアミノブチル酸（Dehydrobutyrine, Dhb）やアミノ酪酸（Aminobutyric acid, Abu）、ランチオニン環構造を有する（Fig. 1）。先行研究によりnukacin ISK-1は真正細菌の外膜上にある細胞壁ペプチドグリカン前駆体lipid IIを標的分子として結合し、細胞壁の生合成阻害[1)]や細胞膜の形態異常[2)]を引き起こすことが明らかになった。本研究ではnukacin ISK-1とlipid IIの相互作用についてNMRによる解析を行い、相互作用のメカニズムを明らかにすることを目的とする。

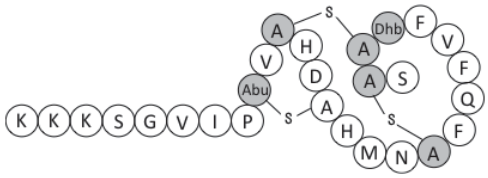


Fig.1 Primary structure of nukcain ISK-1

抗菌ペプチド，相互作用解析，化学交換

○ふじなみだいすけ，あぶどぅるあるまひん，ながおじゅんいち，そのもとけんじ，こうだだいすけ

方法

$^{13}C/^{15}N$標識したnukacin ISK-1は*S. warneri*を培養したCHL培地（クロレラ工業社）上澄から抽出した。Lipid IIは試験管内での酵素反応により生合成した。NMRの測定試料として218 μMの$^{13}C/^{15}N$標識nukacin ISK-1、緩衝液として10 mMリン酸緩衝液pH6.0を用いた。この試料に対して重水素化した界面活性剤n-octyl-β-D-glucosideミセル、lipid IIの滴定を段階的に行い^{1}H-^{15}N HSQCスペクトルを測定した。NMRスペクトルの測定にはAVANCE600（BRUKER社）を用いた。

結果と考察

Nukacin ISK-1の^{1}H-^{15}N HSQCスペクトルを示す（Fig. 2）。Nukacin ISK-1のスペクトルはK2~S27(A状態)とK2'~S27'(B状態)に帰属される二組のクロスピークからなっている。^{1}H-^{1}H NOESYを測定したところ、各状態のアミドプロトン間にEXSYピークが存在することから、この二状態は化学交換していることが示唆された。各状態の８番目のプロリン残基はどちらもトランス型であった。二状態の由来については現在までに明らかにできていない。

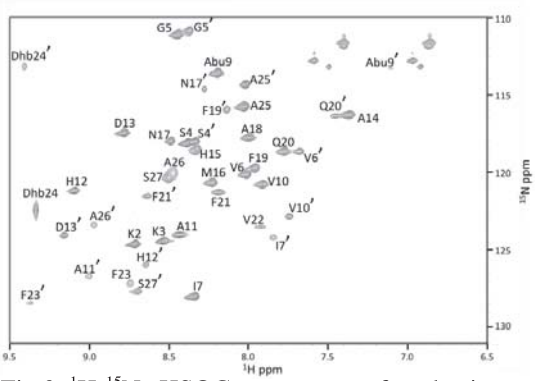


Fig.2 ^{1}H-^{15}N HSQC spectrum of nukacin ISK-1 at 313 K

リガンドの滴定に伴う化学シフト変化の解析では、n-octyl-β-D-glucosideとlipid IIの滴定において、nukacin ISK-1の化学シフト変化を観測することができた（Fig. 3）。よって、nukacin ISK-1は界面活性剤n-octyl-β-D-glucosideとlipid II、両方と相互作用すると考えられる。化学シフト変化をアミノ酸残基にマッピングすることでnukacin ISK-1のリガンド相互作用領域を推定することができた。また、二状態のうちA状態ではB状態に比べて比較的大きな化学シフト変化を示したことから、A状態の方がリガンドに対して高い親和性をもつと考えられる。今後は、lipid II側の相互作用領域の同定をNMRにより行いたいと考えている。

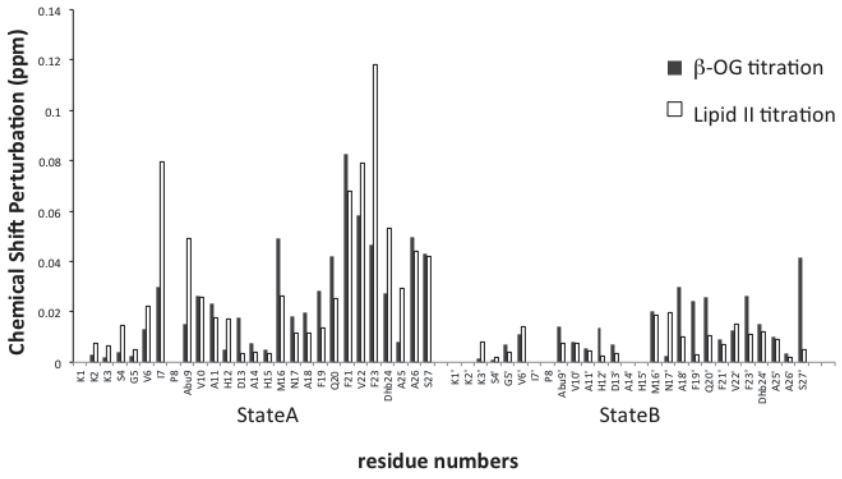


Fig.3 Chemical shift perturbation as a function of the amino acid sequence upon addition of n-octyl-β-D-glucoside (*filled bar*) and lipid II (*open bar*). Chemical shift perturbation was calculated as $\sqrt{(\Delta\delta_H)^2 + \frac{(\Delta\delta_N)^2}{49}}$, where $\Delta\delta_H$ and $\Delta\delta_N$ are the chemical shift perturbation observed on ^{1}H and ^{15}N atoms.

引用文献

1) Islam M.R. and Nishie M. et al., *J.Am. Chem. Soc.* **134**, 3687-3690, 2012.

2) Roy U. et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.***78**, 1270-1273, 2014.

P40

DQF-COSY 法の新しい応用測定-Broad Band Saturation DQF-COSY 法について

○降旗一夫[1]，佐久間千勢子[2]，田代 充[3]
東大院農・応生化[1]，東薬大・薬[2]、明星大・理工[3]

BB-SAT-DQFCOSY ---a new Broad Band Saturation DQF-COSY to saturate huge water and sugars and to observe minor components in foods

K. Furihata[a)], C. Sakuma[b)] and M. Tashiro[c)]
a) Division of Agriculture and Agricultural Life Sciences, University of Tokyo
b) Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences,
c) Department of Chemistry, College of Science and Technology, Meisei University,

In many foodstuffs, the signals of water and sugars make the minor components undetectable or detected with very low sensitivity due to the limitation of dynamic range. BB-WET method has already been reported as a robust method for broad band saturation. Although the decent 1D-1H NMR spectra were obtained, its application to DQF-COSY was unexpectedly difficult. Most of the phase cycles were not useful, resulting in the artifact peaks. we have developed a new technique, Broad Band Saturation(BB-SAT)-DQF-COSY. The proposed method was applied to saturate the resonances of water and sugars simultaneously in a sample of pineapple juice.

食品の溶液の NMR のスペクトルは、食品にどのような成分が含まれるかを示しその食品の特徴を表すことが出来る。食品の NMR スペクトルを測定する場合の問題点として、その溶液は軽水であり、また糖のシグナルが強く観測される。そのため、軽水を saturation しても強い糖のシグナルにより、NMR の dynamic range が支配されるため、糖以外の微量成分を S/N よく観測することが困難になることがしばしばある。この問題を解決する方法として、如何に軽水と糖のシグナルを低く抑え、微量成分を観測するかが重要になっている。既に、この問題を解決する方法として Broad Band(BB)-WET 法[(1)]を報告し、1D-NMR として良好なスペクトルを得ることができた。しかし、この方法を DQF-COSY 法に応用した場合、十分な saturation が得られず t_1-noise が強く観測され、良好な DQF-COSY を得ることが困難であった。この DQF-COSY 法における t_1-noise の問題を解決するために、新しく、Broad Band Saturation(BB-SAT)法を検討し、BB-SAT-DQFCOSY 法の開発を試みた。この方 法を pineapple ジュースに応用して、軽水と糖のシグナルを saturation し微量成分の DQF-COSY シグナルを観測することが可能になった。

BB-SAT-1D の Pulse 系列

図 1 には BB-SAT-1D 法 の pulse を説明するために、関係した 4 つのパルス系列を示す。(a)BB-PRE-SAT-1D,(b)BB-SAT-NOESY1D,(c)BB-SAT-1D-1, (d)BB-SAT-1D-2、また 4 つの pulse に対応したスペクトルを図 2 に示す。BB-SAT-1D 法は BB-WET-1D 法における WET pulse[(2)]を shaped pulse の連続 pulse に置き換えた方法である。この BB-SAT-1D 法が如何にして、broad band saturation が可能になるかを示す。Shaped pulse は 90-pulse の E-BURB[(3)]を使用し、n=60 で saturation をした。また saturation 範囲は、3.02ppm から 5.40ppm に設定した。図 2a は BB-PRE-SAT-1D のスペクトルである。このスペクトルは軽水の presaturation-1D のスペクトルである。Pineapple ジュースには糖が如何に多量に含まれているかを示したスペクトルである。RGAIN＝20 である。

Broad Band-WET, Broad Band Saturation, DQF-COSY
ふりはたかずお、さくまちせこ、たしろみつる

図 2b は BB-PRE-SAT-NOESY1D のスペクトルである。Mixing time は 10.0msec を設定した。予め、軽水は presaturation をしている。水と糖のシグナルは BB-PRE-SAT-1D スペクトルよりは低く抑えることができた。しかし、水のシグナルが強く観測され、水と糖のシグナルの saturation では不十分であることがわかる。Mixing time の間に FG-pulse を入れても大きな変化はない。この時の RGAIN は 30 であった。図 2c は BB-SAT-1D-1 スペクトルである。mixing period に新たに g1-S90-g2-g3-S90(±)-g4 を導入した。この二つの selective-90 pulse は位相回しの結果、0 度パルスと 180 度パルスとなり、水と糖のシグナルは消去される。その結果、水と糖のシグナルを微量成分の acetic acid の LEVEL まで大幅に saturation することが可能になった。RGAIN は 48 であった。図 2d は BB-SAT-1D-2 のスペクトルである。BB-SAT-1D-1 の pulse の g1-S90-g2--g3-S90(±)-g4 pulse に新たに 180 度 pulse を導入した。RGAIN は 48 のままであった。図 2c の BB-SAT-1D-1 のスペクトルと比較して糖の saturation において大きな変化はないが、180 度 pulse を導入した方がシグナルの saturation 効果を高める役割を果たすことが判明した。

このように、BB-SAT-1D 法は BB-WET-1D と同様に、強大な水及び糖のシグナルを同時に saturation することが示された。また、RGAIN を大きく高めることが可能であった。

BB-SAT-DQCOSY 法

BB-SAT-DQF-COSY の PULSE 系列を図 3 に示す。BB-WET 法を DQF-COSY 法に応用した場合、水と糖のシグナルによる強い t_1-nose が観測された。また、artifact シグナルが観測され、解析可能な良好な DQF-COSY スペクトルが得られなかった。そこで、BB-SAT 法を応用することを検討した。

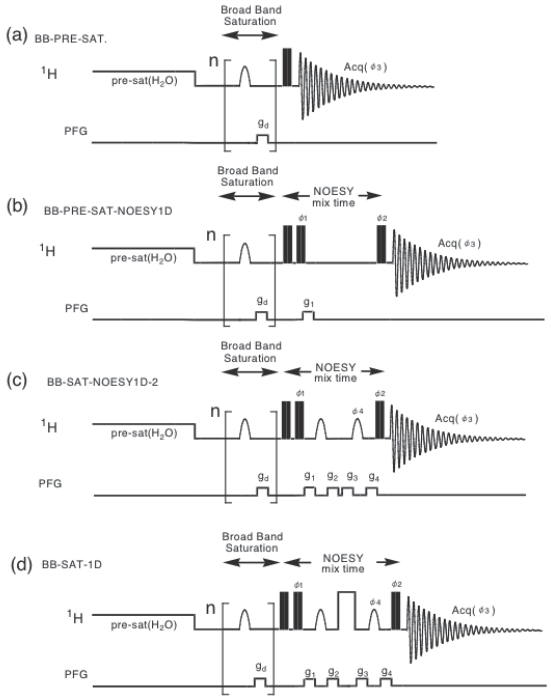


Fig.1 Pulse sequences of BB-SAT-1D. The thin and thick bars represent 90° pulse and 180° pulses respectively.

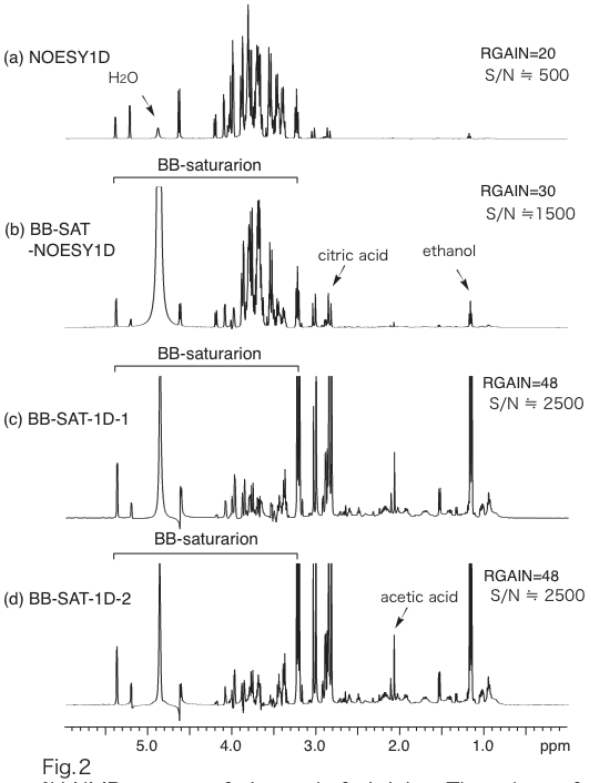


Fig.2
^{1}H-NMR spectra of pineapple fruit juice The values of reciever gain and S/N ratio calculated in the ethanol signal of 1.17 ppm are indicated in each spectrum.

BB-SAT-DQF-COSY 法は FG-DQF-COSY 法の pulse に BB-SAT-1D 法を結合したものであるが、phase cycle においては、通常の DQF-COSY 法の 4-phase cycle を使用した。FG の coherence selection type の 2-phase-cycle では、軽水と糖のシグナルの saturation が不十分であった。しかも軽水と糖からの分散シグナルも観測されスペクトルの解析を困難にした。

図 4 に、BB-SAT-DQF-COSY-1D スペクトルを示す。

このスペクトルは DQF-COSY 法の初期値を固定（90msec）して、1D-NMR として測定したものである。BB-SAT の連続 pulse の個数(n)の変化により、水と糖のシグナルが如何に saturation されるかを検討した。n=4 は BB-WET-DQF-COSY に相当する。このスペクトルでは水と糖のシグナルの saturation が不十分であり、このシグナルにより t_1-noise が強く観測された。n=60 では、水と糖のシグナルは n=4 の時の半分以下に saturation できた。更に Pulse の個数(n)を増やしても大きな saturation は期待できなかった。

図 5 に BB-SAT-DQF-COSY のスペクトルを示す。水と糖のシグナル領域(3.2ppm～5,5ppm)において,BB-SAT の効果により t_1-noise が低く抑えられた。しかも、F_2 軸方向での分散シグナルの検出もなく微量成分領域でのシグナルの観測が可能になった。しかし、F_1 方向においては、軽水と糖のシグナルによる t_1-noise が観測されているが解析が困難なほどではなかった。

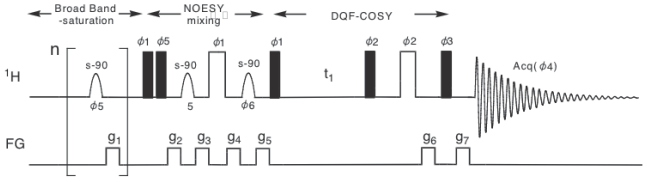


Fig.3 Pulse sequences of BB- SAT-DQF-COSY. The thin and thick bars represent 90° pulse and 180° pulses respectively, and sine shapes are E-BURP-90° pulses. All pulses are along x unless otherwise shown. The tip angles for E-BURP pulses are 90° along x. The duration of all gradients was 1.0msec, gradients pulse strenghts was set as follows:
g1=-1.0 G/cm, g2 = -2.0 G/cm, g3 = -1.0 G/cm, g4= -1.0 G/cm, g5 = 1.0 G/cm,
g6 = -5.0 G/cm, g7 = 10.0 G/cm
Phase cycling was ϕ1=4(x), 4(-x), 4(-x), 4(x); ϕ2 =16(y); ϕ3 = y, -x, -y, x, -y, -x, y, x;
acq.=x, -y, -x, y, x, y, -x, -y; ϕ5 =4(x),4(-x), ϕ6 = 4(-x, x), 4(x,-x), 4(x, -x), 4(-x, x);

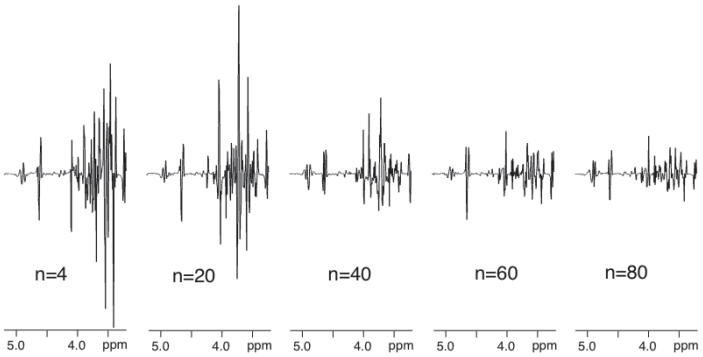


Fig.4 BBSAT-DQF-COSY slice 1D spectra of sugars(5.2-3.2 ppm) signal saturation order by the loop(n) number of times

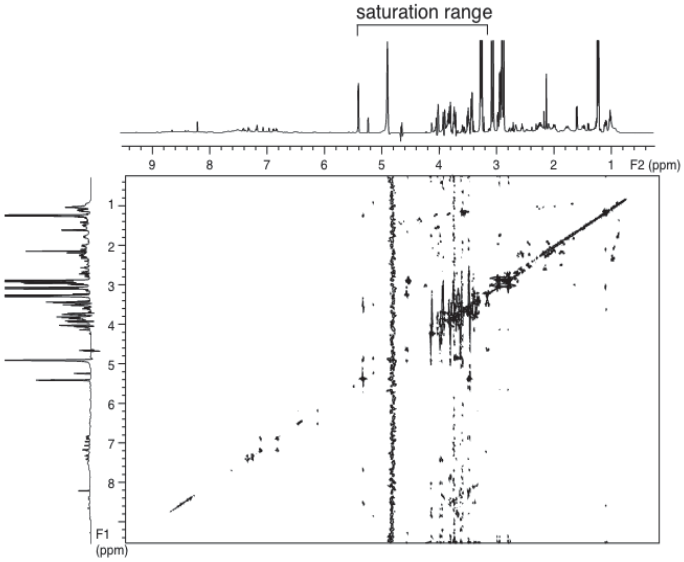


Fig.5 BBSAT-DQF-COSY spectra of pineapple fruit juice
F1x F2= 6700 x 6700 Hz, point = 512 x 2048, scans = 128,
selective pulse=3.9 msec (E-BURB)

図 6 は BBSAT-DQCOSY の拡大スペクトルである。BBSAT-DQF-COSY スペクトルにおいて、軽水および糖のシグナルを非常に低く抑えることができ、微量成分のクロスピークをはっきりと観測できた。しかも F_2 軸の糖のようなシグナル強度の強い領域で、微量成分のクロスピークの観測が可能であることを示した。例えば、malic acid の 2.42---2.70---4.32ppm の cross peak, あるいは、γ-amino-butyric acid の 2.30---1.89---3.00ppm の cross peak を観測し、容易に帰属が可能であることが判明した。

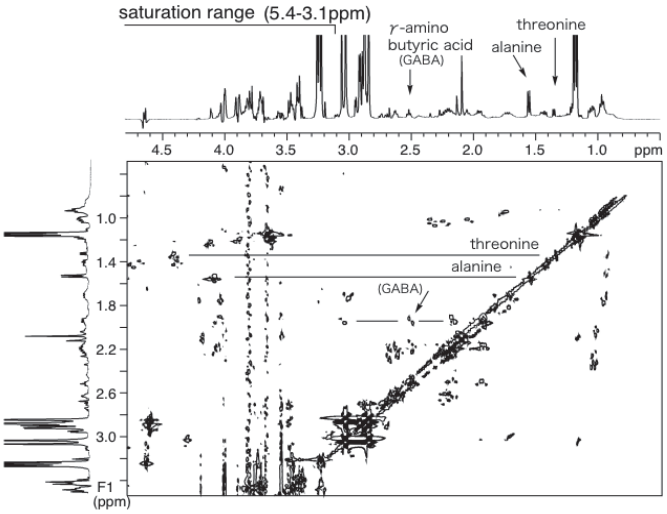


Fig.6 BBSAT-DQF-COSY(expand)spectra of pineapple fruit juice

まとめ

Pineapple のような食品の NMR スペクトルの特徴は軽水と糖のシグナルが強く観測される。このシグナルを如何に小さく押さえて測定できるかが問題であった。BB-SAT-1D 法では、軽水と糖のシグナルを低く抑え、微量成分の観測を容易にした。また、Receiver GAIN を高め、S/N の良いスペクトルを得ることができた。また、pineapple のような水と糖のシグナルの強いスペクトルでは、水と糖を saturation して、DQF-COSY 法を測定することは困難であった。この問題は BB-SAT-DQF-COSY 法により解決され、食品の微量成分の DQF-COSY スペクトルを観測することができることを示された。

1). K. Furihata, J. Zhang, M. Koda, T. Miyakawa and M. Tanokura: *Magn. Reson. Chem.* 2014, 52, 333-338

2). S.H.Smallcome, S. L. Patt and P.A. Keifer: *J. Magn. Reson.*, A 117, 295-303(1995)

3). H.Green and R.Freeman. *J. Magn. Reson.* 93,93(1991)

P41

^{1}H NMRによるポリブチレンサクシネート環状オリゴマーの重合度別シグナル分離

○松原康史，美濃公子
三菱化学株式会社　開発研究所

Size-Dependent Signal Separation in ^{1}H NMR Spectrum of Poly(butylene succinate) Cyclic Oligomer

○Koshi Matsubara and Kimiko Mino
R&D Center, Mitsubishi Chemical Corporation

^{1}H NMR signals of succinate units of cyclic oligomers extracted from poly(butylene succinate) showed a size-dependent separation up to octamer when pyridine-d_5 was used as a solvent. The chemical shift of the succinate unit of cyclic dimer was 0.06 ppm lower than that of linear poly(butylene succinate). The signal of cyclic oligomers shifted to higher frequencies with an increase in the degree of polymerization and finally coalesced with the signal of the polymer. Because the signals were poorly separated in some non-aromatic solvents, the size-dependent separation in pyridine-d_5 was ascribed mainly to the ring-current effect of the aromatic ring. The composition of the cyclic oligomers up to octamer could be obtained from the ^{1}H NMR spectrum, and this method was easy to perform and was at least in principle accurate.

序論　ポリブチレンサクシネートは生分解性の脂肪族ポリエステルである。ポリブチレンサクシネートの低分子量成分であるオリゴマーは成形品の表面に滲出して、外観不良やベタツキの原因となったり、高分子合成の原料として利用されたりする。オリゴマーの化学構造をNMRで解析した際、重ピリジンで測定した^{1}H NMRスペクトルではFig.1に示すブチレンサクシネート環状オリゴマーのコハク酸部分のシグナルが重合度に応じて分離することに気付いた。微細な化学構造の差を判別する現在のNMRの性能を示す一例として、この^{1}H NMRスペクトルを紹介する。

方法　ポリブチレンサクシネートをクロロホルムに溶解し、その溶液にエタノール水溶液を加えることにより、高分子量成分を沈殿させた。沈殿物をろ別し、ろ液を乾燥して、ブチレンサクシネートの環状オリゴマーを得た。種々の重水素化溶媒で環状オリゴマーの^{1}H NMRスペクトルを測定した。帰属の妥当性を確認するために、重ピリジン溶媒で環状オリゴマーのDOSYスペクトルを測定した。環状2量体のコハク酸部分のシグナルを2.70ppmとした。

結果と考察　Fig.2に示すように重ピリジンを溶媒として測定したブチレンサクシネート環状オリゴマーの^{1}H NMRスペクトルはコハク酸部分のシグナルが重合度に応じて分離した。環状単量体の微小なシグナルは2.57ppmに検出された。環状2量体のシグナルは2.70ppmであり、環状オリゴマーのシグナルは、重合度が高くなるほど高周波数側にシフトし、直鎖状高分子のシグナル2.76ppmに接近・融合した。400MHz装置では環状7量体までのピークトップが分離し、950MHz装置では環状8量体までのピークトップが分離した。環状7量体と8量体の化学構造の差はわずかであり、このスペクトルは^{1}H NMR化学シフトの化学構造変化に対する鋭敏さを示している。

オリゴマー，ポリブチレンサクシネート

○まつばらこうし，みのうきみこ

一方、重クロロホルム、重アセトニトリル、重アセトン、重THFで測定した^{1}H NMRスペクトルでは重合度に応じたシグナル分離の程度は重ピリジンの場合より小さかった。たとえば、重クロロホルムでは環状4量体以上のシグナルは分離しなかった。また、環状オリゴマーの化学シフトは、重合度が高くなるほど低周波数側にシフトした。

重ピリジンの場合と類似した重合度に応じたコハク酸部分のシグナルの分離は、重トルエンや重オルトジクロロベンゼンでも観測された。上述のように非芳香族溶媒ではシグナルが十分に分離しなかったので、重合度に応じたシグナル分離の主な原因は溶媒の芳香環による環電流効果と推定した。環状オリゴマーの環内への溶媒のアクセスのしやすさと、コハク酸水素に対する芳香環の平均配向度が関与している可能性がある。

ブチレンサクシネート環状オリゴマーの組成分析法を比較する。重ピリジンで測定した^{1}H NMRスペクトルから8量体までのブチレンサクシネート環状オリゴマーの組成を得ることができる。この方法は簡便で原理的には正確という特徴を有する。^{13}C NMRでもシグナルは分離するが、定量性を担保するためには注意深い測定条件の設定が必要であり、また、感度が劣る。高速液体クロマトグラフィーはNMRより分離能に優れるが、定量性の高い検出器と検量のための標品の準備という課題を有する。ガスクロマトグラフィーは揮発性の低いオリゴマーには適用できないという制限がある。

謝辞　本研究の一部は、文部科学省先端研究基盤共用・プラットフォーム形成事業の補助により、大阪大学蛋白質研究所で実施された。

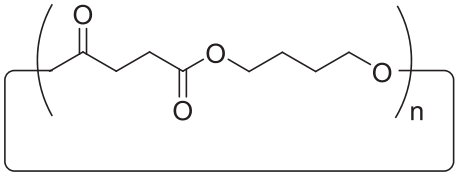


Fig. 1.　Chemical structure of poly(butylene succinate) cyclic oligomer.

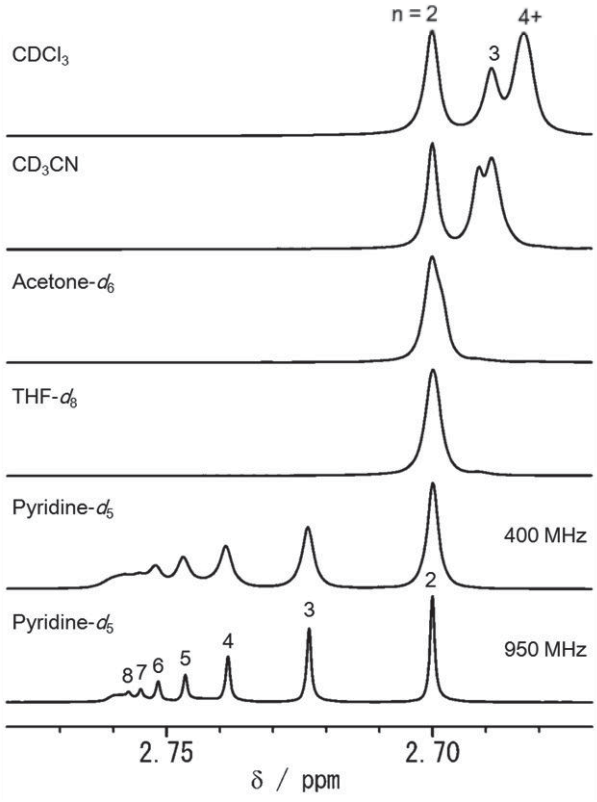


Fig. 2. ^{1}H NMR spectra of poly(butylene succinate) cyclic oligomer measured in $CDCl_3$, CD_3CN, acetone-d_6, THF-d_8, and pyridine-d_5. The succinate proton region was expanded. The bottom spectrum was measured at 950 MHz, and the other spectra were measured at 400 MHz. The largest signal in each spectrum, which was assigned to cyclic dimer/unresolved cyclic dimer, was set to 2.70 ppm. The number on a peak top indicates the degree of polymerization.

P42

プロトプラストの再生細胞壁多糖構成の^{1}H-NMRによる分析

○関屋　大輔[1]，内金崎　大己[2]，飯野　正昭[2]
[1]千葉工業大学大学院・工学研究科・生命環境科学専攻
[2]千葉工業大学・工学部・生命環境科学科

^{1}H-NMR analyses of polysaccharide components in regenerated cell wall of protoplast

○Daisuke Sekiya[1], Taiki Uchikanezaki[2], and Masaaki Iino[2]
[1]*Dept.Life & Environ.Sci., Grad. Sch.Eng., Chiba Inst.Tech.*
[2]*Dept. Life & Environ. Faculty Eng., Chiba Inst. Tech..*

The changes in the polysaccharide components in the regenerated cell wall of protoplast under hormonal chemical stress and physical stress were analyzed by means of ^{1}H-NMR. The NMR spectra of the degradation products obtained by decomposer cellulolytic enzymes from polysaccharides in the regenerated cell walls were measured and compared from those of decomposer obtained from polysaccharide chemicals purchased from Sigma. From the spectral comparisons, there were marked changes in the ratio of β1,3-glucan to β1,4-glucan (cellulose) in the polysaccharides in the regenerated cell walls depending on the stresses.

序論

植物細胞と動物細胞には様々な異なる点が存在し、その一つに細胞壁が挙げられる。植物細胞壁を構成するものは単糖が線状に結合したものや、多様な高分子成分である。
植物細胞を酵素処理し、細胞壁を除去したプロトプラストを再生させる過程でストレスに曝露された細胞から生成された再生細胞壁は物性が変化することなどが報告されている。
細胞壁は一種の物理ゲルと見なせるので、その物性変化は自己組織的生成過程に強く依存すると考えられ、原因については分子の配向性や成分変化などが推定される。

多糖の成分分析の方法として、単糖に分解して構成比から推定する手法では、結合様式の違いが不明である。多糖かつ単鎖のままでも精製されていれば、多次元 NMR により構造解析が可能であるが、細胞壁では多くの多糖を含むうえ、単鎖でなく分岐していることが多く、このような場合、この方法は非現実的である。

本研究では成分変化に注目し、細胞壁の主成分である糖鎖の分析を試みた。しかし、成熟細胞の細胞壁と比較すると数%程しか再生されていない再生細胞壁においても分析可能な方法が要求され、高感度の測定方法で測定する必要がある。本研究では^{1}H-NMRによる分析法を用いて再生細胞壁の多糖分子をノンストレス下で再生させたものとストレス下で再生させたものの多糖分子の割合を求め、再生細胞壁の多糖分子の比率を求め、比較することを目的とした

方法

ニチニチソウ培養細胞を高張液下で原形質分離させ、その後Cellulase”Onozuka”とMacerozymeによるセルラーゼ酵素液を用いてプロトプラストに調整した。このプロトプラストをストレス無しの条件下で

Regenerative cell wall, ^{1}H-NMR, polysaccharide

○せきやだいすけ，うちかねざきたいき，いいのまさあき

再生させた試料と流動場ストレス（20,30,40 1/sec）と植物ホルモン（Benzyladenine,Naphthylacetic Acid）ストレス下で再生させた試料を作成した。その後、重水で洗浄を行い、軽水を重水に置換した。置換後、分解酵素を用いて分解し、試料とした。得られた試料に基準物質である3-(Trimethylsilyl)-1-propanesulfonic acid sodium salt(DSS)を添加し、^{1}H-NMRで測定した。細胞壁に含まれていると考えられる多糖分子試薬についても同様に分解酵素処理などを行い、測定した。ニチニチソウ培養細胞の再生細胞壁のスペクトルと多糖分解溶液のスペクトルを比較し、再生細胞壁に含まれている多糖を検討した。ケミカルシフトが一致した多糖分子溶液のある部分のピークの積分値をaとし、そこに細胞壁に含まれる多糖分子の量をｙ、aと同じ部分の再生細胞壁分解溶液のピークの積分値をxとした。それぞれ一致したピークについて考え、行列式を作成した。多糖量はay=xから変形し$y=a^{-1}x$として、aの逆行列a^{-1}を用いて求めた。求めた多糖量から細胞壁中に含まれる多糖分子の構成比率を算出し、結果を比較した。

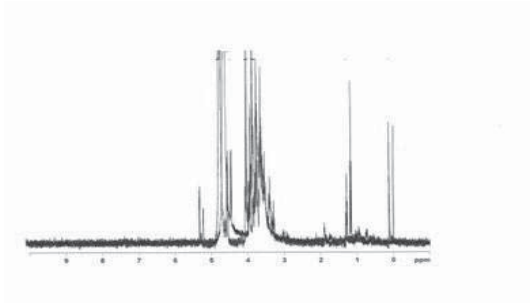


Fig.1 Spectral comparison of the regenerated cell walls and polysaccharide chemicals.

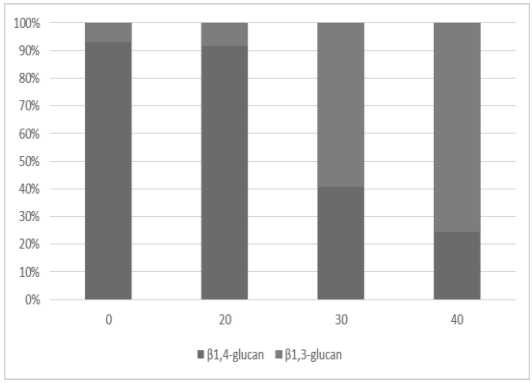


Fig.2 Percentage of cellulose in regenerated cell wall under physical stress.

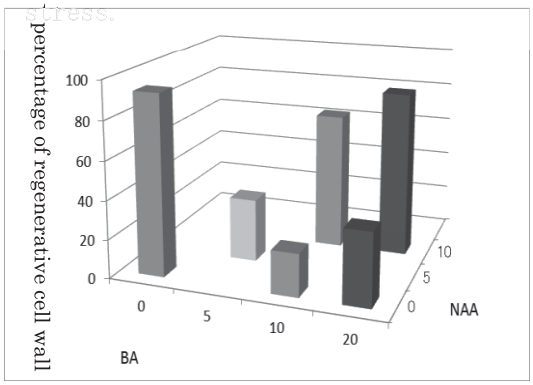


Fig.3 Percentage of cellulose in regenerative cell wall under plant hormone stress.

結果

^{1}H-NMRにより測定した再生細胞壁のスペクトルと同様に酵素処理をした多糖分子溶液のスペクトルを重ね合わせ比較した結果、β1,4-glucanとβ1,3-glucanの多糖分子溶液のケミカルシフトが一致した。（Fig.１）細胞壁に含まれていると考えられるβ1,4-glucanとβ1,3-glucanの各ピークの積分値を算出し、比較して細胞壁に含まれていると考えられるβ1,4-glucanとβ1,3-glucanの構成比率を求めた。ノンストレスで再生させた際の構成比率はβ1,4-glucan 93.2%β1,3-glucan 6.8%という結果だった。

流動場ストレス下ではそれぞれβ1,4-glucan, β1,3-glucanの比率が20で91.5,8.5、30で40.8,59.2、40で24.5,75.5となった。（Fig.2）植物ホルモン下ではそれぞれBA5ppm:NAA5ppm 32.4,67.6、BA10:NAA0 22,78、BA10:NAA10 70.5,29.5、BA20:NAA0 37.5,62.5、BA20:NAA10 85.3,14.7となった。（Fig.3）

考察

流動場ストレス下では、速度が速くなるほどβ1,4-glucanの比率が減少しており、植物ホルモンストレス下ではBAとNAAの存在によって構成比率が大きく変化している。このことからストレス下で再生させると再生細胞壁の構成多糖には変化が生じていると考えられる。物理ストレス下で細胞壁を再生させると、物性が変化することが報告されており、この結果から細胞壁の物性変化の原因の一つとして構成多糖の成分変化が示唆された

P43

適したNMR計測法の選択に基づく多様な水産資源評価

○福地実[1]，朝倉大河[1,2]，坂田研二[2]，伊達康博[1,2]，菊地淳[1,2,3]
[1]横市院生命医，[2]理研CSRS，[3]名大院生命農

Evaluation of diverse marine resources by suitable NMR measurement method

○Minoru Fukuchi[1], Taiga Asakura[1,2], Kenji Sakata[2], Yasuhiro Date[1,2] and Jun Kikuchi[1,2,3]
[1]*Graduate School of Medical Life Science, Yokohama City University*
[2]*RIKEN Center for Sustainable Resource Science*
[3]*Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University*

Japan has abundant marine resources, therefore its analytical evaluation could be contributed for quality control, resource evaluation and environmental assessment. We have challenged metabolic profiling of over 150 fish species living in Japan. To do this, we investigated measurement parameters of aqueous-extracted fish muscles using several NMR pulse sequences. Namely, the 2D-J with non-uniform sampling (NUS) seems to be good performance in terms of relatively high-resolution per acquisition time, possibly enabling over 1000 fish measurements. Combined use of 2D-J and HSQC-TOCSY spectra were useful to assign major metabolites in fish muscles, thus those information may be utilized to explore metabolic biomarker among a wide variety of fishes.

【背景・目的】

日本の国有面積は世界第61位であるのに対し、領海や排他的経済水域の広さは世界第6位であり、豊富な水産資源を有している。これら水産資源の一部は食糧などの形で利用され、養殖技術が確立されているものもあるが、一方で市場に出回っている水産物以外にも日本には多くの未利用水産資源がある。これらの未利用水産資源には多種多様な魚類が含まれているものの、その水産資源としての価値はほとんど評価されていないのが現状である。この多様性豊かな水圏資源に対し、我々はNMR法を基軸とした環境資源評価法の構築を始動している[1-3]。そこで本研究では、生息域等の異なる多種多様な魚類に注目し、魚種の多様性とそれらが代謝した化学プロファイルの多様性を、NMR計測の工夫とデータ駆動型アプローチにより比較・解析することを目的とした。

【方法】

本研究では150種、総計1000個体以上のビッグデータ収集を目指している。この多検体計測の観点から、計測のスループット性は重要課題であるため、4魚種を対象にNUSによる2D-J測定時間の短縮検討を行った。また、ビッグデータ解析の結果を考察するためには代謝物同定が鍵となるため、2D-Jのデータ解析にはSpinCouple、HSQCおよびHSQC-TOCSY等の解析にはSpinAssignと、共に当研究室で開発しているwebツールを駆使した。

【結果・考察】

水溶性抽出物は蛋白質の可溶化量が多く、代謝プロファイリングで頻繁に用いられる1D-NOESYやWatergate法では残存蛋白質がシグナル分離を難しくした。低分子の選択的計測にはCPMG法が一般的に用いられるものの、NUS法を利用した2D-J計測であれば、短時間で高分解能

データ駆動型アプローチ、不均一サンプリング、代謝プロファイリング

○ふくちみのる、あさくらたいが、さかたけんじ、だてやすひろ、きくちじゅん

かつ当研究室開発のSpinCoupleツールによる物質同定や絶対定量が可能になることに着目した。NUSのサンプリングスケジュールを12.5, 25, 50%とした2D-Jと、通常の100%ポイント数で計測した2D-Jシグナルの強度を比較すると、25%までのポイント数削減で高速計測が可能になることを確認した (Fig. 1)。さらに、今後1000個体のビッグデータ解析に挑戦するにあたり、物質同定が不可欠なステップとなるため2D-JとHSQC-TOCSYを組み合わせたシグナル帰属も遂行した (Fig. 2)。

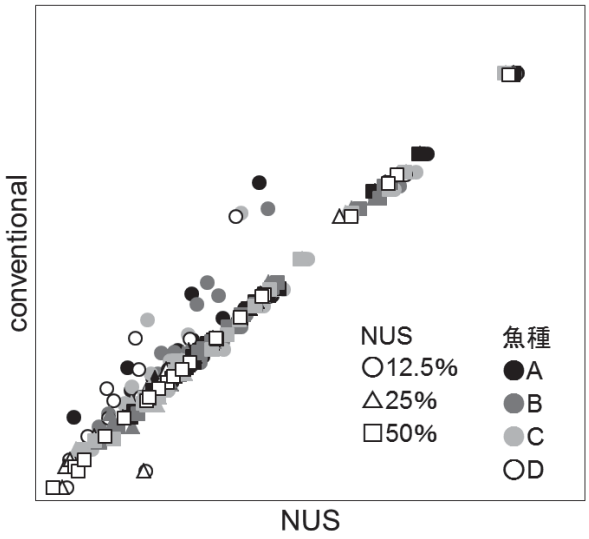


Fig. 1 Evaluation of measurement time by NUS in 2D-J spectra.

今後は魚種多様性（ビッグデータ）に適応できるような解析手法が重要となる。そのため、各水産物の生息域や属性の違いをデータ駆動型アプローチにより特徴づけ、これらの代謝プロファイルへの影響を詳細に評価していくとともに、多様な水産資源を標的として解析した最新の知見についても本会で議論したい。

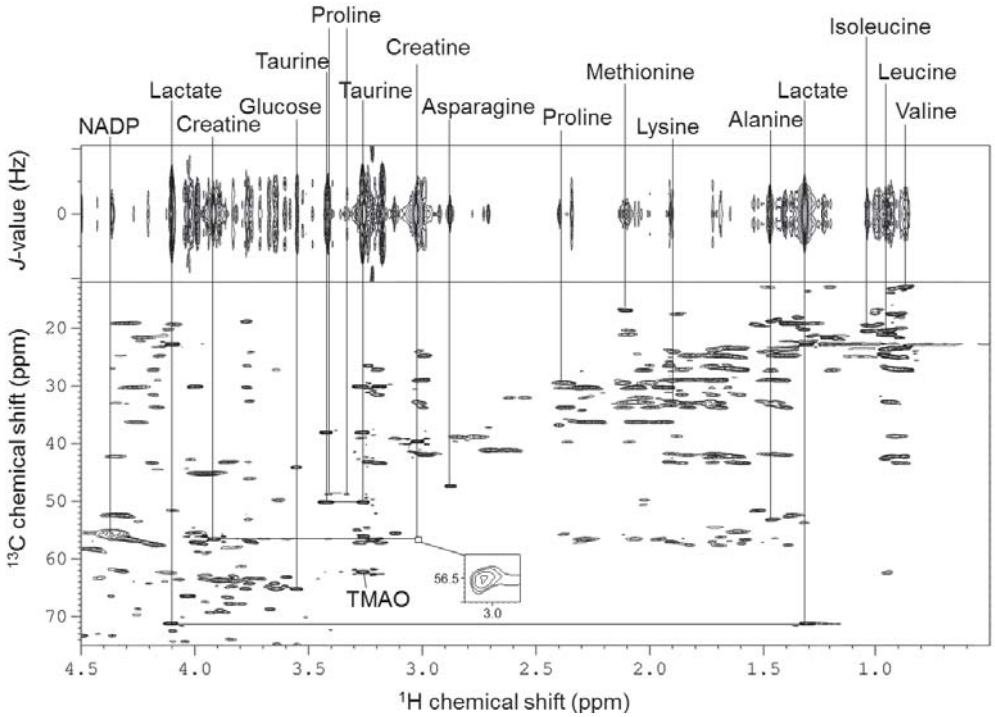


Fig. 2 Metabolite assignments of fish extracts by combined use of 2D-J (top) and ^{1}H-^{13}C HSQC-TOCSY (bottom) spectra.

参考文献

[1] Asakura, T., Date, Y. and Kikuchi, J. (2014) *Anal. Chem.* **86**, 5425-5432.

[2] Ito, K., Sakata, K., Date, Y. and Kikuchi, J. (2014) *Anal. Chem.* **86**, 1098-1105.

[3] Asakura, T., Sakata, K., Yoshida, S., Date, Y. and Kikuchi, J. (2014) *PeerJ* **2,** 550.

P44

代謝物シグナル帰属支援を目指した構造･化学シフト相関解析の試み

○尾渕由佳[1]，小松功典[1,2]，菊地淳[1,2,3]
[1]横市大院・生命医，[2]理研環境資源，[3]名大院・生命農

Investigation of structure·chemical shift relationship for supportive assignment of metabolite signals

○Yuka Obuchi [1], Takanori Komatsu [1,2], and Jun Kikuchi [1,2,3]
[1]Grad.Sch.Medical Life Science.,Yokohama City Univ., Japan.,[2]RIKEN CSRS,Japan.,
[3]Grad.Sch.Bioagri.,Nagoya Univ.,Japan.

Metabolite identifications is still challenging process in the NMR analyses of biomolecular mixture. Theoretical chemical shift calculations can potentially assist this problem, whereas accuracy in the calculation is not enough to identify metabolites in present techniques. In the present study, we compare experimental chemical shift with theoretical chemical shifts over thirty metabolites in solution state, as well as solid state in order to address structure･chemical shift relationship. Chemical shift differences in solution and solid state indicated conformational difference in each state. In addition, we have discussed molecular structure generated quantum chemical calculation of solution state from the results of the comparison of calculated theoretical chemical shift and measurement chemical shift.

【序論】

生体試料や食品等の代謝混合物のNMR解析において、代謝物シグナルの帰属および未帰属シグナルからの未知物質同定は重要課題である。その帰属候補となる代謝物構造さえ与えられれば、量子化学計算を中心とする理論計算によりシグナル帰属支援が可能となる。しかしながら現実には、理論化学シフト計算の精度は、代謝物シグナル帰属支援には不十分である。

本研究では、立体構造が固定化された微結晶での固体NMRの化学シフトと、溶液中で複数配座が時間平均として観測される溶液NMR化学シフトとを比較し、構造と化学シフトの関係性を探った。さらに、第一原理量子化学計算に基づき代謝物の化学シフトを算出し、実測値との比較から計算値において誤差が大きい分子構造を特定した。特定した問題を解決することで計算精度の向上が期待できる。

【方法】

固体NMRは、共鳴周波数500MHzのNMR装置（BRUKER社）および1.3 mm MASプローブを用いて計測した。^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, ^{13}C-^{13}C INADEQUATE, ^{1}H-^{13}C double-CP, および^{1}H-^{1}H SQ/DQで測定し、固体状態での化学シフトを帰属した。溶液状態での実測化学シフトは、BMRB (http://www.bmrb.wisc.edu/metabolomics/) または、HMDB (http://www.hmdb.ca/) に収録された値を用いた。溶液状態における化学シフトの計算値は、spartan '14 (Wavefunction社) を用いて算出した。まず、分子力学法 (MMFF) によって配座解析解析をおこない、つぎに、密度汎関数法 (BY3LP/6-31G*) によって構造最適化をおこない、最後に構造最適化と同一理論で化学シフトの計算をおこなった。得られた各配座の化学シフトは、ボルツマン分布で重みづけをおこない、それを計算化学シフトとした。

固体プロトン検出法，量子化学計算，スケーリングファクター

○おぶちゆか，こまつたかのり，きくちじゅん

【結果および考察】

例としてL-Isoleucineの帰属をFig. 1に示す。他のサンプルも同様に帰属をおこない、それらの化学シフトを溶液状態における化学シフトと比較した（Fig. 2）。結晶状態と溶液状態の化学シフトの平均二乗誤差（RMSE）は0.015～4.7 ppmの間の値をとり完全には一致しない。これは、溶媒効果なども含まれるが，溶液および固体状態で代謝産物の取りうる構造が異なることを示唆している。したがって、単純に結晶配座を用いて化学シフト計算をしても溶液状態の化学シフトを予測することは困難であると考えられる。そのため、溶液NMRの計算では、ボルツマン分布による配座分布を考慮することとした。溶液NMRにおける実測および計算化学シフトの比較をFig. 3に示す。代謝物によっては、18.74 ppm程度の実測化学シフトと誤差がみられた。また^{1}HのRMSEは0.046～0.51 ppmの間に収まったが、^{13}CのRMSEはpyruvic acidは29.67、oxalic acidは18.11 ppmと誤差が生じ、C＝Oにおける化学シフトが10 ppm以上の誤差があった。この点については真空中での化学シフト計算では、酸素の電子吸引性が正しく評価されていないことが考えられる。この問題を追及することによって、計算精度の向上、ひいては、代謝物の帰属支援につなげていきたいと考えている。

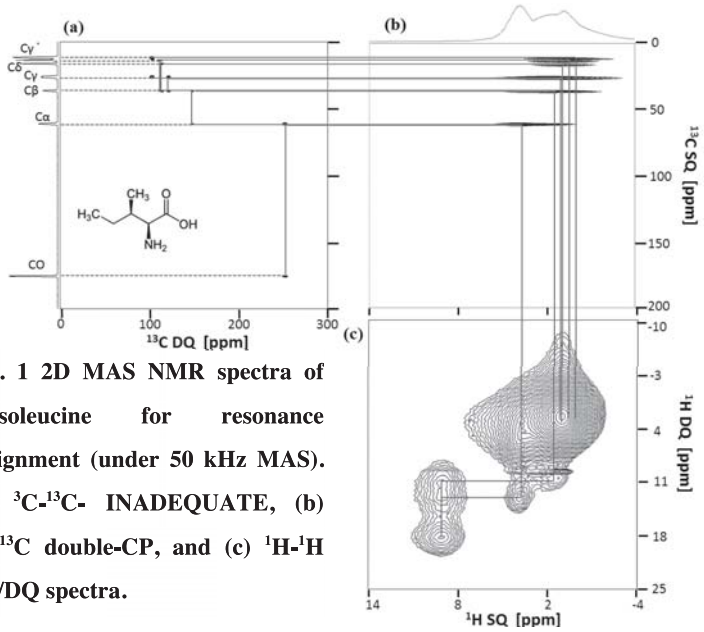


Fig. 1 2D MAS NMR spectra of L-Isoleucine for resonance assignment (under 50 kHz MAS). (a) ^{3}C-^{13}C- INADEQUATE, (b) ^{1}H-^{13}C double-CP, and (c) ^{1}H-^{1}H SQ/DQ spectra.

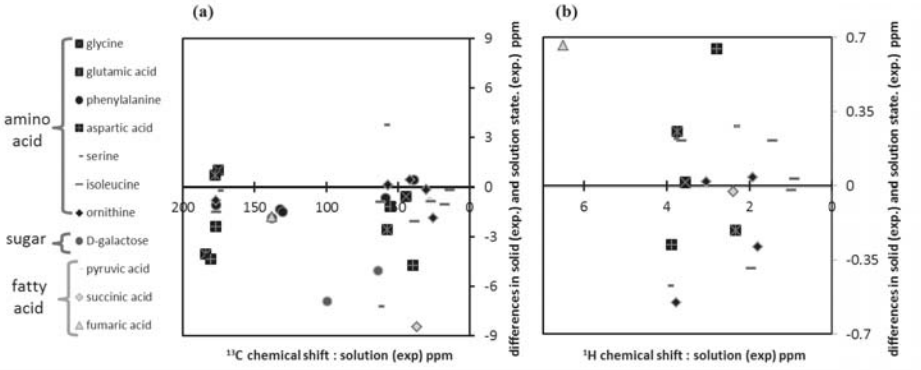


Fig. 2 Chemical shift differences in solid (exp.) and solution state. (exp.) (a) ^{13}C and (b) ^{1}H.

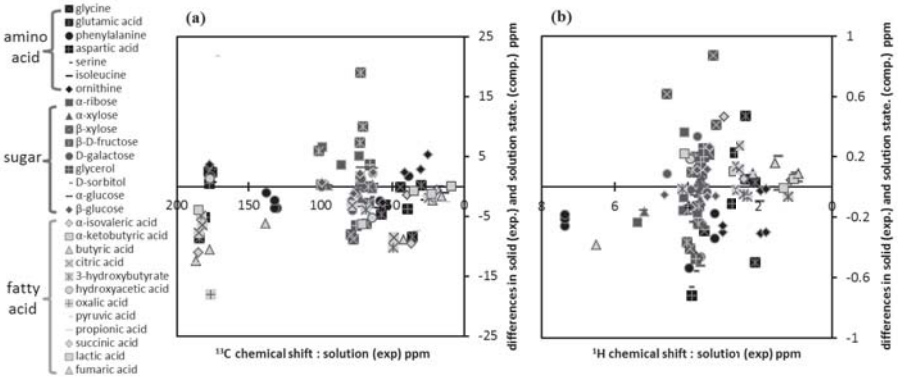


Fig. 3 Differences in experimental and theoretical chemical shifts. (a) ^{13}C and (b) ^{1}H.

P45

NMR法によるイオン液体ガラス転移温度降下メカニズムの研究

○鄭　智海[1]，桑原　大介[2]，持田　智行[3]
[1]電通大　情報理工学研究科, [2]電通大　研究設備センター
[3]神戸大　大学院理学研究科

NMR study of the mechanism for ionic liquids glass transition temperature drop

○ChiKai Tei[1], Daisuke Kuwahara[2], and Tomoyuki Mochida[3]
[1]*Faculty of Informatics and Engineering, UEC (The University of Electron-Communications)*
[2]*Coodinated Center for UEC Research Facilities, UEC*
[3]*Department of Chemistry, Kobe University*

The ionic liquid has been researched in recent years. Mochida et al. have also done it for years. However, the reason of the glass transition temperature drop of ionic liquid has not been resolved yet. Focusing in alkylating metallocene ionic liquid, we used liquid and solid state NMR to reveal the mechanism of its temperature drop. Our both sample include alkylation. Whereas the difference of molecular structures is very small, one is -39℃, the other is -82℃. We measured the cation parts to clarify the problem and it was not totally success. Consequently, we need to measure the anion parts to disclose the mechanism. Thus, we are currently measuring the ^{19}Fluorine (major components of the anion parts) to uncover the mechanism. Using the data of static structure, relaxation time, dynamics, and diffusion constant, we will solve it.

〈序論〉

イオン液体とは、カチオンとアニオンの組み合わせからなる低融点の塩であり、機能性液体として注目されている。我々の共同研究者である神戸大学の持田研究室はアルキルメタロセン類をカチオンとするイオン液体の開発を行ってきた。この種のイオン液体は金属を含む新しい機能性液体であり、磁場配向現象に基づく磁気転換現象や配位子交換反応による相変化などの特徴を示す。応用例としては、磁性流体、磁気記録媒体、電解液、酸化還元発色剤、触媒などである。しかし、骨格にアルキル基を持つメタロセンイオン液体はガラス転位温度が低い。類似構造を持つイオン液体でも液体と固液中間状態に物性が分かれる。すなわち、ガラス転位温度の降下および粘性の相違メカニズムはまだ解明されていない。そこで我々はこの種のイオン液体のガラス転位温度および粘性の相違メカニズムを解明する。固液中間状態のイオン液体については従来の NMR 測定手法では磁化移動が起こらないので、新たな測定手法を開発する。研究成果をもって機能性アルキルメタロセンをより低温で溶液状態とすることにつなげたい。



Fig.1CPRu_butyl_FSA: Sample A

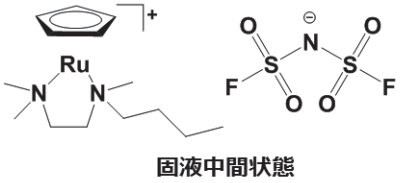


Fig.2 [CpRu(BuMe3en)]FSA: Sample B

イオン液体　ガラス転移温度、拡散係数
○てい　ちかい、くわはら　だいすけ、もちだ　ともゆき

<方法>

固体および溶液NMR手法を駆使し、さらに新規に開発した磁化移動の手法で測定し、ガラス転位温度降下および粘性の相違メカニズムを解明する。(^{1}H,^{13}C,^{19}F 一次元スペクトル、交差分極測定、拡散係数測定、緩和時間温度依存測定、異種核NOE及び新規に開発した磁化移動法)。
研究に用いた装置は、Tecmag社Apollo分光計 (300MHz,Doty MAS 4mm プローブ)、
日本電子ECA-500(500MHz,溶液プローブ)。

<結果>

サンプルについて基本的なSP/MAS測定とT1測定を行った。1,2,3,4級炭素は、磁化移動(DEPT)測定で分離した。C-H 相関NMR(C-H COSY)とCP/MAS測定で液体か固液中間状態かを調べ、液体状態のサンプルAについてはアニオンパートを除くすべてのサイトの帰属を決定した。固液中間状態のサンプルBについても同じような測定を行ったが、得られた情報はどのサイトが液体状態、どのサイトが非溶液状態かだけであった。また拡散係数測定では300Kにおけるサンプル A の ^{1}H 五員環(カチオン部分)は $2.04*10^{-11}[m^2/s]$,ベンゼン環が $8.15*10^{-11}[m^2/s]$ で、^{19}F FSA (アニオン部分)は $2.04*10^{-11}[m^2/s]$ であった。一方サンプルBの拡散係数はスピンエコー信号が減衰磁場勾配0.3[T/m](装置最高性能)にしても減衰しないため、測定できなかった。よってこちらのサンプルの粘性はサンプルAをはるかに超えていると推定できる。

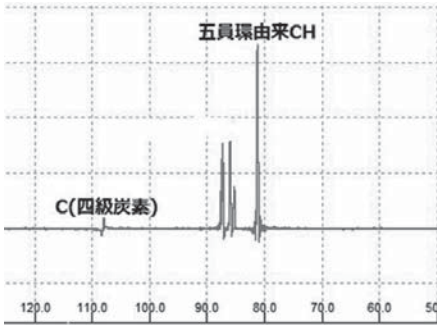


Fig. 2 DEPT spectrum for Sample A

<考察>

サンプル	室温状態	カチオン運動	アニオン運動	拡散定数	分子全体の運動
CPRu_butyl_FSA: Sample A	液体	等方的な並進、回転	?	五員環 $1.20*10^{-11}[m^{-11}/s]$ ベンゼン環 $8.15*10^{-11}[m^2/s]$ FSA $2.04*10^{-11}[m^2/s]$	?
[CpRu(BuMe$_3$en)]FSA: Sample B	固液中間状態	一部のメチル基が回転	?	?>> CPRu_butyl_FSA	?

自己拡散係数およびT2時間から、固液中間状態のイオン液体サンプルBはあまり並進・回転運動が活発でなく、固体のように配向性を有していると考えられる。一方溶液のような振る舞いを見せるサンプルAのほうは、すべての部分が等方的な並進・回転運動していると考えられる。よってガラス転移温度の相違は、カチオンとアニオン部分の分子間距離に依存しているのではないかと推測している。これからは主な緩和機構を計算機シミュレーションで明らかにし、また異核種間NOEでカチオンーアニオン間距離の相違を探ることに注力する。

[1] A. Komurasaki, Y.Funasako, and T. Mochida, Dalton Trans., 2015, 44, 7595-7605

P46

代謝混合物のフラグメント集積法による構造生成とその理論化学シフト・スピン結合定数の評価

○伊藤研悟[1,2]，小松功典[1,2]，伊達康博[1,2]，菊地淳[1,2,3]
[1]横市院生命医　[2]理研CSRS　[3]名大院生命農

Structure construction in metabolic mixtures by fragment-assembly approach and evaluation of its theoretical chemical shifts and spin-spin coupling constants

○Kengo Ito[1,2], Takanori Komatsu[1,2], Yasuhiro Date[1,2] and Jun Kikuchi[1,2,3]
[1]Yokohama City Univ., Kanagawa, Japan., [2]RIKEN CSRS, Kanagawa, Japan.,
[3]Nagoya Univ., Aichi, Japan.

Abundant fragment information for metabolites in molecular crowded states is a major advantage of NMR analysis. Thus, development of a new technique for NMR signal assignments and metabolite identification may open a new avenue for exploring molecular complexity such as biological extracts and tissues. We propose a new signal assignment approach for metabolite mixtures by assembling H–H, H–C, C–C, and C-(O)-C fragmental information obtained by multidimensional NMR, followed by application of graph and network theory. The assignment approach was performed for 12 standard mixtures, and all 12 metabolites were successfully identified by combined use of ^{13}C labeling with complete automatic signal assignments by the newly developed fragment-assembly approach. By application of this approach to ^{13}C-labeled biological extract, 19 metabolites were successfully assembled by automatic chain assignment. Validity of these assembled entire structures could be confirmed by quantum chemical calculations.

【背景・目的】

海藻類の構成成分は食品、工業製品や医薬品等に幅広く利用されており、産業的価値は極めて高いと考えられる。しかし、海藻類には評価されていない構成成分が多数存在し、海藻類の構成成分を網羅的かつ高感度に検出可能な計測技術高度化が望まれている[1-3]。このような計測技術高度化において、安定同位体標識技術を用いたNMR計測による代謝混合物群の網羅的な検出は有用な手法の一つである。また、不均一サンプリング（NUS; Non-Uniform Sampling）法が近年注目を浴びており、この技術を新規・既存のパルスシーケンスで設定することにより計測時間の大幅な短縮が可能となる。この様に、計測技術高度化により従来の手法では見られない代謝混合物群中の微量成分やマイナー構造のピークを検出することが可能になりつつあるが、複雑な代謝混合物のシグナルを帰属することは容易ではなく、従来の帰属手法に頼らない理論計算に基づく帰属方法の発展が期待されている[4]。そこで我々は、既知成分である^{13}C標準試料の混合物を作製し、NUS法を適用した多様なNMR計測法により代謝混合物群の網羅的な計測を行うと共に、相関シグナルの官能基結合情報に対してネットワーク理論に基づいた連鎖帰属により混合物ピーク群の分離およびクラスタ化、グラフ同型理論に基づいた解析により経験的構造予測を行った。また、混合物ピーク群の分離はDOSYスペクトルも用いて評価を行った。さらに、化学シフトおよびスピン結合定数の理論値を用いて推定構造の妥当性を検証し、帰属の可能性を検討した。また、海藻類の^{13}C標識サンプルを用いて同様のNMR計測・解析を行い、代謝混合物群の帰属を試みた。

量子化学計算、スピン結合定数、構造推定

○いとうけんご、こまつたかのり、だてやすひろ、きくちじゅん

【実験方法】

1. ^{13}C標準試料混合物および^{13}C標識海藻サンプルの作製

^{13}C標準試料混合物は、97～99%標識された12個の化合物をKPi/D_2O溶媒中で終濃度1mMとなるように調製した。また^{13}C標識海藻サンプルについては、緑藻類のヘライワズタ(*C. brachypus*)を対象に、$^{13}CO_2$を1Lマリンフラスコ及び60L水槽の海水に常時流入させ、光合成により$^{13}CO_2$を取り込ませることで作製した。^{13}C標識海藻サンプルは凍結乾燥後に粉末化し、メタノールで洗浄後、KPi/D_2O溶媒に溶け込ませ、NMR計測に供試した。また、同位体比計測の結果、NMR計測に使用した海藻の^{13}C標識率は約40%であった。

2. NUS法を適用したNMR計測およびデータ処理

NMR計測は、Bruker社の600MHz（TCIプローブ）にてH-H相関およびC-H相関、500MHz（DCHプローブ）にてC-C相関を検出するパルスプログラムを用いた。また、ピークがオーバーラップする成分があり、高分解なスペクトルを得る必要があったため、各パルスプログラムにコンスタントタイム法を適用し、Bruker社の700MHz（TCIプローブ）と600MHz（DCHプローブ）にて計測を行った。さらに、混合物のシグナルの分離及び分子量の推定を行うため、^{13}C INEPT-DOSYの計測を行い、また、化合物の構造情報を持つスピン結合定数を用いて評価を行うため、^{1}H-*J*res.,^{13}C-*J*res.および^{1}H-^{13}C CLIP/CLAP-HSQCの計測も行った。各パルスプログラムでは25～50%不均一サンプリングするように計測した。また、Topspin3.2上でCS法を用いて不連続データの再構築を行い、各計測の相関シグナルをピークピックし、グラフ同型理論に基づくネットワーク解析に供試した。DOSYスペクトルは非負値スパースコーディング法を用いて処理した。スピン結合定数は*J*res.およびCLAP-HSQCスペクトルのピークから算出し、理論値による評価に用いた。

3. フラグメント集積法による構造生成、理論化学シフト・スピン結合定数の評価

本研究ではR言語を用いてネットワーク化アルゴリズムの関数化を行った。作成したアルゴリズムを用いて、HSQCのC-H相関シグナルを基準とし、H-H相関およびC-C相関シグナルとのネットワーク理論に基づく解析を行い、化合物の骨格を決定した。また、多次元相関シグナルのネットワーク化により、混合物中における純成分をクラスタ化した。混合物の分離したピーク群を評価するためにDOSYスペクトルと比較した。クラスタ化したネットワークの各シグナルに対して当研究室で開発したSpinAssignツール[5]およびBMRB、HMDBのデータベース検索を行った。得られた化合物の部分構造をHOSEコード化し、レーベンシュタイン距離によるクラスタ解析およびJavaのCDKライブラリを用いて最大共通部分構造を導くことにより部分構造を予測した。さらに、部分構造を組み合わせることにより全体構造を推定した。推定構造の妥当性を検証するため、量子化学に基づく化学シフトおよびスピン結合定数の理論値を算出した。これらの計算では、理研のスーパーコンピュータHOKUSAIに実装されているGaussian09を用い、B3LYP-SCRF/6-311++G(d,p)レベルによって最適化し、化学シフトとスピン結合定数の理論値はGIAO法を用いて計算し、実験値と比較した。一連の解析スキームをFig.1に示す。

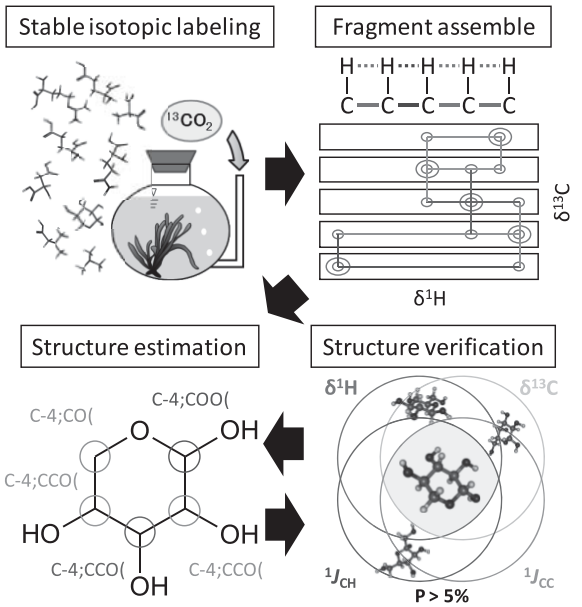


Fig.1 Concept for assignments of metabolic mixtures by NMR in this study.

【結果・考察】

1. ^{13}C標準試料混合物を用いたフラグメント集積法による構造生成および構造評価

相関シグナルの連鎖帰属は化合物の骨格を知ることが可能であるが、手動による複雑な混合物の連鎖帰属は困難であるため、ネットワーク理論に基づく自動連鎖帰属法を構築し、その有用性を検証した。^{13}C COSYにより4級炭素を含む隣接した炭素、^{1}H-^{13}C HSQCと^{1}H-^{13}C HSQC-TOCSYにより炭素に直接結合した水素と同一スピン系の水素が検出でき、これらのピークを連鎖帰属することにより混合物シグナルの分離と各成分の骨格構築が可能である。糖類の領域（δ^{1}H=3～5ppm、δ^{13}C=50～110ppm）は異なる糖類のシグナルがオーバーラップしているため、コンスタントタイム法を適用した高分解能スペクトルのピークを用いた自動連鎖帰属を行い、12標品全てのシグナルを成分ごとのピーク群に分離することが可能であった。完全な自動連鎖帰属を達成するためには高分解能のスペクトルが必要であるが、混合物のシグナル分離および帰属に有用であることが示唆された。また、これらのピーク群をDOSYスペクトルと比較した結果、同様の分離パターンが確認された。各化合物の構造を決定するため、分離されたピーク群の各ピークに対してデータベース検索を行い、得られた化合物群のピークに対する共通部分構造を抽出し、部分構造を組み合わせていくことにより代謝物の全体構造を推定することが可能である。例えば、2つのCHシグナルと1つのCCシグナルのピーク群では、それぞれ水酸基（δ^{1}H=3.97ppm、δ^{13}C=62.9ppm）、アミノ基（δ^{1}H=3.83ppm、δ^{13}C=59.0ppm）、カルボキシル基（δ^{13}C=175.1ppm）の部分構造が得られ、組み合わせることによりL-Serineの構造が得られる。推定構造の妥当性は化学シフト（δ^{1}H、δ^{13}C）およびスピン結合定数（$^{1}J_{CH}$、$^{1}J_{CC}$）の実測値と理論値を比較することにより検証した。化学シフト（δ^{1}H、δ^{13}C）およびスピン結合定数（$^{1}J_{CH}$）の理論値を用いた^{1}H-^{13}C CLAP-HSQCスペクトルは実測値と類似のスペクトルパターンが得られた（Fig.2）。また、これらの理論値は二乗平均平方根偏差（RMSD）と両側検定により評価した（Fig.3）。各理論値のRMSDの平均はそれぞれ0.32ppm（δ^{1}H）、6.94ppm（δ^{13}C）、7.32Hz（$^{1}J_{CH}$）および3.04Hz（$^{1}J_{CC}$）であった。理論化学およびスピン結合定数は実験値と高い線形性が認められ、ほぼ全ての理論値が採択域に入った。予測された全体構造が正しい化合物と異なっていた場合、構造情報を反映する理論化学シフトおよびスピン結合定数は実験値と異なるため、推定した全体構造の妥当性の評価に有効であると考えられた。

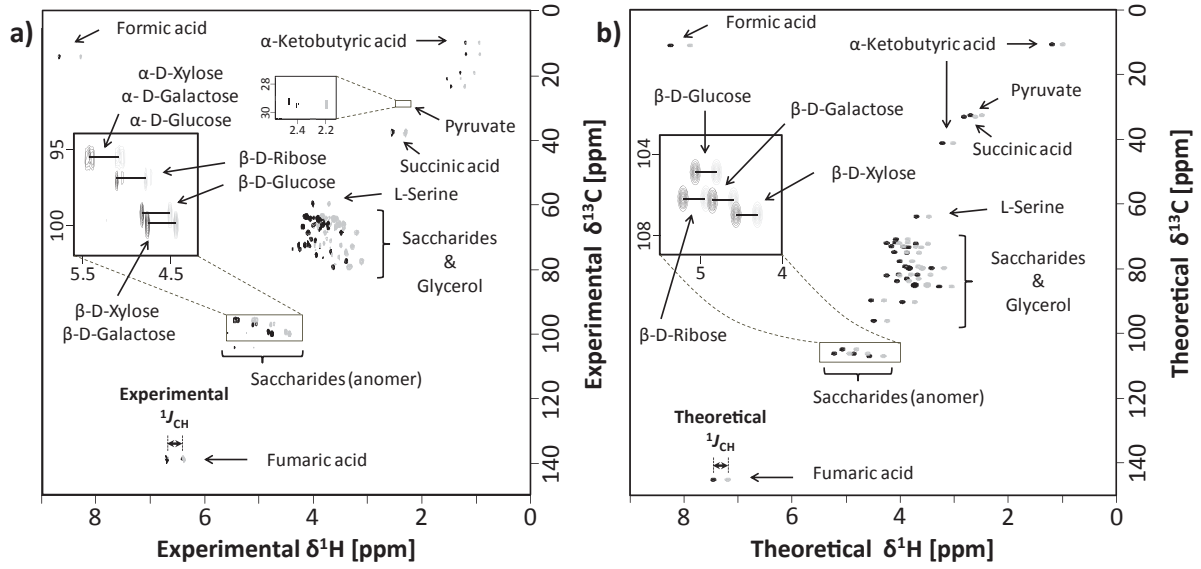


Fig.2 a) Experimental and b) theoretical ^{1}H-^{13}C CLAP-HSQC spectra in standard mixture. Black signals are positive, and gray signals are negative. The signal of Formic acid is fold back.

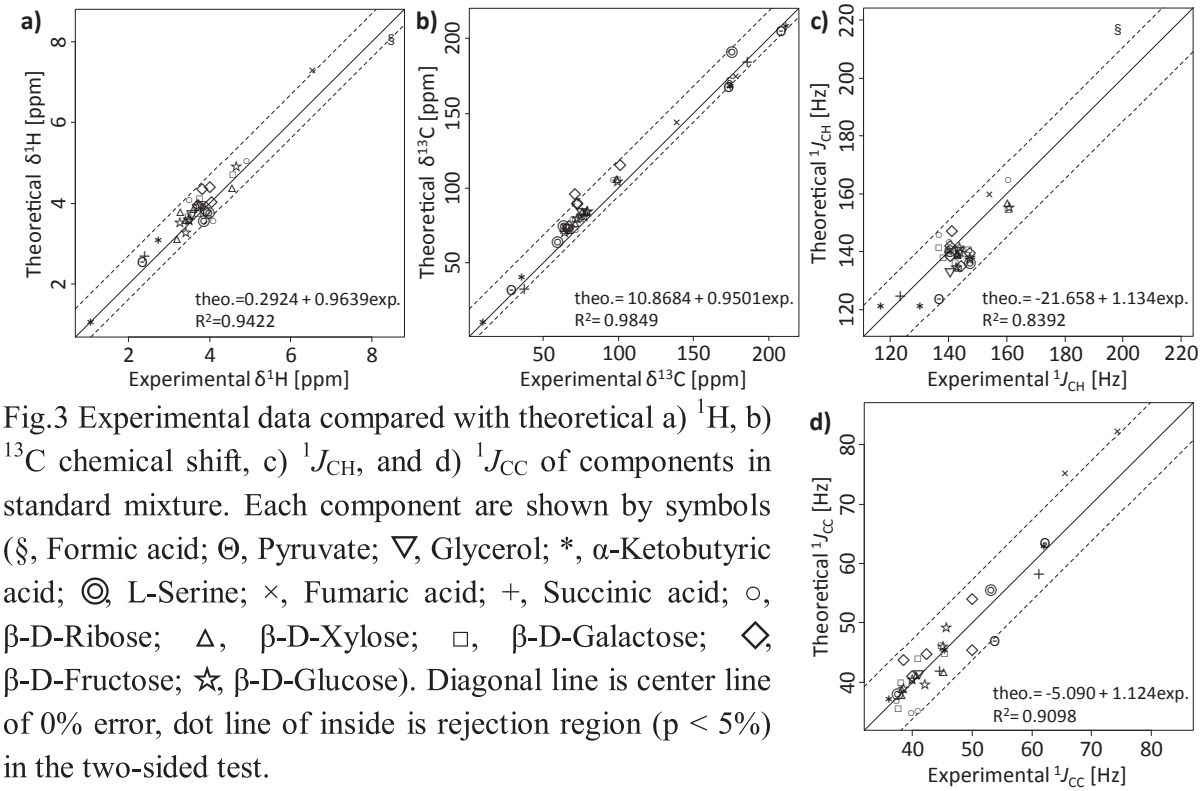


Fig.3 Experimental data compared with theoretical a) ^{1}H, b) ^{13}C chemical shift, c) $^{1}J_{CH}$, and d) $^{1}J_{CC}$ of components in standard mixture. Each component are shown by symbols (§, Formic acid; Θ, Pyruvate; ▽, Glycerol; *, α-Ketobutyric acid; ◎, L-Serine; ×, Fumaric acid; +, Succinic acid; ○, β-D-Ribose; △, β-D-Xylose; □, β-D-Galactose; ◇, β-D-Fructose; ☆, β-D-Glucose). Diagonal line is center line of 0% error, dot line of inside is rejection region ($p < 5\%$) in the two-sided test.

2. ^{13}C標識海藻のシグナル帰属

同様のフラグメント集積法および各理論値の比較方法を海藻のシグナル帰属に適用した。自動連鎖帰属の結果、19の代謝物において隣接する全ての相関シグナルが確認できた。さらに、30の代謝物において部分的な相関シグナルが確認された。次に、フラグメント集積法により生成された19の代謝物について配座解析を行い、最安定構造とそのイオン化構造の理論値を算出するとともに、ボルツマン分布および回帰分析を用いて理論値の補正を行い、構造生成した代謝物の妥当性を量子化学計算により評価した。理論値と実測値の比較では、RMSDおよび95%信頼区間、推定区間により評価を行った。最安定構造のRMSDの平均はイオン化構造よりも低い値（RMSD（δ^{1}H）= 0.304、RMSD（δ^{13}C）= 4.814）であり、イオン化構造は予測区間を外れる傾向にあった。ボルツマン分布による補正は最安定構造のRMSDと大差なかったが、回帰分析による補正は効果が認められた（RMSD（δ^{1}H）= 0.288、RMSD（δ^{13}C）= 3.383）。また、D-Glucoseはα体とβ体のシグナルが観測されたが、それぞれ逆の構造の補正値と比較した場合、化学シフトのRMSDは大きくなった。β体のD-Glucoseの$^{1}J_{CC}$の実測値とβ体およびα体の理論値を比較した結果、RMSDはそれぞれ2.127Hz（β体）、3.589Hz（α体）となったことから、理論値から異性体の判別が可能であることが示唆された。以上のことから、フラグメント集積法により代謝混合物群の各化合物の構造を推定でき、また、推定された全体構造の妥当性は化学シフトおよびスピン結合定数の理論値から評価が可能であった。本研究のアプローチは既知成分の帰属に関する妥当性を評価したが、未知成分にも応用が可能と考えられた。

【参考文献】

1. Ito, K., Sakata, K., Date, Y., Kikuchi, J., *Anal. Chem*. **2014**, *86*, 1098–1105.
2. Wei, F., Ito, K., Sakata, K., Date, Y. & Kikuchi, J., *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 2819–2826.
3. Date, Y., Sakata, K., Kikuchi, J., *Polymer J*. **2012**, *44*, 888–894.
4. 三澤拓真, 伊藤研悟, 菊地淳, *生物工学会誌*. **2014**, *92*, 1–7.
5. Chikayama, E., Sekiyama, Y., Okamoto, M. *et al*., *Anal. Chem*. **2010**, *82*, 1653–1658.

P47

位置選択的多付加型C_{60}およびC_{70}誘導体の合成と^{1}H, ^{13}C NMR

○渡邉 敬太[1]，内山 幸也[1]，高橋 晴夏[1]，与座 健治[2]，森山 広思[1]
[1]東邦大学大学院・理学研究科，[2]ブルカーAXS

Regioselective synthesis and ^{1}H, ^{13}C NMR characterization of novel multifunctionalized fullerenes

○Keita Watanabe[1], Kouya Uchiyama[1], Haruka Takahashi[1], Kenji Yoza[2], and Hiroshi Moriyama[1]
[1]Department of Chemistry, Toho University, [2]Bruker AXS

Multifunctionalized fullerenes have unique properties derived from their contracted π system as well as addends attached to the fullerene skeleton. However, it is difficult to synthesize them regioselectively, therefore regioselective synthesis of fullerene derivatives with multiaddends has attracted much attention in the field of organic electronic devices and life sciences. We have noted that $C_{60}Br_8$ and $C_{70}Br_{10}$ have unique well-characterized structures suitable for starting materials. The substitution reaction of $C_{60}Br_8$ and $C_{70}Br_{10}$ can be a powerful tool for the regioselective synthesis of multifunctionalized fullerenes; furthermore, the reaction can easily change the chemical properties depending on the substituents. We report the synthesis of novel regioselectively controlled $C_{60}(OR)_8$, $C_{70}(OR)_{10}$ and $C_{60}(Aryl)_8$. These compounds were fully characterized by ^{1}H, ^{13}C NMR spectroscopy and X-ray single-crystal structure analysis.

序論

多付加フラーレンの合成は、生成物がフラーレン由来の性質に加え付加有機基由来の性質も示すため、フラーレンへの新たな特性付与の観点から重要な課題の一つである。しかし、フラーレンは歪んだsp^2炭素により構成されているため反応性が高く、付加数を制御し、かつ付加位置選択的に多付加フラーレンを合成することは困難とされている。この課題を克服する一つの手法として、本研究では、単一物質として定量的に合成でき、炭素－臭素結合の結合力が弱いため容易な置換反応が期待できる臭素化フラーレン$C_{60}Br_8$, $C_{70}Br_{10}$の置換反応に着目した。$C_{60}Br_8$および$C_{70}Br_{10}$は前駆体物質として有用であると考えられるが、有機溶媒への溶解性や熱的安定性が低いことから、これまで臭素部位の選択的な置換反応は報告されていない。

今回、$C_{60}Br_8$および$C_{70}Br_{10}$のアルコールによる置換反応により、八重付加型アルコキシフラーレン$C_{60}(OR)_8$ ($R = C_nH_{2n+1}$, n = 1–10; CH_2CF_3)、さらに同型のアリールフラーレン$C_{60}(Aryl)_8$を得た。また、十重付加型アルコキシフラーレン$C_{70}(OR)_{10}$ ($R = CH_3, C_2H_5, C_3H_7$)を得た。^{1}H, ^{13}C NMRおよび単結晶X線構造解析から分子構造を決定した。

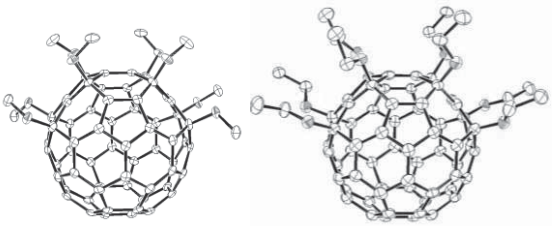
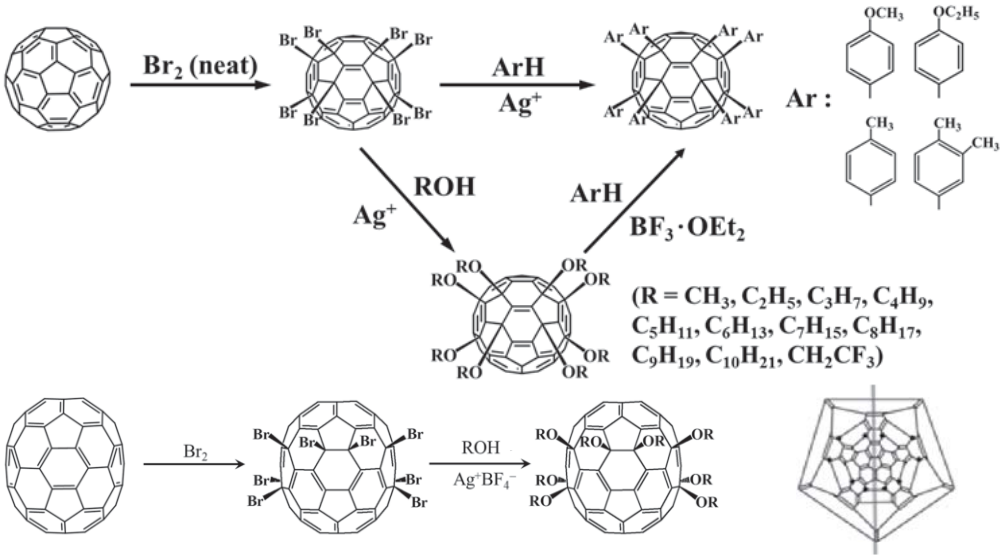


Fig. 1. ORTEP drawing of $C_{60}(OCH_3)_8$ and $C_{60}(OC_2H_5)_8$

実験

スキーム 1. に従って、$C_{60}Br_8$および$C_{70}Br_{10}$とアルコールおよびアニソールの反応により、八重付加型アルコキシフラーレン$C_{60}(OR)_8$ ($R = C_nH_{2n+1}$, n = 1–10 ; CH_2CF_3)、十重付加型アルコキシフラーレン$C_{70}(OR)_{10}$ ($R = CH_3, C_2H_5, C_3H_7$)、八重付加型アリールフラーレン$C_{60}(Ar)_8$ ($Ar = C_6H_4OCH_3$, $C_6H_4OC_2H_5$, $C_6H_4CH_3$, $C_6H_3(CH_3)_2$)が得られ、^{1}H, ^{13}C NMRから同定を行った。

多付加型フラーレン誘導体，位置選択的合成，^{1}H, ^{13}C NMR同定
○わたなべけいた，うちやまこうや，たかはしはるか，よざけんじ，もりやまひろし



Scheme 1.

Fig. 2. Schlegel diagram of $C_{70}Br_{10}$ and $C_{70}(OR)_{10}$

結果と考察

$C_{60}(OCH_3)_8$の^{1}H NMRスペクトル測定の結果、3.52 ppmと3.83 ppmにメチル基プロトン由来のプロトン比1：1のピークが観測された。(Fig. 3) 八重付加型アルコキシフラーレン$C_{60}(OCH_3)_8$は分子内にC_{2V}の対称性を有しているため、それぞれ等価な内側の4つのメトキシ基と外側の4つのメトキシ基のメチルプロトン由来のピークであると考えられる。^{13}C NMRスペクトル測定の結果、低磁場側にはフラーレン骨格のsp^2炭素由来の15本のピーク(強度 ：2C (sp^2) = 4本, 4C (sp^2) = 11本)、高磁場側には77.91 ppmと78.51 ppmにメトキシ基が付加したフラーレン骨格炭素の2本のピークが観測され、$C_{60}(OCH_3)_8$においてフラーレン骨格由来のピーク計17本が観測された。また、付加したメトキシ基のsp^3炭素は、高磁場側の55.07 ppmと55.77 ppmに2本のピークが観測されたことから、2種類のメトキシ基が存在することが^{13}C NMRからも同様に示唆される。以上から、$C_{60}(OCH_3)_8$は前駆体$C_{60}Br_8$の付加形態を保持しており、溶液中でもFig. 1.の分子構造を示すことがわかった。

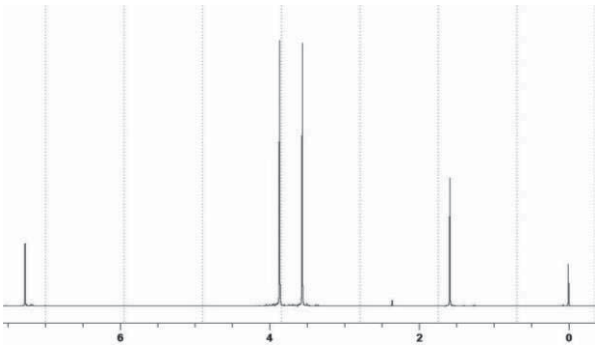


Fig. 3. ^{1}H NMR spectrum of $C_{60}(OCH_3)_8$

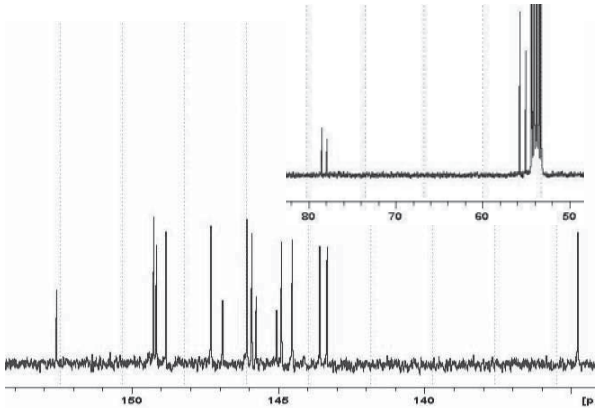


Fig. 4. ^{13}C NMR spectrum of $C_{60}(OCH_3)_8$

引用文献

1) P. R. Birkett, P. B. Hitchcock, H. W. Kroto, R. Taylor, D. R. M. Walton, Nature **1992**, 357, 479–481.

2) M. M. Wienk, J. M. Kroon, W. J. H. Verhees, J. Knol, J. C. Hummelen, P. A. van Hal, R. A. J. Jandden, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 3371–3375.

P48

かご型炭素クラスターC_{60}および$C_{59}N$に内包されたH_2OとH_2の^1H NMR緩和時間

○橋川 祥史[1]，村田 理尚[1]，若宮 淳志[1]，村田 靖次郎[1,2]
[1]京大化研
[2]JSTさきがけ

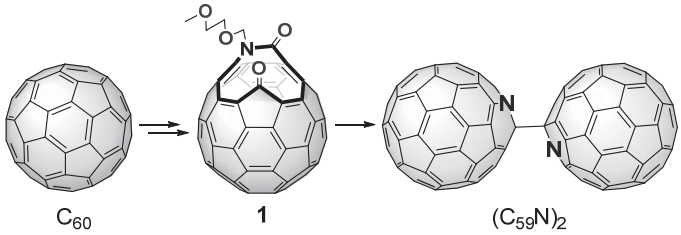
^1H NMR Relaxation Times of H_2O and H_2 Entrapped inside Carbon-Cluster Cages of C_{60} and $C_{59}N$

○Yoshifumi Hashikawa,[1] Michihisa Murata,[1] Atsushi Wakamiya,[1] and Yasujiro Murata[1,2]
[1]*Institute for Chemical Research, Kyoto University.*
[2]*JST-PRESTO.*

Fullerene C_{60} is a caged carbon-cluster with an internal space which is suitable for accommodating a small atom or molecule. We have already synthesized endohedral fullerenes such as $H_2@C_{60}$,[1] $He@C_{60}$,[2] and $H_2O@C_{60}$[3] by using organic chemical reactions. Nitrogen doping of the carbon cage of C_{60} is expected to have an appreciable influence on the nature inside the cage. N-doped fullerene $C_{59}N$ is known as the only heterofullerene for which organic synthetic methods have been established.[4] In this work, we focused on endohedral $C_{59}N$ and developed synthetic methods of $H_2O@C_{59}N$ and $H_2@C_{59}N$ in macroscopic scale. To elucidate the nature of inner surface of $C_{59}N$, ^1H NMR relaxation times of $H_2O@C_{59}N$ and $H_2@C_{59}N$ were measured as well as $H_2O@C_{60}$ and $H_2@C_{60}$. The relaxation time T_1 of $H_2O@C_{59}N$ was found to be three times longer than that of $H_2O@C_{60}$ despite almost no difference in T_1 values between $H_2@C_{59}N$ and $H_2@C_{60}$, suggesting the electrostatic interaction between the nitrogen atom and entrapped H_2O.

序論　フラーレンC_{60}は，直径約3.7 Åの内部空間をもつかご型カーボンクラスターであり (Scheme 1)，小分子を包接することができる．当研究室では，有機化学的手法を用いて水素分子[1]やヘリウム原子[2]，水分子[3]などを内部に導入した内包フラーレンの合成に取り組んできた．フラーレンケージを構成する60個の炭素原子のうち，1つのみを窒素原子に置き換える手法が報告されており[4]，形式的に$C_{59}N$と表記されるこのフラーレンはアザフラーレンと呼ばれる (Scheme 1).

Scheme 1. Synthesis of azafullerene $(C_{59}N)_2$ from fullerene C_{60}



本研究では，フラーレンケージへの窒素原子のドープに起因するフラーレン骨格内部の性質の変化を明らかにするために，$C_{59}N$の内部空間に小分子を導入する有機化学的手法を開発した．また，内包小分子として，フラーレンケージ上の窒素原子との相互作用が期待される水分子および相互作用をほぼ無視できる水素分子を選定し，NMRアクティブな内包小分子のプロトン核磁気緩和時間を測定することにより，$C_{59}N$骨格内部の性質について考察した．

結果と考察　小分子内包$C_{59}N$を合成するために，(1) 小分子内包C_{60}から直接誘導する方法，(2) 前駆体**1**の11員環開口部を拡大し，小分子を導入した後，元の大きさの開口部まで閉環し[5]，$C_{59}N$骨格を構築する方法の2通りの手法を開発した．合成した$H_2O@(C_{59}N)_2$，$H_2@(C_{59}N)_2$の^1H NMRを測

フラーレン，アザフラーレン，緩和時間

○はしかわよしふみ，むらたみちひさ，わかみやあつし，むらたやすじろう

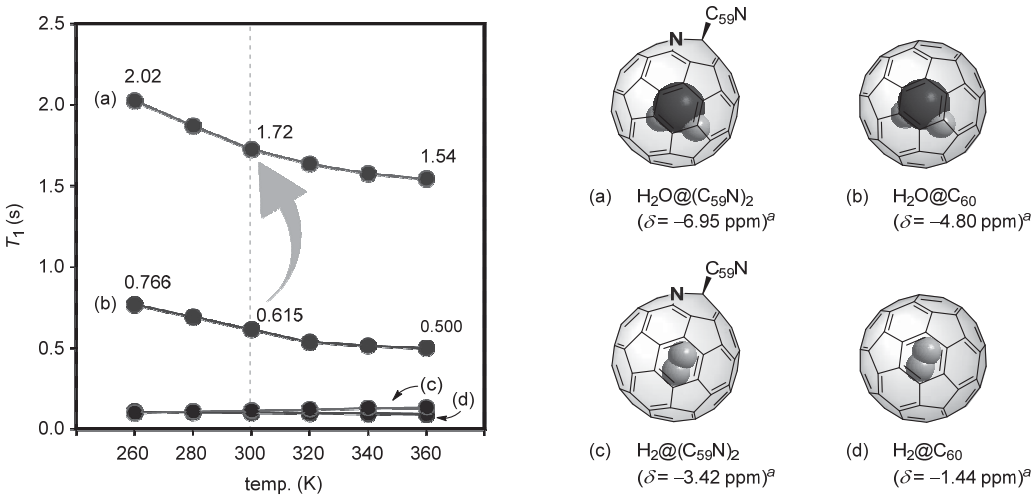


Figure 1. The spin-lattice relaxation times T_1 (500 MHz, in ODCB-d_4, measured by inversion recovery method) of (a) $H_2O@(C_{59}N)_2$, (b) $H_2O@C_{60}$, (c) $H_2@(C_{59}N)_2$, and (d) $H_2@C_{60}$. [a] 300 K.

定した結果，$C_{59}N$骨格に内包された小分子のプロトンシグナルは，C_{60}に比べより強く遮蔽された高磁場領域に観測された (Figure 1)．また，$H_2O@(C_{59}N)_2$のプロトンシグナルの半値幅は1.6 Hzであるのに対し，$H_2@(C_{59}N)_2$は4.1 Hzとブロードニングしていることがわかった．

そこで，より詳細に内包小分子の挙動を調べるために，260–360 Kの温度範囲においてスピン格子緩和時間T_1を測定した (Figure 1)．その結果，$H_2@C_{59}N$のT_1は$H_2@C_{60}$とほぼ同程度であったにも関わらず，$H_2O@C_{59}N$のT_1は$H_2O@C_{60}$の約3倍の値をもつことがわかった．これは，内包された水分子とフラーレン骨格上の窒素原子との間に何らかの相互作用が存在することを示している．想定される相互作用として，(1) 水素結合に由来するN···H_2O相互作用，(2) 静電的な反発に基づくN···OH_2相互作用が考えられる．また，(3) $C_{59}N$の二量体構造に由来する寄与や (4) $C_{59}N$由来の常磁性化学種の残存効果については，$H_2@(C_{59}N)_2$および$H_2@C_{60}$の場合に明確なT_1の差が見られなかったことから除外することができる．

$H_2O@(C_{59}N)_2$におけるより長い緩和時間の起源を明らかにするために，モデル化合物$HC_{59}N$の静電ポテンシャルを理論計算を用いて評価した結果，予想に反し，窒素原子上の静電ポテンシャルは，骨格外部では負に，骨格内部では正に帯電していると示唆された (Figure 2)．このことから，窒素原子上の非共有電子対の大部分がフラーレン骨格のπ共役に寄与しており，内包水分子の酸素原子は骨格上の窒素原子との間にむしろ引き合うような相互作用が働いていると考えられる．さらに，温度可変NMR測定の結果，水素結合に基づく相互作用を否定する結果が得られており，$C_{59}N$に内包された水分子は骨格上の窒素原子の影響により，その回転運動が抑制され，核磁気緩和が遅延しているものと推測される．

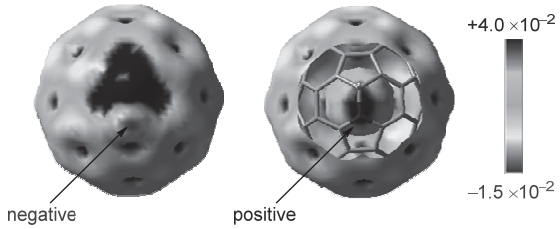


Figure 2. Electrostatic potential of $HC_{59}N$, calculated at the MP2/6-31G(d,p)//M06-2X/6-31G(d,p) level of theory.

References

[1] Murata, M.; Murata, Y.; Komatsu, K. *Science* **2005**, *307*, 238.

[2] Morinaka, Y.; Tanabe, F.; Murata, M.; Murata, Y.; Komatsu, K. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 4532.

[3] Kurotobi, K.; Murata, Y. *Science* **2011**, *333*, 613.

[4] (a) Hummelen, J. C.; Knight, B.; Pavlovich, J.; González, R.; Wudl, F. *Science* **1995**, *269*, 1554.
(b) Nuber, B.; Hirsch, A. *Chem. Commun.* **1996**, 1421.

[5] Hashikawa, Y.; Murata, M.; Wakamiya, A.; Murata, Y. *Org. Lett.* **2014**, *16*, 2970.

P49

PFG-NMR法によるエマルション系の拡散計測

○川口 翼[1]，喜多 理王[1]，新屋敷 直木[1]，八木原 晋[1]，福﨑 稔[2]
[1]東海大学大学院総合理工学研究科
[2]東海大学情報通信学部

Diffusion Measurements of Emulsion using PFG-NMR Method

○Tsubasa Kawaguchi[1], Rio Kita[1], Naoki Shinyashiki[1], Shin Yagihara[1] and Minoru Fukuzaki[2]
[1]Graduate School of Science and Technology, Tokai University, Japan.
[2]School of Information and Telecommunication Engineering, Tokai University, Japan.

Emulsion is used in various fields such as dressing for food, hand cream for medical or cosmetic field, and so on even for daily use. Although it is well known that the water and oil phase separation can be stabilized by surfactant, the emulsion is not stable at long time scale. In this study, we performed Pulsed Field Gradient Stimulated Echo measurements to examine the translational diffusion coefficient of molecules in edible oil, cream, margarine and mayonnaise in order to characterize various emulsion systems. The diffusion coefficient obtained for molecules in each sample reflected sizes of dispersoid and disperse medium, and those distribution with aging. In the presentation, we will discuss details of characterization of various emulsion systems based on diffusion measurements.

［序論］

一般に、油脂は疎水性のアルキル鎖構造を持つことから水には溶けないが、油脂と水の系を撹拌することで油と水が均一に分散した分散系(エマルション)を調製することができる。これらの分散系は医療や化粧品分野においてはクリーム、食品分野においてはマヨネーズやドレッシングなどの形で一般的に普及し、幅広い分野で利用されている。水に比べ油の量が多い場合は油中に水滴が分散したエマルション(W/O型)となるが、マヨネーズ等はこの限りではなく、油が多いにもかかわらず水中油滴(O/W型)の形をとる場合もある。一般にエマルションは安定な状態ではなく、時間が経つと二相に分離した状態に戻るため、産業利用分野などにおいては界面活性剤の導入や分散手法の工夫によって経時安定性を改善することが重要になっている。本研究では特に油リッチのエマルション系についてPulsed Field Gradient(PFG) NMR法を用いて様々なエマルションにおける水と油の拡散計測を行い、得られた拡散係数からそれぞれの構造や性質、系の安定性を評価する手法を考える。

拡散計測にはStimulated Echo(STE)法[1)]を用いた。Fig. 1にSTE法のパルスシークエンスを示す。ここでγは磁気回転比、gは傾斜磁場強度、δは傾斜磁場印加時間、Δは拡散時間であり、傾斜磁場強度を変化させることで測定を行い、下記に示すStejskal-Tannerの式[2)]により拡散係数を求めた。

$$\ln\left(\frac{I(g)}{I(0)}\right) = -\gamma^2 g^2 \delta^2 \left(\Delta - \frac{\delta}{3}\right) D$$

ここで$I(0)$は傾斜磁場を印加してない時もしくは最も弱い時の信号強度であり、$I(g)$はある傾斜磁場における信号強度である。右辺のD以外のパラメータをまとめてB-valueと呼び、左辺のB-value依存性の計測から拡散係数Dが求められる。

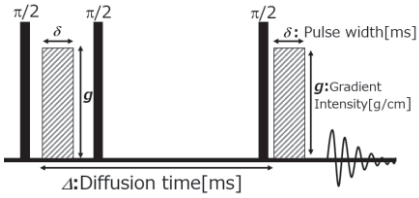


Fig. 1 Stimulated Echo sequence.

PFG-NMR, エマルション, 拡散係数

○かわぐちつばさ，きたりお，しんやしきなおき，やぎはらしん，ふくざきみのる

［実験］

測定試料には市販の化粧品クリームやマヨネーズ、マーガリン、さらに食用油に濃度が10wt%となるように超純水(Millipore SimplicityUV)を添加し、超音波ホモジナイザーを用いて調製したエマルションを用いた。化粧品クリームは固体状であるのに対し、食用油のエマルションは液体状である。これらのエマルションの安定度は大きく異なっており、目視において化粧品クリームが数ヶ月から数年後でも同様の状態を維持するのに対して、食用油は数時間程度で状態が変化し、長くとも数日後には完全に二相に分離してしまうことが認められた。NMR測定にはBruker AVANCE 400WBにDiff50 diffusionプローブを用いた。傾斜磁場印加時間δを1msに固定し、傾斜磁場gを最大2300gauss/cmまで変化させて測定を行った。拡散時間Δは5msから200msの範囲で適宜変化させた。測定温度は25℃とした。安定性が大きく異るため化粧品クリームでは数ヶ月から数年、食用油では数時間の範囲で測定を行った。試料管内での対流等の効果を抑えるため、5mmϕ水溶液用対称形ミクロサンプルチューブ(シゲミ BMS-004)や2mmϕ試料管を適宜使用した。

［結果と考察］

Fig.2に水/食用油エマルションの^{1}H-NMRスペクトルを示す。4.7ppm付近に水由来のピークが認められ、その他の油脂由来のピークのうち、特に1.2ppm付近の大きなピークはアルキル鎖由来である。PFG-NMR法の計測によってそれぞれのピークについて拡散係数を求めることができた。水のピークの拡散係数は1.59×10^{-9}m^2/secと純水に近い値を示したのに対し、アルキル鎖の拡散係数は1.39×10^{-11}m^2/secと水に比べ二桁程度小さな値を示した。その他のピークは8.96×10^{-12}から1.31×10^{-11}m^2/secとアルキル鎖と近い値を示した。これらのことからエマルションにおいて水と油脂は大きな運動性の違いを持っていることがわかる。

Fig.3にクリームのPFG-NMR測定結果を示す。クリームは固体状であったことから水以外のピークはほとんど得られなかったため、水のピークについてのみ解析を行った。PFG-NMR測定ではこの減衰過程の傾きから拡散係数Dの値が得られるが、クリームの減衰過程は途中で屈曲しており、クリーム中の水分子はバルクな水や水/食用油系と異なり、複数の拡散成分を持っていることを示している。時間を経るにつれより大きな屈曲過程を示すことから、新しいクリームに対し、経年クリームでは構造不均一性が増大していったことがわかる。発表ではさらにマヨネーズなどの比較的安定した系の測定結果も加え、エマルションの構造や物性の経時変化について議論する。

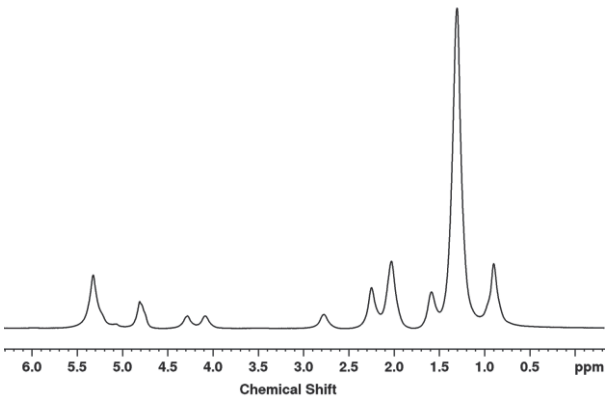


Fig. 2 ^{1}H-NMR spectra for emulsion of edible oil and water.

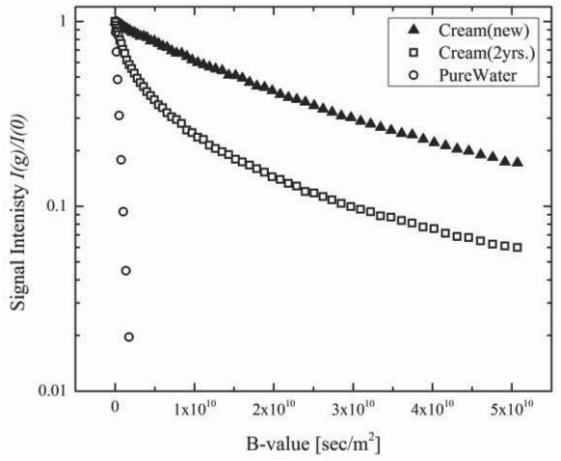


Fig. 3 PFG-NMR signal decay curve for water in cosmetic cream and pure water.

［参考文献］

1) P. P. Mitra, P. N. Sen, and L. M. Schwartz, *Phys. Rev. B* **47**, 8565-8574, 1993.

2) E. O. Stejskal, and J. E. Tanner, *J. Chem. Phys.* **42**, 288-292, 1964.

P50

定量NMR法によるアシルカルニチンの精確な純度評価のための体系的な条件設定方法の確立

○斎藤直樹[1]、齋藤剛[1]、山﨑太一[1]、鈴木彰子[1]、藤峰慶徳[2]、井原俊英[1]
[1]産業技術総合研究所　物質計測標準研究部門
[2]大塚製薬株式会社　診断事業部

Establishment of a Systematic Protocol on the Condition Setting for Accurate Purity Evaluation of Acylcarnitine by Using Quantitative ^{1}H NMR Spectroscopy

○Naoki Saito[1], Takeshi Satio[1], Taichi Yamazaki[1], Akiko Suzuki[1], Yoshinori Fujimine[2] and Toshihide Ihara[1]
[1]*National Metrology Institute of Japan, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Ibaraki, Japan*
[2]*Diagnostic Division, Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd., Tokushima, Japan*

In this study, we conducted purity determination of 5 kinds of acylcarnitine (C2, C4, C5, C8 and C16) by quantitative ^{1}H NMR (qNMR). For achieving the accurate purity, we strategically constructed our systematic protocol. A signal bound to the asymmetric carbon atom of acylcarnitine was chosen as a target signal because we anticipated the signal had the least problems caused by impurity signals. High-performance liquid chromatography (HPLC) was used for validation of qNMR results. C2, C4, C5 and C8 were suitable to determine in D_2O; C16 was not soluble in D_2O. It was soluble in CD_3OD, a broad solvent residual water signal interfered analysis of the target signal. By adding D_2O in CD_3OD, the water signal became shaper. C16 was found to be suitable in CD_3OD/D_2O (80:20). Finally, we confirm the difference in the purities between qNMR and HPLC was about 0.5 % or less, concluding the systematic protocol worked fine.

1.　はじめに　　新生児の血液検査において、特異的なアシルカルニチンの上昇を検出することで、先天的な有機酸あるいは脂肪酸代謝異常を診断することが可能となってきた。当該診断の際には、検査を実施する人や場所、時期等によらず正しい検査結果が求められるため、検査に用いるタンデムマスの校正にアシルカルニチン標準物質を利用する必要があるが、信頼性が正しく評価された標準液はまだ世界的にも供給されていない。そこで、本研究では、標準物質の精確かつ迅速な純度評価法として実績を上げている^{1}H NMRによる定量分析（以下、定量NMR）法[1)2)]を用いて、アシルカルニチン標準液の開発に必要な原料の純度評価を試みた。また、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）により、定量NMR法で得られた純度を比較した。

2.　本研究のコンセプト　　本研究で用いたアシルカルニチンには、不純物としてアルキルカルボン酸やカルニチンが含まれていることが^{1}H NMRスペクトル上で推測されたため、アシルカルニチンの不斉炭素に結合する^{1}H核の信号がそれら不純物の信号を分離でき得ると期待し、当該信号を純度評価に用いるターゲット（以下、ターゲット信号）とした。その上で、アシルカルニチンの種類によらず適用できる体系的な条件設定方法（Fig.1）を構築し、計5物質に適用した。

Acylcarnitine、quantitative ^{1}H NMR、systematic protocol

○さいとうなおき、さいとうたけし、やまざきたいち、すずきあきこ、ふじみねよしのり、いはらとしひで

3. 実験

分析試料には*O*-アセチル-L-カルニチン塩酸塩（C2）、*O*-ブチリル-DL-カルニチン塩酸塩（C4）、*O*-イソバレリル-DL-カルニチン塩酸塩（C5）、*O*-オクタノイル-DL-カルニチン塩酸塩（C8）、*O*-パルミトイル-DL-カルニチン塩酸塩（C16）を用い、定量NMR法における^{1}H信号量の基準に用いる標準物質には認証標準物質であるフタル酸水素カリウム（NMIJ製）あるいはDSS-d_6（和光製）を用いた。溶媒にはDMSO-d_6（和光製、D化率99.9％）に加え、CD_3OD（CIL製、D化率99.8％）、D_2O（ACROS製、D化率99.8％）あるいはこれらを混合したCD_3OD/D_2Oを用いた。また、試料調製ではミクロ天びんあるいはウルトラミクロ天びん（メトラー・トレド製）、NMR測定には^{1}H核の共鳴周波数として400 MHzのNMR装置（日本電子製）、スペクトル解析のソフトウェアにはMestReNova（MestreLab製、Ver. 7.0.2）をそれぞれ用いた。なお、実験はFig. 1に示す方法に従い、DMSO-d_6、CD_3OD及びD_2Oの3溶媒を用いて開始した。

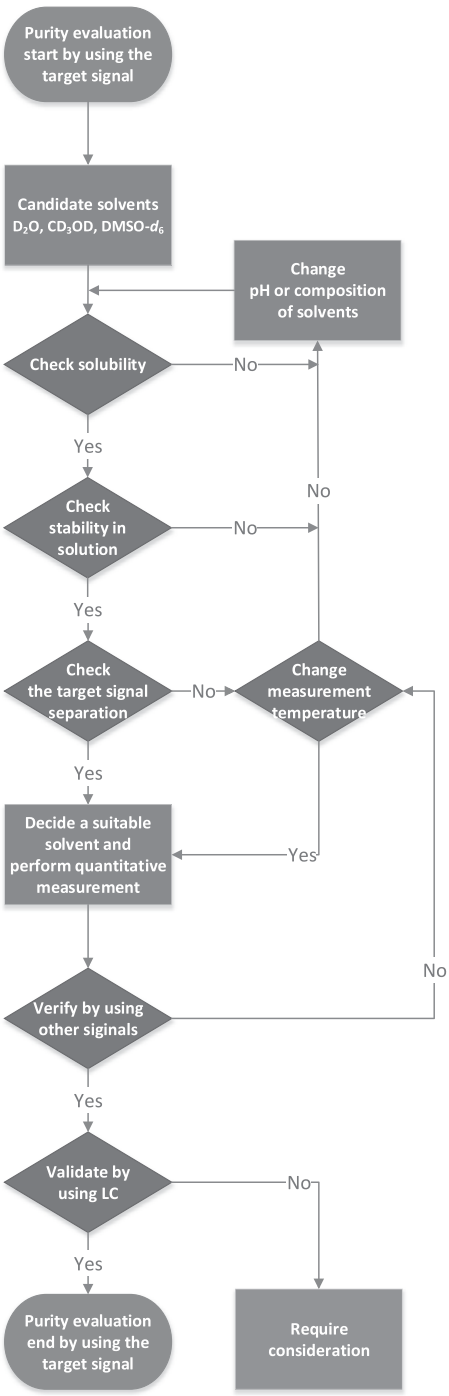


Fig. 1 Systematic protocol on the condition setting

4. 結果と考察

4･1 溶解性及び溶液中での安定性の確認　信号面積を精確に評価するために必要な閾値として1 %以上の溶解度を設定したところ、C16以外の分析試料はいずれもDMSO-d_6、CD_3OD、D_2Oに容易に溶解し、かつ試料調製後12時間以上安定であった。一方、C16はCD_3ODにのみ1 %以上溶解したが、後述するようにターゲット信号と溶媒中の水由来の信号との分離が不十分であったために、溶媒にCD_3OD/D_2O（80:20）を用いたところ、1％以上溶解し、かつ試料調製後12時間以上安定であった。

4･2 信号分離の確認　ターゲット信号が水やその他の不純物由来の信号から最も良好に分離できる溶媒を確認したところ、ターゲット信号への水由来の信号の重なりは、溶媒にD_2Oを用いた場合に最も低減できたため、C16以外の分析試料はD_2Oを定量用溶媒として選定した。一方、D_2Oに溶解しなかったC16では、溶媒にCD_3ODを用いることで溶解性は確保されたが、水由来の信号が広幅化してターゲット信号に重なった。ここに、D_2Oを加えると水由来の信号が先鋭化し、水由来の信号の重なりを低減できたため、C16ではCD_3OD/D_2O（80:20）を定量用溶媒として選定した。

4･3 異なる信号による値の検証　ターゲット信号以外の信号からも純度を評価し、相互に値の確認を行った。このとき、C16はターゲット信号以外の信号から得られた純度が、ターゲット信号から得られた純度に対して3％以上高くなったが、主たる原因は分離できないパルミチン酸の重なりであることを確認している。

4･4 HPLCによる純度との比較　定量NMR法とHPLCの純度の差は概ね0.5 %以内であり、定量NMR法で得られた純度は妥当な値を示していると考えられる。このことから、本研究で構築した定量NMR法における体系的な条件設定方法の有用性を確認することができた。

文献 1) T. Saito et al., *Accred. Qual. Assur.*, **16**, 421 (2011)　2) 斎藤直樹ほか, 分析化学, **63**, 909 (2014)

P51

^{31}P 固体NMRを用いたペプチドホルモングルカゴンによるDMPC脂質二分子膜の形態変化と線維形成過程の解析

○羽矢　和未[1]，菊池　章江[1]，川村　出[1]，内藤　晶[1]
[1]横浜国立大・院工

Morphological change of DMPC lipid bilayers caused by glucagon as studied by ^{31}P solid-state NMR

○Kazumi Haya[1], Akie Kikuchi[1], Izuru Kawamura[1], and Akira Naito[1]
[1]*Graduate School of Engineering, Yokohama National University*

Glucagon is a 29-amino acid peptide hormone to regulate blood glucose level. In an acidic solution, it is known that glucagon easily forms amyloid fibrils. We measured fibril formation pathways of glucagon in the glucagon-DMPC lipid bilayer systems for 10 days by ^{31}P solid state NMR. On the 1st day, we found that glucagon disrupted DMPC bilayers below the gel-liquid crystalline transition temperature of DMPC bilayers (23 °C), when the concentration of glucagon is low. On the 2nd and 3rd day, membrane disruption wasn't observed, but on the 4th day, membrane disruption was observed again. These changes indicate that the states of morphology of glucagon cause membrane disruption differently. It was further observed that the fibrils were formed in the glucagon-DMPC lipid bilayer systems by TEM. It is discussed that the time-course change of DMPC membrane disruption is related to the growth of glucagon fibrils and membrane disruption may associate with toxicity of amyloid fibrils.

序論

グルカゴンは29アミノ酸残基からなるペプチドホルモンであり、血糖値を上昇させる作用をもつ。また、酸性溶液中では容易にミスフォールディングが起こり、アミロイド線維を形成する。アミロイド線維は様々な病気に関与しており、例えばアルツハイマー病にはアミロイドβペプチドが形成するアミロイド線維が、狂牛病にはプリオンタンパクが形成するアミロイド線維が関与していることが報告されている。これらの病気において、アミロイド線維よりもその中間体の方が毒性が高いと考えられているが、その詳細は明らかにされていない。アミロイド線維の線維形成機構はどのペプチドも共通の過程をたどると考えられている。したがって、グルカゴンが形成したアミロイド線維が特定の病気に関与しているという報告はないが、グルカゴンを用いた線維形成過程の解明は、毒性が高いアミロイド凝集体の構造やそれが生体膜を分断する機構の解明を可能にする。この研究はアミロイド病の治療法の開発に大きく貢献することを目的としている。

今回は、グルカゴンが中性溶液中でもアミロイド線維を形成することに着目し、グルカゴンを中性脂質二分子膜を形成するDMPCと中性溶液中で混合させ、^{31}P 固体NMRを用いてグルカゴンの線維形成過程におけるDMPC脂質二分子膜の形態変化を生理条件で解析した。

実験

グルカゴンとDMPCをP(peptide)/L(lipid)=1:50および1:30(モル比)で有機溶媒に溶かし、溶媒を除去してpH=7.5のTris bufferで水和することにより膜試料を調製して、この試料を^{31}P 固体NMRで測定した。DMPCのゲル-液晶相転移温度は23℃であり、温度変化によるグルカゴンとDMPC脂質二分

^{31}P solid-state NMR, Glucagon amyloid fibril, Membrane disruption

○はや　かずみ，きくち　あきえ，かわむら　いずる，ないとう　あきら

子膜との相互作用の変化を観測するために、温度は40℃から10℃毎に0℃まで下げ、0℃から再び10℃毎に40℃まで温度を上げた。これを10日ほど繰り返し、DMPC脂質二分子膜の^{31}P NMRスペクトルパターンがグルカゴンの状態によってどのように変化するかを観測した。

結果

グルカゴンとDMPCをP/L比で1:50、1:30に調製した試料を^{31}P 固体NMRで観測した結果をFig.1、Fig.2に示す。1日目のスペクトルを比較すると、P/L比1:50の試料において、10℃以下では強い等方ピーク(0 ppm)が得られた。2、3日目ではどちらの試料もわずかに等方ピークが得られたが、4日目で再び10℃以下で強い等方ピークを観測した。その後、徐々に等方ピーク以外のピークも現れ、収束した。最後に、測定後の試料を透過型電子顕微鏡で観測した結果、両方の試料から膜脂質断片とともに線維状物質を得た(Fig.3)。

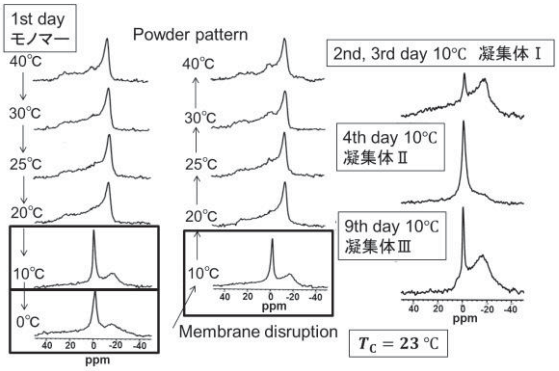


Fig.1 Temperature variations in ^{31}P static NMR spectra of the glucagon-DMPC (P/L=1:50) system

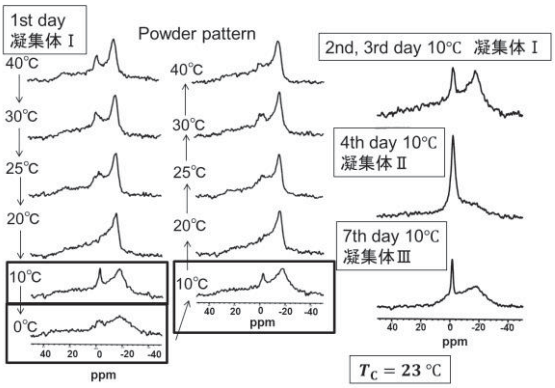


Fig.2 Temperature variations in ^{31}P static NMR spectra of the glucagon-DMPC (P/L=1:30) system

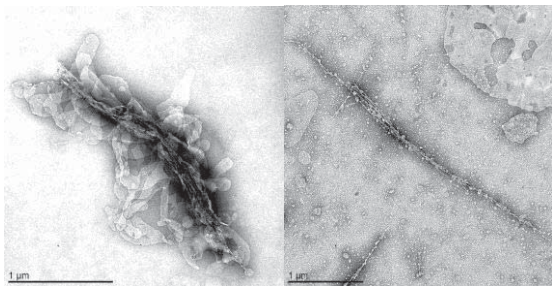


Fig.3 TEM images of the glucagon-DMPC systems
(Left: P/L=1:50　Right: P/L= 1:30)

考察

0 ppm付近の等方ピークは様々な要因によりDMPC脂質二分子膜が分断され、微小な集合体を形成し、等方運動をしたためであると考えられる。このような状態を膜分断状態と呼んでいる。P/L比が1:50の試料で初日に現れた0 ppm付近の等方ピークはグルカゴンモノマーがDMPC脂質二分子膜を分断し、ディスク状ミセルを形成したためであると考えられる。2、3日目ではグルカゴン同士が凝集して凝集体Ⅰを形成し、10℃以下でも0 ppm付近の等方ピークが得られなかったと考えられる。4日目に再び0 ppm付近に等方ピークが得られたことは、最終的に線維状物質を確認したことからアミロイド線維中間体(凝集体Ⅱ)がDMPC脂質二分子膜を分断したためであると考えられる。その後NMRスペクトルがあるパターンに収束したことは、線維中間体が線維(凝集体Ⅲ)に成長しDMPC脂質二分子膜との相互作用が弱まったためであると考えられる。一方P/L比が1:30の試料ではモノマー量が少なく早くに凝集体Ⅰを形成し、1日目での膜分断能が減少したと考えられる。

したがって本結果から、グルカゴンには複数の凝集状態が存在し、膜との相互作用がそれぞれ異なっているということがわかった。つまり、グルカゴンモノマーとアミロイド線維の中間体(凝集体Ⅱ)はDMPC脂質二分子膜を分断するように相互作用し、モノマーの凝集体(凝集体Ⅰ)と成長した線維(凝集体Ⅲ)はあまり分断しない。膜分断は細胞毒性と相関があると考えられ、本結果はアミロイド線維中間体は線維より毒性が高いということを示す。

P52

磁場配向微結晶粉末を用いた単結晶法による結晶多形の分析

○奥村学[1]，久住亮介[1]，木村史子[1]，木村恒久[1]，出口健三[2]，大木忍[2]，
藤戸輝明[2]，清水禎[2]
[1]京大・院農
[2]物材機構

Analysis of polymorph by the single-crystal NMR measurement by using magnetically oriented microcrystal array

○Manabu Okumura[1], Ryosuke Kusumi[1], Fumiko Kimura[1], Tsunehisa Kimura[1], Kenzo Deguchi[2], Shinobu Ohki[2], Teruaki Fujito[2], Tadashi Simizu[2]
[1]Graduate School of Agriculture, Kyoto University, Kyoto, Japan.
[2]National Institute for Materials Science, Tsukuba. Ibaraki, Japan.

The chemical shift anisotropy (CSA) reflects the local distribution of electrons around resonance nuclei under consideration. Single-crystal NMR measurement is a powerful method to determine full information of CSA, enabling to elucidate, for example, differences in local structures of crystal polymorphisms. However, it needs large single crystals. To overcome this limitation, we have proposed use of MOMAs (magnetically oriented microcrystal arrays) in place of large single crystals. A MOMA is a single-crystal-like composite in which microcrystals are three-dimensionally aligned in a polymer matrix. In this report, we prepared MOMAs of histidine A and B forms and compared their CSAs.

序論

化学シフトの異方性 (CSA) は観測核周囲の電子分布を反映するので結晶中での局所構造の解析に有用である．特に単結晶法はCSAを主軸の方向を含めて完全に決定することができるため，同一化合物でありながら異なる結晶構造を持つ結晶多形間での局所構造の解析などに特に有効である．しかし単結晶法には数mmサイズの単結晶が必要である．そのため大きな単結晶を得ることが困難な物質に対しては適用が困難であった．それを克服するため，当研究グループでは変調回転磁場を用いて，微結晶を三次元配向させる擬単結晶法（MOMA法）を単結晶NMR測定に応用することを提案している．これまでにMOMA法を用いて^{13}Cや^{31}Pの化学シフトテンソルを決定することに成功している[1-3]．本研究では2つの結晶多形を持つL-histidineについてMOMA法を応用し，結晶多形間の水素結合様式の差が現れると考えられるカルボキシル炭素の^{13}CのCSAを完全に決定して結晶多形間での局所構造の相違について考察を行った．

実験

L-histidine A形・B形微結晶を紫外線硬化樹脂に分散させ, 25wt%の微結晶懸濁液を作製した．得られた懸濁液を円柱状のプラスチック容器に入れ，試料回転装置を備えた8 T超伝導磁石にセットして，変調回転磁場(ω_s=5 rpm, ω_q=50 rpm, α=90º)を60分間印加した．その後, UVを90分間照射して配向を固定し, MOMAを得た．磁場に対する円柱容器のセッティング方向を変えて同様の操作を行い，円柱試料内での微結晶の配向方向が異なる3つのMOMAを作製した(Fig.1).

結晶多形，磁場配向，単結晶法

○おくむら まなぶ，くすみ りょうすけ，きむら ふみこ，きむら つねひさ，でぐち けんぞう，
おおき しのぶ，ふじと てるあき，しみず ただし

得られたMOMAはX線回折測定に供し，配向性の評価を行った．配向性の良いMOMAをゴニオプローブ内にセットし，回転角をψとしMOMAをψ=0-180°まで15°毎に回転させながら^{13}Cの共鳴周波数125MHzにて固体NMR測定を行った．

結果

得られたL-histidine A形・B形それぞれのMOMAのX線回折図の一部をFig.2に示す．いずれの面においても回折点がスポットで得られ，配向の程度を表す方位角方向の半価幅が5°以下であることから，微結晶が硬化した媒体中で精密に三次元配向した擬単結晶の作製に成功したことがわかる．得られたMOMAの^{13}CNMRスペクトルの一部をFig.3に示す．カルボキシル炭素由来のピークを帰属し，角度ψごとに得られるカルボキシル炭素ピークの化学シフト値に対して以下の理論式$\delta_{lab}(\psi)$を用いてフィッティングを行った．

$$\delta_{lab}(\psi)=\delta_{jj}\cos^2\psi+\delta_{jk}\sin 2\psi+\delta_{kk}\sin^2\psi$$

ここで，i, j, k は磁化軸 χ_1, χ_2, χ_3 軸の巡回置換であり，i 軸が静磁場に垂直な結晶軸で結晶軸 jと静磁場のなす角をψとしている．得られた化学シフトテンソルの主値と分子軸に対する主軸の方向をFig.4に示す．どちらも主値はほぼ同じであったがそれぞれの主軸の方向はわずかに異なっていた．

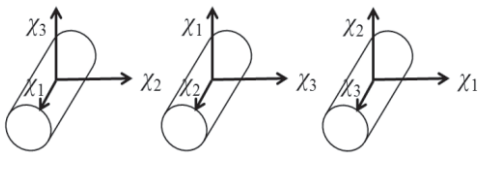


Fig.1 Magnetic axes χ_1, χ_2 and χ_3 of three MOMAs prepared for single crystal NMR measurements.

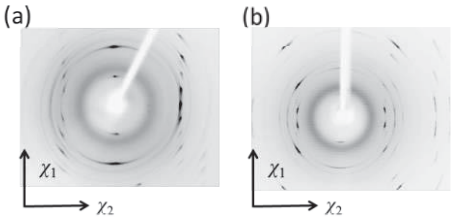


Fig.2 X-ray diffraction patterns of MOMAs of L-histidine (a)A-form and (b)B-form

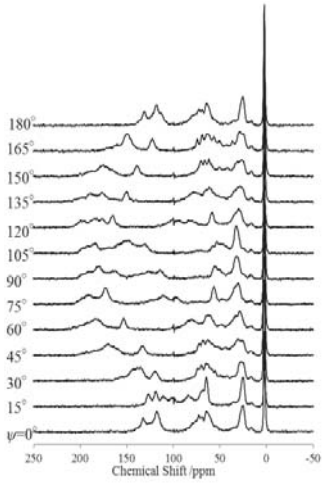


Fig.3 ^{13}C CP NMR spectra of B-form of L-histidine measured for various rotation angles ψs about the χ_1 axis.

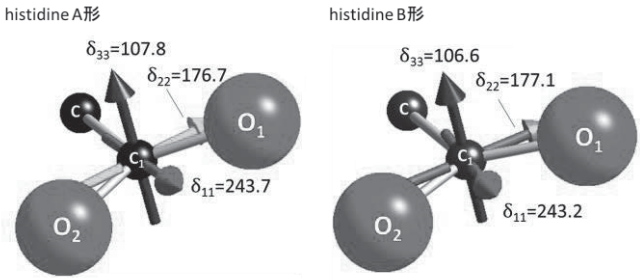


Fig.4 Principal axes and values of the chemical shift tensors of carboxyl groups in L-histidine A and B forms.

参考文献

[1] R. Kusumi, F. Kimura, G. Song, and T. Kimura. *J. Magn. Reson.* **2012,** *223*, 68.

[2] R. Kusumi, F. Kimura, and T. Kimura. *Cryst. Growth & Des*, **2015**, *15*, 718.

[3] G. Song, R. Kusumi, F. Kimura, T. Kimura, K. Deguchi, S. Ohki, T. Fujito, and T. Shimizu. *J. Magn. Reson.,* **2015,** *255*, 28

P53

In-situ光照射固体NMRによるD96N-bR変異体の光反応サイクルにおけるM-中間体の解析

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

Characterization of M-intermediate in the photocycle of D96N-bR mutant by *in-situ* photoirradiation solid-state NMR

○Yuto Otani[1], Arisu Shigeta[1], Yoshiteru Makino[1], Ryota Miyasa[1], Izuru Kawamura[1], Takashi Okitsu[2], Akimori Wada[2], Satoru Tuzi[3], and Akira Naito[1]
[1]*Graduate School of Engineering, Yokohama National University, Japan.*
[2]*Kobe Pharmaceutical University, Japan.*
[3]*Graduate School of Life Science, University of Hyogo, Japan.*

Bacteriorhodopsin (bR) is a seven-transmembrane protein consisting of 248 amino acid residues and chromophore retinal in a purple membrane of *H. salinarum*. When bR absorbs light, it is occurred photoisomerization of the retinal and bR transports a proton from cytoplasmic side to extracellular side during the photocycle through K, L, M, N, O-intermediates and returning to the ground state. The M-intermediate plays an important part to express of function, although it is difficult to observe the M-intermediate by solid-state NMR because of half -life of ms order. Here, we observed NMR spectra of [14, 20-^{13}C]Ret-[1-^{13}C]Tyr-[^{15}N]Pro-D96N-bR mutant with a long half-life of M-intermediate by *in-situ* photo-irradiation solid-state NMR. As a result, we could trap the M-intermediate by irradiation green light (520 nm) irradiation state, and determine the configuration of [14, 20-^{13}C]Retinal to be 13-*cis* and 15-*anti*.

序論

バクテリオロドプシン(bR)は高度好塩菌の紫膜中に存在し、248残基のアミノ酸残基とシッフ塩基結合で結ばれる発色団レチナールからなる7本膜貫通タンパク質である。レチナールは光励起によって異性化し、基底状態からK，L，M，N，O-中間体を経て基底状態に戻るフォトサイクルを形成し、bRはそのフォトサイクルが1回転する間に、一つのプロトンを細胞質側から細胞外側へ輸送する。M-中間体はレチナールのプロトン化シッフ塩基からの脱プロトン化反応を担うため、プロトン輸送の機能において重要な役割を果たしているが、寿命が短いため、フォトサイクル反応が効率よく進む温度域では固体NMRでの観測が困難であり、動的な構造情報は少ない。そこで、本研究ではM－中間体を長寿命化する特徴をもっているD96N-　変異体を用い、当研究室で開発した*in-situ*光照射固体NMRによって、M-中間体を定常的に捕捉し、光励起中間体のレチナールおよびタンパク質の局所的な構造変化の解析を目的とした。

固体NMR，膜タンパク質，バクテリオロドプシン

○おおたにゆうと，しげたありす，まきのよしてる，みやさりょうた，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

bR

実験

高度好塩菌を安定同位体標識アミノ酸、[1-^{13}C]Tyr, [^{15}N]Proを含む培地で培養し、D96N-bR変異体を大量発現させ、精製した。精製したD96N-bRをフォトブリーチした後に[14, 20-^{13}C]レチナールの再構成を行うことで[14, 20-^{13}C]Ret-[1-^{13}C]Tyr-[^{15}N]Pro-D96N-bR試料を調製した。その試料を5 mM Tris, 300 mM NaCl, pH 9のバッファーで置換し、十分に水和したペレットを、ジルコニア製のMAS試料管に入れ、自作のガラスキャップで蓋をし、試料管内部からの連続光照射下で固体^{13}C-NMR測定を行った。測定条件はMAS周波数4.0 kHz、測定温度は-30℃とし、運動性の低い膜貫通領域の測定のためCP-MAS法を用いた。また、光源として緑色LED光(520 nm)と青色LED光(365 nm)を用いた。測定はまず暗条件で測定し、その後、緑色LED光を照射しながら測定を行い、再び暗条件下で測定を行うことで、NMR信号の変化を観測した。測定は暗順応状態(D1)→緑色光照射状態(L1)→暗条件下(D2)→緑色光照射状態(L2)→青色光照射状態(BL)→暗条件下(D3)→緑色光照射状態(L3)→暗条件下(D4)の順で測定を行った。

結果および考察

[14, 20-^{13}C]Ret-[1-^{13}C]Tyr-[^{15}N]Pro-D96N-bR試料を-30℃において暗条件で測定を行うことにより、暗順応状態(DA)スペクトル(Fig.1(a))を得た。次に、緑色LED光を照射した状態で測定を行い、緑色光によって励起された状態(L1)スペクトル(Fig.1(b))を得た。その後、緑色LED光を止め、暗条件下で測定を行うことで、明順応状態(LA)スペクトル (Fig.2(a))を得た。また、それぞれのFIDを変化後から変化前を引き算した差スペクトル(L1-DA)(Fig.1(c))および(LA-L1)(Fig.2(c))を得た。この差スペクトルでは負の信号は反応物、正の信号は生成物を表す。

Fig.1(a)より、暗順応状態において22.7 ppmと13.1 ppmの信号が観測された。この22.7 ppmの信号は13-*cis*, 15-*syn*型(CS)、13.1 ppmの信号はall-*trans*型(AT)と帰属した。また、Fig.1(c)の差スペクトルにおいて、22.7 ppmと13.1 ppmの信号が減少し、20.0 ppmと18.6 ppmの信号が増加している。ここから、緑色光照射によって、CSとATがともに、M-中間体とN-中間体に変化していることが示された。

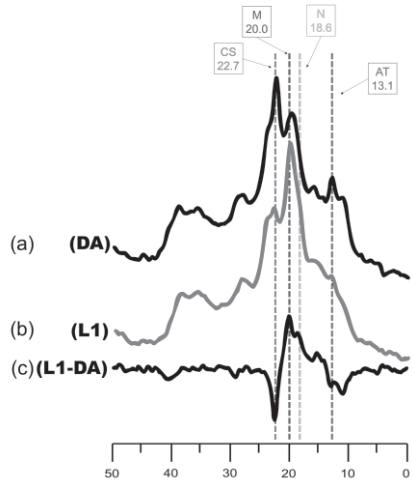


Fig.1 [20-^{13}C]Ret ^{13}C-NMR spectrum DA→L1

Fig.2(c)より、光照射状態から明順応状態にすることによって、20.0 ppmと18.6 ppmの信号が減少し、13.1 ppmの信号が増加している。ここから、緑色光を止めることでM-中間体とN-中間体が熱緩和により、ATに戻ることが示された。

また同様に、[14-^{13}C]Retのスペクトルにおいても M-中間体及びN-中間体に由来する信号が得ることができた。

以上より、D96N-bR変異体におけるM-中間体とN-中間体の[14, 20-^{13}C]レチナールのNMR信号の観測から配座の帰属に成功した。

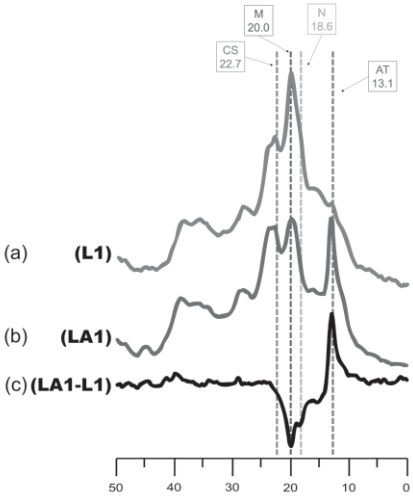


Fig.2 [20-^{13}C]Ret ^{13}C-NMR spectrum L1→DA

結論

In-situ光照射固体NMRによって、観測が困難な光中間体の捕捉及び構造決定が可能であるということが示された。討論会ではタンパク質側の構造変化についても議論したい。

[1]H.Yomoda et al. (2014) *Angew. Chem. Int. Ed.* 53 6960-6964.

P54

13-*cis*, 15-*syn*型バクテリオロドプシンの光中間体の*in-situ*光照射固体NMRによる検出

○重田安里寿[1]，大島恭介[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・院・工
[2]神戸薬科大学
[3]兵庫県立大学

Photo-irradiating solid-state NMR detection of photo-intermediate in 13-*cis*, 15-*syn* photocycle of bacteriorhodopsin

○Arisu Shigeta[1], Kyosuke Oshima[1], Izuru Kawamura[1], Takashi Okitsu[2], Akimori Wada[2], Satoru Tuzi[3], and Akira Naito[1]
[1]*Graduate School of Engineering, Yokohama National University, Japan.*
[2]*Kobe Pharmaceutical University, Japan.*
[3]*Univesity of Hyogo, Japan*

Bacteriorhodopsin is a membrane protein extracted from *Halobacterium salinarum*. Retinal inside bacteriorhodopsin isomerizes when light irradiated and expresses its function as proton pump. Comparing with other rhodopsins, bacteriorhodopsin has an additional characteristic isomer of 13-*cis*, 15-*syn* which is one of two ground states with all-*trans*. Revealing how the 13-*cis*, 15-*syn* retinal relates to the function is the purpose of this research. Using *in-situ* photo-irradiating solid state NMR, ground state and intermediates were trapped such as 13-*cis*, 15-*syn*, CS* intermediate, all-*trans*, N intermediate, O intermediate and existence of a photocycle for 13-*cis* was elucidated from the pathways changing from one intermediate to another.

序論

バクテリオロドプシン(BR)は古細菌由来のプロトンポンプタンパク質であり、高度好塩菌*H. salinarum*の細胞膜中にバクテリオロドプシンのみが結晶格子を作る紫膜が存在する。このタンパク質は7本膜貫通構造をしており、タンパク質中にレチナール色素を有しているため(K216とシッフ塩基結合)、タンパク質特有の紫色を呈している。レチナールは光異性化することで複数の中間体を経由し基底状態に戻り、その過程でプロトンを細胞内から細胞外へ輸送する光駆動型プロトンポンプ活性を発現する。暗所では、all-*trans* (AT)：13-*cis*, 15-*syn* (CS)が1:1で存在している(暗順応状態)が、光照射により~100% AT(明順応状態)へと変化しK, L, M, N, O中間体を経由する。この暗順応状態のCSから明順応状態のATへの変化は直接変化だと考えられている。一方、CS型レチナールを基底とするフォトサイクルの存在が過去に一部の論文で報告されている。以上の背景から、本研究ではこの13-*cis*, 15-*syn*型フォトサイクルおよびタンパク質構造変化の解明を目的とし、光照射固体NMRを用いた実験を行った。

光照射固体NMR, 膜タンパク質, バクテリオロドプシン

○しげたありす, おおしまきょうすけ, 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

方法

レチナールおよびタンパク質の構造変化を観測するため、[20-^{13}C]Retinal, [1-^{13}C]Tyr-WT bRおよび[14, 20-^{13}C]Retinal, [1-^{13}C]Tyr-Y185F bRを調製した。レチナール13-*cis*/*trans*、15-*syn*/*anti*の構造を明らかにするため、それぞれの構造変化に対応した20位及び14位の炭素を安定同位体ラベルした。測定には当研究室で開発した光照射固体NMR[1]を用いた。この方法は光ファイバーをプローブ外から導入し、試料管内のサンプルにLED光を非接触で照射しながら、MAS条件のもとで測定する方法である。光中間体を捕捉し続けることが可能であるため、時間分解能が低い固体NMRでの観測に適している。

結果と考察

WT bRを20℃、Dark状態で測定したところ、C20のレチナール信号は13-*cis*, 15-*syn* (22.0 ppm) と all-*trans* (13.1 ppm) が1:1で存在する暗順応状態を取っていた。そこへ光を照射すると、~100% all-*trans*(明順応状態)へと変化した。同様の実験を-20℃で行うと、光照射により、13-*cis*から、all-*trans*とは異なる別のピーク(19.6 ppm)に変化した。このピークはDark状態に戻すことで、~100% all-*trans*への変化を観測したため、光定常状態として観測された13-*cis*型の光中間体であると帰属した(CS*)。同様に明順応状態に光照射を行うと、新たにピーク(19.6 ppm)が生じ、Hu et al.[2]の報告により、all-*trans*フォトサイクル中のN中間体であると帰属した。

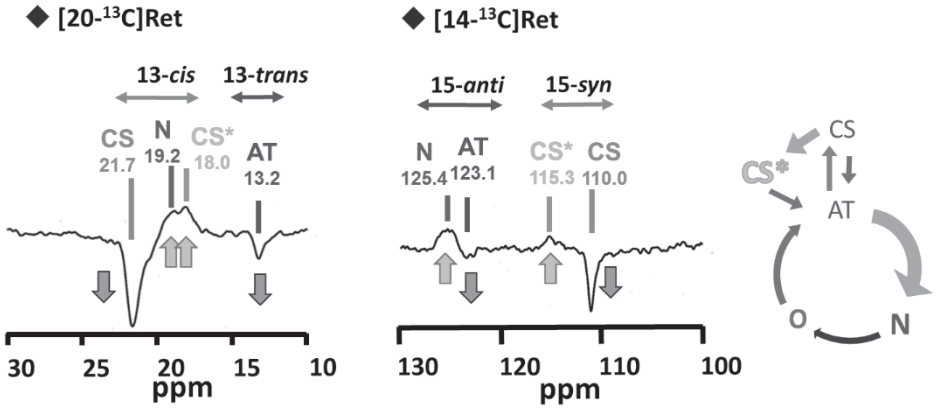


Fig.1 Difference spectra of light-irradiated state and dark-adapted state (negative peak: reactant, positive peak: product)

CS*中間体は13-*cis*, 15-*syn*型のレチナールが存在する最初の段階でのみ捕捉が可能である。暗順応状態で13-*cis*, 15-*syn* (C20: 21.7 ppm, C14: 110.0 ppm) : all-*trans* (13.2 ppm, 123.1 ppm) が約4:1であったY185F変異体を用いることによって、CS*中間体の捕捉率増加及びN中間体とのピークの分離を試みた。WTと同様に測定を行い、CS*中間体(18.0 ppm, 115.3 ppm)、N中間体(19.2 ppm, 125.4 ppm)を捕捉した。C20、C14のスペクトルから、CS*中間体のレチナールの構造は13-*cis*, 15-*syn*であることが明らかになった。また、それらに加え、O中間体(13.2 ppm, 123.1 ppm)も捕捉し、これは固体NMRで初めての観測となる[3]。

光照射固体NMRを用いて13-*cis*, 15-*syn*、CS*中間体、all-*trans*、N中間体、O中間体(Y185Fのみ)中間体を捕捉した。また、それらの変化の経路から、13-*cis*型フォトサイクルの存在が明らかになり、all-*trans*フォトサイクルに加えた新たなフォトサイクルを提唱した。

レチナールの構造変化に対応してタンパク質側にも変化が観測された。WT bRのおいて、レチナールが13-*cis*, 15-*syn*とall-*trans*で構造が異なるにも関わらず、Tyr側のα-helixとloopの2つのピークに変化は見られなかった。しかし、CS*中間体及びN中間体捕捉時はloop側の強度が増加した。N中間体が機能発現に関与していることから、Tyrが同様の構造を取るCS*中間体も機能発現に関与していると示唆された。

引用文献

1) Yomoda, H. et al. *Angew. Chem. Int. Ed.* **53** 6960-6966, 2014.

2) Hu, JG. et al., *Biochemistry* **36**(31), 9316-9322, 1997.

3) Oshima, K., Shigeta, A. et al. *Photochem. Photobiolo. Sci.* **14** 1694-1702, 2015.

P55

固体 NMR によるヒトカルシトニンのアミロイド線維中間体から線維への構造変化の解析

○豊田修平[1]、Lkhamsuren Ganchimeg [2]、Namsrai Javkhlantugs[2]、渡邉(伊藤)ひかり[1]、川村出[1]、上田一義[1]、内藤晶[1]
[1]横浜国大・院工
[2]モンゴル国立大

Characterization of structural changes in the process of amyloid fibril formation of human calcitonin through its intermediate as studied by solid-state NMR

○Shuhei Toyoda[1], Lkhamsuren Ganchimeg[2], Namsrai Javkhlantugs[2] Hikari Itoh-Watanabe[1], Izuru Kawamura[1], Kazuyoshi Ueda[1], Akira Naito[1]
1.Grad. Sch. Eng., Yokohama Natl. Univ. 2 Mongolia Natl. Univ.

Human calcitonin (hCT) is a peptide hormone consisting of 32 residues which is secreted by thyroid gland. However, it forms amyloid fibril and consequently loses the function of hCT. Recently, we determined the structure of full–length hCT fibril grown at pH 7.5 and pH 3.3 by determination of ^{13}C-^{15}N internuclear distances of [1-^{13}C]Phe^{16}, [^{15}N]Phe^{19}-hCT using REDOR method. It is indicated that Phe^{16} and Phe^{19} located one residue away registry in the anti-parallel β-sheet structure at pH 7.5. We considered that charge and aromatic side chains play an important role to stabilize the structure of amyloid fibril. In addition, the same REDOR experiment by using [^{15}N]Asp^{15}, [1-^{13}C]Phe^{19}-hCT to reveal more detailed fibril structure is now underway. Furthermore, we analyzed the structure of fibril intermediate using CP-MAS method. It showed that the intermediate partly has a β-sheet structure.

【序論】hCT (ヒトカルシトニン) は人体の甲状腺より分泌される32残基ペプチドホルモンであり、骨にある破骨細胞に作用し、骨からの Ca^{2+} の放出を抑制する。そのため従来、骨粗鬆症治療薬として用いられていたのだが、水溶液中でミスフォールディングを起こしてアミロイド線維を形成することが分かり、現在使用が中止されている。線維が蓄積することでアミロイド病を引き起こすことが知られており、hCT 線維では「破骨細胞に対する不活性化」、「線維中間体による細胞破壊」など生体に対して悪影響を与えると考えられる。ペプチドの機能と構造は密接な関係にあるため、線維の構造を明らかにすることは重要である。さらに近年では、アミロイド線維中間体に毒性があることも疑われており、中間体の構造解明も重要な研究課題である。

現在、当研究室において hCT アミロイド線維の二次構造、線維形成速度を明らかにしてきたが、線維および線維中間体の詳細な立体構造は明らかになっていない。そのため、本研究では線維の特定残基について、REDOR 法を用いることで異種核間の距離を測定し、詳細な線維構造を解析した。また線維中間体において CP-MAS 法を用いることで二次構造情報を得た。本研究は将来、線維形成阻害剤の開発や、アミロイド病の原因の究明に繋がると考えている。

REDOR、アミロイド、ヒトカルシトニン

○とよだしゅうへい、るくはむすれんがんちめぐ、なむすらいじゃぶからんたぐす、わたなべ（いとう）ひかり、かわむらいずる、うえだかずよし、ないとうあきら

【実験】ペプチド合成機を用いた固相合成法により、①[1-^{13}C]Phe^{16}, [^{15}N]Phe^{19}-hCT ②[1-^{13}C]Gly^{10}, [3-^{13}C]Ala^{26}-hCT を合成し、脱保護、HPLC、空気酸化、HPLC の順で試料調製した。線維は pH 7.5、pH 3.3 の溶媒に①を溶かして作製し、REDOR 法による核間距離測定を行った。線維中間体は②を HEPES 水溶液に溶かして作製し、CP-MAS 法による実験を行った。

【実験結果】< 線維中間体の構造について >

事前に行った TEM による hCT 線維形態観測により、HEPES 水溶液を用いた際、24 h で線維中間体が最も多く存在することが明らかになっていた。そのため、測定では 24 h 後、NMR 設定温度を-30°C に下げて試料を凍結することにより、本来溶液状態では観測できない中間体の構造解析を行った。その結果、22.5 h のスペクトルではそれ以前には見られなかった β-sheet 構造の位置にピークが現れた。また、時間を経るにつれ β-sheet 構造の位置のピークが先鋭になったことから、徐々に線維形成が進行した様子も確認された (Fig.1) 。以上の結果より、線維と同様、線維中間体では部分的に β-sheet 構造を有し、それ以前に α-helix → β-sheet 構造への転移が起こったことが確認出来た。

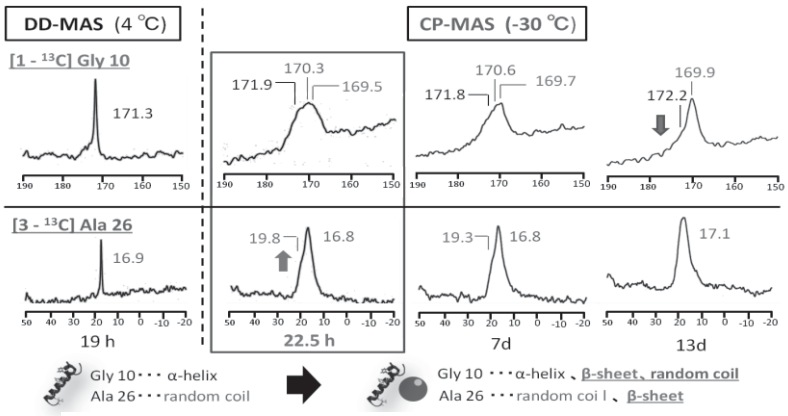


Fig.1 DD,CP-MAS 法による線維中間体の構造解析

< 線維構造について >

^{15}N を観測核とし、REDOR 法により線維間の ^{13}C-^{15}N 核間の距離を測定した。(REDOR 法は MAS の回転に同期させて π パルスを与えることで ^{13}C-^{15}N 原子間の双極子相互作用を復活させ、これによるスペクトルのピークの減少から原子間の距離を決定する手法である。)

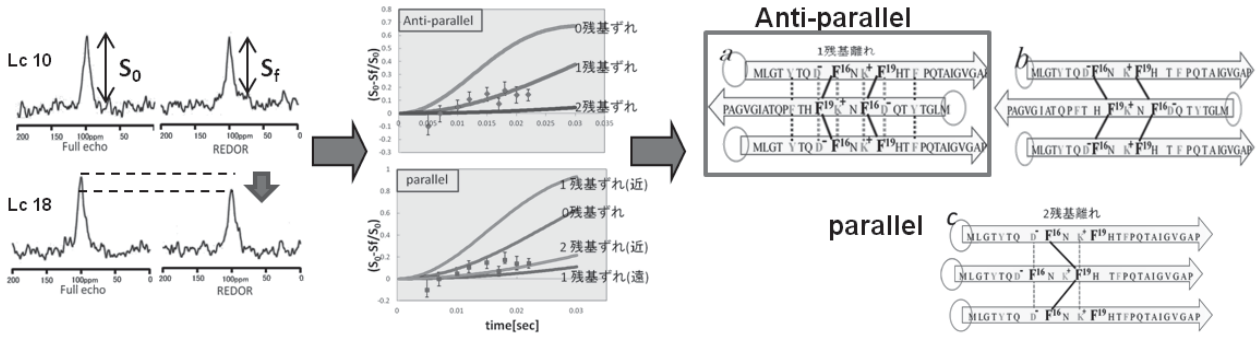


Fig.2 REDOR スペクトル / REDOR 効果のプロットと Anti-parallel および parallel モデルとの比較

REDOR 測定と MD シミュレーションを組み合わせた結果、中性条件で作製した線維では、Phe^{16}-Phe^{19} が 1 残基ずれた位置に存在する anti-parallel β-sheet 構造であることが分かった (Fig.2) 。また、酸性条件ではピークが 2 種類存在し、parallel β-sheet 構造と anti-parallel β-sheet 構造の混在した構造が示唆された。現在、これらの議論を深めるため、安定同位体標識アミノ酸の位置を変え、再び REDOR 測定を行う予定である。

以上の結果から、中間体の β-sheet 構造が毒性と関係していることが考察でき、線維の安定性に電荷と芳香環が寄与していることが分かった。これらは、線維形成阻害剤の開発にも繋がる結果であると考えている。

P56

延伸ならびに水和に伴う^{13}Cラベル家蚕絹の構造転移に関する固体NMR研究

○亀谷　俊輔[1,2]，青木　昭宏[1]，佐藤　佑哉[1]，磯部　洸太郎[1]，朝倉　哲郎[1]
[1]東京農工大学・工学府生命工学専攻
[2]三井化学分析センター

^{13}C Solid State NMR study on the structural change of ^{13}C labeled *Bombyx mori* silk fibroin induced by stretching or hydration

○Shunsuke Kametani[1,2], Akihiro Aoki[1], Yuya Sato[1], Kotaro Isobe[1] and Tetsuo Asakura[1]
[1]*Department of Biotechnology, Tokyo University of Agriculture and Technology,Tokyo, Japan.*
[2] *Mitsui Chemical Analysis & Consulting Service, Chiba, Japan.*

Recently, application of silk fibroin to biomaterials is very active because of the excellent properties for biomaterials. For development of such a silk material, it is important to analyze the structure and structural change occurred under various external forces. For example, biomaterials are generally used in wet state and therefore, the structural analysis in wet state is necessary as well as in dry state.

In this work, the structural change of [3-^{13}C]Ser, [3-^{13}C]Tyr, [3-^{13}C]Ala *B. mori* silk fibroin fiber was studied after stretching or hydration using ^{13}C solid state NMR. Ser and Tyr are rich in the crystalline and non-crystalline domains, respectively. With increasing the stretching ratio, three step elongation of silk fibroin fiber occurs judging from the difference in change of these individual peaks. By hydration, heterogeneous dynamics (fast and slow motion) was observed for these ^{13}C labeled carbons in only random coil domain. Thus, the hydration occurs at crystalline domain as well as non-crystalline domain.

序論

絹は生体適合性に優れ、長年、手術用の縫合糸として用いられてきた実績を持つことから、絹を基盤とした再生医療用材料の研究開発が広く行われてきている。その開発に当たり、絹が開発・使用される環境下での絹物性を把握するとともに、その源となる絹の構造や構造変化の知見を得ることが重要である。延伸を制御した再生繊維として絹を用いる場合は延伸倍率の変化に伴う構造変化を、再生医療用材料として用いる場合は、実際の体内での使用環境である含水状態での構造変化について解析する必要がある。

本研究は、熟蚕前の家蚕に[3-^{13}C]Ser（絹結晶部に多い）および [3-^{13}C]Tyr（絹非晶部に多い）を投与して、絹の^{13}C選択的ラベル化を行った。液状絹を蚕体内から取り出し、直接、延伸を行って繊維化させることで絹繊維の延伸倍率と構造変化の関係について固体^{13}C NMRにより追跡した。また、含水による絹構造変化の検討は、^{13}Cラベル絹繊維を含水させた後、行った。

方法

^{13}Cラベル絹の作製において、[3-^{13}C]Ala残基のラベル化は、家蚕体内での[3-^{13}C]Serからのアミノ基転移反応によって行われた。液状絹の延伸倍率は×1, 3, 4, 6, 7, 8, 13.5とし、^{13}C CP/MAS測定(AVANCE400 Bruker社製)を行った。一方、絹繊維を4 mmϕのNMR試料管内で1日水に浸漬させた後、5 ℃～50 ℃まで温度を変えながら含水状態の^{13}C DD/MAS測定を行った。

^{13}C solid state NMR/ *Bombyx mori* Silk Fibroin /

○かめたに　しゅんすけ，あおき　あきひろ，さとう　ゆうや，いそべ　こうたろう，
あさくら　てつお

結果

Fig.1に延伸倍率を変えた絹繊維の^{13}C CP/MAS NMRスペクトルを示した。未延伸の場合、Silk I* 構造(Type IIβ-turn構造)に特徴的な、シャープな51 ppmのAlaCα,177 ppmのAlaCO および60.2 ppmのSerCβピークが観測される。全Ser残基中でのSilk I* 構造の割合は28%であり、結晶域と考えられる一次構造(AGSGAG)の全繰り返し構造中のSerの割合、68%よりも少なく、(AGSGAG)nのnが長い場合の割合に対応する。すなわち、nが短い場合のSer残基はSilk I* 構造に含まれないことがわかる。

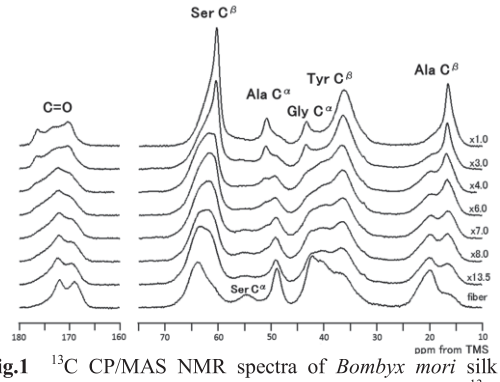


Fig.1 ^{13}C CP/MAS NMR spectra of *Bombyx mori* silk fibroin where Ser ,Tyr and Ala Cβ carbons were ^{13}C labeled. The stretching ratio was changed from x1 to x13.5. The spectrum of the silk fiber was also shown.

Fig.2は、SerCβピークに対してカーブフィッティングを行うことで算出した、各延伸倍率におけるSilk I*構造、β-sheetおよびrandom coilの割合である。4倍延伸まで、Silk I* 構造が明確に残っている。延伸に伴い、Silk I*構造が消失すると、急にrandom coilが減少し、β-sheetが増えることが分かる。

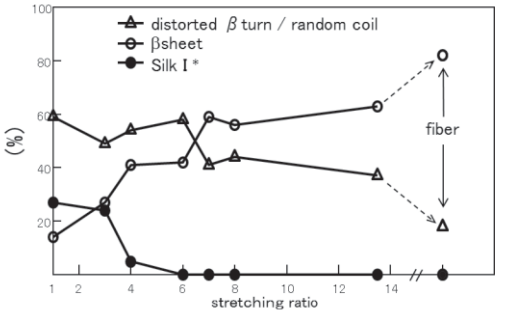


Fig.2 Fraction of Silk I (closed circle) , distorted β-turn /random coil (triangle) and β-sheet (open circle) structure of Ser residues of *Bombyx mori* silk fibroins plotted against stretching ratio determined from the Ser Cβ peak in the ^{13}C CP/MAS NMR spectra. The data of the Ser residues in the silk fiber were also shown.

一方、Tyr残基は未延伸の場合、random coilのみでSilk I* 構造形成に関わっておらず、延伸倍率の増加に伴い、周囲がβ-sheet構造になるにつれて構造転移を起こし、β-sheet構造の割合が増える。このように、延伸に伴い、三段階の構造変化が起こることが分かる。

続いて、含水に伴う絹繊維の構造変化を検討した。Fig.3は、絹繊維のWetの場合について、Ser、Tyr、Ala部位の^{13}C DD/MASスペクトルを示した。含水しても、Ser、TyrおよびAla残基のβ-sheet構造の割合は殆ど変わらないが、random coilのピークの中に、シャープなピークが出現する。これは、含水に伴い、random coil領域に水が一部浸入し、その運動性が増加したことを意味する。その割合は、random coil全体に対して、Ala残基で25%、Ser残基で22%、Tyr残基で11%であり、Tyr残基が最も水とアクセスしにくい事がわかる。従来、一般に、水は材料の非晶部に先ず、アクセスするように言われてきたが、少なくとも、絹繊維の場合には、非晶部のTyr残基は、むしろ、水とアクセスしづらいと言える。

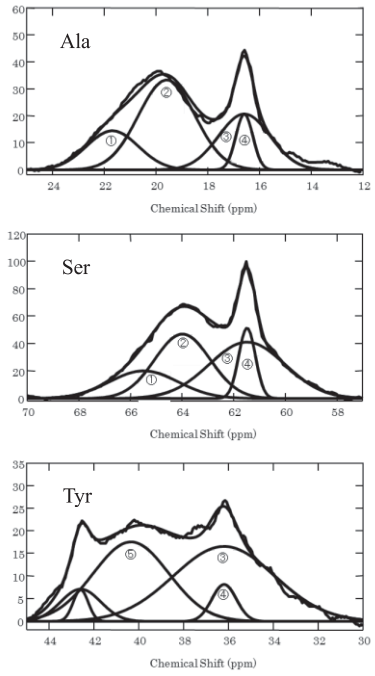


Fig.3 The observed and calculated ^{13}C DD/MAS NMR spectra of Ala Cβ, Ser Cβ and Tyr Cβ carbons of [3-^{13}C]Ala, [3-^{13}C]Ser and [3-^{13}C]Tyr-silk fibroin fiber in a wet state. ① β-sheet B, ② β-sheet A, ③ random coil, ④hydrated random coil, ⑤β-sheet

以上のように、家蚕絹の^{13}Cアミノ酸の選択的ラベル化と固体NMR解析を組み合わせることによって、延伸や水和による絹構造の変化を結晶と非晶の領域毎に別々に検討することができた。その結果、再生医療用材料の開発に向けて、従来の推測や議論とは異なる新たな知見を得ることができた。

本研究は、一部、平成26年度科研費基盤AならびにImPACTプロジェクトにより実施された。

P57

^{13}C固体NMRを用いた細胞膜中に存在するフォボロドプシンのTyr174とTyr199の水素結合変化解析

○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]、川村出[1]
[1]横浜国大・院工、[2]神戸薬大、[3]岡山大・院医歯薬、[4]北大・院生命理

Hydrogen bond alteration of Tyr174 and Tyr199 in phoborhodopsin which exists in cell membrane as studied by solid-state ^{13}C NMR

○Ryota Nishikawa[1], Takashi Okitsu[2], Akimori Wada[2], Yuki Sudo[3], Naoki Kamo[4],
Akira Naito[1] and Izuru Kawamura[1]
[1]*Grad. Sch. Eng., Yokohama Natl. Univ.*
[2] *Kobe Pharm. Univ.*
[3] *Grad. Sch. Med. Dent. Pharm. Sci., Okayama Univ.*
[4] *Grad. Sch. Life Sci., Hokkaido Univ.*

Pharaonis phoborhodopsin (*p*pR) is a 7-transmembrane photo-receptor with a retinal chromophore which acts repellent phototaxis sensor. Tyr174 and Tyr199 residues in *p*pR play important roles to relay the photo-signal toward its cognate transducer protein [1]. We prepared *p*pR with site-specific ^{13}C labeled reconstituted into the EggPC lipid bilayers. Here we present solid-state ^{13}C NMR spectra of [14, 15, 20-^{13}C]retinal, $^{13}C_{\zeta}$-Tyr and $^{13}C_{\varepsilon}$-Lys in *p*pR, T204A, D75N and Y199F. We observed each of the correlated peaks of C_{ζ}-Tyr174 and C14, C15-retinal with C20-retinal by proton-driven spin diffusion (PDSD) 2D NMR. We successfully assigned ^{13}C chemical shifts of C_{ζ}-Tyr174 and C_{ζ}-Tyr199. Moreover, C14-retinal NMR signal was observed clearly. We suggested important hydrogen-bond environment vicinity of retinal by comparing the structure with its mutants.

【緒言】ファラオニスフォボロドプシン(*p*pR)は、高度好塩好アルカリ性菌 *Natronomonas pharaonis* 由来の発色団レチナールを有する 7 本膜貫通型光受容膜タンパク質である。レチナールの光異性化時の変化が立体障害として蛋白質サイドに伝達されることで、細菌の青色光に対する忌避応答（負の走光性機能）を発現する[1]。私達は生理条件に類似した状態（十分な水和率で細胞膜中に存在、室温環境下で測定）の野生型 *p*pR と T204A 失活変異体の ^{13}Cζ-Tyr174 由来の信号解析を暗状態で行い、比較することにより活性発現に必須なレチナール近傍の水素結合環境を明らかにすることに成功した。そして *p*pR と *p*HtrII の複合体形成に重要とされている Tyr199 のζ位の信号は、*p*pR 単体、ppR/pHtrII 複合体、Y199F 変異体 CP-MAS 1D NMR スペクトルデータの比較により帰属した。今後、*p*pR と T204A の C14, C15, C20-レチナールの信号帰属を行い、レチナールとその近傍の構造、つまりレチナールと Tyr174 の位置関係やレチナールのねじれ構造等を解析し、さらに in-situ 光照射固体高分解能 MAS NMR により ^{13}C 標識 *p*pR/*p*HtrII 複合体を測定し、光活性状態と暗状態の ^{13}Cζ-Tyr の信号を比較することで、光活性時の水素結合強度の変化を明らかにする予定である。

固体NMR, 膜タンパク質, PDSD

○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, かわむらいずる

【実験】本研究では野生型*p*pRとその変異体T204A, D75N, Y199F、さらに固有の信号伝達蛋白質である*p*HtrII(1-159)を調製した。研究対象タンパク質のプラスミドを導入した大腸菌BL21(DE3)株を、^{13}C標識レチナール, ^{13}Cζ-Tyr, ^{13}Cε-Lysを加えたM9培地での培養により大量発現させたタンパク質を精製することで、^{13}C標識試料を得た。これをEgg PC脂質膜（ゲル－液晶相転移温度：4℃）に再構成することでNMR測定試料とした。*p*pR/*p*HtrII複合体試料の場合は先に２つのタンパク質を数時間混合した後に再構成した。^{13}C 固体NMR測定は、試料を4 mmのMASローターに詰め、Bruker 600 MHz Avance III 分光器を用いて、Glycine粉末のカルボキシル炭素の信号176.03 ppm（TMS 0 ppm）を基準とし、MAS回転周波数は主に11.0 kHz、測定温度27℃で行った。プロトン駆動スピン拡散(PDSD) 2D NMRの混合時間は500 msとした。

【結果と考察】*p*pR中には11残基のTyrが存在するため、CP-MAS 1D NMRでは155～158 ppm付近にTyr由来の信号が重なって現れた。^{13}Cζ-Tyrの化学シフト値からは水素結合や側鎖の構造変化の情報が得られるため、重なった信号からTyr174やTyr199の信号を特定するために様々な測定を行った。まず、Proton-driven spin diffusion (PDSD) 2D NMRによって^{13}C20-レチナールと^{13}Cζ-Tyr174の^{13}C-^{13}C交差ピークを観測することに成功した。Tyr174は他のTyrに比べ圧倒的にレチナールの近くに存在するため、選択的に相間ピークを観測できる。この結果から、*p*pRの157.7 ppmの信号をTyr174に帰属した。同様の手法でT204Aの^{13}Cζ-Tyr174由来の信号を158.5 ppmと帰属した。これまでに、化学シフト値と交差ピーク強度についてこのデータの再現性を確認した。この結果からT204Aは*p*pRと比較して約1 ppm低磁場シフトしていることが分かった(Fig.1)。これはレチナール近傍のThr204がAlaに変異したことにより、Thr204とTyr174との間の水素結合が失われ、Tyr174の水素結合に変化が生じたことを示している。

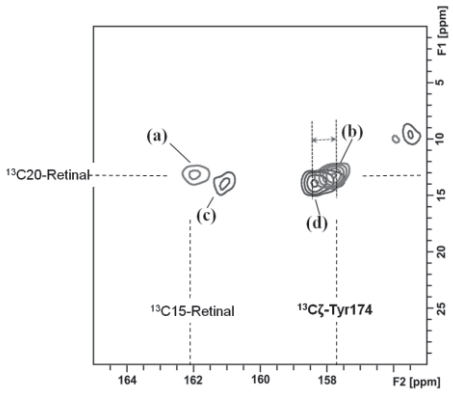


Fig.1 Comparison of PDSD 2D ^{13}C-^{13}C correlation peaks ;
(a) correlated peak of ^{13}C15-Retinal with ^{13}C20-Retinal in *p*pR
(b) correlated peak of ^{13}Cζ-Tyr174 with ^{13}C20-Retinal in *p*pR
(c) correlated peak of ^{13}C15-Retinal with ^{13}C20-Retinal in T204A
(d) correlated peak of ^{13}Cζ-Tyr174 with ^{13}C20-Retinal in T204A

次に^{13}Cζ-Tyr199に注目した。Y199Fと*p*pRのCP-MAS差スペクトルをとることで、155.5 ppmの信号を*p*pR単体における^{13}Cζ-Tyr199由来の信号と帰属した。さらに*p*pR単体と*p*pR/*p*HtrII複合体の差スペクトルから、複合体形成時の^{13}Cζ-Tyr199を157.0 ppmと帰属した。複合体形成によってフリーだったTyr199はAsn74$^{p\mathrm{HtrII}}$と水素結合を形成する。この1.5 ppmのシフト結果は、Tyr199の水素結合有無の変化を^{13}Cζ-Tyrで観測したことを示す。これらのデータから^{13}Cζ-Tyrが水素結合変化に敏感な良いプローブであることが分かった。ゆえに今後、in-situ光照射固体NMRによって*p*pRの光活性中間体のNMR測定を行い、^{13}Cζ-Tyr信号変化から蛋白質側の変化を追い、信号伝達メカニズムの更なる解析に取り組む予定である。

この実験を実現させるためには、それぞれの光中間体を見分ける必要がある。そこで我々は新たに*p*pRの^{13}C14-レチナールの信号を帰属した(Fig. 2)。^{13}C14,20-レチナール由来の信号から各々の光中間体を分離し、それらの^{13}Cζ-Tyr信号変化を観測したいと考えている。

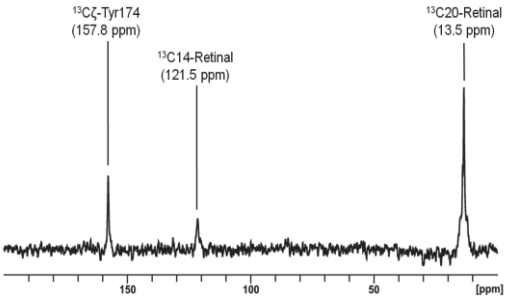


Fig. 2 Cross section of ^{13}C20-retinal at 13.5 ppm with cross peaks of ^{13}Cζ-Tyr174 and ^{13}C14-retinal.

【参考文献】

[1] Y. Sudo & J.L. Spudich (2006) *PNAS.* **103**, 16129-16134

P58

固体NMR法を用いたナトリウムポンプ型ロドプシンの構造解析

○斉藤 優太[1]、田巻 初[1]、江川 文子[2]、菊川 峰志[1]、神谷 昌克[1]、
相沢 智康[1]、藤原 敏道[2]、出村 誠[1]
[1] 北海道大学　大学院生命科学院
[2] 大阪大学　蛋白質研究所

Solid-state NMR structural analysis of the sodium ion-pumping rhodopsin

○Yuta Saito[1], Hajime Tamaki[1], Ayako Egawa[2], Takashi Kikukawa[1], Masakatsu Kamiya[1], Tomoyasu Aizawa[1], Toshimichi Fujiwara[2], and Makoto Demura[1]
[1] Graduate School of Life Science, Hokkaido University, Sapporo, Japan.
[2] Institute for Protein Research, Osaka University, Osaka, Japan.

The microbial rhodopsin family of membrane proteins has divergent functions, such as light-driven ion pumps, photosensors and light-gated ion channels. The first and second ion pumps to be discovered were outward H^+ pump and inward Cl^- pump, respectively. In 2013, the third ion pump capable of outward Na^+ transport (the sodium ion-pumping rhodopsin; NaR) was discovered from eubacteria.

We analyzed uniformly ^{13}C, ^{15}N-labeled NaR reconstituted in DMPC/DMPA by high-resolution solid-state NMR for revealing its molecular mechanism and conformation in the native-like lipid environment. The 2D correlation spectra showed many isolated narrow peaks that can be used to estimate the resolution, structural homogeneity, and secondary structure of the sample. We also carried out 3D spectral measurements, and chemical shift assignments are currently in progress.

【序論】

膜蛋白質の一種である微生物型ロドプシンは、7回膜貫通型α-ヘリックス構造をもち、発色団レチナールがシッフ塩基を介して結合している光受容体である。ロドプシンの機能は、光駆動イオンポンプ・光センサー・光開閉イオンチャネルなど、多種多様なものが存在する。中でもイオン輸送に関わるロドプシンは、光照射により神経の興奮・抑制を制御できるオプトジェネティクス（光遺伝学）ツールとしての応用が期待されており、微生物型ロドプシンのイオン輸送メカニズムの解明や機能変換に向けた研究が盛んに行われている。

1971年には初の微生物型ロドプシンとなるバクテリオロドプシン（H^+ポンプ）が、続いて1977年にはハロロドプシン（Cl^-ポンプ）が発見された。2000年以降にはメタゲノム解析によりプロテオロドプシン（H^+ポンプ）が海洋性細菌から次々と発見された。そして、2013年には第3のイオンポンプに分類されるNa^+ポンプ型ロドプシン（NaR）が真正細菌から発見され、Na^+輸送に起因する分子メカニズムや立体構造に注目が集まっている。

先行研究では、NaRのX線結晶構造解析や可溶化系での機能解析が行われている。しかし、ロドプシンの光反応サイクルは脂質膜中と可溶化系では異なることがあり、NaRのイオン輸送メカニズムを解明するためには、固体NMR法による脂質再構成系での構造解析が非常に重要である。そのため、我々は固体NMR法による脂質再構成NaRの構造解析を行っている。現在までに、2次元および3次元測定を実施しており、本学会ではその成果について報告する。

固体NMR、膜蛋白質、構造解析

○さいとうゆうた、たまきはじめ、えがわあやこ、きくかわたかし、かみやまさかつ、あいざわともやす、ふじわらとしみち、でむらまこと

【実験方法】

^{13}C-グルコース、$^{15}NH_4Cl$を含むM9最少培地を用いた大腸菌発現系により、^{13}C, ^{15}N均一ラベル化NaRを大量発現させた。菌体破砕後の膜画分を*n*-Dodecyl-β-D-maltoside (DDM) で可溶化した後、Ni-NTAアガロースによる精製を施した。この可溶化サンプルをDMPC: DMPA = 9: 1（質量比）の混合脂質へ、蛋白質 : 脂質 = 1: 20（モル比）の割合で再構成し、DDMはバイオビーズで除去した。脂質再構成サンプルを10 mM CHES (pH 9.0), 100 mM NaClで洗浄した後、超遠心分離によって脱水したものを3.2 mmローターに充填し、これを固体NMR試料とした。測定にはJEOL RESONANCE ECA II 600 MHz, 700 MHz, およびBruker Avance III HD 900 MHzを使用した。プローブはいずれも3.2 mm MASプローブを使用し、MASはそれぞれ12.5, 14.6, 15.0 kHzで測定を行った。また、サンプル温度が0-5℃になるようにプローブ温度を調整した。

【結果・考察】

◆二次元^{13}C-^{13}C, ^{15}N-^{13}Cスペクトルによるサンプル評価

^{13}C-^{13}Cスペクトルでは、ほとんどの単一ピークの線幅が1.0 ppm以下であった。また、NaRはB-Cヘリックス間のループ部分にβ-ストランド構造を有しており、それを示すSer C_α/C_β (58-59/63-66 ppm), Thr C_α/C_β (61-64/70 ppm) のピークが確認された（Fig. 1）。

NCAスペクトルでは、$^{13}C_\alpha$の化学シフト45-50 ppmにGly由来の、63-67 ppmにPro由来の単一ピークが複数確認された（Fig. 2）。これらのピークは、膜貫通領域のα-ヘリックス構造由来であると示唆される。

また、この脂質再構成NaRが正常な光反応サイクルを示すことを、過渡吸収分光法により確認した。

以上の結果は、NaRが天然の構造を保持したまま、DMPC/DMPA二重膜中に、非常に均一に再構成されたことを示している。

◆主鎖帰属のための三次元スペクトル測定

主鎖帰属に必要となる CANCO, NCACX, NCOCX スペクトル測定を行った。固体 NMR の CANCO は、溶液 NMR の ^{1}H, ^{15}N-HSQC に相当するスペクトルであり、NaR の残基数の約 70%に相当する 190 ピークを拾い、連鎖帰属可能なピークの分離具合であることを確認した。

現在は帰属を行っており、本学会ではこれらの解析結果について議論したい。

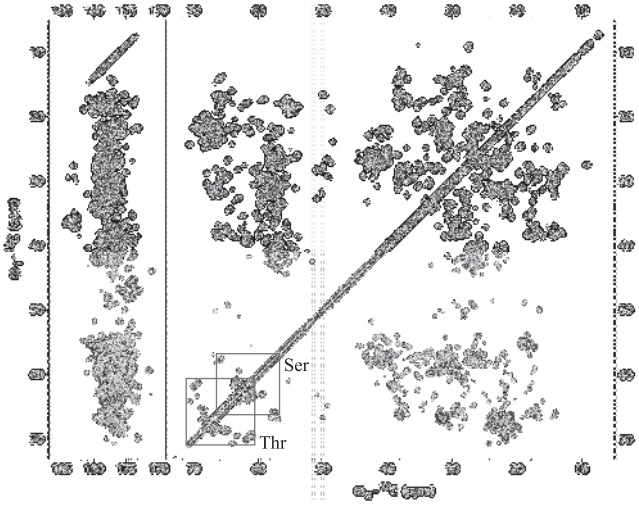


Fig. 1 2D ^{13}C-^{13}C chemical shift correlation spectrum of ^{13}C, ^{15}N-NaR proteoliposomes recorded at 600 MHz, at a spinning frequency of 12.5 kHz. Ser or Thr resonances are shown in the boxes.

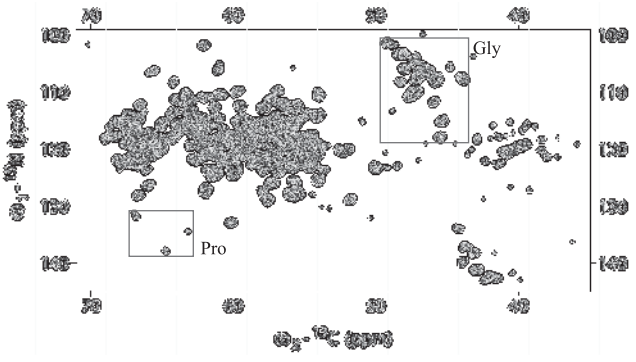


Fig. 2 2D NCA spectrum of ^{13}C, ^{15}N-NaR proteoliposomes recorded at 900 MHz, at a spinning frequency of 15.0 kHz. Gly or Pro resonances are shown in the boxes.

P59

固体NMRによるタンパク質測定への圧縮センシングの応用

○田巻　初[1]，斉藤　優太[1]，江川　文子[2]，菊川　峰志[1]，神谷　昌克[1]
相沢　智康[1]，藤原　敏道[2]，出村　誠[1]
[1] 北海道大学・大学院生命科学院
[2] 大阪大学・蛋白質研究所

Application of compressed sensing to solid-state NMR measurements of proteins

○Hajime Tamaki [1], Yuta Saito [1], Ayako Egawa [2], Takashi Kikukawa [1], Masakatsu Kamiya [1], Tomoyasu Aizawa [1], Toshimichi Fujiwara [2], and Makoto Demura [1]
[1] Graduate School of Life Science, Hokkaido University, Sapporo, Japan.
[2] Institute for Protein Research, Osaka University, Osaka, Japan.

Data sampling reduction using combination of compressed sensing (CS) and non-uniform sampling (NUS) is an attractive approach to obtain high-resolution spectra and gain sensitivity. This approach successfully introduced to solution NMR measurement of many types of multi-dimensional spectra. However, the effectivity of the approach is still unclear in solid-state NMR due to its broadened line width and low sensitivity, especially in the case of large size protein measurement. We applied NUS to a ^{13}C-^{13}C chemical shift correlation spectrum of a heptahelical membrane protein recorded by MAS solid-state NMR and reconstructed by CS using L1-norm as a regularization term. Our results show that the spectral features include linearity of the signal intensity were reproduced by 30 % of a fully linearly sampled data set. Combination of NUS and CS is useful even the case of large membrane protein measurements in solid-state.

圧縮センシング(Compressed sensing, CS)は、劣決定の連立一次方程式でモデリングされた信号処理系において、データのスパース性を利用することにより、限られた出力情報から入力情報を推定する技術である。NMR では間接観測軸の非均一サンプリング(Non-uniform sampling, NUS)により得られた FID の処理に用いられている。CS と NUS の組み合わせによってスペクトルの特徴を保持しながら測定時間を短縮することができるため、高分解能スペクトルの測定や感度向上が期待されている。溶液 NMR では、主鎖帰属や距離情報取得のための 3,4 次元測定、さらに、サンプルの安定性が悪く長時間の測定が難しい膜タンパク質への応用等が報告されている。

NUS で得られた FID を CS によって再構成する際、「多次元スペクトルの大部分の領域には信号がない」というスペクトルの特徴がスパース性として用いられている。固体 NMR は線幅が広く、感度も低いため、このスパース性を満たしづらい。小型タンパク質測定への応用は報告されているが、200 残基を超えるタンパク質については著者らの知る限り報告はない。残基数が増加すれば信号数が増加し、分子数の制限によって感度も低下する。そのため、再構成性能の低下は避けられない。よって、このような悪条件下での性能評価は不可欠である。そこで本発表では約 280 残基の 7 回膜貫通型タンパク質のスペクトルに対する CS と NUS の応用について議論する。

圧縮センシング，非線形サンプリング，膜タンパク質

○たまきはじめ，さいとうゆうた，えがわあやこ，きくかわたかし，かみやまさかつ，
あいざわともやす，ふじわらとしみち，でむらまこと

<方法>

測定試料はDMPC/DMPAリポソームに再構成された^{13}C, ^{15}N均一標識されたナトリウムポンプ型ロドプシン(NaR)を用いた。測定は3.2 mm MASプローブを装備したJEOL RESONANCE ECAII 600 MHzでおこなった。MASは12.5 kHzで、試料温度は5度付近に調整し、信号強度のダイナミックレンジが広い、残基内^{13}C-^{13}C相関スペクトルを測定した。これで得られたFIDの間接軸にPoisson-Gapサンプリングを適用し、NUSをシミュレートした。データ再構成は、スペクトル全体の周波数成分の絶対値和であるL1ノルムを正則化項に、NESTA法を用いて行った。

<結果・考察>

サンプリング密度が10〜90 %のスケジュールを、それぞれの割合について5つずつ作成し、NUSシミュレーションならびに再構成を行い、ピーク強度を元のスペクトルと比較した。比較には、そのサンプリング密度で、ピーク強度の相関係数が最も低いデータを使用した。

Fig.1は元のスペクトルとサンプリング密度が30 %のデータをNESTA法で処理したもの、Fig.2はそのピーク強度相関プロットである。スペクトルの概形はほぼ同じであり、信号強度には定量性が認められる。相対強度が0.1以下のピークについては信号の消失が見られた。

Fig.3は各サンプリング密度におけるピーク強度の相関係数を示している。サンプリング密度が増加するにしたがって相関が回復していることがわかる。長距離相関測定など、信号強度のダイナミックレンジがより広いデータを扱う場合には、サンプリング密度に注意を払う必要がある。

信号数が多く、感度の低い膜タンパク質試料の固体NMRの測定においても、NUSとCSは有用だと考えらえる。しかし、信号強度の定量性については、溶液NMRの場合と比べ悪いため、弱い信号を取り扱う場合には注意が必要となる。ポスターでは、主鎖帰属に使用する三次元測定にNUSとCSを応用した例についても発表する予定である。

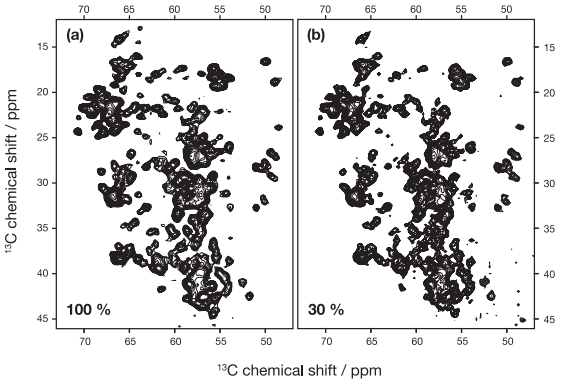


Fig. 1 2D ^{13}Cα-^{13}C (aliphatic) spectra of NaR with 20 ms mixing time. (a) Fully sampling spectrum. (b) Reconstruction from 30 % NUS sampling.

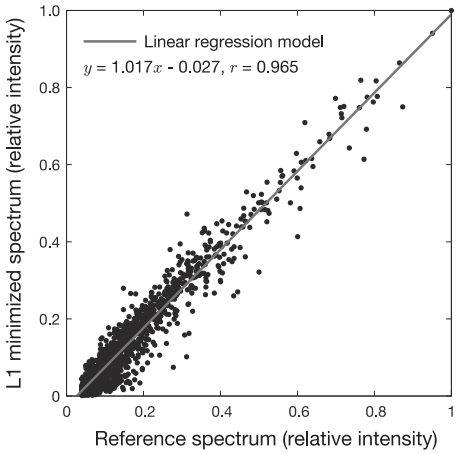


Fig. 2 Correlation of peak intensities between fully and 30% NUS sampling spectra.

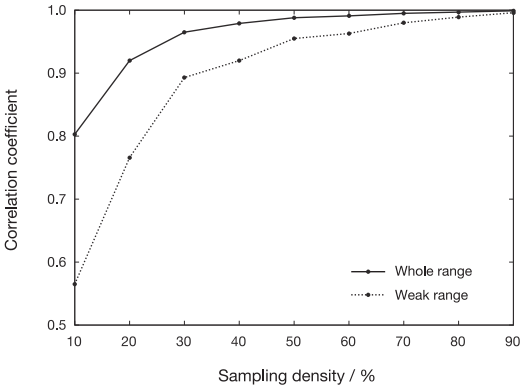


Fig. 3 Correlation coefficients of peak intensities between fully and NUS sampling spectra in various sampling density. The solid line indicates correlation coefficients for all peaks, and dashed line indicates those for the reference peaks whose intensity is less than 0.3.

P60

大腸菌によるユビキチン過剰発現時に合成される単一細胞当りの分子数評価を指向した定量固体NMR法

○山田 和哉[1]、江川 文子[1]、藤原 敏道[1]
[1]大阪大学・蛋白質研究所

Quantitative solid-state NMR method for counting the number of molecules synthesized during the overexpression of ubiquitin in an *Escherichia coli* cell

○Kazuya Yamada[1], Ayako Egawa[1], and Toshimichi Fujiwara[1]
[1] *Institute for Protein Research, Osaka University, Osaka, Japan.*

The quantitative analysis of the biological systems in a living cell is essential to understanding lives. However there are little methods to obtain the quantitative data. Here, we report a method for counting the number of molecules synthesized during the overexpression of ubiquitin in an intact *Escherichia coli* cell by using quantitative solid-state NMR. On the basis of the high-resolution ^{13}C NMR of the cells and the membrane fraction of the cells, it was revealed that not only ubiquitin but also peptidoglycans and lipids were synthesized during the overexpression. Then, the amount of molecules were evaluated from the integral signal intensities. The number of the cells in a sample were counted by a cell counter. From these results, we calculated the number of the molecules in the cell.

【序論】

生命システムを定量的に測定・解析することは、生命の理解に必須である。しかしながら、これまで生命システムを定量的に測定し、解析できる手法は存在しないため、現状ではこれらの情報は全く得られていない。そこで、筆者らは固体NMRを用いて上記の課題を解決できると考えた。なぜなら、固体NMRは低感度だが、低温では原子数とシグナルの積分値が完全に比例し、運動性に関わらず全ての^{13}Cや^{15}N原子を観測し、原子分解能の情報を得ることが可能であるからである。今回は定量固体NMR法を用いて、IPTGを用いた大腸菌過剰発現時に一細胞あたり合成される分子数を計数し、細胞環境を議論することに成功したので、以下に報告する。

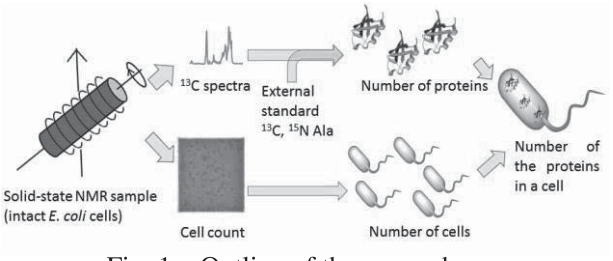


Fig. 1 Outline of the research

手法の概略としては、まず大腸菌をMASローターに詰め、^{13}C-NMR 1次元スペクトルを測定した。その信号積分値と外部標準を用いて作成した検量線から、MASローター中の炭素原子数を求め、さらに分子数に換算した。一方、MASローター中に存在する菌体数はセルカウンターを用いて計数した。最後にMASローター中の分子数を大腸菌数で割ることで、一細胞あたり合成された分子数を見積もることが可能となった。(Fig. 1)

【方法】

実験では、ユビキチンを組み込んだpET21cプラスミドをRosetta (DE3)に形質転換した大腸菌を用いた。培養は、前培養及び本培養を非標識のLB及びM9最少培地で行い、発現誘導直前に菌体を$^{13}C/^{15}N$標識されたM9最少培地に移し、発現誘導時に合成された分子のみ$^{13}C/^{15}N$標識される手法を用いた。[1] 発現誘導時間は4時間とした。また、膜画分は菌体をSDS存在下高温で処理し、遠心分

定量NMR、in-cell 固体NMR、分子数定量

○やまだかずや、えがわあやこ、ふじわらとしみち

離によって調製した。[2] 培養した菌体は集菌後に生理食塩水で洗浄後、直接MASローターに詰めた。膜画分も調製後直接MASローターに詰め、測定に用いた。全ての測定でMASローターは外形4.0 mm、容量35 μLのものを使用した。^{13}C 1Dスペクトルの測定では、定量性を確保するためにCPを含まないパルス系列(DD-MAS)を用い、縦緩和時間の6倍の待ち時間を各測定間に設けた。^{15}N 1Dスペクトルの測定ではCP-MASを用い、同様の待ち時間を各測定間に設けた。2D ^{13}C-^{13}C双極子相関スペクトル(DARR)測定は混合時間60 ms、温度 - 60度でJEOL社の500MHz装置を用いた。

【結果と考察】

菌体の^{13}C 1Dスペクトルでは、殆どのピークがユビキチンのシグナルと一致したが、脂質由来の脂肪族炭素と糖鎖由来の炭素の信号も観測された。また、2D DARR測定でもユビキチンの他に糖鎖由来の信号が観測された。(Fig. 2) これらの結果より、ユビキチン過剰発現でユビキチン以外にペプチドグリカンなど糖鎖を含む分子も合成されていることが強く示唆された。続いて、糖鎖由来のシグナルがペプチドグリカン由来であることを確認するために、膜画分の^{13}C 1D測定と 2D DARR測定を行った。(Fig. 3) 結果、膜画分の糖鎖由来シグナルと菌体の糖鎖由来ピークは完全に一致し、ユビキチン過剰発現時に合成された糖鎖は、膜画分即ちペプチドグリカン由来であることが示された。

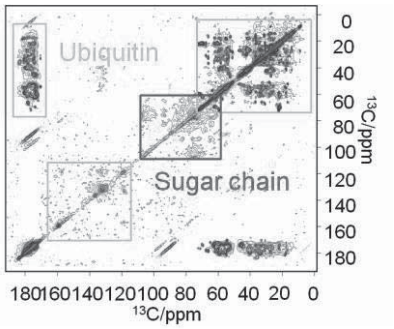


Fig. 2　2D DARR spectra of whole cells (white) and ubiquitin (black)

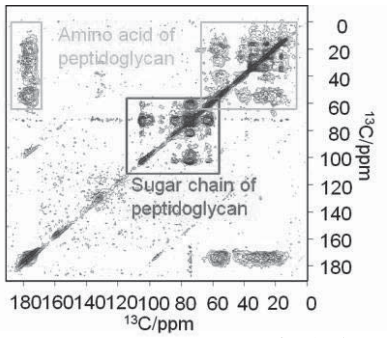


Fig. 3　2D DARR spectra of whole cells (white) and membrane fraction (black)

Table. 1　The number of molecules in one cell

Ubiquitin (molecules / cell)	$(9.5 \pm 0.4) \times 10^6$
Lipid (molecules / cell)	$(1.62 \pm 0.09) \times 10^7$
Peptidoglycan (units / cell)	$(1.39 \pm 0.04) \times 10^7$

一細胞あたりが合成した分子数の見積もりは以下のように計算した。まず、細胞の^{13}C 1Dスペクトルを、ユビキチン、脂質及びペプチドグリカンのスペクトルを用いて、フィッティングした。次にそれぞれのスペクトルの積分値を求め、外部標準の^{13}C 1Dスペクトルから求めた積分値と炭素原子数の比を用いて、MASローター内の炭素原子数に換算した。その値を、それぞれの分子内に存在する炭素原子数と、MASローター内の大腸菌数で割ることで、大腸菌1細胞当りの分子数に換算し、Table. 1にまとめた。

最後に、発現誘導時間を変えて集菌した菌体及びそれらの膜画分を用いて、発現誘導中に合成される分子数の時系列解析を行った。結果、1細胞当りの^{13}C原子数は発現誘導後1時間でほぼ一定数になったのに対し、^{15}N原子数は増加し続けた。これは、炭素源が細胞に早く取り込まれ、アミノ酸前駆体の合成に時間がかかるのに対し、窒素源はアミノ酸前駆体の合成後にゆっくりと取り込まれ、素早くタンパク質に変換されていることを示唆している。

今回のNMR実験で定量的に得られた分子数は、大腸菌細胞の培地からの炭素の取り込み率、ユビキチンの細胞体積に占める割合、ユビキチン合成に関与するリボソームの個数などに関する情報を与える。これらの情報を基に、発現誘導時の大腸菌の状態についての議論を行う予定である。

以上より、本研究ではタンパク質過剰発現時に大腸菌1細胞が合成する分子数を、定量分析可能な固体NMRを用いて見積もった。この結果は大腸菌の分子の取り込みや合成能力を評価し、大腸菌を理解する上で重要な結果である。また、大腸菌のシステム生物学を議論するのに必要不可欠なデータとなる。

【引用文献】

1) Ikeya, T. *et al*. *Nature Protocols*, **2010**, *5*, 1051.　2) Glauner, B. *et al*. *J*. *Biol*. *Chem*., **1988**, *263*, 10088.

P61

*In situ*光照射固体NMRによる光受容センサー膜タンパク質*p*pR/*p*HtrIIの光活性中間体の解析

○槙野　義輝[1]、友永　雄也[1]、日高　徹朗[1]、川村　出[1]、
沖津　貴志[2]、和田　昭盛[2]、須藤　雄気[3]、加茂　直樹[4]、
内藤　晶[1]
[1]横浜国大・院工, [2]神戸薬大, [3]岡山大・院医歯薬、
[4]北海道大・院生命理

Characterization of photo-intermediates of *p*pR/*p*HtrII as revealed by in-situ photo irradiation solid-state NMR

○Yoshiteru Makino[1], Yuya Tomonaga[1], Tetsurou Hidaka[1], Izuru Kawamura[1], Takashi Okitsu[2], Akimori Wada[2], Yuki Sudo[3], Naoki Kamo[4] and Akira Naito[1]
[1]*Grad. Sch. Eng, Yokohama Natl.Univ.*
[2]*Kobe Pharm Univ.*
[3]*Grad, Sch, Med, Dent, Pharm, Okayama Univ.*
[4]*Grad. Sch. Life Sci, Hokkaido Univ.*

*p*pR(*pharaonis* phoborhodopsin) is a photo receptor with a retinal chromophore, and form a complex with its cognate transducer protein *p*HtrII to express negative phototaxis during photocycle through K-, L-, M-, and O-intermediates. To reveal the photoreaction pathway, we measured ^{13}C NMR signal of retinal using *in situ* photo irradiation CP-MAS NMR. We demonstrated that the conformational change of retinal occurred under the photo illumination. Under the green light illumination, the retinal configuration changed from all-trans (13.5 ppm) of ground state to 13-cis (22.1、22.9、23.9 ppm) of the M-intermediates and 13-trans (16.1 ppm) of the O-intermediate. After the accumulation of the M-intermediates, under the UV light illumination, the signal of at 23.9 ppm was not decreased. Therefore, we assigned that the signal is a N-intermediate like bacteriorhodopsin.

［序論］
*p*pRは*Natronomonas pharaonis*の膜中に存在するレチナールを発色団として持つ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*p*HtrIIと2：2の複合体を形成し、負の光走性を担っている。*p*pR複合体はレチナールの光異性化反応に基づくフォトサイクルと呼ばれる特有の光反応経路を経て、負の光走性を示す。膜タンパク質である*p*pRの光刺激に対応した構造変化は、膜中のタンパク質の構造解析が困難であるため、その詳細は解明されていない。近年、我々の研究室で開発した*In-situ*光照射個体NMR装置は微生物由来のレチナールタンパク質(ロドプシン類)の光異性化反応の解明に貢献している[1、2、3]。そこで、*p*pRの光反応過程を明らかにするために*In situ*光照射固体NMR法を用いて光照射下でNMR測定を行った。

*In-situ*光照射固体NMR, 膜タンパク質, レチナール

○まきのよしてる，ともながゆうや，　ひだかてつろう，かわむらいずる，おきつたかし，わだあきもり，すどうゆうき，かもなおき、ないとうあきら

[実験方法]

*p*ppRおよび*p*HtrIIは*E. coli* (BL21)を用いてそれぞれ発現し、*p*ppRは発現過程で[20-^{13}C] retinalを導入することで[20-^{13}C] retinal標識*p*ppRを調製し、可視-紫外吸収分光法や電気泳動法を用いて非標識*p*HtrIIと2：2の複合体を脂質二重膜であるEgg-PC膜に*p*ppR：PC膜＝1：30のモル比で再構成し測定用試料とした。

Fig. 1に示すような*in situ*光照射固体NMR法[1]によって光照射下で^{13}C NMRスペクトルを測定した。光源はLED光を使用し、光ファイバーを用いて試料管に直接光を導入した。光ファイバーをNMR試料管に非接触に固定し、マジック角回転数4 kHzで試料を高速回転しながら光照射下で、^{13}C CP MAS NMR測定を行った。また、光中間体の光反応過程を追跡するために、複数のLED光源が装備された多波長での光照射実験が可能な装置を使用した。[2]。

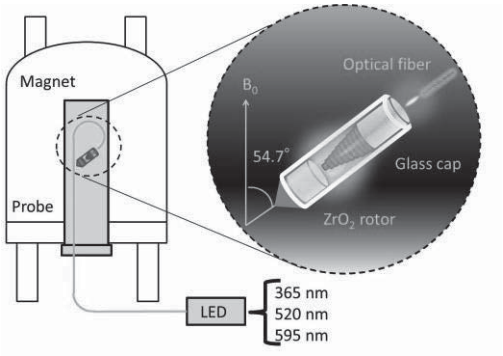


Fig. 1 Photo irradiation solid state NMR system [2]. The light irradiation with three wavelength (520 (green), 595(orange), 365(blue) nm) can be easily switched during measurements.

[結果と考察]

基底状態(G-state)の*p*ppRに－40℃で520 nmの光照射条件で^{13}C NMR測定をしたところ、G状態(13.5 ppm)の信号の減少とそれに伴う13-*cis*配座のM-中間体と考えられる光中間体(22.1、22.9、23.9 ppm)の信号の増加が観測できた(Fig.2)。また同時に、13-*trans*構造のO-中間体を示す16.1 ppmの信号の増加も観測できた。3つの13-*cis*配座の信号の詳細を明らかにするために、十分にM中間体を蓄積させた状態で、光源を365 nmに切り替えたところ、22.1 ppmおよび22.9 ppmの信号は減少した。これはM中間体がシッフ塩基が脱プロトン化しているためにその極大吸収波長が390 nmであるためであると考え、この2つの信号をM-中間体であると帰属した。一方、23.9 ppmの信号は青色光照射によって減少しなかった。よって23.9 ppmの信号を示す中間体はシッフ塩基がプロトン化された状態にあり、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。

以上より、光照射固体NMRを用いることによって、*p*ppRの複数の光中間体の捕捉にとレチナールの構造決定に成功した。

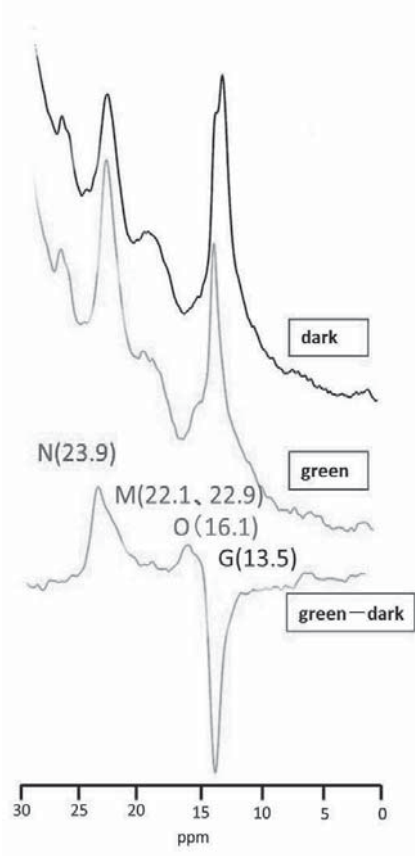


Fig. 2 ^{13}C NMR spectra of retinal in *p*ppR under dark and green light illumination.

[1]Y. Tomonaga, et al. (2011) *Biophys. J.* **101,** L50-L52.

[2]H. Yomoda, et al. (2014) *Angew. Chem. Int. Ed.* **53**(27) 6960-6964.

[3 Kyosuke Oshima, et al. (2015) *Photochem. Photobiol. Sci.* **14** 1694-1702.

P62

ポリ（アリルアミン）／ポリ（γ―グルタミン酸）複合体の固体NMR

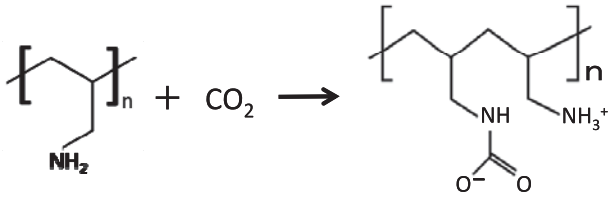
○柿下　拓史，前田　史郎
福井大院工

Characterization of a polymer complex of poly (allyl amine) and poly (γ-glutamic acid) by solid NMR

○Takafumi Kakishita, and Shiro Maeda
Division of Applied Chemistry and Biotechnology, Graduate School of Engineering, University of Fukui, Fukui, Japan.

Molecular structure analysis of polymer complex of poly(allyl amine) (PAAm) and poly(γ-glutamic acid) (γ-PGA) with and without CO_2 bubbling was done by IR and solid NMR. Formation of carbamated PAAm, which is an amphoteric polyelectrolyte, was done by bubbling gaseous CO_2 through aqueous solution of PAAm. Some amino groups of PAAm react with CO_2 to make carbamates, and others form ammonium groups. A hydrogel was formed with mixing carbamated PAAm aqueous solution and γ-PGA/Na aqueous solution.

[はじめに]　微生物産生高分子ポリ(ε-リジン) (ε-PL)は水溶液中で，側鎖アミノ基α-NH_2が空気中の二酸化炭素と反応してカルバメート(-$NHCOO^-$)を形成すること，また空気中に数日放置した水溶液のキャストフィルムにおいて，同時に生成するプロトン化したε-PLの側鎖α-NH_3^+とのイオンコンプレックス形成による自己組織化架橋が生じていることを^{13}Cおよび^{15}N固体NMRを用いて明らかにした[1]。ε-PLと同様に側鎖にアミノ基NH_2を持つポリ（アリルアミン）(PAAm)の水溶液にCO_2をバブリングすると、アミノ基(NH_2)がCO_2と反応してカルバメートアニオン(-$NHCOO^-$)とアンモニウムカチオン(-NH_3^+)になる（Scheme 1）[2]。これをカルバメート化PAAm(PAAm・CO_2)と呼ぶことにする。ε-PL やPAAmのような側鎖にNH_2基を持つ高分子はCO_2をバブリングすることによって両性高分子電解質に変換することができる。PAAm・CO_2水溶液をポリ(γ-グルタミン酸) (γ-PGA)ナトリウム塩(γ-PGANa)水溶液と混合させることで、γ-PGAのCOO^-とPAAm・CO_2のNH_3^+がポリイオンコンプレックスを形成すると予測される。本研究では、PAAm・CO_2およびγ-PGANa水溶液を混合することによって生じた複合体の分子構造をIRおよび固体NMR測定を行うことで検討した。



Scheme 1. Schematic diagram of formation of carbamate with bubbling CO_2 through aqueous solution of poly(allyl amine) (PAAm).

固体ＮＭＲ，二酸化炭素，ポリ（アリルアミン）

○かきしたたかふみ，まえだしろう

[実験]　PAAmはMn=5,000（ニットーボーメディカル、20%水溶液）を用いた。PAAm水溶液にCO_2を30分間バブリング（200mL/min）することによってカルバメート化PAAm水溶液を作成した。γ-PGANaはMw=1500,000～2500,000, D：L=7:3（和光純薬）を用いた。カルバメート化PAAm水溶液と、γ-PGANa水溶液を所定のモノマーユニット比で混合し、テフロンシャーレにキャストして減圧乾燥を行うことで複合体試料を作成した。固体NMRは、3.2mmφCPMASプローブを用い、試料回転数10kHzでJEOL-ECA600 II を用いて測定した。

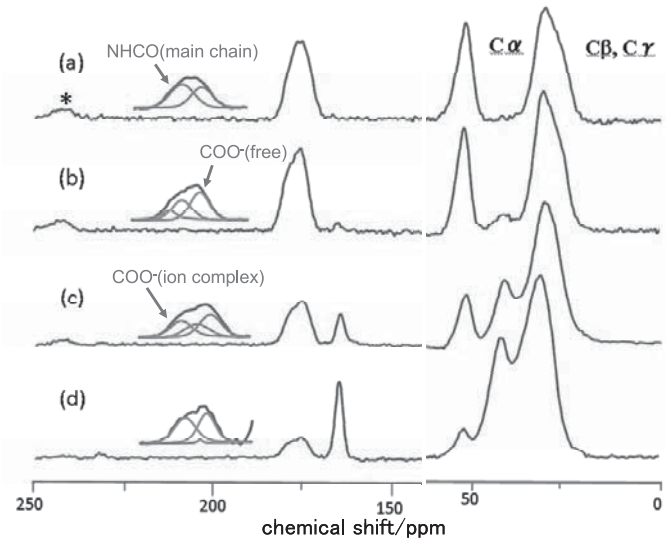


Figure 1. ^{13}C CPMAS NMR spectra of (a)γ-PGA and PAAm·CO_2/γ-PGA.=(b)1/5,　(c)1/1, (d)5/1.
Curve-fittings for C=O peaks of carbamate are shown in the insets.

[結果・考察]　Figure 1(a)に γ-PGA, Figure 1(b), (c), (d)にそれぞれ PAAm·CO_2/γ-PGA.=(b)1/5,　(c)1/1, (d)5/1　の ^{13}C CPMAS スペクトルを示す。PAAm·CO_2/γ-PGA のスペクトルは γ-PGANa のスペクトルとは異なる。γ-PGANa と PAAm·CO_2/γ-PGA のカルボニル炭素のピークはそれぞれ 2 つと 3 つのピークに波形分離することができ、前者の 2 つは主鎖のアミド基とフリーな COO^-のカルボニル炭素に帰属し、後者の残る 1 つはカルバメート化による PAAm・CO_2 の NH_3^+とイオンコンプレックスを形成する COO^-に帰属した。複合体が生成したのはカルバメート化による PAAm・CO_2 の NH_3^+と γ-PGA の COO^-との間に強い静電相互作用が働き、ポリイオンコンプレックスを形成したためであると考えられる。カルバメート（-$NHCOO^-$）のカルボニル炭素のピークは 164 ppm[1]に現れているが、161ppm にもピークが現れており、炭酸水素イオン(HCO_3^-)に帰属している[3]。PAAm・CO_2 水溶液と γ-PGANa 水溶液を混合するとすぐに白濁し、攪拌すると複合体が生じる。一方、CO_2 バブリングをしていない PAAm 水溶液と γ-PGANa 水溶液を混合するとどのモル比でも無色透明の溶液となりゲルは生じない。PAAm・CO_2 水溶液に 2 時間 N_2 ガスをバブリングすると-$NHCOO^-$のピークだけ残ってHCO_3^-のピークは消失する(PAAm·(CO_2+N_2)) [4]。この PAAm·(CO_2+N_2)水溶液と γ-PGANa 水溶液を混合してもゲルは生成しない。HCO_3^-が存在するとゲルが生じ、なければ生じないようにも見える。このゲルの IR スペクトルはカルバメート化によって生成した PAAm・CO_2 の NH_3^+と γ-PGA の COO^-のピークを示した。複合体が生成したのはカルバメート化による PAAm・CO_2 の NH_3^+と γ-PGA の COO^-との間に強い静電相互作用が働き、ポリイオンコンプレックスを形成したためであると考えられるが、HCO_3^-の役割については現在検討中である。

引用文献

[1] S. Maeda, S. Oumae, S. Kaneko, K.-K. Kunimoto, *Polym. Bull.*, **68**, 745-754 (2012).
[2] E. Carretti, L. Dei, P. Baglioni, R. G. Weiss, *J. Am. Chem Soc.* **125**, 5121-5129 (2003)
[3] Y. Li, X. Yu, J. Ho, D. Fushman, N. M. Allewell, M. Tuchman, D. Shi, *Biochemistry,* **49**, 6887–6895(2010).
[4] K. Takagi, S. Maeda, K.-K. Kunimoto, *Polym. Preprints, Jpn.*, **62**(1), 1015 (2013)

P63

ポリ（アリルアミン）塩酸塩／カルボキシメチルセルロース複合体の固体NMR

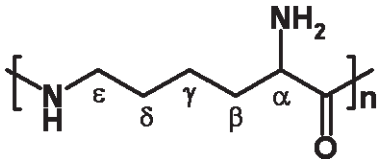
○川口　健，前田　史郎
福井大院工

Characterization of a polymer complex of poly(allylamine hydrochloride) and carboxymethyl cellulose sodium salt by solid NMR

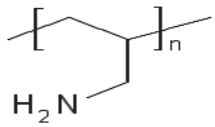
○Takeshi Kawaguchi[1], and Shiro Maeda[1]
Division of Applied Chemistry and Biotechnology, School of Engineering, University of Fukui, Fukui, Japan.

Molecular structure analysis of polymer complex of poly(allylamine hydrochloride) (PAAm･HCl) and carboxymethyl cellulose sodium salt (CMC/Na) was done by IR and solid NMR. PAAm·HCl is a functional polymer having NH_3^+ group in the side chain. CMC/Na is water-soluble, biodegradable and biocompatible and forms anionic polyelectrolyte in aqueous solution. Colorless and transparent hydrogel was formed by mixing the aqueous solutions of PAAm·HCl and CMC/Na. Hydrogels were cast on a Teflon dish and dried in vacuum. IR spectra of hydrogels show a peak of NH_3^+ of PAAm·HCl and COO^- of CMC/Na. Carbonyl carbon peak of PAAm·HCl/(CMC/Na) complex in ^{13}C CPMAS spectrum was curve fitted into two peaks. Downfield side peak at 179 ppm was assigned to -COO^- which forms ion complexes with NH_3^+ and high field side peak at 177 ppm to free -COO^-. Water absorption capacity of the hydrogel depends on the composition of the hydrogel.

[はじめに] 微生物産生高分子ポリ(ε-リジン) (ε-PL) [1](Scheme 1)は水溶液中で，側鎖アミノ基 α-NH_2 が空気中の二酸化炭素と反応してカルバメート(-$NHCOO^-$)を形成すること，また空気中に数日放置した水溶液のキャストフィルムにおいて，同時に生成するプロトン化した ε-PL の側鎖 α-NH_3^+ とのイオンコンプレックス形成による自己組織化架橋が生じていることを ^{13}C および ^{15}N 固体 NMR を用いて明らかにした[2]。また，ε-PL とカルボキシメチルセルロースナトリウム塩(CMC/Na)の混合水溶液に二酸化炭素をバブリングすることによって，カルバメート化した ε-PL の側鎖アミノ基 α-NH_2 と CMC のカルボキシアニオンがポリイオンコンプレックスを形成してゲルを生成することを見出した[3]。本研究では、ポリアリルアミン(PAAm) (Scheme 2)をε-PL のモデル化合物として取り上げ、ε-PL と比較することでゲル形成機構について詳細な情報が得られると考え、PAAm をベースに、CMCNa 水溶液を混合することによって生じたハイドロゲルの分子構造を IR および固体 NMR 測定を行うことで検討した。PAAm は、側鎖にアミノ基を持つ水溶性高分子で



Scheme 1. poly(ε-L-lysine) (ε-PL).



Scheme 2. poly(allyl amine) (PAAm).

固体NMR，ポリ（アリルアミン），ハイドロゲル

○かわぐちたけし，まえだしろう

あり、機能性高分子材料のベースとして、広く用いられており、今回使用したポリアリルアミン塩酸塩(PAAm・HCl)はPAAmの塩酸塩であり、高機能カチオンポリマーである。

[実験] PAAm・HCl(ニットーボーメディカル(株), PAA-HCL-L)とCMCNa(東京化成工業(株), n=500)　水溶液を所定のモノマーユニット比で混合し、テフロンシャーレにキャストして減圧乾燥を行うことで複合体試料を作成した。固体NMRは、3.2mmφCPMASプローブを用い、試料回転数10kHzでJEOL-ECA600Ⅱを用いて測定した。

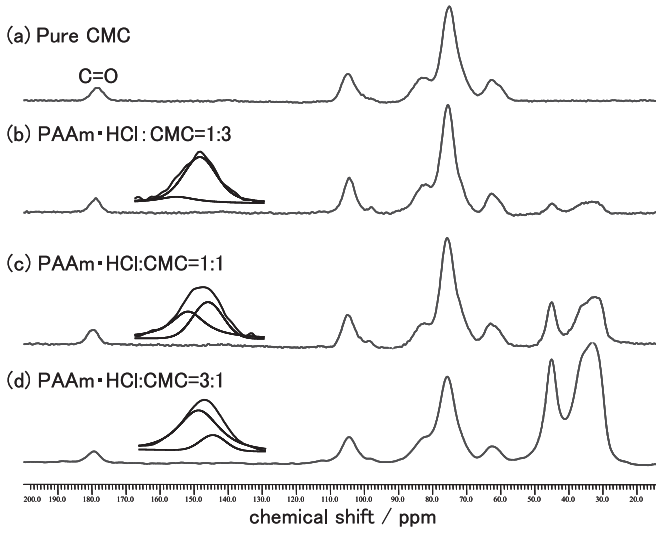
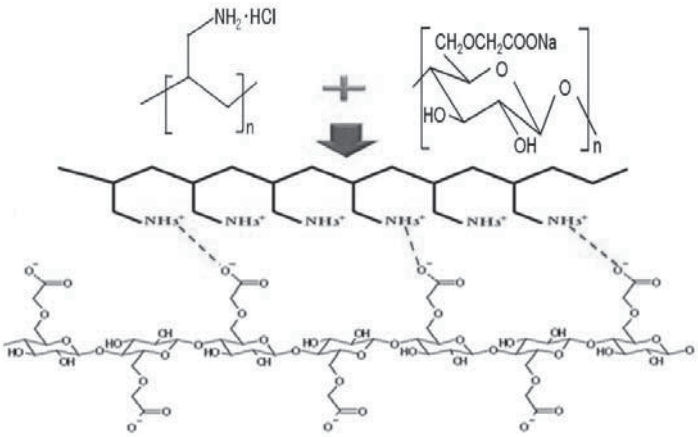


Figure 1. ^{13}C CPMAS spectra of (a)CMCNa and PAAm・HCl/CMCNa= (b)1/3, (c)1/1, (d)3/1. Curve-fittings for carboxyl carbon are shown in the insets.

[結果・考察]　PAAm・HCl水溶液とCMCNa水溶液を所定のモノマーユニット比で混合し、攪拌するとハイドロゲルが生じた。このハイドロゲルのIRスペクトルはPAAm・HClのNH_3^+とCMCNaのCOO^-のピークを示した。CMCNaおよびPAAm・HCl/CMCNa の^{13}C CPMASスペクトルをFigure 1に示す。カルボキシル炭素のピークは2つに波形分離することができ、低磁場側の179ppmのピークをPAAm・HClのNH_3^+とイオンコンプレックスを形成しているCOO^-、高磁場側の177ppmのピークをフリーのCOO^-に帰属した。このハイドロゲルは広く分布した架橋点を持っているため、それが網目構造を取り(Scheme 3) 、溶媒を取り込みやすいと考えることができる。また、ハイドロゲルの吸水率がモルユニット比に依存することを見出した。吸水率の低い複合体が最も架橋密度が高いと推測される。ハイドロゲルを生成したこととIR, 固体NMRの結果より、CMCNaのCOO^-とPAAm・HClのNH_3^+によるイオンコンプレックスを形成していると考えられる。



Scheme 3.　Schematic diagram of PAAm・HCl/CMCNa hydrogel

引用文献

[1] S. Maeda, C. Sasaki, K.-K. Kunimoto, In: H. N. Cheng, *et al*. Ed., "*NMR Spectroscopy of Polymers: Innovative NMR Strategies for Complex Macromolecular Systems*" ACS symposium series, vol. **1077**, chapter 19, pp 317-335 (2011).

[2] S. Maeda, S. Oumae, S. Kaneko, K.-K. Kunimoto, *Polym. Bull.*, **68**, 745-754 (2012).

[3] S. Maeda, K. Kato, K. Takagi, M. Kobayashi, K.-K. Kunimoto, *Int. J. Mod. Phys. B*, **25**, 4315-4318 (2011).

P64

ポリ（アリルアミン）／ポリ（アクリル酸）複合体の固体NMR

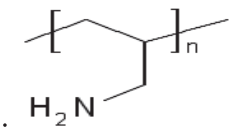
○両角　悠作，前田　史郎
福井大院工

Characterization of a polymer complex of poly (allyl amine) and poly(acrylic acid) by solid NMR

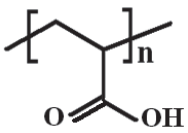
○Yusaku Morozumi and Shiro Maeda
Division of Applied Chemistry and Biotechnology, School of Engineering, University of Fukui, Fukui, Japan.

Molecular structure analysis of polymer complex of poly(allyl amine) (PAAm) and poly(acrylic acid) (PAA) was done by IR and solid NMR. As the PAAm and PAA methanol solutions were mixed, white precipitates appeared and dried in vacuum. IR measurements suggest that amino groups take the protonated cationic form -NH_3^+ and carboxyl groups take the deprotonated anionic form -COO^-. Carbonyl carbon peak in ^{13}C CPMAS spectra of complexes can be curve fitted into two peaks. Downfield side peak at 184 ppm was assigned to -COO^- which forms ion complexes with NH_3^+ and high field side peak at 179 ppm to free -COOH. A broad peak at about 20-38 ppm observed in ^{15}N CPMAS spectra can be curve fitted into two peaks. Downfield side peak at 30 ppm was assigned to -NH_3^+ which forms ionic complexes with -COO^- and high field side peak at 23 ppm to free -NH_2. These experimental data suggest the formation of poly-ionic complexes between PAAm and PAA, as PAAm-$H_3N^+\cdots{}^-OOC$-PAA.

[はじめに] 微生物産生高分子ポリ(ε-リジン) (ε-PL)[1]とポリ（アクリル酸）(PAA)のメタノール溶液を混合すると、白色の沈殿が生じる。これを遠心分離した後に減圧乾燥すると白色粉末状の高分子複合体が得られた。IR 測定の結果、PAA では 1700cm^{-1} 付近に-COOH の強いピークが見られるが、複合体では ε-PL の比率が高くなるにつれて減少し、1400cm^{-1} 付近に脱プロトン化した-COO^-、そして 1670cm^{-1} 付近にプロトン化した-NH_3^+のピークが現れてくる。また、^{13}C 固体 NMR 測定の結果、PAA のカルボキシル炭素のピークは、184ppm のイオンコンプレックスを形成した-COO^-、183ppm の二量体の -COOH、180ppm のフリーまたは分子間水素結合を形成している-COOH の 3 つに波形分離することができた。一方、^{15}N 固体 NMR 測定の結果、ε-PL のアミノ窒素のピークは 38ppm のイオンコンプレックスを形成した-NH_3^+と 26ppm のフリーの-NH_2 の 2 つに波形分離できた。これらの実験結果は、PAA の-COO^-と ε-PL の-NH_3^+とのイオンコンプレックス形成を示唆する[2]。本研究では ε-PL と同様に側鎖-NH_2 基を持つ PAAm と PAA の高分子複合体の構造解析を試みた。



Scheme 1. poly(allyl amine) (PAAm).



Scheme 2. poly(acrylic acid) (PAA).

固体NMR，ポリ（アリルアミン），高分子複合体

○もろずみゆうさく，まえだしろう

[実験] PAAm は Mn=5,000（ニットーボーメディカル、20%水溶液）、PAA は Mn=5,000 (和光純薬)　を用いた。それぞれのメタノール溶液を所定のモノマーユニット比で混合し、テフロンシャーレにキャストして減圧乾燥を行うことで複合体試料を作成した。固体 NMR は、3.2mm φ CPMAS プローブを用い、試料回転数 10kHz で JEOL-ECA600 II を用いて測定した。

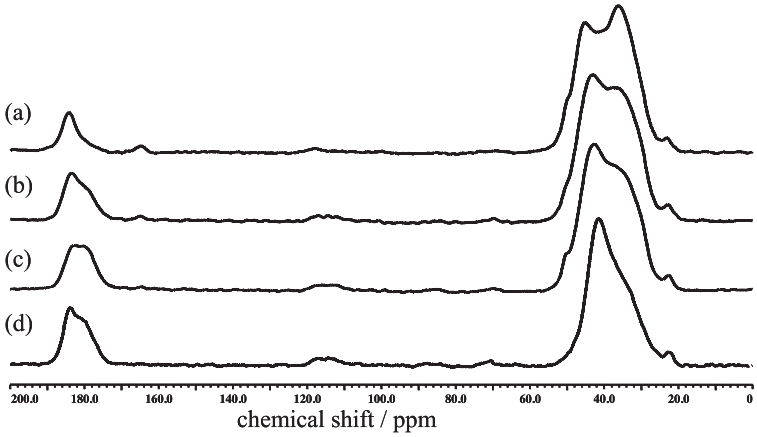
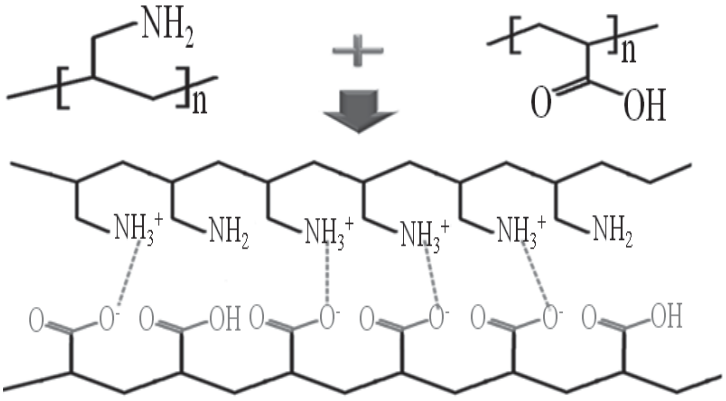


Figure 1. ^{13}C CPMAS NMR spectra of PAAm/PAA and PAA. (a) PAAm/PAA = 3/1, (b) PAAm/PAA = 1/1, (c) PAAm/PAA = 1/3 , (d) PAA.

[結果と考察]　PAAmとPAAのメタノール溶液を所定のモノマーユニット比で混合すると、白色の沈殿が生じた。これを減圧乾燥して得られた粉末試料PAAm/PAAのIRスペクトルには1640cm^{-1}付近にPAAmのNH_3^+と1400cm^{-1}付近にPAAのCOO^-のピークが現れた。PAAおよびPAAm/PAAの^{13}C CPMASスペクトルをFigure 1に示す。カルボキシル炭素のピークは2つに波形分離することができ、低磁場側の184ppmのピークをPAAmのNH_3^+とイオンコンプレックスを形成しているCOO^-、高磁場側の179ppmのピークをフリーのCOOHに帰属した。一方、^{15}N固体NMR測定の結果、PAAmのアミノ窒素のピークは2つに波形分離でき、30ppmのピークをイオンコンプレックスを形成している-NH_3^+、23ppmのピークをフリーの-NH_2に帰属した。これらの実験結果から、Scheme 3に示したように、PAAのCOO^-とPAAmのNH_3^+によるイオンコンプレックスを形成していると考えられる。



Scheme 3.　Schematic diagram of PAAm/PAA

引用文献

[1] S. Maeda, C. Sasaki, K.-K. Kunimoto, In: H. N. Cheng, *et al*. Ed., "*NMR Spectroscopy of Polymers: Innovative NMR Strategies for Complex Macromolecular Systems*" ACS symposium series, vol. **1077**, chapter 19, pp 317-335 (2011).

[2] S. Maeda, Y. Fujiwara, C. Sasaki, K.-K. Kunimoto, *Polym. J*., **44**, 200-203 (2012).

P65

プロトン伝導性無機固体酸塩$Cs_2(HSO_4)(H_2PO_4)$の室温相における水素結合

○林　繁信，治村　圭子
産業技術総合研究所・物質計測標準研究部門

Hydrogen bonds in the room-temperature phase of proton conductive inorganic solid acid salt $Cs_2(HSO_4)(H_2PO_4)$

○Shigenobu Hayashi, Keiko Jimura
Research Institute for Material and Chemical Measurement, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Japan.

It is well known that a high proton conductivity is observed in a high-temperature phase, so-called “a superprotonic phase”, of several inorganic solid acid salts such as $CsHSO_4$ and CsH_2PO_4. In these compounds, tetrahedral AO_4 anions form hydrogen bond networks. Among them, $Cs_2(HSO_4)(H_2PO_4)$ shows a large thermal history. The high-temperature phase is retained for a considerably long period on cooling. These characteristics are expected to correlate intimately with the hydrogen bond networks. In the present work, we have attempted to study the hydrogen bond networks by solid-state NMR. The ^{1}H MAS NMR spectra demonstrate the presence of four types of hydrogen bonds. The $^1H\{^{31}P\}$ REDOR experiments support random distribution of the SO_4 and PO_4 tetrahedra in the hydrogen bond networks.

序論

$CsHSO_4$に代表される無機固体酸塩ではAO_4型（A= S, P, etc.）の四面体イオンが水素結合ネットワークを形成している。これらの物質の中には融点直下の高温相において高いプロトン伝導を示すものがあり、無加湿の状態かつ100～300℃の温度域で使用可能なプロトン伝導材料として有望である。その中で、$Cs_2(HSO_4)(H_2PO_4)$はいったん超プロトン伝導相になると転移点以下でも超プロトン伝導相が長い時間維持される[1,2]。この特異的な性質には水素結合が大きく関係していると予想される。Fig. 3に結晶構造を示した[3]。SO_4およびPO_4四面体が水素結合によって連なっている。SO_4およびPO_4四面体は1:1で存在しているが、ランダムに配置しているとされている。本研究では、^{1}Hおよび^{31}P MAS NMRスペクトルを測定して、$Cs_2(HSO_4)(H_2PO_4)$の室温相における水素結合について調べたので、報告する。

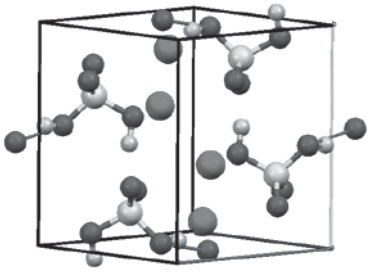


Fig. 1.　Crystal structure of the room-temperature phase of $Cs_2(HSO_4)(H_2PO_4)$.[3]

方法

$Cs_2(HSO_4)(H_2PO_4)$試料は、硫酸セシウム($CsSO_4$)とリン酸(H_3PO_4)を少量の水に溶かし、水分を蒸発させることによって合成した。TG-DTA測定およびXRD測定の結果は文献[1]と一致した。

無機固体酸塩，プロトン伝導，水素結合

○はやししげのぶ，じむらけいこ

^{1}H MAS NMR測定には、ブルカーAvance III HD 600WB（共鳴周波数 600.39 MHz）を用いた。試料回転数によって、外径4、2.5、1.3 mmのローターを使い分けた。^{31}P MAS NMRスペクトルの測定も行った。緩和時間T_1は飽和回復法を用いて測定した。

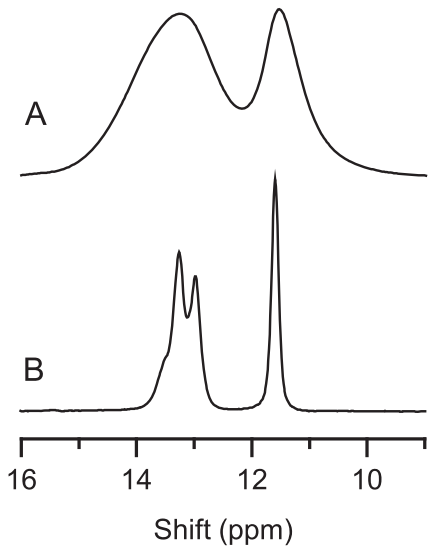


Fig. 2. ^{1}H MAS NMR spectra at spinning rates of (A) 8 kHz and (B) 60 kHz. Repetition times were (A) 600 s and (B) 800 s.

結果および考察

Fig. 2に、^{1}H MAS NMRスペクトルを示した。8 kHzの回転数では2成分の存在しかわからなかったが、回転数を25 kHz以上に上げると4成分の存在がわかった。緩和時間T_1は150 sであり、^{1}Hとしては非常に長く、室温相においてプロトンの運動が起きていないことを示唆した。

Fig. 3に示すように、60 kHzで回転させて測定したスペクトルをピーク分離した。13.5 ppm (7%)、13.3 ppm (39%)、 13.0 ppm (22%)、11.6 ppm (33%)となった。11.6 ppmの成分が1/3を占めていた。13 ppm付近の3成分は重なっているため、相対強度の誤差が大きい。

一方、^{31}P MAS NMRスペクトルは、-3.9 ppmに1成分のみが観測された。T_1は316 sであった。

HはSO$_4$もしくはPO$_4$四面体の間にあり、S-O-H-O-S、S-O-H-O-P、P-O-H-O-Pの3種類の結合様式が考えられる。^{1}Hスペクトルの4成分が3種類の結合様式と何らかの対応を示すかを調べるために、^{1}H{^{31}P} REDOR実験を行った。Fig. 4に結果を示した。4成分とも全く同じ挙動を示し、結合様式とは対応しないことを示した。この結果は、SO$_4$およびPO$_4$四面体がランダムに分布していることを支持している。

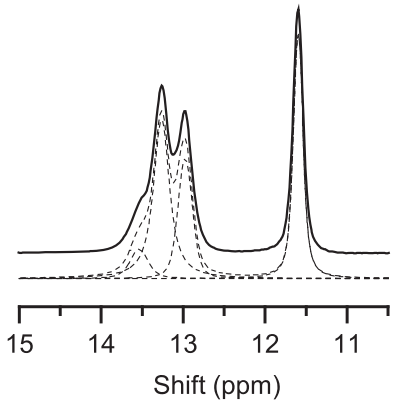


Fig. 3. Deconvoluted results of the ^{1}H MAS NMR spectrum of a sample spinning at 60 kHz. Components are drawn by chain lines.

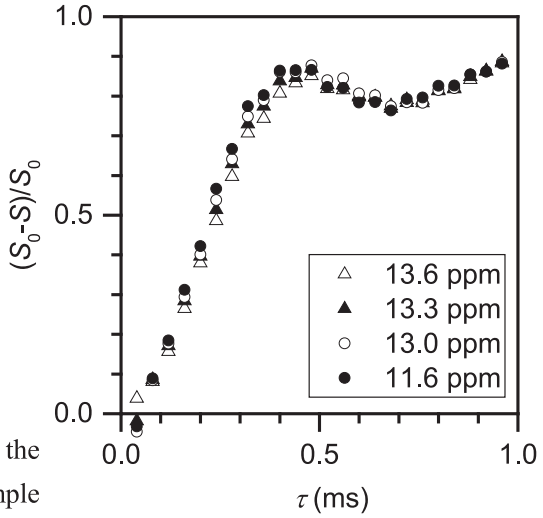


Fig. 4. ^{1}H{^{31}P} REDOR results for the sample spinning at 50 kHz.

謝辞

文科省ナノテクノロジープラットフォーム微細構造解析プラットフォーム事業で整備した装置を使用した。本研究はJSPS科研費15K05405の助成を受けた。

引用文献

1) S. Hayashi, M. Mizuno: *Solid State Ionics* **176**, 745-754, 2005.

2) S. Takeya, S. Hayashi, H. Fujihisa, K. Honda: *Solid State Ionics* **177**, 1275-1279, 2006.

3) C.R.I. Chisholm, S.M. Haile, *Acta Crystallogr., B* **55**, 937-946, 1999.

P66

ゴム材料の^{1}H-T_2緩和解析：ラプラス逆変換法と主成分解析

○角村　将希[1]，浅野　敦志[1]，大窪　貴洋[2]，奥下　慶子[3]
[1]防衛大学校・応用化学科
[2]千葉大学大学院・工学研究科
[3]分子科学研究所

A new approach of the ^{1}H-T_2 Relaxation of Rubber Materials : Inverse Laplace Transform and Principal Component Analysis

○Masaki Tsunomura[1], Atsushi Asano[1], Takahiro Ohkubo[2], and Keiko Okushita[3]
[1] *Department of Applied Chemistry, National Defense Academy, Kanagawa, Japan*
[2] *Applied Chemistry and Biotechnology, Graduate School of Engineering, Chiba University, Chiba, Japan*
[3] *Institute for Molecular Science, Aichi, Japan*

We observed the ^{1}H-T_2 relaxation decays of un-cross-linked and cross-linked polyisoprene rubbers filled with different kinds and quantities of carbon black by means of the pulse NMR method. The observed ^{1}H-T_2 relaxation decays were divided into Gaussian and Exponential components. The former contains the residual dipolar coupling (D_r) and the latter mostly reflects the molecular motion. Furthermore, we estimated the T_2 distribution from the exponential component by the inverse Laplace transform. In addition, the principal component analysis of the T_2 distributions, D_r components, and the ^{1}H-T_2 relaxation decays was performed to reveal the correlation among carbon black species, rubber chain mobility, and physical property.

＜緒言＞　ゴム材料は、カーボンブラック（CB）などの無機物の混練や架橋を行うことにより物性を改良して用いられることが多い。CB充填ゴム材料では、ゴム鎖がCB表層部に吸着して分子運動が束縛される。そのため、ゴム鎖の運動はCBから離れるにつれてバルクと同様の運動性をもつ。架橋すると、架橋点近傍のゴム鎖の運動がさらに付加される。ゴム材料の^{1}H-T_2緩和曲線には、このように広範な運動変化が含まれて観測される。通常、このようなゴム材料の^{1}H-T_2緩和曲線は、運動が極端に遅いガウス関数成分と、それよりも運動が速い指数関数成分の和として解析される。運動の遅いガウス成分は、ネットワーク鎖からの異方的な運動から生じる残余双極子相互作用（residual dipolar coupling; D_r ）を含んでいる。ガウス成分をD_rのみの項で表し、^{1}H-T_2緩和曲線（$M(t)$）を理論的に書き示すと(1)式となる[1)]。

$$\frac{M(t)}{M(0)} = f_{D_r}\cdot\exp\left(-\frac{9}{40}\cdot D_r^2\cdot t^2\right) + f_A\cdot\exp\left(-\frac{t}{T_{2A}}\right) + f_B\cdot\exp\left(-\frac{t}{T_{2B}}\right) \qquad \left(f_{D_r}+f_A+f_B=1\right) \qquad (1)$$

ただし、関数の個数には任意性がある。そこで、実測の^{1}H-T_2緩和曲線を(1)式を用いて最小二乗フィットした後、ガウス関数部分を抽出し、残りの指数関数成分をラプラス逆変換法によりT_2分布として求め任意性を排除した。さらにガウス成分、T_2分布、実測の^{1}H-T_2緩和曲線を統計解析の一種である主成分解析により運動成分を細分化して抽出し、CB近傍の情報取得を目指した。

ラプラス逆変換法，T_2緩和分布，主成分解析

○つのむらまさき，あさのあつし，おおくぼたかひろ，おくしたけいこ

＜実験・解析＞ ^{1}H-T_2緩和減衰曲線は、JEOL社製JNM－MU25パルスNMR装置を用いて測定した。^{1}H観測周波数は25 MHzである。solid echo法によるT_2緩和測定は、積算16回、繰り返し2.0 s、パルス間隔8.0 μs、観測時間1 ～10 ms、測定温度は30℃で行った。Hahn echo法によるT_2緩和測定は、積算4回、繰り返し1.0 s、パルス間隔　50.0 μs、観測時間10～20 msで行った。測定温度は30℃と60℃である。試料は、東海ゴム工業（現、住友理工株式会社）より提供された、CB充填量の異なる未架橋、架橋ポリイソプレンゴム（PI/CB）を用いた。CBは、比表面積の異なる3種類（HAF、FEF、FT）を総表面積が同じになる質量比でそれぞれ混練した。

＜結果・考察＞ Fig. 1 は、Hahn echo 法から得られた架橋 PI/HAF = 100/20.0 の 60℃における ^{1}H-T_2 緩和減衰曲線である。(1)式を用いて解析した結果を実線で示した。残余双極子相互作用の成分を破線で示してある。得られた値はそれぞれ、f_{Dr} = 0.45、D_r = 1492 rad s^{-1}、f_A = 0.49、T_{2A} = 1.32 ms、f_B = 0.06、T_{2B} = 23.8 ms である。観測した ^{1}H-T_2 緩和減衰曲線（○）から残余双極子相互作用の成分を差し引いた ^{1}H-T_2 緩和減衰曲線（△）を、ラプラス逆変換法により T_2 緩和分布として求め、運動成分を視覚化して Fig. 2(A)に示した。PI/CB のうち、(a)PI/HAF = 100/20.0、(b)PI/FEF = 100/36.9、(c) PI/FT = 100/66.4 の 3 種類を代表して示した。充填した CB の表面積の総和は全て等しい（2490 m^2）。

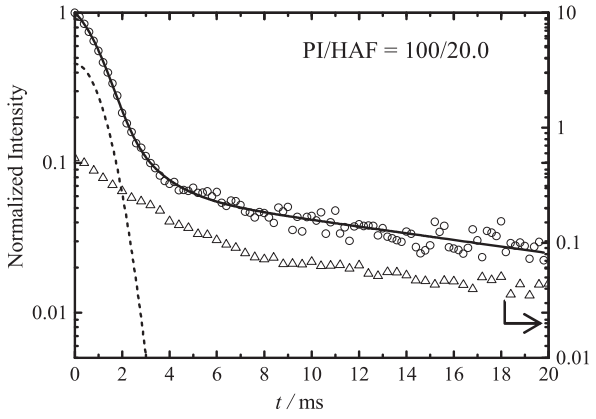


Fig. 1. ^{1}H-T_2 relaxation decay of the cross-linked PI/HAF = 100/20 observed by the Hahn echo method at 60℃. The fitting result using the eq. 1 is drawn by the solid line. The dashed line represents the component of D_r and the subtraction from the observed T_2 decay is shown by (△).

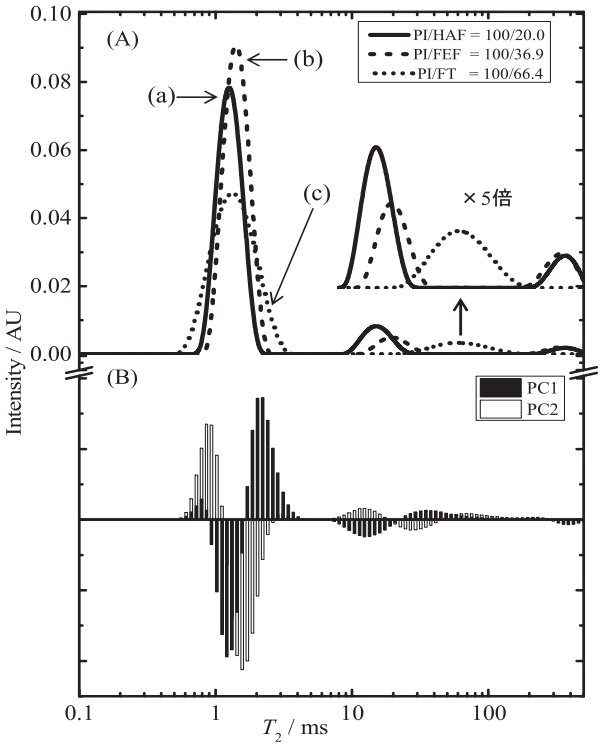


Fig.2 .(A) T_2 distributions estimated from the inverse Laplace transform; (a) PI/HAF = 100/20.0, (b) PI/FEF = 100/36.9, and (c) PI/FT = 100/66.4. (B) the loading plot for PC1 and PC2 obtained from the principal component analysis for all cross-linked polyisoprene rubbers.

PI/HAF と PI/FEF は 3 ヶ所（1.2 ms、15 ms、370 ms 近傍と、1.4 ms、19 ms、350 ms 近傍）、PI/FT は 2 ヶ所（1.3 ms と 60 ms 近傍）に T_2 緩和分布が観測された。これらの T_2 分布は、1 ms 前後の T_2 分布がゴム鎖と相互作用し運動を束縛している成分、350 ms より長い T_2 分布がゴム鎖のバルク状態に近い成分、そして、それらの中間成分（15 ~ 19 ms）を反映していると考えられる。FT は HAF や FEF と比べて比表面積が小さく（HAF を 1 とした時、FEF は約半分、FT は 1/3 の比表面積 ）、同じ表面積にするために CB 充填量が 2~3 倍と多い。そのため、バルク状態の T_2 分布が観測されず 60 ms 付近に T_2 分布が現れたと考えられる。

T_2 分布を求めただけでは CB 近傍の情報が不明確であったので、T_2 分布に隠れた情報を探求するため主成分解析を行った。Fig. 2(B)は、架橋試料の T_2 緩和分布の主成分解析から得られた、PC1（寄与率：61.3 %）と PC2（寄与率：28.5 %）のローディングプロットを示してある。1~2 ms に観測される大きな T_2 分布成分は、PC1 と PC2 の指標では特徴的に分割されることがわかる。例えば、PC1 では 2.2 ms 近傍で正の最大値を示し、1.2 ms 近傍では負の最大値を示す。PC2 では 0.9 ms 近傍で正の最大値を示し、1.0 ms 近傍で負の最大値となった。このローディングプロットと T_2 分布の関係を Fig. 3 に示した。Fig. 3 にはすべての架橋 PI/CB 試料の結果をプロットした。

PC1 と PC2 が両方とも正の領域(+, +)と、負の領域(-, -)、さらに PC1 が負、PC2 が正の領域(-, +)にそれぞれ(c), (b), (a)の試料が帰属されている。Fig. 2 の(c)を見ると、PC1 の 2.2 ms 近傍の正の値、PC2 の 0.9 ms 近傍の正の値まで T_2 分布が拡がっている。また、Fig. 2 の(b)では PC1, PC2 の正の最大値を示す領域には T_2 分布がほとんど存在せず、T_2 分布が狭い範囲にあるという傾向が示される。さらに Fig. 2 の(a)では、PC2 の正の最大値の領域側に T_2 分布が寄っていることがわかる。これらの結果から、PC1 と PC2 の符号が分布幅と関係していることが示された。

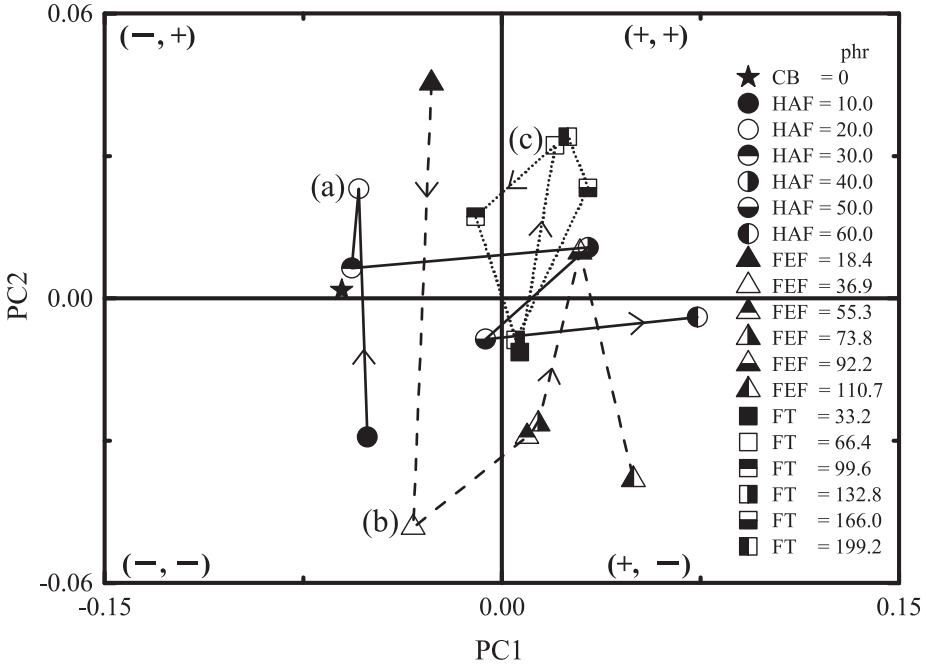


Fig.3 . Score plot of all cross-linked polyisoprene rubbers. The arrow shows the increment of CB quantity.

より試料間の関係をより明確に区分けするため、PC3（寄与率：4.7 %）の軸方向にもデータを展開し、3 次元プロットを行った。結果を Fig. 4 に示した。Fig. 4 の 3 次元プロットから、HAF、FEF、FT の CB の種類別に見比べてみると、FT と FEF は PC3 軸の負側に集中し、また特に FT は PC1~3 軸に関して狭い範囲に CB の添加量に関係なく固まって存在していることがわかる。それらに比べ HAF では、PC3 軸においても正負に大きく拡がり、CB の添加量に応じて運動性が大きく影響を受けていることがわかった。

これらの運動性の違いと応力－ひずみ曲線の関係を比較した。Fig. 5 には(a)~(c)の応力－ひずみ曲線を示した。CB を含有していない架橋 PI（★）と比較すると、PI/HAF、PI/FEF、PI/FT は、CB を添加することで伸び率は共に 2~3 割減少するものの、引張り強さは 4 倍前後向上している。これら 3 種類の PI/CB 試料の CB の総表面積は等価である。CB と相互作用している PI 鎖が物性に大きく寄与するとすれば、FEF と FT は CB と相互作用するゴム鎖が同じ量だけ存在すると考えられるので、PI と CB の相互作用成分（バウンドラバー）が物性に関与していると考えられる。

しかし HAF の剛性は FT ほど高くない。このことは、CB 添加量が PI 鎖の架橋に与える影響も考慮する必要があることを示している。つまり、CB 添加量に依存して PI 鎖の架橋密度が異なっている可能性が示唆され、その影響が剛性に現れていると考えられる。Fig. 2 より、PI/FT は、PI/HAF や PI/FEF より 1~2 ms の T_2 分布が幅広い。このことは、様々な分子運動成分を含むことを示している。CB との相互作用を表す D_r 成分も検討する必要もあるが、Fig. 2 と Fig. 5 から T_2 分布の拡がりが剛性の高さに関係していると示唆される。

当日は、他の試料や D_r と架橋密度の関係なども踏まえ、運動性と物性などの相関性を求めた結果を報告する。

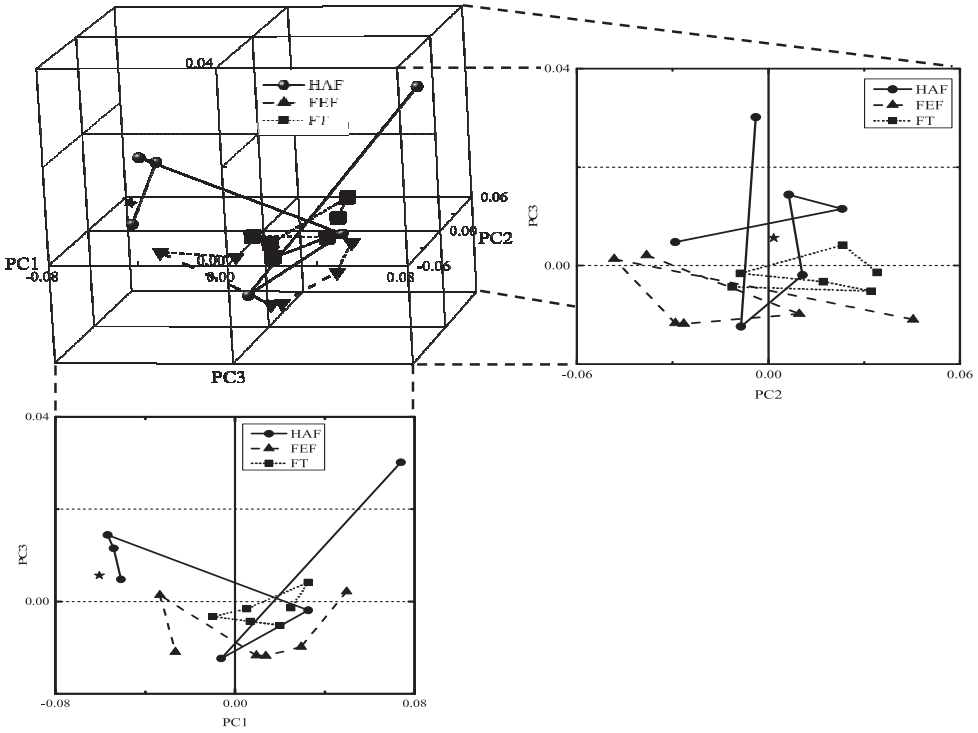


Fig.4. Three dimensional score plots of cross-linked PI/CB samples. PI/HAF (●), PI/FEF (▲), PI/FT (■), and without CB (★).

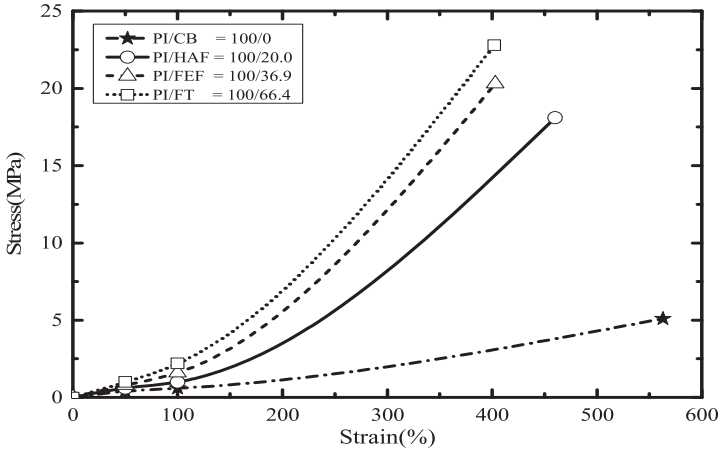


Fig.5 . Stress-strain curves for PI/HAF = 100/20.0 (●), PI/FEF = 100/36.9 (▲), PI/FT = 100/66.4 (■), and PI/CB = 100/0 (★).

＜参考文献＞

1) A. Asano, *Annual Rep. NMR*, **86** (2015) 1-72. (doi:10.1016/bs.arnmr.2015.04.001)

P67

^{19}F-定量固体NMRを用いたEDLC用活性炭の細孔径による電荷貯蔵効率の評価

○出田 圭子[1]，金 斗元[2]，吉 鉉植[1]，中林 康治[1,2]，宮脇 仁[1,2]，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

Evaluation of charge storage efficiency of EDLC electrode made of activated carbon with different pore size using ^{19}F quantitative solid-state NMR

○Keiko Ideta[1], Doo Won Kim[2], Hyun-Sig Kil[1], Koji Nakabayashi[1,2], Jin Miyawaki[1,2] and Seong-Ho Yoon[1,2]
[1]*Institute for Material Chemistry and Engineering, Kyushu University, Japan.*
[2] *Interdisciplinary Graduate School of Engineering Sciences, Kyushu Univ., Japan.*

Recently, EDLC is attracting much attention as a potable power device due to its high power density and cycle performances. Activated carbon (AC) which is used as electrode materials for EDLC shows different electrochemical performances by controlling its specific surface area, pore size and surface state. To date, we has quantitatively evaluated amounts of electrolyte ions in pore of electrode before and after charging using ^{19}F-solid state NMR. In this study, we specially prepared various ACs with different pore sizes, and evaluated the efficiency of pore size effect on the pore-infiltrated ions for the effective relevance to capacitance using the same method.

【序論】

電気二重層キャパシタ（EDLC）は高パワー密度、高速充放電および高サイクル特性のため移動型電力貯蔵デバイスとして注目されている。EDLCの電極材活性炭の性能は比表面積や細孔径、表面状態によって異なる。これまでに我々は、充電後・放電後のキャパシタ電極材を用いて^{19}F-固体NMRにより細孔内に吸着したイオン量を定量し、静電容量から求めた電子量との比較を行うことで、イオン当たりの電子貯蔵効率が活性炭により異なることを見出している。

今回、比表面積はほぼ同じで細孔径のみ変化させた活性炭を調製し、その静電容量の違いとNMRから求めた充電前後の吸着イオン量を比較することで、電荷貯蔵効率に与える活性炭の細孔径の影響を定量的に検討したので報告する。

【実験】

球状フェノール樹脂 S-BEAPS（旭有機工業(株)）はTable 1に示した異なる温度条件でKOH賦活を行い、比表面積はほぼ同じで、平均細孔径の異なる活性炭を作製した。これを活物質とし、バインダーとしてフッ素樹脂、polytetrafluoroethylene（PTFE）、導電助剤としてケッチェンブラックを重量比8:1:1で混練し、電極を作製した。電解液NEt_4BF_4/PCと共にコインセルを組み立て、CC-CV法で充電を行い、静電容量を求めた（Table 1）。^{19}F-固体NMR測定は、JEOL RESONANCE社の装置を用いた。定量性を保つため、最も長いPTFEの緩和時間の5倍以上、25秒の繰り返し時間で行った。

EDLC, 定量固体NMR, 活性炭

○いでた けいこ， きむ どぅうぉん， きる ひょんしっく，なかばやし こうじ，みやわき じん，ゆん そんほ

【結果と考察】

用いた試料の表面積、平均細孔径および細孔容量をTable 1に示す。賦活温度が上がるにつれ、平均細孔径、細孔容量は上昇したが、比表面積は同程度である。これらの試料について、^{19}F-NMRの定量性に着目し、電極内に一定量含まれるPTFEを定量の基準として、細孔内に吸着したBF_4^-イオンのピーク面積からイオン濃度を算出した。

今回は、まずBF_4^-イオンが陰イオンであることから正に帯電した電極について測定を行った（Fig. 1）。充電前の化学シフトは平均細孔径が大きいほど高磁場側にあり、充電後はいずれも充電前(imp)より低磁場シフトした。(＊ は外表面に吸着したBF_4^-イオンと帰属)

細孔内ピークの面積は充電後に増大した。面積の増分と充電された静電容量には関連があると考えられる。そこで、充電前後の細孔内イオン濃度の増分と、実際にコインセルを組み立てて測定した静電容量から求めた電子濃度との比較を行った。電荷効率(β)を以下のように定義し、各試料について求めた結果をTable 2に示す。

$$\text{電荷効率}(\beta) = \frac{\text{静電容量から求めた電子濃度}}{\text{充電前後の } BF_4^- \text{濃度の差}}$$

活性炭の賦活温度が高いほど、静電容量が大きくなった。電子濃度は静電容量に比例するため同様の傾向を示した。βは充電により増加した陰イオンと電子との比較であるため、陰イオン1個で補償される正孔の数と考えられる。我々は、最も単純なモデルとして、陰イオン1個が新たに細孔内に入ると同時に陽イオン1個が追い出される場合を考え、この場合はβ ＝ 2とした。しかし、今回の結果では非常に2をはるかに超える大きな値となった。

充電前後のイオン濃度の差と細孔径もしくは細孔容量に関連していることが示唆されたが、βの大きな値については未だよくわかっていない。発表では負に帯電した電極の結果も含めて議論したい。

Table 1 各種活性炭の調整条件、および物性

	賦活温度 (℃)	比表面積 (m^2/g)	平均細孔径 (nm)	細孔容量 (cm^2/g)
A600	600	2497	0.94	1.16
A700	700	2819	1.07	1.50
A800	800	2790	1.16	1.60
A900	900	2860	1.33	1.88

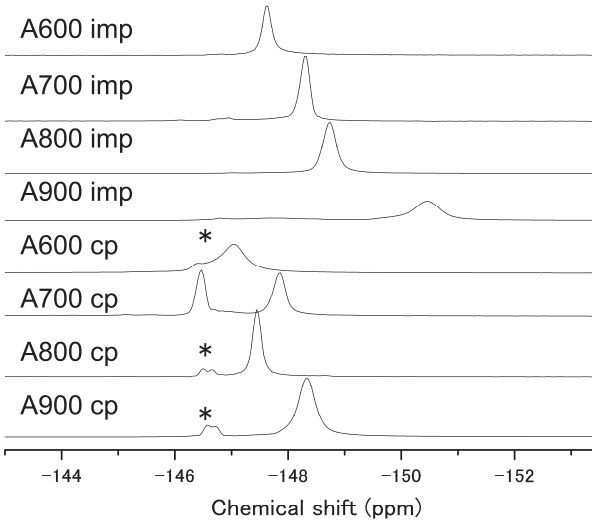


Fig. 1 EDLCの正に帯電した電極の充電前(imp)，充電後(cp)の ^{19}F-固体 NMR スペクトル

Table 2 各種電極の EDLC の電子濃度及びβ

	静電容量 (F/g)	電子濃度 (mmol/g)	β
A600	30.0	83.9	1.31
A700	40.2	112	2.49
A800	43.4	121	4.06
A900	44.8	125	6.26

【参考文献】

1) Y. Shingai, K. Ideta, M. Saito, J. Miyawaki, I. Mochida, S. H. Yoon, 50th ISNMR2011 Abstract, 364-365

2) T. Kim, K. Ideta, D, Jung, K. Saito, J-I. Park, C. K. Rhee, J. Miyawaki, I. Mochida, S. H. Yoon, (2014) *RSC Advances* , **4(32)**, 16726-16730.

P68

規則性メソポーラスシリカの細孔内でのフルフリルアルコールの重合過程の観察

○稲垣怜史[1]，中尾太一[1]，川村　出[1]，窪田好浩[1]
[1]横浜国立大学大学院・工学研究院／工学府

Solid-state NMR investigation of polymerization of furfuryl alcohol within ordered mesoporous silica MCM-48

○Satoshi Inagaki[1], Taichi Nakao[1], Izuru Kawamura[1], and Yoshihiro Kubota[1]
[1]*Graduate School of Engineering, Yokohama National University, Japan*.

Ordered mesoporous carbon materials are reliable candidates of the electrode materials for electric double-layer capacitors and various secondary batteries. Furfuryl alcohol (FA) is one of useful carbon sources for the preparation of carbon replica using ordered mesoporous silica as templates. In this study, we investigated the polymerization and carbonization processes of FA using ^{13}C CP MAS NMR measurements as well as TG-DTA and MS analyses.

序論

規則性メソポーラスカーボンは規則性メソポーラスシリカを鋳型として調製される物質であり，均一で貫通したメソ孔と，高比表面積を有することが特徴である．我々はこれまでに，原料に主としてフルフリルアルコール（FA）を用いて規則性メソポーラスカーボンを電気二重層キャパシタ（EDLC）の電極として適用し，優れたレート特性を見出している[1,2]．炭素電極の充放電容量の向上を実現するには，炭化処理方法の改良が必要であり，これを検討するにはFAの重合および炭化の過程の理解が欠かせない．そこで本研究では，規則性メソポーラスシリカMCM-48のメソ孔内でのFAの重合過程を^{13}C MAS NMRを用いて観察した．また熱重量分析（TG-DTA），MS分析などを踏まえてFAの重合および炭化過程を考察した．

方法

規則性メソポーラスシリカMCM-48は，カチオン性界面活性剤$CH_3(CH_2)_{15}N(CH_3)_3Br$のミセルを鋳型として，$Si(OEt)_4$をシリカ源に用いて既報[3]に従い調製した．得られた白色粉末を550℃での焼成することで，メソ孔内の界面活性剤を除去してMCM-48を得た． FA（5.5 g）に微量のシュウ酸（0.028 g）を溶解した液をMCM-48（2.0 g）に染み込ませてから，90℃のオーブン内で72時間，加熱することで重合を進めた．オーブンから取り出した茶色になった試料をFA/MCM-48_90と呼ぶ．このFA/MCM-48を石英管に詰め，アルゴン気流下で所定温度（T(℃)= 200，300，400，500，600，700，800，900，1000）で6時間加熱して重合・炭化を実施した．得られた試料をそれぞれ，FA/MCM-48_Tと呼ぶ．

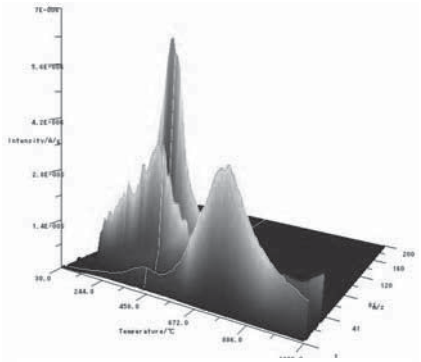


Fig. 1　A thermal MS spectrum of FA/MCM-48_90 under He flow.

^{13}C CP MAS NMRスペクトルの測定にはAVANCE600（Bruker社）を用いた．^{13}Cのケミカルシフトはglycineを二次標準物質として決定した．FA/MCM-48_Tを外径4 mmのZrO_2チューブに詰めてから，recycle timeを3.0 sとし，4096回積算してNMR測定を行った． このとき，MAS速度を10ないし13 kHzでそれぞれ測定してspinning side bandを識別するためのスペクトルデータを得た．

TG-MS測定はリガクの協力の下でThermoMass Photoを用いて実施した．

Polymerization, Diels-Alder reaction, Carbonization

○いながきさとし，なかおたいち，かわむらいずる，くぼたよしひろ

結果・考察

粉末X線回折測定により，得られたMCM-48が空間群$Ia\bar{3}d$からなる規則的に配列したメソ孔構造を有することを確かめた．また77 Kでの窒素吸脱着等温線を測定し，これを解析することでBET表面積1291 $m^2\ g^{-1}$，メソ孔容積1.12 $cm^3\ g^{-1}$，平均メソ孔径2.9 nmであることがわかった．

調製したFA/MCM-48_*T*をそれぞれ，HF水溶液でシリカのエッチング処理をしたところ，600ºC以上で炭化した試料ではポーラスシリカのレプリカとなる炭素体を得ることができたが，500ºC以下での加熱処理ではレプリカを得ることはできなかった．すなわち，600ºC以上の加熱を経てはじめて十分な炭化が起こりうると推測できる．またFA/MCM-48_90をHe流通下でTG-MS測定を行った結果，1100ºCまでの加熱で約36%の重量減少が見られた．またFig. 1に示すようなMSピークが観察され，H_2, CH_x, H_2O, CO, CO_2, FAなどのフラグメントの脱離が確認できた．

Fig. 2に^{13}C CP MAS NMRスペクトルを示す．重合させる前のFA（モノマー）は，142，110，55 ppm付近に鋭いピークが現れることを確認した．FA/MCM-48_90では142，110 ppmのピークがブロードになり，55 ppmのピークはほぼ消失した．また152，62，40，25 ppm付近に新たなブロードなピークが現れた．末端メチレンのピーク（55 ppm）[4-6]が消失し，FA重合体のメチレン由来のピーク（25 ppm）[4-6]が現れたことから90ºCの加熱処理でFAのオリゴマー化が進行したと言える．フラン環5位のC由来のピーク（142 ppm）[4-6]が相対的に減少し，フラン環2位のCのピーク（152 ppm）[4-6]が顕著に増加したことからもFAのオリゴマー化が支持される．一方，40 ppm付近の非常にブロードなピークの出現は，フラン環どうしのDiels-Alder反応により生じた生成物のCに由来すると推測できる．200ないし300ºCに加熱温度を上げていくと，142 ppmのピークが徐々に減少して消失したことから，FAのオリゴマー化がさらに進んだものと考えられる．400ºC以上に加熱すると新たに130 ppm付近に芳香族六員環由来のピークが出現した．500ºCに加熱すると130 ppm以外のピークが減少し，FA/MCM-48_700では130 ppm付近のピークのみが観察されるようになった．従って500～700ºCではCO, H_2などの脱離を経て六角網面の形成が進行するものと考えられる．

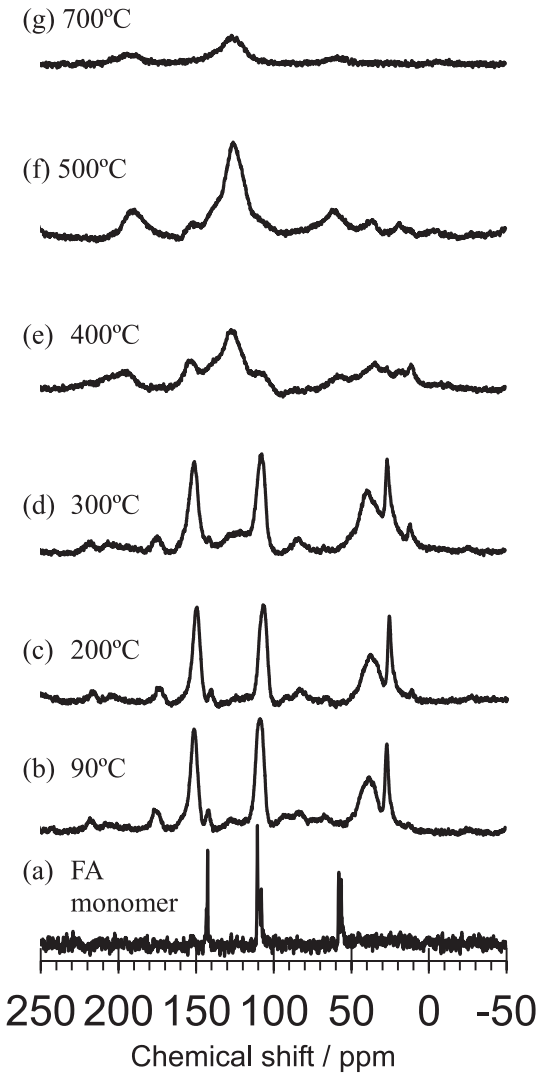


Fig. 2 ^{13}C CP MAS NMR spectra of FA/MCM-48_*T*. MAS rate = 10 kHz.

引用文献

1) S. Inagaki *et al*., *Chem*. *Lett*., **38,** 918−919, 2009.
2) S. Inagaki *et al*., *Micropor*. *Mesopor*. *Mater*., **179**, 136−143, 2013.
3) C. Liu, S. Wang, Z. Rong, X. Wang, G. Gu, W. Sun, *J*. *Non-Cryst*. *Solids*, **356**, 1246−1251, 2010.
4) A.H. Fawcett, W. Dadamba, *Makromol*. *Chem*., **183**, 2799–2809, 1982.
5) M. Principe, R. Martínez, P. Ortiz, J. Rieumont, *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, **10(1)**, 8−14, 2000.
6) A. Gandini, M.N. Belgacem, *Prog*. *Polym*. *Sci*, **22**, 1203−1379, 1997.

P69

固体NMRによるポリヒドロキシアルカン酸成形体の機械特性の解析

○西田 雅一[1]，田中 智子[1]，早川 由夫[1]，小倉 崇[2]，西田 政弘[2]
[1]産総研・構造材料，[2]名工大院・機能工学

Study on mechanical properties of poly(hydroxyalkanoic acid) molded products by solid-state NMR analysis

○Masakazu Nishida[1], Tomoko Tanaka[1], Yoshio Hayakawa[1], Takashi Ogura[2], and Masahiro Nishida[2]
[1]*National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Japan.*
[2]*Nagoya Institute of Technology, Japan.*

To improve mechanical properties of poly(hydroxyalkanoic acid) (PHA), were investigated effects of other polyester additives for their molded products with a melt-mixer and a hot press. The PHA/poly-(butylenesuccinate) (PBS) blend has better formability than PHA/poly(lactic acid) (PLA). The mechanical properties of the PHA/PBS blend were further improved by the addition of poly(*ε*-caprolactone) (PCL): a quasi-static tensile test of the molded PHA/PBS/PCL=32.5/15/50 showed higher breaking elongation giving whiten and porous fracture surface. In ^{1}H MAS NMR spectra, the signals of the PHA/PBS blend were sharper than those of PHA/PLA. The signal intensity in ^{13}C PST-MAS NMR spectra increased with the addition of PCL, especially in the signal of C=O group of PHA, compared in ^{13}C CP-MAS NMR spectra. In conclusion, the PCL unit promoted the mobility of the PHA segments in the molded products to improve the mechanical properties.

序論

バイオマスプラスチックとしてポリ乳酸の開発研究が盛んに行われているが、現状ではトウモロコシでんぷんを原料とするため、原料の安定的供給や食糧市場との競合などの課題がある。一方、ポリヒドロキシアルカン酸（PHA）は非可食バイオマスから微生物によって産出されるバイオマスプラスチックであり、生分解性を合わせて持つことから、食糧問題のない新たなバイオマスプラスチックとして期待されている。しかしながら、PHA単独では成形性が悪く、正確な機械特性を調べることができない。本稿では、このPHAにポリブチレンサクシネート（PBS）やポリ乳酸（PLA）を加えた場合の成形性と固体NMRでのスペクトル変化を調べるとともに、PHA/PBSブレンドにさらにポリεカプロラクトン（PCL）を加え、機械特性と固体NMRとの相関性を調べることで、機械特性の変化を分子レベルの挙動として解析を行うことを目的とした。

方法

溶融混練機により175°C, 50rpmで20分間混練を行った後、ホットプレスで175°C, 30 MPaで30分保持することによりブレンド成形体を作製し、得られた成形体について準静的引張試験により引張強度及び破断伸びを求めた。これらの組成と機械特性の関係が明らかである試料について、^{1}H MAS NMR, ^{13}C CP-MAS NMR, ^{13}C PST-MAS NMRの測定を行い、それぞれのシグナル幅や強度を比較することにより、組成によるスペクトル変化を調べた。

ポリマーブレンド、準静的引張試験、PST-MAS NMR

○にしだまさかず，たなかともこ，はやかわよしお，おぐらたかし，にしだまさひろ

結果及び考察

出発原料のPHAペレットとしては、PBSを含むものとポリ乳酸（PLA）を含むものについてホットプレスにより成形性を調べたが、PHA/PLAに対してPHA/PBSの方がより成形性に優れた試料を得ることができた。そこで、65%PHA/30%PBS/5%架橋剤のPHAペレットを原料として、PCLの添加量を変化させた場合の機械特性の変化を調べた。図１に準静的引張試験における応力－歪み曲線を示す。PCLを添加しない場合（Run 1）には、引張応力、破断伸びともに低い値を示したのに対して、それらはPCLの添加で増大し、特に、50%のPCLの添加（Run 3）で白化しながら試料が大きく伸び（図２）、引張応力も増加していた。

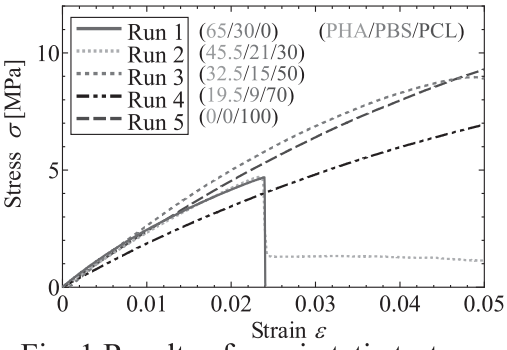


Fig. 1 Results of quasi-static test

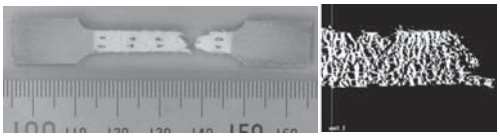


Fig. 2 Sample shape (Run 3) after the quasi-static test

これらの組成の異なるブレンド成形体の^{1}H MAS NMR（図３ａ）では、PLAの添加では全体的にブロードになり、PHAのシグナル強度もごく弱かったのに対して、PBSやPCLを添加した場合には、比較的シャープなシグナルを与え、PHAのシグナル強度も増大していた。一方、^{13}C CP-MAS NMR（図３ｂ）を基準とし、^{1}Hの影響が少ない主鎖のC=O (170－180 ppm)の^{13}C PST-MAS NMR（図３ｃ）のシグナルを比較すると、PLAの添加ではシグナル強度が大きく減少していたが、PBSの添加ではシグナルの減少は限定的であった。一方、PCLを添加することでシグナル強度はむしろ増加していた。^{1}H MAS NMRシグナルは運動性が低いと広幅化すること、また、^{13}C PST-MASでは運動性の高い部分が強調されて検出されることから、PCLを添加することでPHAの運動性、特にC=O部位の運動性が増加すると考えられた。今後、緩和時間解析や引張試験前後のスペクトルを比較することで機械特性との相関性をさらに調べる予定である。

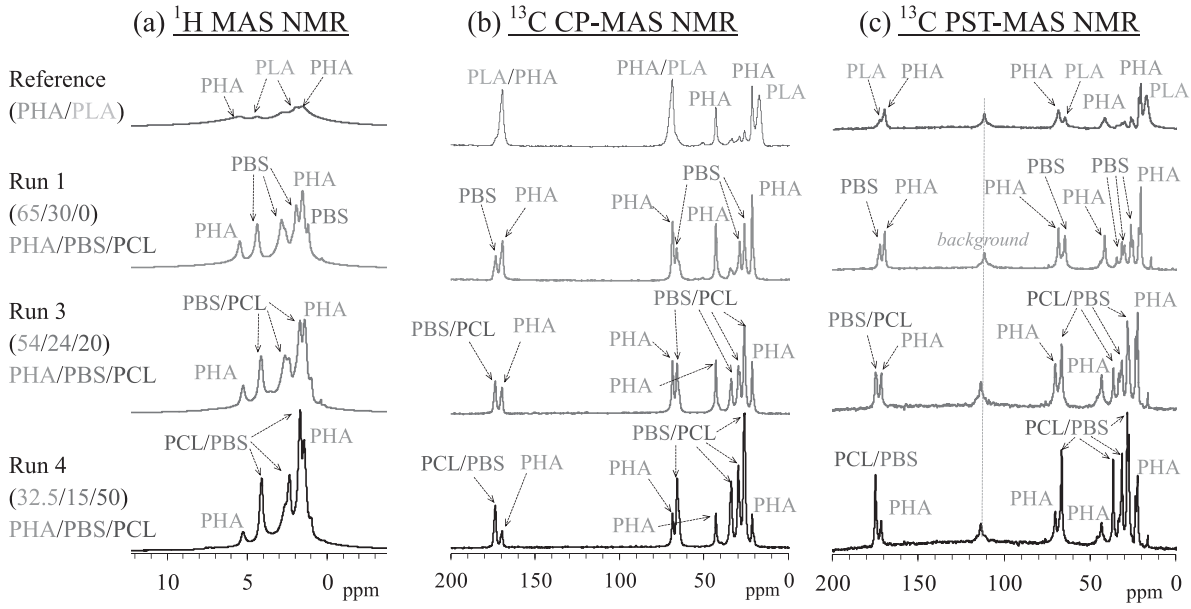


Fig.3 Solid state NMR spectra of the PHA blend molded products

【謝辞】本研究の一部は名古屋工業技術協会の支援を受けて行いました。ここに謝意を表します。

P70

固体NMRによるシステイン保護$(CdSe)_{34}$と保護基との相互作用の解析

○栗原拓也, 野田泰斗, 竹腰清乃理
京都大院・理学研究科

Solid-State NMR of Interactions between Cysteine-Capped $(CdSe)_{34}$ and the Ligand-Cysteine

○Takuya Kurihara, Yasuto Noda, and K. Takegoshi
Division of Chemistry, Graduate School of Science, Kyoto University, Kyoto, Japan.

$(CdSe)_{34}$ magic-sized clusters have been studied to control the optical property for the application to light-emitting devices. The quantum yield is influenced by the surface structure and the interactions between clusters and the ligand molecules. In this study, we synthesized cysteine-capped $(CdSe)_{34}$, and analyzed the interactions between $(CdSe)_{34}$ and the ligand-cysteine by using solid-state NMR.

1. 序論

物質をバルクから切り出していくと、ナノ粒子を経て、1 nm台のサイズのクラスターへと至る。化合物半導体であるCdSeは、特定の原子数でのみ安定に存在するマジックサイズクラスターを形成することが明らかにされており[1]、そのひとつである$(CdSe)_{34}$マジックサイズクラスターは発光材料として注目を集めている。発光効率は粒子の界面構造や保護基との相互作用に大きく左右されるため、様々な有機分子を$(CdSe)_{34}$の保護基に用いて多くの研究が行われている。しかし、$(CdSe)_{34}$は単結晶が得られていないため有効な構造解析法が少なく、そのためその構造や界面の状態はいまだ実験的には解明されていないのが現状である。

我々は、システインに保護された$(CdSe)_{34}$ (以下、$(CdSe)_{34}$-Cys)の解析を行った。$(CdSe)_{34}$-Cysは、保護基であるシステインのチオール基の水素が外れて$(CdSe)_{34}$と結合していることがIRによりわかっている[2]。また$(CdSe)_{34}$-Cys合成時の前駆体として用いるCd-Cys錯体では、システインは必ずSがCdと結合しており[3]、よって $(CdSe)_{34}$-Cysも同様にSがCdと結合していると考えられる。システインにはアミノ基も存在しており、オクチルアミンなどアミノ基を有する保護基を用いての$(CdSe)_{34}$の作製も行われていることから、$(CdSe)_{34}$-Cysではアミノ基が粒子表面と何らかの相互作用をしている可能性も高いことが予想される。そこで本研究では、固体NMRによる$(CdSe)_{34}$とシステインの特にアミノ基との相互作用の詳細な特定を目指す。

CdSeクラスター、システイン、固体NMR

○くりはらたくや、のだやすと、たけごしきよのり

2. 実験

$(CdSe)_{34}$-Cysの合成・固体化は、Parkらの方法[4]を基に我々が確立した、同位体濃縮試薬の入手可能な金属Cdを原料とする方法[5]により行った。原料に金属^{113}Cd、^{77}Se粉末、L-[^{15}N]システインを用いることで、^{113}Cd、^{77}Se、^{15}Nの3核が同位体濃縮された$(CdSe)_{34}$-Cys固体を得た。また、水の代わりに重水を用いて合成を行い、システインのアミノ基の^{1}Hが^{2}Hに交換された試料も作成した。

固体NMR測定は磁場9.4 T (^{1}H 400.235 MHz)にて、MAS速度20 kHzで行った。

3. 結果と考察

^{1}H MAS NMR (Fig. 1a)では、5 ppm付近に線幅の細いピークが観測された。^{1}HT_1は0.3 s、$T_{1\rho}$はスピンロック強度80 kHzで1.8 msとどちらも短く、保護基のシステインは高い運動性を持っていることが伺える。$(CdSe)_{34}$-Cysの合成および固体化はNaOHによる強塩基性下で行われるため、システインのアミノ基はNH_2の状態になっている。アミノ基が$(CdSe)_{34}$と相互作用していれば、アミノ基の運動性はないはずである。そこで、このアミノ基の運動性について調べるため、重水素を合成に用いてアミノ基の^{1}Hを重水素化した試料を測定したところ、5 ppm付近にCHおよびCH_2による非常に細い^{1}Hピークが観測された(Fig. 1b)。このT_1はアミノ基の^{1}Hの重水素化を行っていない場合と変わらず、よってアミノ基は運動性を持っておらず粒子表面と相互作用している可能性が考えられる。また、システイン単体(Fig. 1c)と比べてCH_2のピーク位置がシフトしており、このように運動性と相互作用の影響が同時に見られることから、保護基ではなく粒子全体が運動性を持ち、回転している可能性も示唆されている。

Fig. 1abにおいて1-3 ppmに観測された細いピークは、5 ppm付近のピークとはT_1が異なり0.3 sより長いことから、極めて高い運動性を有していると言える。金ナノ粒子を保護するシステインにおいてもこのようなピークが観測されており、金ナノ粒子を保護するシステインに結合したシステインと帰属されている[6]。$(CdSe)_{34}$-Cysからは^{23}NaのNMR信号も観測されている[3]ことから、試料の固体化の際にNa^+をカルボキシル基で挟んで保護基のシステインと結合したシステインのピークと帰属した。

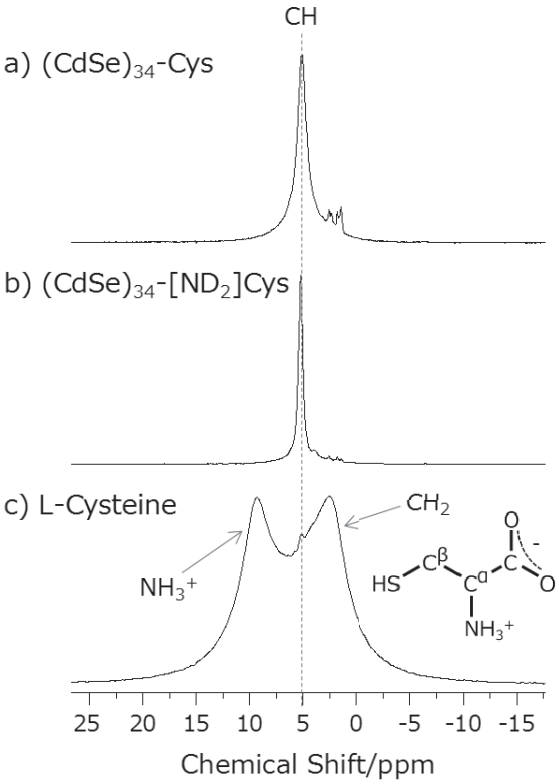


Fig. 1 ^{1}H MAS spectra of (a) $(CdSe)_{34}$-Cys, (b) $(CdSe)_{34}$-Cys with deuterated amino groups, and (c) L-cysteine, and the structural formula of cysteine.

^{15}N{^{1}H} CP/MAS NMRスペクトル(Fig. 2)では、大きく2つのピークが観測された。20 ppmのピークは、その強度や^{1}H NMRの結果から、保護基のシステインと結合したシステインと帰属した。40.8 ppmのピークには化学シフトの分布が見られ、^{13}C{^{1}H} CP/MAS NMRにおいても、α炭素のピークに化学シフトの分布が観測されていることから[3,5]、アミノ基には粒子表面で相互作用しているものがある可能性が高い。そこで、アミノ基と粒子表面との相互作用の解析を、^{15}Nと^{113}Cdおよび^{77}SeとのCP/MAS測定により試みた。^{113}Cd{^{15}N} CP/MAS測定では信号は検出されたものの、運動性のためかCP効率が非常に悪く、十分なS/N比のスペクトルを得ることは難しかった(Fig. 3)。一方、^{77}Se{^{15}N} CP/MAS測定では信号の検出はされず、これらの結果よりアミノ基は粒子表面のCdと相互作用している可能性が高いと考えられる。

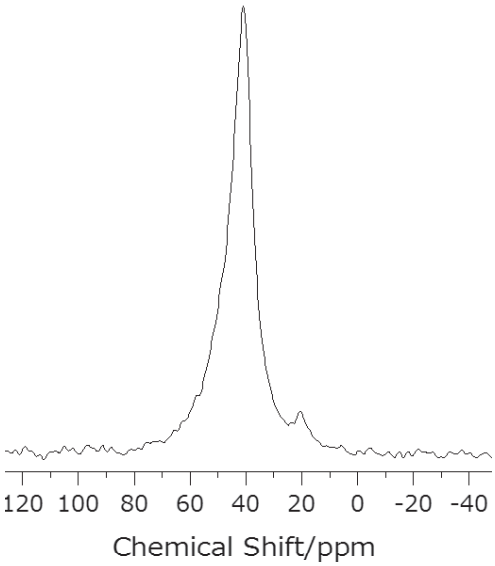


Fig. 2 ^{15}N CP/MAS spectrum of $(CdSe)_{34}$-Cys.

ヘキサデシルアミンを保護基として作成した粒径2 nmのCdSeナノ粒子では、Hが粒子表面のSeと相互作用していることが固体NMRにより明らかにされ、報告されている[7]。$(CdSe)_{34}$はCd^{2+}とSe^{2-}が交互に並び構成されていると構造が予想されている[1]ことから、$(CdSe)_{34}$-CysにおいてSがCdと結合しており、更にアミノ基がCdと相互作用をしている場合、CH_2のHがSeと相互作用をする可能性が考えられ、この場合^{1}H NMRで観測されたCH_2のピークのシフトの理由が説明できる。

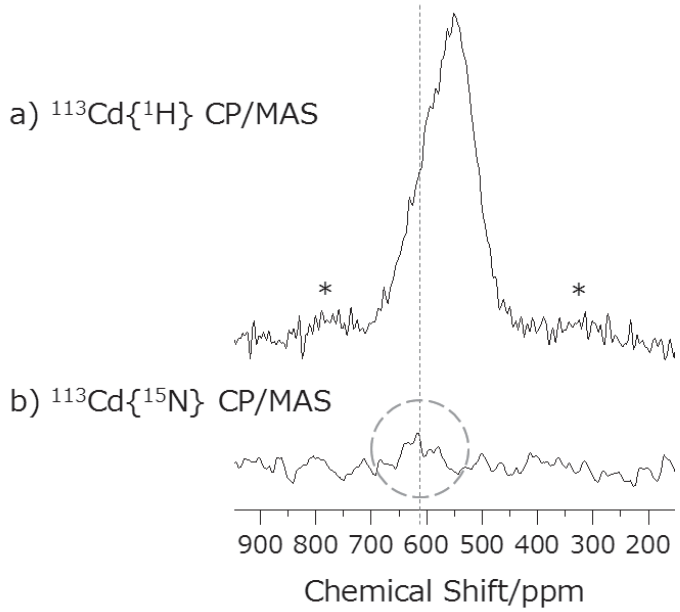


Fig. 3 ^{113}Cd CP/MAS spectra of $(CdSe)_{34}$-Cys. Asterisks indicate spinning sidebands.

今後は、^{1}Hと^{113}Cd、^{77}Se、^{15}NのLGCP-HETCOR測定などを行い、^{1}Hおよび、^{1}Hを介したアミノ基と、粒子表面との相互作用をより明らかなものとし、その結果は当日に報告する予定である。

4. 参考文献

[1] A. Kasuya et al., Nat. Mater. 3 (2004) 99.

[2] F. Jalilehvand et al., Inorg. Chem. 48 (2009) 5758.

[3] 栗原ら、第53回NMR討論会 (2014)、P67

[4] Y. Park et al., J. Nanosci. Nanotechnol. 7 (2007) 3750.

[5] 澤上ら、第51回NMR討論会 (2012)、P89

[6] A. Abraham et al., J. Phys. Chem. B 116 (2012) 7771.

[7] M. Berrettini et al., J. Am. Chem. Soc. 126 (2004) 7063.

5. 謝辞

本研究はJSPS科研費25888009研究活動スタート支援の助成を受けて実施されました。

P71

固体 NMR を用いた鉄鋼スラグ中のエトリンガイトの定量

○金橋康二
新日鐵住金・先端研

Quantification of Ettringite in Steelmaking Slag by using Solid-state NMR

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

A new approach to quantifying ettringite ($3CaO{\cdot}Al_2O_3{\cdot}3CaSO_4{\cdot}32H_2O$) in steelmaking slag has been proposed by using solid-state ^{27}Al NMR spectroscopy. Ettringite shows a quite narrow and symmetric peak assigned to octahedral (six-coordinated) Al in the ^{27}Al NMR spectrum because of its highly symmetric structure around Al ions, although ^{27}Al is a quadrupolar nucleus (spin I=5/2) which often displays severe broadening in solids due to the second-order quadrupolar interaction. The ettringite signal is able to be separated from the signal of steelmaking slag with tetrahedral (four-coordinated) Al by optimizing the external magnetic field and the sample spinning frequency. Using the internal standard (e.g. potassium aluminum sulfate hydrate, $AlK(SO_4)_2{\cdot}12H_2O$) which has a sharp ^{27}Al signal and shows the different chemical shift from ettringite and slag matrix, quick quantification of ettringite is achieved thanks to high sensitivity of ^{27}Al; typical NMR experiment time is about 10 minutes. Accuracy of ettringite concentration obtained by the present method has been demonstrated in a variety of matrix with different bulk density.

はじめに

エトリンガイトは、$3CaO{\cdot}Al_2O_3{\cdot}3CaSO_4{\cdot}32H_2O$ の組成で表される水和物であり、路盤材やセメントの初期硬化に関与する化合物であるが、遅延生成されたエトリンガイトがコンクリートの膨張破壊の原因となることが広く知られている。以上のようなエトリンガイトの生成に伴う無機酸化物材料の膨張破壊を低減することは、利用時の安全性の確保や拡販時の顧客の信頼を得るために非常に重要な取り組みであり、それに先立ってエトリンガイト自身を精度良く定量評価することが不可欠である。これまでに、セメント等の無機酸化物系材料中に含まれるエトリンガイトを XRD、TG/DTA、溶媒抽出等を用いて定量した研究がなされているが [1]、いずれの分析法も定量精度に課題があった。

これらの従来法による課題を克服するために、我々は固体 NMR を用いたエトリンガイトの定量方法を提案した。今回、マトリックス由来の Al ピークをエトリンガイト由来の Al ピークを分離するための NMR 測定条件について検討するとともに、高精度な定量に不可欠な内標準物質を選択した。さらに、嵩密度の異なるマトリックスを用いて、本定量法により得られた定量値の確からしさを検証した [2]。

エトリンガイト、定量、^{27}Al MAS NMR

○かねはしこうじ

実験

エトリンガイトの標準試薬は（株）太平洋コンサルタント製、硫酸カリウムアルミニウム 12 水和物（$AlK(SO_4)_2{\cdot}12H_2O$）（純度：99.5 %以上）は関東化学（株）製のものをそれぞれ使用した。今回、エトリンガイトを定量する材料として、製鉄所から産出された高炉徐冷スラグを用いた。

固体 ^{27}Al NMR スペクトルの測定には、JEOL ECA-700 分光計（^{27}Al 共鳴周波数：182.30 MHz）、Agilent INOVA-500（130.25 MHz）、Agilent CMX-300（78.11 MHz）を用い、15〜18 kHz の速度で回転させた。^{27}Al NMR の化学シフト基準は、$AlCl_3$ 飽和水溶液のピークを-0.1 ppm に設定した。^{27}Al MAS スペクトルの測定にはシングルパルス法を用い、フリップ角を 18°に設定した。また、パルス繰り返し時間を 0.5 s に設定することで、励起した核スピンを完全に緩和させた。典型的な積算回数は 1280 回であり、1 試料の測定に要した時間は約 10 分であった。

高炉徐冷スラグ中のエトリンガイトの定量は、静磁場強度：16.4 T、試料回転周波数：18 kHz にて実施した。使用した 4 mm 径の固体 NMR 試料管に充填したスラグおよび硫酸カリウムアルミニウム 12 水和物の質量は、それぞれ 65 mg および 3 mg 程度であった。

結果・考察

精度の良いエトリンガイトの定量を行うための静磁場強度の最適化を行った。静磁場強度が 16.4 T のときは、スラグ骨格／エトリンガイト／$AlK(SO_4)_2{\cdot}12H_2O$ のピークがそれぞれ完全に分離しており、精度の高い定量が可能となる。一方、2 次の核四極子相互作用の影響を受けているスラグ骨格のピークは、静磁場強度が減少するに従って低周波数側へ広幅化する様子が観測された。7.0 T では、エトリンガイトや $AlK(SO_4)_2{\cdot}12H_2O$ のピークがスラグ骨格の広幅なピークと完全に重なり合ってしまうことが確認された。このように、エトリンガイト由来のピークがマトリクスのピークと重なり合うと、精度の良いエトリンガイトの定量は困難となる。さらに、試料中に存在するエトリンガイト濃度が微量の場合には、エトリンガイトのピークがマトリクスのピークに埋もれてしまい、見かけ上検出できない可能性も高くなる。以上の結果から、高精度にエトリンガイトを定量するためには、少なくとも 11.7 T 以上の静磁場強度が必要であることがわかる。

また、同時に試料回転周波数の最適化も行うことによって、他の化合物のピークの妨害を受けることなく、スラグ中のエトリンガイト濃度を高精度かつ迅速に定量できる方法を確立した。

本方法を用いてエトリンガイトを定量する利点としては、①検量線作成を必要としない絶対定量法であるため、定量値が測定装置のコンディションに影響されない、②XRD による定量法とは異なり、定量値がマトリクスの嵩密度や試料の配向性等に依存しない、③高炉徐冷スラグを測定対象とした場合、^{27}Al NMR スペクトルの測定時間はわずか 10 分足らずであり、迅速な定量が可能である、等が挙げられる。一方で、固体 NMR 試料管に測定試料と内標準物質を共存させる必要があるため、試料の秤量を正確に行うことが信頼性の高い定量値を得るために重要となる。

文献

1) I. Odler, S. Abdul-Maula, *Cem. Concr. Res.*, **14** (1984) 133.
2) 金橋康二, 相本道宏, セメント・コンクリート論文集, **66** (2012) 266.

P72

高分解能固体NMRを用いた2:1型層状ケイ酸塩の八面体シートにおける配位構造解析

○高橋貴文[1]，金橋康二[1]
[1]新日鐵住金株式会社　先端技術研究所

High resolution solid state NMR analysis on coordination structure of octahedral site in 2:1 phyllosilicates

○Takafumi Takahashi[1] and Koji Kanehashi[1]
[1]*Advanced Technology Research Laboratories, Nippon Steel & Sumitomo Metal Corporation, 20-1, Shintomi, Futtsu, Chiba prefecture, Japan.*

Configuration of hydroxyl (OH) groups around the octahedral cations of 2:1 phyllosilicates has been an important question in clay science. In the present study, ^{27}Al multiple quantum (MQ) MAS NMR was applied to the local structural analysis of octahedral Al positions in a purified Na-montmorillonite. Three octahedral Al sites ($^{[6]}Al_a$, $^{[6]}Al_b$, and $^{[6]}Al_c$) are distinguished by ^{27}Al 5QMAS NMR, whereas these sites are not separated by ^{27}Al MAS and 3QMAS NMR. The three Al sites is originated from geometric isomers with *cis* and *trans* structures, which have the mutually different configuration of the OH groups around the central Al^{3+} ions. The occurrence of multiple Al sites implies that Na-montmorillonite used in the present study has *cis* vacant structure in the octahedral sheet.

1.　緒言

粘土鉱物・モンモリロナイトは、鉱物学的には2:1型層状ケイ酸塩（フィロシリケイト）に分類される。層状ケイ酸塩において、Al^{3+}のような３価イオンで置換されると八面体サイト（６配位）のおよそ1/3が空孔サイトとなる。Dritsら[1]はこの空孔構造に関し、Fig.1に示すように、OH基が空孔サイトに対して*cis*位に配位した*cis*-vacantと*trans*位に配位した*trans*-vacantに分類した。従来、*cis*-vcantおよび*trans*-vacantの識別は、熱分析等の脱水温度に基づいて行われてきたが、構造に関す分光学的データは非常に少ない。OH基の対称性は、少なからず中心Al^{3+}の配位構造に影響を与える。そこで、我々は、Alの構造を調査することによって、逆に、空孔サイトをはじめとする八面体シートの配位構造に関する知見が得られるのではないかと考えた。Zazzi ら[2]は、粘土鉱物・クローライトを^{27}Al 3QMASによって測定し、八面体Alの構造異性体を区別することに成功したと報告している。一方、モンモリロナイトに関しては、^{27}Al 3QMAS NMRでは八面体の異性体が区別されたという報告はない。本研究では、^{27}Al 3QMASに加えて5QMAS測定を行い、層状ケイ酸塩の八面体シートにおけるAl異性体の識別を試みるとともに、空孔構造に関する考察も行った。

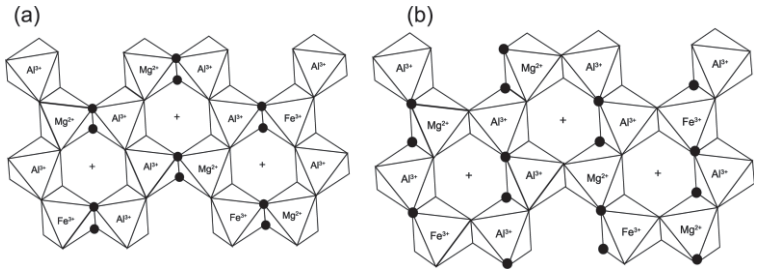


Figure 1. Schematic explanation of (a) *trans*-vacant and (b) *cis*-vacant structure. The parts shown with cross (+) symbol indicate vacant site.

2.　実験方法

2.1.　試料調整　月布モンモリロナイト（JCSS-3101）から不純物を取り除き、精製したものを測定用試料（Kunipia-P）とした。化学分析値に基づくKunipia-Pの組成は次の通りである。

MQMAS,　*cis*-vacant,　2:1 型層状ケイ酸塩
○たかはし　たかふみ、かねはし　こうじ

（$Na_{0.35}K_{0.01}Ca_{0.06}$）($Al_{1.56}Mg_{0.33}Fe_{0.09}Ti_{0.01}$)($Si_{3.87}Al_{0.13}$)$O_{10}(OH)_2$

2.2. ^{27}Al MASおよびMQMAS NMR測定

粉末試料を4mmφのジルコニア試料管に封入し、JEOL ECA-700(16.4T)分光計およびCPMASプローブを用いて^{27}Al MASおよびMQMAS NMRスペクトル測定を行った。測定は、回転周波数18kHz ± 3Hz, 繰り返し時間0.3sにて実施した。^{27}Al MASスペクトル測定には、1.2μs (π/6パルス)を用いた。一方、^{27}Al 3QMAS および5QMASスペクトル測定には、z-filter付きシーケンス[3]を用いた。3QMAS測定におけるexcitation および conversion パルスは、r.f.強度12.5kHzでそれぞれ3.0μs, 1.0μsに設定し、5QMAS測定においては、前記r.f.強度で3.2μs, 1.6μsとした。ソフトパルスはr.f.強度4.4kHzで14μsとした。また、F_1方向の観測幅は回転周波数（18kHz）に同期させた。

3. 結果および考察

Fig.2に、Kunipia-Pの^{27}Al 5QMAS NMRスペクトルを示す。^{27}Al 3QMASスペクトルおよび^{27}Al MASスペクトルからは、１つの６配位Al構造のみが観測されていたが、今回実施した5QMASにより、それは３つのサイトから構成されていることが分かった。各サイトの等方性化学シフトおよび四極子結合定数をTable 1に示す。NMRの化学シフトに影響を与える観測核周囲の電子構造は、配位数、配位子の種類、およびその配位子の対称性に依存しており、通常、配位子対称性の影響は前者の２つに比べて小さい。今回注目している部分は、基本的に６配位Al構造であり、配位子の種類も同じであることから、構造の差異は対称性に起因する微小なものであり、5QMAS NMRによって初めて検出に至ったと考えられる。Fig.1より、仮にKunipia-Pが*trans*-vacantな構造を有する場合、そもそもAlは*cis*-site１種類に入ることしか許されない。複数の６配位Alは、*cis*-vacantな構造においてのみ可能であるから、Kunipia-Pは、少なくとも*cis*-vacantな構造を有すると言える。この結論は、月布モンモリロナイトの熱分析（TG-DTA）分析において、構造水（OH）の脱水温度が（680~750°C）であり、*trans*-vacant型の脱水温度（500-600°C）より高いこととも矛盾しない。

また、$[RhL_4X_2]^+$(L=PMe_3 or $AsMe_3$, X=Cl, Br)における^{103}Rh-NMR[4]や、$Co(X)_4(Y)_2$錯体における^{59}Co NMR[5]による研究により、*trans*型の金属錯体では、中心金属イオンの化学シフトが、*cis*型に比べ低磁場シフトすることが知られている。よって、今回観測された３つのサイトに関し、高磁場側の$^{[6]}Al_a$および$^{[6]}Al_b$を*cis*サイト、$^{[6]}Al_c$を*trans*サイトに帰属した。ここで、$^{[6]}Al_a$および$^{[6]}Al_b$サイトは極めて近い位置に観測されている。これは、Alから見て第二近接配位圏の陽イオン分布等、局所的な摂動の影響で、僅かな構造的差異を有する*cis*型６配位Alが生じたことに因ると考えられる。

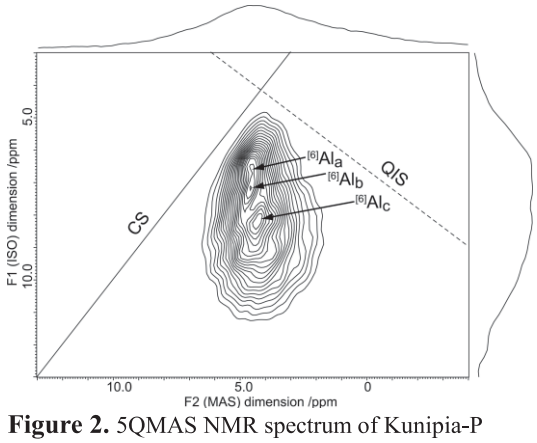


Figure 2. 5QMAS NMR spectrum of Kunipia-P obtained with 12000 scans and a total of 16 t_1 points.

Table 1. Summary of isotropic chemical shifts (δ_{iso}) and quadrupoalr products (P_Q) for each Al site identified in 3QMAS and 5QMAS NMR spectra.

	3QMAS	5QMAS		
	$^{[6]}Al$	$^{[6]}Al_a$	$^{[6]}Al_b$	$^{[6]}Al_c$
δ_{iso}/ppm	6.5	5.8	6.2	6.7
P_Q/MHz	3.6	2.6	3.0	3.7

引用文献

1) Drits V.A. et al., *Clays and Clay Miner.* (2006) **54**,131-152. 2) Zazzi et al., Clays and Clay Miner. (2006) 54, 252-265. 3) Takahashi. T. *et al.*, *Clays and Clay Miner.* (2008) **56**, 520-525. 4) Mann, P.E. Transition Metal NMR. Elsevier, New York, 177pp. 5) Juranic *et al.* (1977) *Inor. Chim. Acta* **25**, 229-232.

P73

固体高分解能^{33}Sおよび^{67}Zn-NMRによるゴム材料の構造解析

○宇川　仁太[1]，木村　英昭[2]
[1]東洋ゴム工業株式会社　中央研究所
[2]ブルカー・バイオスピン株式会社

Structural Analysis of Rubber Materials by High-Resolution Solid-State ^{33}S and ^{67}Zn-NMR

○Jinta Ukawa [1] and Hideaki Kimura[2]
[1]*TOYO TIRE & RUBBER CO., LTD, Japan.*
[2]*Bruker Biospin K. K., Japan*

Sulfur and zinc chemicals have important roles in vulcanization reaction of rubber materials. In this study, high-resolution solid-state ^{33}S and ^{67}Zn-NMR spectroscopy were applied to vulcanized rubber materials. QCPMG method was effectively used for ^{33}S and ^{67}Zn-NMR spectroscopy. New signals were detected by vulcanization in ^{33}S-NMR spectra. Decrease of zinc oxide in vulcanization process was figured out in ^{67}Zn-NMR specta.

序論

ゴム材料は多くの場合、硫黄、加硫促進剤などの硫黄化合物、酸化亜鉛などの亜鉛化合物が配合される。このゴム配合物に熱プレス処理を行うと加硫反応によりゴム分子鎖に硫黄による架橋が生じ、実用的なゴム弾性体となる。加硫反応や架橋構造はNMRなど種々の分析手法を用いて数多く論じられてきたが、解明されていない部分は多い。これまでのNMRを用いた加硫反応や架橋構造の解析は、主に^{13}C-NMRや^{1}H-NMRが用いられてきたが、加硫反応や架橋構造を決定づける重要な元素である硫黄や亜鉛を直接観測することなく、近接する炭素や水素から間接的に考察しているため、得られる知見には限界があった。一方、^{33}S-NMRや^{67}Zn-NMRは硫黄や亜鉛を直接観測することから有用な情報が得られると期待されるが、その測定難易度の高さから、ゴム材料について適用された例はこれまでなかった。そこで本研究ではゴム材料について^{33}S-NMRや^{67}Zn-NMR測定を試み、信号を得ることに成功したことから、その結果を紹介する。さらに、これらの測定法が加硫反応や架橋構造の解析に用いることができるか検討を行った。

方法

試料は天然ゴムに硫黄、加硫促進剤、酸化亜鉛、ステアリン酸をオープンロールにて配合し、熱プレスにより加硫したものを用いた。硫黄および酸化亜鉛は必要に応じNMR測定核に対応した同位体濃縮品を用いた。

装置はBruker AVANCE III HD 400システムに低周波核種対応固体プローブを装着したものを用いた。

固体^{33}Sおよび^{67}Zn-NMR測定はパルス系列にシングルパルス法のほか、四極子相互作用により線幅の広くなる信号の感度を高める方法としてquadrupolar Carr-Purcell-Meiboom-Gill (QCPMG)法[1)]を用いた。

^{33}S-NMR, ^{67}Zn-NMR，ゴム
○うかわじんた，きむらひであき

結果と考察

Fig. 1に加硫時間を変えたゴム試料の^{33}S QCPMG-MAS NMRスペクトルを示す。未加硫ゴムでは信号が観測されなかったが、加硫を行うと、加硫が進むにしたがって大きくなる信号が観測された。これは加硫によって硫黄を含んだ構造が新たに生成することを示している。

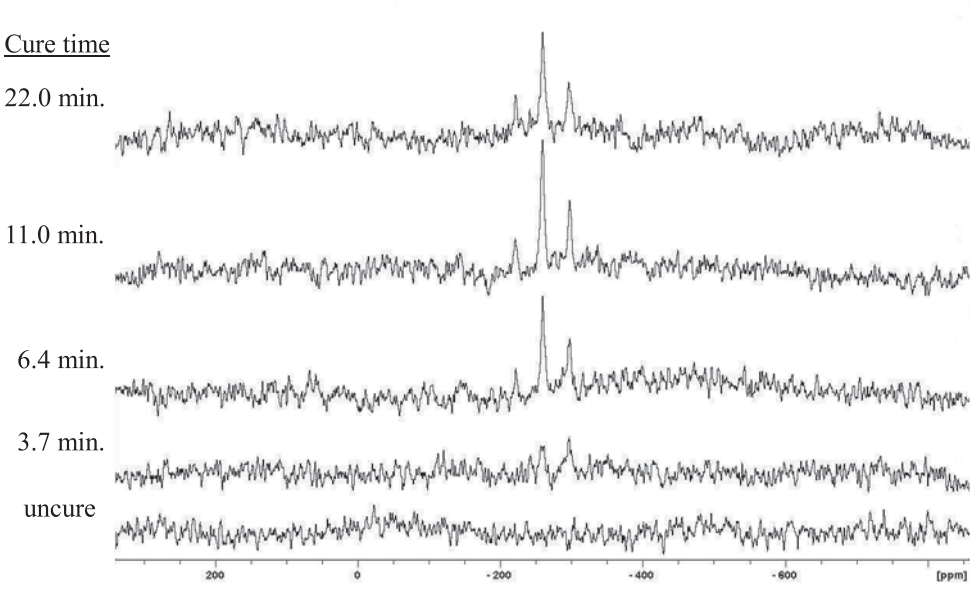


Fig.1 Solid-state ^{33}S QCPMG-MAS NMR spectra of rubber compounds.

Fig. 2に加硫時間を変えたゴム試料の^{67}Zn QCPMG-MAS NMRスペクトルを示す。未加硫ゴムでは配合した酸化亜鉛の信号が検出された。この酸化亜鉛の信号は加硫が進むほど減少していることから、加硫反応によって酸化亜鉛が消費されていく様子を定量的に捉えることができていると考えられる。

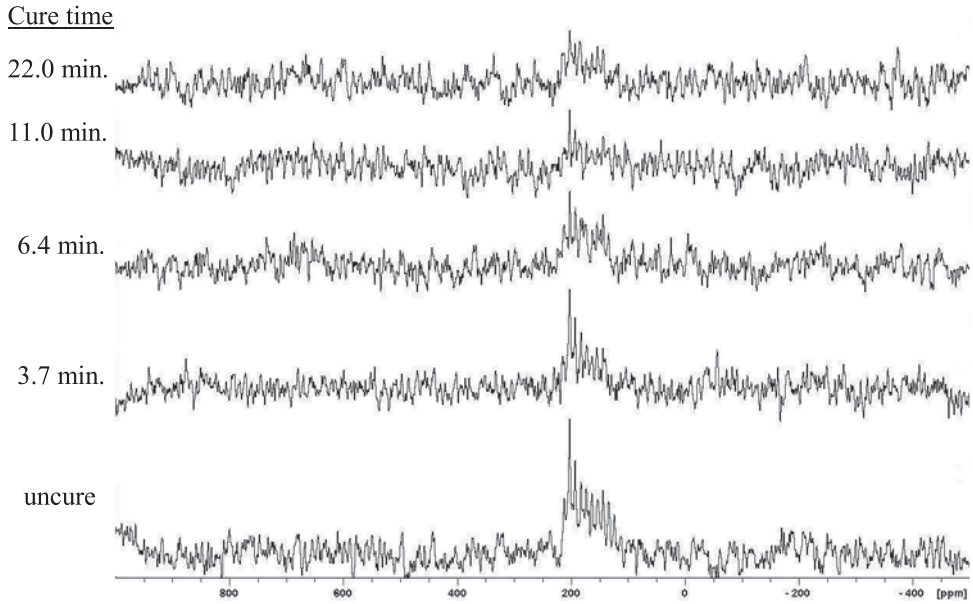


Fig.2 Solid-state ^{67}Zn QCPMG-MAS NMR spectra of rubber compounds.

引用文献

1) Flemming H, Larsen et al., *Journal of Magnetic Resonance*, **131**, 144-147 (1998)

P74

^{67}Zn NMR による In-doped ZnO の解析

○大橋 竜太郎[1]、佐藤 渉[1]、水野 元博[1]、
大木 忍[2]、出口 健三[2]、丹所 正孝[2]、清水 禎[2]
[1]金沢大学・院・自然, [2]物質・材料研究機構

Analysis of In-doped ZnO by ^{67}Zn NMR

○Ryutaro Ohashi[1], Wataru Sato[1], Motohiro Mizuno[1],
Shinobu Ohki[2], Kenzo Deguchi[2], Masataka Tansho[2], Tadashi Shimizu[2]
[1] Kanazawa University National Institute for Materials Science
[2]Graduate School of Natural Science & Technology

Abstract: Indium-doped zinc oxide (In-doped ZnO) is expected for replacement of tin-doped indium oxide, which is generally applied in transparent electrodes, particularly given that zinc is much more abundant and inexpensive than indium. Zinc oxide (ZnO) is doped with cations to be used as an N-type semiconductor. In order to examine effects of doping indium nuclei into ZnO, 1 at.% In-doped ZnO was investigated using solid-state ^{67}Zn NMR spectroscopy under magic angle spinning (MAS). The ^{67}Zn NMR spectrum of In-doped ZnO indicated that zinc nuclei in 1at.% In-doped ZnO have at least two distributions of electric field gradient (EFG) as shown in Fig. 2. Since ZnO which was processed the similar method of doping indium was not shown such spectrum as shown in Fig. 1, it is probably considered that the two zinc distribution of 1 at.% In-doped ZnO is affected by doping indium.

【序】酸化亜鉛(ZnO)は、ウルツ鉱型の結晶構造(Fig. 1)を持つ絶縁体であるが、カチオンをドープすることで透明伝導性をもつ内因性の n 型半導体として機能する。現在透明電極材料として広く用いられているスズをドープした酸化インジウム(ITO)はレアメタルであるインジウムを多量に必要とすることから、ITO の代替物質として液晶ディスプレイ等の様々な分野での応用が期待されている。ZnO は不純物の存在で電気伝導性が大きく変わるため、不純物の種類・量・導入条件を検討することで、物性を制御することが可能となる。不純物として用いられるカチオンの 1 つであるインジウムについて、佐藤らにより TDPAC 法を用いた先行研究が進められており、スピネル型のクラスターが形成されていることが示唆されている。[2] このクラスター形成はインジウムをドープするための焼成により起こっていると考えられるため、インジウムが酸化亜鉛にドープしていく過程を推測するためには、焼成によって酸化亜鉛がどのように変化するかを知る必要がある。佐藤らによるX線回折による解析[3]では ZnO と IZO とで同じ結果が得られた。このため、焼成やインジウムドープによる影響は X 線では解析できない、部分的な構造、あるいは構造の不均一性に対する影響だと考えられる。そこで本研究では、焼成

キーワード：酸化亜鉛、電場勾配、^{67}Zn NMR

○おおはし　りゅうたろう、さとう　わたる、みずの　もとひろ、おおき　しのぶ、でぐち　けんぞう、たんしょ　まさたか、しみず　ただし

やインジウムドープによる影響を調べるため、非晶質等の不均一な構造を持つ試料でも観測を行える固体 ^{67}Zn NMR を用いて、焼成回数の異なる ZnO および 1at. % In-doped ZnO を解析した。

【実験】

1 at.% In-doped ZnO (1%-IZO) の粉末試料を 18.8T (^{1}H 800 MHz, ^{67}Zn 50.1 MHz)の磁場で JNM-ECA NMR 分光器、JEOL 3.2mm MAS スピナーを用いて自作した NMR プローブにより、20 kHz の試料回転下でシングルパルス測定を行った。In-doped ZnO は佐藤らの方法[3]に従って作成した。ZnO の１回目と２回目の焼成は、In-doped ZnO の２回の焼成と同じ条件で行った。

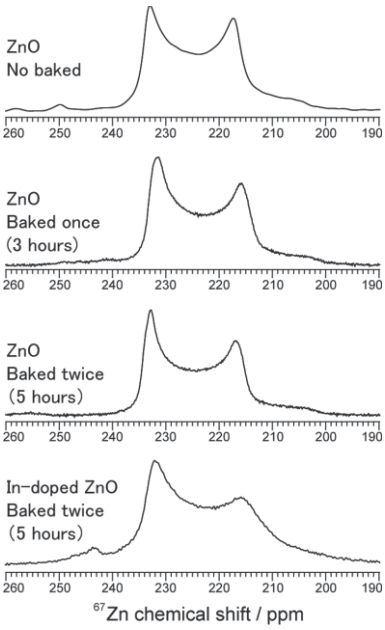


Fig. 1: ^{67}Zn MAS NMR spectra of ZnO and In-doped ZnO.

【結果と考察】

純度 99.999%の ZnO, 1273 K で３時間、１回焼成した ZnO, 1273 K で３時間、1373 K で２時間の２回焼成した ZnO, 1 at. % In-doped ZnO（焼成条件は２回焼成 ZnO と同じ）の ^{67}Zn NMR スペクトルを Fig. 1 に示す。Fig. 1 のように、ZnO の焼成回数が増えると、235 ppm 付近の線形が高磁場（低 ppm）側にはみ出してきているが、焼成回数が線形に与える大きな影響は見られなかった。一方、1 at. % In-doped ZnO では、ドープ率が低いにも関わらず、線形がかなり広幅化した。この広幅化は構造の不均一性によるものではないかと考え、^{67}Zn NMR の線形を支配していると考えられる四極子相互作用の変数、四極子相互作用定数(C_Q)と電場勾配の非対称性（η）の２変数を、相関なく正規分布していると仮定した線形シミュレーションによる線形解析を行った。線形解析の結果を Fig. 2 に示す。Fig. 2 のように、比較的元の ZnO に近い四極子相互作用を持つサイトとかなり異なる相互作用を持ち分布も前者よりも広いサイトの２つのサイトを仮定することで実測と計算スペクトルが良く一致した。以上のことから、インジウムのドープにより、亜鉛の持つ電場勾配が２つの分布を持っていることが考えられる。X 線回折では ZnO と In-doped ZnO に変化が見られなかったことから、この分布はインジウムドープにより格子欠陥が増えているか、インジウムの電荷が試料全体の電場勾配に影響を与えているか、どちらかの理由ではないかと考えている。

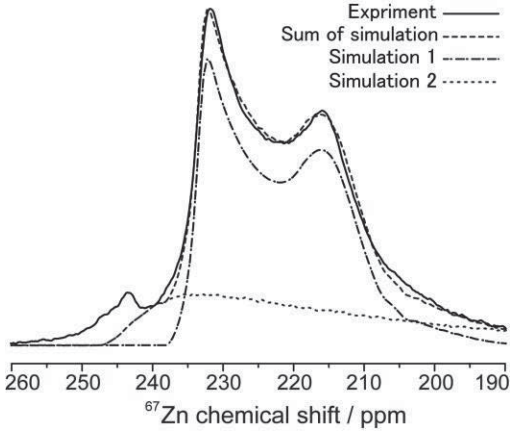


Fig. 2: Experimental and simulated ^{67}Zn MAS NMR spectra of 1 at. % In-doped ZnO. Two distributions (Simulation 1 and 2) of EFG were assumed in the simulation.

【References】

[1] K. Kihara, et al., Canadian Mineralogist, 1985, 23, 647.
[2] W. Sato, et al., Phys. Rev. B, 2014, 90, 235204.
[3] W. Sato, et al., Phys. Rev. B, 2008, 78, 045319.

P75

固体NMRによるプロトン伝導性 poly(vinylphosphonic acid)—イミダゾール複合体中のイミダゾールの状態解析

○成田 貴光，岩崎 彩乃，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 states of imidazole in proton conductive poly(vinylphosphonic acid) — imidazole composite by solid state NMR

○Takamitsu Narita, Ayano Iwasaki, Ryutaro Ohashi, Tomonori Ida, and Motohiro Mizuno
Graduate School of Natural Science and Technology, Kanazawa University, Ishikawa, Japan.

The composite of proton conductive polymer, poly(vinylphosphonic acid) (PVPA) and imidazole (PVPA / *x*Im; *x* is the number of imidazole molecules to a phosphonic acid group of PVPA) is known to show the high proton conductivity even under anhydrous and high temperature condition (e.g. ~ 5×10^{-3} S cm^{-1} at x = 2, 130 ℃) [1,2]. The conductivity increases with increasing x. Thus, imidazole plays an important role in the proton conducting mechanism for PVPA / *x*Im. In this study, we analyzed the states of imidazole in PVPA / *x*Im by solid-state NMR methods. The local structure and dynamics of imidazole in the composite were investigated by ^{1}H–^{13}C HETCOR and ^{2}H quadrupole echo (QE) NMR experiments, respectively.

【序論】

プロトン伝導性高分子 poly(vinylphosphonic acid)（PVPA）とイミダゾール（Im）の複合体 PVPA / *x*Im（x は PVPA のホスホン酸基に対するイミダゾールの分子数を表す ; Fig. 1）は水を必要とせず，100 ℃以上の高温条件下でも高いプロトン伝導性を示すことが報告されている[1, 2]. この複合体はイミダゾール濃度の上昇に伴ってプロトン伝導性が向上し, x = 2, 130 ℃の条件においておよそ 5×10^{-3} S cm^{-1} の高いプロトン伝導性を示す[1]. このことから，この複合体のプロトン伝導機構にはイミダゾールが深く関わっていると考えられるが，複合体中のイミダゾールがどのような状態で存在するのかは明らかになっていない.

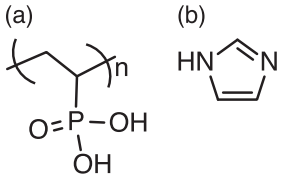


Fig. 1 Structures of poly(vinylphosphnic acid) (a), and imidazole (b).

そこで本研究では ^{1}H—^{13}C HETCOR 法や ^{2}H 四極子エコー（QE）法を用いて PVPA / *x*Im 複合体中のイミダゾール濃度増大に伴うイミダゾールの状態の変化について調べた.

【実験】

測定には，PVPA / *x*Im の他に，PVPA のホスホン酸基の水素とイミダゾールの窒素に結合した水素を重水素化した，PVPA-d_2 / *x*Im-d_1 とイミダゾールの炭素に結合した水素のみを重水素化した，PVPA / *x*Im-d_3 を用いた．固体 NMR 測定には JEOL ECA-300 を用い，6.928 T（^{1}H：294.988 MHz，^{2}H：45.282 MHz，^{13}C：74.175 MHz）の磁場中で測定を行った.

プロトン伝導，イミダゾール

○ なりた たかみつ，いわさき あやの，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 に室温における PVPA / 2Im および PVPA-d_2 / 3Im-d_1 の ^{13}C CP / MAS スペクトルを示す．スペクトルにおいて，イミダゾリウムイオンはブロードなピーク（3, 4）として表れ，イミダゾールはシャープなピーク（5, 6, 7）として表れた．イミダゾールのピークは $x = 2$ の試料には見られず，一部のイミダゾールが複合体中で凝集したような構造を形成していると考えられる．Fig. 3 に PVPA-d_2 / 3Im-d_1 の ^{1}H—^{13}C HETCOR スペクトルを示す．PVPA の主鎖のプロトンは 2.4 ppm に，イミダゾールとイミダゾリウムのプロトンは 29.6—30.9 ppm の範囲に表れ，PVPA の主鎖の炭素（1, 2）とイミダゾールとイミダゾリウムイオンのプロトン（3—7）に相関が見られた．

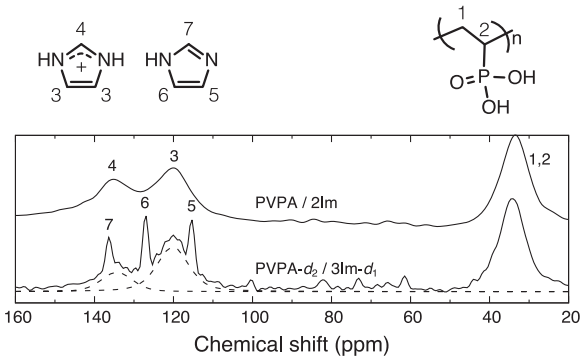


Fig. 2 ^{13}C CP / MAS spectra of PVPA / 2Im and PVPA-d_2 / 3Im-d_1 at room temperature.

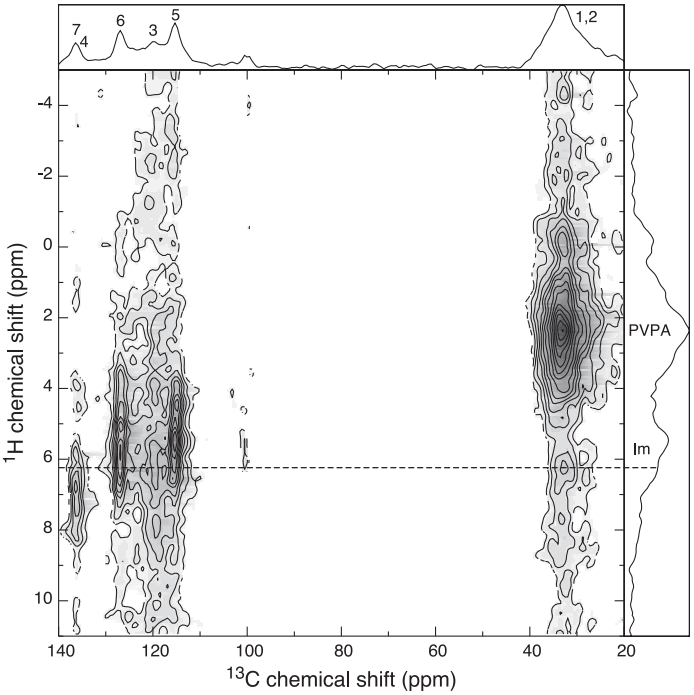


Fig. 3 ^{1}H—^{13}C HETCOR spectral of PVPA-d_2 / 3Im-d_1 at room temperature.

Fig. 4 に 311.7 K における PVPA / 3Im-d_3 ($x = 1, 2, 3$) の ^{2}H QE スペクトルを示す．$x = 1$ ではイミダゾールの遅い再配向運動に起因するブロードなスペクトルが，$x = 3$ ではイミダゾールの速い等方回転運動に起因するシャープなスペクトルが見られ，x = 2 は両者を足しあわせたようなスペクトルとなっている．これらのスペクトルの比較からイミダゾール濃度 x が上昇するにしたがって，イミダゾールの運動がより速くなり，等方回転運動の占める割合が増加することが分かる．

このほか，^{2}H QCPMG スペクトルも測定しており，QE スペクトルと共に現在，分子運動を取り入れたスペクトルシミュレーションによりイミダゾールの詳細なダイナミクスの解析を行っている．

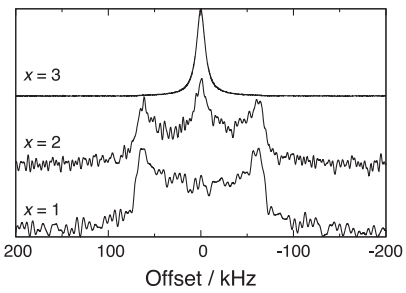


Fig. 4 ^{2}H QE spectra of PVPA / xIm-d_3 ($x = 1, 2, 3$) at 311.7 K.

【参考文献】

[1] Sevil, F.; Bozkurt, *J. Phys. Chem. Solids* **2004**, *65* (10), 1659–1662.

[2] Yamada, M.; Honma, *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108* (18), 5522–5526.

P76

液晶性ポリエステルが形成するハニカム構造における気体輸送特性のNMR法による研究

○石神 稜大，吉水 広明
名工大院・工

A study on the gas transport properties of honeycombed structure of liquid crystalline polyesters by NMR methods

○Ryota Ishigami, Hiroaki Yoshimizu
Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology, Japan.

The thermotropic liquid-crystalline polyesters with decyl side chains, PBpT-O10 was synthesized. Here, we report on the preparation of gas separation materials made from these polyesters. PBpT-O10 can be formed the honeycombed structure and filled hexagonal channel-like space with the decyl side chains. In this study, the mono-axially oriented sample of PBpT-O10 was prepared by the SCM of an NMR spectrometer. The structural characterizations of the oriented PBpT-O10 were performed by solid state ^{13}C NMR method. The anisotropic diffusion properties of the PBpT-O10 samples were confirmed from the ^{1}H NMR measurements of the methane in the samples including the pulsed-field gradient method. The relatively large diffusion coefficient along the mono-axially oriented direction was obtained.

序論

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，温度を下げてもその配向性が保たれることから，高度な秩序構造に因る高性能な気体分離膜への応用が期待される。PBpT-O10は側鎖に柔軟なデシル基を有する全芳香族液晶性ポリエステルである。これはサーモトロピック液晶性を呈し，主鎖骨格と側鎖層がミクロ相分離して独特なハニカム構造を形成する(Fig. 1)。これは平均3本の剛直な全芳香族ポリエステル主鎖が並列に会合して六角中の一辺を成し，このチャネル状の隙間を比較的柔軟な直鎖アルキル(デシル基)で充填された，凝集高次構造体であり，ここへ溶解した気体の拡散経路は選択的に制限された空間になると考えられる。本研究では, PBpT-O10のハニカム構造の磁場配向を試み，それの気体拡散特性についてNMR法を用いて調査した。

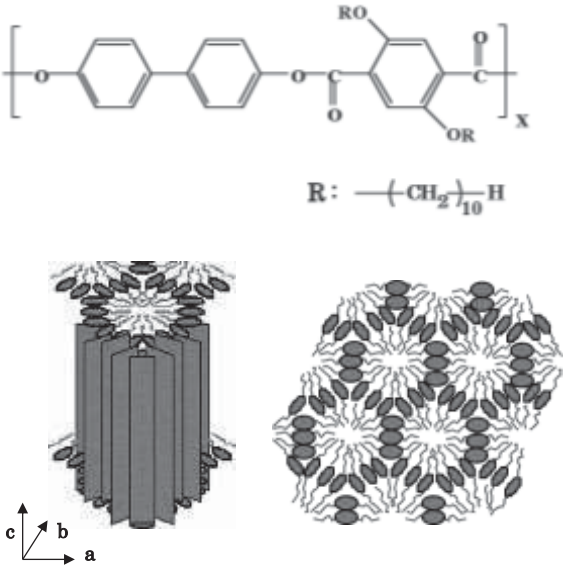


Fig. 1 Schematic illustrations of the chemical and honeycombed structures of PBpT-O10.

NMR， 液晶性ポリマー， 気体輸送特性，

○いしがみ りょうた，よしみず ひろあき

方法

PBpT-O10の合成確認は^{1}H NMR測定から行った。示差走査熱量測定から相転移挙動の確認を行った。ハニカム構造形成の確認は広角X線回折測定で行った。9.4 TのSCM中で，磁場配向試料を調製した。配向構造は^{13}C CP/static NMR 測定から確認した。メタンガスを対象に^{1}H PFG NMR測定を行い，調製したPBpT-O10試料片中での自己拡散係数を求めた。

結果と考察

本研究で合成されたPBpT-O10の重合度はかなり低く，オリゴマー程度であった。示差走査熱量測定から決定された液晶温度域を考慮して，PBpT-O10を実験室で熱処理並びにアニーリングした。この試料を対象に広角X線回折を測定した結果，非晶部は認められず，ハニカム構造がランダムに配向して形成されていることが確認された。固体^{13}C NMR 測定からは側鎖充填層の局所分子運動性が主鎖部分と比較して高いと結論された。また，^{13}C CP/static NMR測定の結果，ハニカム構造がランダムな方向を向いている無配向試料では，PBpT-O10を構成する多種多数の炭素のいわゆる“粉末パターン”が重なり合って幅広いスペクトルが観察された(Fig.2(a))。PBpT-O10主鎖の方向でをz軸にとり図示したが，これがNMR分光計のSCMの磁場(B_0)と平行になるように置かれた磁場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.2(c))。さらにこの磁場配向試料を90° 回転させてz軸がB_0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,2(b))。これはPBpT-O10分子軸が一定の方向に配向しているためであり，この結果から一軸配向を確認できた。また，^{1}H PFG NMR測定の結果，PBpT-O10試料中にあるメタンの拡散係数はランダム配向試料に比べ，磁場配向試料でより大きな値が得られた。z軸方向の拡散係数がxy平面方向での拡散係数より大きかった。これらの結果よりハニカム構造の特徴を反映して気体分子の拡散挙動に異方性が現れたといえる。

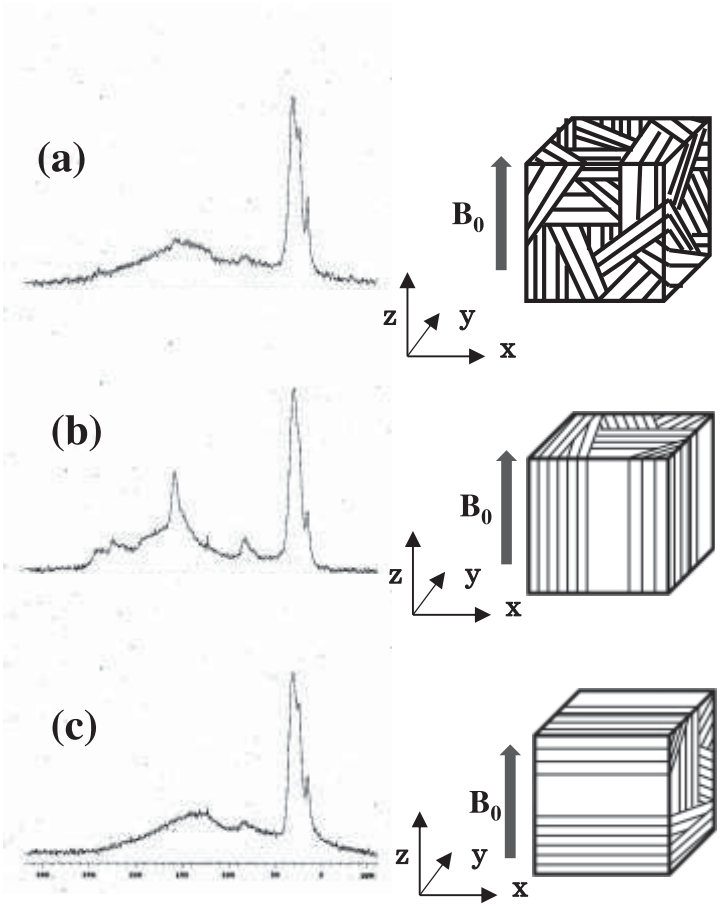


Fig. 2 ^{13}C CP/Static NMR spectra of PBpT-O10 at 22 ℃: (a) randomly oriented (b) z axis is parallel to B_0 (c) z axis is perpendicular to B_0.

P77

BOLD 法を用いた匂い刺激によるマウス脳活性化の検出

舩津 大嗣[1]，○吉永 壮佐[1]，平金 真[1]，岩本 成人[1]，寺沢 宏明[1]
[1]熊本大学大学院生命科学研究部 構造生命イメージング分野

Activation analyses of the mouse brain evoked by odor stimuli using the BOLD method

Hirotsugu Funatsu[1], ○Sosuke Yoshinaga[1], Makoto Hirakane[1], Shigeto Iwamoto[1], and Hiroaki Terasawa[1]
[1]*Department of Structural BioImaging, Faculty of Life Sciences, Kumamoto University, Japan*

Living organisms receive information from their environment through various sensory organs. The surrounding chemical signals contribute to survival and species preservation especially for animals that rely heavily on chemoreception for gathering environmental information. Odors are chemical signals that regulate a wide range of social and sexual behaviors in many animals. They bind to selective olfactory receptors in the olfactory epithelium, and the chemical signals induced by the receptor activation are transmitted through the olfactory bulb, to higher-order brain areas. The aim of this study is to reveal the olfactory neural circuitry that recognize and discriminate the odor substances that activate the olfactory system in mice. An example of such substances is muscone from musk deer to attract females. The experimental results obtained by the blood oxygenation level-dependent (BOLD) analysis were discussed with the results from the manganese-enhanced MRI (MEMRI) and the immunohistochemical analyses.

【背景】

動物は、嗅覚を通じて外界から様々な情報を得ている。特に、外界の情報収集の多くを化学感覚に依存する動物では、種の保存や生命の危機回避において、嗅覚の果たす役割は大きい。匂い物質がその情報の担い手であり、情動や行動、生理的変化を引き起こす。匂い物質は、吸気とともに鼻孔に取り込まれ、鼻粘膜上皮に存在する嗅覚受容体に選択的に結合する [1]（Fig. 1）。それにより引き起こされたシグナルが、嗅覚神経を通して嗅球内で統合処理され、さらに高次の脳内へと神経伝達される。嗅球および脳にはそれぞれの匂いに対し特徴的な応答パターンがあることが知られている [2]。しかし、嗅球の腹側や内側などの領域、および、高次の脳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 [3]。

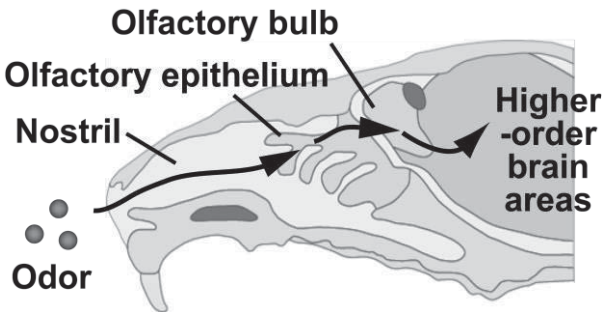


Fig. 1 Olfactory system for odor perception in mice. Odor substances are assimilated by the nostrils upon air intake, and bind to selective olfactory receptors in the olfactory epithelium . The chemical signals induced by the receptor activation are transmitted through the olfactory sensory neurons to the olfactory bulb, and to higher-order brain areas.

ｆＭＲＩ，脳活性化，嗅覚

ふなつひろつぐ，○よしながそうすけ，ひらかねまこと，いわもとしげと，てらさわひろあき

ジャコウジカ由来の匂い物質であるムスコンについては、manganese-enhanced MRI (MEMRI) 法を用いたマウス嗅球における活性化領域の同定 [4]、および免疫組織化学染色を用いたマウス嗅球と脳の活性化領域の同定 [3] が報告されている。

本研究は、リアルタイムで匂い応答を観測する blood oxygenation level-dependent (BOLD) 法を用いてムスコンによる嗅球・脳の活性化領域を明らかにし、MEMRI 法と免疫組織化学染色を用いた知見と組み合わせることで、嗅球から高次の脳領域へと至る匂いを識別する神経回路を包括的に明らかにする。

【方法】

撮像装置は、7T MRI および 2ch phased array surface cryogenic coil (Bruker BioSpin) を使用した。麻酔下の C57BL/6 雄マウスを対象とし、嗅球・脳の T_2^* 強調画像の連続撮像中に複数回のムスコンの匂い刺激を加えた。マウスの呼吸数と体温をモニタリングし、撮像中に大きく変動しない時間領域を解析に使用した。匂い刺激にともなう信号変化を SPM8 により解析し、ムスコンによる活性化領域と推定される領域をマウスの解剖画像（T_2 強調画像）へマッピングした。これらの領域を、MEMRI 法の結果 [4] と免疫組織化学染色の結果 [3] と比較し、総合的に考察した。

【結果】

BOLD 法により同定した嗅球の活性化領域は、免疫組織化学染色で同定された嗅球腹側前部の活性化領域を含んでいた。その領域は、MEMRI 法により同定した活性化領域にも含まれていた。また、嗅球背側後部において、BOLD 法と MEMRI 法により同定した活性化領域が共通する箇所が見られた。

高次の脳領域においては、嗅覚伝導路が位置する脳底を含む領域の解析を進めている。解析結果を免疫組織化学染色による知見と比較することで、考察を行う。

【展望】

常磁性酸化鉄の造影剤を用いる cerebral blood volume (CBV) 法によってムスコン匂い刺激実験を実施することで、BOLD 法で得られた活性化領域についてデータの検証と補完を行い、活性化領域の精度を高める。

【参考文献】

[1] Touhara, K., Vosshall, L.B., *Annu. Rev. Physiol.* **71**, 307–332 (2009)

[2] Uchida, N. *et al.*, *Nature Neurosci.* **3**, 1035–1043 (2000)

[3] Shirasu, M. *et al. Neuron* **81**, 165–178 (2014)

[4] 後藤ら，第４１回日本磁気共鳴医学会大会 (2013)；平金ら，第５２回 NMR 討論会 (2013)；後藤ら，第４２回日本磁気共鳴医学会大会 (2014)

P78

9.4T縦型超伝導磁石MRIを用いた固体イメージングの試み

○瀬戸井 綾菜[1]，巨瀬 勝美[2]
[1]筑波大学理工学群応用理工学類
[2]筑波大学数理物質系物理工学域

Solid imaging on an MRI system using a 9.4T vertical bore superconducting magnet

○Ayana Setoi[1], Katsumi Kose[2]
[1]*College of Engineering Sciences, School of Science and Engineering, University of Tsukuba*
[2]*Instisute of Applied Physics, University of Tsukuba*

We constructed an MRI system using a 9.4T vertical bore superconducting magnet designed for NMR spectroscopy. However, this system has been optimized for a liquid state sample such as biological soft tissues and imaging of solid samples has not been considered. We thus performed experiments to demonstrate possibility of application to solid samples. We used a LEGO block as a solid sample and obtained its clear 3D image dataset using the 3D projection method. In the pulse sequence, the echo time of 3 ms was a minimum because of the bandwidth limitation of the MRI transceiver. Therefore we have concluded that if the signal bandwidth of the transceiver system is extended, TE can be less than 1 ms and imaging of solid material with shorter T_2 can be possible.

１．はじめに

固体のMR imagingとしては，これまで，Constant time imaging（CTI）やSingle point imaging（SPI）およびそれを発展させた方法などが用いられてきたが[1,2]，最近は，臨床用MRIにおいても行われるようになってきた．ただし，この分野では，測定時間の短縮のため，3D projection法をベースにした，Zero echo-time imaging（ZTE）などが行われている[3]．そこで，本研究では，主に生体試料の撮像のために開発されたMRIシステムで，固体のイメージングができるかを評価するために，3D projection法による撮像を行った．

２．装置と方法

Fig.1 に本研究使用したMRIシステムを示す．本システムは，9.4T，室温開口径54mmの縦型超伝導磁石（JMTC-400/54/SSS, JASTEC），自作の室温二次シムコイル（内径40mm），低インピーダンス勾配磁場コイル（外径39mm，内径32mm，各コイルの直流抵抗 : 122.2，101.7，100.9mΩ），ソレノイドRFコイル（直径12.5mm），デジタルRFトランシーバー（（株）エム・アール・テクノロジー社（MRTe）製）などから構成されている．送受信系としては，主に帯域が±50kHzのFIRフィルタが内蔵されたものを使用した．なお，撮像ソフトウェアとしては，同じくMRTe製のSampler 7D を使用した．

撮像試料には，レゴブロック（ABS樹脂）を使用した（Fig.2）．

画像再構成法には，線形補間法を用いたregridding 法を使用した．線形補間法とは，k空間にお

MRI，固体イメージング，高磁場

○せといあやな，こせかつみ



Fig.1 Overview of the MRI system

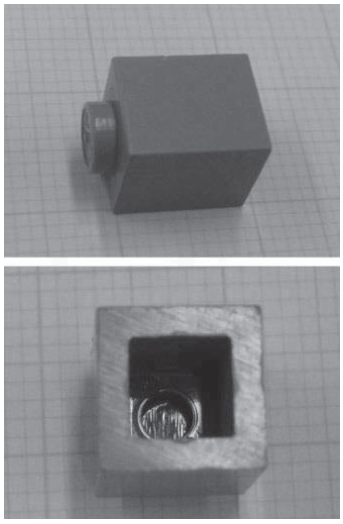


Fig.2 LEGO block

けるデカルト座標系の格子点におけるFourier 成分の値を，それを取り囲む8個の極座標上の格子点における計測データ値に，距離に応じた重みをつけた線形補間によって求める方法である．

３．パルスシーケンス

撮像に使用した3D projection 法のパルスシーケンスをFig.3に示す．図に示すように，合成強度を一定とした投影方向に沿った勾配磁場をまず印加する．その後，それらの強度が十分に平坦になってから，幅の狭いRFパルスをTE/2間隔で2個印加することによってスピンエコーを発生させ，その信号をサンプリングした．勾配磁場方向は，z 軸方向からの極角をθ，それと直交するxy 平面における方位角をφとして，θとφをそれぞれ0~πと変化させた．φを0~πとしたのは，スピンエコー信号に対応するためである．

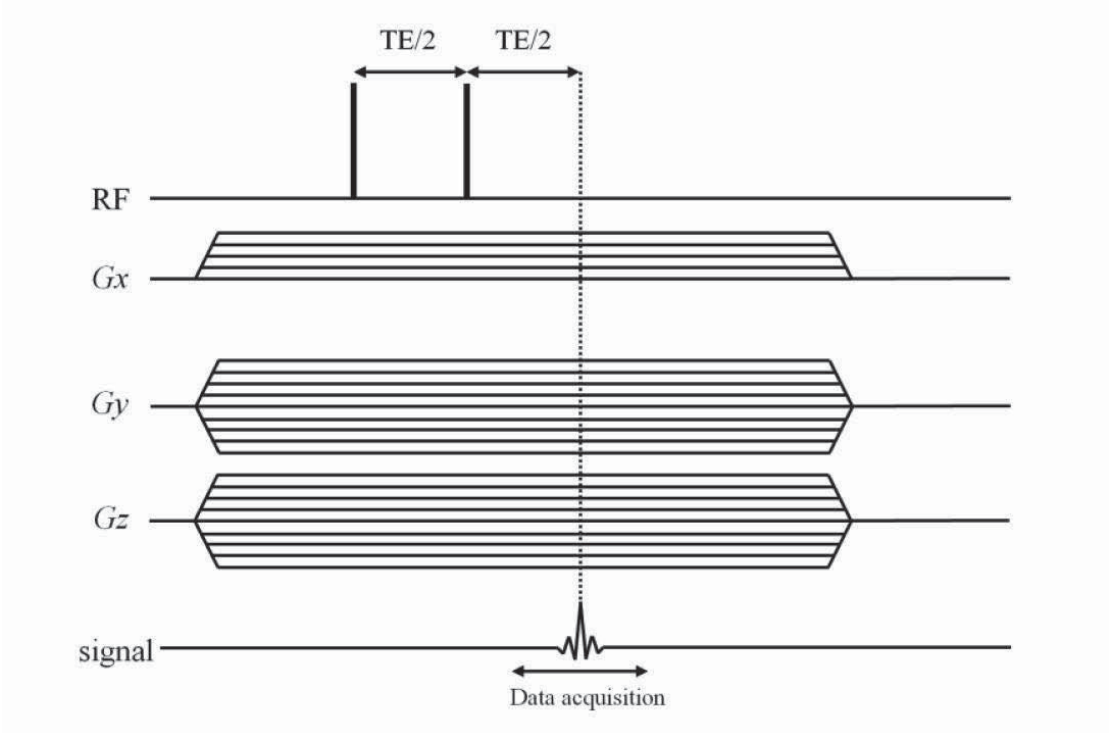


Fig.3 Pulse sequence of the 3D projection imaging method for short T_2 samples

Fig.3 に示したシーケンスで撮像を行うにあたり，スピンエコー信号の計算機シミュレーションを行った．個々の核磁化が，有効磁場の周りにどのように運動するかを計算することにより，スピンエコー信号の強度を計算し，RFパルスのフリップ角 α に対し，スピンエコー信号の強度変化を調べた．計算をする際の条件として，最初のRFパルスを印加するときは，核磁化はすべてz 方向にあると仮定し，静磁場不均一性はないものとし，勾配磁場だけによって静磁場分布が変化しているものとした．また，RFパルス印加中は，緩和時間の影響は考えないとした．

RFパルスは，同じRFパルスを2回印加する方法 $(\alpha - \alpha)$，2回目に印加するRFパルスのフリップ角を1回目に印加するRFパルスのフリップ角の2倍にする方法 $(\alpha - 2\alpha)$ を使用した．後者は，振幅を2倍にする方法と，パルス幅を2倍にする方法の2通りを用いた．

Fig.4 に，フリップ角を 0°~180° まで10° ごとに変化させて，スピンエコー信号の強度変化を調べた結果を示す．このように，条件によって，最大強度を与えるフリップ角と，そのピーク強度が変化した．

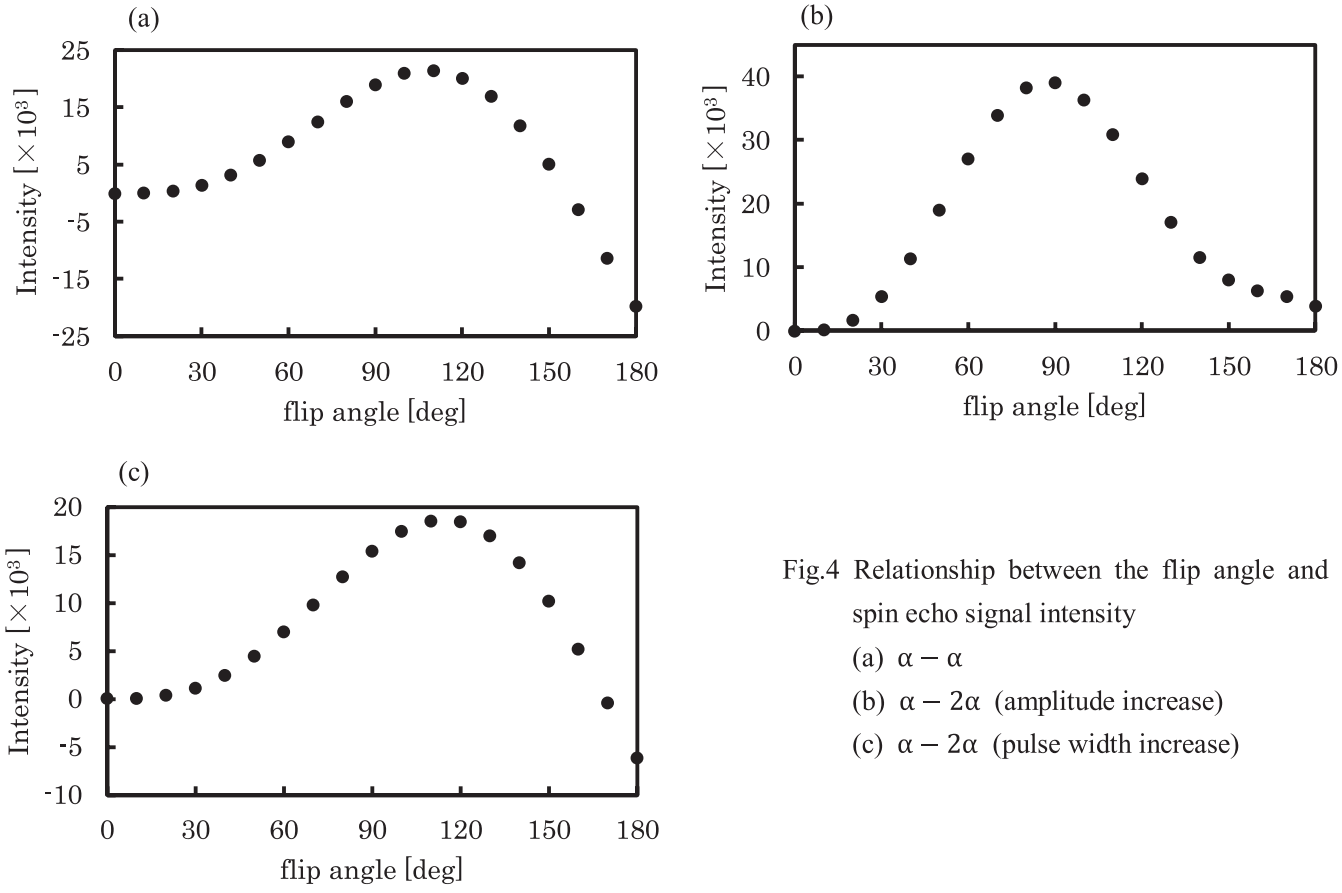


Fig.4 Relationship between the flip angle and spin echo signal intensity
(a) α − α
(b) α − 2α (amplitude increase)
(c) α − 2α (pulse width increase)

4．実験結果

Fig.3 に示したパルスシーケンスを用いてレゴブロックを撮像し，サーフェイスレンダリングした結果を Fig.5 に示す．撮像条件は，TR=800ms，TE=3ms，FOV=(20.48mm)^3，θ と φ を 0~π までそれぞれ 128 等分割，NEX=4，全撮像時間は約 14 時間 40 分である．この撮像は，24μs の幅を持つ同一の RF パルスを 2 個使用して，信号強度が最大になる送信パルス強度において行った．再構成マトリックスは 128^3 である．画像に示すように，試料側壁の傷や細かい円形の穴とその周囲の構造が明瞭に描出されている．

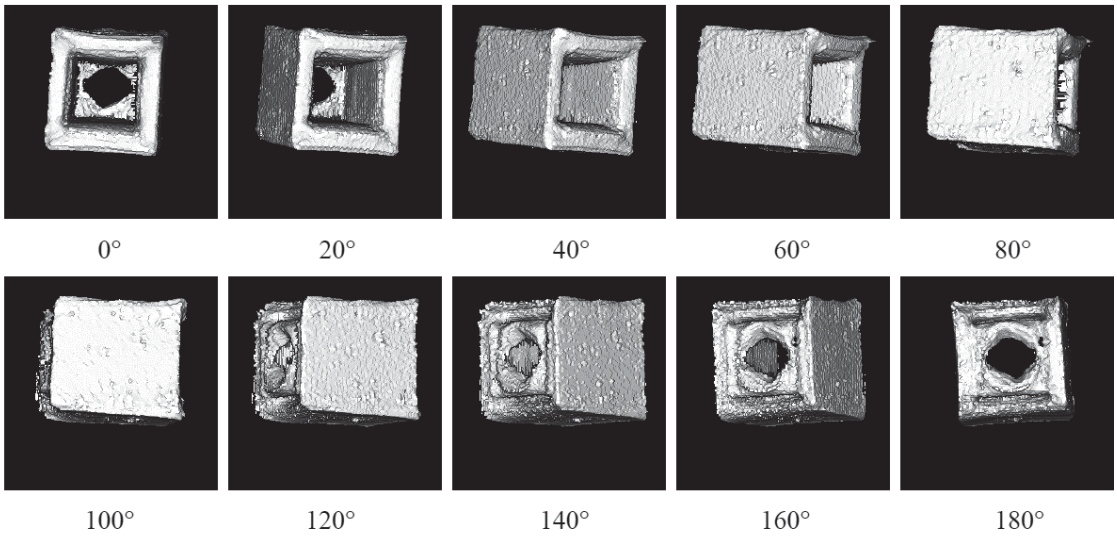


Fig.5 Surface rendered images of a LEGO block acquired with the 3D projection method (TE=3ms)

５．考察

5.1　パルスシーケンスについての考察

シミュレーションの結果より，90° パルスと 180° パルスを，同じ幅で，振幅を 2 倍にすると，スピンエコー信号の強度が最大になる．振幅に上限があって180° パルスの振幅を 2 倍にできない場合には，約 110° のパルスを，同じ幅，同じ振幅で 2 個印加するときに強度が最大になり，実験は，この条件で行っている．また，使用したシーケンスでは極角 θ を等分割しているが，今後は，信号サンプリング密度が三次元空間で均一になるようなスキャン法を開発する予定である．

5.2　ハードウェアについての考察

固体材料の T_2 は，1ms 以下のことが多いため，さらに TE を短くする必要がある．しかし，Fig.3 のシーケンスを使用する場合，本研究では TE=3ms が限界であった．これは本システムの送信系の 50kHz の帯域制限のため，送信 RF パルス幅の下限が 20μs 程度にあり，これにより励起帯域も 50kHz 程度となっているからである．これにより，FOV の帯域が決定され，画素数を 128 とすると，1 画素あたりの信号帯域は 400Hz 程度，信号収集時間は約 2.5ms になることから TE=3ms とした．よって，このシーケンスで TE を短縮するためには，送信パルスの帯域を広くする必要があり，それに合わせて，受信信号の帯域も広くする必要がある．デジタルトランシーバーの送受信帯域は，内蔵の FPGA の書き換えにより，±300kHz へと拡張することが可能であるため，この帯域になれば，H_1 の出力強度にも依存するが，1ms 以下のエコー時間が達成可能である．

６．むすび

液体試料に最適化された 9.4TMRI システムで，固体イメージングを試みた．送受信系の帯域の拡大により，より短い T_2 を持つ固体の撮像が可能であると結論した．

参考文献

[1] S. Gravina, D.G. Cory, Sensitivity and resolution of constant-time imaging, J. Magn. Reson. A 104 (1994) 53–61.
[2] B.J. Balcom, R.P. MacGregor, S.D. Beyea, D.P. Green, R. L. Armstrong, T.W. Bremner, Single-Point ramped imaging with T_1 enhancement (SPRITE), J. Magn. Reson. A 123 (1996) 131–134.
[3] M. Weiger, D.O. Brunner, B.E. Dietrich, C.F. Muller, and Klaas P. Pruessmann, ZTE Imaging in Humans, Magn. Reson. Med. 70 (2013) 328–332.

P79

二枚貝心拍動周期の光プレチスモグラフィーと7 T NMRマイクロイメージングによる解析

○瀬尾 芳輝[1*]、瀬尾 絵理子[2]、早川 実佳[1]、大橋 好偉[1]、村上政隆[3]
[1]獨協医科大学・医学部、[2]東京大学・大気海洋研、[3]生理研

Cardiac cycle of bivalves analyzed by photoplethysmography and 7 T NMR microimaging

○Yoshiteru Seo[1], Eriko Seo[2], Mika Yokoi-Hayakawa[1], Yoshie Imaizumi-Ohashi[1], and Masataka Murakami[3]
[1]*Dokkyo Medical University School of Medicine, Japan.*
[2]*Atmosphere and Ocean Research Institute, The University of Tokyo, Japan.*
[3]*National Institute for Physiological Sciences, Japan*.

Cardiac cycle of bivalves, the *Mytilus galloprovincialis*, was analyzed by 7 T NMR microimaging. The cardiac motion was imaged by retrospectively self-gated fast low angle shot sequences (IntraGate) and T_1-weighted fast gradient-echo imaging (T_{1w}-cine). Flow of hemolymph was detected by phase-contrast gradient-echo imaging. Based on these results, in addition to the original constant-volume hypothesis (i. the total volume of the heart is always the same, and ii. ventricle contraction causes a decrease in the pressure in the pericardium), we added two postulates (iii. the low pericardial pressure maintains venous return from the anterior oblique vein to the auricle, and iv. the pressure difference between the auricle and the pericardium drives haemolymph filtration through the auricle walls). Infrared photoplethysmography (IRP) waveform and T_{1w}-cine MRI were observed simultaneously. As a result, we concluded that the initial large peak of IRP corresponds to the auricular filling followed by ventricular dilatation, and the sharp drop of IRP corresponds to the ventricular contraction. We also analyzed the IRP waveform under different heart rate, and will present in the meeting.

序論および方法

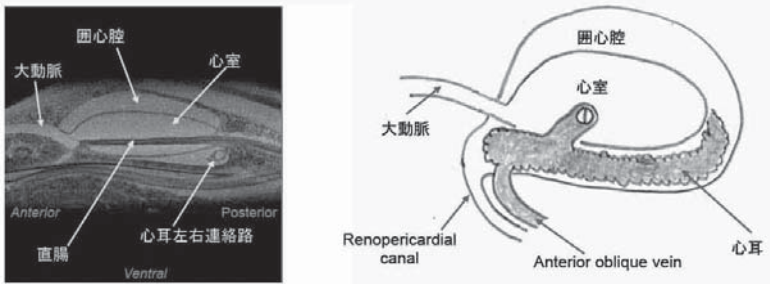
我々は、深海性二枚貝をモデル動物として、内皮細胞性血管弛緩因子(EDRF)を研究している[1)]。赤外線光プレチスモグラフィー法（IRP 法）は、心拍動を非侵襲的に長時間連続測定できる[2)]。しかしながら、IRP 波形はバリエーションが大きく、IRP 波形と心拍動との対応付けは不十分なため、あまり利用されていない。我々は、まず、*Mytilus galloprovincialis*（ムラサキイガイ）の心拍動を IntraGate 法と T_1-weighted cine MRI 法で、位相コントラスト MRI 法により血リンパ液の流れを測定し、心拍動についての constant-volume 仮説を検証した。次に、IRP 法と T_1-weighted cine MRI 法（毎秒 3 枚）によりムラサキイガイの心拍動を同時計測し、IRP 波形と心拍動との対応、および心拍動に伴う血流動態の変化を捉えることができた。MRI 測定には、7 T AVANCE III マイクロイメージング装置（Bruker Biospin）を用い、IRP 法は、小動物モニター（1025L, SAI）に MRI 法との同時測定用に作成した光ファイバー反射式赤外センサーを用いた。

心拍動、血流、二枚貝

○せお　よしてる，せお　えりこ，はやかわ　みか，おおはし　よしえ，むらかみ　まさたか

結果および考察

Fig. 1 Anatomy of *Mytilus galloprovincialis* heart

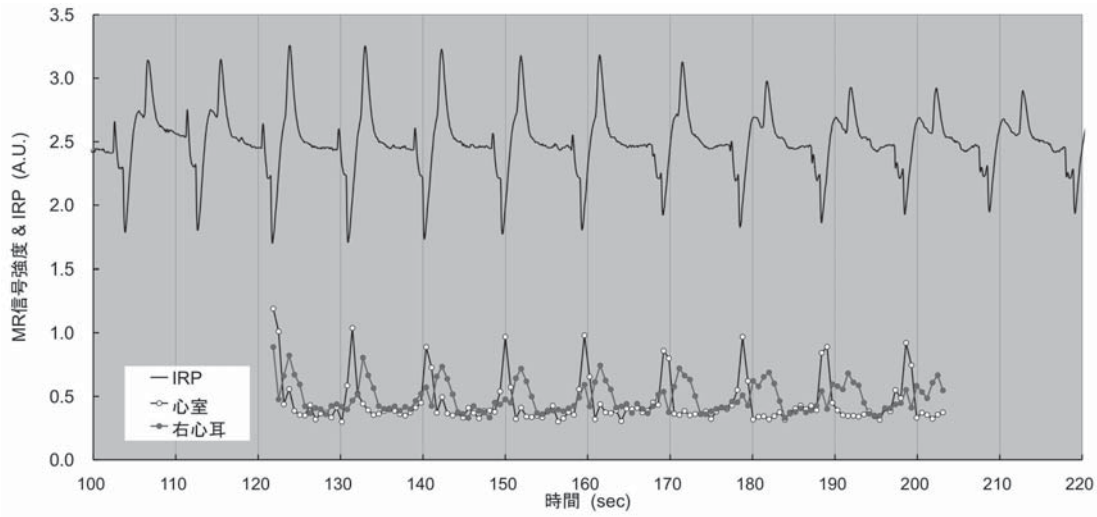


ムラサキイガイの心臓は2心房1心室からなり、Fig. 1に示すように、心室は、大動脈へ血リンパを拍出し、左右の心耳から房室弁を介し血リンパを受け取る。また、直腸が長軸方向に貫いている。心室・心耳は囲心腔内にあり、心耳へは鰓からの血リンパがanterior oblique veinを経由し還流している。囲心腔の前方にはrenopericaridial canalがあり、腎へと交通している。人工海水中(23℃)での拡張期末心室容積(EDV)、収縮期末心室容積(ESV)、１回拍出量(SV)は、各々心体積の50%, 21%, 29%であった。駆出率（SV/EDV）は約60％であり、ヒトの心室（60-80％）と同等の値を示した。大動脈内の血リンパ流は層流で平均流速は約50 mm/sであった。一方、鰓血管や心耳内の血リンパ流はおよそ10 mm/sであった。

以上の測定結果を基に、RamsayやKrijgsman & Divaris[3)]らによって提唱されたconstant-volume 仮説を検証した。その結果、i) 心周期を通して心臓の全体積は一定であり、ii) 心室の収縮によって囲心腔内圧を低下させる、という従来からの条件に加え、囲心腔の低圧によって iii)静脈還流が維持され、iv) 心耳壁から囲心腔へと血リンパが濾過される、という2条件が新たに明らかとなった。

Fig. 2 に典型的なムラサキイガイの心拍動の測定例を示す。図中 120 秒過ぎから約 82 秒間 MRI 測定が行われている。MRI 測定中および測定前後で心拍数は約 6 bpm で安定している。心室および心耳の T_1 強調 MRI 信号強度のピークは、各々、心室からの血リンパの拍出、および心耳への血リンパの流入を示している。IRP 波形は、心室からの拍出に伴い心室体積が減少し、IRP 信号強度が減少している。また、心室収縮により囲心腔内圧は低下し、心耳への血リンパ還流量が増加し、心室へと流入する。結果として、IRP 波形の信号強度が増加している。以上より、IRP 波形と心拍動との関係が明らかとなり、IRP 法の応用がさらに進むものと思われる。

Fig. 2 Waveform of IRP and changes in T_{1W}-MR imge intensity



引用文献

1) Seo E, et al., J Exp Biol 217: 964-973, 2014.

2) Depledge MH, Comp Biochem Physiol 77A: 369-371, 1984.

3) Krijgsman B J and Divaris GA, *Biol Rev* 30: 1-126, 1955.

P80

DOSY曲線の一括推定によるMCR-NLR法の高速化

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

A Fast Method Based on MCR-NLR Method via Combined Estimating Process of DOSY-curve

○Yuho Tanaka[1], Tomoki Nakao[2], Kenya Izumi[2], Hiroaki Utumi[2], Tosihiro Furukawa[1]
[1]*Department of Industrial Engineering, Tokyo University of Science.*
[2]*JEOL RESONANCE Inc.*

MCR-NLR method is one of the analysis methods for the observed DOSY data. The MCR-NLR method estimates two matrices by using the alternating optimization algorithm. One matrix is spectrum matrix which has the spectrum of individual compound in column. Other matrix is DOSY-curve matrix which has the DOSY-curve according with the diffusion of each individual compound in column. In the MCR-NLR method, the DOSY-curve matrix is optimized two processes. First process estimates the least square solution of DOSY-curve matrix in the non-negative condition. Second process corrects the column of estimated matrix. This correction process exchanges the column of the estimated matrices in the first process for most approximate vector indicated exponential function. Therefore, To estimate DOSY-curve matrix spends time. We proposed new method that reduces the time cost of estimating two matrices. The proposed method improves the optimization process for DOSY-curve matrix.

【はじめに】

DOSY法とは，複数種の化合物を含む試料のスペクトルから，自由拡散係数の違いを利用して個々の化合物に対応するスペクトルの推定を行う手法である．現在，DOSY法の一つにMCR-NLR(Multivariate Curve Fitting with Non-linear Least square Regression)法と呼ばれる手法がある．MCR-NLR法は，観測スペクトルから各化合物のスペクトルを列に持つスペクトル行列とDOSY曲線を列に持つDOSY曲線行列の二つを交互に最適化することで推定する手法である．MCR-NLR法の特徴として，DOSY曲線が指数関数で表されるという性質を利用しており，ピークが重なりあったスペクトルに対しても高精度な分解が可能である[1]．DOSY曲線行列の最適化は行列要素の推定と列がDOSY曲線となるような減衰率の推定という二つの処理によって行われる．従って，DOSY曲線行列の推定には時間がかかってしまう．

本報告では，従来の方法であるMCR-NLR法を基礎として計算時間の短縮と推定精度の向上を図る．提案法は，従来法のDOSY曲線行列の最適化，すなわち行列及び減衰率の推定を同時に行う．そのため，減衰率を直接推定することでDOSY曲線行列の推定に要する時間は短縮することが可能である．最後に，計算機シミュレーションにより提案法の有用性を示す．

【信号モデル】

観測データ行列**Y**は以下の式によって表される．

DOSY，MCR-NLR，高速化

○たなかゆうほ，なかおともき，いずみけんや，うつみひろあき，ふるかわとしひろ

$$\mathbf{Y} = \mathbf{C}\mathbf{S}^{\mathrm{T}} + \mathbf{N} \tag{1}$$

ここで，$\mathbf{C}$は各化合物のDOSY曲線を列に持つM × K行列，$\mathbf{S}$は各化合物のスペクトルを列に持つN × K行列，$\mathbf{N}$は雑音成分を表すM × N行列であり，それぞれ，DOSY曲線行列，スペクトル行列，雑音行列と呼ぶ．また，DOSY曲線行列$\mathbf{C}$のm行k列目の要素$\{\mathbf{C}\}_{\mathrm{m,k}}$は

$$\{\mathbf{C}\}_{\mathrm{m,k}} = \mathrm{e}^{-D_k\left(\Delta-\frac{\delta}{3}\right)(\gamma\delta g_m)^2} \tag{2}$$

で表される．ここで，D_{k}はk番目の化合物の自由拡散係数，g_mはm回目の測定における磁場勾配強度を表している．なお，本報告では，$(\Delta - \delta/3) = 1$，$\gamma\delta = 1$とする．また，スペクトル行列$\mathbf{S}$のn行k列目の要素$\{\mathbf{S}\}_{\mathrm{n,k}}$は

$$\{\mathbf{S}\}_{\mathbf{n,k}} = \boldsymbol{Re}\left[\sum_{p=1}^{P_k} \frac{A_{p,k}}{\sigma_{p,k} + j2\pi\left(f_{\mathrm{n}} - f_{p,k}\right)}\right] \tag{3}$$

で表される．ここで，P_k，$\mathrm{A}_{p,k}$，$\sigma_{p,k}$，$f_{p,k}$はk番目の化合物のスペクトルのピーク数，ピーク強度，半値半幅，共振周波数をそれぞれ表している．なお，f_{n}は周波数領域の標本点に対応する周波数の値である．また， Re[·]は実部を意味する．

【MCR-NLR法】

MCR-NLR法は，以下の最適化問題を考える．

$$\min_{\mathbf{C},\mathbf{S}} \left\|\mathbf{Y} - \mathbf{C}\mathbf{S}^{\mathrm{T}}\right\|_{\mathrm{F}} \quad \text{subject to } \mathbf{C} \geq \mathbf{0}, \mathbf{S} \geq \mathbf{0} \tag{4}$$

ここで，$\|\cdot\|_{\mathrm{F}}$は行列のフロベニウスノルムを表している．また，制約条件$\mathbf{C} \geq \mathbf{0}$，$\mathbf{S} \geq \mathbf{0}$は各行列の要素が非負であるということを意味している．MCR-NLR法において，式(4)に基づく最適化を$\mathbf{S}$と$\mathbf{C}$で別々に交互に行うことで，最終的に式(4)を満足する$\mathbf{S}$と$\mathbf{C}$を得ている．MCR-NLR法の手順をTable1に示す．

Table1 MCR-NLR algorithm

01	LOOP convergence $\left\|\mathbf{Y} - \mathbf{C}\mathbf{S}^{\mathrm{T}}\right\|_{\mathrm{F}}$
02	$\mathbf{S}^{(\mathrm{t})} = \underset{\mathbf{S}}{\mathrm{argmin}}\left\|\mathbf{Y} - \mathbf{C}^{(\mathrm{t}-1)}\mathbf{S}^{\mathrm{T}}\right\|_{\mathrm{F}}$ subject to $\mathbf{S} \geq \mathbf{0}$
03	$\bar{\mathbf{C}}^{(\mathrm{t})} = \underset{\mathbf{C}}{\mathrm{argmin}}\left\|\mathbf{Y} - \mathbf{C}\{\mathbf{S}^{(\mathrm{t})}\}^{\mathrm{T}}\right\|_{\mathrm{F}}$ subject to $\mathbf{C} \geq \mathbf{0}$
04	$\boldsymbol{\alpha}^{(\mathrm{t})} = \underset{\boldsymbol{\alpha}}{\mathrm{argmin}}\left\|\bar{\mathbf{C}}^{(\mathrm{t})} - \mathbf{C}(\boldsymbol{\alpha})\right\|_{\mathrm{F}}$
05	$\mathbf{C}^{(\mathrm{t})} = \mathbf{C}\left(\boldsymbol{\alpha}^{(\mathrm{t})}\right)$
06	End

ここで，$\mathbf{C}(\boldsymbol{\alpha})$は列が指数減衰系列で表わされるM × K行列であり，そのm行k列目の要素$\{\mathbf{C}(\boldsymbol{\alpha})\}_{\mathrm{m,k}}$は減衰率を表わすベクトルパラメータ$\boldsymbol{\alpha}$のk番目の要素$\alpha_{\mathrm{k}}$によって

$$\{\mathbf{C}(\boldsymbol{\alpha})\}_{\mathrm{m,k}} = \mathrm{e}^{-\alpha_k(g_m)^2} \tag{5}$$

と表わされる．以降，Table1の処理について説明する．まず，手順02において，1試行前の推定処理で得られたDOSY曲線行列$\mathbf{C}^{(t-1)}$を定数として，非負値要素制約付きの最小二乗問題を解くことでスペクトル行列の推定を行う．次に，02番目の処理で推定されたスペクトル行列$\mathbf{S}^{(t)}$を定数として，非負値要素制約付きの最小二乗法によってDOSY曲線行列に対応する行列$\bar{\mathbf{C}}^{(t)}$の各要素を推定する．続いて，手順03で推定された行列$\bar{\mathbf{C}}^{(t)}$に対して列を最も良く近似する指数関数の減衰率$\boldsymbol{\alpha}^{(t)}$を推定する．こうして得られた減衰率$\boldsymbol{\alpha}^{(t)}$によって表される行列をDOSY曲線行列の推定解$\mathbf{C}^{(t)}$と

する．以上の手順を繰り返し行うことで，DOSY曲線の性質を考慮した最適解を推定する．一般的に，02番目の処理と03番目の処理には最急降下法，04番目の処理にはLevenberg-Marquardt法が用いられる．以降，MCR-NLR法を従来法とする．

従来法は，最小二乗法によって得たDOSY曲線行列に対して減衰率$\boldsymbol{\alpha}$を推定し，これを用いてDOSY曲線行列を更新することにより近似的に式(2)を満たすような最適化を行っている．しかしながら，このDOSY曲線行列の処理方法では二つの問題が考えられる．一つ目の問題は計算時間である．行列の推定に用いられる最急降下法は収束が遅く[2]，解の推定に時間がかかってしまう．二つ目の問題は推定精度である．最適化されたDOSY曲線行列は，式(4)を満たす最小二乗解が補正処理によって指数減衰系列へと置き換えられるため，最小二乗基準の観点では最適解とは言えない．

【提案法】

提案法では，従来法の処理の中で，DOSY曲線行列$\mathbf{C}$の推定処理である行列の推定とDOSY曲線による近似を一括に行う手法である．これは，スペクトル行列と観測データ行列から直接的に減衰率$\boldsymbol{\alpha}$を推定することで行列の推定を行わずにDOSY曲線の推定を行っている．提案法では，式(4)の代わりに以下の最適化問題を考える．

$$\min_{\mathbf{S},\boldsymbol{\alpha}} \left\| \mathbf{Y} - \mathbf{C}(\boldsymbol{\alpha})\mathbf{S}^{\mathrm{T}} \right\|_{\mathrm{F}} \quad \text{subject to } \boldsymbol{\alpha} \geq \mathbf{0}, \mathbf{S} \geq \mathbf{0} \tag{6}$$

ここで，制約条件$\boldsymbol{\alpha} \geq \mathbf{0}$は$\boldsymbol{\alpha}$の要素が全て非負であることを意味している．提案法の手順をTable2に示す．なお，02番目，03番目の処理には従来法と同様にそれぞれ最急降下法，Levenberg-Marquardt法を用いる．

Table2 Proposed algorithm

01	LOOP convergence $\left\| \mathbf{Y} - \mathbf{C}(\boldsymbol{\alpha})\mathbf{S}^{\mathrm{T}} \right\|_{\mathrm{F}}$
02	$\mathbf{S}^{(\mathrm{t})} = \underset{\mathbf{S}}{\operatorname{argmin}} \left\| \mathbf{Y} - \mathbf{C}\left(\boldsymbol{\alpha}^{(\mathrm{t}-1)}\right)\mathbf{S}^{\mathrm{T}} \right\|_{\mathrm{F}}$ s.t $\mathbf{S} \geq \mathbf{0}$
03	$\boldsymbol{\alpha}^{(\mathrm{t})} = \underset{\boldsymbol{\alpha}}{\operatorname{argmin}} \left\| \mathbf{Y} - \mathbf{C}(\boldsymbol{\alpha})\left\{\mathbf{S}^{(\mathrm{t})}\right\}^{\mathrm{T}} \right\|_{\mathrm{F}}$ s.t $\boldsymbol{\alpha} \geq \mathbf{0}$
04	end

提案法は従来法に比べて以下の二点で成果が望める．第一に処理速度の向上である．これは，行列要素の推定処理を省くことにより，DOSY曲線行列の推定にかかる時間が短縮されるためである．第二に，推定精度の向上である．これは，式(6)によって得られるDOSY曲線行列は最小二乗基準に基づき最適なためである．

【数値例】

提案法の有効性を示すため，計算機シミュレーションを行い，提案法と従来法の計算時間と各行列の推定精度を比較した．使用した疑似データは化合物数[K]を2個とし，FID信号サンプル数[N]を1024点，測定に用いた磁場勾配強度の数[M]を8点とした．また，各化合物のスペクトルは単一のローレンツピークで表され，そのピーク強度[A]と半値半幅[σ]は同じ値$\mathrm{A} = 1$，$\sigma = 0.02[\mathrm{rad/s}]$を持つとし，ピークの共振周波数[$f$]は化合物1が0.1Hz，化合物2が0.4Hzとした．なお，FID信号のサンプリング周波数は1Hzとしている．また，各化合物の自由拡散係数は化合物1が$1[\mathrm{m^2/s}]$，化合物2が$0.5[\mathrm{m^2/s}]$とした．各化合物のスペクトル及びDOSY曲線をFig1とFig2に示す．なお，横軸はそれぞれ周波数と磁場勾配強度の二乗，横軸をスペクトル強度とDOSY曲線の値とする．また図中の実線は化合物1のスペクトル及びDOSY曲線を，破線は化合物2のスペクトル及びDOSY曲線を表している．

ここで，本報告中で使用されるSNRは

$$\mathrm{SNR} = 10\log_{10}\frac{\|\mathbf{C}\mathbf{S}^{\mathrm{T}}\|_{\mathrm{F}}}{\|\mathbf{N}\|_{\mathrm{F}}} \tag{7}$$

によって定義されるものとする．また，推定精度の評価量として$\mathrm{E}_{\mathbf{C}} = \|\mathbf{C} - \hat{\mathbf{C}}\|_{\mathrm{F}}/\|\mathbf{C}\|_{\mathrm{F}}$，$\mathrm{E}_{\mathbf{S}} = \|\mathbf{S} - \hat{\mathbf{S}}\|_{\mathrm{F}}/\|\mathbf{S}\|_{\mathrm{F}}$をそれぞれ用いた．ここで，$\hat{\mathbf{C}}$と$\hat{\mathbf{S}}$はそれぞれの行列の推定値を表している．各SNRにおける各手法の計算時間をTable4に，各行列の推定精度をTable5，6に示す．ただし，それぞれ雑音を変えて20回試行した平均値を示している．

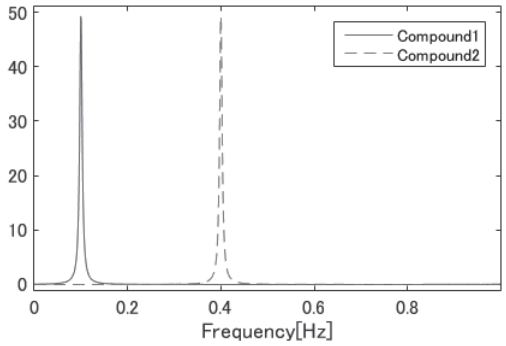


Fig1 Spectrum of the compound

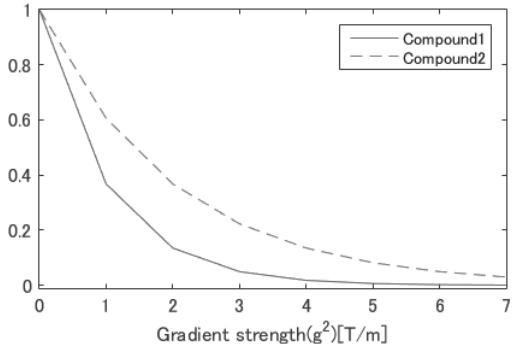


Fig2 DOSY-curve of the compound

Table4 The mean of the processing time

	SNR[dB]			
	10	20	30	40
proposed	0.421	0.426	0.366	0.366
MCR-NLR	32.384	28.348	16.314	10.577

Table5 The mean error of reconstructed DOSY-curve matrix

	SNR[dB]			
	10	20	30	40
proposed	2.384×10^{-3}	1.608×10^{-4}	1.471×10^{-5}	7.728×10^{-7}
MCR-NLR	2.090×10^{-2}	4.886×10^{-4}	2.576×10^{-5}	1.926×10^{-6}

Table6 The mean error of reconstructed spectrum matrix

	SNR[dB]			
	10	20	30	40
proposed	4.088×10^{-2}	5.215×10^{-3}	6.625×10^{-4}	8.536×10^{-5}
MCR-NLR	1.248×10^{-1}	9.054×10^{-3}	8.386×10^{-4}	1.032×10^{-4}

【考察】

Table4の結果から，提案法は従来法に比べて計算時間がSNR10dBで約1/75，SNR40dBで約1/30になっている．また，Table5とTable6の推定誤差の結果から，従来法に比べわずかに精度が向上していることがわかる．以上のことから，提案法を用いることで，MCR-NLR法よりも高速にDOSY曲線行列とスペクトル行列を推定することが可能である．また，推定誤差も従来法よりも減少しているため，短時間で高精度な復元が可能な手法であるといえる．

【Reference】

[1] R. Hou, R. Wehrens, L.M.C. Buydens,"Improved DOSY NMR data processing by data enhancement and combination of multivariate curve resolution with non-linear least square fitting" Journal of Magnetic Resonance, Vol.169(2), pp.257-269, 2004

[2]金谷健一,「これなら分かる最適化数学」共立出版，2013

P81

ヒトの生活習慣と分光計測で構成されるトランザクションデータの統合解析可視化

○塩川由佳[1], 三澤拓真[1, 2], 伊達康博[1, 2], 菊地淳[1, 2, 3]
[1]横市院生命医，[2]理研CSRS，[3]名大院生命農

Visualization of integration analysis of transaction-data based on human lifestyle and spectroscopic measurements

○Yuka Shiokawa[1], Takuma Misawa[1, 2], Yasuhiro Date[1, 2], and Jun Kikuchi[1, 2, 3]
[1]Yokohama City Univ., Kanagawa, Japan, [2]RIKEN CSRS, Kanagawa, Japan., Kanagawa, Japan.,[3]Nagoya Univ., Aichi, Japan.

With the innovation of high-throughput analytical methods such as NMR, data mining techniques that can reveal valuable information from enormous data is demanded. Especially in the study of omics on human, that has various life-styles, advanced computational methods are needed. In this study, we applied the association analysis, generally used for marketing, using transaction data derived from the dietary intake information and the urinary excreted chemical data from NMR and ICP measurements. The association analysis revealed that 1-Methylnicotinamide was excreted higher level in the morning and produced from protein which was taken in a day before. Therefore, the association analysis can be applied to metabolomics and capture relationships between metabolites and life-style.

【背景】

NMRをはじめとするハイスループットな計測手法の台頭と共に，大量のデータから有益な情報をデータマイニングする技術の多様化・高度化が求められている．とりわけ，多様な代謝反応の影響を反映した代謝物の変化を捉えるメタボロミクスにおいては，特徴的な情報抽出が難しく，一般的に用いられる線形の多変量解析だけでは発掘可能な情報に制約があり，埋もれた情報を最大限発掘するための有用な解析技術の確立が望まれている．そこで本研究では，従来の線形的な解析手法では抽出来ない有益な情報を取得するため，非線形の主成分分析を取り入れた解析フローを構築し，メタボロミクスにおける解析手法の充実を目指した．さらに，多様なデータに対応するため，数値以外の情報も統合して解析可能なアソシエーション分析法に着目した．アソシエーション分析法はマーケティング等で用いられているが，本研究ではメタボロミクスへの応用として，ヒトの生活習慣と代謝レスポンスの関係性の抽出を試みた．

【方法】

本研究では非侵襲的サンプルである尿検体を複数名のボランティアから収集し，^{1}H-NMRおよびICP-OES装置で計測した．ボランティアからは食事情報も提供してもらい，Excel-Eiyokunで数値化した (1) ．これらのデータに対し線形および非線形の多変量解析によるデータの特徴抽出，及びアソシエーション分析で関係性を評価した．アソシエーション分析においては，数値情報を扱うことができないため，NMRやICP-OES計測データ，栄養素の数値をランク分けし，全サンプル中の上位25%をHigh，下位25%をLowと定義した．得られた全データをサンプルごとに統合し，アソシエーション分析に用いるトランザクションデータとした．

非侵襲的試料，アソシエーション分析，非線形解析

○しおかわ　ゆか，みさわ　たくま，だて　やすひろ，きくち　じゅん

【結果・考察】

非線形の主成分分析 (PCA) であるカーネルPCA (KPCA) を取り入れた解析フローでは，KPCAで因子負荷量が示せないという問題点を克服するため, KPCAのスコアを基にクラスター解析を行い，cforestという機械学習で分類器を作成し，クラス分けに貢献した変数の重要度を算出することにより，擬似的な因子負荷量を表現する方法を確立した．また，ここで見出された変数のピーク強度に対し，各クラス間の有意差を検定することで擬似的な因子負荷量の妥当性が検証され，従来の線形解析では見出すことのできない埋もれた代謝情報の発掘を可能にした．

次に，尿中の代謝物・ミネラルと一日前の栄養素情報との関係性をアソシエーション分析法により検証した結果，前日に摂取した栄養素と，次の日の午前に尿中へ排出された代謝物・ミネラルとの関係性を網羅的に検出し，ネットワーク図として可視化することに成功した (Fig.1) ．特に尿中への排出量がHigh-levelであった1-Methylnicotinamide (MNA) は，ATPの産生に伴うNicotinamide adenine dinucleotide (NAD) の代謝物であり，就寝時にエネルギー消費が低下しNADプールが満たされるのに伴い，Nicotinamide phosphoribosyltranferaseの活性が阻害され，NicotinamideがMNAに代謝されたことにより増加した可能性が示唆された (2) ．また，NADはナイアシンやトリプトファンから作られるが，当該ボランティア試料の栄養素値からは前日のアミノ酸やタンパク質摂取がHigh-levelであることからもMNAとの関係性を示しており, アソシエーション分析の妥当性を支持する結果が得られたと考えられる．以上のように，アソシエーション分析をNMRメタボロミクス分野へと応用することにより，摂食時間や栄養素傾向といったヒトの生活習慣と、代謝応答の関係性を捉えることが可能であった．

以上のことから，線形手法では見いだせない情報を抽出可能な非線形手法の導入と，数値以外のデータも統合し解析することの出来るアソシエーション分析の応用により，メタボロミクスにおける解析手法の多様化及び高度化に成功した．

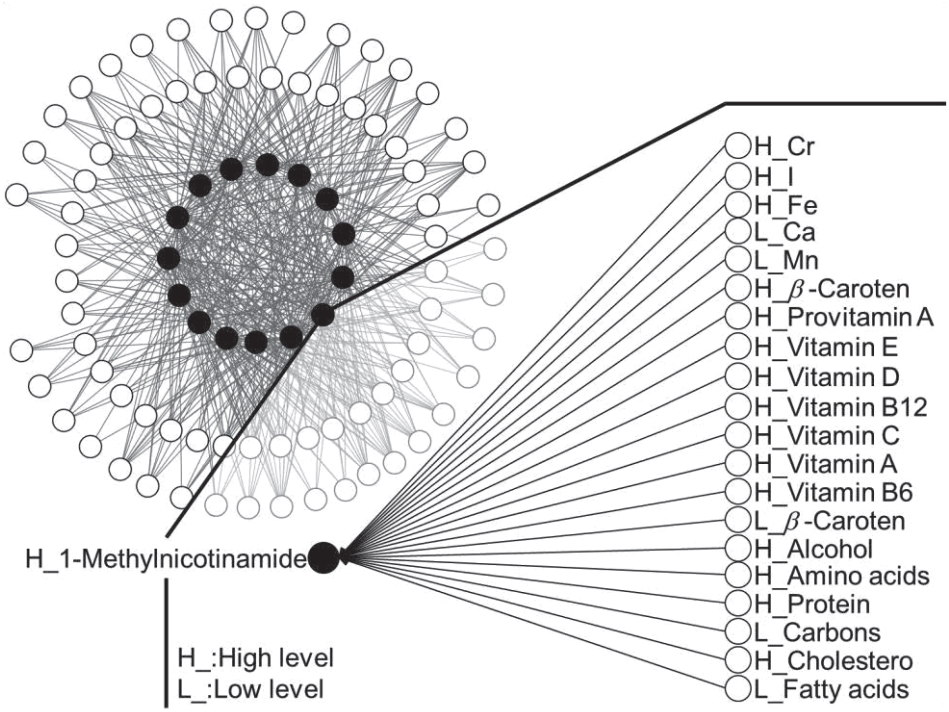


Fig.1. Whole association network (Upper) between urine metabolites excreted in the morning (black dot) and nutrition taken a day before (white dot). An expansion of association network between 1-Methylnicotinamide with nutrition taken a day before is also shown in bottom.

【引用文献】1) Misawa, *et al*., *J Proteome Res.* **14**, 1526-34 (2015). 2) Okamoto, *et al*., *Am J Clin Nutr.* **77**, 406-10 (2003).

P82

スピン－共振器結合のスピン－格子緩和への影響

○宮澤 典裕, 竹腰 清乃理, 武田 和行
京都大学大学院理学研究科

Effects of spin–resonator coupling on spin–lattice relaxation

○Norihiro Miyazawa, K. Takegoshi, Kazuyuki Takeda
Division of Chemistry, Graduate School of Science, Kyoto University

A spin and a resonator couple when their resonance frequencies match. In this work, we studied the effects of the spin–resonator coupling on spin–lattice relaxation by measuring saturation-recovery curves with and without probe detuning during the recovery time. We found that the apparent relaxation rate was faster for the latter case. We propose a theoretical model to account for the faster relaxation in the presence of the tuned circuit.

1. 序論

スピンと共振器は、共振周波数が一致するとカップリングすることが知られており、これまでにスピン－共振器結合による多量子コヒーレンスの誘起が報告されている[1]。本研究の目的は、スピン－共振器結合が緩和に及ぼす影響を調べることにある。通常の条件下ではその効果は非常に弱いが、環境との相互作用が弱く T_1 が長いスピン系においては、緩和曲線に無視できない効果が表れると考えている。また、もしスピン－共振器結合を強くすることができれば、常磁性不純物をドープすることなく緩和を加速させて信号の積算効率を上げる、共振器の冷却によりスピン偏極率を増大させる等の応用が開かれると期待している。

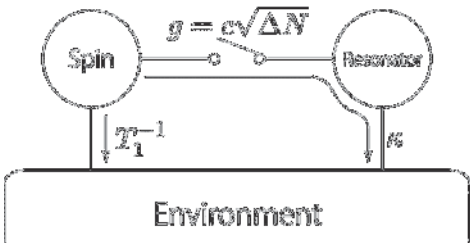


Fig. 1. A schematic diagram representing the couplings among a spin ensemble system, a resonator, and environment.

2. 実験

ガラス管に真空封入したナフタレンを、加熱した環状ニクロム線を一定方向にゆっくり通過させることで、不純物を一端に濃縮し精製した（ゾーンメルト法）。この作業を3ヶ月間行い、ニク

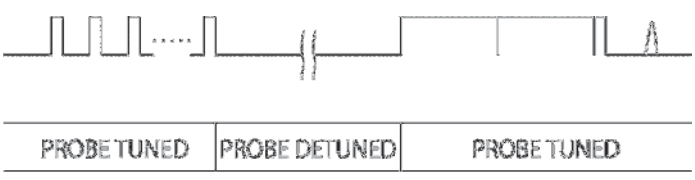


Fig. 2. A pulse sequence for saturation-recovery and magic-echo detection.

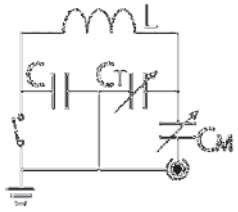


Fig. 3. A circuit diagram of the probe used in this work.

スピン－共振器結合, スピン－格子緩和

○みやざわのりひろ, たけごしきよのり, たけだかずゆき

ロム線を計1700回通過させた。精製したナフタレン 28.3 mg を粉砕し外径 4 mm のガラス管に封入した。磁場強度 14 T、室温にて saturation-recovery 法による ^{1}H のスピン－格子緩和の測定を行った。回復時間中にプローブのチューニングをずらした場合とずらさない場合で緩和曲線を比較し、スピン－共振器結合の影響を評価した。手巻きコイル L (直径 7.4 mm、長さ 8.5 mm、巻き数 4)、テフロン板を銅板で挟んで作った固定コンデンサー C、Voltronics 社製可変コンデンサー NMAJ25HV (1 – 23 pF) C_T および C_M を用いて Fig. 3 に示す共振回路を作製した。自作スイッチにより回路の共振周波数を ^{1}H の共振周波数である 600.1416 MHz から約 50 MHz ずらし、また戻すことができるようにした。

3. 結果と考察

得られた回復時間と信号強度の関係を exponential フィットして得られた時定数を Table 1 に示す。通常の手法でスピン－格子緩和曲線を計算したときの T_1 は、回復時にチューニングをずらして測定した場合と比較して 7.2% 短かった。

スピン－共振器結合の強さは、スピンのゼーマン準位への分布の差の平方根に比例する[2]。また T_1 が共振器の緩和の時間スケールに比べて十分長いとすると、共振器は常に熱平衡状態にあると近似できる。この仮定の下で核磁化 M_z に関する以下の式

$$\frac{d}{dt}M_z = -\left(\frac{1}{T_1} + g\right)(M_z - M_0) \qquad (1)$$

を考案した。ここで T_1 はスピン－共振器結合がない場合の回復時定数、 M_0 は熱平衡状態での磁化である。g はスピン－共振器カップリング強度であり、スピンの準位数差 $\Delta N = 2\,M_z\,/\,\gamma\hbar$ の平方根に比例し

$$g = c\sqrt{\Delta N} \qquad (2)$$

と表せる。ただし c は定数である。カップリングが無い場合は $g = 0$ となり、通常のブロッホ方程式となる。微分方程式 (1) は解析的に解けないため、数値的に c の値を求めた。 チューニングをずらし $g = 0$ として計算した場合の時定数を真の T_1 とし、チューニングをずらさず測定した場合の測定値から c の値を算出したところ $c = 1.60 \times 10^{-6}\ \mathrm{s}^{-1}$ となった。Fig. 4 に示すように、通常の緩和曲線へのフィッティングでは回復過程である $10000\ \mathrm{s} \leq T_1 \leq 20000\ \mathrm{s}$ 付近の磁化が全体的に緩和曲線より上回っている。決定係数は補正しない曲線が 0.9957 である一方、 g の補正を加えた曲線が 0.9969 であり、後者の方がより回帰していると考えられる。

Table 1. Measured ^{1}H T_1 in polycrystalline naphthalene in a tuned/detuned coil in 14 T at room temperature.

	Tune	Detune
T_1 / sec	7012 ± 196	7560 ± 263

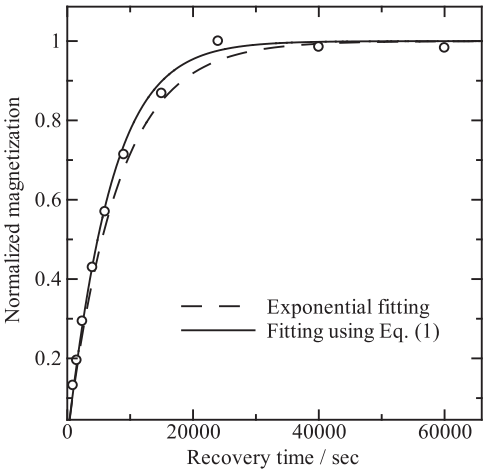


Fig. 4. Circles: recovery-time dependence of the ^{1}H magnetization in polycrystalline naphthalene measured under the conventional, tuned condition. Broken and solid lines represent simple exponential fitting and fitting using Eq. (1).

4. 参考文献

[1] M. A. McCoy, W. S. Warren, *J. Chem. Phys.* **93**, 858 (1990).

[2] E. Abe, H. Wu, A. Ardavan, J. J. L. Morton, *Appl. Phys. Lett.* **98**, 251108 (2011).

P83

多量子カウンティングシーケンスにおける化学シフト異方性の影響

○賀來萌[1]，野田泰斗[1]，竹腰　清乃理[1]
[1]京都大学大学院　理学研究科

Effects of chemical shift anisotropy in Multiple Quantum counting sequence

○Megumi Kaku[1], Yasuto Noda[1], and Kiyonori Takegoshi[1]
[1]*Division of Chemistry, Graduate School of Science, Kyoto University.*

It is known that the conventional “8-pulse” sequence for the Multiple Quantum(MQ) counting experiment is difficult to work with a strong inhomogeneous interaction such as chemical shift anisotropy. In this work, we examined the “12-pulse” sequence made to refocus the chemical shift anisotropy during the MQ excitation and reconversion periods. Analytical examination using the average Hamiltonian theory and experimental results are shown.

[序論]　現在、多量子(Multiple Quantum(MQ))カウンティング法はPinesらが提唱した8パルスシークエンス[1]が用いられている。しかしこのパルスシークエンスは^{1}Hなどの双極子相互作用が強く化学シフト異方性(CSA)の小さい試料に関しては有効であるが、^{31}Pや^{19}FなどのCSAの大きい核ではCSAの影響が出てしまうことが知られている。そこでTyckoらはPinesらの8つの90°パルスの間に180°パルスを入れた24パルスシークエンス[2]を用いてCSAの影響を消去することに成功した。しかし、このようにパルスの数を増やすとパルス不完全性の影響が大きくなり、また、プローブや試料へのダメージが大きくなってしまう。

Fayonら[3]はCSAの大きい^{31}Pを測定する際にSaalwächterらが提唱した12パルスシークエンス[4]を用いてCSAによる影響を消去することを考えた。本研究ではこの12パルスシークエンスがCSAの影響を消去するのに妥当なパルスシークエンスであるかどうかを平均ハミルトニアン法による計算と実験から検証した。

[計算]　0次の平均ハミルトニアン法を用いて化学シフト異方性

$$\mathrm{H}^{0}_{CSA} = cI_z \tag{1}$$

と同種核双極子相互作用

$$\mathrm{H}^{0}_{D} = \frac{1}{2}d_{zz}\left\{I_zS_z - \frac{1}{4}\left(I_+S_- + I_-S_+\right)\right\} \tag{2}$$

による時間推進演算子とrf照射を表すゼーマン相互作用による時間推進演算子を分離し、パルス間とパルスとパルスの間における時間平均ハミルトニアンを計算したところ、化学シフト異方性は8パルスと12パルスの両シークエンスにおいて0次で消去されていることがわかった。また、同種核双極子相互作用の計算からは次のような90°パルス幅(t_p)とパルス間隔(Δ、Δ’; Fig.1)の関係式が二量子項の生成に必要なことが示された。

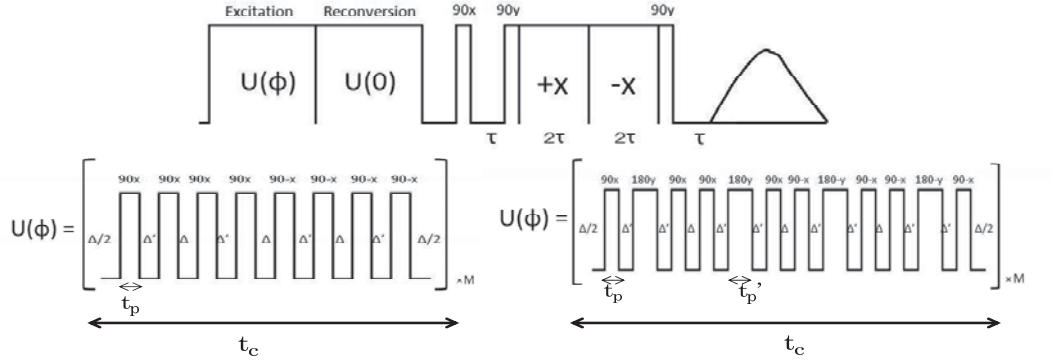
8パルス　・・・　$\Delta' = 2\Delta + t_p$ (3)

12パルス・・・　$\Delta' = \Delta - t_p/2$ (4)

多量子カウンティング、平均ハミルトニアン法、化学シフト異方性

○かくめぐみ，のだやすと，たけごしきよのり

[実験]　14Tの磁場を用いて行った。対象としてCSAの大きな^{19}Fを考え、試料はテフロンを用い、^{19}Fの照射周波数は564.6025 MHzとした。Fig.1に示すMQ countingのパルスシークエンスにおいて、Excitationパルス間を8パルスと12パルスの2つの場合についてmixed echo法を用いて測定した。



(a) 8-pulse　　(b) 12-pulse

Fig. 1 The pulse sequence for MQNMR. (a) t_p=2.47 μs, Δ=4 μs, Δ'=10.47 μs, t_c=69.64μs
(b) t_p=2.46 μs, t_p'=5.1μs, Δ=4 μs, Δ'=2.77 μs, t_c=70.24 μs

[結果と考察]　mixed echo法で測定した^{19}F NMRスペクトル(半値幅 : 29 kHz)と、それぞれ式(3),(4)で示された条件の下に、MQの励起シークエンスの繰り返し回数Mを変えた際の8パルスと12パルスそれぞれのMQスペクトルの0量子と2量子の強度の比をFig.2に示す。

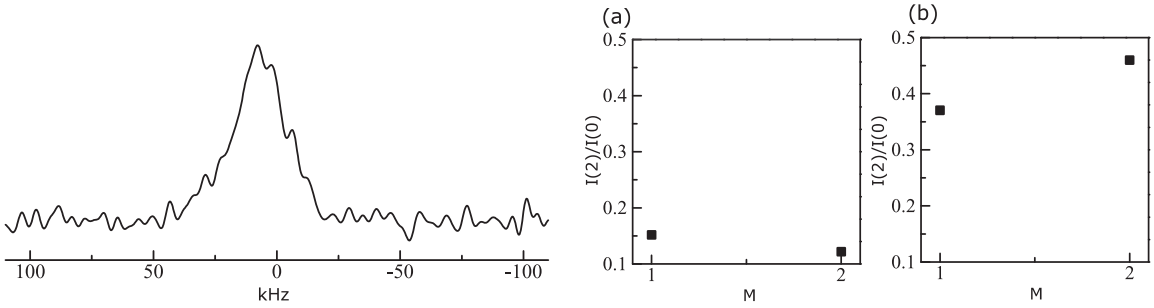


Fig. 2 ^{19}F NMR spectra of Teflon and I(2)/I(0) for (a)8-pulse and (b)12-pulse sequences

今回用いたパルスシークエンスでは、偶数コヒーレンスが生成される。また、励起時間つまり繰り返し回Mを長くするほど強度比は大きくなる。励起シークエンスに8パルスを適用した場合(a)と12パルスを適用した場合(b)を比較すると、12パルスの方は強度比が増加しているが8パルスでは減少している。0次の平均ハミルトニアン法の計算ではどちらも化学シフト異方性の影響を受けない、つまりどちらの場合においてもMQコヒーレンスが発展していくことが予想されていたが、本実験では8パルスと12パルスとで差が見られた。この結果より、高次の項が影響していると考えられる。

今後は平均ハミルトニアン法における高次の項の影響を検討し、よりCSAの影響を受けにくいパルスシークエンスの開発にも取り組んでいきたい。

[引用文献**]**

[1] J.Baum, A.Pines, *J. Am. Chem. Soc.* 108 (1986) 7447.
[2] Oleg N. Antzutkin , R.Tycko, *J. Chem. Phys.* 110 (1999) 2749.
[3] Franck Fayon, et al., *J. Phys. Chem. C* 117 (2013) 2283.
[4] K.Saalwächter et al., *J. Chem. Phys.* 119 (2003) 3468.

P84

*In-situ*マイクロ波照射NMRによるマイクロ波加熱におけるエネルギー移動過程の解明

○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・工学研究院
[2]プローブ工房

Process of energy transfer under microwave irradiation revealed by *in-situ* microwave irradiation NMR spectroscopy

○Yugo Tasei[1], Teruaki Fujito[2], Izuru Kawamura [1] and Akira Naito[1]
[1]*Graduate school of Engineering, Yokohama National University, Yokohama*
[2]*Prove Laboratory Inc .*

Microwave heating is wildly used in the acceleration of organic reactions. However, the detailed molecular mechanisms associated with microwave heating effects on the chemical reactions have not yet well understood. This study revealed the microwave heating effects of organic compounds using newly developed in situ microwave irradiation nuclear magnetic resonance spectroscopy, by analyzing ^{1}H NMR spectra under microwave irradiation. The sample temperature during microwave irradiation was estimated by measuring the temperature dependent chemical shifts of individual protons in the sample, and the different protons were found to indicate significantly different temperatures within the molecule. It is noticed that the protons bound to polar group were found to indicate different electron density from these of other protons. These results suggest that microwave heating polarizes bonds in polar functional groups, and this effect may partly explain the attendant acceleration of organic reactions.

＜序論＞

マイクロ波はNMR分光法で用いられるラジオ波より高周波数の電磁波である。物質にマイクロ波を照射することで加熱現象が起こることはよく知られている。マイクロ波加熱を利用したものが電子レンジであり日本では2.45 GHzの周波数が使われている。また化学の分野では有機反応を中心にマイクロ波加熱を用いることで反応性が大幅に上昇することが数多く報告されている。これらの現象は他の加熱では起こらないためマイクロ波効果と呼ばれ、低エネルギーで高い加熱効率をもつことも相まってグリーンケミストリーの観点からマイクロ波化学という分野で盛んに研究されている。マイクロ波加熱が通常の加熱である熱伝導加熱とは異なるという事例は数多くありながらマイクロ波加熱機構について詳細に理解されていないのが現状である。マイクロ波加熱を研究するにあたって障害になるのが分子レベルで解析できる実験方法が非常に少ない点である。そこで*In-situ* マイクロ波照射NMR装置の開発[1]を行い、マイクロ波加熱機構の解明に取り組んだ。マイクロ波加熱を取り扱う際には温度上昇効果と区別することが非常に難しいとされるが、線幅や化学シフトの温度依存性を利用することで分子および原子レベルでマイクロ波加熱現象を解析することが可能である。これまでマイクロ波加熱効率が高い液晶分子を用いた^{1}H NMRスペクトルの結果から局所加熱が起こり空間的温度分布が生じること[1] [2]や極性基に結合したプロトンの

マイクロ波加熱、マイクロ波照射NMR、有機溶媒

○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

電子密度が他のプロトンに比べてが増加することを示した[2]。

マイクロ波はわずかなエネルギーで加熱効率は非常に高い。この要因としてエネルギーから熱に変換される過程が他の加熱とは大きく異なることが考えられ、マイクロ波加熱機構およびマイクロ波効果を理解するにはエネルギー移動過程を理解することが重要である。今回の発表では合成反応で用いられる有機溶媒を独自に開発した*In-situ*マイクロ波照射NMR装置で^{1}H 化学シフトと温度の相関関係を利用してマイクロ波加熱におけるエネルギー移動過程について議論する。

＜装置開発・実験＞

●*In-situ* マイクロ波照射NMR装置の開発[1]

I. *In-situ* マイクロ波照射 NMR 装置 (Figure 1)

*In-situ*マイクロ波照射NMR装置は温度ジャンプ状態相関 2DNMR 装置を改良して行った[3][4]。既存の固体 NMR 分光器(Chemmagnetics CMX-400 infinity)に独自に開発した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。マグネトロン(2.45 GHz)で発生したマイクロ波は NMR 分光器の近くまでは導波管を通り,同軸ケーブルに変換してプローブ内に入れている。

II. マイクロ波共振回路 (Figure 2)

マイクロ波共振回路はラジオ波回路の分離を良くし、ラジオ波回路の加熱を防ぐためにラジオ波共振回路の中に組み込んだ。ラジオ波の共振回路ではコイルに試料を挿入してコンデンサーで同調をとっているのに対して、マイクロ波の共振回路では試料をコンデンサーに挿入してコンデンサーのキャパスタンスを変化させて同調をとることで双方の回路の分離をよくした二重同調回路になっている(Fig.2 (A))。幅 4 mm、長さが 38 mm の銅泊を直径 6 mm のガラス管で挟むことでコンデンサーの役割を果たし､端の部分で 180° 銅泊を覆ったものをコイルとしてマイクロ波共振回路として使用した。また、径の小さい直径 3 mm の試料管を用いてマイクロ波回路と接触しないようにし、空気で断熱することで試料のみが加熱されるようにした(Fig.2(B))。

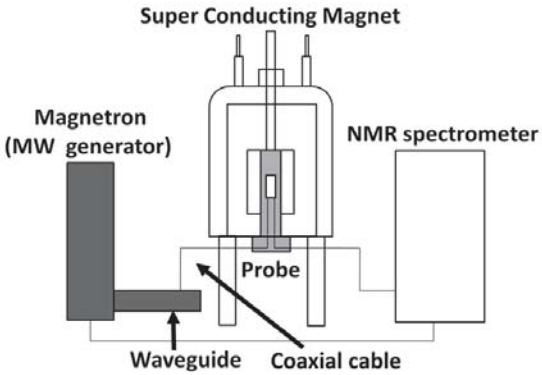


Figure 1 Schematic diagram of the in situ microwave irradiation NMR spectrometer equipped with a microwave transmitter.

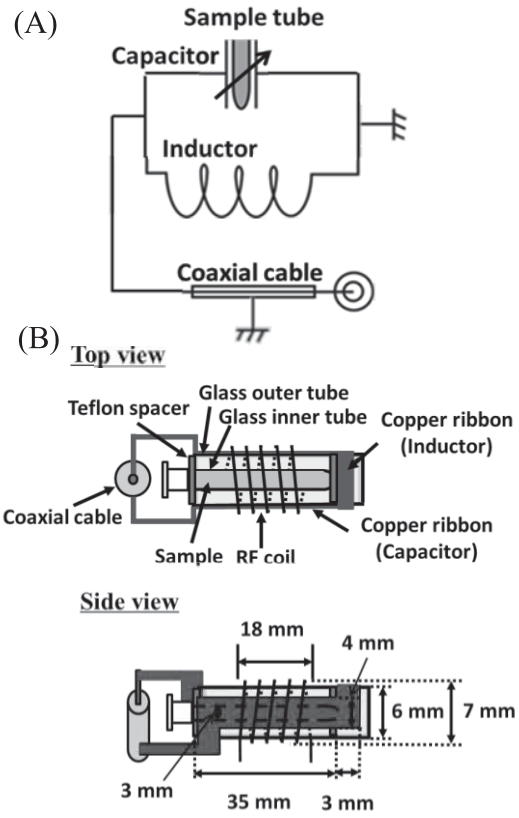


Figure 2 (A) Equalizing microwave resonance circuit consists of an inductor and capacitor. (B) Schematic diagrams of sample tube, capacitor and inductor of microwave resonance circuit and inductor of radio frequency. The top view indicates the names of components and the side view indicates the dimensions of components.

●NMR 測定

① ^{1}H 化学シフト値と温度の相関

マイクロ波照射 NMR 測定を行う際、マイクロ波加熱によって NMR 装置に付随している温度コントロールシステムで設定した温度より高くなるため、マイクロ波照射下で分子状態を観測するためには正確な試料温度を知ることが重要である。そこで、まず試料の ^{1}H 化学シフト値と温度の相関を調べた。温度コントロールシステムで設定した温度で ^{1}H NMR 測定を行い、温度に対して化学シフトのずれ(Δδ)のプロットをそれぞれのプロトンで正確に行った。

② CW（連続波）によるマイクロ波照射NMR測定

初期温度は0˚C、マイクロ波の外部出力を135 Wに設定して、0˚Cのガスを流しながらCWによるマイクロ波加熱を10分間行った。この加熱過程を30 秒毎に ^{1}H NMR測定を行い、化学シフト値を正確に求めた。得られた化学シフト値を①の相関関係を用いてそれぞれのプロトンの温度を求めた。

＜結果＞

ここではエタノール（HO-CH_2-CH_3）の結果を述べる。

① ^{1}H化学シフト値と温度の相関　(Figure 3)

エタノールの温度に対して^{1}H化学シフト値のずれ(Δδ)のプロットをFigure 3に示す。Δδ値は0˚Cを初期値(0 ppm)　とし温度上昇による高磁場シフトした値をプロットした。その結果、それぞれのプロトンが温度上昇によって直線関係で高磁場シフトすることがわかり、その傾きを求めることでエタノールの^{1}H 化学シフト値と温度の相関を調べることが出来た。

② CWによるマイクロ波照射NMR測定(Figure 4, 5)

マイクロ波加熱時間に対して①の相関関係から求めた温度のプロットをFigure 4に示す。時間経過によって全てのプロトンで温度上昇が確認されたが、最終的にはヒドロキシル基のプロトンがメチレン基やメチル基のプロトンに比べて10˚C以上の低い温度を示した。さらに興味深いことに、この温度のずれはマイクロ波加熱の時間経過によって大きくなっており、照射開始からしばらくは起こらなかった。

マイクロ波加熱を 10 分間行った直後とこの時の

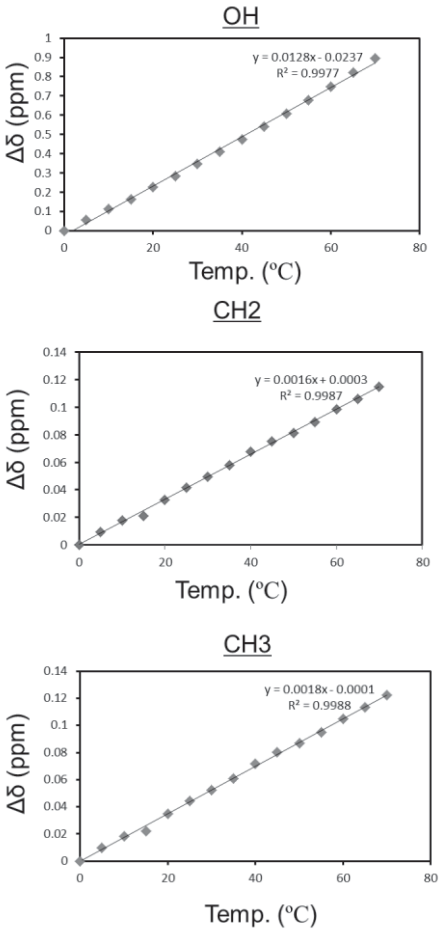


Figure 3 Plots of ^{1}H chemical shift values of Ethanol for individual protons against temperatures regulated by the instrument's temperature control system.

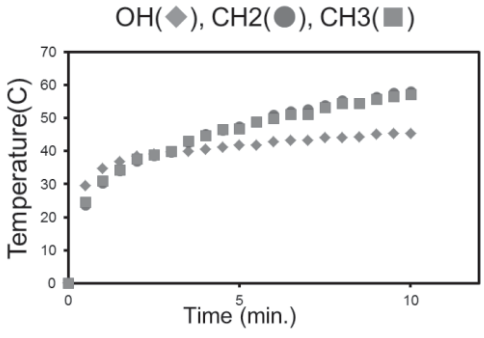


Figure 4 Plots of temperature increase against microwave irradiation time. Temperatures were determined using the slopes obtained for the individual protons.

バルク温度に近い 55˚C の ^{1}H NMR スペクトルを Figure 5 に示した。メチレン基やメチル基はバルク温度と同じ化学シフトは示し２つのスペクトルは重なるが、ヒドロキシル基は低磁場側にバルク温度とは異なる化学シフト値を示し、熱伝導加熱では生じないマイクロ波加熱特有の NMR スペクトルが得られたといえる。

＜考察＞

マイクロ波加熱を行うとヒドロキシル基の温度が異なる結果が示された。しかし、分子内で温度が異なることは物理化学的に有り得ないことである。^{1}H 化学シフトは結果①で示したように通常、温度上昇ともに高磁場シフト、言い換えれば電子密度が高くなる。つまりマイクロ波照射によってヒドロキシル基の電子密度が低くなっているといえる。

この理由としてマイクロ波が与える分子の影響は回転モードの励起が考えられるが、そのエネルギーは非常に小さく分子の電子密度を変えるほどではない。そこでマイクロ波におけるエネルギー移動過程に起因することが考えられる。

今回の結果からエネルギー移動過程の違いは熱伝導加熱ではエンタルピーが増大し、ランダムな分子は運動速度が増大する。その結果、温度が上昇してそれぞれプロトンの電子密度が高まる。

マイクロ波加熱は発生した電場に対して分子は配向しようとする。このときエントロピーが減少し、エネルギーの吸収が起こる。そして他の分子と衝突することで配向状態が乱れるとエントロピーが増大しエネルギーを放出する。その結果、温度上昇と極性基の電子密度が変化する分極効果が得られる。この分極効果は分子が配向するまで時間がかかることが考えられ、実験結果と一致している。

このエントロピー変化による分極効果は熱伝導加熱では決して起こらないものであり、有機反応の反応性が上昇するマイクロ波効果を説明するのに有力な概念である。

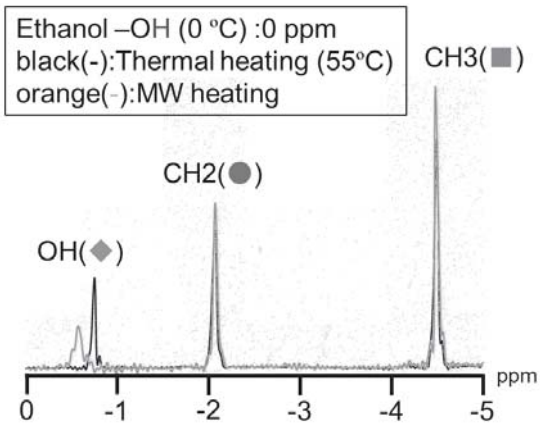


Figure 5 ^{1}H NMR spectra of ethanol at 55 ºC and under CW microwave irradiation for 10 min while regulating the instrument temperature at 0 ºC.

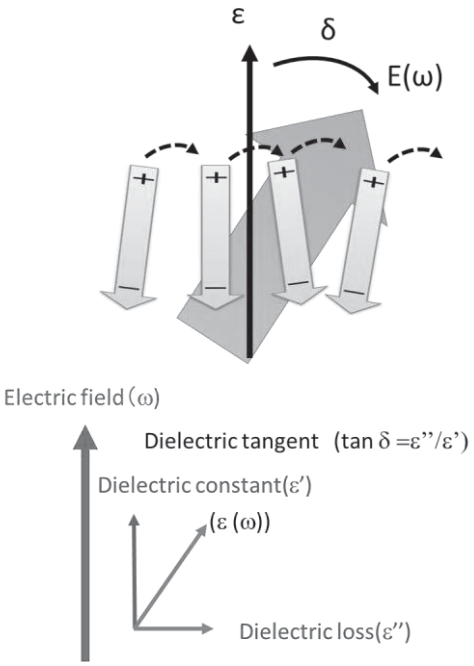


Figure 6 Orientation model of molecular under microwave irradiation and definition of term about dielectric loss heating.

＜引用文献＞

1) Yugo Tasei et. al. *Journal of Magnetic Resonance*, 2015, **254**, 27-34
2) Yugo Tasei et. al. *Physcal Chemistry Chemical Physics*, 2015,**17**, 9082-9089
3) Akira Naito et al, *Thermotropic Liquid Crystals* 2007 85-116 *Springer*.
4) Akira Naito and YugoTasei, *Materials Science & Technology* 2010 2886-2894

P85

肉用牛の霜降りの非侵襲計測用片側開放型NMRの開発

○中島 善人[1]
[1]産業技術総合研究所

Development of a single-sided NMR scanner for the in vivo quantification of live cattle marbling

○Yoshito Nakashima[1]
[1]*National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Japan*

In vivo marbling quantification helps to choose the optimum nutritional management for growing cattle. When using time-domain proton NMR relaxometry, it is possible to quantify muscle and fat separately by taking advantage of the difference in T2 between water molecules in muscles and fat molecules. With this in mind, we developed a prototype NMR scanner using a single-sided magnetic circuit and a plane radio frequency (RF) coil for use in the non-invasive quantification of water and fat in live cattle. The investigation depth (the distance from the RF coil to the center of the sensed region) is 3 cm, which is sufficient for the in vivo trapezius muscle measurement of live cattle. Measurements of 17 samples of beef meat blocks were taken in a laboratory to demonstrate that each meat sample could be measured in about ten seconds with a measurement error as small as approximately 10 wt.%. Accordingly, our prototype scanner would be useful for in vivo marbling measurements of live cattle trapezius muscles.

はじめに

黒毛和牛に代表される肉用牛において、脂肪交雑すなわち霜降りの程度は、肉質等級（ひいては取引価格）を決める重要な指標のひとつである。飼料の種類・量の脂肪交雑への影響を正確に評価するには、牧場で牛の脂肪交雑の経年変化を追う必要がある。また、競り市に出た肉用牛の価格の正確な把握のためには、と畜前に脂肪交雑を定量する必要がある。これらのニーズに適合するには、非侵襲かつ短時間で牛の脂肪交雑を計測できる装置が必要である。現状では、脂肪交雑のスキャン用として、超音波イメージング装置が導入されてはいる。しかし、超音波で脂肪と筋肉の混合比率を定量的に計測することは原理的に困難であり、新しい原理に基づく脂肪交雑の計測方法が望まれていた。

プロトン核磁気共鳴法は、脂肪組織中の脂肪分子と筋肉組織中の水分子を、プロトン横緩和時間の長短というかたちでtime-domainで定量識別できる。筋肉は、タンパク質などの水以外の物質も含むが、筋肉組織中の水とタンパク質の量比は一定なので、水分量が分かればタンパク質の量ひいては筋肉の量も推定できる。また、片側開放型という特殊な形状の磁石（whole body用よりずっと小さい）を採用すれば、牛のような大きな物体でもその表面から数cm内部の部位を非侵襲スキャンできる。そこで我々は、肉用牛の脂肪交雑計測用の片側開放型プロトン核磁気共鳴スキャナーを開発することにした[1-3)]。

プロトタイプとその性能評価

元来、脂肪交雑は、ロース芯（胸最長筋）の霜降り状態で決めるが、牛のロース芯は体表から

single-sided magnet, cattle marbling, T2 relaxometry

○なかしまよしと

10cm以上も深部にあり、そのような深い探査深度を片側開放型で実現するのは現状では技術的に困難である。そこで今回は、代替案として、より体表に近い筋肉である僧帽筋（牛の体表から約3cmの距離にある）をターゲットとして装置開発を行った。Sweet spot（磁場均一領域）を持つNd-Fe-B永久磁石と平面型の高周波コイルを設計・製作し、高周波ノイズ対策に工夫をこらした結果、プロトタイプの製作に成功した。そのプロトタイプの感度領域のサイズは、1.9x1.9x1.6cm^{3}の直方体（磁束密度は97 mT, プロトン4.1MHz）で、探査深度（コイル表面から感度領域の中心までの距離）は3cmである。

小売店から購入した僧帽筋、サーロイン、テンダーロイン、赤身、脂肪の塊など計17個の牛肉ブロック試料を高周波コイルに載せて分析した。リンギングノイズを抑制するために、phase-alternated pair stacking (PAPS) CPMGというシーケンスを用いた。エコー間隔は0.5ms、高周波パルス幅は0.2ms、繰り返し間隔3sで4回積算した。脂肪をほとんど含まない赤身試料（モモ肉）の緩和時間は短く（61ms）、いっぽう赤身（筋肉）をほとんどふくまない脂肪塊の試料の緩和時間は長い（141ms）。霜降り肉は、脂肪と赤身の混合物なので、その緩和波形は、緩和時間61msの減衰成分と緩和時間141msの減衰成分の混合物として解釈できる。その混合比を最小二乗フィットで決めた。その結果を従来の食品分析手法と比較することで、脂肪量と水分量の推定誤差を約10wt%と評価した。このようにプロトタイプは、僧帽筋のある位置（コイル表面から約3cmの深度）の試料部位の脂肪交雑を短時間かつ高い精度で非侵襲計測することができた。

このプロトタイプは、time-domain型（イメージングをしない）であり、また、超電導磁石でなく永久磁石をつかっているため、低コストで小型・ポータブルなシステムを実現できている。したがって、可搬性が要求されるニーズ（たとえば牧場から牧場に装置を移動して計測を繰り返す）にも対応できると思われる。

今後の展望

このプロトタイプではまだ牛肉ブロックの試料しか計測していないので、生きた肉用牛の計測を計画中である。今回開発した装置は、肉用牛の霜降り計測専用ではないことを強調したい。たとえば牛の筋炎・しこりなど大型家畜の病気のT2 relaxometryによる非侵襲診断にも使えるであろう．また、牛と同様に脂肪含有量が重要視されているブランド豚、マグロ（トロ）、フォアグラなどへの適用も可能であろう。さらに、そのような高級食材に限定することなく、水や油を含む大きな物体を原位置で非破壊計測できるという特性を生かして、老朽化したインフラのメンテナンス（トンネル壁をスキャンして水をふくむ空洞を検出）や油汚染土壌試料の計測（石油を含む部位の検出）など土木方面への応用[4]も行いたい。

謝辞　宇津澤 慎博士（米国 New Mexico Resonance）には、プロトタイプ装置の計測ソフトとハードウェアの開発で大変お世話になりました。

引用文献

1) Nakashima, Y. (2015) Development of a Single-Sided Nuclear Magnetic Resonance Scanner for the In Vivo Quantification of Live Cattle Marbling. Applied Magnetic Resonance, 46, 593-606.
2) 中島善人 (2015) 牛の霜降り状態を計測できる核磁気共鳴スキャナーを開発.（産総研公式HP）http://www.aist.go.jp/aist_j/new_research/nr20150518/nr20150518.html
3) 中島善人 (2015) 牛の霜降り状態がNMRでわかる？　月刊化学（印刷中）
4) 中島善人, 宇津澤 慎 (2008) 核磁気共鳴表面スキャナーの農業土木への応用にむけて．水土の知（農業農村工学会誌）76, 795-799.

P86

多重検出磁気共鳴による π 共役系分子デバイスのスピン依存過程の解明

○福田國統、浅川直紀
群馬大学 大学院理工学府 分子科学部門

Spin dependent processes investigated by multiplex detection of magnetic resonance for π-conjugated molecular electronic devices

○ Kunito Fukuda and Naoki Asakawa
Division of Molecular Science, Graduate School of Science and Technology, Gunma University, 1-5-1 Tenjincho, Kiryu, Gunma 376-8515, JAPAN, email: asakawa@gunma-u.ac.jp

Molecular dynamics often causes time fluctuation on physical properties of π-conjugated molecular electronics devices. We have tried to develop a variable frequency magnetic resonance instrument to measure spectral density of molecular dynamics. Variable frequency ESR experiments were performed using a variable size microwave cavity. Furthermore, magnetic resonance experiments with versatile spin generations and also with several detection methods were implemented in order to measure versatile devices under test. We will show the quasi-simultaneous measurements of electrically detected magnetic resonance (EDMR) and ESR for a complex sample of a silicon diode with DPPH powder and also for an organic photovoltaic cell of ITO/pentacene/Al. The quasi-simultaneous ESR/EDMR measurements could be helpful to identify mobile and trapped carriers and quantify the number of spins.

緒言

π 共役系高分子は、低コスト・軽量・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。また、π 共役系分子が、無機材料と比較して小さなスピン-格子緩和と弱い超微細結合に起因した長いスピンコヒーレント時間を持つため、スピントロニクス分野における研究も近年活発である。

このように、その応用が期待される π 共役系分子であるが、多くの場合、デバイスの性能安定性に問題を抱えている。その不安定性の原因の一つとして分子運動が考えられる。分子運動とキャリア移動度の相関が理論的に予測され、実際に、高移動度・易溶性から広く研究されている構造制御型ポリ（3-ヘキシルチオフェン）は、構造相転移近傍において電気伝導性やキャリア移動度の変化が指摘されている。そのため、その分子運動性を解明することは効率的なデバイス開発を行うためには必要不可欠と考える。さらに、分子運動はスピン-格子緩和を通して電子スピン状態への影響が想定されるため、スピントロニクス分野においても重要な要因と思われる。

このようなデバイスの出力は、デバイス中のキャリアのダイナミクスにより引き起こされる。さらに、スピントロニクスにおいては、そのキャリアのスピン状態も重要である。そのため、効率的なデバイスの開発には、作動条件下におけるデバイス中のキャリアを評価する方法が望ましい。

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確立されていない。ここで、磁気共鳴測定は簡便に原子レベルの情報を与える測定手法である。実際に磁気共鳴法には、薄膜状態の π 共役系分子、および、デバイス試料に対して複数の測定例が存在する。特に周波数可変測定によって、ゆらぎのスペクトル密度関数から不均一構造であるデバイスにおいて重要な分子運動の相関時間の分布に関する情報を引き出すことができる。得られるスペクトル密度関数には、その関数型としてスピン自由度の次元性の情報が含まれ、デバイス中のスピンダイナミクスを推定することにつながる。そのため、周波数可変測定はスピントロニクス分野の発展を推進するだろう。

このように複数の有用な情報を与える共鳴周波数可変測定であるが、市販されている測定装置を用いた場合、マイクロ波発生装置と空洞共振器により利用可能な共鳴周波数は制限されるため実現が困難であった。そこで、信号発生器によるマイクロ波発生と独自の周波数可変機構を実装した空洞共振器を作製することとした。

また、別の問題点として一般的な市販の X-band（∼9 GHz）の装置を使用した場合、測定用にデバイスサイズの縮小や変更が必要になり、測定用試料が制限されてきた。また、デバイスの種類ごとにキャリアの発生方法および出力形式は実に多様化している。それらデバイスの作動条件に測定環境を対応させるためには、デバイス動作時と同様のキャリアの発生方法、および、デバイス出力の測定による共鳴信号の検出をデバイスに応じて組合せ可能な測定系が必要と考えた。これにより、デバイス特性と相関の高い共鳴信号が取得可能と考えられる。そこで、測定するマイクロ波領域を C バント (4-6GHz) とすることにより、測定可能な試料サイズの拡大、およびキャリア発生方法と共鳴検出方法の組合せを容易に実現する測定系の構築を目指した。さらに、それらの測定法を同一の試料に対してほぼ同時に適用しスペクトルを比較することによって、共鳴信号を与えるキャリアの種類を判別する手法を提案する。特に今回の発表では、スピン発生方法として電場注入、共鳴検出法として π 共役系分子デバイスの電流を用いた電気的検出磁気共鳴（EDMR）測定によりデバイス出力のスピン依存過程を調べることを目的とした。

π 共役系分子、分子運動、スピントロニクス
○ふくだくにと、あさかわなおき

実験

C-band の測定系を構築した後に、自作の waveguide window（WW）を空洞共振器に取り付けることによって空洞共振器の長さを段階的に変化させる共振周波数可変の空洞共振器を作製した。これを用いて ESR の標準物質である 1-ジフェニル-2-ピクリルヒドラジル（DPPH）に対して共鳴周波数可変測定を実施した。

また、電圧検出とマイクロ波検出の信号の積算を交互に行うことによりほぼ同時測定系を構築した。シリコン pn 接合型ダイオード (1N4007) と DPPH の複合試料を測定することにより自作した装置により多重検出可能か検証した。1N4007 はその抵抗値がスピン依存の再結合過程により磁気共鳴にともない変化を示す、安定な試料として知られている。さらに、π 共役系分子である pentacene を含んだ ITO/pentacene/Al 型の Schottky フォトダイオードに対して同様の測定を試みた。

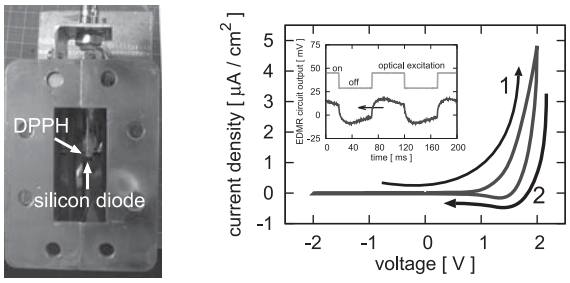


Fig. 1: The photograph of a silicon diode(1N4007) and DPPH in the microwave cavity(left) and current density-voltage ($J - V$) characteristics of ITO/pentacene/Al(right). The inset figure shows a photocurrent response to an excitation light.

結果・考察

WW を使用した共振周波数可変キャビティを用いた自作の磁気共鳴装置により DPPH の周波数可変測定に成功した（Fig.2）。それぞれの共鳴磁場に対応した共鳴周波数において共鳴信号が得られている。

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、π 共役系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、本実験において磁場変調コイル（Fig.1 の青い導線）は磁場変調の用途以外に NMR コイルとしての使用を想定しキャビティ内に設置されている。これにより、キャビティの共振周波数可変帯域より低周波の分子運動を捉えられるだろう。さらに、観測可能な周波数領域の拡張のみならず、超微細結合を積極的に活用した動的核偏極や電子-核二重共鳴法を行い、分子運動の種類、大きさに対するキャリアダイナミクスへ与える影響の大きさをより詳細に解明していきたいと考えている。

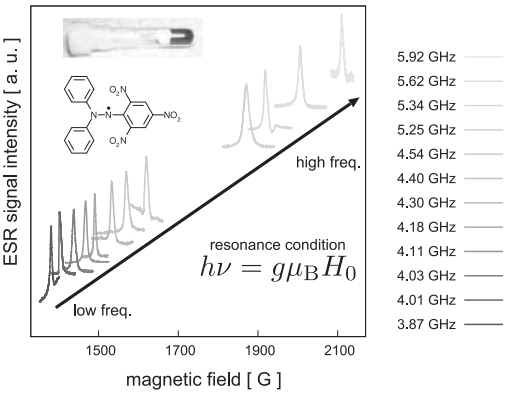


Fig. 2: Variable frequency spectra of a powdered DPPH

デバイスの測定例として 1N4007/DPPH 複合系試料に対して電圧およびマイクロ波吸収によりほぼ同時に磁気共鳴を測定することに成功した（Fig.3 左）。次に pentacene フォトダイオードにおける同様の測定では、電圧観測による共鳴信号は得られたが、マイクロ波吸収による信号は観測されなかった（Fig.3 右）。しかし、同一の試料に対して異なる観測手法の結果を比較を行うことにより、そのデバイスのスピン状態が解明されると考えられる。

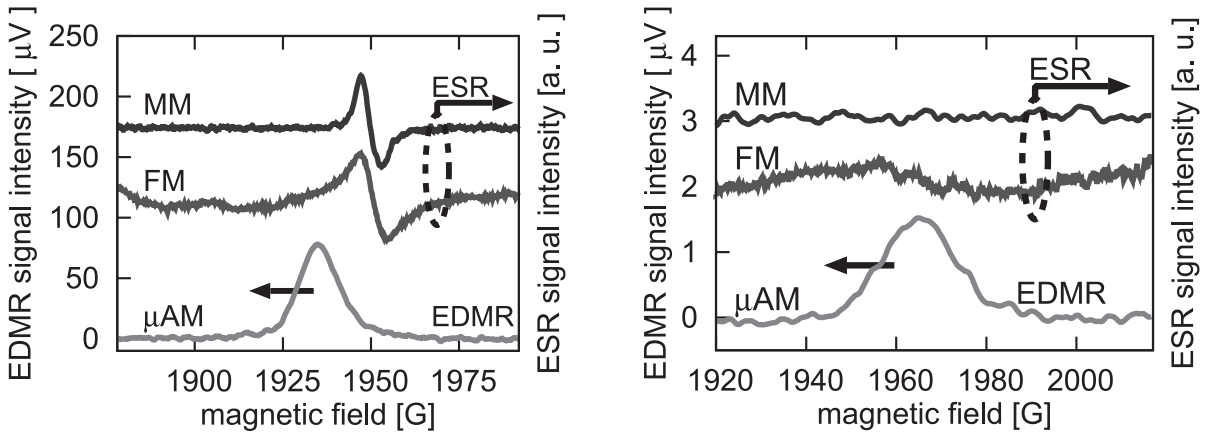


Fig. 3: ESR/EDMR spectra for a complex sample of DPPH and silicon diode(1N4007) (left) and for organic photodiode of ITO/pentacene/Al (right) measured using quasi-simultaneous measurements

P87

紙に浸透させたインクのパルスNMRによる評価

○原　英之
ブルカー・バイオスピン株式会社

The observation of physical properties of the ink penetrating three kinds of papers by pulse NMR.

○Hideyuki HARA
Application Division, Bruker BioSpin K.K.

When ink is hung to paper, it penetrates and colored. The process of this penetration is different depending on paper for example it's difficult to penetrate by xerographic paper, but easy to spread by Japanese writing paper and also goes out. The physical properties of the ink penetrating each paper were estimated using pulse NMR. Three kinds of papers, xerographic paper, Japanese writing paper and filter paper were prepared and T2 relaxation time and diffusion constant were measured after hanging ink to each paper.

.

【序論】

紙にインクを垂らすと浸透し，着色する．この浸透の仕方は紙によって異なり，例えばコピー用紙では浸透しにくいが，半紙ではよく浸透し，にじみもでる．紙のなかでインクがどのように運動し，このような性質が現れるのかをパルスNMRをもちいて評価した．用紙は，コピー用紙，半紙，ろ紙を用いてそれぞれにインクを垂らして一定時間放置した後，T2緩和時間および拡散係数の測定を行ってインクの挙動を評価した．

【実験】

実験は磁場勾配ユニットを装備したパルス NMR（minispec mq20）を用いて 25℃で行った．T2 緩和時間は CPMG 法，拡散時間は stimulated echo 法を用いて行った．磁場勾配は 80Gauss/cm を用いた．制限拡散の実験は δ =0.5ms,最初の 90° パルスの間隔=7.5ms とし，Δ=10ms から 600ms まで変化させて観測した．解析は TDNMR-A ソフトを用いて緩和時間の成分を求めた．

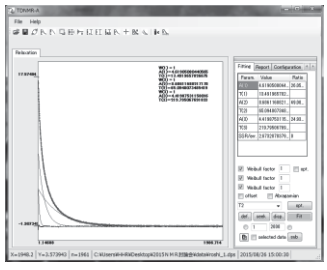


Fig.1 TDNMR-A software

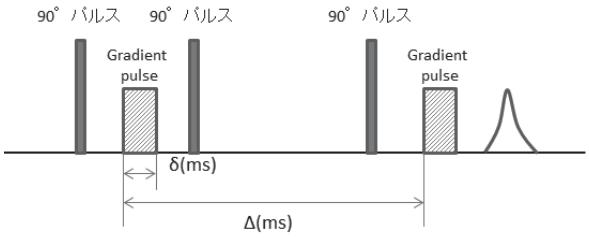


Fig. 2 Stimulated PFG echo

パルスNMR，拡散係数，緩和時間

○はら　ひでゆき

試料は，市販の用紙（コピー用紙，ろ紙，半紙）0.12g に油性インクを 200uL たらし，十分用紙に染み込んでから測定を行った．

【結果および考察】

図 2 にインク及び各種紙に染み込ませたインクの緩和時間を示す．インクでは緩和時間は 400ms と長いが，髪に浸透させると 100-300ms と短くなるのが観測された．またインクでは緩和時間の成分は 1 成分フィッティングで表されるが，紙に浸透させたものでは 2-3 成分が見られた．これは紙の内部に内包された水分と，表面と結合した水分の成分が観測されたものと思われる．紙の種類で見ると半紙とろ紙では緩和時間が同程度であり，コピー用紙はそれよりも長い緩和時間となった．

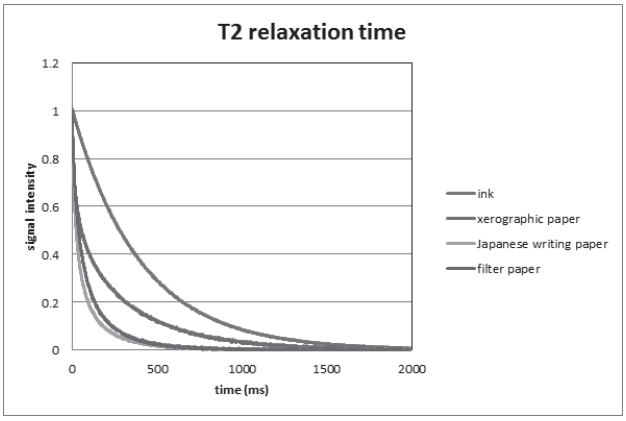


Fig.2 T2 relaxation curve

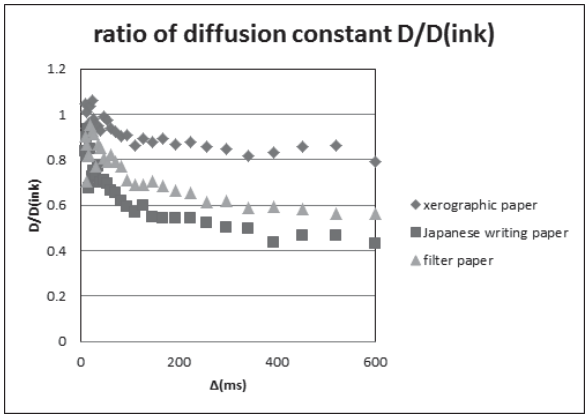


Fig.3 Ratio of diffusion constant

図 3 に拡散係数をΔの値を変えたときのインクの拡散係数 D(ink)で割った値を示す．拡散が制限されていない系の時，拡散係数はΔの値によらず一定の値になるが，拡散が制限されると，Δの値とともに拡散係数が減少していく．インクのみの拡散係数に対して，用紙に浸透させたインクの拡散係数の比も半紙とろ紙では似たような傾向であり，コピー用紙がインクに近い値となった．各用紙共に拡散係数は制限拡散の影響でΔ値とともに減少することが観測された．しかしながらコピー用紙では制限拡散の影響が小さく，半紙で最も制限拡散の影響が大きくなると観測された．これらの違いは紙の繊維の構造と大きく関係しているものと思われる．また，浸透の具合を変えた状態でもそれぞれ測定を行った．詳細は当日議論する．

P88

スーパーナイキスト動作を応用した簡易MRIシステムの開発

○津田 真人，寺田 康彦，巨瀬 勝美
筑波大学大学院数理物質科学研究科

Development of simple MRI system applying super-Nyquist MRI operation

○Makoto Tsuda, Yasuhiko Terada , and Katsumi Kose
Institute of Applied Physics, University of Tsukuba, Japan.

A simple digital MRI system using super-Nyquist operation for the frequency source is proposed. The super-Nyqusit operation which utilizes the third harmonic wave for the Larmor frequency (43.8 MHz) was confirmed using an arbitrary waveform generator. We thus concluded that a much more simple MRI system can be constructed using a digital oscilloscope which can generate a triangular wave.

序論

オシロスコープや任意波形発生器といった汎用デジタル機器が容易に手に入るようになり，これらを用いて低価格かつ短期間でデジタルMRIシステムの開発に成功した．[1](Fig.1)　一方，高周波信号を効率よく出力するスーパーナイキスト動作という手法により，高磁場磁石でも使用可能なMRIシステムの開発が可能になった．また，この技術により低性能なオシロスコープの波形発生機能で核磁化励起することも可能になり，位相再現性の確保するための処理や任意波形発生器が不要になり，より低価格かつ簡単にMRIシステムの開発が可能になった．本研究ではスーパーナイキスト動作で撮像可能であることを確認し，より簡単なデジタルMRIシステムを提案する．

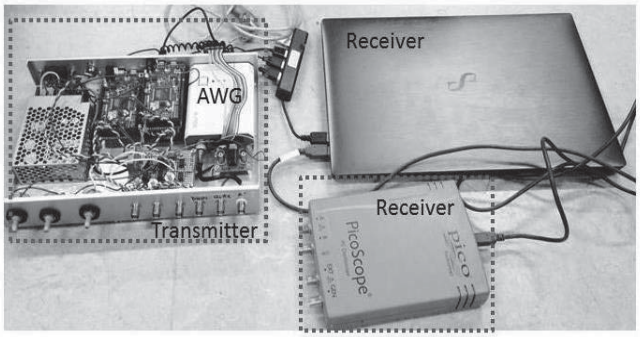


Fig. 1　Digital MRI console using general purpose digital instruments and board computers (Components:
Digital Oscilloscope, Arbitrary waveform generator, board computers and a Laptop PC)

デジタルMRI，スーパーナイキスト，オシロスコープ

○つだまこと，てらだやすひこ，こせかつみ

スーパーナイキスト送信の原理

Fig.2のような周期T，振幅Aの三角波をフーリエ級数展開すると次のようになる

$$f(t)=\frac{8A}{\pi^2}\sum_{n=1}^{\infty}\frac{1}{(2n-1)^2}\cos\left(\frac{2\pi(2n-1)}{T}t\right)$$

$$=\frac{8A}{\pi^2}\left(\cos\omega t+\frac{1}{9}\cos 3\omega t+\frac{1}{25}\cos 5\omega t+\cdots\right)$$

$$\text{ただし．基本波角周波数}\omega=\frac{2\pi}{T}$$

このように三角波は奇数次の高調波を効率よく発生し，スーパーナイキストMRIのRF信号はこの高調波(3倍波)を核磁化励起に使用する．

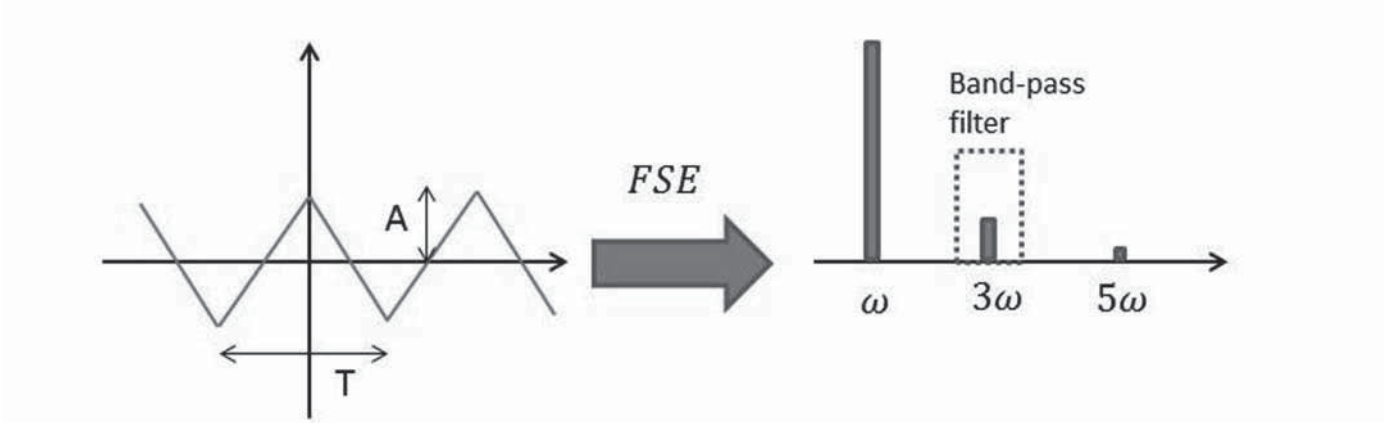


Fig. 2 Fourier series expansion of the triangular wave

スーパーナイキストMRI送信系の構成

Fig.3にスーパーナイキストMRI送信系のブロック図，Fig.4にRF信号を出力する任意波形発生器(AWG-100, Elmos, Osaka)を示す．Fig.4の任意波形発生器で三角波のRF信号を直接出力し，バンドパスフィルタを通して第3次高調波を出力する．本実験で使用した任意波形発生器のサンプリング周波数は100MHzであり，50MHzまでの基本波まで出力可能である．したがって第3次高調波を使用した場合，共鳴周波数150MHz，すなわち約3.5T以下の磁石に対応する．

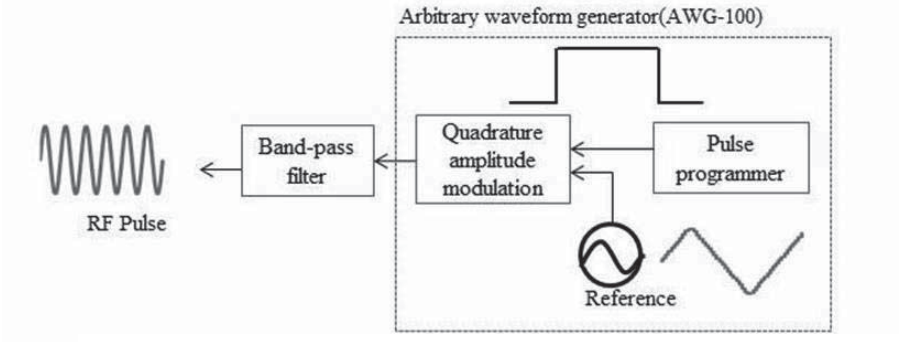


Fig.3 Block diagram of a super-Nyquist MRI Transmitter

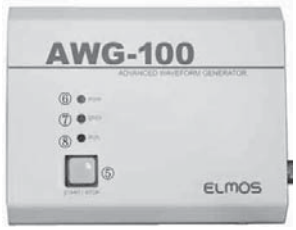


Fig.4 AWG-100

波形生成実験

任意波形発生器で14.6MHzの三角波を生成すると，43.8MHzの第三次高調波が生成され，ローパスフィルタ(BLP-50,mini-circuits,NewYork)とハイパスフィルタ(BHP-50,mini-circuits,NewYork)の直列接続したフィルタを通した信号のスペクトルをFig.5とFig.6に示す．第三次高調波以外の成分がカットされて第三次高調波だけが出力される．

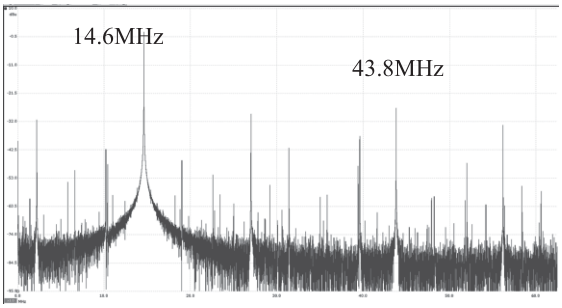


Fig.5 RF pulse spectrum

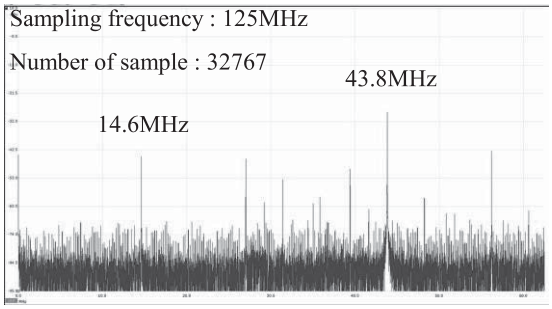


Fig.6 Filtered RF pulse spectrum

撮像実験

静磁場強度1T永久磁石を用いて，送信RF信号は14.6MHzの三角波，受信サンプリング周波数は6.9MHzのアンダーサンプリング[1]で3Dスピンエコー撮像を行った．位相再現性の確保のため，RF信号とNMR信号の2ch同時サンプリングを行い，NMR信号の位相シフトを補正した．

撮像パラメーター
3DSpin-echo,1T90mm,Slice1.67mm,FOV=37.2mm ×32.6mm TR=100msec，Matrix size=256×256×8

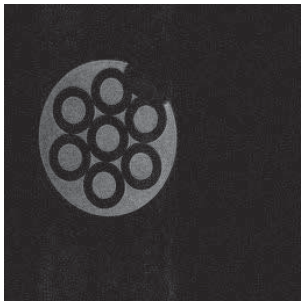


Fig.6 A selected cross section from a 3D image dataset of a water phantom

考察

本研究において，スーパーナイキスト動作を用いて画像再構成が可能であることを確認した．以前のシステムでは任意波形発生器の性能限界により高磁場磁石での使用は困難であった．しかし，送信系にスーパーナイキスト動作を用いることで周波数上限を3倍に広げることができ，高磁場磁石での撮像が可能になった．

このスーパーナイキスト動作は従来システムの高磁場磁石での撮像を可能にするだけではなく，低性能なオシロスコープの波形生成機能で核磁化励起させることも可能にした．従来のシステムのブロック図をFig.7，提案するシステムのブロック図をFig.8に示す．この場合，任意波形発生器が不要になるため，より低価格なMRIシステムの開発が可能になる．また，従来のシステムでは各モジュールの周波数源の違いによる予測不能な位相シフトを補正するためにRF信号とNMR信号を2ch同時サンプリングをしてNMR信号の位相補正をしていたが，提案するシステムではその補正も不要になるため，よりシンプルなデジタルMRIの開発が可能になる．

今後は提案した，よりシンプルで低価格なMRIシステムの実装を行い，従来システムとの性能評価を行う予定である．

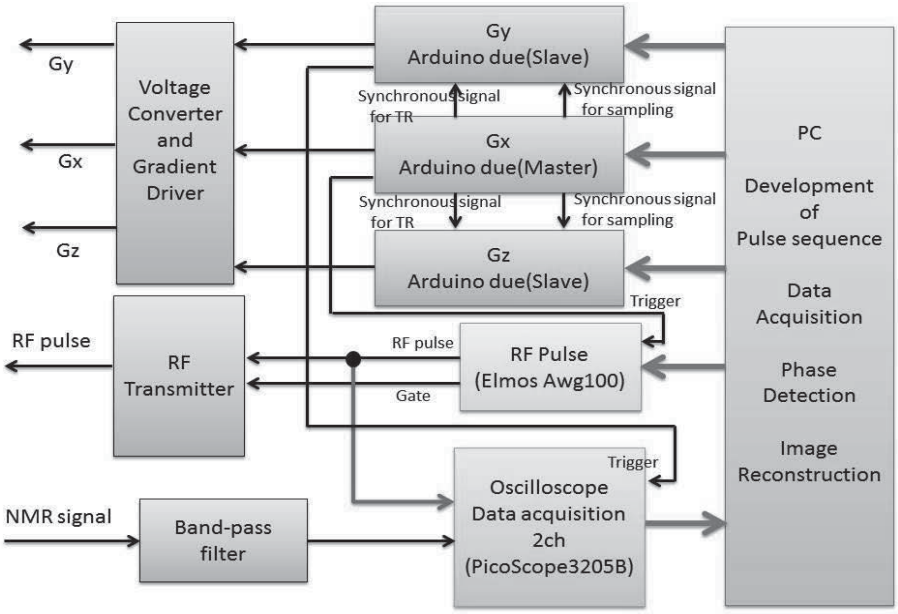


Fig.7 Block diagram of conventional MRI system

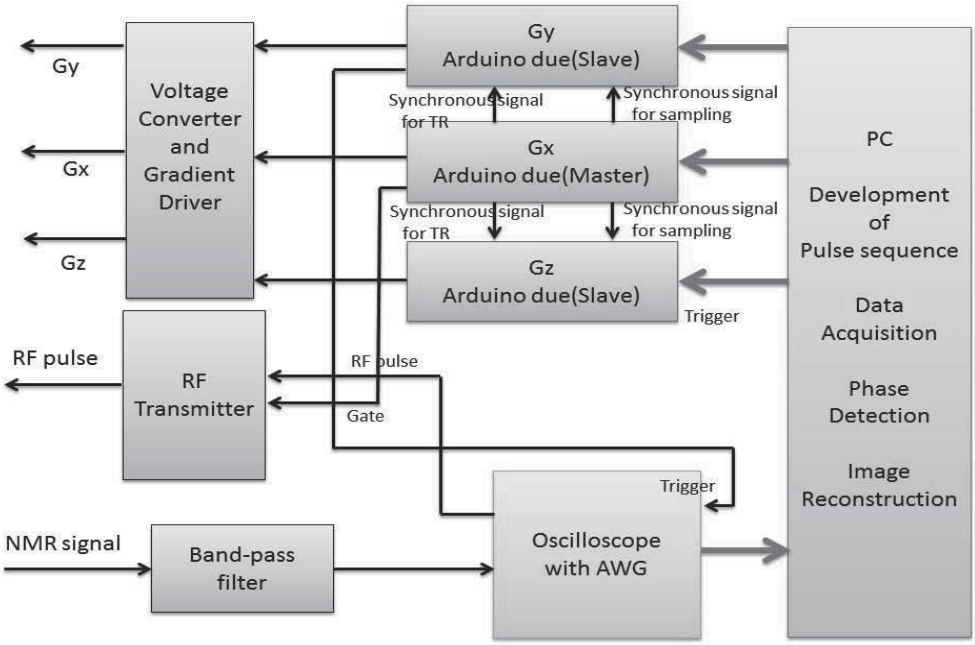


Fig.8 Block diagram of proposed MRI system

引用文献

[1] M. Tsuda, Y. Terada, K. Kose, Development of a Digital MRI Console Using General Purpose Digital Instruments and Board Computers 2 June, 2015, 23th Annual Meeting & Exhibition (ISMRM), Toronto, Canada. (1843) 285P

[2] Pablo Pe’rez.,Andre’s Santos.(2004) Undersampling to acquire nuclear magnetic resonance images Medical Engineering & Physics 26(2004) 523-529

[3] Pascal P. Stang, Steven M. Conolly, Juan M. Santos, John M. Pauly, and Greig C. Scott Medusa: A Scalable MR Console Using USBIEEE Trans Med Imaging. Feb 2012; 31(2): 370–379.

P89

卓上および高磁場NMR装置を利用した食品加工過程の分析評価情報ツール開発

○近山　英輔[1,2]，山科　椋[1]，小松　桂子[2]，坪井　裕理[2]，坂田　研二[2]，関山恭代[2,3]，亀山　真由美[3]，菊地　淳[2,4,5]
[1]新潟国際情報大学・情報システム学科
[2]理化学研究所・環境資源科学研究センター
[3]食品総合研究所・食品分析研究領域
[4]横浜市立大学大学院・生命医科学研究科
[5]名古屋大学大学院・生命農学研究科

Analysis tool and database for food processing by using benchtop and high resolution NMR

○Eisuke Chikayama[1,2], Ryo Yamashina[1], Keiko Komatsu[2], Yuuri Tsuboi[2], Kenji Sakata[2], Yasuyo Sekiyama[2,3], Mayumi Kameyama[3], and Jun Kikuchi[2,4,5]
[1]Department of Information Systems, Niigata University of International and Information Studies, Japan.
[2]Center for Sustainable Resource Science, RIKEN, Japan.
[3]Analytical Science Division, National Food Research Institute, Japan.
[4]Graduate School of Medical Life Science, Yokohama City University, Japan.
[5]Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University, Japan.

We have been developing a new NMR tool and database for food processing. It is aimed at evaluating a user NMR spectrum through food processing with linking another evaluation including human subjective sense. As the result, a NMR query of fruit ripening demonstrated the success implementation of statistically estimated human evaluated score. The web tool was implemented under Apache, PHP, and MySQL.

序論

食品は農産物、畜産物、水産物などのほかに、様々な加工、処理、調理が行われる。それらの素材自体が有する代謝能に伴う貯蔵・熟成過程、その後の製造や調理時の物理・化学的変換過程、摂食時の調味料添加等に伴う様々な過程が、化学成分や物理的特性を大きく変化させることで、食品の多様性と価値が生まれる。

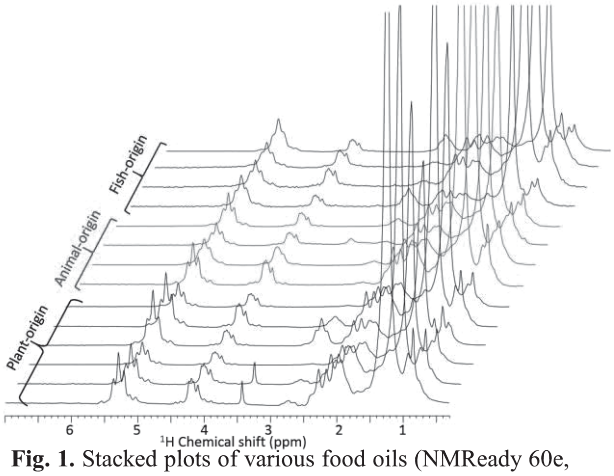


Fig. 1. Stacked plots of various food oils (NMReady 60e, a benchtop NMR)

現在、Human Metabolome Database下のFooDB[1)]など、情報編纂型の食品データベースは存在するが、貯蔵、発酵、加工、調理などの「プロセス」に注目したNMRの系統的なデータベースは、筆者らの知るところ存在しない。そこで我々は、そのデータベース・分析ツール開発に着手し、単にNMRデータを保持するだけでなく、食品の価値指標である、人間の主観や多様な「プロセス」と紐づける手法開発に挑戦した。

食品，データベース，ウェブ

○ちかやまえいすけ，やましなりょう，こまつけいこ，つぼいゆうり，さかたけんじ，せきやまやすよ，かめやままゆみ，きくちじゅん

方法

多様な食品プロセス試料を用い、複数の評価者の呈味評価により1～5の主観的スコアを取得した。また、この食品試料について、抽出物の1D ^{1}H-NMRスペクトルを計測した。卓上NMRはNMReady 60e (60 MHz, Nanalysis社)を用い、典型的には、重クロロホルム溶媒、300 K、64スキャン、スペクトル幅11.9 ppm、2048ポイントで取得した(Fig.1)。ウェブサーバーはApacheを用い、サーバー処理言語としてPHPを用い、PHPからリレーショナルデータベースであるMySQLにアクセスさせた。MySQLには6個のテーブルを新規設計・実装した。ヒトの食味評価、および食品工学的な物性分析データ等を想定し、これらを統一的に特徴ベクトルとしてMySQLに登録可能にした。さらに、数値化スペクトルを格納できるようにし、予測値計算アルゴリズムを開発して、主観的データである特徴ベクトルと客観的データである数値化スペクトルの検索を紐付け可能にした。

結果と考察

今回開発した食品加工過程の分析評価情報ツール（試作版:FoodPro）を示す（Fig. 2）。データベースには、試作版用のデータ登録がなされている。即ち、果実登熟過程のNMR計測スペクトル、それをランダムに修正した仮想NMRスペクトル、呈味評価値、データの各IDである。登熟時の1スペクトルをクエリ（Fig. 2, Query）として、ウェブツールに投入した結果、呈味評価値の予測値を統計し、可視化するツールの開発が確認できた（Fig. 2, FoodProスクリーンショット, Result, Statistically estimated human evaluation）。現在も、実データを充実させるべく食品NMRスペクトルを計測中であり（Fig. 1）、今後は、今回採取した数百の呈味評価結果の登録、高分解能NMR、様々な食品スペクトルの登録など、官能評価や製造工程の評価に応用可能なツールを目指してゆく。

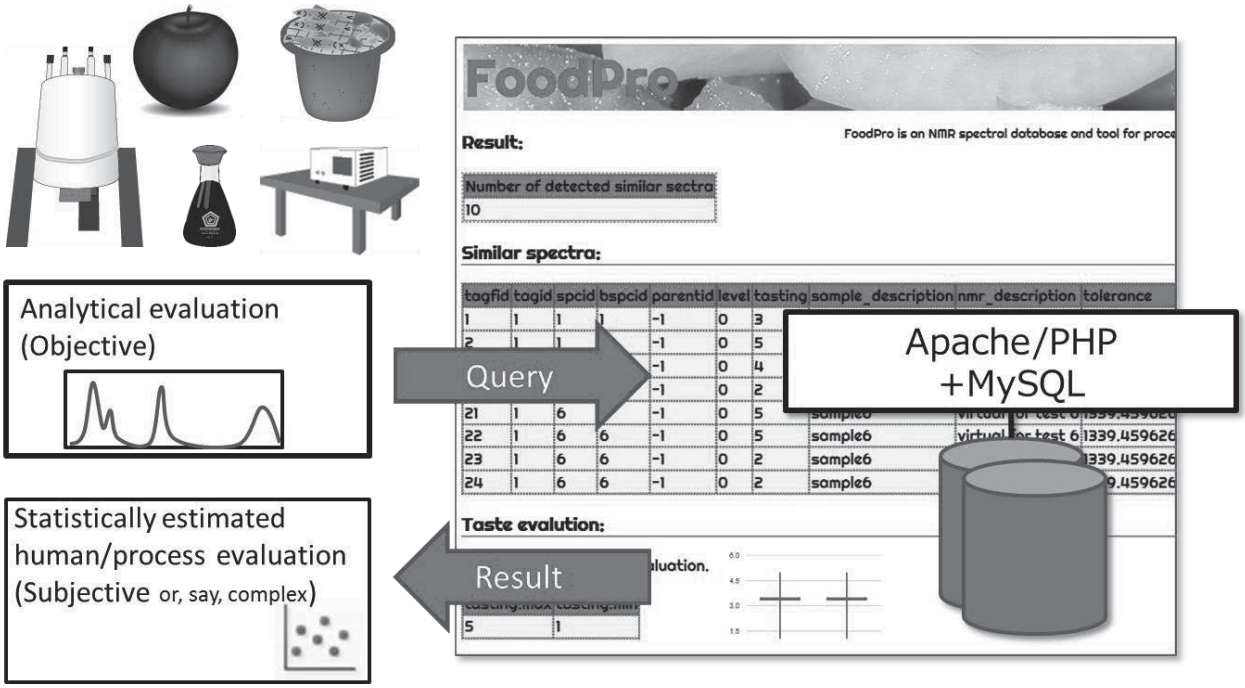


Fig. 2. A newly developed NMR tool and database for food processing.

引用文献

1) Wishart, D. S. et al., *Nucleic Acids Res.* **41**, D801-D807, 2013.

P90

定量NMRにおけるデータ解析の最適化とデータの共同解析

○山﨑 太一[1]，斎藤 直樹[1]，齋藤 剛[1]，井原 俊英[1]
[1]産業技術総合研究所・物質計測標準研究部門

Optimization of data process for quantitative NMR and collaborative data process

○Taichi Yamazaki[1], Naoki Saito[1], Takeshi Saito[1], Toshihide Ihara[1]
[1]National Metrology Institute of JAPAN (NMIJ), National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST).

Optimization of data process on purity assessment using NMR is presented. We optimized the data process conditions, focusing on signal area and baseline setting, for the accurate quantitative results. The dependency between the conditions and results were discussed, the results obtained with the optimized condition was compared to results collected from laboratories in a collaborative study. When we suggested the process condition and re-processed by the collaborators, results became more accurate than the initial study.

【序論】

NMRは分子の構造解析等の定性分析に広く用いられてきたが，構造の異なる分子を基準に利用できるという利点から，近年では精確な定量分析法（qNMR）として利用され始めている[1), 2)]. qNMRの普及により，定量分析のための測定条件は数多く報告されているが，試料調製やデータ解析に関する報告例はまだあまりない．当グループでは，データ解析において，精確な結果を得るためには積分範囲を適切に設定することの重要性を報告している[3)]. そこで本研究では，積分範囲の詳細な検討に加えて，ベースラインについても検討を行い，qNMRにおける解析条件の最適化を試みた．さらに，データの共同解析を行うことで，解析条件の最適化の効果についても検証した．

【実験】

測定対象にはジメチルスルホン（$DMSO_2$, 和光純薬工業製）を，標準物質には3,5-ビス（トリフルオロメチル）安息香酸（NMIJ CRM 4601-a）をそれぞれ用いた．また，それらの希釈溶媒にはメタノール-d_4（CD_3OD, 和光純薬工業製）を用いた．^{1}H NMR測定はアジレント社製 VNS600 (^{1}H 共鳴周波数:599.90 MHz, California, USA)で行い，プローブにはバリアン社製の^{15}N-^{31}P/^{1}H-^{19}F dual-broadbandプローブを用いた．測定に用いた代表的なパラメータをTable 1に示す．調製した試料を3回測定した3データ（FID）について，MestReNova ver.9.0.1.を用いて解析を行った．なお，共同解析では，調製した試料を2本のNMR管に分けて，それぞれ3回ずつ測定した同じデータを参加機関に送付し，それぞれの機関で独自に解析した．

Table1 Measurement parameters in this experiment.

Parameter	Value
Pulse width (Pulse angle)	13.0 μs (90°)
Relaxation delay	60 s
Acquisition time	4.0 s
Number of scan	32 times
Spectrum width	59523.8 Hz (99.2 ppm)
Temperature	23 °C

qNMR, data process, collaborative study

○やまざきたいち，さいとうなおき，さいとうたけし，いはらとしひで

【結果】

１．解析条件の最適化

本研究では特に影響の大きいと考えられる積分範囲及びベースラインの最適化を検討した．測定対象物質及び標準物質の各信号の^{13}Cサテライト信号を含む場合と含まない場合で，信号面積に明確な差が確認され，^{13}Cサテライト信号を含む範囲で一定の値が得られた．このことから，^{13}Cサテライト信号を含む積分範囲で，ベースラインの影響を評価した．積分範囲を一定とし，ベースラインのアルゴリズム変えた際の$DMSO_2$の信号面積の変動をTable 2に示す．ここでは，積分範囲の両端のノイズの中心を結ぶ直線（Liner）で解析した場合は調製値との差が0.1 %以内であったことから，この信号面積を1.000として規格化した．すべての条件で，信号面積の繰返し再現性は0.1 %以下だったが，アルゴリズムの設定によって信号面積が有意に異なり，ベースラインを設定しない場合(Off)にはLinearと1 %近い差が確認された．

Table 2 The influence of baseline collection in signal area.

Baseline collection	Algorithm	Degree of a polynomial	Normalized area (bias from linear)	RSD (%)
Off	-	-	0.991 (-0.9 %)	0.00
On	Smoothing	-	1.008 (+0.8 %)	0.04
	Linear	**-**	**1.000**	**0.07**
	DC	-	1.003 (+0.3 %)	0.05
	Polynomial	1	1.000 (±0 %)	0.01
		2	1.001 (+0.1 %)	0.01
		3	0.999 (-0.1 %)	0.06
		4	1.000 (±0 %)	0.03
		5	0.998 (-0.2 %)	0.05
		9	0.998 (-0.2 %)	0.04
		10	0.998	0.04

２．データの共同解析

共同解析の結果をFig.1 に示す．参照値から約7.5 %外れた結果はフーリエ変換時にデータポイント数を間引いたため，位相補正が正しく処理できなかったことが原因であったが，それ以外でも調製値（参照値）から1 %近いバイアスが認められる機関が多かった．そこで，当所で行った解析条件の最適化の検討結果を踏まえ，解析条件を参加機関に提示した上で共同解析を再度実施したところ，ほとんどの機関で参照値に対して0.5 %以内のバイアスで評価することができた．なお，解析プロトコルを示し同一のFIDを解析したにもかかわらず，データが一致せず多少のばらつきが確認されたのは，解析ソフトやオペレータによる差であると考えている．

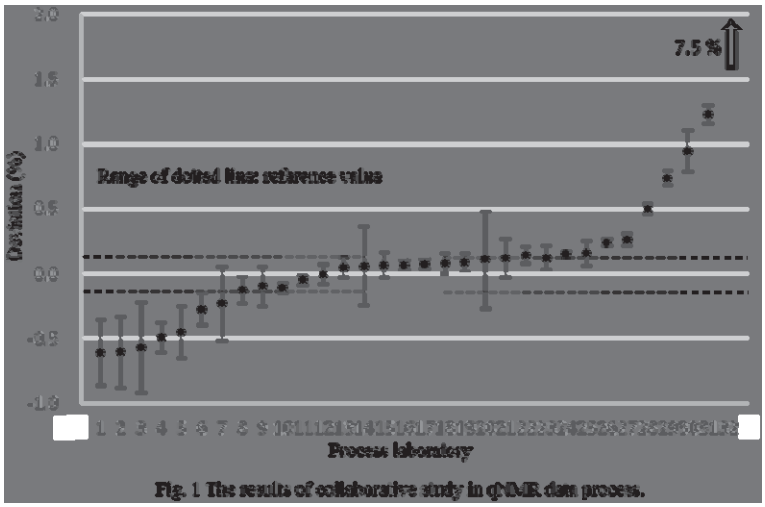


Fig. 1 The results of collaborative study in qNMR data process.

引用文献

1) T. Saito, et al., *Metrologia* **41** (2004) 213-218.
2) T. Yamazaki, et al., *Accred. Qual. Assur*. **19** (2014) 275-282.
3) T. Yamazaki, et al., *BUNSEKIKAGAKU* **61(11)** (2012) 963-967.

P91

多次元 NMR スペクトル再構成法の開発とケモカイン-ケモカイン受容体複合体の転移交差飽和実験への応用

○上田 卓見[1,2], 吉浦 知絵[1], 幸福 裕[1], 松本 昌彦[1], 奥出 順也[1], 近藤 啓太[1], 白石 勇太郎[1], 嶋田 一夫[1]
[1]東京大学大学院・薬学系研究科
[2]JST, さきがけ

Development of an NMR spectra reconstruction method to elucidate the CCR1- and CCR5- binding modes of MIP-1α

○Takumi Ueda[1,2], Chie Yoshiura[1], Yutaka Kofuku[1], Masahiko Matsumoto[1], Junya Okude[1], Keita Kondo[1], Yutaro Shiraisi[1], and Ichio Shimada[1]
[1]*Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo, Japan.*
[2]*JST, PRESTO, Japan.*

Conventional methods for the reconstruction of multidimensional NMR spectra from undersampled time-domain data were not effective for the accurate determination of the signal intensity ratios of the crowded two-dimensional spectra of proteins. Here, we developed an NMR spectra reconstruction method, "Conservation of experimental data in ANAlysis of FOuRier" (Co-ANAFOR), to reconstruct the crowded spectra from the undersampled time-domain data. The number of sampling points required for the transferred cross-saturation experiments between membrane proteins, photosystem I and cytochrome b_6f, and their ligand, plastocyanin, with Co-ANAFOR was half of that needed for linear prediction, and the peak height reduction ratios of the spectra reconstructed from truncated time-domain data by Co-ANAFOR were more accurate than those reconstructed from non-uniformly sampled data by compressed sensing.

序論

蛋白質の動的構造を解析する上では, 緩和分散法や常磁性緩和増大法, および転移交差飽和法等の NMR 手法が有効である. これらの手法を, 収量や安定性の低い蛋白質に適用する上では, 二次元 NMR スペクトル上のシグナル強度比を, 迅速かつ正確に決定することが重要である.

多次元 NMR スペクトルでは, シグナルがまばらにしか存在しないという性質を利用して, 少数の実験データから高分解能のスペクトルを再構成する手法が多数開発されている. 特に, 不均一にサンプリングしたデータから圧縮センシングで再構成する手法は, 線形予測法等の他の手法より有効であることが示されている. また, 試料の性状確認のために取得する, ^{1}H-^{15}N HSQC 等の比較的単純で感度が良い二次元 NMR スペクトルから得られる化学シフトの情報を再構成に利用する, SIFT 法や ANAFOR 法のような手法も最近開発されている.

圧縮センシングで用いられる, 不均一にサンプリングしたデータよりも, 展開時間の小さい部分のみを均一サンプリングしたデータの方が, S/N の良いデータを多く含むため, 強度比を正確に決定する実験では有効であることが期待される. しかし、両データから再構成したスペクトルにおける, シグナル強度比の正確性を比較した例はない. そこで本研究では, シグナル強度比を正確に決定する上で有効な二次元 NMR スペクトル再構成法を開発することを目的とした.

GPCR, 転移交差飽和法, 膜蛋白質

○うえだたくみ, よしうらちえ, こうふくゆたか, まつもとまさひこ, おくでじゅんや, こんどうけいた, しらいしゆうたろう, しまだいちお

結果および考察

最初に, 部分的に取得した実験データを, ANAFOR 法で再構成した. その結果, 再構成後のスペクトルでは, 一部のシグナルの形状が異なったり (Fig. 1C), 混んでいる領域に強いアーティファクトが観測されたりした (Fig. 1D). 前者の原因は再構成に用いた化学シフトや緩和速度の情報が完全には一致していないこと, 後者の原因はシグナル数に比べてデータ数が少ない条件において, 最小二乗法の解が安定しないことであると考えた.

そこで, ANAFOR 法に二点の改良を加えた. 一点目として, 最小二乗法の解を安定化させるために, Tikonov regularization を適用した. 二点目として, 化学シフトや緩和速度のミスマッチの影響を小さくするために, ANAFOR では捨てて計算値に置き換えていた実測データを残して, 測定していない部分だけ外挿するように変更した. その結果, ANAFOR における線形の不一致やアーティファクトが解消された (Fig. 1E). 以下, 開発した手法を Co-ANAFOR と呼ぶ.

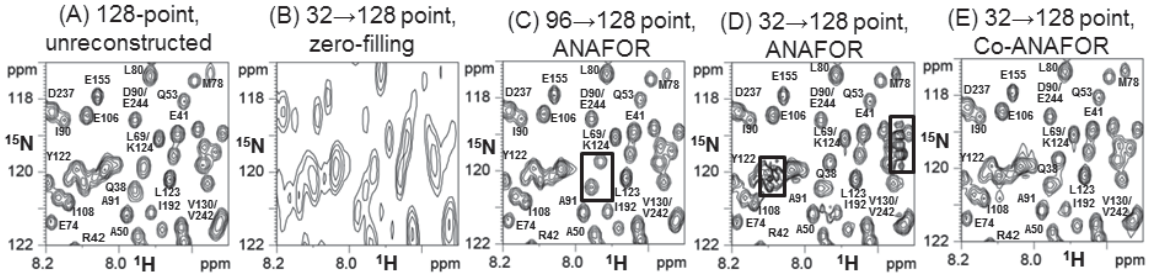


Fig. 1 ^{1}H-^{15}N TROSY spectra of [ul-^{2}H, ^{15}N] spectra of EIN reconstructed by various methods.

次に, Co-ANAFOR をプラストシアニンと光合成明反応膜蛋白質の転移交差飽和実験のデータに適用した. その結果, 圧縮センシングにより 14 ポイントの不均一サンプリングしたデータから再構成した 56 ポイントのスペクトルでは, S/N 比が 40 を下回るような感度の低いシグナルの強度比が, 56 ポイント全て実測したスペクトルにおける強度比と顕著に異なっていたのに対し, Co-ANAFOR により 14 ポイントの均一サンプリングしたデータから再構成した 56 ポイントのスペクトルでは, 56 ポイント全て実測したスペクトルにおける強度比との差は全て 0.15 以下であった (Fig.2).

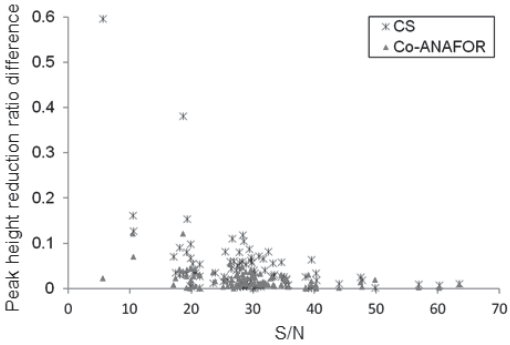


Fig. 2 Plots of the difference between the peak height reduction ratios of the reconstructed spectra (by compressed sensing, CS, or Co-ANAFOR) and those of the unreconstructed spectra against the S/N ratios of each signal, in the transferred cross-saturation experiments of plastocyanin and photosynthetic membrane proteins.

以上の成果を投稿論文に発表した上で [1], 二次元および三次元の実測 NMR スペクトルを Co-ANAFOR で再構成するためのプログラムおよびマニュアルを, ホームページ上で公開した (http://ishimada.f.u-tokyo.ac.jp/public_html/reconstruction/indexj.html). さらに, G 蛋白質共役型受容体であるケモカイン受容体 CCR1, CCR5 とそのリガンド MIP-1α の転移交差飽和実験に Co-ANAFOR を適用した.

引用文献

1) Ueda et al., *J. Biomol. NMR* **41**, 2526-2540, 2015.

P92

NMRデータベースBioMagResBankの統合的拡張と公開

○小林直宏[1]、横地政史[1]、岩田武史[1]、本野千恵[2]、廣明秀一[3]、児嶋長次郎[1]、藤原敏道[1]
[1]大阪大学蛋白質研究所
[2]産業技術総合研究所 創薬分子プロファイリング研究センター
[3]名古屋大学大学院 創薬科学研究科

Extension and publication of biomolecular NMR data archived at BioMagResBank for integrated database search

○Naohiro Kobayashi[1], Masashi Yokochi[1], Takeshi Iwata[1], Chie Motono[2], Hidekazu Hiroaki[3], Chojiro Kojima[1] and Toshimichi Fujiwara[1]
[1]*Institute for Protein Research, Osaka University*
[2]*Molecular Profiling Research Center for Drug Discovery, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology*
[3]*Department of Basic Medicinal Sciences, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya University*

We, PDBj-BMRB group in Osaka university, have published XML and RDF documents of biomolecular NMR data archived at BioMagResBank (BMRB) can allow us to gain the information related to the entry such as chemical shifts, structure coodinates, function and interaction of proteins, and single nucleotide polymorphism (SNP). Using the BMRB/RDF via SPARQL endopoint, we have established secondary database of modeled structures for the human genome (SAHG) linked with the other life science databases. Furthermore, we have develped web-page for integrated search of the databases such as BMRB, PDB, UniProt and IntAct.

序論

我々、大阪大学蛋白質研究所のPDBj-BMRBグループは生体高分子ＮＭＲの実験データをアーカイブしているデータベースであるBioMagResBank (BMRB)を米ウィスコンシン大学との国際的協力関係のもとで運営し、データの登録、管理、公開の業務を行っている。昨年度までに我々はBMRBの全データについてXML化、RDF化を行い、公開を行った。XML化、RDF化においてはデータ構造をNMR-STAR3.1に完全準拠させることでデータの完全な記述とマシンリーダブルな情報を公開可能にし、更にはSPARQLエンドポイントの公開とSPAQRL検索サイトの公開を行うことで他のライフサイエンス系データベースと連携させたデータベース間検索を実現可能にした1)。

一方、産業総合研究所の本野千恵主任研究員らはヒトゲノム配列に対して網羅的にホモロジーモデリングを行うことで42000件を超える高品質な立体構造予測を実現し、それらの構造情報をSAHG (Structural Atlas of Human Genome) データベースとして公開した2)。本研究においてはこれら統合的拡張されたBMRBデータを有効活用し、2次データベースの構築やWEB検索サイトの開発を行った。

BMRB, database, modeling

○こばやしなおひろ，よこちまさし，いわたたけし，もとのちえ，ひろあきひでかず，こじまちょうじろう，としみちふじわら

結果と考察

SAHGのデータベースに登録されているモデル構造のうちPDBにすでに登録されている配列相同性95%以上のもの、テンプレート構造との配列相同性が40%以下あるいは90%以上のもの、アミノ酸40残基以下あるいは300残基以上のものを除外し得られた約3100構造について対応しているUniProtのIDと残基番号情報のリストを作成した。このリストに対して対応しているBMRB, IntAct, OMIMの情報をSPARQLによるデータベース間検索を実行し、MySQL上に2次データベースを構築した[Fig. 1]。構築された2次データベースはSAHGの情報とテンプレートとなるPDB-IDとUniProt-IDに加えBMRB情報、IntActによるタンパク質相互作用情報あるいはOMIMによる一塩基置換(SNP)情報を持つものについてはそれらのIDと詳細情報を表示する検索サイトを開発した。この検索サイトではこれらのモデル構造を相互作用情報数やSNP情報の有無で絞り込み検索が可能であり、NMR研究等に適している興味深い高品位なモデル構造を入手することができる。また、SAHGのモデル構造データベースには複合体構造も多く含まれており、2次データベースではその約1/3がBMRBに登録されている化学シフト帰属情報を持つため創薬研究への応用が期待できる。

我々は更にBMRB/XMLを利用し、他のライフサイエンス系データベースのXMLアーカイブを連携させることで統合検索を実現する検索サイトを開発しこれも近日中の公開を予定している。この検索サイトを用いることでBMRB, PDB, UniProt, IntActについてキーワード、配列などによる同時検索を高速に実行できる。化学シフト情報および構造情報を起点として機能情報や相互作用情報を柔軟に取得でき様々なタンパク質研究への応用が期待できる。

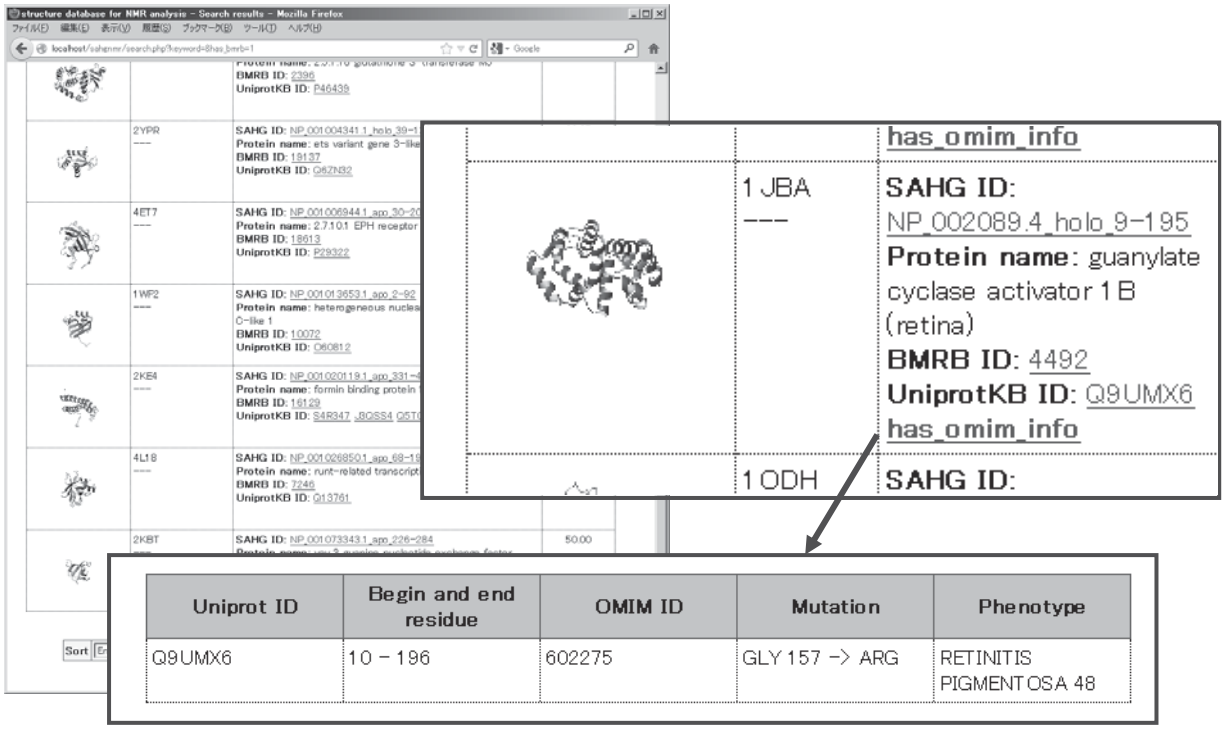


Fig. 1. The secondary database of modeled structures linked with the other life science databases.

引用文献

1) Yokochi, M. et al., *J. Biomed. Sem.* 投稿中.

2) Motono, C. et al., *Nuleic. Acids Res.* D487-493 (2011)

P93

高磁場DNPによるマジック角回転下での核磁化増大を定量的かつ高速にシミュレーションする方法

○深澤隼[1], 藤原敏道[1], 松木陽[1]
[1]大阪大学蛋白質研究所

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

○Jun Fukazawa[1], Toshimichi Fujiwara[1], and Yoh Matsuki[1]
[1]*Institute for Protein Research, Osaka University, Osaka, Japan.*

It is time-consuming to simulate the build-up of the nuclear magnetization by exact numerical calculation of spin states in high-field DNP under magic-angle spinning. The elemental process consists of saturation of electron spin polarization, electron-nuclear polarization transfer via cross-effect DNP and electron spin-spin exchange. Here, we have developed an efficient code for obtaining the same results by exactly calculating only the critical events under the electron spin relaxation. We calculated the build-up by the DNP for biradical molecule TOTAPOL in several situations such as irradiation frequency dependence of submillimeter-wave double-resonance at 16.45 T and 9.4 T. This fast calculation can be used for optimization of DNP experimental parameters.

【序】

動的核分極（Dynamic Nuclear Polarization，DNP）は，電子スピンの分極を核スピンに移すことによりNMRの感度を向上させる技術である。理論的には^{1}Hについて最大660倍の核磁化の増大が期待でき，NMRの解析能力を大幅に向上させる。しかし実験的には，特に高磁場のマジック角試料回転（MAS）条件において，そのように大きな核磁化増大を得るのは困難である。DNP効率を向上させるための実験技術としては，試料温度に依存して，スピンハミルトニアンを決める常磁性分子系や，ESRサブミリ波およびNMRラジオ波の照射周波数，強度，パルスシークエンスを最適化することが考えられる。高分解能固体NMRのための高磁場DNPは，高出力サブミリ波や極低温での高速試料回転を用いるなど実験上の難しさなどのために，DNP効率向上のための最適化は容易ではない。そこで，実験上の制約を受けないで，それら実験パラメータや条件を検討するために，効率的な数値シミュレーション法を開発した。前回のものは瞬間的な磁化の増大効率を求める物であったが，今回我々はそれを発展させ，緩和効果を含めて平衡状態になるまでのシミュレーションを定量的かつ高速に行うプログラムを作成した。

MAS条件の高磁場DNPシミュレーションでは，GHzからHzにわたる広大な周波数領域のスピン相互作用を扱うため，高磁場近似を用いても時間領域での厳密な積分は膨大な計算時間になる[1]。これを克服するために，およそMHz級以上のスピン相互作用により共鳴条件のみで生じる短時間状態遷移のみを正確に計算し，試料回転や緩和など長時間の事象を粗視化して考慮して計算効率を向上させた。今回我々はその考えに基づいたプログラムを組み，様々な条件下でDNP効率がどのように変わるかというシミュレーションを行った。分子にはTOTAPOL等のビラジカルを想定し，交差効果が主要機構となる高磁場条件でシミュレーションを行った。さらにこれが実験結

Dynamic Nuclear Polarization，DNP効率，シミュレーション

○ふかざわじゅん，ふじわらとしみち，まつきよう

果の再現に問題ないか検討した。

【方法】

DNPにおける核の分極効果にはオーバーハウザー効果，固体効果，交差効果があるが，高磁場固体DNPでは交差効果が主要になる[2]。この交差効果とは2電子のスピンのエネルギー差が核スピンのエネルギーに等しくなった際に電子のフリップフロップとともに核スピン励起が起こる効果である。これは3スピン系の現象であるため，正確な計算を行うためには8×8行列のハミルトニアンをナノ秒ステップで解く必要があるが，これには多くの時間を要する。そこで，計算の単純化のために，考慮する相互作用を電子のg因子の異方性$H_{\mathrm{g}i}$，核スピンのゼーマン効果H_{Z}の他，各H_{EM}(電子-サブミリ波)，H_{triple}(電子2-電子1-核)，H_{EE} (電子1-電子2)の3種に絞り，またH_{triple}では電子2と核の間には直接相互作用はないとした。また各種効果による準位間遷移はエネルギーの等式が成立する点を通過するときのみ発生するとした。この効果による遷移比率は各準位上の存在比率に依らないとし，MAS1周分の数値を一度計算し繰り返し用いた。エネルギー差を評価する長時間の刻みはマジック角試料回転角度2°相当とした。またパウダーパターン計算の空間配向格子点にはEdénらのZCW3[3]を用いた。磁場強度は16.45T (700MHz for ^{1}H)と9.4T (400MHz for ^{1}H)，励磁対象核は^{1}H，MAS速度は10kHz，ビラジカルはTOTAPOL (Fig.1)，gテンソルはニトロキシルラジカルの典型値(2.0094, 2.0061, 2.0021)，ラジカル電子間距離は13.1 Å，電子1-^{1}H核(Fig.1下線)間距離は2.7 Å，初期状態の分極は温度20K相当とし，電子縦緩和時間は2msとした。

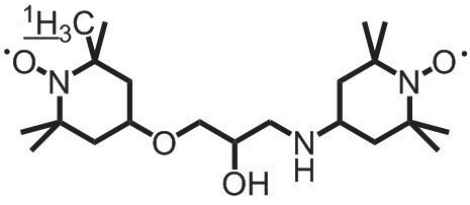


Fig.1. TOTAPOL with electron and ^{1}H spins.

【結果・考察】

これを用いて計算したDNP効率をプロットした図をFig.2に示す。このシミュレーションは照射するサブミリ波周波数を少しずつ変えながらDNP効率をプロットする実験に相当する。ここから，電子の広域パウダーパターン線形に相当する周波数のうち，中心より少し離れた部分にサブミリ波を照射すると効率良く励起を行うことが出来るとわかり、実験とよく合う。この図は強度80kHz照射を10s間行ったときのDNP効率である。ZCW3格子点の数は6044点で，この計算にかかる時間は各周波数2時間程度である。計算の条件は要求する精度と掛けられる時間との兼ね合いで自由に選ぶことが出来る。この特徴を利用して検討したサブミリ波二重共鳴の効果やDNP効率の高いラジカル分子AMUPolについての結果も示す。

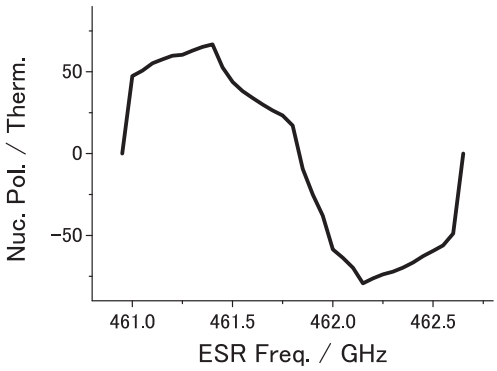


Fig.2. DNP enhancement profile for TOTAPOL, after a build-up time of 100k times the MAS period (almost equilibrated).

Reference

[1] K. R. Thurber, R. Tycko, *J. Chem. Phys.*, **137**, 084508 (2012)
[2] T. Mary, et. al., *J. Chem. Phys.* **128**, 052211 (2008)
[3] M. Edén, M. H. Levitt, *J. Magn. Reson.*, **132**, 220-239 (1998)

キーワード検索
著者検索

Keyword Index
Author Index

キーワード検索

数字・記号

^{13}C selective-HR-HMBC and SIMBA…… L3-3
^{13}C solid state NMR……P56
^{15}N-detection …… L2-2
^{1}H, ^{13}C NMR同定 …… P47
^{1}H-NMR …… P42
2:1型層状ケイ酸塩 ……P72
^{27}Al MAS NMR……P71
^{27}Al-^{29}Si CPMAS …… L1-6
^{27}Al-^{29}Si HETCOR …… L1-6
^{31}P solid-state NMR …… P51
^{31}P-^{31}P双極子相関 …… L1-5
^{31}P固体NMR…… L3-5
^{33}S-NMR ……P73
3D structure and dynamics …… L3-3
^{67}Zn NMR ……P74
^{67}Zn-NMR……P73
π共役系分子……P86

アルファベット

A

Acylcarnitine ……P50
Amino acid-selective isotope labeling …… L1-9
AML1 (RUNX1) ……P15
amyloid β(1-42) ……P38
amyloid fibrils ……P10
aptamer …… P15, P16

B

Bioreactor-system …… P2
BMRB ……P92
Bombyx mori Silk Fibroin ……P56
Broad Band Saturation ……P40
Broad Band-WET ……P40

C

Carbonization ……P68
cattle marbling……P85
CdSeクラスター……P70
Chabazite …… L1-6
chemical exchange …… P6
Chemical shift perturbation …… L1-3
cis-trans isomerization …… P14
cis-vacant ……P72
coarse grained model…… L2-1
collaborative study ……P90
conformational change ……L3-10

D

database ……P92
data process ……P90
Diels-Alder reaction ……P68
Diffusion Filter ……P11
DNA結合タンパク質 ……P29
DNP効率 ……P93
DOSY……P80
DQF-COSY ……P40
drug discovery…… L1-11
Dynamic Nuclear Polarization ……P93
dynamics …… P14
Dアミノ酸 …… L3-5

E

EDLC……P67
electron microscopy …… IL2

F

fMRI ……P77

G

G protein-coupled receptors(GPCRs) …… L2-4
GB1…… P4
Glucagon amyloid fibril …… P51
GPCR……P91
Gustatory compounds …… L3-7

H

H/D exchange …… P10
High-cell density fermentation …… L1-9
HIV-1 restriction factor …… L2-3
HIV-1 Vif interaction …… L2-3
HNCO …… P4
homonuclear correlation …… L2-7

I

*in-situ*光照射固体NMR ……P61
In-cell NMR…… L1-10, P1～P3
in-cell 固体NMR……P60
Intrinsically disordered protein …… L2-1

L

LCC …… L3-1
Lectin…… P9
LINE ……P22
lipid……P33
lncRNA ……P21
long non-coding RNA …… L3-9
Low magnetic field …… L2-6
low-gamma nuclei method development …… L2-4
LPS……P24

M

magnetic field …… L3-4
MAP Kinase…… IL3
MCR-NLR……P80
Membrane disruption……P51
Membrane proteins…… IL1
membrane-protein in micelle
and nanodisc…… L2-4
Metabolite analysis …… L3-7
Methyl Dynamics …… IL3

mitochondria ……P30
model-free解析 …… L1-2
modeling ……P92
MQMAS ……P72
MRI ……P78
multi-coil …… L3-4
multiple quantum coherence…… P6
multivariate analysis ……P34
MutL …… L1-3

N

natural evolution mimicry …… P9
NMR ……IL2, P76
NMRデータ処理 …… L1-10
non-bucketing metabonomics ……P33
non-detergent sulfobetaine …… P14

O

organosulfur compounds …… L2-6
origomer ……P25

P

pCold vector …… L1-9
PDSD ……P57
Peak separation in 2D NMR …… L1-6
PFG-NMR ……P49
polyamine modulon……P18
polysaccharide……P42
Protein …… L2-2, P14
protein-DNA interaction ……P11
PST-MAS NMR ……P69
PSYCHE ……P34

Q

qNMR ……P90
Quantification …… L3-7
quantitative ^{1}H NMR ……P50
quantum chemistry calculation ……P33

R

$R_{1\rho}$ dispersion法 ……P26
Paramagnetic lanthanide probe ……L3-10
Polymerization……P68
REDOR ……P55
Regenerative cell wall……P42
relaxation …… P6
Relaxation analysis …… L1-3
Relaxation Dispersion …… IL3
Rev ……P28
Ribosome Modulation Factor ……P18
RNA …… IL2, P16, P22, P23, P28, P30, P31
RNase……P31
RNAアプタマー ……P12
RRE ……P28
pseudocontact shift……L3-10

S

SAIL法 …… P7
secondary structure ……P30
segmental isotope labeling …… L2-1
SELEX …… P15, P16
sf9 …… P1
shimming …… L3-4
SHY ……P36
Sialo-glycan …… L3-3
sialic acid …… P9
single-sided magnet ……P85
solid-state NMR …… IL1, L2-7
solution NMR ……P38
spermidine ……P18
ssDNA cytosine deaminase …… L2-3
Structure …… IL1
structure determination…… P1
sugar mixture ……P34
Sulfur NMR …… L2-6
systematic protocol……P50

T

T2 relaxometry ……P85
T_2緩和分布 ……P66
Telomerase …… IL2
TIR domain ……P25
TLR signaling ……P25
TraB ……P29
TROSY …… L2-2

U

ubiquitin ……P10
ultrafast MAS …… L2-7

X

X線小角散乱……P27

Z

Zeolites …… L1-6

五十音順

あ行

アザフラーレン ……P48
アソシエーション分析 ……P81
圧縮センシング ……P59
アミノ酸選択的安定同位体標識法 …… L1-8
アミロイド ……P55
アミロイドβ……P13
安定同位体選択標識……P31

い行

イオン液体 ……P45
位置選択的合成 …… P47
イミダゾール ……P75
因子分析計算 …… L1-11

う行

ウェブ ……P89

え行
液晶性ポリマー …… P76
エトリンガイト …… P71
エマルション …… P49
お行
オシロスコープ …… P88
オリゴマー …… P41
オリゴマー形成 …… P27
か行
化学シフト異方性 …… P83
化学交換 …… P39
化学合成 …… P19
拡散係数 …… P45, P49, P87
核酸 …… L3-8, P19
活性炭 …… P67
可溶性ペンタセン …… L3-6
ガラス転移温度 …… P45
環境応答 …… P36
環境メタボロミクス …… P35
汗腺 …… P37
感度向上 …… L2-5
緩和解析 …… L1-2
緩和時間 …… P48, P87
き行
擬コンタクトシフト(PCS) …… L1-1
気体輸送特性 …… P76
逆転写酵素 …… P22
嗅覚 …… P77
極低温ヘリウムMAS …… L2-5
禁制コヒーレンス遷移 …… P5
け行
結晶多形 …… P52
血流 …… P79
こ行
高圧力NMR …… P32
高エネルギー構造 …… P32
抗菌ペプチド …… L3-5, P24, P39
高磁場 …… P78
高磁場マイクロイメージング …… L1-4
構造解析 …… P21, P32, P58
構造推定 …… P46
高速化 …… P80
酵素阻害活性 …… L1-11
酵素反応 …… P20
高分子複合体 …… P64
高分子量蛋白質複合体 …… P7
固体NMR …… L2-5, P53, P57, P58, P62～P64, P70
固体イメージング …… P78
固体電解質 …… L1-5
固体プロトン検出法 …… P44
ゴム …… P73
さ行
酸化亜鉛 …… P74
し行
システイン …… P70
磁場配向 …… P52
シミュレーション …… P93
主成分解析 …… P66
準静的引張試験 …… P69
常磁性NMR …… L1-1
常磁性効果 …… L3-2
常磁性シフト …… P8
食品 …… P89
人工塩基対 …… P23
心拍動 …… P79
す行
水素結合 …… P65
スーパーナイキスト …… P88
スケーリングファクター …… P44
スピントロニクス …… P86
スピンラベル …… P19, P23
スピン-格子緩和 …… P82
スピン-共振器結合 …… P82
スピン結合定数 …… P46
スペルミン …… P12
せ行
接合伝達 …… P29
摂動 …… P13
そ行
相互作用解析 …… P39
た行
代謝プロファイリング …… P43
大腸菌蛋白質発現系 …… P7
ダイナミクス …… L1-5
多付加型フラーレン誘導体 …… P47
多量子カウンティング …… P83
単結晶法 …… P52
蛋白質の科学修飾 …… L1-1
蛋白質立体構造計算 …… L1-10
ち行
地域性 …… P35
て行
データベース …… P89
データ駆動型アプローチ …… P43
低分子化合物 …… P5
定量 …… P71
定量NMR …… P60
定量固体NMR …… P67
デジタルMRI …… P88
鉄 …… L1-4
転移交差飽和法 …… P91

電気穿孔法 …… P4
電場勾配 …… P74
と行
同位体効果 …… P17
糖鎖 …… L3-2
動的核偏極 …… L3-6
動的構造解析 …… P5
に行
二酸化炭素 …… P62
ニトリラーゼ …… P27
二枚貝 …… P79
認識部位 …… P20
ね行
ネットワーク解析 …… P36
の行
脳活性化 …… P77
は行
ハイドロゲル …… P63
バクテリオロドプシン …… P53, P54
パルスNMR …… P87
ひ行
光励起三重項電子スピン …… L3-6
光照射固体NMR …… P54
非侵襲的サンプリング …… P37
非侵襲的試料 …… P81
非線形解析 …… P81
非線形サンプリング …… P59
ヒトカルシトニン …… P55
ヒト脳組織 …… L1-4
ふ行
不均一サンプリング …… P43
符号化標識法 …… L1-8
フラーレン …… P48
プロトン伝導 …… P65, P75
プロリン異性化酵素 …… P17
分子運動 …… P86
分子混雑環境 …… L1-2
分子シミュレーション …… L3-2
分子数定量 …… P60
へ行
平均ハミルトニアン法 …… P83
ヘム-DNA複合体 …… P8
ペルオキシダーゼ活性 …… P8
ほ行
ポリ(アリルアミン) …… P62～P64
ポリアミン …… P12
ポリブチレンサクシネート …… P41
ポリマーブレンド …… P69
ま行
マイクロ波加熱 …… P84
マイクロ波照射NMR …… P84
膜タンパク質 …… P53, P54, P57, P59, P61
膜蛋白質 …… P58, P91
む行
無機固体酸塩 …… P65
め行
メタボノミクス …… P37
メタロ塩基対 …… L3-8
メチル化 …… P13
も行
木質バイオマス …… L3-1
モデル構築 …… P35
ゆ行
有機溶媒 …… P84
ユビキチン …… P26
ら行
ラプラス逆変換法 …… P66
り行
リアルタイムNMR法 …… P20
リグニン …… L3-1
立体構造 …… L3-8
量子化学計算 …… P44, P46
れ行
レチナール …… P61
レプリカ交換モンテカルロ法 …… L1-8

著者検索

アルファベット

A

Aizawa Tomoyasu …… P24, P58, P59
Akagi Ken-ichi …… P13
Altannavch Nyamsambuu …… L3-5
Amano Ryo …… P12, P15, P16, P28
Aoki Akihiro …… P56
Aoki Daisuke …… L2-1
Aoki Kazuteru …… P16
Arai Hajime …… L1-5
Arai Souichiro …… P4
Arthanari Haribabu …… L2-2
Asakawa Naoki …… P86
Asakura taiga …… P36
Asakura Taiga …… P43
Asakura Tetsuo …… HL2, P56
Asano Atsushi …… P66
Ashihara Yuta …… P31
Awazu Akinori …… L2-1

B

Baxter Nicola J …… P32

C

Carninci Piero …… L3-9
Chen Kuan-Ming …… L2-3
Chikayama Eisuke …… P89
Christian Roumestand …… P32

D

Dairaku Takenori …… L3-8
Date Yasuhiro …… P33, P35～P37, P43, P46, P81
Deguchi Kenzo …… P52, P74
Demura Makoto …… P24, P58, P59

E

Egawa Ayako …… P58～P60
Enokizono Yoshiaki …… P25

F

Feig Michael …… L1-2
Feigon Juli …… IL2
Fujimine Yoshinori …… P50
Fujinami Daisuke …… P39
Fujisawa Tetsuro …… P27
Fujita Shunsuke …… P23
Fujito Teruaki …… P52, P84
Fujiwara Toshimichi …… L1-1, L1-9, L2-5, P31, P58～P60, P92, P93
Fukazawa Jun …… P93
Fukuchi Minoru …… P43
Fukuda Kunito …… P86
Fukui Kenji …… L1-3
Fukui Shigeo …… L2-5
Fukuzaki Minoru …… P49
Funatsu Hirotsugu …… P77
Furihata Kazuo …… P40
Furuita Kyoko …… L3-8, P31
Furukawa Koji …… L1-11
Furukawa Tosihiro …… P80

G

Ganchimeg Lkhamsuren …… P55
Garwood Michael …… L1-4
Goda Natsuko …… P38
Gong Bo …… L2-7
Goto Yuji …… L1-3
Griffin R. G. …… HL1
Guentert Peter …… L1-10, P1

H

Hagn Franz …… L2-4
Haimei Wang …… P14
Hamada Michiaki …… P31
Hamatsu Jumpei …… P1
Hanzawa Hiroyuki …… P5
Hara Hideyuki …… P87
Harjes Elena …… L2-3
Hashikawa Yoshifumi …… P48
Hatano Akihiko …… P19
Hattori Yoshikazu …… L1-1
Haya Kazumi …… P51
Hayakawa Mika …… P79
Hayakawa Yoshio …… P69
Hayashi Shigenobu …… L1-6, P65
Hemmi Hikaru …… P9
Hidaka Tetsuro …… P61
Hirabayashi Jun …… P9
Hirakane Makoto …… P77
Hirao Ichiro …… P23
Hirao Yuuka …… P11
Hiroaki Hidekazu …… P38, P92
Horiuchi Masataka …… P25
Hoshi Minako …… P38
Hosoda Kazuo …… P14
Hosoya Saori …… L1-10

I

Ida Tomonori …… P75
Idehara Toshitaka …… L2-5
Ideta Keiko …… P67
Igarashi Kazuei …… P18
Ihara Toshihide …… P50, P90
Iino Masaaki …… P42
Ikebata Yusuke …… P31
Ikeda Shiro …… L1-10
Ikeya Teppei …… L1-10, P1, P2, P4
Inagaki Fuyuhiko …… L3-10, P25

Inagaki Satoshi ····· P68
Inomata Kohsuke ····· P4
Inoue Jin ····· P4
Ishigami Ryota ····· P76
Ishiguro Ryo ····· P27
Ishii Takeshi ····· P14
Ishikawa Maho ····· P2
Ishimori Koichiro ····· L3-10
Isobe Kotaro ····· P56
Ito Kengo ····· P46
Ito Masahiro ····· L1-2
Ito Yutaka ····· L1-10, P1, P2, P4, P21, P29
Itoh-Watanabe Hikari ····· P55
Iwamoto Shigeto ····· P77
Iwasaki Ayano ····· P75
Iwata Takeshi ····· P92
Iwaya Naoko ····· P38
Izumi Kenya ····· P80

J

Javkhlantugs Namsrai ····· L3-5, P55
Jean-Paul Amoureux ····· L1-7
Jimura Keiko ····· P65

K

Kagawa Akinori ····· L3-6
Kainosho Masatsune ····· L2-4, P7
Kajikawa Masaki ····· P22
Kakishita Takafumi ····· P62
Kaku Megumi ····· P83
Kamatari Yuji ····· P27
Kamba Keisuke ····· P20
Kameda Tomoshi ····· L1-1, P31
Kametani Shunsuke ····· P56
Kameyama Keiichi ····· P27
Kameyama Mayumi ····· P89
Kamiya Akihiro ····· L3-1
Kamiya Masakatsu ····· P24, P58, P59
Kamiya Narutoshi ····· L1-3
Kamo Naoki ····· P57, P61
Kamoshida Hajime ····· P2, P4
Kanaba Teppei ····· P29
Kaneda Shiho ····· L3-5
Kanehashi Koji ····· P71, P72
Kanno Yuichi ····· P19
Kano Hirotaka ····· P25
Kasai Takuma ····· L1-8
Kashiwagi Keiko ····· P18
Katahira Masato ····· L3-1, P15, P20
Kataoka Masakazu ····· P29
Kato Koichi ····· L1-1, P32
Kato Masaki ····· L3-3
Kawaguchi Takeshi ····· P63
Kawaguchi Tsubasa ····· P49
Kawahara Ikumi ····· P31
Kawai Gota ····· P12, P18, P19, P22, P23, P30
Kawamura Izuru ····· L3-5, P51, P53～P55, P57, P61, P68, P84
Kawasaki Ryosuke ····· P17
Kigawa Takanori ····· L1-2, L1-8
Kikuchi Akie ····· P51
Kikuchi Jun ····· P33～P37, P43, P44, P46, P81, P89
Kikukawa Takashi ····· P24, P58, P59
Kil Hyun-Sig ····· P67
Kim DooWon ····· P67
Kim Ju-Yaen ····· L1-3
Kimoto Michiko ····· P23
Kimura Fumiko ····· P52
Kimura Hideaki ····· P73
Kimura Tsunehisa ····· P52
Kinoshita Masashi ····· P8
Kita Rio ····· P49
Kitagawa Masahiro ····· L3-6
Kitahara Ryo ····· P32
Kitahashi Yuki ····· L3-5
Kitazawa Soichiro ····· P32
Kiyosawa Hidenori ····· P30
Kiyozumi Yoshimichi ····· L1-6
Kobayashi Ayaho ····· P21
Kobayashi Naohiro ····· P92
Kodani Yoshinori ····· L3-7
Kofuku Yutaka ····· P91
Kohda Daisuke ····· P39
Kohno Kenji ····· P31
Kohno Toshiyuki ····· P14
Koichi Kato ····· L3-2
Kojima Chojiro ····· L1-1, L1-9, L3-8, P31, P92
Komatsu Keiko ····· P89
Komatsu Takanori ····· P33, P34, P44, P46
Kondo Keita ····· P91
Korn David H. ····· L2-7
Kose Katsumi ····· L3-4, P78, P88
Kouno Takahide ····· L2-3
Kozu Tomoko ····· P15, P16
Kubota Yoshihiro ····· P68
Kumaki Yasuhiro ····· P24
Kumeta Hiroyuki ····· P25
Kuno Atsushi ····· P9
Kurihara Takuya ····· P70
Kurita Jun-ichi ····· P11
Kusumi Ryosuke ····· P52
Kuwahara Daisuke ····· P45

L
Ladizhansky Vladimir ····· IL1
Lee Young-Ho ····· L1-3
M
Maeda Shiro ····· P62～P64
Maesaki Ryoko ····· P29
Mahin Abdullah Al ····· P39
Makino Yoshiteru ····· P53, P61
Malon Michal ····· L2-7
Masu Hyuma ····· L3-3
Matsubara Koshi ····· P41
Matsufuji Senya ····· P12
Matsuki Yoh ····· L2-5, P93
Matsumoto Masahiko ····· P91
Matsuo Hiroshi ····· L2-3
Matsuzaki Mizuki ····· P38
McNernv Erin ····· L2-7
Minou Kimiko ····· P41
Misawa Takuma ····· P33, P37, P81
Mishima Masaki ····· L1-10, P1, P2, P4, P21, P29
Mishima Yuichi ····· L1-3
Mitsui Akio ····· L1-5
Mitsumori Fumiyuki ····· L1-4
Miyajima Hiroaki ····· L1-4
Miyakawa Shin ····· P16
Miyakawa Takuya ····· L3-7
Miyanoiri Yohei ····· P7
Miyasa Ryota ····· P53
Miyawaki Jin ····· P67
Miyazawa Norihiro ····· P82
Mizuno Motohiro ····· P74, P75
Mizushima Ryota ····· L1-3
Mochida Tomoyuki ····· P45
Monobe Yoko ····· P13
Morimoto Daichi ····· P3, P10, P26
Moriyama Hiroshi ····· P47
Morozumi Yusaku ····· P64
Morris Michale D. ····· L2-7
Motono Chie ····· P92
Mroue Kamal H. ····· L2-7
Murakami Masataka ····· P79
Murakami Miwa ····· L1-5
Murata Michihisa ····· P48
Murata Yasujiro ····· P48
N
Nagai Kan ····· P21
Nagao Junichi ····· P39
Nagata Kazuma ····· L3-1
Nagata Kenji ····· L1-8
Nagata Takashi ····· L3-1, P15, P20
Naito Akira ····· L3-5, P51, P53～P55, P57, P61, P84
Nakabayashi Koji ····· P67
Nakamura Shinji ····· L2-5
Nakamura Yoshikazu ····· P15, P16
Nakao Taichi ····· P68
Nakao Tomoki ····· P80
Nakashima Yoshito ····· P85
Nakayama Daisuke ····· P3
Namatame Ichiji ····· L1-11
Narita Akihiro ····· P38
Narita Takamitsu ····· P75
Negoro Makoto ····· L3-6
Niimi Tatsuya ····· L1-11
Nishida Masahiro ····· P69
Nishida Masakazu ····· P69
Nishikawa Ryota ····· P57
Nishimura Hiroshi ····· L3-1
Nishimura Yoshifumi ····· P11
Nishizawa Mayu ····· P3, P26
Nishizawa Ryo ····· P10
Noda Yasuto ····· P70, P83
Nonaka Hiroshi ····· L3-6
O
Obuchi Yuka ····· P44
Ogumi Zempachi ····· L1-5
Ogura Kenji ····· L3-10, P25
Ogura Takashi ····· P69
Oguro Akihiro ····· P12
Ohara Koji ····· L1-5
Ohashi Yoshie ····· P79
Ohashi Ryutaro ····· P74, P75
Ohki Shinobu ····· P52, P74
Ohkubo Takahiro ····· P66
Ohyama Takako ····· L3-9, P23
Okada Masato ····· L1-8
Okamura Hideyasu ····· L1-2
Okitsu Takashi ····· P53, P54, P57, P61
Okude Junya ····· P91
Okui Saya ····· P30
Okumura Manabu ····· P52
Okushita Keiko ····· P66
Onodera Yohei ····· L1-5
Osawa Masanori ····· P6
Oshima Takahiro ····· P35
Oshima Kyosuke ····· P54
Otani Yuto ····· P53
Otsu Maina ····· P12, P19, P22
Oyama Kyouhei ····· P27
P
Pandey Manoj Kumar ····· L2-7

Pardi Arthur ····· IL3
Phan Hong Anh ····· L3-7
Plückthun Andreas ····· L2-4

R

Ramamoorthy Ayyalusamy ····· L2-7

S

Sahara Junpei ····· P18
Saito Naoki ····· P50, P90
Saito Takeshi ····· P50, P90
Saito Yuta ····· P58, P59
Sakamoto Taiichi ····· P12, P15, P16, P28
Sakao Makiko ····· L1-4
Sakashita Hitoshi ····· L1-11
Sakata Kenji ····· P36, P43, P89
Sakuma Chiseko ····· P40
Sando Shinsuke ····· L3-6
Satio Tomohide ····· L3-10
Sato Wataru ····· P74
Sato Yuya ····· P56
Schiffer Celia A. ····· L2-3
Sekiya Daisuke ····· P42
Sekiyama Yasuyo ····· P89
Seo Eriko ····· P79
Seo Yoshiteru ····· P79
Setoi Ayana ····· P78
Seya Tsukasa ····· P25
Seyama Haruhiko ····· L1-4
Shandilya Shivender M.D ····· L2-3
Shibata Tomokazu ····· P8
Shigematsu Megumi ····· L2-3
Shigemitsu Yoshiki ····· P38
Shigeta Arisu ····· P53, P54
Shimada Ichio ····· L2-2, P5, P6, P91
Shimazaki Manato ····· L1-10
Shimizu Haruna ····· P8
Shimizu Tadashi ····· P52, P74
Shimoda Keiji ····· L1-5
Shinyashiki Naoki ····· P49
Shiokawa Yuka ····· P81
Shiotani Shinya ····· L1-5
Shiraishi Yutaro ····· P91
Shirakawa Masahiro ····· P3, P10, P26
Sirigiri Jagadishwar ····· L2-5
Smith Colin ····· P28
Solomon William ····· L2-3
Someya Tatsuhiko ····· P23
Sonomoto Kenji ····· P39
Sudo Yuki ····· P57, P61
Suematsu Hiroto ····· L2-5
Suetake Isao ····· L1-3
Sugase Kenji ····· P3, P10, P26
Sugiki Toshihiko ····· L1-9, P31
Sugita Yuji ····· L1-2
Sugiyama Syusei ····· L1-2
Sun Pingchuan ····· L2-7
Suzuki Akiko ····· P50
Suzuki Ei-ichiro ····· L3-7

T

Tadashi Satoh ····· L3-2
Tajima Shoji ····· L1-3
Takada Kenta ····· P15, P16, P28
Takahashi Haruka ····· P47
Takahashi Hazuki ····· L3-9
Takahashi Takafumi ····· P72
Takahashi Toshikazu ····· L1-6
Takai Tomoyo ····· L1-3, P13
Takano Yu ····· L1-3
Takeda Kazuyuki ····· P82
Takeda Mitsuhiro ····· P7
Takeda Yumi ····· P28
Takegoshi Kiyonori ····· P70, P82, P83
Takeuchi Kikuko ····· P13
Takeuchi Koh ····· L2-2, P5
Takeuchi Masao ····· P13
Takishita Shunpei ····· L3-10
Takizawa Takeshi ····· P5
Takumi Yamaguchi ····· L3-2
Tamaki Hajime ····· P58, P59
Tamari Yu ····· P17
Tanabe Eiki ····· L1-11
Tanaka Hiroaki ····· L1-3
Tanaka Takashi ····· P1, P2
Tanaka Tomoko ····· P69
Tanaka Yoichiro ····· P15
Tanaka Yoshiyuki ····· L3-8, P31
Tanaka Yuho ····· P80
Tani Osamu ····· L1-11
Tanokura Masaru ····· L3-7
Tansho Masataka ····· P74
Tasei Yugo ····· P84
Tashiro Mitsuru ····· P40
Tate Shin-ichi ····· L2-1, P17
Tateishi Kenichiro ····· L3-6
Tateishi Yukihiro ····· L1-11
Tei ChiKai ····· P45
Tenno Takeshi ····· P38
Terada Yasuhiko ····· L3-4, P88
Terasawa Hiroaki ····· P77
Terauchi Tsutomu ····· P7
Terawaki Shin-ichi ····· P14
Terui Yusuke ····· P18
Tochio Naoya ····· L1-2, L2-1, P17

Tokunaga Yuji …… P5
Tomomi Hnashima …… L1-10
Tomonaga Yuya …… P61
Tong Zhu …… L3-2
Toyama Yuki …… P6
Toyoda shuhei …… P55
Tsuboi Yuuri …… P35, P89
Tsuda Makoto …… P88
Tsunomura Masaki …… P66
Tsutsui Satoshi …… P37
Tuzi Satoru …… P53, P54

U

Uchida Keiko …… P13
Uchikanezaki Taiki …… P42
Uchimoto Yoshiharu …… L1-5
Uchiyama Kouya …… P47
Ueda Kazuyoshi …… L3-5, P55
Ueda Takumi …… P91
Ueno Hirotaka …… P29
Uesaka Tomohiro …… L3-6
Uewaki Jun-ichi …… L2-1
Ukawa Jinta …… P73
Ushida Chisato …… P30
Utumi Hiroaki …… P80
Uzawa Jun …… L3-3

W

Wada Akimori …… P53, P54, P57, P61
Wada Satoshi …… L3-6
Wagner Gerhard …… L2-2, L2-4
Wakamatsu Kaori …… P14
Wakamatsu Ryota …… P24
Wakamiya Atsushi …… P48
Wakamoto Takuro …… P32
Walinda Erik …… P26
Watanabe Keita …… P47
Watanabe Satoru …… L1-2
Watanabe Takashi …… L3-1
Wei Feifei …… P36
Williamson Mike …… P32

Y

Yagihara Shin …… P49
Yagi-Utsumi Maho …… P32
Yamada Kazuhiko …… L2-6
Yamada Kazuya …… P60
Yamada Ryota …… L3-4
Yamaguchi Takumi …… L1-1
Yamaguchi Yoshiki …… L3-3
Yamamoto Yasuhiko …… P8
Yamasaki Kazuhiko …… L1-11
Yamashina Ryo …… P89
Yamazaki Taichi …… P50, P90
Yamazaki Toshio …… L3-9
Yanagida Asumi …… P12
Yasuda Hiroyuki …… L1-6
Ying Zhang …… L1-1
Yokochi Masashi …… P92
Yokogawa Mariko …… P6
Yoon Seong-Ho …… P67
Yoshida Toyokazu …… P27
Yoshimizu Hiroaki …… P76
Yoshinaga Sosuke …… P77
Yoshiura Chie …… P91
Yoza Kenji …… P47
Yu Isseki …… L1-2
Yusuke Nishiyama …… L2-7
Yuya Katahira …… P8

Z

Zhang Rongchun …… L2-7
Ziarek Joshua …… L2-4

五十音順

あ

相沢　智康 …… P24, P58, P59
アイヤルサミー　ラマムーシー …… L2-7
青木　昭宏 …… P56
青木　一晃 …… P16
青木　大将 …… L2-1
赤木　謙一 …… P13
浅川　直紀 …… P86
朝倉　大河 …… P36, P43
朝倉　哲郎 …… HL2, P56
浅野　敦志 …… P66
芦原　悠太 …… P31
アブドゥル・アル　マヒン …… P39
天野　亮 …… P12, P15, P16, P28
新井　崇一郎 …… P4
荒井　創 …… L1-5
アルセナリ　ハリバブ …… L2-2
粟津　暁紀 …… L2-1

い

飯野　正昭 …… P42
五十嵐　一衛 …… P18
池田　思朗 …… L1-10
池端　悠介 …… P31
池谷　鉄兵 …… L1-10, P1, P2, P4
石井　毅 …… P14
石神　稜大 …… P76
石川　真帆 …… P2
石黒　亮 …… P27
石森　浩一郎 …… L3-10
泉　顕也 …… P80
磯部　洸太郎 …… P56
井田　朋智 …… P75

出田　圭子……P67
出原　敏孝…… L2-5
伊藤　研悟 ……P46
伊東　優拡…… L1-2
伊藤　隆…… L1-10, P1, P2, P4, P21, P29
稲垣　怜史……P68
稲垣　冬彦……L3-10, P25
井上　仁…… P4
猪股　晃介 …… P4
井原　俊英…… P50, P90
岩崎　彩乃……P75
岩田　武史……P92
岩本　成人……P77
岩谷　奈央子 ……P38
イン　チャン …… L1-1

う

ウィリアム　ソロモン …… L2-3
ウィリアムソン　マイク ……P32
魏　菲菲 ……P36
上坂　友洋…… L3-6
上田　一義…… L3-5, P55
上田　卓見……P91
上埜　大空 ……P29
上脇　隼一…… L2-1
宇川　仁太……P73
鵜澤　洵 …… L3-3
牛田　千里……P30
内金崎　大己……P42
内田　敬子……P13
内本　喜晴…… L1-5
内山　幸也…… P47
内海　博明……P80

え

江川　文子……P58～P60
榎園　能章……P25
エリック　ワリンダ……P26
エリン　マクネルン…… L2-7
エレーナ　ハージェス …… L2-3

お

大木　忍 …… P52, P74
大窪　貴洋……P66
大澤　匡範…… P6
大島　恭介 ……P54
大島　嵩裕……P35
大谷　優人……P53
大津　舞菜…… P12, P19, P22
大橋　好偉 ……P79
大橋　竜太郎 …… P74, P75
大山　恭平……P27
大山　貴子…… L3-9, P23
岡田　真人…… L1-8
岡村　英保…… L1-2
沖津　貴志…… P53, P54, P57, P61
奥居　沙弥 ……P30
奥下　慶子……P66
奥出　順也……P91
小久見　善八…… L1-5
奥村　学 ……P52
小椋　賢治……L3-10, P25
小倉　崇……P69
小黒　明広……P12
小野寺　陽平 …… L1-5
尾原　幸治…… L1-5
尾渕　由佳……P44

か

ガーウッド　マイケル …… L1-4
甲斐荘　正恒…… L2-4, P7
香川　晃徳…… L3-6
柿下　拓史……P62
賀來　萌……P83
葛西　卓磨…… L1-8
梶川　正樹……P22
柏木　敬子……P18
片岡　正和……P29
片平　正人…… L3-1, P15, P20
片平　祐弥…… P8
加藤　晃一…… L1-1, L3-2, P32
加藤　雅樹 …… L3-3
金場　哲平……P29
金田　志穂 …… L3-5
金橋　康二…… P71, P72
狩野　裕孝……P25
鎌足　雄司……P27
カマル　ロー …… L2-7
神谷　明宏…… L3-1
神谷　成敏…… L1-3
神谷　昌克…… P24, P58, P59
亀田　倫史…… L1-1, P31
亀谷　俊輔……P56
亀山　啓一……P27
亀山　真由美……P89
加茂　直樹……P57, P61
鴨志田　一…… P2, P4
カルニンチ　ピエロ …… L3-9
河合　剛太…… P12, P18, P19, P22, P23, P30
川口　健……P63
川口　翼……P49
川嵜　亮祐……P17
河原　郁美……P31
川村　出……L3-5, P51, P53～P55, P57, P61, P68, P84
菅野　優一……P19

神庭　圭佑……P20
カンミン　チェン …… L2-3
き
木川　隆則……L1-2, L1-8
菊川　峰志…… P24, P58, P59
菊池　章江……P51
菊地　淳…… P33～37, P43, P44, P46, P81, P89
喜多　理王 ……P49
北川　勝浩…… L3-6
北沢　創一郎……P32
北橋　由貴…… L3-5
北原　亮 ……P32
木下　真志…… P8
金　宙妍 …… L1-3
金　斗元……P67
木村　恒久 ……P52
木村　英昭 ……P73
木村　史子 ……P52
木本　路子 ……P23
ギュンター　ペーター…… L1-10, P-1
清澤　秀孔 ……P30
清住　嘉道…… L1-6
吉　鉉植 ……P67
く
久住　亮介……P52
久野　敦 …… P9
窪田　好浩……P68
熊木　康裕……P24
久米田　博之……P25
栗田　順一……P11
栗原　拓也……P70
桑原　大介……P45
こ
神田　大輔……P39
合田　名都子……P38
神津　知子…… P15, P16
河野　憲二……P31
コウノ　タカヒデ …… L2-3
河野　俊之 ……P14
幸福　裕 ……P91
児嶋　長次郎 ……L1-1, L1-9, L3-8, P31, P92
巨瀬　勝美 ……L3-4, P78, P88
小谷　良徳…… L3-7
後藤　祐児…… L1-3
小林　彩保……P21
小林　直宏……P92
小松　桂子 ……P89
小松　功典 …… P33, P34, P44, P46
近藤　啓太……P91
さ
斉尾　智英…… L3-10
齋藤　剛…… P50, P90
斎藤　直樹…… P50, P90
斉藤　優太…… P58, P59
坂尾　万幾子 …… L1-4
阪下　日登志…… L1-11
坂田　研二…… P36, P43, P89
坂本　泰一 …… P12, P15, P16, P28
佐久間　千勢子 ……P40
佐藤　匡史…… L3-2
佐藤　佑哉……P56
佐藤　渉 ……P74
佐原　潤平 ……P18
山東　信介…… L3-6
し
ジアレック　ジョシュア …… L2-4
塩川　由佳 ……P81
塩谷　真也…… L1-5
重田　安里寿…… P53, P54
シゲマツ　メグミ …… L2-3
重光　佳基 ……P38
柴田　友和…… P8
シベンダー　シャンデリア …… L2-3
嶋崎　真那人…… L1-10
嶋田　一夫……L2-2, P5, P6, P91
清水　禎…… P52, P74
清水　春那…… P8
治村　圭子……P65
下田　景士…… L1-5
ジャブクフランタグス　ナムズライ …… L3-5
シュ　トン …… L3-2
白石　勇太郎……P91
白川　昌宏…… P3, P10, P26
シリア　シファー …… L2-3
シリギリ　ジャガディシュワー …… L2-5
新屋敷　直木……P49
す
末武　勲…… L1-3
末松　浩人…… L2-5
菅瀬　謙治…… P3, P10, P26
杉木　俊彦…… L1-9, P31
杉田　有治…… L1-2
杉山　修世…… L1-2
鈴木　彰子……P50
鈴木　榮一郎…… L3-7
須藤　雄気 ……P57, P61
スミス　コリン ……P28
せ
瀬尾　絵理子 ……P79
瀬尾　芳輝 ……P79
関屋　大輔……P42
関山　恭代……P89

瀬戸井　綾菜……P78
瀬谷　司……P25
瀬山　春彦…… L1-4
そ
園元　謙二……P39
染谷　龍彦 ……P23
た
大樂　武範 …… L3-8
高井　朋代…… L1-3, P13
高田　健多…… P15, P16, P28
鷹野　優…… L1-3
高橋　貴文……P72
髙橋　利和 …… L1-6
高橋　葉月…… L3-9
高橋　晴夏……P47
滝沢　剛 …… P5
瀧下　俊平…… L3-10
竹内　喜久子……P13
竹内　恒……L2-2, P5
竹内　昌男……P14
竹腰　清乃理…… P70, P82, P83
武田　和行……P82
武田　光広…… P7
武田　有未……P28
田嶋　正二…… L1-3
田代　充……P40
田制　侑悟……P84
楯　真一…… L2-1, P17
伊達　康博…… P33, P35～37, P43, P46, P81
立石　健一郎…… L3-6
立石　幸寛 …… L1-11
田中　孝…… P1, P2
田中　智子……P69
田中　宏明…… L1-3
田中　勇帆……P80
田中　陽一郎……P15
田中　好幸…… L3-8, P31
田辺　英紀 …… L1-11
谷　修…… L1-11
田之倉　優…… L3-7
田巻　初…… P58, P59
玉利　佑……P17
丹所　正孝……P74
ち
近山　英輔……P89
つ
辻　暁…… P53, P54
津田　真人……P88
筒井　聡志……P37
角村　将希……P66
坪井　裕理 …… P35, P89
て
鄭　智海……P45
デイビッド　コーン …… L2-7
出口　健三…… P52, P74
出村　誠…… P24, P58, P59
寺内　勉…… P7
寺沢　宏明……P77
寺田　康彦…… L3-4, P88
寺脇　慎一……P13
照井　祐介 ……P18
天野　剛志 ……P38
と
徳永　裕二…… P5
栃尾　尚哉……L1-2, L2-1, P17
友永　雄也 ……P61
外山　侑樹 …… P6
豊田　修平……P55
な
内藤　晶…… L3-5, P51, P53～55, P57, P61, P84
永井　敢……P21
永尾　潤一……P39
中尾　太一……P68
中尾　朋喜……P80
中島　善人……P85
永田　一真…… L3-1
永田　賢二…… L1-8
永田　崇…… L3-1, P15, P20
中林　康治……P67
中村　新治…… L2-5
中村　義一…… P15, P16
中山　大輔…… P3
生田目　一寿…… L1-11
ナムスライ　ジャブカランタグス……P55
成田　哲博……P38
成田　貴光……P75
に
新美　達也…… L1-11
西川　亮汰……P57
西澤　茉由…… P3, P26
西澤　亮……P10
西田　雅一……P69
西田　政弘……P69
西村　裕志…… L3-1
西村　善文……P11
西山　裕介…… L2-7
ニャムサムブ　アルタナブ …… L3-5
ね
根来　誠 …… L3-6
の
野田　泰斗…… P70, P83
野中　洋…… L3-6

は
ハーグン　フランツ …… L2-4
バクスター　ニコラ …… P32
橋川　祥史 …… P48
幡野　明彦 …… P19
服部　良一 …… L1-1
花島　知美 …… L1-10
浜田　道昭 …… P31
濱津　順平 …… P1
羽矢　和未 …… P51
早川　実佳 …… P79
早川　由夫 …… P69
林　繁信 …… L1-6, P65
原　英之 …… P87
半沢　宏之 …… P5
ひ
日高　徹朗 …… P61
平尾　一郎 …… P23
平尾　優佳 …… P11
平金　真 …… P77
平林　淳 …… P9
廣明　秀一 …… P38, P92
ピンチュン　サン …… L2-7
ふ
ファン　ホンアイン …… L3-7
フェイグ　マイケル …… L1-2
深澤　隼 …… P93
福井　健二 …… L1-3
福居　滋夫 …… L2-5
福﨑　稔 …… P49
福田　國統 …… P86
福地　実 …… P43
藤澤　哲郎 …… P27
藤田　舜介 …… P23
藤戸　輝昭 …… P52, P84
藤浪　大輔 …… P39
藤峰　慶徳 …… P50
藤原　敏道 …… L1-1, L1-9, L2-5, P31, P58～60, P92, P93
舩津　大嗣 …… P77
降旗　一夫 …… P40
プリュクトゥン　アンドレアス …… L2-4
古板　恭子 …… L3-8, P31
古川　功治 …… L1-11
古川　利博 …… P80
へ
逸見　光 …… P9
ほ
ボー　ゴン …… L2-7
星　美奈子 …… P38
細田　和男 …… P14
細谷　沙織 …… L1-10
堀内　正隆 …… P25
ま
前崎　綾子 …… P29
前田　史郎 …… P62～64
槙野　義輝 …… P53, P61
桝　飛雄真 …… L3-3
松尾　浩 …… L2-3
松木　陽 …… L2-5, P93
松崎　瑞季 …… P38
松原　康史 …… P41
松藤　千弥 …… P12
松本　昌彦 …… P91
マノジ　クマール　パンディ …… L2-7
み
ミカル　モーリス …… L2-7
三澤　拓真 …… P33, P37, P81
三島　正規 …… L1-10, P1, P2, P4, P21, P29
三島　優一 …… L1-3
水島　良太 …… L1-3
水野　元博 …… P74, P75
三井　昭男 …… L1-5
三森　文行 …… L1-4
美濃　公子 …… P41
ミハル　マロニュ …… L2-7
宮川　伸 …… P16
宮川　拓也 …… L3-7
宮佐　亮太 …… P53
宮澤　典裕 …… P82
宮嶋　裕明 …… L1-4
宮ノ入　洋平 …… P7
宮脇　仁 …… P67
む
村上　美和 …… L1-5
村上　政隆 …… P79
村田　理尚 …… P48
村田　靖次郎 …… P48
も
持田　智行 …… P45
本野　千恵 …… P92
物部　容子 …… P13
森本　大智 …… P3, P10, P26
森山　広思 …… P47
両角　悠作 …… P64
や
矢木-内海　真穂 …… P32
八木原　晋 …… P49
安田　弘之 …… L1-6
柳田　明日美 …… P12
山口　拓実 …… L1-1, L3-2
山口　芳樹 …… L3-3

山崎　和彦…… L1-11
山﨑　太一…… P50, P90
山崎　俊夫…… L3-9
山科　椋……P89
山田　和彦…… L2-6
山田　和哉……P60
山田　諒太…… L3-4
山本　泰彦…… P8
ゆ
優　乙石 …… L1-2
尹　聖昊 ……P67
よ
横川　真梨子…… P6
横地　政史……P92
与座　健治 ……P47
吉浦　知絵 ……P91
吉田　豊和……P27
吉永　壮佐……P77
吉水　広明……P76
り
李　映昊…… L1-3
る
ルーメスタンド　クリスチャン……P32
ルクハムスレン　ガンチメグ ……P55
ろ
ロンチュン　チャン …… L2-7
わ
若松　馨……P14
若松　瞭太……P24
若宮　淳志 ……P48
若本　拓朗……P32
ワグナー　ゲルハルト ……L2-2, L2-4
和田　昭盛…… P53, P54, P57, P61
和田　智之…… L3-6
渡邉　敬太 ……P47
渡部　暁…… L1-2
渡辺　隆司…… L3-1
渡邉(伊藤)　ひかり……P55
王　海梅 ……P14

（無断で複製・転載を禁じます）
Copyright© 2015 The Nuclear Magnetic Resonance Society of Japan

2015年11月6日発行
Published on November 6, 2015

第54回NMR討論会（2015）

会　期：2015年11月6日（金），7日（土），8日（日）
November 6(Fri)-8(Sun), 2015
会　場：千葉工業大学　津田沼キャンパス
Chiba Institute of Technology Tsudanuma Campus
〒275-0016　千葉県習志野市津田沼2-17-1
TEL：047-475-2111

編集・発行：54th 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：nmr54@kuba.jp

協賛企業（五十音順）

Wavefunction, Inc.

株式会社エコソフト

SIサイエンス株式会社

NMR共用プラットフォーム

株式会社エム アール テクノロジー

株式会社エルエイシステムズ

株式会社JEOL RESONANCE

株式会社シゲミ

セティ株式会社

大陽日酸株式会社

株式会社東京インスツルメンツ

日本カンタム・デザイン株式会社

日本テクノサービス株式会社

ブルカー・バイオスピン株式会社



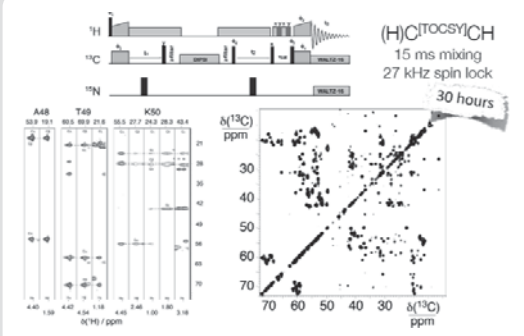
111 kHz MAS Probe

Gain new insights from your NMR analysis

Brukerの111 kHz 超高速MASプローブは、通常では測定困難な固体生体試料の構造やダイナミックスの研究に必要な測定を実現する画期的なプローブです。
0.5µlという極微量のサンプル量と超高感度により、サンプル量や回転速度に制限されることなく、研究対象となる試料で固体NMRの測定が可能になります。
また、新たに開発されたマジック角回転制御システムMASIIIは超低速から超高速回転の幅広い回転条件下においてでも安定に回転を制御し、111 kHz 超高速MASプローブの性能を最大限に引き出します。
111 kHz 超高速MASプローブはどのBrukerの固体システムにも取り付け可能であり、サンプルパッキングのための専用の精密作業ツールと試料管をチェックするための実態顕微鏡が付属します。

- 111 kHzの超高速MAS
- MASIIIによるMASの高安定制御
- 材料分野とバイオ分野の双方に対応できるラインアップ
- 使いやすさを追求したサンプリングツール
- 微量サンプル量ながらも超高感度
- 広帯域の励起と高効率なrecouplingを可能とする非常に高いRF性能

GB1 side chain connectivity



Side chain connectivity in a microcrystalline GB1 detected by use of TOCSY based solid-state sequences.

ヘリウム再液化機能付きAscend
Ascend™ Aeon 900

世界初のヘリウム再液化機能付き超高磁場磁石

2000年に初めて900 Mhz (21.1 T) を発売して以来、Bruker BioSpinの超高磁場の磁石は進化を続けてきました。その進化は2004年に発売された画期的なアクティブシールド 900 US² 超伝導磁石を経て、そして2014年ついに最先端のヘリウム再液化機能をそなえたAscend Aeon 900小型超伝導磁石を実現し、その初号機がカリフォルニア大学サンディエイゴ校にインストールされました。

Ascend アクティブシールドテクノロジー

- 限りなく小さい漏えい磁場
- 外乱の影響を抑制する機構の内蔵
- 最高の磁場安定度と最小のドリフト

小型超高磁場磁石

- 高さ制限を解消し、1階建の建屋にも入る設計
- 機械設計と磁場設計の改善により縮小されたフットプリント
- 従来の磁石に比べて重量の減少
- 液体ヘリウム再液化機能付き800WBと同等のサイズ

Aeon ヘリウム再液化テクノロジー

- 液体窒素不要
- 磁石に統合された２ステージパルスチューブ冷凍機によるヘリウム再液化
- 通常運転中はヘリウム蒸散がゼロ

UltraStabilized ™ 過冷却磁石テクノロジー

- 磁石内温度を下げることで長期安定した超高磁場を達成
- コイルを蒸気圧化においたままでのジュール・トンプソン効果を用いた冷却
- 世界中で200以上もの過冷却磁石を納入した実績

800 WBで培われた経験

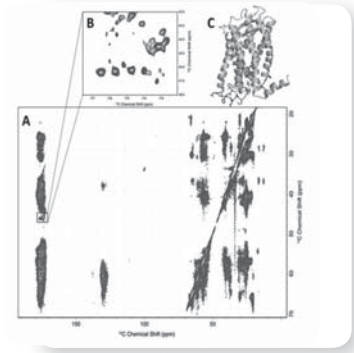
Bruker BioSpinは過冷却機構とヘリウム再液化機構の両方をもつ800WB磁石を、MIT（ケンブリッジ; アメリカ）、Centre de RMN（リヨン; フランス）、ユトレヒト大（オランダ）、FMPベルリン（ドイツ）をはじめとする多くのサイトにインストールしてきた実績があります。



800WB ヘリウム再液化機構付き磁石
リヨンのCentre de RMNより写真提供



カリフォルニア大学サンディエイゴ校に納入されたAscend Aeon 900超伝導磁石。
同大学より写真提供。

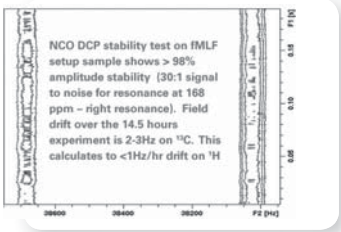


A：二次元$^{13}C/^{13}C$スピン交換スペクトル。サンプルはDMPCリポソーム中の$^{13}C/^{15}N$ラベルされたCXCR1、PDPSD 150 msecのミキシングタイムと15kHz MASで測定。

B：Glycineの信号領域の拡大図

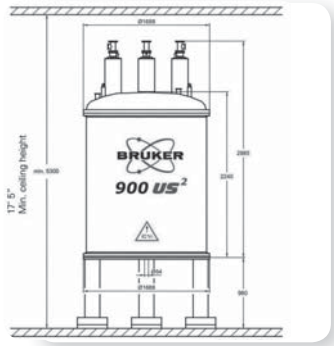
C：CXCR1（350残基）の三次元構造。固体NMRにて構造解析がおこなわれた（Park et al. (2012), Nature 491, 779-783）

Dr. Sang Ho Park, Dr. Anna De Angelis, and Prof. Stan Opellaよりデータ提供

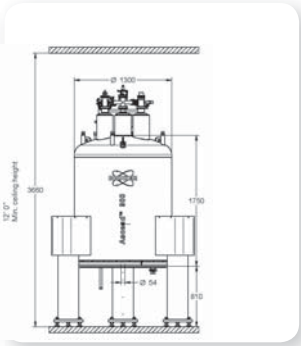


カリフォルニア大学サンディエイゴ校で実施されたAscend Aeon 900のドリフトテストの結果。ドリフトレートは1 Hz/hr以下であった。

超伝導磁石の進化の軌跡



7,200 kg
He: 250 ml/hr, 60 days hold time
5 G radial at 3.3 m



4,850 kg
He re-liquefaction,
>1 year hold time
5 G radial at 2.8 m

〒221-0022
神奈川県横浜市神奈川区守屋町3-9
ブルカー・バイオスピン株式会社
本社
Tel: 045-444-1390
Fax: 045-453-2457

〒532-0004
大阪府大阪市淀川区西宮原1-8-29
ブルカー・バイオスピン株式会社
大阪営業所
Tel: 06-6394-8989
Fax: 06-6394-9559

安定同位体標識化合物
Stable Isotope for Structural Biology

大陽日酸は多次元NMRでの構造解析に必須な安定同位体標識化合物を
高い品質・お求め易い価格で販売しております。

安定同位体標識無細胞タンパク質合成キット

理化学研究所の無細胞タンパク質合成技術をキット化いたしました。

抗体用　無細胞くん® SI SS

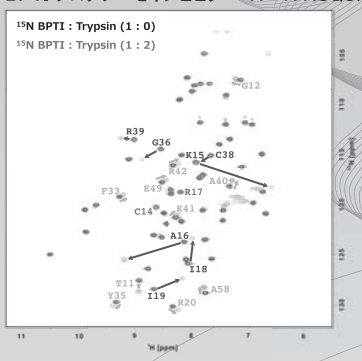


安定同位体標識タンパク質合成キット 無細胞® SS くん SI

SS結合を持つ抗体やサイトカインなどの分泌タンパク質合成専用キットです。安定同位体標識タンパク質の合成も可能です。

製品番号	製品名	数量	保存温度	希望納入価格(円)
A89-0126	無細胞くんSI SS	1キット	−80℃	65,000

BPTI プロテアーゼインヒビター ^{1}H-^{15}N HSQCスペクトル



Biological Magnetic Resonance Data Bank 5358, 5359 were used for assignments.

無細胞くん® SI

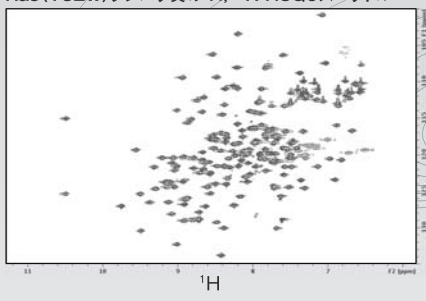


安定同位体標識タンパク質合成キット 無細胞® くん SI

迅速・簡単なタンパク質大量合成用キットです（CATタンパク質最大合成量 5mg/mL）。発現確認用「無細胞くんQuick」と併せてお使い下さい。

製品番号	製品名	数量	保存温度	希望納入価格(円)
A29-0059	無細胞くんSI	1キット	−80℃	55,000

Ras（Y32W）タンパク質の^{1}H, ^{15}N-HSQCスペクトル



ご提供：理化学研究所生命分子システム基盤研究領域 NMRパイプライン高度化研究チーム殿

無細胞くん用 アミノ酸

製品番号	製品名	数量	希望納入価格(円)
A107-0144	アミノ酸混合物水溶液-UL-d	1mL	ご相談
A39-0072	アミノ酸混合物水溶液-UL-^{15}N	1mL	15,000
A41-0074	アミノ酸混合物水溶液-UL-^{15}N,d	1mL	18,000
A40-0073	アミノ酸混合物水溶液-UL-^{13}C,^{15}N	1mL	30,000

製品番号	製品名	数量	希望納入価格(円)
A42-0075	アミノ酸混合物水溶液-UL-^{13}C,^{15}N,d	1mL	35,000
A91-0128	アミノ酸混合物水溶液-Lys,Arg-UL-^{13}C,^{15}N	1mL	20,000
A92-0129	アミノ酸混合物水溶液-Lys,Leu-UL-^{13}C,^{15}N	1mL	20,000
A108-0145	アミノ酸混合物水溶液-SeMet	1mL	ご相談

培地

- D-Glucose (^{13}C, d)
- Salts (^{15}N, d)
- Deuterium Oxide 99.9atom%

アミノ酸・ケト酸

- L-Amino Acids (^{13}C, ^{15}N, d)
- Algal Amino Acids (^{13}C, ^{15}N, d)
- α-Keto Acids (^{13}C, d)

核酸

- NTPs / NMPs (^{13}C, ^{15}N, d)
- Phosphoramidites (^{13}C, ^{15}N, d)
- RNA·DNAオリゴマ合成

その他

- Pf1 NMR Cosolvent
- Tris-d_{11}, MES-d_{13}, HEPES-d_{19}
- Water-^{17}O (10-90atom%)

※各種製品を取り揃えておりますのでお気軽にお問い合わせください。
※Biomolecular NMR専門カタログをご用意しておりますのでお気軽にお問い合わせください。

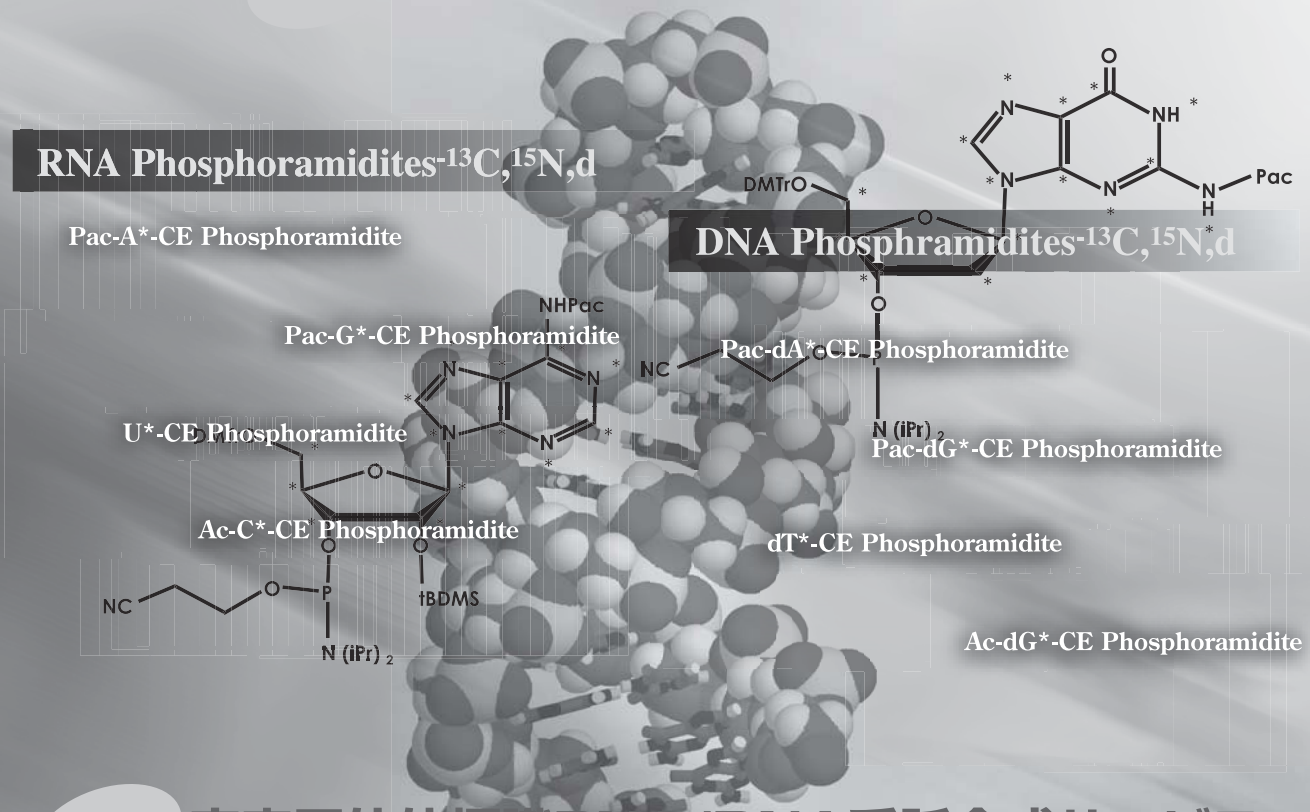
製造・総販売元　**大陽日酸株式会社　SI事業部**
〒142-8558　東京都品川区小山1-3-26 東洋Bldg.
Tel.03-5788-8550（代表）　Fax.03-5788-8710
●資料のご請求は、大陽日酸までお気軽にご用命ください。
メールアドレス Isotope.TNS@tn-sanso.co.jp
ホームページアドレス http://stableisotope.tn-sanso.co.jp

大陽日酸 The Gas Professionals

安定同位体標識RNA/DNA

大陽日酸は、高品質な安定同位体標識RNA/DNAを提供します。

NEW! 安定同位体標識アミダイト



NEW! 安定同位体標識RNA/DNA受託合成サービス

標識アミダイトの導入により、多彩な合成サービスを可能にしました。

受託合成サービスの特徴

高純度精製●20％変性PAGE / HPLC
大量調製●20ODU～（100ODU以上も合成可能）
標識パターン●^{13}C, ^{15}N, d標識、残基別標識、NEW! 部分標識

RNA/DNA関連商品

オリゴマー合成原料の安定同位体標識dNTPs、dNMPs、rNTPs、rNMPs
その他Phage等も各種取り揃えております。

製造・総販売元 **大陽日酸株式会社 SI事業部**
〒142-8558 東京都品川区小山1-3-26 東洋Bldg.
Tel.03-5788-8550（代表） Fax.03-5788-8710
●資料のご請求は、大陽日酸までお気軽にご用命ください。
メールアドレス Isotope.TNS@tn-sanso.co.jp
ホームページアドレス http://stableisotope.tn-sanso.co.jp

大陽日酸 The Gas Professionals

JEOL

4.5倍の感度向上！



固体NMR用 極低温プローブ

http://www.j-resonance.com/

クライオコイル MAS プローブは、固体高分解能NMR用の「極低温プローブ」として、試料を室温下で高速回転させながら、検出系の冷却により高い信号雑音比を実現。極低温プローブ技術を応用した4 mm チューナブル クライオコイル MAS プローブは、従来の室温プローブと比較して4.5倍の感度を達成しました。（磁場強度14.1 T ^{1}H共鳴周波数 600 MHz）

nanalysis

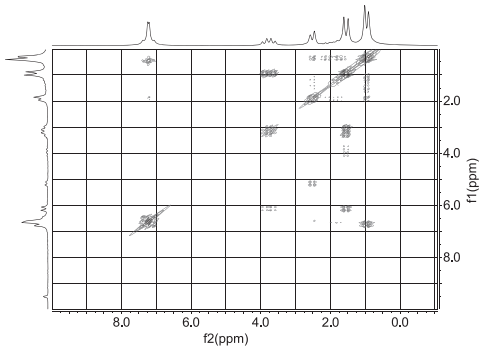
NMRに必要な機能をワンパッケージに凝縮

卓上型NMR NMReady 60Pro

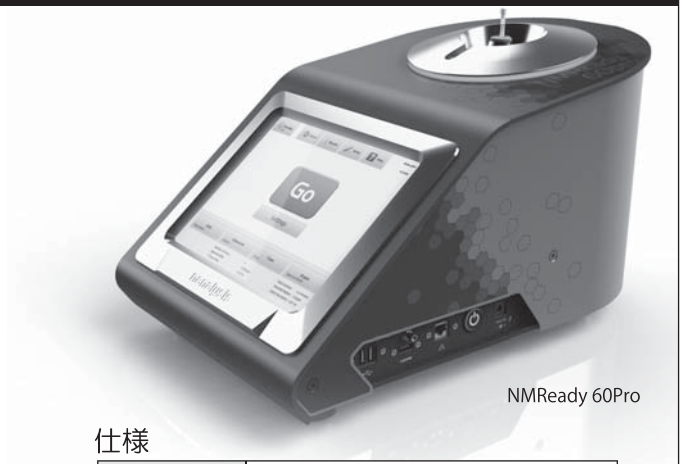
^{13}C, 2次元測定対応ハイグレードモデル

特長

- S/N比 5倍アップ(旧モデル比)
- 各種2次元NMR測定対応
- パルスプログラム制御可能
- デカップリング可能
- シグナルサプレッション可能



2次元NMR　データ測定例



NMReady 60Pro

仕様

共鳴周波数	60 MHz
磁場強度	1.4 T
分解能	1 Hz (代表値)
対応核種	60Pro : ^{1}H, ^{7}Li, ^{11}B, ^{13}C, ^{19}F, ^{31}P (^{1}H+他核種のいずれか、デュアル)

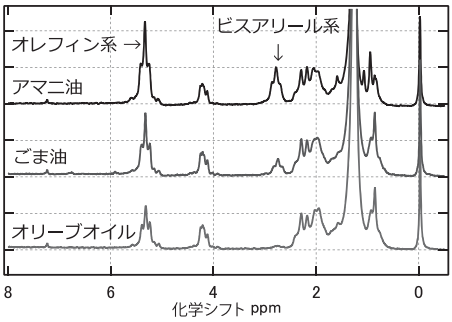
卓上型NMR NMReady 60e

組成分析・品質管理・教育に最適

特長

- A3サイズのコンパクトサイズ
- タッチスクリーンで簡単操作
- 冷媒不要 Heフリー
- 2次元NMR測定対応 (COSYのみ)

データ測定例



食用油の不飽和脂肪酸含有量の比較



NMReady 60e

仕様

共鳴周波数	60 MHz
磁場強度	1.4 T
分解能	1.2 Hz (代表値)
対応核種	60E : ^{1}H, ^{19}F, ^{1}H/^{19}Fデュアル

株式会社 東京インスツルメンツ
TOKYO INSTRUMENTS, INC.

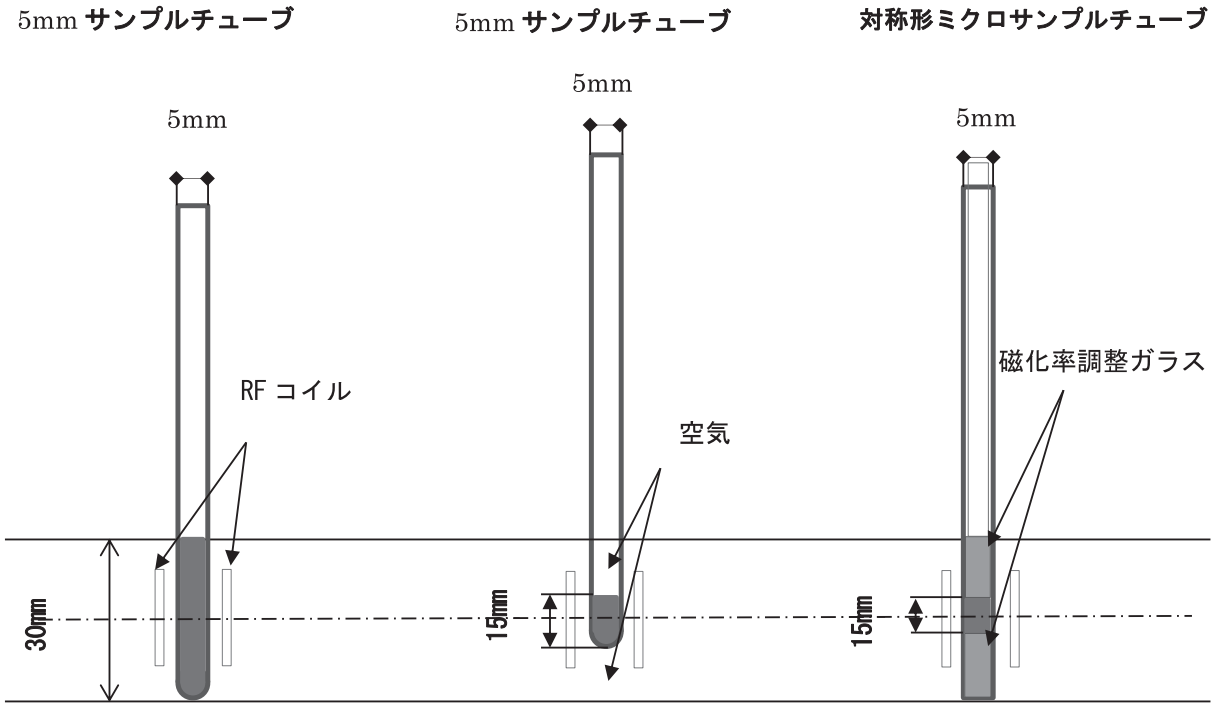
http://www.tokyoinst.co.jp/

本　　社　〒134-0088 東京都江戸川区西葛西6-18-14 TIビル TEL 03(3686)4711 FAX 03(3686)0831
大阪営業所　〒532-0003 大阪市淀川区宮原4-1-46 新大阪北ビル TEL 06(6393)7411 FAX 06(6393)7055

対称形ミクロサンプルチューブ

液高を低くして測定するにはシム調整の限界があります。対称形ミクロサンプルチューブは溶媒と同じ磁化率のガラスをサンプル管の上下に配置したためシム調整が可能になりました。現在、対応できる溶媒の種類は、D_2O, $CDCl_3$, DMSO, C_6D_6, C_5D_5N, CD_3OD, CD_3CN です。

★サンプル量を少なくしてもシム調整が可能なので微量サンプルに最適
★DOSY(対流を少なくでき、温度勾配を極力少なく)(3mm 対称形ミクロが Better)
★Diffusion (対流を少なくでき、温度勾配を極力少なく)(3mm 対称形ミクロが Better)



5mmφ用プローブでの測定例

5mmφサンプルチューブにシムが十分調整可能な液高に注入。	5mmφサンプルチューブに濃度を上げるために溶媒を減らしたが、液高が低いためシム調整できない。	5mmφ対称ミクロ形サンプルチューブに 5mmφサンプルチューブの半分の量注入。シム調整問題なし。
液高：30mm	液高：15mm	液高：15mm
量：410μL	量：210μL	量：210μL

平成２１年度「日本化学会科学有効賞」受賞製品

電話　042-624-2207
FAX　042-622-0937
株式会社　シ ゲ ミ
http://www.shigemi.co.jp
mail:shigemi-corp@nifty.com

SCETI
セティ株式会社

弊社では、重水素溶媒をはじめ、海外メーカーの
各種安定同位体標識化合物など幅広く取り扱っております。

- ✓***NMR Deuterated Solvents***
- ✓***Biomolecular NMR and MS***
  (Chemicals / Amino Acids / Nucleotides / Media etc…)
- ✓***Proteomics***
  (SILAC / SILAM / Mouse Diet / Mouse Tissue / Fish Diet etc…)
- ✓***Metabolic Research***
- ✓***Standards for Environmental Analysis***
- ✓***Isotopic Gases and Metals***
- ✓***Custom Synthesis Request****

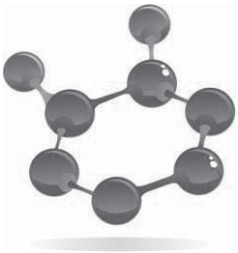
＊カタログ製品以外にも、お客様ご希望の特別合成サービスも行っておりますので、 是非一度ご相談下さい。
http://www.sceti.co.jp/research_menu/synthesis/

主要取扱メーカー

eurisotop® YOUR PARTNER FOR LABELLED COMPOUNDS (^{13}C, ^{15}N, D, ^{18}O)

Silantes Stable Isotope Labeled Biomolecules

MEDICAL ISOTOPES, Inc.



販売元

SCETI
セティ株式会社

営業第三部　検査薬課　TEL: 03-5510-2652
website: http://www.sceti.co.jp
E mail: Exp-pet@sceti.co.jp

DENISJAPAN
A MEMBER OF DENIS GROUP - EST.1862

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

NMR共用プラットフォーム　ご利用案内

NMR共用プラットフォームでは、
参画機関が保有するNMR装置を産業界等に開放しております。



DNP固体
700MHz NMR
（大阪大学）

平成27年度 第3回公募

【公募期間】10月1日～10月30日

専門知識を身につけたプロフェッショナルが
豊富な経験に基づいて、皆様の研究をサポートいたします。



溶液950MHz
LC-NMR
（横浜市立大学）

NMR装置一覧や応募方法等の
詳細はWebサイトをご覧ください
URL： http://nmrpf.jp/

◆ご利用前の相談も随時、承ります。

NMR共用プラットフォーム　検索

※平成28年度以降は利用形態を変更する可能性があります。

【NMR共用プラットフォームの概要】

先端的なNMR 施設と技術を有する、理化学研究所、横浜市立大学、大阪大学は、強固に連携した「NMR 共用プラットフォーム」を構築し、最先端技術開発の動向を踏まえた研究開発と人材育成を支える取組を、他の施設との連携協力関係を築きながら全国的な取り組みへと発展させNMR 技術領域の利用と発展を先導するとともに、最先端技術開発の基盤を作り、ユーザーニーズを的確に反映させた技術開発に資する存在となることを目指します。

【イベントのお知らせ】

○高分子関連NMR利用促進シンポジウム（仮称）（1月開催予定、理研横浜）

■過去のイベント （高磁場・高感度ＮＭＲ利活用促進シンポジウム）
http://www.ynmr.riken.jp/news/information/nmrsymposium2014.html

○よこはまNMR研究会（年4回程度開催、横浜市大鶴見キャンパス）

■H28年8月29-30日予定（理研横浜交流棟: Post ICMRBS Symposium）
The 5th International Symposium on Drug Discovery and Design by NMR
■H27年度： 今後2回程度理研横浜交流棟で開催予定です。以下は開催済みです。
・第53回ワークショップ『ドラッグデザインのための最新分子間相互作用解析』
・よこはまNMR研究会20周年記念公開シンポジウム
H26年度：・第52回ワークショップ『インセルNMR』
・The 4th International Symposium on Drug Discovery and Design by NMR
■詳細 http://www.tsurumi.yokohama-cu.ac.jp/ynmr/index.html

○NMR共用プラットフォーム事業報告会（3月開催予定、理研横浜）

■過去のイベント （平成26年度NMR共用プラットフォーム事業報告会）
http://nmrpf.jp/event.html



NMR立体構造解析
パイプライン
（理化学研究所）



溶液600MHz NMR
DCH：^{13}C高感度測定
（理化学研究所）

参画機関
◎代表機関　国立研究開発法人　理化学研究所（ライフサイエンス技術基盤研究センター）
○実施機関　公立大学法人　横浜市立大学（大学院生命医科学研究科生命医科学専攻）
国立大学法人　大阪大学（蛋白質研究所）

連絡先　NMR 共用プラットフォーム（3 機関共通）
E-mail：nmrpfkaihou@riken.jp
URL： http://nmrpf.jp/

NTS DNA/RNA 合成機

M-Series　made in Japan

試薬循環機構搭載型

TYPE MX



Model：

M-2-MX【2本カラム　11本アミダイトポートタイプ】

M-4-MX【4本カラム　9本アミダイトポートタイプ】

M-8-MX【8本カラム　6～20本アミダイトポートタイプ】

関連試薬の販売も行っております。　合成機の見学もご相談に応じます。

日本テクノサービス株式会社
NIHON TECHNO SERVICE CO.,LTD

〒300-1234茨城県牛久市中央1-19-1　E-mail info@ntsbio.com
TEL:029-886-6811 FAX:029-870-0210　URL http://www.ntsbio.com

株式会社Ecosoft

ホームページ作成、システム開発をお考えの方へ

株式会社EcosoftではWeb系のシステム開発を中心に、
ホームページ制作からサーバ保守・管理まで
幅広いサービスを迅速かつ丁寧にご提供致します。

Webページ制作　システム開発　サーバ保守管理

まずはお気軽にご連絡ください！

Mail　toiawase@ecosoft.jp

URL　http://www.ecosoft.jp/

住所　〒330-0834　埼玉県さいたま市大宮区天沼町2-1031-1-108

スタンプラリーご協力の御礼

この度は、第54回NMR討論会のスタンプラリーにご賛同、ならびにご協力をいただきまして誠にありがとうございます。また、ご協賛品を賜りましたこと重ねて御礼申し上げます。

本スタンプラリーを通じまして、本討論会参加者との積極的な交流の機会となりましたら幸いです。

なお、公益財団ちば国際コンベンションビューローに、ご支援をいただきました。ありがとうございました。

第54回NMR討論会事務局

謝　辞

若手ポスター賞に関しまして、今年度も株式会社JEOL RESONANCEよりJEOL RESONANCE賞を設けていただきました。また、今年度より大陽日酸株式会社より大陽日酸賞を設けていただきました。

ご支援賜りましたこと、心より御礼申し上げます。