第55回 NMR討論会（2016）

The 55th Annual Meeting of the Nuclear Magnetic Resonance Society of Japan (2016)

講演要旨集

Abstracts

会　期：　**2016年11月16日（水）、17日（木）、18日（金）**
November 16(Wed)-18(Fri), 2016

会　場：　**広島国際会議場**
International Conference Center Hiroshima
〒730-0811　広島県広島市中区中島町1-5

主　催：日本核磁気共鳴学会

共催・協賛・後援：広島大学クロマチン動態数理研究拠点（RcMcD）、高分子学会、
日本生物物理学会、日本材料科学会、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、
日本物理学会、日本分子生物学会、日本糖質学会

第55回NMR討論会　プログラム委員会

楯　　真一（広島大学）　［委員長］

神田　大輔（九州大学）

寺沢　宏明（熊本大学）

渡邉　英宏（国立環境研究所）

田中　好幸（徳島文理大学）

山田　和彦（高知大学）

犬飼　宗弘（徳島大学）

吉永　壮佐（熊本大学）

武田　光広（熊本大学）

栃尾　尚哉（広島大学）（チュートリアル担当）

会場（広島国際会議場）への交通案内

広島国際会議場　〒730-0811　広島市中区中島町1-5

JR広島駅より

- 路線バス（所要時間:約20分）
  - ・南口バスのりばA-3ホームより、広島バス24号線吉島営業所または吉島病院行「平和記念公園」下車すぐ
- 市内電車（所要時間：約25分）
  - ・広島港①行「袋町」下車、徒歩約10分
  - ・西広島②、江波⑥、宮島行「原爆ドーム前」下車、徒歩約10分
- タクシー（所要時間：約15分）

広島バスセンターより

- 徒歩約10分

広島空港より

- リムジンバス（所要時間：約70分）
  - ・空港ターミナルビル1階到着フロア1番ホームより、広島バスセンター行終点下車、徒歩約10分
- タクシー（所要時間：約50分）

広島港（宇品港）より

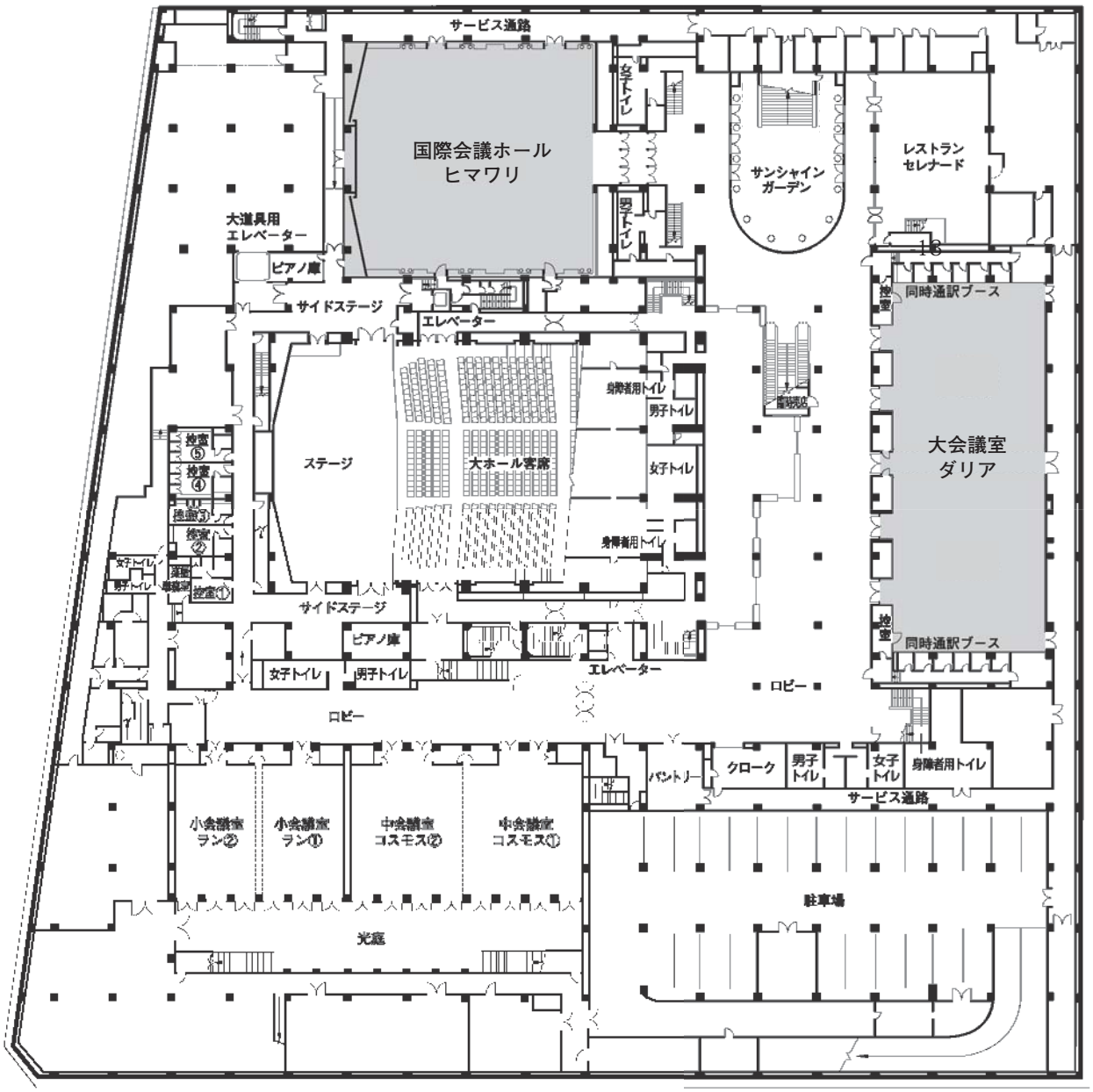
- 路線バス（所要時間：約25分）
  - ・広島バス21号線広島駅、向洋大原、洋光台団地行「中電前」下車、徒歩約10分
- 市内電車（所要時間：約35分）
  - ・広島駅①、西広島③行「中電前」下車、徒歩約10分
- タクシー（所要時間：約20分）

＊上に記載の所要時間は、目安です。交通状況により異なる場合がございますのでご注意ください。
＊詳細は会場ホームページをご覧ください。http://www.pcf.city.hiroshima.jp/icch/access.html

会場の案内図

広島国際会議場　地下2F

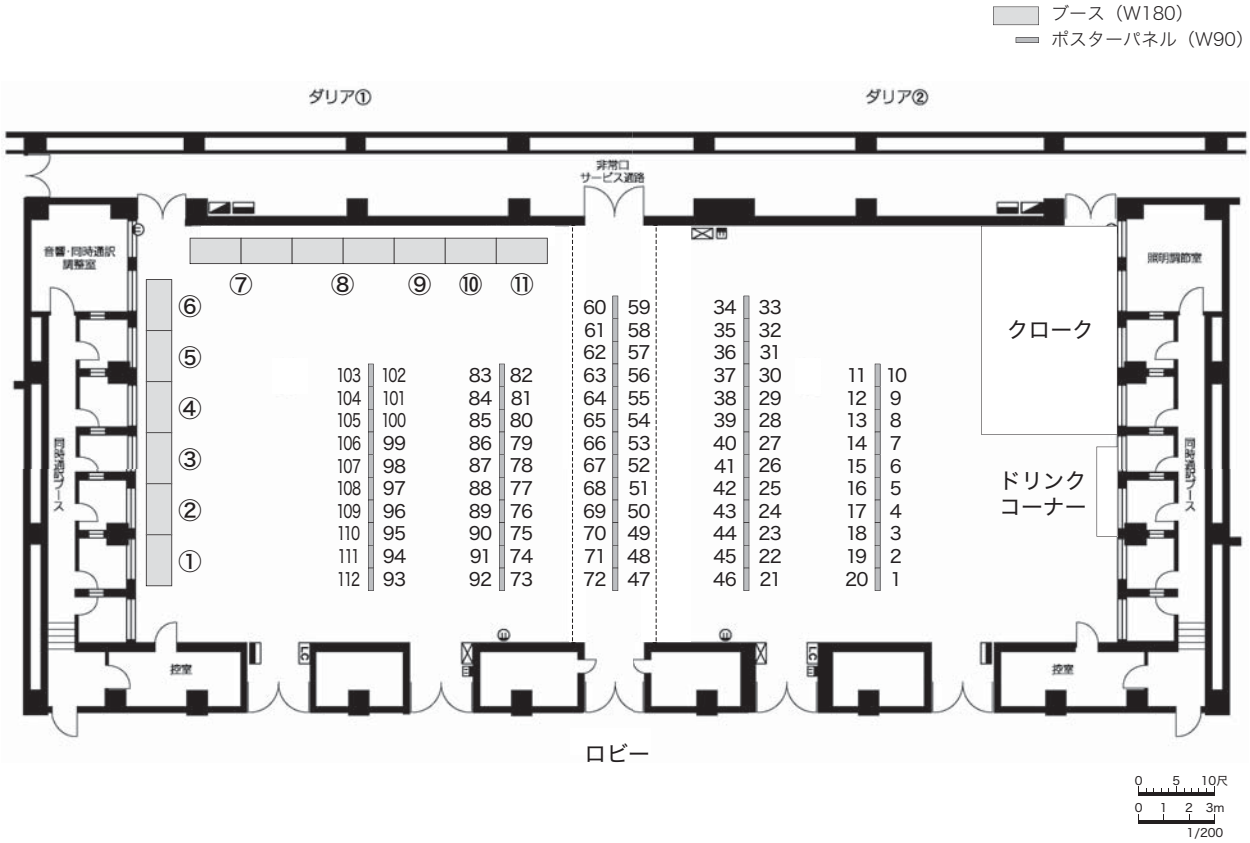
［ヒマワリ］口頭発表会場、総会会場



ポスター・展示会場詳細図

広島国際会議場　地下2F

［ダリア］展示ブース、ポスター発表会場、ドリンクコーナー、クローク



位置	社　名
①	株式会社シゲミ（SHIGEMI Co., Ltd.）
②	大陽日酸株式会社（TAIYO NIPPON SANSO CORPORATION）
③	SI サイエンス株式会社（SI SCIENCE Co., LTD.）
④	株式会社エムアールテクノロジー（Magmetic Resonance Technology Ltd.）
⑤	株式会社エルエイシステムズ（L.A.Systems Inc.）
⑥	日本カンタム・デザイン株式会社（Quantum Design, Inc.）
⑦	ブルカー・バイオスピン株式会社（Bruker BioSpin K.K.）
⑧	株式会社 JEOL RESONANCE（JEOL RESONANCE Inc.）
⑨	株式会社東京インスツルメンツ（Tokyo Instruments Inc.）
⑩	株式会社 システムプラス / Mestrelab Research, S.L.（System Plus Inc. / Mestrelab Research, S.L.）
⑪	ジーンフロンティア株式会社（Gene Frontier Corporation）

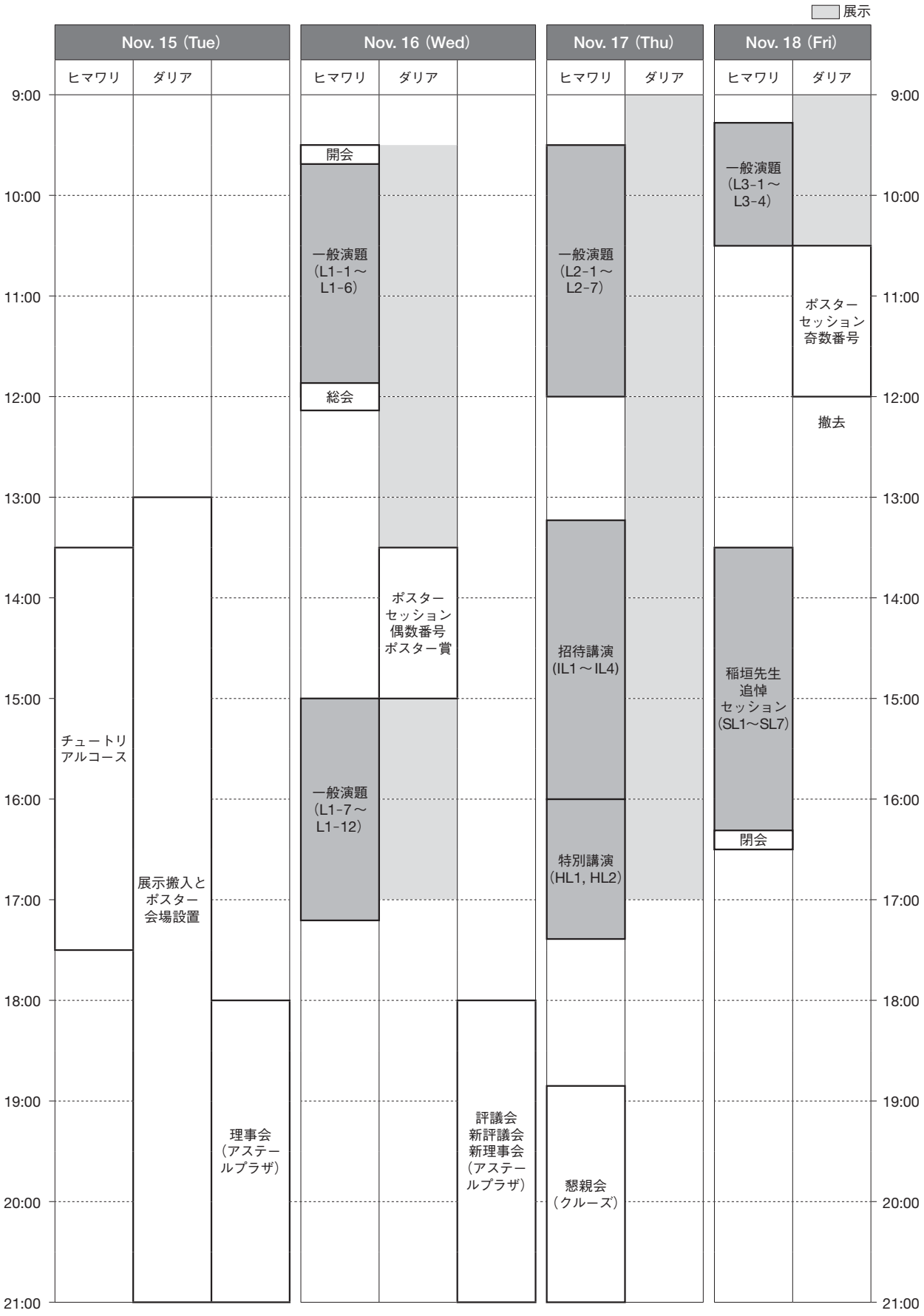
懇親会会場の案内図

瀬戸内海汽船　銀河（18：20乗船開始、18：50出港、21：00帰港）

＊討論会会場（広島国際会議場）から懇親会会場へのバスを用意いたしております。
＊公共交通をご利用の場合は市内電車（1、3、5番線 広島港（宇品）行き）にご乗車の上、「広島港（宇品）」で下車、または広島バス21番線（広島港（宇品）行き）にご乗車の上、「広島港桟橋」で下車いただけるのが便利です。

問い合わせ
瀬戸内海クルーズ株式会社　Tel: 082-255-3344　URL: http://ginga-cruise.com

討論会日程表


展示
Nov. 15（Tue）
Nov. 16（Wed）
Nov. 17（Thu）
Nov. 18（Fri）
ヒマワリ
ダリア
9:00
10:00
11:00
12:00
13:00
14:00
15:00
16:00
17:00
18:00
19:00
20:00
21:00
チュートリアルコース
展示搬入とポスター会場設置
理事会（アステールプラザ）
開会
一般演題（L1-1～L1-6）
総会
ポスターセッション偶数番号ポスター賞
一般演題（L1-7～L1-12）
評議会
新評議会
新理事会
（アステールプラザ）
一般演題（L2-1～L2-7）
招待講演（IL1～IL4）
特別講演（HL1, HL2）
懇親会（クルーズ）
一般演題（L3-1～L3-4）
ポスターセッション奇数番号
撤去
稲垣先生追悼セッション（SL1～SL7）
閉会

参加者へのご案内

1．受付と参加登録

◇受　付

受付はヒマワリ前に設けます。

受付時間：11月16日（水）　9：00～17：30
　　11月17日（木）　9：00～17：30
　　11月18日（金）　9：00～16：30

・事前登録された方で、参加費を支払済みの方は、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	￥10,000	￥8,000	￥10,000	￥8,000

◇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55回NMR討論会ホームページ（http://www.nmrj.jp/NMR2016/index.html）で公開します。

◇学会費の支払いと入会手続き

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

2. 会場内のサービス・施設

◇ クローク

ダリア（ポスター・展示会場）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16日（水）　9：00～17：00
　　11月17日（木）　9：00～17：00
　　11月18日（金）　9：00～12：00

◇ インターネット

全会場・ロビーにおきましてWi-Fiによるインターネットをご利用いただける環境を整えております。詳しくは受付にてご案内いたします。

◇ 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

館内は全て禁煙です。喫煙所は地下2階レストラン前「サンシャインガーデン」(中庭）のみとなっております。また会場内でのご飲食は可能です。

◇ 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
〒730-0811　広島県広島市中区中島町1-5
広島国際会議場

◇ 会期外

55thNMR 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：nmr55@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、講演会場内の「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。持ち時間は特別講演35分、招待講演35分、一般講演20分、ベルの鳴動時刻は以下の通りです。

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

※特別講演には質疑の時間はありません。

◇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180cm×横90cmです。左上隅20cm四方のスペースに演題番号を表示してあります。床から30cm程度のスペースを空けておくことを推奨します。画鋲は各ポスターパネルに用意します。

展示場所：ポスター会場は大会議室ダリアです。演題番号が表示されたパネルに展示して下さい。

提示期間：会期中はポスターの張り替えを行いません。全ての発表ポスターは、11月16日（水）9:30～13:30の間に掲示し、11月18日（金）12:00～12:30の間に取り外して下さい。ポスター撤去時刻を過ぎても取り外されないポスターは事務局で撤去します。

ポスター発表時間：ポスター番号が偶数番号および若手ポスター賞候補の方（P2, P4, …）は、11月16日（水）13:30～15:00にポスター討論を行って下さい。奇数番号（P1, P3, …）の方は、11月18日（金）10:30～12:00にポスター討論を行って下さい。発表時間の間は、必ずポスター前に立ち、質問と討論に応じて下さい。また、発表者はポスターボードに備え付けられたリボンを付けて発表して下さい。

6. 第55回日本核磁気共鳴学会　総会開催通知

日　時：2016年11月16日（水）　11：50～12：10
場　所：広島国際会議場　ヒマワリ

第55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15日（火）18：00より	アステールプラザ
評議員会	11月16日（水）18：00より	アステールプラザ
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15日（火）／ Nov. 15, Tue.　13：30～17：30（受付13：00～）
会　場：広島国際会議場　ヒマワリ（受付　ヒマワリ入口前）

13:30～14:30

「フーリエ変換を工夫してNMRスペクトルをよみがえらせる」

池上　貴久　先生（横浜市立大学）

同じ測定データでも、どのようにフーリエ変換するかによって、スペクトルに大きな違いが生じることがあります。もちろん、プロセス法も考えておいたうえで測定パラメータを設定するのがよいのですが、もし間違えて測定してしまったとしても、フーリエ変換をなんとか工夫することによって、そのミスを少しでもカバーできればそれに越したことはありません。今回はプロセス用パラメータをブラックボックスとして使ってしまっているNMR初心者を対象に、プロセス法における工夫や個々の基本的なパラメータの意味について、できるだけ詳しく紹介したいと思います。

14:30～14:50　休憩

14:50～15:50

「四極子核固体NMR法の基礎の基礎」

山田　和彦　先生（高知大学）

ほとんど全ての元素は固有の核スピン（I）を有する安定同位体を含んでいる。従って、原理的には周期表上のほとんどの元素がNMR測定の対象になるはずである。また、その八割程度は四極子核と呼ばれる$I \geq 1$の核種であり、四極子モーメントを有している。そのため、周囲の電荷が創出する電場勾配と四極子モーメントの間で、核四極相互作用と呼ばれる静電的な核スピン相互作用が生じる。概して、NMRユーザーは^{1}Hや^{13}CなどI = 1/2の核種を測定対象とすることが多く、四極子核NMRを使用する機会は少ないかもしれない。これは、化学シフト相互作用や双極子－双極子相互作用などに比べて、核四極相互作用は線形に与える影響が大きいため、線幅が広がることを反映した結果と思われる。しかしながら、近年の技術的な進歩に伴って、それら難易度は確実に下がっており、NMR測定が可能な四極子核が増えてきた。そして、NMR法を応用できる研究分野は確実に広がってきている。このような背景から、従来からのNMRユーザーのみならず、これからNMR法を活用する研究者においても、四極子核を測定対象とするNMR法への関心が高まってきている（と思われる）。本講演では、これから四極子核NMRに挑戦するユーザーを対象に、四極子核NMRの基礎的理論やバックグランドを概説し、四極子核の代表格（核？）である酸素（^{17}O）NMRを実例として、スペクトル解析の重要性について説明する。

15:50～16:00　休憩

16:00～17:30

「NMRを創った人たち：第1話　夜明け前
1. SternとGerlach―偶然はいかに彼らに微笑んだか」

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、学問が創られた背景には、様々な味わい深い物語がある。研究対象の選択や鍵となるアイデアの着想の経緯、あるいは回り道やつまずきなど創造の過程で辿った軌跡を知ることは、学問を創る側に立とうとしている若い人々にとって素晴らしい財産となろう。研究を行なった本人の人物像、研究が行なわれた時代背景、研究環境、周辺の人々などもまた創造の物語を構成する重要な要素である。本講演では、時代を画した研究を行った人物にスポットを当て、可能な限りその研究が行われた現場を蘇らせる。その試みが研究者として歩みだした若い人たちにとって一つの道標になれば幸いである。今回は角運動量の方向量子化を発見し、陽子などの磁気能率を初めて測定してNMRが出現する土壌を培った先人の物語を話す。

第55回 NMR討論会（2016）

The 55th Annual Meeting of the Nuclear Magnetic Resonance Society of Japan (2016)

会　期：　2016年11月16日（水）～18日（金）
November 16(Wed)-18(Fri), 2016

会　場：　広島国際会議場
International Conference Center Hiroshima
〒730-0811　広島県広島市中区中島町1-5

第1日目　11月16日（水）／Day 1（Nov. 16, Wed）

9:30～13:30　ポスター貼り付け

9:30～17:00　展示会

9:30～9:40　開会の挨拶　竹腰　清乃理（京都大学大学院　理学研究科）
Opening remarks: Kiyonori Takegoshi
（Division of Chemistry, Graduate School of Science, Kyoto University）

一般演題1［会場:ヒマワリ］
9:40～10:40　座長：山田　和彦

9:40～10:00
L1-1　$PbSnF_4$固体イオン伝導体のダイナミクス解析
Dynamics study of ionic conductivity in $PbSnF_4$
○村上美和，森田善幸（京都大学・産官学連携本部）

10:00～10:20
L1-2　アルミラミネート型全固体リチウム二次電池の^{7}Li-NMRイメージング法：正極，固体電解質，およびLi箔について
^{7}Li-NMR imaging for aluminum-laminated all-solid-state rechargeable lithium battery
○拝師智之[1]，藤木聡[2]，相原雄一[2]（[1]株式会社エム・アール・テクノロジー（つくば市），[2]株式会社サムスン日本研究所）

10:20～10:40
L1-3　含水状態における絹の構造および水との相互作用に関するNMR研究
NMR study of the structures of hydrated silks and the interaction with water
○田制侑悟[1]，平沖敏文[1]，松田裕生[1]，片岡奈緒美[1]，大窪貴洋[2]，朝倉哲郎[1]（[1]東京農工大学大学院 工学研究科、[2]千葉大学大学院 工学研究科）

10:40～10:50　休憩

一般演題2［会場:ヒマワリ］
10:50～11:50　座長：犬飼　宗弘

10:50～11:10
L1-4　2次元交換NMRの交換速度に対する3スピンフリップ－フロップの影響
Effects of 3 spin flip-flop for exchange rate in 2D exchange NMR
○大橋竜太郎，水野元博（金沢大学・大学院・自然科学研究科）

11:10～11:30
L1-5　高磁場DNPの高速定量的シミュレーションによる高効率核磁化増大法の研究
Effective high field solid-state DNP techniques as analyzed by fast quantitative calculation
○深澤隼，藤原敏道，松木陽（大阪大学蛋白質研究所）

11:30～11:50

L1-6　超偏極キセノンガスを用いた二次元NMRによるカーボンナノチューブの細孔解析
Hyperpolarized ^{129}Xe Aided 2D-NMR Study of Carbon Nanotube Pore Analysis

○藤原英明[1]，木村敦臣[1]，今井宏彦[2]，宮脇仁[3,4]，尹聖昊[3,4]，池田基[4]，吉鉉植[4]，出田圭子[3]，齋藤公児[5]，金橋康二[6]（[1]阪大院・医，[2]京大・学際融合，[3]九大・先導研，[4]九大・総理工，[5]新日鐵住金・技術開発本部，[6]新日鐵住金・先端研）

11:50～12:10　**日本核磁気共鳴学会総会 / Meeting of the NMR Society of Japan**

12:10～13:30　**昼食 / Lunch**

13:30～15:00　**ポスターセッションⅠ（偶数番号、若手ポスター賞審査含む）**
Poster Session（even numbers）including poster presentations for Young Scientists Poster Awards

ポスターセッション［会場：地下2階ダリア］

一般演題3［会場：ヒマワリ］

15:00～16:00　**座長：伊藤　隆**

15:00～15:20

L1-7　高感度レオロジーNMRの開発と応用
Highly Sensitive Rheo-NMR Spectroscopy For Proteins

○森本大智[1]，Erik Walinda[2]，西澤茉由[1]，Ulrich Scheler[3]，山本昭彦[4]，白川昌宏[1]，菅瀬謙治[1]（[1]京都大学大学院 工学研究科，[2]京都大学大学院 医学研究科，[3]Leibniz Institute of Polymer Research Dresden，[4]ブルカー・バイオスピン株式会社）

15:20～15:40

L1-8　定量固体NMRを用いた単一大腸菌細胞内で合成される分子種の同定および分子数の計測
Identification the species of molecules and counting the number of molecules synthesized in an *Escherichia coli* cell by quantitative solid-state NMR

○山田和哉，江川文子，藤原敏道（大阪大学・蛋白質研究所）

15:40～16:00

L1-9　木質バイオマスにおける超分子構造とステレオ選択的な酵素反応及び核酸のin-cell NMR
Supramolecular structure and stereoselective enzymatic reaction of wood biomass, and in-cell NMR of nucleic acids

山置佑大[1,2,5]，永田一真[1,2]，清石彩華[1,2]，西村裕志[3,4,5]，加納ふみ[6]，村田昌之[7]，大田ゆかり[5,8]，渡辺隆司[3,4]，永田崇[1,2,4,5]，○片平正人[1,2,4,5]（[1]京大・エネルギー理工学研究所，[2]京大・エネルギー科学研究科，[3]京大・生存研，[4]JST・CREST，[5]JST・ALCA，[6]東工大・院科学技術創製，[7]東大・院総合文化，[8]海洋研究開発機構）

16:00～16:10　**休憩**

一般演題4［会場：ヒマワリ］

16:10～17:10　**座長：児島　長次郎**

16:10～16:30

L1-10　コアフコース認識レクチンの三量体溶液構造と糖鎖認識機構の解析
The trimeric solution structure of a core fucose-specific lectin and its recognition ofoligosaccharide

○山崎和彦[1]、山崎智子[1]、清水弘樹[2]、長島生[2]、清水明[3]、千葉靖典[3]、舘野浩章[3]（産業技術総合研究所 [1]バイオメディカル研究部門、[2]生物プロセス研究部門、[3]創薬基盤研究部門）

16:30～16:50

L1-11　アゾベンゼン架橋剤の光異性化反応によるタンパク質変性のNMR同期測定

NMR-synchronized protein denaturation by photoisomerization of an azobenzene cross-linker

長島敏雄[1]，植田啓介[2]，西村千秋[2]，○山崎俊夫[1]（[1]理化学研究所・ライフサイエンス技術基盤研究センター，[2]帝京平成大学・薬学部）

16:50～17:10

L1-12　CAST/CNMRシステムを用いた^{13}C NMRシフト値による様々な有機化合物の構造訂正

Structural Revision of Several Organic Compounds by Evaluation of ^{13}C NMR Chemical Shifts using CAST/CNMR System

○越野広雪[1]，小市俊後[2]，佐藤寛子[3,4]（[1]理化学研究所 環境資源科学研究センター，[2]南山大学 システム数理学科，[3]情報・システム研究機構，[4]チューリッヒ大学 化学科）

18:00～21:00　**日本核磁共鳴学会評議会・新評議会・新理事会［会場：アステールプラザ］**

（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、新理事会は新評議会が終わりしだい開きます）

第2日目　11月17日(木)／Day 2 (Nov. 17, Thu)

9:00～17:00　展示会

一般演題5［会場：ヒマワリ］
9:30～10:30　座長：片平　正人

9:30～9:50
L2-1　新規安定同位体標識技術を利用した高分子量蛋白質の溶液立体構造解析
Relaxation-optimized SAIL method for structural studies of large proteins
○宮ノ入洋平[1]，武田光広[1,2]，寺内勉[3,4]，甲斐荘正恒[1,3]（[1]名古屋大学・大学院・理学研究科附属構造生物学研究センター，[2]熊本大学・大学院・生命科学研究部，[3]首都大学東京・大学院・理工学研究科，[4]SAILテクノロジーズ株式会社）

9:50～10:10
L2-2　多剤耐性転写制御因子の転写制御機構：非特異的DNA吸着の役割
Transcriptional regulation of a multidrug transcriptional repressor: role of non-specific DNA adsorption
○竹内恒[1,2]，今井美咲[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]バイオ産業情報化コンソーシアム，[4]東京大学・大学院薬学系研究科）

10:10～10:30
L2-3　高磁場DNPの効率改善をめざした手法開発とその応用
Methods for improving high-field DNP and its application
○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・蛋白質研究所，[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）

10:30～10:40　休憩

一般演題6［会場：ヒマワリ］
10:40～12:00　座長：藤原　敏道

10:40～11:00
L2-4　NMR signals to light conversion through a membrane capacitor
○武田和行[1]，長坂健太郎[2]，宇佐見康二[2]（[1]京都大学・大学院・理学研究科、[2]東京大学・先端科学研究センター）

11:00～11:20
L2-5　固体NMRを用いたイモリの肢再生制御蛋白質におけるアンカリングの役割の解明
The Role of Anchor in the Prod1 essential in Newt Limb Regeneration
○野村薫[1]，谷本泰士[2]，林文夫[3]，原田英里砂[1]，単小遠[4]，森垣憲一[5]，島本啓子[1]（[1]公益財団法人サントリー生命科学財団・生物有機科学研究所，[2]神戸大学大学院・農学研究科，[3]神戸大学大学院・理学研究科，[4]サントリーグローバルイノベーションセンター株式会社研究部，[5]神戸大学・バイオシグナル総合研究センター）

11:20～11:40
L2-6　高分解能固体NMRおよびFIB-TOF-SIMSを用いたフライアッシュ中ホウ素の化学構造解析
Chemical structure analysis of coal fly ash by using high-resolution solid state NMR and FIB-TOF-SIMS
○高橋貴文[1]，金橋康二[1]，林俊一[2]，長坂徹也[3]（[1]新日鐵住金 先端技術研究所，[2]新日鐵住金 技術開発本部，[3]東北大学 工学研究科）

11:40～12:00
L2-7　Solid-State NMR meets electron diffraction: Application to crystalline form determination
Tetsuo Oikawa[1], Manabu Okumura[2], Ryosuke Kusumi[2], Fumiko Kimura[2], Tsunehisa Kimura[2], Manoj Kumar Pandey[3], ○Yusuke Nishiyama[3]（[1]JEOL ASIA Pte. Ltd., [2]Graduate School of Agriculture, Kyoto University, [3]JEOL RESONANCE Inc. & RIKEN CLST-JEOL Collaboration Center）

12:00～13:10 **昼食 / Lunch**

Invited Lecture

13:10～13:45 **Chairperson: Kazuhiko Yamada**

IL1 Elucidation of Chain Trajectory and Chemical Reaction of Semicrystalline Polymers by Solid-State NMR

○Toshikazu Miyoshi（Department of Polymer Science, The University of Akron, USA）

13:45～13:50 **Break**

13:50～14:25 **Chairperson: Yoshiyuki Tanaka**

IL2 Advanced NMR studies of DNA conformational polymorphs

○Lukas Trantirek（Central European Institute of Technology, Brno, Czech Republic）

14:25～14:30 **Break**

14:30～15:05 **Chairperson: Masayoshi Sakakura**

IL3 Cholesterol Binding to the C99 Domain of The Amyloid Precursor Protein as a Factor that May Promote Alzheimer's Disease

○Charles R. Sanders（Center for Structural Biology and Department of Biochemistry, Vanderbilt University, USA）

15:05～15:10 **Break**

15:10～15:45 **Chairperson: Shin-ichi Tate**

IL4 The Future of NMR in Metabolomics

○David S. Wishart（Departments of Biological Sciences and Computing Science. University of Alberta, Canada）

15:45～16:00 **Break**

Honorary Lecture

16:00～16:35 **Chairperson: Kaoru Nomura**

HL1 Gazing NMR for Thirty Six Years

○Takashi Iwashita（（Former）SUNTORY FOUNDATION for LIFE SCIENCES
Bioorganic Research Institute, Structure and Function Group, Division of Structural Biomolecular Science）

16:35～16:40 **Break**

16:40～17:15 **Chairperson: Tetsuo Asakura**

HL2 High Resolution Solid-State NMR Spectroscopy. Development and Application to Structural Biochemistry

○Akira Naito（Graduate School of Engineering, Yokohama National University, Japan）

18:50～21:00 **Banquet**

第3日目　11月18日(金)／Day 3 (Nov. 18, Fri)

9:00～12:00　**展示会**

一般演題7［会場：ヒマワリ］
9:10～10:30　**座長：山崎　俊夫**

9:10～9:30
L3-1　化学物質のヒト脳への影響評価を目指したMR定量測定法の開発
Development of quantitative measurement methods in MR for evaluation of effects of chemicals to human brain
○渡邉英宏[1]，高屋展宏[1]，Tin Tin Win Shwe[2]，三森文行[1]（[1]国立環境研究所 環境計測研究センター 画像・スペクトル計測研究室，[2]国立環境研究所 環境リスク・健康研究センター 生体影響評価研究室）

9:30～9:50
L3-2　磁石回転による主磁場制御型MRIのT1強調効果
New Type T1 weighted imaging of main field cycle MRI with rotary magnet
○小林竜馬[1]，内海英雄[2]（[1]九州大学・先端融合医療レドックスナビ研究拠点、[2]静岡県立大学）

9:50～10:10
L3-3　情報科学を活用したシグナル帰属法のin-cell NMRへの応用
Signal Assignment Strategy with Information Science for in-cell NMR
○葛西卓磨[1,2]，樋口佳恵[1]，猪股晃介[1,3]，木川隆則[1,2,4]（[1]理化学研究所・生命システム研究センター，[2]JST・CREST，[3]JST・さきがけ，[4]東京工業大学・情報理工学院）

10:10～10:30
L3-4　深層学習に支援されたNMRシグナルの自動解析
Automated analysis of NMR signals assisted by Deep Neural Networks
○小林直宏[1]，服部良一[2]，永田崇[3]，児嶋長次郎[4]，藤原敏道[1]（[1]大阪大学・蛋白質研究所，[2]徳島文理大学・薬学部，[3]京都大学・エネルギー理工学研究所，[4]横浜国立大学・理工学部）

10:30～12:00　**ポスターセッションⅡ（奇数番号）**
Poster Session Ⅱ（odd numbers)

ポスターセッション［会場:地下2階ダリア］

12:00～13:30　**昼食 / Lunch**

オーガナイザーセッション［会場:ヒマワリ］
13:30～13:35　**趣旨説明：楯　真一**

13:35～14:25　**座長：楯　真一**

13:35～14:00
SL1　μ-オピオイド受容体のシグナル選択性制御機構の解明
Identification of a Conformational Equilibrium That Determines the Efficacy and Functional Selectivity of the μ-Opioid Receptor
奥出順也[1]，上田卓見[1,2]，幸福裕[1]，佐藤元彦[1]，延山尚幸[1]，近藤啓太[1]，白石勇太郎[1]，水村拓也[1]，大西健人[1]，夏目芽依[1]，前田正洋[3]，辻下英樹[3]，倉永健史[1]，井上将行[1]，○嶋田一夫[1]（[1]東京大学・大学院薬学系研究科，[2]日本学術振興会（JST）・さきがけ（PRESTO），[3]塩野義製薬・創薬研究所）

14:00～14:25
SL2　アスパラギン結合型糖鎖転移反応の理解のための統合的構造生物学アプローチ
Integrative structural biology approach to decipher the molecular mechanism of Asn-glycosylation
○神田大輔（九州大学・生体防御医学研究所）

14:25～15:15　**座長：神田　大輔**

14:25～14:50

SL3　四ヘムシトクロムにおける常磁性電子系の動的協同性とその生物学的意義

Dynamic and cooperative behaviors of paramagnetic electron systems in tetra-heme cytochromes and their biological significance

○阿久津秀雄（横浜市立大学生命医学研究科）

14:50～15:15

SL4　NMR Approaches to Dissect Oncogenic RAS Signaling in Biological Membranes

Zhenhao Feng, Teklab Gebregiworgis, Ki-Young Lee, Le Zheng, Mohammad Mazhab-Jafari, Mathew J. Smith, Christopher B. Marshall,○Mitsu Ikura（Princess Margaret Cancer Centre and Department of Medical Biophysics, University of Toronto, Canada）

15:15～16:15　**座長：寺沢　宏明**

15:15～15:35

SL5　常磁性ランタノイド金属とBiomolecular NMR

Paramagnetic lanthanides for biomolecular NMR

○八木宏昌（理化学研究所・生命システム研究センター）

15:35～15:55

SL6　受容体チロシンキナーゼ FGFR1 のがん変異体の動的構造状態と阻害剤耐性機構の解析

NMR analysis of dynamic feature and drug resistant mechanism of cancer mutant of tyrosine kinase

○小橋川敬博[1]，稲垣冬彦[2]（[1]熊大・院・生命科学、[2]北大・院・先端生命）

15:55～16:15

SL7　NMRとX線結晶解析の協業から迫るオートファジーの分子機構

Molecular mechanisms of autophagy revealed by collaboration of NMR and X-ray crystallography

○野田展生[1]，稲垣冬彦[1,2]（[1]微生物化学研究会・微生物化学研究所，[2]北海道大学・大学院先端生命科学研究院）

16:15～16:25　**閉会の挨拶　（世話人）**

一般ポスター発表／Poster presentation［地下２階ダリア］

偶数番号：１日目（2016/11/16）、奇数番号：３日目（2016/11/18）

Y：若手ポスター賞

P1　化学修飾によるタンパク質の新たな安定同位体標識法の開発
Newly developed stable isotope labeling methods of proteins via chemical modification
○服部良一[1,2]，David Heidenreich[1]，横山敬一[3]，鈴木榮一郎[3,4]，田中好幸[2]，藤原敏道[1]，児嶋長次郎[1,5]
（[1]大阪大学・蛋白質研究所，[2]徳島文理大学・薬学部，[3]味の素株式会社・イノベーション研究所、[4]バイオ産業情報化コンソーシアム・JBIC研究所，[5]横浜国立大学・大学院工学府）

P2 Y　二重試料管を用いた定量NMR法の開発と応用
Develoment and application of quantitative NMR method using coaxial NMR tube
○大木慈子，島田治男（資生堂グローバルイノベーションセンター）

P3　蛋白質選択的飽和によるタンパク質-リガンド相互作用観測の試み
Protein-ligand interaction analysis using adiabatic spin lock as spin saturation
○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）

P4　WET法の新しい応用測定Flip-Back-BBWET-TOCSY法について
Flip-Back-BBWET —a new method to saturate huge sugars and to observe minor components and amide protons in foods
○降旗一夫[1]，佐久間千勢子[2]，田代充[3]（[1]東大院農・応生化，[2]東薬大・薬，[3]明星大・理工）

P5　ケモカイン受容体制御因子FROUNT－新規制御化合物間の相互作用解析
Analyses of the interaction between the regulating factor of the chemokine receptor FROUNT and new anti-inflammatory compounds.
江崎宗一郎[1]，○吉永壮佐[1]，石田規人[1]，武田光広[1]，柚木芳[1]，寺島裕也[2]，遠田悦子[2]，松島綱治[2]，寺沢宏明[1]（[1]熊本大学大学院生命科学研究部，[2]東京大学大学院医学系研究科）

P6　HSP70基質結合ドメインにおけるリッドの動的構造と機能との相関解析
Structural dynamics and functional relationship of the lid in the substrate binding domain of HSP70
○梅原康平[1]，栃尾尚哉[2]，星川美穂[1]，楯真一[1,2]（[1]広島大学・大学院・理学研究科，[2]広島大学・クロマチン動態数理研究拠点（RcMcD））

P7　天然変性領域(IDR)を介した過度的ドメイン間相互作用による基質結合能増強機構の解明
Enhancement of the ligand binding ability through the transient inter-domain interaction facilitated by intervening IDR
○井上涼平[1]，川嵜亮祐[1]，栃尾尚哉[2]，楯真一[1,2]（[1]広島大学・大学院・理学研究科，[2]広島大学・クロマチン動態数理研究拠点（RcMcD））

P8　ライゲーション反応を用いたマルチドメインタンパク質PKCの構造解析
Structure determination of the multi-domain protein PKC by protein ligation
○貴堂晃弘[1]，金場哲平[1,2]，伊藤隆[1]，三島正規[1]（[1]首都大学東京・大学院・理工学研究科，[2]ブルカー・バイオスピン株式会社）

P9　メチル基を利用した蛋白質の全自動NMR構造決定
Automated protein structure determination using methyl groups
○新家粧子，小林直宏，藤原敏道，児嶋長次郎（大阪大学 蛋白質研究所）

P10　NMRによるR型レクチン改変体とシアル酸糖鎖との分子間相互作用解析
NMR analysis of the interaction between a novel sialic acid-binding lectin mutant from the C-terminal domain of an R-type lectin and sialyllactose
○逸見光[1]，久野敦[2]，平林淳[2]（[1]農研機構・食品研究部門，[2]産総研・創薬基盤研究部門）

P11　ヘムと四重鎖DNAの複合体の構造解析
Structural characterization of a complex between heme and G-quadruplex DNA formed from d(GGG(TGGG)$_3$)
○越智健太郎[1]，柴田友和[1]，逸見光[2]，萩原正規[3]，山本泰彦[1]（[1]筑波大学・大学院・数理物質科学研究科，[2]農研機構・食品部門，[3]弘前大学・大学院・理工学研究科）

P12　TRAF6の二量体形成機構のNMR解析
NMR analysis for the dimerization mechanism of TRAF6

○上田和也[1]，栃尾尚哉[2]，楯真一[1,2]（[1]広島大学・大学院・理学研究科，[2]広島大学・クロマチン動態数理研究拠点（RcMcD））

P13　拡張moel-free解析法による分子混雑環境下の蛋白質ダイナミクス解析
A novel extended model-free analysis reveals protein dynamics under macromolecular crowding environment.

○岡村英保[1,7]，栃尾尚哉[2]，杉山修世[1,2]，伊東優拡[1]，渡部暁[1,2]，ワン ポーハン[3]，優乙石[3]，フェイグ マイケル[1,4]，杉田有治[1,3,5,7]，木川隆則[1,2,6,7]（[1]理化学研究所 生命システム研究センター，[2]理化学研究所 生命分子システム基盤研究領域，[3]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 情報理工学院，[7]CREST/JST）

P14　NMRを用いた脂質二重膜中における1回膜貫通型タンパク質C99の構造解析
NMR study of a single transmembrane protein C99 in lipid bilayers

○真嶋健大[1]，坂倉正義[1]，藤井萌[1]，三尾和弘[1,2]，Charles R. Sanders[3]，高橋栄夫[1]（[1]横浜市立大学・大学院・生命医科学研究科，[2]産業技術総合研究所，[3]Department of Biochemistry and Center for Structural Biology, Vanderbilt University School of Medicine）

P15　放線菌の接合伝達タンパク質TraBの構造研究
Structural study 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）

P16　酵母*Pichia pastoris*発現系を用いて調製した安定同位体標識ヒト膜タンパク質のNMR解析
NMR analyses of human membrane proteins produced by the yeast *Pichia pastoris* expression system

○坂倉正義，鈴木里佳，森雅樹，藤井萌，高橋栄夫（横浜市立大学・大学院・生命医科学研究科）

P17　免疫受容体Mincleによる糖脂質認識機構のNMR解析
NMR analysis of glycolipid recognition mechanism by innate immune receptor Mincle

○齊藤貴士[1]，須知祐介[2]，古川敦[3]，前仲勝実[3]（[1]北海道薬科大学、[2]北海道大学大学院・生命科学院、[3]北海道大学大学院・薬学研究院）

P18　B型肝炎X蛋白質（HBx）BH3様モチーフと$Bcl\text{-}x_L$のNMR相互作用解析
NMR analysis of the interaction between the BH3-like motif of hepatitis B virus X protein (HBx) and $Bcl\text{-}x_L$

○楠英樹[1]，田中俊之[2]，河野俊之[3]，木村博一[4]，細田和男[5]，若松馨[5]，浜口功[1]（[1]国立感染症研究所 血液・安全性研究部，[2]筑波大学大学院生命環境科学研究科，[3]北里大学医学部 生化学，[4]国立感染症研究所 感染症疫学センター，[5]群馬大学大学院理工学府 分子科学部門）

P19　昆虫細胞発現系における高度重水素標識を用いた脂質二重膜中のGタンパク質共役型受容体の動的構造解析
Functional Dynamics of Deuterated β_2-Adrenergic Receptor in Lipid Bilayers Revealed by NMR Spectroscopy

○幸福裕[1]，上田卓見[1,2]，奥出順也[1]，白石勇太郎[1]，近藤啓太[1]，水村拓也[1]，鈴木志歩[1]，嶋田一夫[1]（[1]東京大学・大学院薬学系研究科，[2]日本学術振興会（JST）・さきがけ（PRESTO））

P20　複数の抗原を特異的に認識する抗体G2の抗原結合による構造及び揺らぎの変化
Structural and dynamical changes of multispecific antibody G2 induced by binding of different antigens

○鎌足雄司[1]，臼井大樹[2]，石黒直隆[3]，織田昌幸[2]（[1]岐阜大学・生命科学総合研究支援センター、[2]京都府立大学大学院・生命環境科学研究科、[3]岐阜大学・応用生物科学部）

P21　メチル化アミロイドβと金属イオンとの相互作用解析
Analysis of interaction between methylated Aβ42 and metal ions

髙井朋代[1]，物部容子[1]，山口りつ子[1]，竹内昌男[1]，竹内喜久子[1]，児玉高志[1,2]，○赤木 謙一[1]（[1]医薬基盤・健康・栄養研究所，[2]京都大学 理学研究科）

P22 Y　NMRとSAXSによるRNA結合性マルチドメインタンパク質Nrd1の構造解析
Structural studies of the RNA-binding multi-domain protein Nrd1 by NMR and SAXS

○小林彩保[1]，永井敢[1]，佐藤亮介[2]，伊藤隆[1]，杉浦麗子[2]，三島正規[1]（[1]首都大・理工，[2]近畿大・薬）

P23 FGFR4活性化に関わるFGFR4-FGFR1キナーゼドメイン間相互作用のNMRによる解析
NMR analysis of the interaction between kinase domains required for activation of the receptor tyrosine kinase FGFR4

○逆瀬川知香[1]，雨宮舜[2]，与座魁斗[1]，姫野梨花[1]，林田大輝[1]，赤星璃[1]，佐藤卓史[3]，森岡弘志[3]，小橋川敬博[3]（[1]熊大・薬，[2]熊大・院・薬，[3]熊大・院・生命科学）

P24 Y LINEの逆転写酵素がLINE RNAの1残基の違いを識別するメカニズムの解析
Mechanism of the discrimination of a single residue difference in LINE RNAs by LINE reverse transcriptase

○大津舞菜[1]，梶川正樹[2]，河合剛太[1]（[1]千葉工業大学・工学部，[2]東京工業大学・生命理工学院）

P25 RMF mRNA 5'-UTRにおいて1残基の変異がRNA構造およびスペルミジンとの相互作用に与える影響
Effect of a point mutation in RMF mRNA 5'-UTR on RNA structure and interaction of 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）

P26 Y *Cyclin D1*遺伝子転写制御やテロメア長制御に関わるTLS/FUSタンパク質と非コード核酸間の相互作用のNMR法による解析
NMR analysis of interaction of TLS/FUS and non-coding RNA/DNA, a key event for regulation of *CCND1* transcription and telomere shortening

○近藤敬子[1]，真嶋司[1,2]，大吉崇文[3]，米田竜馬[4]，黒川理樹[4]，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・エネルギー科学研究科，[3]静岡大学・理学部，[4]埼玉医科大学・ゲノム医学研究センター）

P27 転写共役因子天然変性領域（IDR）の低存在率構造と核内受容体の結合能の相関解析
Functional roles exerted by the low population structures in the intrinsically disordered region (IDRs) of the co-activator protein

○伊藤慎一郎[1]，栃尾尚哉[2]，中嶋直大[1]，楯真一[1,2]（[1]広島大学・大学院・理学研究科，[2]広島大学・クロマチン動態数理研究拠点（RcMcD））

P28 Y C:G塩基対を選択的に認識する人工塩基を含む三重鎖DNAの構造解析
Structural analysis of triplex DNA containing an artificial nucleoside which selectively recognizes the C:G base pair

○真嶋司[1,2]，岡村秀紀[3]，王磊[3]，谷口陽祐[3]，佐々木茂貴[3]，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，[3]九州大学大学院薬学研究院）

P29 NMRを用いた汗のメタボロミクスと皮膚表在微生物叢
NMR-based human sweat metabolomics and skin microbiome

○筒井聡志[1]，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）

P30 Y 天然変性領域を介した動的なドメイン協働による基質認識機構の解明
Enhanced substrate binding through the inter-domain dynamics linked by the intrinsically disordered region (IDR)

○川嵜亮祐[1]，栃尾尚哉[2]，楯真一[1,2]（[1]広島大学・理学研究科・数理分子生命理学専攻，[2]広島大学・クロマチン動態数理研究拠点（RcMcD））

P31 NMRによる多様な水産資源のビックデータ解析に基づく代謝・物理特性の総合評価
NMR-based comprehensive evaluation of metabolic and physical characteristics of the diversified aquatic resources

○魏菲菲[1]，福地実[2]，朝倉大河[1,2]，坂田研二[1]，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）

P32 Y 天然変性領域の多重リン酸化によるFACTヌクレオーム結合の超高感度応答性機構
Ultra-sensitive regulation of the nucleosome binding of FACT, a chromatin remodeling factor, through multiple phosphorylation to its intrinsically disordered regions (IDRs)

○青木大将[1]，上脇準一[2]，栃尾尚哉[2]，楯真一[1,2]（[1]広島大学・大学院・理学研究科，[2]広島大学・クロマチン動態数理研究拠点（RcMcD））

P33　魚類多様性の生息環境・表現型の体内物質・微生物群のビッグデ ータ解析
Big data analysis of metabolic and microbial profiling for characterization of habitat and phenotype in fish diversity
○佐藤有穂[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・生医，[2]理研CSRS，[3]名大院・生命農）

P34 Y　機械学習理論に基づく生体分子複雑系の解析技術高度化
Machine learning as advanced analytical technique of complex biomolecular mixtures
○伊達康博[1,2]，菊地淳[1,2,3]（[1]国立研究開発法人理化学研究所・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　シアロ糖鎖 α, β 結合の判別と セレン含有糖鎖のNMRによる解析
Determination of alpha, beta connectivity of sialo-glycans and analysis of seleno-carbohydrates using NMR spectroscopy
○ 鵜澤洵[1]，山口芳樹[1]，田中浩士[2]，鈴木達哉[3,4]，安藤弘宗[3,4]，木曽真[3,4]（[1]理研 糖鎖構造，[2]東工大 物質理工，[3]岐阜大 応用生物，[4]京大 物質－細胞 統合システム拠点）

P36　NMRを用いた定量法の比較―内部標準法と外部標準法
Comparison of quantitative methods by NMR- Internal and External Calibration Methods
○片平律子，大澤弘幸，大室喜久子，望月正（JFEテクノリサーチ株式会社 分析ソリューション本部 先端有機分析部 先端医薬品解析センター）

P37　無機材料結合ペプチドと無機ナノ粒子の相互作用解析
Structure and dynamic properties of Ti-binding peptide bound to inorganic nanoparticles
○鈴木悠[1]，神藤平三郎[2]，朝倉哲郎[3]（[1]福井大学テニュアトラック推進本部，[2]東京薬科大学，[3]東京農工大学大学院工学研究科）

P38　NMR多変量解析による食用油の熱劣化解析
Thermal degradation analysis of edible oils by multivariate analysis of NMR
○大田陽介，早河裕子，岡田明子，平田真吾，塩成さゆり，森美詞，則武智哉（株式会社UBE科学分析センター）

P39　紅藻ハナヤナギ由来パリトキシンの構造解析
Palytoxin isolated from a marine red alga, *Chondria armata*
○森祥子[1]，菅原孝太郎[1]，前田満[2]，岩下孝[1]，山垣亮[1]（[1]（公財）サントリー生命科学財団・生物有機科学研究所，[2]サントリーグローバルイノベーションセンター（株））

P40　リポソーム / 水分散液における水分子のダイナミクス解析
Water Dynamics Analysis in Liposome/Water Dispersion
○川口翼[1]，喜多理王[2]，新屋敷直木[2]，八木原晋[2]，福崎稔[3]（[1]東海大学大学院総合理工学研究科，[2]東海大学理学部物理学科，[3]東海大学熊本教養教育センター）

P41　セルロース誘導体の化学シフト帰属と構成モノマー組成の決定
Chemical shift assignment of cellulose derivatives: Determination of the mole fractions of monomers comprising sodium carboxymethylcellulose
○甲野裕之，藤田彩華，大島和浩，橋本久穂，清水祐一（苫小牧高専 応用化学・生物系）

P42 Y　ゴム状高分子の溶液NMRを用いた種々の測定
A variety of measurements using solution NMR of the rubber-like polymer
○宮代亜紗美，吉水広明（名古屋工業大学・大学院・工学研究科）

P43　ポリプロピレンの F_2 選択励起TOCSY
F_2-selective TOCSY of polypropylene
○松原康史[1,2]（[1]三菱化学株式会社・開発研究所，[2]日本ポリケム株式会社・研究開発部）

P44　さまざまな低分子液体のPFG-NMR法と誘電分光法による並進および回転拡散の評価
Evaluation of the translational and rotational diffusion of various low-molecular liquid by PFG-NMR and dielectric spectroscopy.
○堀雄貴[1]，川口翼[2]，喜多理王[3]，新屋敷直木[3]，八木原晋[3]，福崎稔[4]（[1]東海大学大学院理学研究科，[2]東海大学大学院総合理工学研究科，[3]東海大学理学部物理学科，[4]東海大学熊本教養教育センター）

P45　金属ルテニウムを含む新規イオン液体のガラス転移温度降下メカニズム
The mechanism of glass transition temperature drop for new type ionic liquids involving Ruthenium
○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　PS，PMMS 内に収着させた Xe をプローブとし，^{129}XeNMRによって評価する気体輸送特性
The gas transport properties characterized by ^{129}Xe NMR observations of the Xe in PS and PMMA as a probe
○西口枝里子，吉水広明（名古屋工業大学・大学院・工学研究科）

P47　重金属のスピン分極シフトの測定
Measurement of the chemical shift of the heavy metal by the spin polarization
○横山拓海，花坂明、桑原大介、中川直哉（電気通信大学・大学院・情報理工学研究科）

P48 Y　定量NMR法における不純物の重なる信号に対するクロマトグラフィーを併用した新規評価法の確立
Establishment of a Novel Evaluation Method for Analyte Signals Overlapping with Impurity Signals by Using Chromatography in Combination with Quantitative NMR
○斎藤直樹[1]，北牧祐子[1]，大塚聡子[1]，西﨑雄三[2]，杉本直樹[2]，井原俊英[1]（[1]産業技術総合研究所 計量標準総合センター 物質計測標準研究部門，[2]国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部）

P49　リチウムイオン二次電池用無機固体電解質のリチウム拡散挙動
Lithium ion migration of inorganic solid electrolytes for lithium ion batteries
○栗間昭宏，石川朋希，夏目穣，橋本康博，松岡直樹，吉野彰（旭化成株式会社）

P50　光励起三重項状態を用いた動的核偏極による安息香酸の高偏極化
Hyperpolarization of benzoic acid with dynamic nuclear polarization using photoexcited triplet states.
○田中良樹，根来誠，香川晃徳，北川勝浩（大阪大学大学院・基礎工学研究科）

P51　磁場掃引NMRパターン上の特異点を用いた四極子パラメータの決定法
Determination of quadrupolar parameters using singularities in field-swept NMR patterns
○一条直規[1]，武田和行[1]，山田和彦[2]，竹腰清乃理[1]（[1]京都大学大学院 理学研究科 化学専攻，[2]高知大学 教育研究部 総合科学系 複合領域科学部門）

P52 Y　固体NMRによる光駆動型ナトリウムイオンポンプKR2のpH変化に対するレチナール結合サイトの構造変化の解析
Structural analysis upon pH-change of retinal binding site in light-driven sodium ion pump rhodopsin, KR2, by solid-state NMR
○重田安里寿[1]，伊藤奨太[2]，沖津貴志[3]，和田昭盛[3]，井上圭一[2,4]，神取秀樹[2]，川村出[1]（[1]横浜国立大学大学院・工学府，[2]名古屋工業大学大学院・工学研究科，[3]神戸薬科大学，[4]JST・さきがけ）

P53　^{13}C固体NMRを用いたDMPC脂質二重膜存在下におけるペプチドホルモングルカゴンの線維構造の解析
Glucagon fibril structure in the presence of DMPC lipid bilayers as studied by ^{13}C solid-state NMR
○羽矢和未，川村出，内藤晶（横浜国立大・院工）

P54　ナトリウムポンプ型ロドプシンにおけるイオン結合サイトの役割
Role of cation binding site of sodium pump rhodopsin
○田巻初[1,2]，斉藤優太[2]，江川文子[1]，菊川峰志[3]，相沢智康[3]，出村誠[3]，藤原敏道[1]（[1]大阪大学・蛋白質研究所，[2]北海道大学・大学院生命科学院，[3]北海道大学・大学院先端生命科学研究院）

P55　固体NMRを用いたミドルロドプシンの温度変化に対する構造変化の解析
Temperature-dependent structural changes of middle rhodopsin as studied by solid-state NMR
○川村出[1]，関隼斗[2]，槙野義輝[1]，重田安里寿[1]，沖津貴志[3]，和田昭盛[3]，須藤雄気[4]（[1]横浜国立大学・大学院・工学府，[2]横浜国立大学・理工学部 化学生命系学科，[3]神戸薬科大学，[4]岡山大学 院医歯薬）

P56　光照射固体NMRによるセンサリーロドプシンIIの光反応過程における光中間体構造の解明
Photo-intermediates in sensory rhodopsin II as revealed by in-situ photo-irradiation solid-state NMR
○槙野義輝[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]，上田一義[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）

P57 In-situ 光照射固体NMRによるバクテリオロドプシンD96N変異体の光反応過程でのレチナールおよびタンパク質構造変化の解析

Structural change of retinal and protein during photoreaction of bacteriorhodopsin D96N mutant as revealed by *in-situ* photo-irradiation 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）

P58 Y ^{2}H, ^{19}F NMRを用いた脂質膜中におけるアンフォテリシンBの配向解析

Orientation Analysis of Amphotericin B in membrane using ^{2}H and ^{19}F NMR

○山本智也[1,2]，梅川雄一[2,1]，山上正輝[1,2]，花島慎弥[1]，土川博史[1]，松森信明[3,1]，村田道雄[1,2]（[1]大阪大学大学院・理学研究科，[2]JST-ERATO，[3]九州大学大学院・理学研究院）

P59 固体NMRによるポリヒドロキシアルカン酸ブレンドのマルチスケール解析評価

Multi-scale analysis of poly (hydroxyalkanoic acid) blend with solid-state NMR

○西田雅一[1]，田中智子[1]，早川由夫[1]，伊藤嘉晃[2]，安田洸平[2]，西田政弘[2]（[1]産総研・構造材料，[2]名工大院・電気機械工学専攻）

P60 Y 固体NMR法によるエチレンアイオノマーの結晶構造と運動性解析

Solid-State NMR study of crystalline phase and molecular motions of Poly (ethylene-co-methacrylic acid) Ionomers

○松川隆幸，中澤千香子，浅野敦志（防衛大学校・応用化学科）

P61 ポリ（γ-グルタミン酸）の固体NMRによる構造解析

Characterization of Poly (γ-glutamic acid) by Solid NMR

○藤井美暉子，柿下拓史，前田史郎（福井大院工）

P62 メチレン鎖長の異なる半芳香族ポリアミドの物性と構造解析

Structure and Physical property of semi-aromatic polyamides with various methylene length

○田中佑弥，米山賢，上原宏樹，山延健（群馬大学・大学院・理工学府）

P63 界面活性剤及びシランカップリング剤を利用したシリカエアロゲルの構造解析

Structure analysis of silica aerogel using surfactant and silane coupling agent by solid state NMR

○日下康成[1]，大鷲圭吾[1]，遠藤健司[2]，安孫子大祐[2]，酒井秀樹[2]（[1]積水化学工業株式会社，[2]東京理科大学工学部工業化学科）

P64 Y 固体NMRおよびDFT計算による二次電池負極炭素中のリチウムおよびナトリウムの状態分析

Analysis of the state of lithium and sodium in carbon anode for secondary battery using solid state NMR and DFT calculation

○森田凌平[1]，後藤和馬[1,2]，福西美香[2,3]，久保田圭[2,3]，駒場慎一[2,3]，西村直人[4]，湯村尚史[4]，出口健三[5]，大木忍[5]，清水禎[5]，石田祐之[1]（[1]岡山大学大学院 自然科学研究科，[2]京都大学ESICB，[3]東京理科大学 理学部，[4]京都工芸繊維大学 工芸科学部，[5]物質・材料研究機構）

P65 ジシラシクロファン誘導体の溶液中並びに固体中でのコンフォメーション変化に関する研究

Conformational Consideration of Octamethyltetrasila[2,2]cyclophanes in Solution and Solid State

○服部峰之[1]，治村圭子[1]，林繁信[1]，島田真樹[2]，山野井慶徳[2]，西原寛[2]，尾本賢一郎[2]，田代省平[2]，塩谷光彦[2]（[1]産業技術総合研究所・計量標準総合センター・物質計測標準研究部門，[2]東京大学大学院・理学系研究科・化学専攻）

P66 ^{2}H NMRによる黒鉛層間エーテル分子の構造および動的挙動の解析

Structure and dynamics of ether molecules intercalated in graphite layers studied by ^{2}H NMR

○後藤和馬[1,2]，○丸山寿史[1]，森田凌平[1]，宮東達也[3]，水野元博[3]，瓜田幸幾[4]，石田祐之[1]（[1]岡山大学 大学院・自然科学研究科，[2]京都大学 触媒・電池元素戦略研究拠点（ESICB），[3]金沢大学 大学院・自然科学研究科，[4]長崎大学 大学院・工学研究科）

P67 固体NMRによる NaI-$LiBH_4$ 固溶体のLiイオン伝導機構の解明

Solid-State NMR reveals Li-ion transport mechanism in NaI - $LiBH_4$ solid-solution

○野田泰斗[1]，内林渓[1]，宮崎怜雄奈[2]，栗原大[2]，日原岳彦[2]，竹腰清乃理[1]（[1]京都大学大学院理学研究科化学専攻，[2]名古屋工業大学大学院工学研究科物理工学専攻）

P68 無機固体酸塩 $Cs_2(HSO_4)(H_2PO_4)$ におけるアンモニウムイオン置換とスピン－格子緩和

Ammonium ion exchange and spin-lattice relaxation in 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）

P69　超高速MAS NMRを用いた石炭の化学構造解析
Ultra-fast MAS NMR of coal
○金橋康二（新日鐵住金・先端研）

P70　クライオMASプローブによる^{43}Ca NMRの研究
^{43}Ca NMR by using the cryo-coil MAS probe
○最上祐貴[1]，清水禎[1]，水野敬[2]，竹腰清乃理[3]（[1]国立研究開発法人物質材料研究機構，[2]株式会社 JEOL RESONANCE，[3]京都大学 大学院理学研究科）

P71　^{13}C固体NMRおよび^{2}H溶液緩和NMRによるクモ糸の超収縮機構の解明に関する研究
Study of super-contraction phenomenon of spider by ^{13}C solid state and ^{2}H solution relaxation NMR
○田制侑悟[1]，亀谷俊輔[1,2]，朝倉哲郎[1]（[1]東京農工大学 工学部，[2]（株）三井分析センター）

P72　プロトン伝導体 PVPA /xIm ($x \geqq 2$) におけるイミダゾールの運動性および局所構造
Mobility and local structure of imidazole in proton conductor, PVPA / xIm ($x \geq 2$)
○成田貴光，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）

P73　固体NMRによるプロトン伝導性ジホスホン酸イミダゾリウム結晶の構造解析
Structural Analysis of Proton Conducting Imidazolium Diphosphonate Crystals Using Solid-State NMR
○畝亮太[1]，不破寛規[1]，大橋竜太郎[2]，井田朋智[2]，水野元博[2,3]（[1]金沢大学理工学域物質化学類，[2]金沢大学大学院自然科学研究科，[3]金沢大学新学術創成機構）

P74 Y　多孔性配位高分子の空隙に物理吸着させた気体分子のダイナミクス
Dynamics of gas molecules in porous coordination polymers.
○田村優実，犬飼宗弘，中村浩一（徳島大学大学院 理工学研究科）

P75　擬単結晶試料を用いた単結晶NMR法による四極子結合テンソルの解析
Determination of quadrupole coupling tensor by single-crystal NMR measurement using magnetically oriented microcrystal arrays
○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]，藤戸輝昭[2]，清水禎[2]（[1]京大・院農，[2]物材機構）

P76 Y　結晶多形を示すシンジオタクチックポリスチレンの固体NMR法を用いた結晶構造解析
Crystal structure analysis of syndiotactic polystyrene showing a crystal polymorphism by solid-state NMR method
○伊藤美翔，吉水広明（名古屋工業大学大学院 工学研究科）

P77　NMR法による種々の高次構造を形成する液晶性ポリエステルの気体輸送特性評価
A Gas Transport Properties of liquid crystalline polyester to form various conformation by NMR method
○石神稜大，吉水広明（名工大院・工）

P78　^{31}P固体NMRによる抗菌ペプチドボンビニンH2およびH4の細菌模倣膜に対する作用の解析
Analysis of membrane interaction of antimicrobial peptide bombinin H2 and H4 on bacterial mimetic membrane by ^{31}P solid-state NMR
○金田志穂，北橋由貴，内藤晶，川村出（横浜国立大学大学院 工学府）

P79　1.5 T/280 mm水平開口型超伝導磁石のための小動物用勾配磁場コイルの開発と応用
Development and application of an insertable gradient coil for a 1.5 T/280 mm horizontal bore superconducting magnet
○矢野順也，小林優太，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）

P80 Y　楕円筒型勾配磁場コイルの開発と小児骨年齢計測への応用
Development of an oval gradient coil set for child bone age measurements
○松澤晃樹[1]，阿部充志[2]，巨瀬勝美[1]，寺田康彦[1]（[1]筑波大学数理物質科学研究科 電子・物理工学専攻，[2]（株）日立製作所 研究開発グループ）

P81　連続供給超偏極^{129}Xeから固体表面の生体分子上^{13}Cへの超偏極移行
Hyperpolarization transfer from continuously provided hyperpolarized ^{129}Xe to ^{13}C included in bio-molecules on surface of solid-state materials
○服部峰之[1]（[1]産業技術総合研究所・計量標準総合センター・物質計測標準研究部門）

P82 Y 0.2 T永久磁石MRIを用いた屋外樹木中の水輸送計測
Measurement of water transport in an outdoor tree using a 0.2 T permanent magnet MRI
○長田晃佳[1]，福田健二[2]，巨瀬勝美[1]，寺田康彦[1]（[1]筑波大学大学院 数理物質科学研究科 電子・物理工学専攻，[2]東京大学大学院 農学生命科学研究科 森林科学専攻）

P83 動物培養細胞のin-cell NMR要素技術開発の更新とその応用への試み
Technical improvements for advanced in-cell NMR of mammalian cells
○猪股晃介[1,5]，杤尾豪人[2]，伊藤隆[3]，白川昌宏[4]，木川隆則[1]（[1]理化学研究所・生命システム研究センター，[2]京都大学大学院・理学研究科，[3]首都大学東京・理工学研究科，[4]京都大学大学院・工学研究科，[5]JST・さきがけ）

P84 Y グリーンレーザーを用いたアロディニア特異的な痛みに対する鎮痛薬評価に関するfMRI研究
An fMRI study for the evaluation system of analgesic agents on allodynia-specific pain using the green laser
○杠直哉[1]，吉永壮佐[1]，武田光広[1]，佐藤博司[2]，寺沢宏明[1]（[1]熊本大学大学院 生命科学研究部 構造生命イメージング分野，[2]ブルカー・バイオスピン株式会社 アプリケーション部）

P85 細胞分散系のPFG-NMRと誘電分光による膜損傷に伴う水とイオンの運動性の変化
The influence of water and ion dynamics in cell suspension induced by membrane lesion.
○青山剛志[1]，斉藤宏伸[2]，川口翼[2]，喜多理王[3]，新屋敷直木[3]，八木原晋[3]，福崎稔[4]，伊藤敦[5]，浅見耕司[6]（[1]東海大学大学院理学研究科，[2]東海大学大学院総合理工学研究科，[3]東海大学理学部，[4]東海大学熊本情報教育センター，[5]東海大学工学部，[6]京都大学化学研究所）

P86 Y 細胞内におけるALS関連タンパク質SOD1のフォールディングに 関する動的構造解析
Structural dynamic analysis of SOD1 in living cells
○岩川直都[1]，森本大智[1]，ヴァリンダエリック[2]，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，[2]京都大学大学院・医学研究科）

P87 酸化ストレスに対するTrxの細胞内分子応答のin-cell NMR観測
Real-time observation of intracellular oxidative stress response using in-cell NMR
○望月綾野[1]、佐宗新[1]、久保智史[1]、西田紀貴[1]、嶋田一夫[1]（[1]東京大学・大学院薬学系研究科）

P88 Y NQR用低インピーダンス送受信回路の開発
Development of a low impedance transceiver circuit for NQR
○大田垣祐衣，大平龍太郎，宮戸祐治，赤羽英夫（大阪大学・大学院・基礎工学研究科）

P89 新規ランタノイド結合タグを用いたヒト培養細胞内蛋白質のin-cell PCS解析
A new carbamidemethyl-linked lanthanoid chelating tag for PCS NMR spectroscopy of proteins in living HeLa cells.
彦根佑哉[1,2]，平井剛[2,3]，三島正規[1,4]，猪股晃介[5,6]，池谷鉄兵[1,4]，○新井崇一郎[1]，白川昌宏[3,7]，袖岡幹子[2,3]，伊藤隆[1,4]（[1]首都大学東京大学院理工学研究科，[2]理化学研究所袖岡有機合成化学研究室，[3]AMED-CREST，[4]CREST/JST，[5]理化学研究所生命システム研究センター，[6]PRESTO/JST，[7]京都大学大学院工学研究科）

P90 Y NMR-NQR二重共鳴法を用いたNQR信号高感度化
NMR-NQR double resonance technique for enhancement of NQR signals
○大平龍太郎，大田垣祐衣，韓猛，宮戸祐治，赤羽英夫（大阪大学・大学院・基礎工学研究科）

P91 MRIを用いた小児骨年齢測定へのDeep Learningの応用
The application of deep learning to pediatric bone age measurements using MRI
○皆川新[1]，寺田康彦[1]，巨瀬勝美[1]（[1]筑波大学・大学院・数理物質科学研究科）

P92 理論化学シフト・スピン結合定数と構造相関モデル式を用いた代謝混合物同定法の構築
Development of assignment method of metabolic mixtures by using structural correlation analysis with theoretical chemical shifts and spin-spin coupling constants
○尾渕由佳[1]，伊藤研悟[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）

P93 オーバーハウザー効果に現れる非線形性と非平衡熱力学的特徴
Non-Linearity and non-equilibrium thermodynamical characteristics appearing in the Overhauser effect
○戸田充[1,2]，藤井裕[1]，光藤誠太郎[1]，出原敏孝[1]（[1]福井大学・遠赤外領域開発研究センター，[2]（株）JEOL RESONANCE・技術部）

P94 極低温下での動的核偏極のためのENDOR共振器の開発
Development of an ENDOR resonator for dynamic nuclear polarization at very low temperature.
○竹盛勝彦[1]，香川晃徳[1]，根来誠[1]，北川勝浩[1]（[1]大阪大学大学院 基礎工学研究科）

P95 円筒型マルチサーキュラーシムコイルを用いたダイナミックシミングシステムの開発
Development of dynamic shimmin system using a cylindrical multi-circular shim coil
○山田諒太[1]，寺田康彦[1]，巨瀬勝美[1]（[1]筑波大学 数理物質科学研究科 電子・物理工学専攻）

P96 NMR向け高温超電導バルク磁石の高磁場化への課題
Challenge to the higher magnetic field of the high temperature superconducting bulk magnet for NMR
○仲村高志[1]，内海博明[2]，柳陽介[3]，伊藤佳孝[3]，内藤智之[4]，藤代博之[4]（[1]理化学研究所・環境資源科学研究センター・技術基盤部門・分子構造解析ユニット，[2]JEOL RESONANCE，[3]イムラ材料開発研究所，[4]岩手大学理工学部、物理・材料理工学科）

P97 広帯域―多核対応型クライオコイルMASプローブの開発
Development of Broadband-Multinuclear Cryocoil MAS-NMR probe
○水野敬[1]，戸田充[1]，中井利仁[1]，芦田淳[1]，根本貴宏[1]，藤岡耕治[2]，最上祐貴[3]，清水禎[3]，竹腰清乃理[4]（[1]（株）JEOL RESONANCE，[2]（株）クライオウェア，[3]物質・材料研究機構，[4]京都大学大学院・理学研究科）

P98 大気非曝露型MASプローブの開発
Development of a MAS probe to prevent sample from exposure to the atmosphere
○内林渓[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）

P99 TD-NMRによる化粧品の評価
Evaluation of cosmetics by TD-NMR
○原英之（ブルカー・バイオスピン株式会社）

P100 Nafionの水アルコール混合溶液中の分散状態の19Fのスピン緩和速度プロファイル測定による検討
Dispersion of Nafion in water-alcohol mixtures studied by 19F spin-lattice relaxation rate profiles
○山口真[1]，松永拓郎[2]，雨宮一樹[3]，大平昭博[1,4]，長谷川直樹[2]，篠原和彦[1]（[1]技術研究組合FC-Cubic，[2]豊田中央研究所，[3]トヨタ自動車，[4]産総研）

P101 活性炭細孔径の^{129}Xe-NMRによる検討
Study of pore size distribution of Activated carbon using ^{129}Xe-NMR
○出田圭子[1]，秦弘一郎[2]，吉鉉植[1]，中林康治[1,2]，持田勲[3]，尹聖昊[1,2]，宮脇仁[1,2]（[1]九州大院総合理工学府，[2]九州大先導物質化学研究所，[3]一般財団法人九州環境管理協会）

P102 Y Satellite transition selective {^{27}Al}/^{1}H *D*-HMQC experiment at very fast MAS for the determination of quadrupolar coupling constants
○Nghia Tuan Duong[1], Manoj Kumar Pandey[1,2], and Yusuke Nishiyama[1,2]（[1]RIKEN CLST-JEOL collaboration center, [2]JEOL RESONANCE Inc.）

P103 ^{14}N/^{14}N correlations at fast magic angle spinning (MAS) solid-state NMR to distinguish parallel and antiparallel beta-sheet forming alanine tripeptides
Manoj Kumar Pandey[1,2], Jean-Paul Amoureux[3,4], Tetsuo Asakura[5] and Yusuke Nishiyama[1,2]（[1]JEOL RESONANCE Inc., [2]RIKEN CLST-JEOL NMR Collaboration Center, [3]Shanghai Key Laboratory of Magnetic Resonance, School of Physics and Materials Science, East China Normal University, [4]UCCS (CNRS-8181), Lille University, [5]Department of Biotechnology, Tokyo University of Agriculture and Technology）

P104 Y Simultaneous observation of ^{1}H detected ^{13}C/^{1}H and ^{15}N/1H 2D correlation solid-state NMR spectra in natural abundance at very fast MAS > 60 kHz
You-lee Hong[1] and Yusuke Nishiyama[1,2]（[1]RIKEN Center for Life Science Technologies, JEOL Collaboration Center, [2]JEOL RESONANCE Inc.）

P105 赤潮発生予測の精度向上を図る環境評価技術の構築
Integrative environmental profiling for a better prediction of red-tide outbreaks
○大島嵩裕[1]，内宮万里央[2]，松本朋子[2]，朝倉大河[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）

P106 Y パルスODMRを用いた磁気センシング
Magnetic field sensing using Pulsed ODMR
○田辺竜太郎[1]，五十嵐龍治[1]，白川昌宏[1]（[1]京都大学大学院 工学研究科）

P107 ナノダイヤモンドによる分子標識技術
Establishment of selective molecular labeling system by nanodiamond
○寺田大紀[1]，外間進悟[1,2]，五十嵐龍治[1]，白川昌宏[1]（[1]京都大学工学研究科，[2]中央研究院原子分子科学研究所）

第一日目
11月16日（水）
日本語セッション

Day 1（Nov. 16, Wed）
（Japanese Sessions）

L1-1

$PbSnF_4$ 固体イオン伝導体のダイナミクス解析

○村上美和，森田善幸
京都大学・産官学連携本部

Dynamics study of ionic conductivity in $PbSnF_4$

○Miwa Murakami, Yoshiyuki Morita
Office of Society-Academia Collaboration for Innovation, Kyoto University

$PbSnF_4$ has long been known to show high anionic conductivity, and various structural studies have been done to elucidate the relationship between its structure and the conduction properties. The β-$PbSnF_4$ crystalline form with its conductivity in the order of 10^{-3} Scm^{-1} has been considered as a two-dimensional super ionic conductor, in which the F^- ion moves in the crystallographic plane normal to the *c* axis. In this work, we applied high-resolution solid-state NMR for ^{207}Pb, ^{119}Sn, and ^{19}F to examine dynamical features of β-$PbSnF_4$. NMR lineshapes and spin-lattice relaxation times (T_1) were measured as a function of temperature. The ^{119}Sn T_1 data was fitted using the BPP equation with the correlation time being expressed by the Arrhenius equation. It is shown that the mechanism that governs the T_1 relaxation of ^{119}Sn is the fluctuation of the CSA interaction.

$PbSnF_4$は1970年代よりフッ化物イオン伝導性や結晶構造が研究されており[1]、最近では高イオン伝導性を示す新たな結晶相も発見されているが[2]、イオン伝導のメカニズムに関する知見は少ない。$PbSnF_4$のβ相は-(Sn-F-Pb-F-Pb-F-Sn)-の層構造を持ち、高フッ化物イオン伝導性を示すことが知られている。本研究では、この既知の結晶相であるβ相について、^{19}F、^{119}Sn、^{207}PbのNMR線形やT_1の温度依存性と磁場依存性を解析することにより、各スピンのダイナミクスとイオン伝導性の関係を検討した。

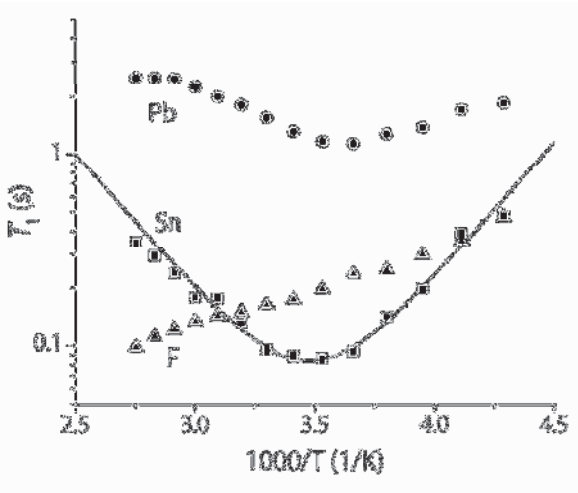


Fig. 1. Temperature dependence of the ^{19}F (triangle), ^{119}Sn (square), and ^{207}Pb (circle) spin-lattice relaxation times (T_1) for β-$PbSnF_4$.

Fig.1に14 Tで測定したT_1の温度依存性を示す。室温での^{119}SnのT_1は0.1秒以下と極端に短く、40~-20℃では^{19}Fより^{119}Snの緩和時間が短かった。Sn自体は不動と考えられることから、これは周囲の伝導しているFの運動を反映した結果であり、高イオン伝導性を考える手がかりになる。

この試料の^{119}Sn T_1には２つの緩和機構が考えられる。ひとつは、^{119}Sn-^{19}Fの異種核間双極子相互作用の揺らぎであり、もうひとつは^{119}Snの化学シフトの異方性(CSA)の揺らぎである。等方的な運動によるスピン*I-S* (*I*:^{119}Sn 、*S*:^{19}F)の緩和速度は式(1),(2)とアレニウスの式(3)で表される[3,4]。

イオン伝導体、ダイナミクス、緩和機構

○むらかみみわ，もりたよしゆき

$$\left(\frac{1}{T_1}\right)_{\mathrm{D}} = \frac{2\hbar^2}{15}\frac{\gamma_I^2\gamma_S^2}{r^6}S(S+1)\ \left[J(\omega_I-\omega_S)+3J(\omega_I)+6J(\omega_I+\omega_S)\right] \qquad (1)$$

$$J(\omega) = \frac{\tau}{1+\omega^2\tau^2} \qquad (2)$$

$$\tau = \tau_0 \exp(E_{\mathrm{a}}/RT) \qquad (3)$$

ここで、E_{a} は活性化エネルギーであり、τ_0は温度無限大での相関時間である。
Sn-F 間距離を約 0.2 nm とすると T_1 の最小値は約 6.5s と計算され、測定で得られた約 85ms の約 100 倍に相当する。この結果から ^{119}Sn-^{19}F 異種核双極子相互作用による緩和機構は否定された。

CSA による緩和速度は以下の式で表される [3,4]。

$$\left(\frac{1}{T_1}\right)_{\mathrm{CSA}} = A\,J(\omega_I)\ . \qquad (4)$$

ここで、等方的な運動における A 項は以下で与えられる。

$$A = \frac{2}{15}\gamma_I^2 B_0^2 \Delta\sigma^2\left(1+\frac{\eta^3}{3}\right) \qquad (5)$$

$$\Delta\sigma = \sigma_{ZZ} - \frac{1}{2}(\sigma_{XX}+\sigma_{YY}) \qquad (6)$$

$$\eta = \frac{\sigma_{YY}-\sigma_{XX}}{\sigma_{ZZ}} \qquad (7)$$

$$|\sigma_{ZZ}| \geq |\sigma_{XX}| \geq |\sigma_{YY}|\ . \qquad (8)$$

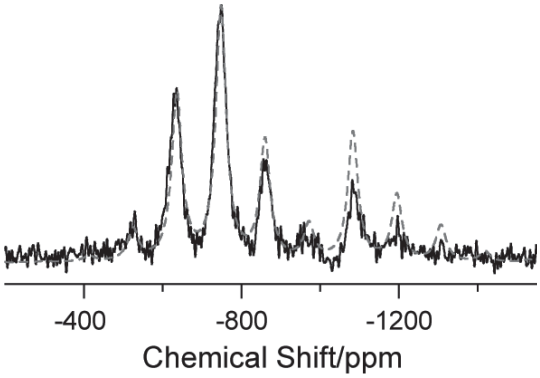


Fig. 2. ^{119}Sn MAS spectrum for β-PbSnF$_4$. The broken line is a simulated one.

式(3)、(4)で実験データをフィッティングした結果(Fig.1 の実線)、A = (3.35 ± 0.05) ×10^{10} (s^{-2}), τ_0 = (6.0 ± 2.0) ×10^{15} (s), E_{a} = 27.0 ± 0.1 (kJ/mol)となった。η=0と仮定すると得られた A 値からΔσの絶対値は約 355 ppm となった。Fig.2 にβ- PbSnF$_4$ の ^{119}Sn MAS スペクトルと計算線形 (σ_{ZZ} = -1360 ppm, σ_{YY} = -585 ppm, σ_{XX} = -635 ppm)を示す。線形から得られたΔσ は約-750 ppm、η は約 0.04 となった。ここで得られたΔσは ^{119}Sn の CSA から、T_1 を支配する運動で平均化している部分(|Δσ|～355ppm)を除いたものと考えられ、運動がない場合の ^{119}Sn の Δσ は-1100 ppm と推定される。これらの値は ^{119}Sn の値として妥当であり、^{119}Sn の緩和機構は CSA を決めている周囲の F の異方的な運動による CSA の揺らぎであると結論した。Fig.2 から遮蔽側の CSA テンソル成分が運動でより平均化されていることが示されている。(Sn-F-Pb-F-Pb-F-Sn)構造からは Sn の F 側が遮蔽側と考えられ、Sn 層と Pb 層にはさまれた F のイオン伝導を担う運動が ^{119}Sn の緩和を CSA を通じて支配していることが示唆された。^{19}F や ^{207}Pb の緩和とイオン伝導の関係に関しては講演で述べる。

References

(1) J.M. Reau *et al*., Study of Structural and Electrical Properties of a New Anion Conductor - PbSnF$_4$, *Mater. Res. Bull*., **13**, 877-882 (1978).
(2) M. Murakami *et al*., to be submitted.
(3) A. Abragam, Principles of Nuclear Magnetism, Oxford, 1961.
(4) H.W. Spiess, Dynamic NMR Spectroscopy (NMR: Basic Principles and Progress, vol. 15), P. Diehl, E. Fluck, and R. Kosfeld, Eds., Springer-Verlag, New York, 1978.

謝辞　本研究は、新エネルギー・産業技術総合開発機構(NEDO)、革新型蓄電池実用化促進基盤技術開発事業(RISING Ⅱ)の下で実施された。

L1-2

アルミラミネート型全固体リチウム二次電池の^{7}Li-NMRイメージング法：正極，固体電解質，およびLi箔について

○拝師智之 [1]，藤木聡 [2]，相原雄一 [2]
1）株式会社エム・アール・テクノロジー(つくば市)，
2）株式会社サムスン日本研究所

^{7}Li-NMR imaging for aluminum-laminated all-solid-state rechargeable lithium battery

○Tomoyuki HAISHI [1], Satoshi FUJIKI [2], Yuichi AIHARA [2]
[1] MRTechnology, Inc., Tsukuba, Ibaraki, JAPAN, [2] Samsung R&D Institute Japan Co. LTD

A feasibility of ^{7}Li-NMR imaging for aluminum-laminated all-solid-state rechargeable lithium batteries has investigated. The NMR/MRI measurement of aluminum-laminated samples was believed impossible because the aluminum-lamination around any Li batteries prevents to penetrate radio frequency waves of ordinal NMR excitation and detection to/from a measurement ^{1}H/^{7}Li subject inside. However, we have discovered that NMR/MRI measurements of the aluminum-laminated lithium objects can be performed in a proper orientation of the B_1 excitation pulse to the sample's lamination plane. A 4.7-Tesla wide-bore NMR magnet, digital NMR/MRI console, 3-axis gradient coil, and solenoid coil were employed. The TX power for the B_1 excitation was less than 50 W for 120 μs. Packages of working electrode (e.g., graphite, LiV_2O_5), sulfide based solid-state electrolyte, Li-foil, of which sizes were $(20mm)^2$ square, and Al/Cu current collectors, were successfully measured with 2D/3D/CSI sequences in a few minutes to several hours.

＜背景＞

これまでリチウム二次電池を構成する ^{1}H，^{6}Li，および ^{7}Li を直接的に計測できる NMR は，リチウム電池の研究開発において大きな役割を果たしてきた。いっぽうで，アルミラミネートで封じた電池に関しては，NMR 計測に必要な高周波パルスあるいは NMR 信号そのものがアルミ箔を通過しないことを主な要因として，NMR 計測の範疇として考慮されてこなかった。本研究は，アルミラミネート型全固体リチウム二次電池について，NMR 計測法や NMR イメージング法を一般的に適用できる手順および当該二次電池の評価手法の開拓を目的としておこなった。

＜NMR/MRI 計測を可能とするアルミラミネートの封じ方＞

NMR 計測は計測対象核種に応じた共鳴周波数における，高周波磁場の送信と受信によって，成立している。アルミ箔は厚さ 50μm 程度で，数十から数百 MHz の高周波磁場を遮蔽する能力は充分にある。いっぽうで，本研究では，電池をパッケージする際のアルミラミネートは，必ずしも全体が電気的に接続されていなくてもよい点に着目した。NMR 計測のために，アルミ箔 2 枚以上を貼り合わせるときに接合部の「糊」を厚めかつ「糊代」を幅狭くすることで，平板型アルミラミネート電池の面方向に逆らわず，高周波磁場が通過できるようにした。予備実験として，シリコンゴム板(厚さ 0.5mm~5mm，幅 20mm)を，アルミ箔を 2 枚，複数枚，C 字状等で挟むことで約 30mm 幅の試験模擬体をいくつか作成し，1.5T/280mm の超電導磁石を用いて，^{1}H-NMR イメージングを行った。高周波検出コイル(^{1}H-64MHz)の高周波磁場方向を，アルミラミネート面の広がりに対して必ず平行に配置し，高周波磁場がアルミラミネートの隙間を通過できる配置において，均一な信号分布の MRI 計測が，定常の照射パルスによって実現できた。

---

laminate, MRI, Lithium

○はいしともゆき，ふじきさとし，あいはらゆういち

＜^{7}Li-NMR/MRI 用ハードウェアおよび Li 被検体＞

静磁場強度 4.7T/89mm の NMR 用縦型超電導磁石(^{7}Li-78.45MHz)，デジタル NMR/MRI 分光計(自作)，三軸勾配磁場コイル（桶底対向型，自作)，およびソレノイド型 RF コイル(Fig.1，開口 29mm×3mm，自作)を用いた。使用した RF パルスは最大 50W/120μ 秒であった。

作用極(Graphite，バナジウム他)，固体電解質(硫黄系 SE)，対極（Li 箔）について各約(20 mm)^{2} を準備し，Al/Cu 集電体を適宜組合せたアルミラミネートパッケージ(Fig.2)を作成した。本ハードウェア構成を用いて NMR 信号は固体電解質からは容易に，Li 箔については比較的容易に収集することができた。Fig.3 に示す通り SE+Li 箔の ^{7}Li-NMR スペクトルには 242ppm のケミカルシフトがあった。複数枚の 2D 勾配エコー撮像法によって画像計測した T_2*値はそれぞれ SE：2.3ms，および Li 箔：0.6ms であった。バナジウム極については，配合した SE からと思われる NMR 信号が確認できた。Graphite 極に dope された Li については NEX 回数 1 では SNR が非常に乏しい状況で，T_2 および T_2*が 0.5ms を大きく下回るような短さであることを確認した。

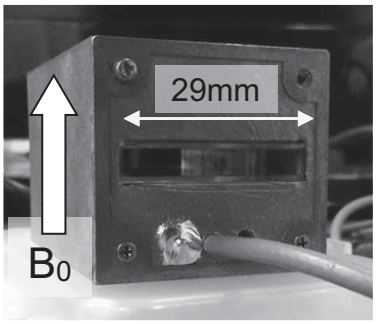


Fig.1 rf-solenoid imaging coil

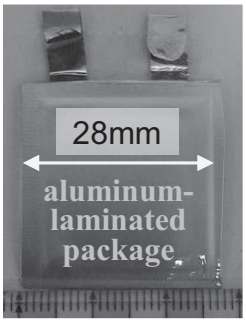


Fig.2 Li-sample

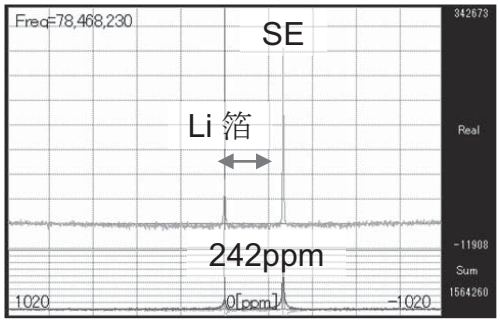


Fig.3 ^{7}Li -NMR-Spectrum of SE +Li-foil

＜^{7}Li-NMR イメージング結果：固体電解質 SE＋Li 箔のアルミラミネート＞

Fig.4 は，三つの個別アルミラミネート試料(28mm)^{2} を重ねて同時に 2D 撮像した結果である。MRI 分光計の中心周波数を左図は SE に，右図は Li 箔に合わせた場合である。Fig.5 は，Fig.4 左図を上方から透視した様子の 2D スピンエコー投影像である。Fig.6 はアルミラミネート内の Li 箔の CSI 画像(TE=0ms)を，MIP として 2D 画像としたものである。

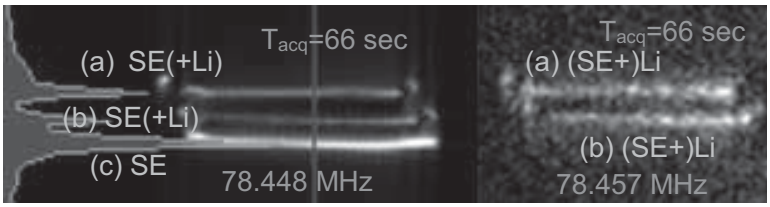


Fig.4 Stack of three aluminum-laminated samples

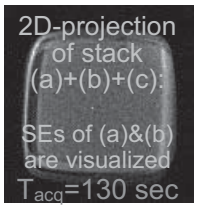


Fig.5 SE-MRI

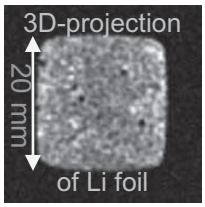


Fig.6 ^{7}Li-MRI

＜結語＞

アルミラミネート型全固体リチウム二次電池の NMR および MRI 計測について，作用極，固体電解質，および Li 箔に分解されたものおよび組み合わされたパッケージについて，定量化手法につなげるための初期検討を行った。アルミ箔が高周波磁場シールドとして作用しないように既述の方法でうまく貼り合わせたうえで，検出コイルの高周波磁場方向をアルミ箔に平行に合致させることで，アルミラミネート型電池セルの NMR 計測を可能とした。さらに，NMR イメージングによって，ラミネートパッケージ内の NMR/MRI 計測が均一に出来ていることも確認できた。固体 Li 箔の可視化に成功した。今後は，SE 内で生成する Li 塊，SE=Li 箔の界面，さらには Graphite 極内に dope された Li 等の検出・評価が可能かどうかを見極める予定である。

L1-3

含水状態における絹の構造および水との相互作用に関するNMR研究

○田制侑悟[1]，平沖敏文[1]，松田裕生[1]，片岡奈緒美[1]，大窪貴洋[2]，朝倉哲郎[1]
[1] 東京農工大学大学院　工学研究科
[2] 千葉大学大学院　工学研究科

NMR study of the structures of hydrated silks and the interaction with water

○Yugo Tasei[1], Toshifumi Hiraoki[1], Hironori Matsuda[1], Naomi Kataoka[1], Takahiro Ohkubo[2], Tetsuo Asakura[1]
[1] *Department of Biotechnology, Tokyo University of Agriculture and Technology, Koganei, Tokyo, Japan*
[2] *Department of Engineering, Chiba University, Chiba, Chiba, Japan*

The mechanical properties of silk fibers, such as elasticity and tensile strength, change remarkably upon hydration. However, the microscopic interaction with the fibers and water molecules is not well understood yet on a molecular level. In this study, the structures of *Bombyx mori* silk cocoon fiber, silk sericin (powder and fiber) and silk fibroin fiber in the hydrated state were determined by using ^{13}C NMR, that is, refocused-INEPT, DD/MAS and CP/MAS NMR. Moreover, the dynamics of water molecules interacting with the silks was studied by ^{2}H solution NMR relaxation (T_1 and T_2) measurements in the silks-$^{2}H_2O$ system. Using an inverse Laplace transform algorithm, we were able to identify distinct several components in the relaxation times of $^{2}H_2O$. Other hydrated silks were analyzed by using similar NMR methods. Our measurements provide new insight relating the characteristics of the hydrated structure of silks and water molecules which are relevant in light of current interest in the design of novel silk-based biomaterials which are usually used in body fluids and blood.

家蚕が産生する繭は絹フィブロインと絹セリシンで構成されるタンパク質である。絹フィブロイン繊維は繊維の女王としてよく知られているが、機械的特性の点でも高強度と高弾性を併せ持つ優れた素材である。さらに含水状態での高い生体適合性、高い酸素ならびに水蒸気透過性、適度な生分解性といった優れた特徴をもつため、再生医療材料としても極めて魅力的である。

一般に再生医療材料は動物の体内で使用するため水にさらされており、水和状態における絹タンパク質の構造や特性そして水との相互作用の情報は再生医療材料として絹タンパク質を利用するうえで不可欠である。しかしながら、含水状態における様々な絹の構造や水との相互作用については、現在、分子レベルで十分に解明されているとは言い難い。

本研究は、NMRを用いて含水状態における様々な絹の構造および水との相互作用について知見を得、それを集積することを目的とした。含水状態での絹の構造とダイナミクスを^{13}C 固体NMRによって検討し、また絹と相互作用した重水のダイナミクスを^{2}H 溶液NMR T_1-T_2 相関の測定によって検討した。本稿では、家蚕絹の結果についてまとめた。

【実験】^{13}C ラベルおよびノンラベル家蚕繭、繭から精練により得た絹フィブロイン繊維、熱水抽出して得た家蚕絹セリシン粉末、セリシン蚕由来の絹セリシン繊維（農研機構の寺本博士より恵与）を実験に供した。12時間以上含水させた試料について、Bruker Avance400を用いて^{13}C CP/MAS, DD/MASおよびrefocused-INEPT NMR測定を行った。一方、各種絹存在下での重水の^{2}H溶液NMR緩和時間(T_1, T_2)の測定は、JEOL ECX400を用いた。得られたデータについて逆ラプラス変換を行い、2D^{2}H T_1-T_2相関マップを作製した。同様の実験を他の絹についても行った。

絹，固体NMR，緩和時間測定

○たせいゆうご，ひらおきとしふみ，　まつだひろのり，かたおかなおみ，おおくぼたかひろ，あさくらてつお

【結果と考察】

^{13}C 各種固体 NMR 測定＜含水状態の家蚕絹セリシン粉末、絹フィブロイン繊維、繭の挙動＞

Fig.1に水和したノンラベル絹セリシン粉末および絹フィブロイン繊維の^{13}C固体NMRスペクトルを示す。絹セリシンの場合、運動性の高い残基を選択的に観測したr-INEPT(Fig.1 A)では、多種類の残基由来のランダムコイルシグナルのみが出現する。一方、運動性の低い残基を選択的に観測したCP/MAS (Fig.1 C)では、βシート構造とランダムコイルの双方が観測される。その割合は絹セリシン粉末の^{13}CβラベルSer, Tyr, Ala残基のCP/MAS測定から決定できた。

このようにβシート構造域の残基はすべて含水状態でも水和することがないが、ランダムコイル域は水和される残基とされない残基があることがわかる。また、56ppm付近のSer残基Cαピークの強度は側鎖Cβピークよりも明らかに大きい。これはCα-Cβ軸回りの早い回転のためCβピークのCP効率が低下したためである。DD/MAS(Fig.1 B)は、r-INEPTの場合と類似しており、絹セリシンは全体としては十分に水和し、高い運動性を有すると言える。

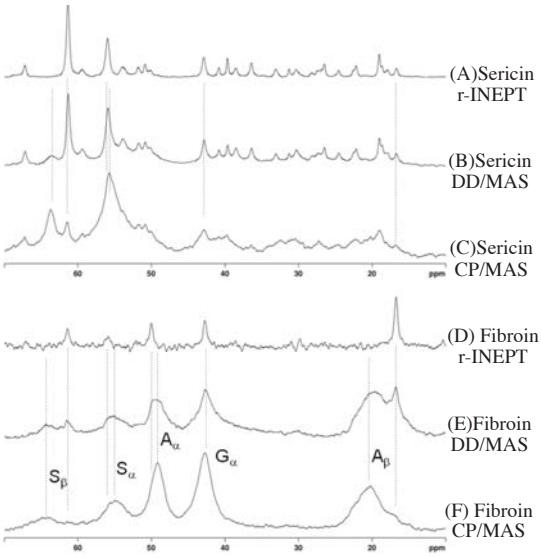


Fig.1 ^{13}C r-INEPT, DD/MAS and CP/MAS NMR spectra (10-70 ppm) of natural abundance silk sericin (upper three spectra) and silk fibroin (lower three spectra) in the hydrated state.

一方、絹フィブロインのr-INEPT(Fig.1 D)は、同様にランダムコイル構造を示す成分が観測されるがDD/MAS(Fig.1 E)と比較すると、その量は少ないことがわかる。CP/MAS(Fig.1 F)はβシート構造とランダムコイルが観測されるが、前者の方が圧倒的に多い。また、繭の水和試料ではCP/MASスペクトルは絹フィブロイン、r-INEPTスペクトルは絹セリシンのパターンを示す。繭の水和は表面の絹セリシン部分で起こり、絹フィブロイン部分には及んでいないことがわかる。

^{2}HT_1-T_2 測定＜家蚕絹セリシン繊維、絹フィブロイン繊維、繭存在下での重水の挙動＞

2D^{2}H T_1-T_2相関マップにおいて、T_1=T_2の対角線上にある最もT_1,T_2 値の大きいスポットはNMR管中で絹試料の外に存在する自由水である。絹との相互作用に伴って水の運動が低下すると、T_1,T_2 値が小さい所にスポットが現れる。Fig.2に、絹セリシン繊維存在下での重水の^{2}H T_1-T_2 相関を示す。A-Eのスポットが観測された（%は相対強度を示す）。Aのスポットは、対角線からわずかにずれ、それ以外の各スポットは、BからEまで徐々に運動性が低下していくことを示す。これは、重水と絹セリシンとの相互作用が大きくなって運動性が低下することを意味する。最も含量の多い水は、スポットC（34%）の場合である。

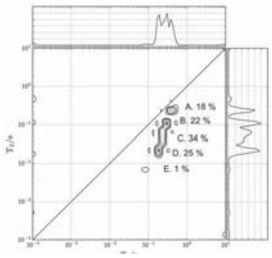


Fig. 2 ^{2}H T_1-T_2 correlation map of $^{2}H_2O$-silk sericin fiber

また、T_1値よりT_2値の変化量が大きいが、これは異なるスポット間にある水分子間の交換の寄与がT_2の緩和機構に加わるためと考えられる。

Fig.3は、絹フィブロイン繊維存在下での重水の^{2}HのT_1-T_2相関を示す。自由水Aのスポットの含量が多く、絹セリシンの場合と様子が著しく異なる。さらに、より運動性の束縛されたスポットFが新たに観測される。このように水のダイナミクスの様子は、絹材料間で著しく異なる。

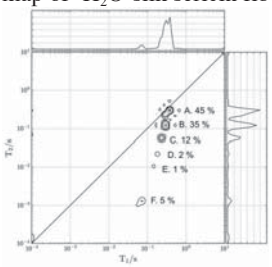


Fig. 3 ^{2}H T_1-T_2 correlation map of $^{2}H_2O$-silk fibroin fiber system

＜謝辞＞本研究は一部、平成 26 年度科研費基盤 A（課題番号 26248050）、ImPACT プロジェクトならびに笹川（財）研究助成により実施された。

L1-4

２次元交換ＮＭＲの交換速度に対する３スピンフリップ－フロップの影響

○大橋 竜太郎[1]，水野 元博[1]
[1]金沢大学・大学院・自然科学研究科

Effects of 3 spin flip-flop for exchange rate in 2D exchange NMR

○Ryutaro Ohashi[1], Motohiro Mizuno[1]
[1] *Graduate school of Natural Science and Technology, Kanazawa University*

Abstract
^{13}C-^{13}C 2D exchange NMR is generally applied for structural analysis of biomolecules, etc. In these structural analysis, 3D structure of molecules is calculated by distance information obtained from exchange rate in 2D exchange NMR. In this study, analytical formula was obtained in three or more ^{13}C nuclei. This formula of exchange rates indicates that phenomena like flip-flop in three spins (“3 spin flip-flop”) enhances exchange rates. Since 3 spin flip-flop enhances exchange rates even for long distance between two ^{13}C nuclei, accuracy of distances obtained by exchange rates is significantly decreased. Randomly labeled sample, such as natural abundance sample, is useful to remove the effects of 3 spin flip-flop because such sample can be considered summation of many kinds of two spin systems.

【序】固体NMRを用いた炭素原子核間の距離の解析は古くから行われており、特に２スピンのみラベルした試料では、R2等に代表される手法を用いて、高精度な結果を得ることができる。また、多スピン系の試料でも、R2TRのように２スピンずつ励起することで距離を求める手法も開発されている。多スピン系の試料の炭素間距離を同時に求めるための手法も数多く研究されてきているが、２スピン系で得られる精度と比べると、実験的に決められる距離の精度はかなり低い。本研究では、DARR法を用いた２次元交換NMRにより求められる炭素間距離の精度を上げることを目的に単体のアミノ酸の解析を行った。

【実験】試料には、２スピン系の試料として 2,3-$^{13}C_2$-l-alanine, 1,2-$^{13}C_2$-l-leucine, 1,2-$^{13}C_2$-l-serine, $^{13}C_2$-l-glycine を用いた。また多スピン系の試料として $^{13}C_3$-l-alanine, $^{13}C_5$-l-valine を用いた。本要旨では 2,3-$^{13}C_2$-l-alanine, $^{13}C_3$-l-alanine についての結果を紹介する。

固体NMR測定には、$^{13}C_5$-l-valine のみ 11.7 T (^{1}H 500 MHz)、他の試料は 6.9 T (^{1}H 295 MHz) の磁場で分光器はそれぞれ ECA500, ECA300 を用いた。

【理論：3 spin flip-flop】N個の炭素からなる系に対し A. Kubo et al. と同様の計算を行うと[1]、ある炭素A，B間のNスピン系での交換速度は、

$$k_{A,B}^{(N)} = k_{A,B}^{(2)} + \frac{1}{4}\sum_{i\neq A,B}(k_{A,i}^{(2)} + k_{B,i}^{(2)}) \quad (1)$$

と表される。ここで $k_{i,j}^{(2)}$は添え字 i, j の２スピンのみの場合の２スピン系での交換速度を示す。この第２項は、Fig. 1 のように３スピン間で間接的にフリップフロップが起こり、交換速度が増えたことを意味する。特に第１項が小さい場合はこの第２項が支配的となるため、遠距離の炭素間でも第1項のみの場合と比べてかなり大きな交換速度となる。また、この３スピンフリップフロップは微視的なスピン束（以下、スピン）間での現象であり、巨視的な磁化のリレーとは異な

２次元交換ＮＭＲ、原子核間距離、炭素１３ラベル試料

○おおはし りゅうたろう，みずの もとひろ

る。J. Jeenerらのモデルを用いる場合[2]、巨視的な磁化のリレーは交換速度を求めた後の交換行列で表すことができる現象であるが、微視的な２スピン、または３スピンフリップフロップは交換行列に代入する交換速度そのものに影響する。従って、多スピン系の２次元交換ＮＭＲでは微視的な３スピンフリップフロップで交換速度の差が小さくなり、さらに巨視的な磁化のリレーにより交差ピーク強度の差が小さくなる。このように多スピン系では交差ピーク強度が均一化されていくため、交差ピーク強度の変化から精度の高い距離情報を引き出すことは困難となることが考えられる。

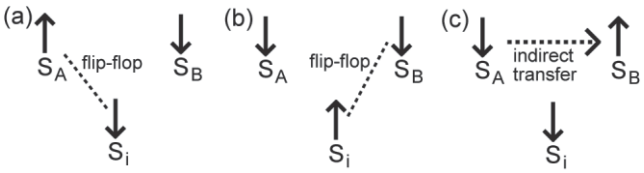


Fig. 1: Model of 3 spin flip-flop.

【炭素間距離の解析】本研究では、天然存在比の試料でDARR照射下での FID を間接観測(t1 次元)、^{1}H decoupling 下での FID を直接観測(t2 次元)とする2次元測定を行い、t1次元のスペクトルを線形解析することでDARR照射下での^{13}C-^{1}Hの双極子相互作用の大きさとDARR照射下でのスピンースピン緩和時間を求めた。また^{13}Cのスピン一格子緩和時間も天然存在比の試料で求めた。次にラベル試料と天然存在比を水溶液中で１：９で混合し再結晶化させた試料に対しDARR法を用いた^{13}C-^{13}C同種核2次元交換NMR測定を行い、異なる相関時間における交差ピーク強度を求めた。先に求めた^{13}C-^{1}Hの双極子相互作用の大きさとスピンースピン緩和時間、スピン一格子緩和時間から交差ピーク強度を計算し、実測と比較することで炭素間距離を解析した。

【結果と考察】上記の方法により、アラニンのメチル基をカルボキシ基の炭素間の交差ピーク強度を計算した結果が Fig. 2(a) である。菱形は実測、実線は計算結果を表す。図のように、炭素間距離が３Åの計算結果は区別できるが、２Åから２．７Åまではほとんど差がなかった。

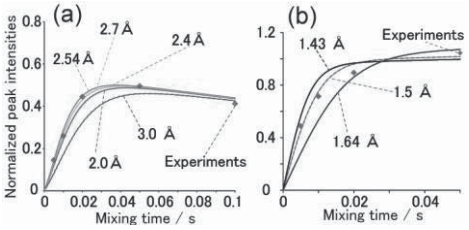


Fig. 2: Mixing time dependences of cross peaks. All experimental points are between upper and lower limits.

次に多スピン系の試料との比較のために同様の解析をメチル基、メチン基をラベルした２スピン系試料に対して行ったところ、Fig. 2(b) のような結果が得られた。フィッティングは手動によるものであるが、炭素間距離が1.5Åのときに最も合っているように見え、計算結果が実測の全ての点を上回る距離が1.43Å、下回る距離が1.64Åとなった。試料は最も交差ピークが強く出る直接結合の２スピンを^{13}Cラベルしたものではあるが、このように２スピン系試料では0.1Å程度の違いでも計算結果に大きく違いが出た。また、最適値とした結果も実際の結合距離と近い値が出た。

【結論】

以上のように、２スピン系試料から１スピン増えるだけでも距離の精度が著しく悪くなることが示された。スピンが増えると(1)式の第２項の数が増え、より精度が悪くなることが考えられる。単結合の結果とはいえ、２スピン系の試料では計算結果が距離に応じて変化することを考えると、２スピン系試料の集まりである低濃度のランダムラベル試料が炭素間距離の解析に適していると考えられる。さらにラベル率の精度、^{13}Ｃの均一度、合成が困難な試料への応用などを考えると、ＳＮ比が低いという固体ＮＭＲの最大の弱点を克服できれば、天然存在比の試料が最も炭素間距離の解析に適しているといえるだろう。

References 1. A. Kubo, et al., J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1, **84**, 3713 (1988).

2. J. Jeener, B. H. Meier, P. Bachmann, and R. R. Ernst, J. Chem. Phys, **71**. 4546 (1979).

【謝辞】本研究は平成24,28年度科研費若手B（16K17850, 24750014）の助成を受けたものである。

L1-5

高磁場DNPの高速定量的シミュレーションによる高効率核磁化増大法の研究

○深澤隼[1]，藤原敏道[1]，松木陽[1]
[1]大阪大学蛋白質研究所

Effective high field solid-state DNP techniques as analyzed by fast quantitative calculation

○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 processes consist 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 program 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, AMUPOL, and TEMTriPol-1 in several situations such as submillimeter-wave double-resonance experiments dependent on the irradiation frequency. We studied optimal conditions for irradiation frequency, irradiation power, biradical molecule, pulse sequence and etc. by using the program code.

【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。

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果と一致するかを検討した。

Dynamic Nuclear Polarization，DNP効率，シミュレーション

○ふかざわじゅん，ふじわらとしみち，まつきよう

【方法】

DNPにおける核の分極効果にはオーバーハウザー効果，固体効果，交差効果があるが，高磁場固体DNPでは交差効果が主要になる[2]。この交差効果とは2電子のスピンのエネルギー差が核スピンのエネルギーに等しくなった際に（交差効果条件），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_{g_i}，核スピンのゼーマン効果H_{Z}，電子-サブミリ波共鳴H_{EM}，電子間双極子相互作用とスカラー相互作用および電子1と核の間の超微細構造によるH_{triple}(電子2-電子1-核)，H_{EE} (電子1-電子2)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交差効果条件が成立する点を通過するときのみ発生するとして正確な計算を行った。この効果による遷移比率は成立点の通過速度に依存し、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[3,4]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7kHz，ビラジカルはTOTAPOL, AMUPOL, TEMTriPol-1 (Fig.1)とした。

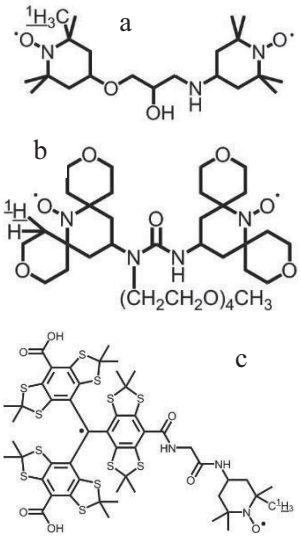


Fig.1. (a) TOTAPOL, (b) AMUPOL, and (c) TEMTriPol-1 with electron and ^{1}H spins.

【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。この図は強度80kHz照射を2.14s間行ったときのDNP効率である。TEMTriPol-1のトリチルラジカルはニトロキシルラジカルよりgテンソル異方性が小さいため、サブミリ波による飽和がより効率良く起こりDNP効率が高くなるという計算結果になるが、これはMathiesらの実験結果[5]によく合っている。

この他、照射強度やパルスシークエンスなど、より良いDNP手法についての考察をシミュレーションの観点から行う。

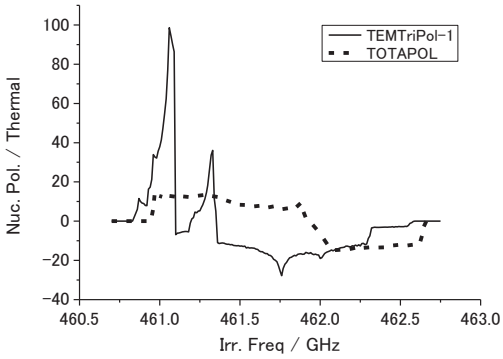


Fig.2. DNP enhancement profile for TEMTriPol-1 and TOTAPOL, after a build-up time of 15k times the MAS period (almost equilibrated).

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)
[4] M. H. Levitt, http://www.southampton.ac.uk/~mhl/resources/Orientations/index.html
[5] G. Mathies, et. al., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **54**, 11770-11774 (2015)

L1-6

超偏極キセノンガスを用いた二次元NMRによるカーボンナノチューブの細孔解析

○藤原英明[1]、木村敦臣[1]、今井宏彦[2]、宮脇仁[3,4]、尹聖昊[3,4]、池田基[4]、吉鉉植[4]、出田圭子[3]、齋藤公児[5]、金橋康二[6]
[1]阪大院・医　[2]京大・学際融合　[3]九大・先導研　[4]九大・総理工　[5]新日鐵住金・技術開発本部　[6]新日鐵住金・先端研

Hyperpolarized ^{129}Xe Aided 2D-NMR Study of Carbon Nanotube Pore Analysis

○Hideaki Fujiwara[1], Atsuomi Kimura[1], Hirohiko Imai[2] , Jin Miyawaki[3,4], Seong-Ho Yoon[3,4], Motoi Ikeda[4], Hyun-Sig Kil[4], Keiko Ideta[3], Koji Saito[5], Koji Kanehashi[6]
[1] Graduate School of Medicine, Osaka University, [2] Center for the Promotion of Interdisciplinary Education and Research, Kyoto University, [3] Institute for Materials Chemistry and Engineering, Kyushu University, [4] Interdisciplinary Graduate School of Engineering Sciences, Kyushu University, [5] R&D Bureau, Nippon Steel & Sumitomo Metal Corporation, [6] Advanced Technology Research Labo., Nippon Steel & Sumitomo Metal Corporation

Hyperpolarized ^{129}Xe NMR/MRI, which has now grown as a candidate for advanced diagnostic tool in basic and clinical medicine, is applied to perform pore analysis of carbon nanotube in the present study. ^{129}Xe spectral pattern observed in one- and two-dimension for a single wall carbon nanotube (SWCNT) is not a simple one that has been observed with a typical adsorption agent such as zeolites. Capillarity that is induced after aggregation of SWCNT is considered to be responsible for the complicated phenomena.

^{129}Xe NMR によるナノ素材の細孔解析は古く 1990 年以前から Fraissard と Ito らにより取り上げられ、ゼオライト等の工業材料への応用の途が開かれた[1]。NMR 法の特徴は化学シフトや緩和時間を通して細孔表面との相互作用を明らかとするばかりでなく、NMR 特有の動的特性の解明が出来ることである。そこでは、交換による線型の変化(広幅化、融合)の観察や 2 次元交換 NMR(2D-EXSY)の適用が有効である。しかし、これら動的特性の測定では、弱い信号の観察が問題となり、^{129}Xe NMR の高感度化が幅広い応用展開に必須の要件となる。本研究では我々が生体系の MRI 観察のために開発してきた超偏極技法による高感度化[2,3]を、ナノ素材解析に適用することを試みた。取り上げたサンプルは Carbon Nanotube (CNT)である。名城ナノカーボン製 eDIPS (細孔径 2.0nm) を熱処理し末端を開孔した Single-Wall CNT (SWCNT)について、10 mg程度を 10 φ試料管に入れ、超偏極 Xe ガスをキャピラリーを通して連続的に試料管底から吹き込み NMR を測定した。^{129}Xe の偏極は天然同位体組成の Xe ガスに 10%の窒素を混合し、110℃で 90W の 795nm レーザー光により行った。レーザー光の半値幅は 2 - 3nm であるため偏極率は 10%程度である。

^{129}Xe NMR の測定は、Agilent INOVA400WA　NMR 装置で行った (^{129}Xe の共鳴周波数は 110.5 MHz)。

常温 (20 ℃) の^{129}Xeスペクトルは図1の通りであり(積算1632回)、40-50 ppm付近にブロードな吸着ピークが観察される。このピークは開孔処理前の試料では観察されないことから、チューブ内に吸着したXeに帰属できる。この40-50 ppmのブロードな信号は、低温の - 30 ℃では、100 ppm

---

超偏極キセノン，カーボンナノチューブ、^{129}Xe 2D-EXSY
○ふじわらひであき，きむらあつおみ、いまいひろひこ、みやわきじん、ゆんそんほ、いけだもとい、きるひょんしっく、いでたけいこ、さいとうこうじ、かねはしこうじ

まで低磁場シフトし、ゼオライト等の吸着ピークと同様の低磁場シフトの傾向を示す（図 2、積算448回)。低温では0 ppmのガス信号に接して10 ppm付近に吸着ピークと同程度の強度の信号が見える（図 2）。この信号は室温でも出ているはずであり、室温では0 ppmのガスピークの幅広い裾ピークとなっていると予想できる。

以上のスペクトルから、SWCNTへのXeの吸着はチューブ細孔内に Xe が吸着される単純な吸着平衡ではなく、もっと複雑な様相がうかがわれる。

２次元交換スペクトル2D-EXSYで見てみると、40～60 ppmにわたり0 ppmのガス相との間に交差ピークが確認できる（図 3、τ_{mix}= 100 ms）。F2軸への投影スペクトルと併せて見ると、40～60 ppmの幅広い信号は、およそ4本の比較的シャープな信号を含むと見られる。

この40～60 ppmの複数本のピークパターンは通常スペクトルで積算回数が非常に少ない段階で観察される傾向がある（図4、積算48回）。これはチューブ内への吸着が動的な性質を有し、時間と共に吸着サイトや吸着状態等に何らかの変化が進み、広幅化することが考えられる。

カーボンナノチューブ（CNT）は複数の管が集合してバンドルを形成したり、さらにそれらが複数折り重なって、間隙としての細孔（capillary）を形成する（aggregation を起こす）ことが知られており、これらの詳細な情報を^{129}Xe NMRが提供し得ると考えられる。

偏極装置に関しては、ナノ素材解析用に適した装置の開発が、医療用とは別に必要と感じられた。

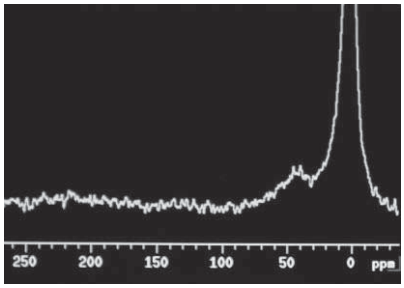


Fig. 1. ^{129}Xe Spectrum adsorbed in SWCNT eDIPS_2.0nm at room temperature, 20 ℃.

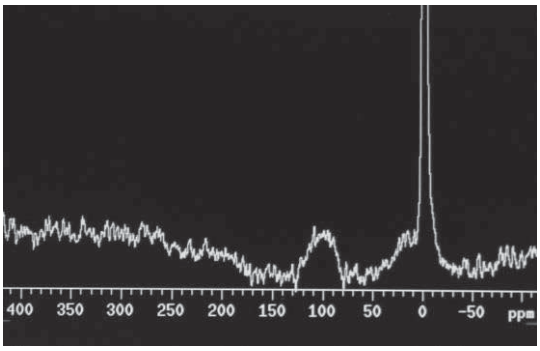


Fig. 2. ^{129}Xe Spectrum adsorbed in SWCNT eDIPS_2.0nm at low temperature, －30 ℃.

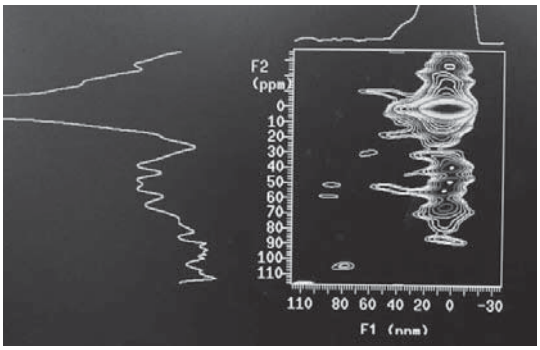


Fig. 3. 2D-EXSY ^{129}Xe spectra adsorbed in SWCNT at room temperature.

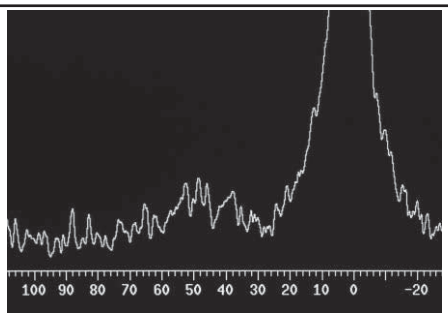


Fig. 4. ^{129}Xe Spectrum adsorbed in SWCNT eDIPS_2.0nm at room temperature. ct= 48.

References

1. J. Fraissard and T. Ito, *Zeolites*, **8**, 350 (1988). 2. A. Kimura, H. Imai, and H. Fujiwara, Continuous Flow and Dissolved Phase ^{129}Xe NMR/MRI for Quantification in Preclinical Study as well as Materials Science, in: T. Meersmann and E. Brunner, eds., *Hyperpolarized Xenon-129 Magnetic Resonance*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, Chap.17, pp.301-316 (2015). 3. H. Imai, A. Kimura, and H. Fujiwara, Development and Application of Mouse Imaging Using Hyperpolarized Xenon, in: M. Albert, ed., *Hyperpolarized and Inert Gas MRI in Research and Medicine* , Elsevier, San Diego, CA, Chap. 8, in press (2017).

L1-7

高感度レオロジーNMRの開発と応用

○森本大智 [1]，Erik Walinda [2]，西澤茉由 [1]，Ulrich Scheler [3]，山本昭彦 [4]，
白川昌宏 [1]，菅瀬謙治 [1]
[1] 京都大学大学院　工学研究科，[2] 京都大学大学院　医学研究科，
[3] Leibniz Institute of Polymer Research Dresden，
[4] ブルカー・バイオスピン株式会社

Highly Sensitive Rheo-NMR Spectroscopy For Proteins

○Daichi Morimoto [1]，Erik Walinda [2]，Mayu Nishizawa [1]，Ulrich Scheler [3]，Akihiko Yamamoto [4]，
Masahiro Shirakawa [1]，and Kenji Sugase [1]
[1] *Graduate School of Engineering, Kyoto University*，[2] *Graduate School of Medicine, Kyoto University*，
[3] *Leibniz Institute of Polymer Research Dresden*，[4] *Bruker BioSpin K.K.*

The interior of cells is an extremely dense and crowded environment. The concentration of macromolecular components in cells is quite high, approximately 50-400 mg/ml; in addition, some of them are supposed to move unidirectionally by cytoplasmic streaming. Therefore, intracellular proteins may be aligned along the cytoplasmic flow direction and/or may undergo mechanical stress to induce their deformation. To investigate an effect of unidirectional force on proteins, we have designed a simple rheo-NMR instrument that can be applied for an NMR spectrometer equipped with a cryoprobe. Using this novel instrument, we have observed not only a shear-dependent molecular alignment, but also fibril formation of amyloid-prone proteins. The sensitivity in our rheo-NMR instrument with a cryoprobe is much higher compared to other reported rheo-NMR instruments, which contributes to further rheological studies of proteins.

細胞内は数十から数百mg/mlもの生体高分子が密に詰まった環境である。そのような環境下で、細胞内のタンパク質は、原形質流動ならびに拡散によって、特定の相互作用相手と遭遇しなければならない (Fig. 1)。しかし、高濃度の生体高分子さらには細胞骨格やオルガネラが存在する環境下では、タンパク質は、流動流方向に対する分子配向もしくは、分子移動に伴う分子変形を生じる可能性がある。これまで、タンパク質に対する分子クラウディング効果は議論されてきたが、分子配向や分子変形に関する基礎的な研究は発展途上である。そこで我々は、NMR管内に一方方向にずり応力を負荷することの出来る高感度レオロジーNMRを新規に開発した。

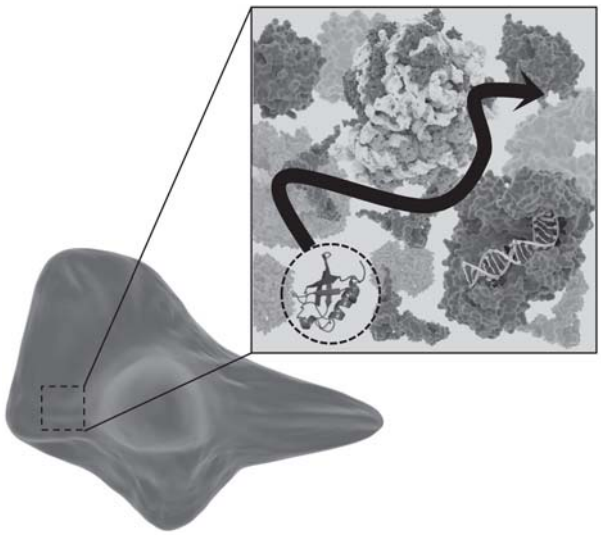


Figure 1. Macromolecular crowding.

レオロジー，分子配向

○もりもとだいち，ゔぁりんだえりっく，にしざわまゆ，しぇらーうるりっひ，やまもとあきひこ，しらかわまさひろ，すがせけんじ，

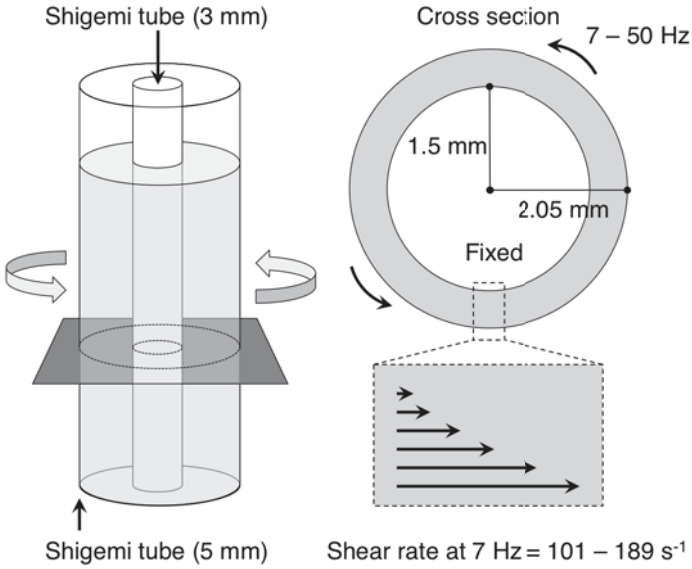


Figure 2. Geometry of the NMR tube used in this study.

これまで報告されているレオロジーNMRシステムは、追加の制御機器を設置する必要であり[1,2]、クライオプローブ装着のNMR装置に適用した例は未だ無い。本研究では、NMR装置のデフォルト機能であるスピナー回転を利用した安価で単純なレオロジーNMRシステムを構築した (Fig. 2)。外径5 mmのシゲミNMR管 (外管) にサンプル溶液を入れ、その中に外径3 mmのシゲミ管 (内管) を挿入した。内管を固定し、スピナー回転で外管を回転させることにより、溶液中に一方方向にずり応力することが出来た。

まず、構築した装置を用いて、モデルタンパク質であるユビキチンに様々なずり応力を付加した。その結果、ずり応力が大きくなるに従い、より大きな残余双極子相互作用 (RDC) を観察出来た (Fig. 3)。一方、この条件下ではユビキチンのアミド水素の化学シフト変化はほとんど無かった。配向媒体無しで、ユビキチンの様に球状に近い分子が、分子配向することは興味深い。

また、パーキンソン病関連タンパク質であるα-シヌクレインにずり応力を加え、連続NMR測定を行った。撹拌によってアミロイド線維を形成することが知られており、レオロジーNMRのずり応力においても線維形成が確認でき、それに伴うシグナル減衰を観察することが出来た。

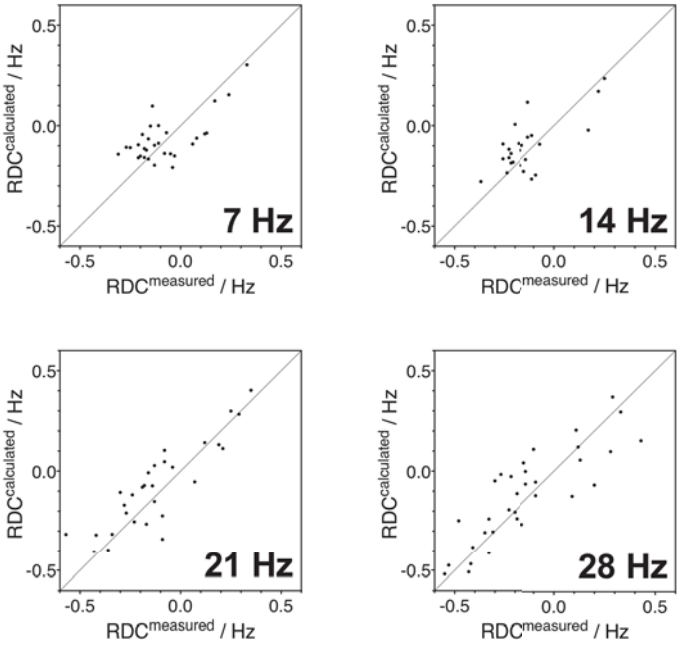


Figure 3. RDC values of sheared ubiquitin.

このように、本研究で構築したレオロジーNMRを用いて一方方向のずり応力に伴う分子配向と分子変形を観察することが出来た。本手法では既存の溶液NMR測定法がほぼ全て適用することが出来、タンパク質のずり応力に対する物理的変化をより高感度に取得することが可能である。

References

(1). Britton, *et al*. (1999) *Applied magnetic resonance* **15**, 287-301

(2). Ohgo, *et al*. (2007) *JACS* **130**, 4182-6

L1-8

定量固体NMRを用いた単一大腸菌細胞内で合成される分子種の同定および分子数の計測

○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

Identification of the species of molecules and counting the number of molecules synthesized in an *Escherichia coli* cell by quantitative solid-state NMR

○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 few methods for obtaining the quantitative data in living systems. Here, by developing a quantitative in-cell solid state NMR method, we identified the species of molecules and counted the number of the molecules synthesized during the ubiquitin overexpression in an intact *Escherichia coli* cell. The species were clarified by the high-resolution 2D DARR ^{13}C-^{13}C spectra of the intact cells. The numbers were estimated from the comparison of the integral signal intensities between the spectrum of ubiquitin overexpressed cells and that of mock overexpressed cells. 1D and 2D ^{13}C and ^{15}N spectra of the samples at the different incubation time after the induction clarified the time-dependent synthesis of the molecules. Moreover, secondary structure of ubiquitin inside the cells was compared to that of purified ubiquitin.

【序論】

細胞内で合成される分子の種類、分子数、合成される時間などを定量的に測定・解析することは、生命の理解に必須であると考えられる。しかしながら、これまで生命システムを定量的に測定し、解析できる手法はほとんど存在しなかったため、現状ではこれらの情報は全く得られていない。例えば、蛍光顕微鏡は高感度で空間分解能を持つが、タグが必要で原子分解能情報は得られない。また、マススペクトルは高感度で分子種の情報を得られるが、定量性を確保することは難しい。溶液NMRは非侵襲的な測定で原子分解能の情報を得られるが、シグナル強度が分子量や運動性に影響されてしまう。そこで、上記の問題を解決するために、筆者らは固体NMRに注目した。なぜなら、固体NMRは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原子を観測でき、原子分解能の構造に由来する情報を得ることが可能であるからである。また、生きた状態を反映した細胞を非侵襲的に測定できるため、より生理的条件に近い環境での測定が可能である。今回、筆者らは固体NMRを用いて定量的な測定を行う方法論を開発し、モデル系として大腸菌のpET発現系によるユビキチン過剰発現時に、一細胞あたり合成される分子種の同定・分子数の計数および、細胞環境を議論したので、以下に報告する。

実験手法の概略は以下の通りである。まず大腸菌をMASローターに詰め、定量的な1D ^{13}C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。

In-cell固体NMR、分子数定量、タンパク質二次構造

○やまだかずや、えがわあやこ、ふじわらとしみち

【方法】

実験では、ユビキチンを組み込んだpET21cプラスミドをBL21(DE3)Rosettaに形質転換した大腸菌を用いた。また、対照群として、空ベクターの同プラスミドを形質転換した同株の大腸菌も用いた。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最少培地に移す手法を用いた。[1] 発現誘導時間は4時間とした。また、菌体をSDS存在下高温で処理し、不溶性画分を調製した。[2] 菌体及び不溶性画分は、直接MASローターに詰め測定に用いた。MASローターは外形4.0 mm、容量35 μLのものを使用した。1D ^{13}C-NMR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を用い、縦緩和時間の6倍の待ち時間を設けた。1D ^{15}N-NMRスペクトルの測定ではCP-MASを用い、同様の待ち時間を設けた。全ての測定は温度 - 60度で行い、JEOL ECA II固体NMR分光計(^{1}H共鳴周波数500MHz)を用いた。

【結果と考察】

分子種の同定

ユビキチンを過剰発現した菌体(Ubq-cell)と、空ベクターを過剰発現した菌体(Mock-cell)の1D ^{13}Cスペクトルを比較したところ(Figure. 1)、Ubq-cellとMock-cellの差スペクトルが精製したユビキチンのスペクトルと一致した。また、両者の2D DARR ^{13}C-^{13}Cスペクトルでは、ユビキチンの他に糖鎖と脂質由来の信号が観測された。(Figure. 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糖と脂質も合成されていることが強く示唆された。また、Ubq-cellの不溶性画分には糖由来の信号が観測され、アミラーゼ処理で消失したことから、グリコーゲン由来の信号であることが示唆された。さらに、2D DARRスペクトルの対角ピーク、交差ピークの積分値より^{13}C標識率を(Table. 1)、糖鎖のヘミアセタール炭素信号の積分値より、五炭糖と六炭糖の比を求めた。(Table. 2)

分子数の計数

まず、Mock-cellの1D ^{13}Cスペクトルを、蛋白質、脂質及び糖のスペクトル

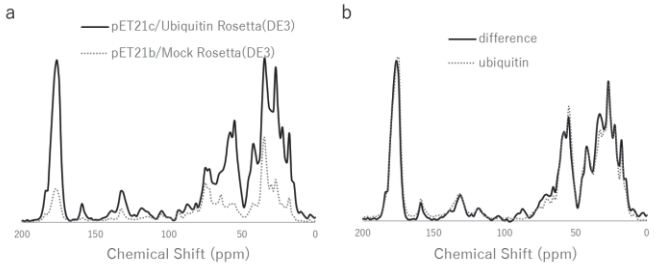


Figure. 1. Quantitative 1D ^{13}C spectra of (a) Ubq-cell and Mock-cell, (b) the difference and the purified ubiquitin.

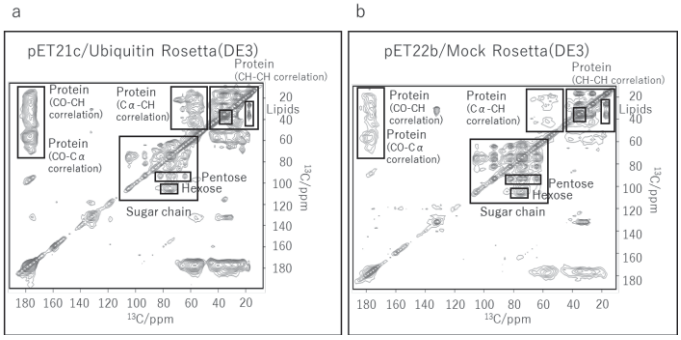


Figure. 2. 2D DARR ^{13}C-^{13}C spectra of (a) Ubq-cell and (b) Mock-cell.

	Ratio	^{13}C labeling ratio
Purified ubiquitin	3.48	100%
Proteins in ubq-cells	3.14±0.40	82.2±6.1%
Proteins in mock-cells	2.26±0.90	48±15%

Table. 1. The ratio of the integral intensities of cross peaks against the diagonal peaks and ^{13}C labeling ratio of proteins

	Hexose / Pentose (mol/mol)
Ubq-cells	2.53±0.71
Mock-cells	1.40±0.25

Table. 2. The ratio of hexose against pentose calculated from the hemiacetal region of 2D ^{13}C-^{13}C DARR spectra.

	Ubiquitin	Other proteins	Lipids	Hexose	Pentose
Number ($\times 10^7$)	1.02±0.04	14±1	1.68±0.11	2.50±0.11	1.00±0.04

Table. 3. The number of synthesized molecules in a cell during the ubiquitin overexpression

	Proteins	Lipids	Glycogen (monomer unit)	Peptidoglycan (monomer unit)
Number ($\times 10^6$)	0.202±0.021	1.03±0.41	28.0±6.0	2.69±0.55

Table. 4. The number of synthesized insoluble molecules in a cell during the ubiquitin overexpression

の線形和を用いて、Ubq-cellの1D ^{13}Cスペクトルを、Mock-cellと精製ユビキチンのスペクトルの線形和を用いてフィッティングした。次に各スペクトルの積分値を求め、外部標準である^{13}C, ^{15}N Alaの^{13}C 1Dスペクトルから求めた積分値と炭素原子数の検量線を用いて、MASローター内の炭素原子数に換算した。その値を、各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、大腸菌一細胞当りの分子数に換算し、Table. 3にまとめた。また、不溶性画分の^{13}C 1Dスペクトルを、蛋白質、グリコーゲン、ペプチドグリカン、脂質のスペクトルの線形和を用いてフィッティングし、同様に大腸菌一細胞当りの分子数に換算した。(Table. 4)

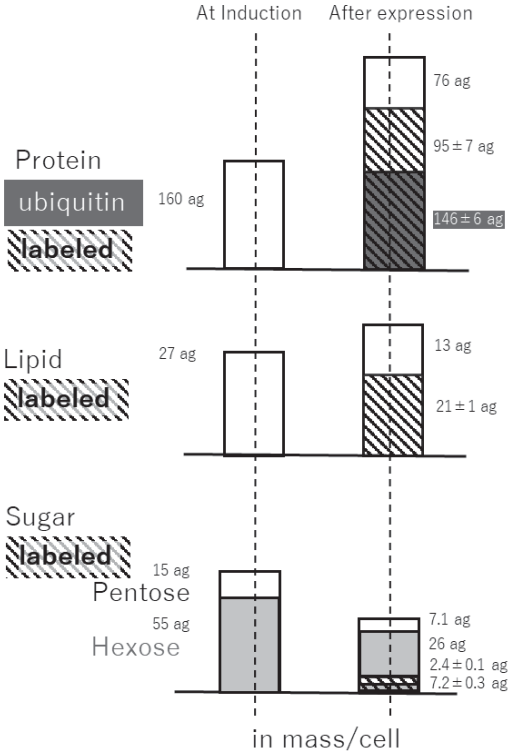


Figure. 4. The difference of the mass of each molecule in a cell at the induction and after the expression.

大腸菌細胞の変化

ユビキチン過剰発現時にユビキチン以外のタンパク質、脂質および糖が合成されていることは、細胞体積や培養液中の細胞濃度の変化を示唆している。また、外膜内膜間距離が変化し、内膜内体積が変化している可能性がある。それを確かめるため、光学顕微鏡で細胞の大きさと培養液中の細胞濃度を、電子顕微鏡で外膜内膜間距離を測定した。その結果、4時間のユビキチン発現誘導中に、細胞数は2.1±0.3倍に、細胞体積は0.83±0.08倍になっていた。細胞数の増加により、一細胞当たりの非標識の分子数が減少し、^{13}C標識分子が合成されたと考えられる。以上より、一細胞内のタンパク質、脂質、糖の重量は、Figure. 4.のように計算された。一細胞当たりのユビキチン以外のタンパク質量は変わらず、脂質量は1.3倍、糖の量は61%になった。また、Table. 3及び4より、増加した六炭糖はグリコーゲンに由来すると考えられる。

一方、外膜内膜間距離はユビキチン過剰発現の前後で10 nm小さくなっていた。これによる内膜内体積の増加は、^{13}C標識されたユビキチンとその他のタンパク質の体積の合計と一致した。

各分子が合成された時間

発現誘導時間を変えて集菌した菌体を用いて、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、一細胞当りの^{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。また、^{13}C標識されたユビキチン以外のタンパク質、糖、脂質は、発現誘導後2時間でほぼ一定数になったのに対し、ユビキチン分子数は常に増加し続けた。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。

大腸菌細胞内でのユビキチンの二次構造

Ubq-cellとMock-cellの2D DARR ^{13}C-^{13}Cスペクトルをサンプル中の菌体数で標準化して差スペクトルを作成し、精製したユビキチンのスペクトルと比較した。まず、タンパク質の二次構造に鋭敏なα炭素領域とカルボニル炭素領域の二次元スペクトルのスライスを比較したところ、ピークの位置および形状が一致した。(Figure. 5)ガウシアンで各ピークをフィッティングしたところ、ピークの化学シフト差は1ppm以内であった。よって、ユビキチンは大腸菌細胞内においても正しい二次構造を保っていると考えられる。今後、二次元スペクトル上において差スペクトルを、微結晶ユビキチンの化学シフト[3]、全アミノ酸残基がα-ヘリックスまたはβ-シートの場合の化学シフトと比較し、大腸菌細胞内でのユビキチンの二次構造を議論する予定である。

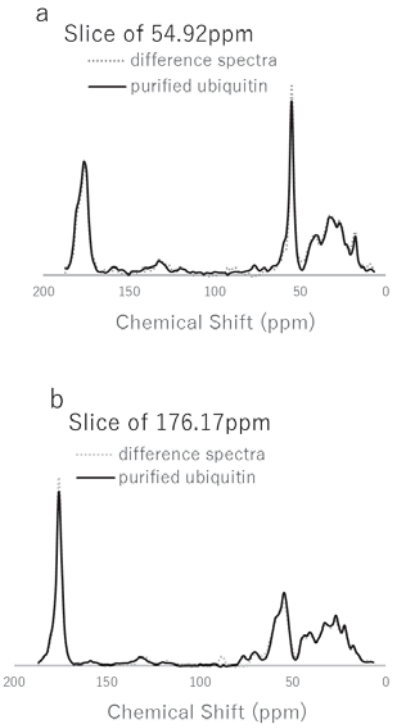


Figure. 5. 1D slices of (a) Alpha carbon region and (b) carbonyl carbon region in 2D DARR ^{13}C-^{13}C spectra of the difference between ubq-cell and mock cell and the

結果の検証

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。ユビキチンの細胞内濃度は58 mg/mLまたは6.7 mMであり、通常の細胞内タンパク質濃度である5 mMとほぼ一致した。また、培地1 Lあたりのユビキチンの収量は152±41 mgであった。また、報告されているリボソームの数とタンパク質合成速度から、リボソームの18%がユビキチン合成に関与していることが分かった。さらに、求めた量のユビキチンを4時間で合成するために必要なグルコース分子を、炭素源およびエネルギー源から計算すると、1秒当たり4.2×10^5分子が必要である。大腸菌は5×10^5分子のグルコースの取り込み能力があるので、84%の取り込み能力を用いていた。そのグルコースを取り込むために必要なグルコーストランスポーターは一細胞あたり9300分子であり、膜表面の2%を占めていることが示唆された。培地1 L中に存在する1.94×10^{22}分子のグルコースのうち、大腸菌が利用したのはその34%である6.6×10^{21}分子であった。

以上より、本研究ではタンパク質過剰発現時に大腸菌一細胞が合成する分子種とその分子数を、定量分析可能な固体NMRを用いて見積もった。その結果は、細胞数や大きさの変化、および過去の報告と矛盾せず、本測定法によって得られたデータが正しいことが示された。これら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.
3) Igumenova, T. I. *et al*. *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 6720.

L1-9

木質バイオマスにおける超分子構造とステレオ選択的な酵素反応及び核酸のin-cell NMR

山置佑大[1,2,5], 永田一真[1,2]、清石彩華[1,2]、西村裕志[3,4,5]、加納ふみ[6]、村田昌之[7]、大田ゆかり[5,8]、渡辺隆司[3,4]、永田崇[1,2,4,5]、○片平正人[1,2,4,5]
[1]京大・エネルギー理工学研究所、[2]京大・エネルギー科学研究科、[3]京大・生存研、[4]JST・CREST、[5]JST・ALCA、[6]東工大・院科学技術創製、[7]東大・院総合文化、[8]海洋研究開発機構

Supramolecular structure and stereoselective enzymatic reaction of wood biomass, and in-cell NMR of nucleic acids

Yudai Yamaoki[1,2,5], Kazuma Nagata[1,2], Ayaka Kiyoishi[1,2], Hiroshi Nishimura[3,4,5], Fumi Kano[6], Masayuki Murata[7], Yukari Ohta[5,8], Takashi Watanabe[3,4], Takashi Nagata[1,2,4,5], and ○Masato Katahira[1,2,4,5]
[1] *Institute of Advanced Energy, Kyoto Univ.,* [2]*Grad. Scl. Energy Sci., Kyoto Univ.,* [3]*RISH, Kyoto Univ.,* [4]*CREST, JST,* [5]*ALCA, JST,* [6]*Inst. Innova. Res., Tokyo Inst. Tech.,* [7]*Grad. Scl. Arts & Science, Tokyo Univ., and* [8]*JAMSTEC*

Three major components of wood biomass are cellulose, hemicellulose and lignin. We examined the supramolecular structure of wood biomass, lignin-carbohydrate complex (LCC), on the basis of solid J connectivities, and reported the benzyl ether linkage of LCC last year. This year we report the benzyl ester linkage of LCC in natural wood biomass for the first time. Six enzymes were identified in marine *Novosphingobium* MBES04 strain for the degradation of four different kinds of stereoisomers on the *β-O-4* linkage of lignin. Stereoselective reactions by identified enzymes were successfully monitored in real-time by NMR. We also report the in-cell NMR spectra of nucleic acids in human cells for the first time.

1. 実木質バイオマスにおけるLCC結合の実体の解明

我々は木質バイオマスの構造と、同分解酵素による木質バイオマスの物質変換を溶液NMR法で解析すべく、方法論の開発(1)とそれを用いた解析を進行させている。木質バイオマスの三大成分はセルロース、ヘミセルロース及びリグニンである。ヘミセルロースとリグニンは共有結合によって連結され、lignin-cabohydrate complex (LCC)を形成する。ヘミセルロースとリグニンを有効に利活用する為には、このLCC結合に関する情報が不可欠である。これまではモデル化合物の^{1}H,^{13}C－HSQCスペクトルに基づいて、実木質バイオマス中におけるLCC結合を類推していた。

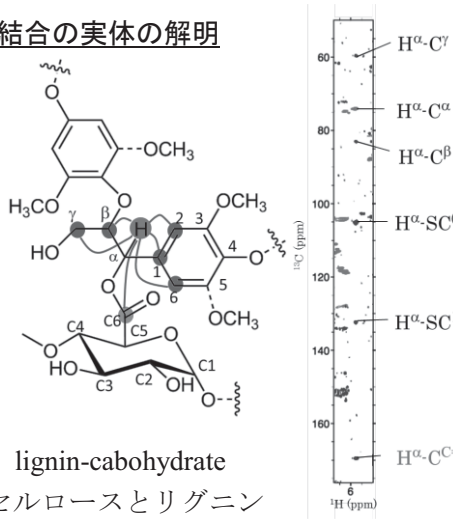


Fig. 1. Identification of the benzyl ester linkage of the LCC in natural wood biomass. (Left) HMBC correlations expected for the benzyl ester structure. (Right) HMBC correlations derived from Hα of lignin.

超分子構造，リアルタイムモニタリング，in-cell NMR

やまおきゆうだい，ながたかずま，きよいしあやか，にしむらひろし，かのうふみ，むらたまさゆき，おおたゆかり，わたなべたかし，ながたたかし，○かたひらまさと

これに対して我々はLCC結合を濃縮した画分を調製する事で、HSQCに加え、良好なHMBCスペクトルを取得する事に成功した。これによりLCC結合の実体を、スピンースピン結合の連結に基づいて紛れなく決定する事が可能となった。昨年の本年討論会では、アカマツにおいてベンジルエーテル型のLCC結合が存在する事を発表した。今回はブナにおいてベンジルエステル型のLCC結合が存在する事を初めて見出したので報告する(Fig. 1)。

2. *β–O–4* 結合の開裂における立体選択的な酵素反応のリアルタイムモニタリング

リグニンにおいて最も高頻度で見られる単量体間の連結は、*β-O-4*結合である。同結合に関しては、α位とβ位について合計4種類の立体異性体が存在する。海洋生物*Novosphingobium* MBES04株から、これらの異性体の開裂を担う6種のタンパク質が得られた(2)。得られた酵素による立体選択的な開裂反応を、NMRシグナルを用いてリアルタイムで追跡する事に成功したので、報告する(Fig. 2)。

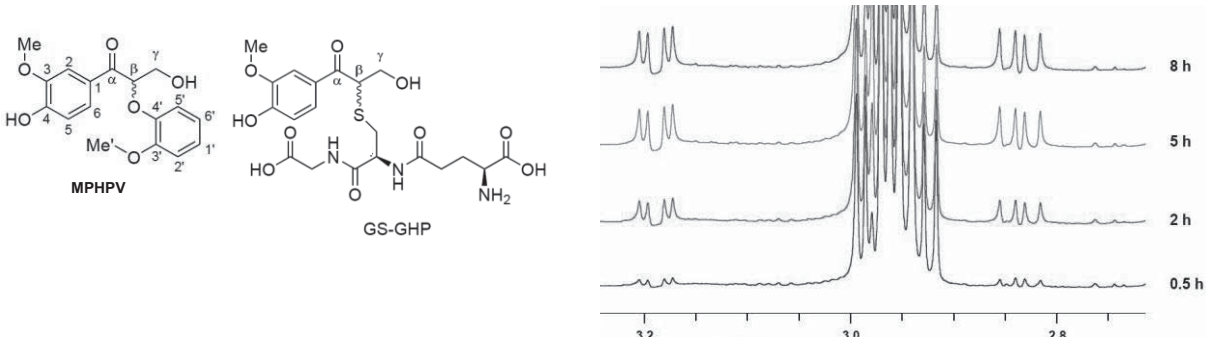


Fig. 2. Real-time monitoring of the stereoselective enzymatic reaction. Time-course of the cleavage of the *β-O-4* linkage of MPHPV by glutathione S-transferase 4 (GST4) with glutathione (GSH) to produce GS-GHP. Selective production of β(*R*) GS-GHP was reveled from the chemical shift values of methylene protons of a Cys residue.

3. 核酸のヒト細胞におけるin-cell NMRシグナルの観測

ヘアピン構造及び４重鎖構造を形成するDNAをHeLa細胞に導入し、ヒト細胞内における核酸由来のNMRシグナルを観測する事に初めて成功した(Fig. 3)。試験管における核酸のシグナルとの比較について考察する。

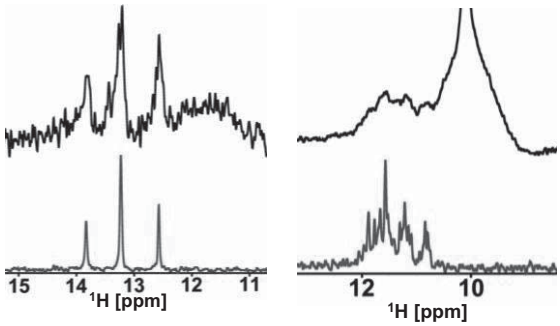


Fig. 3. In-cell NMR spectra of nucleic acids in human cells. Hairpin DNA (left) and quadruplex DNA (right). Lower, in vitro; upper, in-cell.

引用文献

(1) Okamura, H., Nishimura, H., Nagata, T., Kigawa, T., Watanabe, T., and Katahira, M. (2016) Accurate and molecular-size-tolerant NMR quantitation of diverse components in solution. *Sci. Rep.6*, 21742.

(2) Ohta, Y., Nishi, S., Hasegawa, R., and Hatada, Y. (2015) Combination of six enzymes of a marine *Novosphingobium* converts the stereoisomers of *β-O-4* lignin model dimers into the respective monomers. *Sci. Rep. 5*, 15105.

L1-10

コアフコース認識レクチンの三量体溶液構造と糖鎖認識機構の解析

○山崎 和彦[1]、山崎 智子[1]、清水 弘樹[2]、長島 生[2]、清水 明[3]、千葉 靖典[3]、舘野 浩章[3]
産業技術総合研究所 [1]バイオメディカル研究部門、[2]生物プロセス研究部門、[3]創薬基盤研究部門

The trimeric solution structure of a core fucose-specific lectin and its recognition of oligosaccharide

○Kazuhiko Yamasaki[1], Tomoko Yamasaki[1], Hiroki Shimizu[2], Izuru Nagashima[2], Akira Shimizu[3], Yasunori Chiba[3], and Hiroaki Tateno[3]
[1]Biomedical Research Institute, [2]Bioproduction Research Institute, and [3]Biotechnology Research Institute for Drug Discovery, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Tsukuba, Japan.

Because α1-6 fucosylation (core fucosylaiton) of a tumor marker protein, α-fetoprotein, is closely related to hepatocelluar carcinomas, a lection specific to core fucose enables precise diagnosis of such cancer cells. Here we report a solution structure of a core fucose-specific lectin, PhoSL, from a mushroom *Pholiota squarrosa*. This protein consists of only 40 amino acid residues and, therefore, we initially expected to be able to determine the structure by solution NMR easily. However, we could not obtain a monomeric structure that satisfies all the NOE distance constraints. Gel filtration assay, chemical cross-linking, and mass spectrometry were, thus, performed, which clearly indicated that PhoSL forms a trimeric state. Structure calculation for a symmetric trimer revealed a structure that satisfies the distance constraints, showing a β-prism motif. Now we are analyzing the interaction between PhoSL and a core fucose disaccharide, fucose (α1-6) GlcNAc, by NMR in order to understand the mechanism of recognition.

【序論】糖タンパク質のフコシル化は、炎症やがん化など細胞の状態と強く関連する（文献 1）。特に、肝細胞の腫瘍マーカーである α-fetoprotein（AFP）は、慢性肝炎や肝硬変などでも検出されるが、α1-6 結合フコース（コアフコース）修飾を持つ AFP は、肝細胞がんに極めて特異的である（文献 2）。したがって、コアフコースに結合するレクチンは、正確な腫瘍診断ツールとしての活用が期待される。スギタケ *Pholiota squarrosa* から発見された新規コアフコース認識レクチン PhoSL（*Pholiota squarrosa* lection）は、既知のフコース結合レクチンと異なり、コアフコースのみに特異的に認識し、α1-2 結合、α1-3 結合、α1-4 結合フコースなどには結合しない（文献 3）。アミノ酸 40 残基と極めて短いため、化学合成によって調製できる。したがって、非天然のアミノ酸の導入などにより、結合の強化や特異性の改変・拡張など、新規ツールの創出を可能とする。本研究では、そのようなデザインのための基盤構築を目的とし、NMR による立体構造解析と糖鎖認識機構の解明を行う。

【方法】PhoSLの調製は、カスタムペプチド合成（BEX）により、行った。0.3 mMの濃度（単体換算）で、20 mM d_{11}-Tris (7.5)（ISOTEC）、1 mM d_{10}-dithiothreitol（ISOTEC）溶液に溶解し、Avance III HD 900分光計（Bruker）を用い、308 Kで、NOESY、TOCSY、DQF-COSY、^{1}H-^{13}C HSQCの2D

三量体構造、糖鎖認識、レクチン

○やまさきかずひこ、やまさきともこ、しみずひろき、ながしまいずる、しみずあきら、ちばやすのり、たてのひろあき

NMR 測定を行った。スペクトル解析は Felix により、構造計算は CNS ver1.3 により行った。三量体の計算には、non-crystallographic symmetry を適用した。ゲルろ過実験は、Superdex 75（GE）により、行った。各 50 mM の 1-ethyl-3-(3-dimethyl-aminopropyl)carbo-diimide（EDC、Peptide Institute）および N-hydroxysuccinimide（NHS、Wako）の存在下で、室温 1 時間の化学架橋反応を行った後、SDS-PAGE により検出した。検出バンドの質量は、質量分析計 Axima TOF^2 (Shimadzu)により、決定した。コアフコース２糖 fucose (α1-6) GlcNAc は、化学合成により、調製し、PhoSL と当量混合後、上述の 2D NMR 測定を行った。

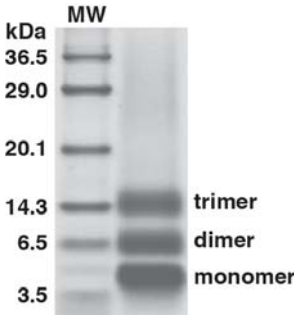


Fig. 1: Trimeric state of PhoSL as revealed by chemical cross-linking and SDS-PAGE. Molecular masses for the three bands are determined by mass spectrometry.

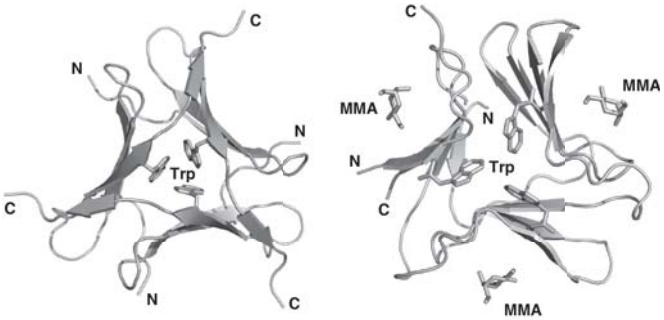


Fig. 2: The trimeric solution structure of PhoSL, possessing a three-fold rotational symmetry (left). Trp residues forming the structural core near the symmetry axis are shown in stick. The crystal structure of a mannose-specific lection (PDB ID: 1MSA; ref. 4) showing a pseudo three-fold symmetry, which also has three Trp residues forming the core (right). MMA stands for o1-methylmannose.

【結果および考察】当初､その短さから、NMRを用いた立体構造決定は容易であると予想された。スペクトル上のシグナル帰属の結果、βシートを基本構造とする一組のデータセットを得たが、単量体を想定して行った構造計算では、拘束条件をすべて満たすものは得られなかった。多量体形成の可能性を考え、ゲルろ過法や化学架橋、質量分析により、PhoSLは三量体を形成することが明らかになった（図１）。データセットが一組であることから、対称性をもつ三量体を想定して構造計算を行ったところ、図２左のようなβストランドのswapを伴う構造が、拘束条件を満たすものとして得られた。これは、βプリズムの構造モチーフに分類されるが、このような構造は他のレクチンでも見られる（図２右）。高等植物*Galanthus nivalis*由来のマンノース特異的レクチンは、偽３回対称性をもつ（文献４）。PhoSLと同じく、Trpによるコア形成をもつなどの共通性もあり、進化的関連も想定される。

現在、糖鎖認識機構解明に向け、PhoSLとコアフコース２糖のスペクトル解析を進めており、本発表において報告したい。

【謝辞】本研究は、産総研Leading Engine program for Accelerating Drug discovery (LEAD)プロジェクトの課題として行われた。また、Avance III HD 900分光計の利用にあたって、理研NMR施設・外部共用事業（成果非占有課題）の支援を得た。

【引用文献】

1) Miyoshi, E., Moriwaki, K., and Nakagawa, T. *J. Biochem.* **143**, 725–729, 2008.
2) Aoyagi, Y., Suzuki, Y., Igarashi, K., Saitoh, A., Oguro, M. *et al*., *Cancer* **67**, 2390–2394, 1991.
3) Kobayashi, Y., Tateno, H., Dohra, H., Moriwaki, K., *et al*., *J. Biol. Chem.* **287**, 33973–33982, 2012.
4) Hester, G., Kaku, H., Goldstein, I. J., and Wright, C. S. *Nature Struct. Biol.* **2**, 472-479, 1995.

L1-11

アゾベンゼン架橋剤の光異性化反応によるタンパク質変性のNMR同期測定

長島敏雄[1]，植田啓介[1]，西村千秋[2]，○山崎俊夫[1]
[1]理化学研究所・ライフサイエンス技術基盤研究センター
[2]帝京平成大学・薬学部

NMR-synchronized protein denaturation by photoisomerization of an azobenzene cross-linker

Toshio Nagashima[1], Keisuke Ueda[1], Chiaki Nishimura[2], ○Toshio Yamazaki[1]
[1] *RIKEN Center for Life Science Technologies*
[2] *Faculty of Pharmaceutical Sciences, Teikyo Heisei University*

Recently, large geometry change of azobenzene by *cis-trans* photoisomerization enables manipulation of protein structure, as if atoms in a protein are pinched between one's fingers. The alkylation at two cysteine residues, separated properly, with an azobenzene derivative cross-linker realizes the distance change between any two points on protein structure. We succeeded that distinguishable denatured structures were induced, depending on the position of the distance modulation. To assign NMR signals from these denatured structures of protein, newly developed pulse sequences coupled with photoisomerization make it possible to transfer the magnetization in a denatured state to that in a native folded state. We define this method as structure-correlation NMR spectroscopy.

まるで指でつまんで操作するように、アゾベンゼンの*cis-trans*光異性化反応による大きなジオメトリー変化を利用したタンパク質の構造操作が、近年、可能になった。アゾベンゼン誘導体の両端をタンパク質の2つのシステインに結合させることで、タンパク質上の任意の部位の2点間の距離を変化させることが可能である。タンパク質フォールディングをNMRで研究する場合、温度、圧力、変性剤等でタンパク質の構造を操作するが、アゾベンゼンを用いる場合、天然条件で部位特異的に変性させることができる。また、アゾベンゼンの異性化反応は2種類の光で双方向へ誘導でき、しかも数万回以上の異性化反応でもほとんど劣化しない。この構造変換をNOESYの混合時間内に一方向に起こすことで、一般的な化学交換と同様に2構造間の同一核間で交差ピークが得られる。しかしながら、反応が一方向であるため、対角ピークに対して交差ピークが非対称に現れ、展開時間t1と観測時間t2における構造を制御しているため、F1とF2方向の化学シフトは一意に構造に帰属できる。この測定方法を、構造相関NMR分光法を呼んでいる。すでに発表した論文では、この測定方法を行うためのNMR内光照射方法の開発とペプチドへの応用から、ペプチド

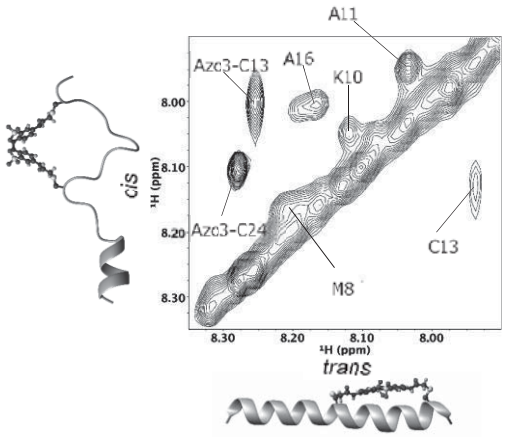


Fig. 1 A structure-correlation NMR spectrum of azobenzene-cross-linked peptide.

タンパク質フォールディング、アゾベンゼン、構造相関NMR

ながしまとしお、うえだけいすけ、にしむらちあき、○やまざきとしお

のαヘリックスの二次構造操作から構造相関NMRスペクトルを得るに至っている(Fig. 1)。

タンパク質構造変換用に新規に合成し、ペプチド構造操作に利用したアゾベンゼン誘導体(2,2'-bis(sulfonato)-4,4'-bis(chloroacetamido)azobenzene, BSBCA22)は、4,4'に導入したクロロアセトアミド基とシステイン側鎖のチオール基の間のアルキル化反応で結合できる。この際、*trans*と*cis*型でシステイン残基の硫黄原子間距離は、それぞれ16.5-18と11-16 Åと距離が変化する。例えば、この変化をヘリックス構造に利用する場合は、*i*と*i+11*番目のアミノ酸残基をシステインに置換すれば、*trans*型BSBCA22が結合して、ヘリックス構造を維持できる。これを*cis*構造にすれば、天然構造の適正な距離を保てなくなり構造を変化させることができる。この条件で、複数のBSBCA22結合GB1を作成し、^{15}N-HSQCスペクトルをそれぞれ*trans*と*cis*型で測定を行った。Fig. 2はこの一例で、*trans*で天然構造をとるようにヘリックス部分にBSBCA22を結合させたものであり、UV照射により*cis*構造に異性化させると、HSQCスペクトルのシグナルの分離が悪くなり、幅広化も見られ、タンパク質全体が変性していることがわかる。通常、このような変性状態になってしまうとHSQCスペクトルのシグナル帰属は困難になる。しかし、Fig. 1に示したペプチドの結果と同様に構造相関NMRを利用することで、変性構造の磁化を天然構造へ移すことで帰属を行った。Fig. 3のスペクトルは、いずれも^{15}N-HSQCで検出している点は同じであるが、磁化が^{1}Hにいるとき(Fig. 3左)、^{15}Nにいるとき(Fig. 3右)に構造変換を行うことで、それぞれの核の化学シフト情報を得ることを目的にしている。このようにして、*cis*状態の変性構造のNMR信号(Fig. 2右)を帰属し、TALOSで二次構造予測を行った結果、二次構造ができていないことが確認できた。この方法は、部位特異的に変性させたタンパク質の変性構造を帰属することができることを示し、新しい視点からタンパク質フォールディングにアプローチできる可能性を開いた。

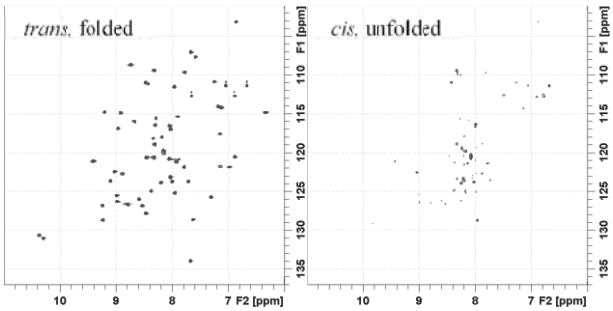


Fig. 2 A comparion of 15N-HSQC spectra in dark state (after blue irradiation, left) and in UV-adapted state (right). HSQC spectrum in UV-adapted state were calculated by a formula, 1.5 × (UV-adapted state) – 0.5 × (dark state) to remove residual *trans*-components in the UV-adapted state.

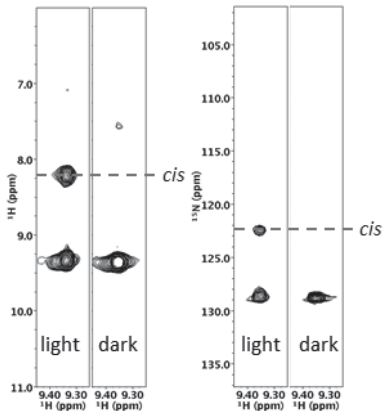


Fig. 3 Strip plots of ^{15}N-edited ^{1}H structure-correlation (left) and ^{15}N-edited ^{15}N structure-correlation (right) on Thr43 residue in azobenzene-cross-linked protein GB1 in states of dark and light.

References

Nagashima, T, Ueda, K, Nishimura, C, and Yamazaki, T (2015) Structure-Correlation NMR Spectroscopy for Macromolecules Using Repeated Bidirectional Photoisomerization of Azobenzene. *Anal. Chem. 87,* 11544-11552

L1-12

CAST/CNMRシステムを用いた^{13}C NMRシフト値による様々な有機化合物の構造訂正

○越野広雪[1]，小市俊後[2]，佐藤寛子[3,4]
[1]理化学研究所　環境資源科学研究センター
[2]南山大学　システム数理学科
[3]情報・システム研究機構
[4]チューリッヒ大学　化学科

Structural Revision of Several Organic Compounds by Evaluation of ^{13}C NMR Chemical Shifts using CAST/CNMR System

○Hiroyuki Koshino[1], Shungo Koichi, [2] Hiroko Satoh[3,4]
[1] *RIKEN Center for Sustainable Resource Science*
[2] *Department of Systems and Mathematical Science, Nanzan University*
[3] *Research Organization of Information and Systems*
[4] *Department of Chemistry, University of Zurich, Switzerland*

The CAST/CNMR system is composed of two functions for prediction of ^{13}C NMR chemical shift values from a query chemical structure (CAST/CNMR Shift Predictor) and elucidation of chemical structures from query ^{13}C NMR data (CAST/CNMR Structure Elucidator). These functions work using a database consisting of reported/observed ^{13}C NMR chemical shift values associated chemical structures described using the CAST (CAnonical-representation of STreochemistry) coding method. In the development of the database, we add reported data from peer-reviewed journals with careful evaluation. We have applied the CAST/CNMR system to find and correct wrong assignments or structures. Here, we will present structural revision for a pyrone-related class natural products, flavonoid *C*-glycosides, some terpenoids, and so on.

CAST/CNMRシステムは、化学構造式のクエリーに対して立体化学や環構造情報を考慮して精密化学シフト予測を行うCAST/CNMR Shift Predictor[1-3)]と、^{13}C NMRの化学シフト値をクエリーとして部分構造検索をし、その部分構造から構築して分子構造を提案するCAST/CNMR Structure Elucidator[4)]の機能を有するコンピュータシステムである。CAST/CNMRの適用範囲を拡げるために最近の文献値を中心にデータベースへのデータ登録を行っているが、データの質は予測精度に影響を与えるため、登録するデータの評価を注意深く行う必要がある。本システムの開発と同時に構造決定、構造訂正研究への応用研究を行ってきた。[5-7)] 今回新たに多くの天然有機化合物などに構造訂正を必要とする事例がデータベースへ登録するデータの評価をCAST/CNMRシステムを利用して行う際に見出されてきたので、その詳細を報告する。

CAST/CNMR Structure Elucidatorを用いて、化学シフト値をクエリーとして検索した場合に、既知物質であれば完全に一致した構造式が見出される。構造訂正が必要な場合には、同じ化学シフト値のクエリーに対して構造の異なる化合物が見出される。場合によっては、平面構造が異なったり、分子式が異なる場合も少なくない。異なる構造のうち正しい構造を判断するには、CAST/

天然有機化合物，構造解析，データベース

○　こしのひろゆき，こいちしゅんご，さとうひろこ

CNMR Shift Predictorでシフト値の妥当性を検討するが、一般に間違っている構造の同族体の報告は少ないため、適切な評価が困難な場合もある。その様な例では、文献に記載されている構造決定の妥当性などを慎重に検討して評価する必要がある。単結晶X線構造解析や、合成化学的に構造が証明されている場合には正しい構造の判断は容易である。今回紹介する構造訂正の一例では、フラン骨格のflufuan (5-hydroxymethyl-furan-3-carboxylic acid)[8-10]のNMRデータはγ-ピロン骨格でよく知られているkojic acid (5-hydroxy-2-hydroxymethyl-4*H*-pyran-4-one)[11]と一致した。また、5-hydroxy-4-hydroxymethyl-2*H*-pyrane-2-one[12]として報告されている化合物もkojic acidと一致した。間違った構造の報告を引用してさらに間違った同定や、比較により同族体の構造決定が報告されている例である。今回、他のピロン系化合物、C-配糖体型フラボノイドや、テルペンノイドなど様々な天然有機化合物に関して構造訂正を行ったので合わせて報告する。

References

(1) H. Satoh, H. Koshino, J. Uzawa, and T. Nakata (2003) CAST/CNMR: Highly Accurate ^{13}C NMR Chemical Shift Prediction System Considering Stereochemistry. *Tetrahedron*, *59*, 4539-4547.

(2) H. Satoh, H. Koshino, T. Uno, S. Koichi, S. Iwata, and T. Nakata (2005) Effective Consideration of Ring Structures in CAST/CNMR for Highly Accurate ^{13}C NMR Chemical Shift Prediction. *Tetrahedron*, *61*, 7431-7437.

(3) S. Koichi, S. Iwata, T. Uno, H. Koshino, and H. Satoh (2007) Algorithm for Advanced Canonical Coding of Planar Chemical Structures That Consider Stereochemical and Symmetrical Information. *J. Chem. Inf. Model.*, *47*, 1734-1746.

(4) S. Koichi, M. Arisaka, H. Koshino, A. Aoki, S. Iwata, T, Uno, and H. Satoh (2014) Chemical Structure Elucidation from ^{13}C NMR Chemical Shifts: Efficient Data Processing Using Bipartite Matching and Maximal Clique Algorithms. *J. Chem. Inf. Model.*, *54*, 1027-1035.

(5) H. Koshino, H. Satoh, T. Yamada, and Y. Esumi (2006) Structural Revision of Peribysins C and D. *Tetrahedron Lett.*, *47*, 4623-4626.

(6) S. Takahashi, H. Satoh, Y. Hongo, and H. Koshino (2007) Structural Revision of Terpenoids with a (3*Z*)-2-Methyl-3-penten-2-ol Moiety by the Synthesis of (23*E*)- and (23*Z*)-Cycloart-23-ene-3β,25-diols. *J. Org. Chem.*, *72*, 4578-4581.

(7) S. Takahashi, M. Yasuda, T. Nakamura, K. Hatano, K. Matsuoka, and H. Koshino (2014) Synthesis and Structural Revision of a Brominated Sesquiterpenoids, Aldingenin C, *J. Org. Chem*., *79*, 9373-9380.

(8) G. M. Cabrera, M. J. Roberti, J. E. Wright, A. M. Seldes. (2002) Cryptoporic and Isocryptoporic Acids from the Fungal Cultures of *Polyporus arcularius* and *P. cilatus*. *Phytochemistry*, *61*, 189-193.

(9) A. Evidente, G. Cristinzio, B. Punzo, A. Andolfi, A. Testa, and D. Melck. (2009) Flufuran, an Antifungal 3,5-Disubstituted Furan Produced by *Aspergillus flavus* LINK. *Chem. & Biodiversity*, *6*, 328-334.

(10) Y.-M. Ma, C.-C. Ma, T. Li, and J. Wang. (2016) A New Furan Derivative from an Endophytic *Aspergillus flavus* of *Cephalotaxus fortunei*. *Nat. Prod. Res.*, *30*, 79-84.

(11) C. A. Kingsbury, M. Cliffton, and J. H. Looker. (1976) Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectra of Kojic Acid and Other 4-Pyrone Derivatives. *J. Org. Chem.*, *41*, 2777-2780.

(12) A. Lin, X. Lu, Y. Fang, T. Zhu, Q. Gu, and W. Zhu. (2008) Two New 5-Hydroxy-2-pyrone Derivatives Isolated from a Marine-derived Fungus *Aspergillus flavus*. *J. Antibiot.*, *61*, 245-249.

第二日目
11月17日（木）
英語セッション

Day 2（Nov. 17, Thu）
（English Sessions）

L2-1

新規安定同位体標識技術を利用した高分子量蛋白質の溶液立体構造解析

○宮ノ入洋平[1]，武田光広[1,2]，寺内勉[3,4]，甲斐荘正恒[1,3]
[1]名古屋大学・大学院・理学研究科附属構造生物学研究センター，
[2]熊本大学・大学院・生命科学研究部，[3]首都大学東京・大学院・理工学研究科，
[4]SAILテクノロジーズ株式会社

Relaxation-optimized SAIL method for structural studies of large proteins

○Yohei Miyanoiri[1], Mitsuhiro Takeda[1,2], Tsutomu Terauchi[3,4], Masatsune Kainosho[1,3]
[1] *Structural Biology Research Center, Graduate School of Science, Nagoya University,* [2] *Faculty of Life Science, Kumamoto University,* [3] *Graduate School of Science and Engineering, Tokyo Metropolitan University,* [4] *SAIL Technologies, Inc.*

For precise structural studies of large molecular weight proteins, we have been developing optimal isotope labeling patterns for several amino acids. Especially, we have been focusing on observing aromatic, methylene and methyl CH signals using new stereo-array isotope-labeling (SAIL) techniques. In recent years, we introduced relaxation-optimized SAIL amino acids and succeeded in the signal assignments of the aromatic and aliphatic ^{13}C-^{1}H groups in 82 kDa malate synthase G (MSG) and the 900 kDa GroEL-ES protein complex. We also developed an amino acid- and stereo-selective labeling method for leucine and valine methyl groups, using the conventional *E. coli* protein expression system. In this presentation, we introduce efficient and practical protocols for the *E. coli* protein expression system to prepare proteins with relaxation-optimized SAIL amino acids, and demonstrate the unambiguous NOE signal assignments among the methyl, aliphatic and aromatic CH groups, even for large molecular weight proteins.

Although NMR spectroscopy is quite useful for studying the structures, interactions and dynamics of proteins in solution, the molecular weights acceptable for conventional NMR techniques are still limited to relatively small proteins. At present, some advances in NMR experiments and methyl-specific isotope labeling methods have allowed us to observe the backbone ^{15}NH and methyl $^{13}CH_3$ signals, even for larger proteins over 50 kDa (*e.g.* membrane proteins, protein-protein complexes). Even though this information is useful to elucidate the ligand interactions and dynamic properties of large molecular weight proteins, it is still not sufficient for high-resolution structural analyses. In order to solve this problem, we have been exploring further optimizations of the isotope labeling patterns for several amino acids, using the stereo-array isotope labeling (SAIL) method.

First, we have been focusing on observing the aromatic amino acid signals, which are often found in the hydrophobic cores of proteins. Therefore, they could afford crucial information for precise structural determination, interaction and dynamics studies [1-4]. Recently, we introduced relaxation-optimized SAIL (RO-SAIL) aromatic amino acids, which have systematically controlled isotope labeling patterns, to remove the ^{13}C-^{13}C scalar and dipole couplings and reduce the remote interactions between ^{1}H and ^{13}C in aromatic amino acids (Fig. 1). Using RO-SAIL aromatic amino acids, we successfully observed the well-separated aromatic and aliphatic CH cross peaks of 82 kDa MSG and the 900 kDa GroEL-ES protein

SAIL法，高分子量蛋白質，立体構造解析

○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

complex with high sensitivity in CH TROSY HSQC experiments. We also demonstrated the sequence-specific signal assignments and inter-/intra-residue NOE analyses for aromatic CH and aliphatic CH. This information is crucial for the precise structure determination of larger proteins.

Second, we developed a differential labeling method for Leu and Val methyl groups, as an alternative to the isotope-labeled precursors for these amino acids. Using this method, proteins can be labeled using any combinations of isotope-labeled or unlabeled Leu and Val, including some labeled amino acids that cannot be prepared by using precursors (Fig. 2). Notably, the labeling efficiencies of these amino acid residues in proteins are much higher than those obtained from α-keto acids, which are commonly used as Val/Leu precursors. As a result, we effectively achieved the unambiguous methyl signal and methyl-methyl NOE signal assignments [5].

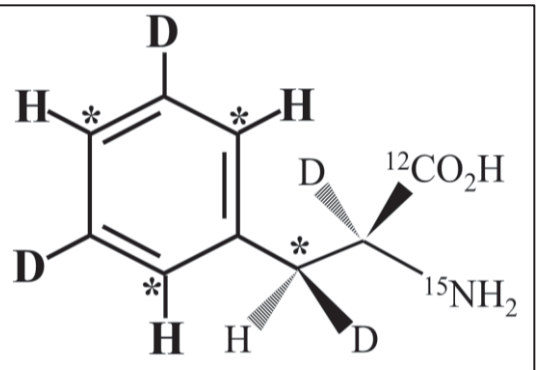


Fig.1 Structure of RO-SAIL Phe

* = ^{13}C

Recently, we also developed an efficient and practical protocol for preparing proteins bearing expensive isotope-labeled amino acids, such as RO-SAIL amino acids. By constructing auxotrophic mutant *E. coli* strains derived from *E. coli* BL21(DE3), we established a highly efficient and residue-selective labeling method for various amino acids [6]. We used this method to prepare RO-SAIL-labeled MSG, and successfully obtained the residue-, site- and stereo-specific signal assignments. Moreover, unambiguous NOE signal assignments among the methyl, methylene and aromatic groups were achieved by using 3D CH TROSY HSQC/HMQC-based NOESY experiments.

The RO-SAIL NMR method is very practical and powerful, and will open up new avenues for the structural biology of larger proteins and protein complexes.

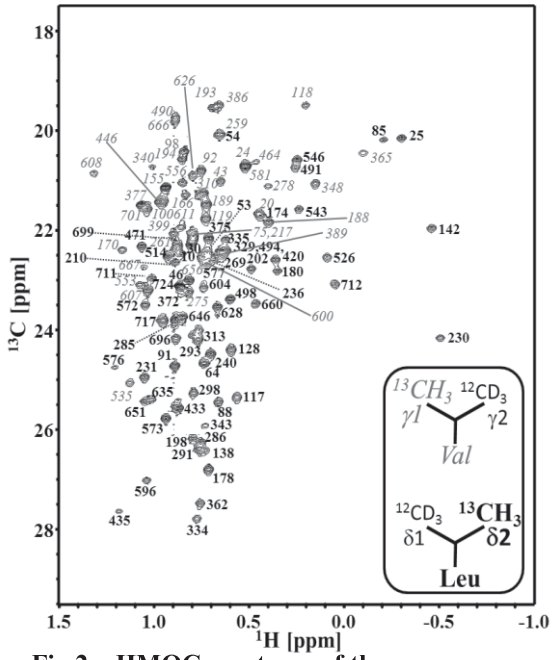


Fig.2 HMQC spectrum of the combinatorial Leu δ2/Val γ1-labeled MSG

References

[1] T. Torizawa, *et al.* (2005), *J. Am. Chem. Soc.*127, 12620-12626; [2] M. Takeda, *et al.* (2010), *J. Biomol. NMR.* 46, 45-49; [3] Y. Miyanoiri, *et al.* (2011), *J. Biomol. NMR.* 51, 425-435; [4] C.J. Yang, *et al.* (2015), .*Biochemistry 54*, 6983-6995, [5] Y. Miyanoiri, *et al.* (2013), *J. Biomol. NMR.* 57, 237-249; [6] Y. Miyanoiri, *et al.* (2016), *J. Biomol. NMR.* 65, 109-119

Acknowledgments

This research is partially supported by the Platform Project for Supporting in Drug Discovery and Life Science Research from Japan Agency for Medical Research and Development (AMED), JSPS KAKENHI Grant-in-Aid for Scientific Research (C).

L2-2

多剤耐性転写制御因子の転写制御機構：非特異的DNA吸着の役割

○竹内　恒[1,2]、今井　美咲[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]バイオ産業情報化コンソーシアム
[4]東京大学・大学院薬学系研究科

Transcriptional regulation of a multidrug transcriptional repressor: role of non-specific DNA adsorption

○Koh Takeuchi[1,2], Misaki Imai[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]*Japan Biological Informatics Consortium, Japan*
[4]*Graduate Schools of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo, Japan*

LmrR is a multidrug transcriptional repressor that controls the expression of a major multidrug transporter, LmrCD, in *Lactococcus lactis*. Promiscuous compound ligations reduce the affinity of LmrR for the *lmrCD* operator by several fold to release the transcriptional repression; however, the affinity reduction is orders of magnitude smaller than that of typical transcriptional repressors. Here, we found that the transcriptional regulation of LmrR is achieved through an equilibrium between the operator-bound and non-specific DNA-adsorption states *in vivo*. The effective dissociation constant of LmrR for the *lmrCD* operator under the equilibrium is close to the endogenous concentration of LmrR, which allows a substantial reduction of LmrR occupancy upon compound ligations. Therefore, LmrR represents a dynamic type of transcriptional regulation, where the small affinity reduction induced by compounds is coupled to the functional relocalization of the repressor on the genomic DNA via nonspecific DNA adsorption.

Introduction Multidrug resistance (MDR) systems are esential for life and are ubiquitously distributed in all three kingdoms of life. In the Gram-positive bacterium *Lactococcus lactis*, the MDR activity is achieved through a heterodimeric multidrug transporter, LmrCD. It was demonstrated that the *lmrCD* genes are constitutively expressed in *L. lactis*, and that the exposure to toxic compounds elevates the expression of the lmrCD genes by up to two-fold. The basal and induced expression of the *lmrCD* genes is regulated by a multidrug transcriptional repressor, LmrR. In the absence of toxic compounds, LmrR occupies the promoter/operator region of the lmrCD genes, repressing their transcription to the basal level. The compound ligation reduces the affinity of LmrR for *lmrCD* promoter/operator regions by several fold, however, the reduction of affinity is orders of magnitude smaller, as compared to those of other transcriptional repressors that are controlled by specific inducers. Therefore, a different molecular mechanism should underlie to effective connection of the small affinity reduction to the functional release of the transcriptional repression *in vivo*.

Multidrug Resistance, Dynamics, Transcriptional regulation

○たけうち　こう，いまい　みさき，しまだ　いちお

Result In our previous study, we demonstrated that LmrR exists as a conformational ensemble with multiple α4 helix orientations in solution (Fig. 1). While the *upper* and *lower* α4 helix conformations are almost equally present in the *apo* state, the compound ligation to LmrR shifts the conformational ensemble to a higher proportion of the *upper* α4 helix orientations. Here, we found that the binding to the *lmrCD* operator shifts the conformational ensemble of LmrR to the *lower* α4 helix orientations, which is opposite to that for the compound ligations. Since the α4 helix orientations are coupled to the relative distance between the DNA-binding α3 helices (Fig. 1), the distinct conformational ensemble induced by compound and DNA would represent the structural basis for the transcriptional regulation by LmrR. In line of this notion, the conformationally biased mutants with higher a propensity to adopt the *upper* α4 helix conformations significantly reduced the affinity to the *lmrCD* operator (Fig. 2). These observations strongly suggest that multidrug recognition as well as the transcription regulation of LmrR is described in the conformational selection model. In order to estimate the occupancy of LmrR in the *lmrCD* operator, then we conducted a set of biochemical analysis. It turns out that the dissociation constant of LmrR to the *lmrCD* operator is 66 nM in basal and 220 nM in induced conditions, and endogenous LmrR concentration is 3.2 μM. This indicates that a DNA dissociation model that assumes a simple equilibrium between the free state and the *lmrCD* operator bound state cannot explain the transcriptional regulation by LmrR (Fig. 3A).

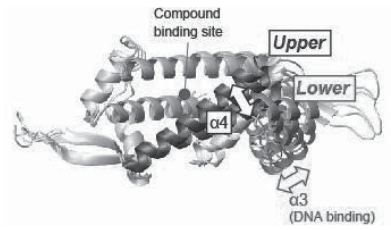


Fig. 1. Conformational equilibrium of LmrR.

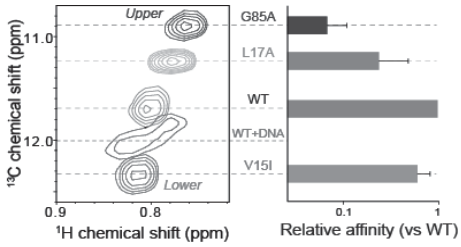


Fig. 2. Biasing conformational equilibrium reduces the affinity to operator DNA.

In addition, the 37 μM non-specific DNA binding affinity to LmrR were revealed by titration of non-specific *E.coli* genomic DNA fragment. Concidering the high concentration of genomic DNA (3.6 mM), this implied that LmrR is always bound to the genomic DNA *in vivo*. In this case, the effective affinity to the *lmrCD* operator would be defined by the equilibrium between the operator-bound and non-specific DNA adsorption states (Fig. 3B). The effective K_D values of LmrR for the *lmrCD* operator at equilibrium (6.6 μM in basal and 22 μM in induced conditions) are close to its intracellular concentration, which maximize the effects of the affinity reduction caused by the promiscuous compound ligations and explain both the basal and compound-induced expression of the *lmrCD* gene *in vivo*.

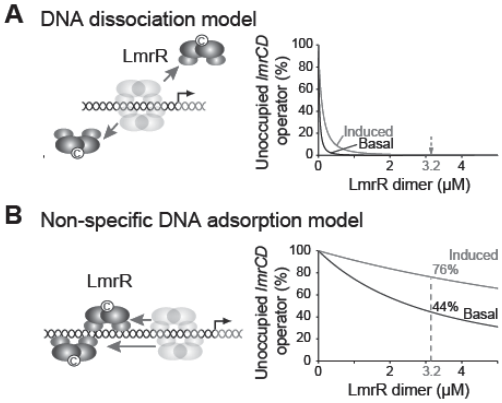


Fig. 3. Models of transcriptional regulation of LmrR. DNA dissociation model (A) and non-specific DNA adsorption model (B).

Conclusion The non-specific DNA adsorption model provided here represents a model for the transcriptional regulation in MDR systems, where the shift in the conformational ensembles induced by promiscuous compound ligations is coupled to the dynamic relocalization of the transcriptional repressors in the genomic DNA through an equilibrium between the operator-bound and non-specific DNA-adsorption states.

L2-3

高磁場DNPの効率改善をめざした手法開発とその応用

○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・蛋白質研究所、[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

Methods for improving high-field DNP and its application

○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 this loss of efficiency, we have recently improved our closed-cycle helium MAS system and the sub-mm wave (SMMW) irradiation system. Also, we are developing novel polarizing agent based on the transition metal complexes. In the presentation, we will report on these efforts, together with our latest DNP data.

固体NMR法は不溶性、非晶性の生体試料や材料について原子分解能の構造／運動性解析ができる稀な手法であるが、感度が低いのが最大の弱点である。動的核分極(DNP)法は電子スピン分極を核スピンに移すことでNMRの感度を劇的に向上させる可能性があるが、その効率は外部磁場強度の上昇とともにしばしば大きく悪化する。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。

この問題の克服に向けて我々は、次に挙げる３つのアプローチで取り組んでおり、本発表ではその進捗を最新のDNPデータと合わせて報告する。

1. ヘリウムMAS-DNPプローブの性能向上

従来よりも低温の条件を用いてスピン(n and e^-)の緩和を抑えれば、高磁場におけるDNP効率を向上できると考えられる。これは膜蛋白などメチル基を多く含む試料系では特に重要になる。そこで昨年度報告した閉回路ヘリウムMASシステムを、より低温-高速の試料回転を目標にスピナーガス用の圧縮機と冷凍機を増設して改良した。これによりドライブガス流量の上限はこれまでの2倍の200L/minに、冷却能も約25W積み増すことができた。結果、平均密度1.85g/mlの内容物を含む3.2mm試料管の回転は、現状270Kで20kHz、100Kで13kHz、40Kで6.8kHzを安定(±2Hz)に達成でき

動的核分極(DNP)、固体NMR、感度向上

○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

る様になり、最低到達試料温度もこれまでの35Kを更新して17Kに達した。低温では弱いサブミリ波でも高いDNP効率を得ることが出来る利点がある。例えばB_0=16.4TにおいてT=66KのDNP信号増強因子(ε_{DNP})はT=90Kよりも~2.2倍高かった(Fig.1)。また温度によるε_{DNP}の伸び率はB_0=14.1Tにおける~1.3倍よりも有意に大きく特筆に値する。

室温付近、20kHzの試料回転はローター表面に発生するガス流速の制限から従来の空気MASの上限に近いが、ヘリウム回転システムでは問題なく安定な回転(±2Hz)を得ており、従来の限界を超えたMASに期待が持てる。回転には約6000L/hrのヘリウムが要るが、本閉回路システムはもちろんこれを循環流として得る事が出来る。

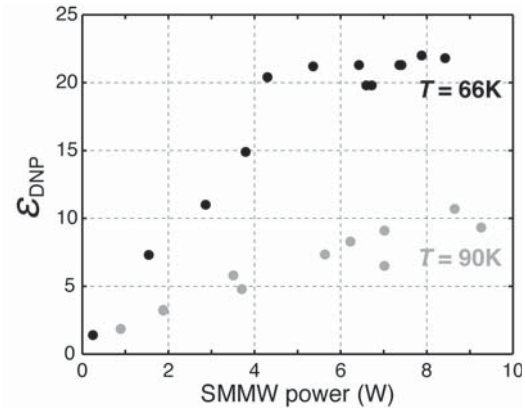


Fig. 1 DNP enhancement factor vs sub-millimeter wave power. At T = 66 K, 2.2-fold higher enhancement was obtained with 40% of the power required at T = 90 K. Sample was 1-M urea in 20 mM TOTAPOL-doped glycerol matrix. B_0 = 16.4 T, ν_R ~ 6 kHz.

2. サブミリ波照射システムの高度化

DNP効率の最大化には、分極剤固有の至適サブミリ波周波数とパワーを正確に発振できること、これを長時間維持できること、またサブミリ波の磁場成分($\mathbf{B}_{1,SMMW}$)が試料の位置でNMR外部磁場($\mathbf{B}_{0,NMR}$)に直交していることが重要である。そこで伝送経路中のマイターミラー一カ所にカップラーホールを穿ち(結合係数: −49dB=実測)、直交する二台の出力検出ダイオードと周波数観測用ミキサーダイオードを設置、サブミリ波の周波数とパワー、磁場ベクトルの向きをDNP-NMR測定中リアルタイムに観測できるシステムを構築した。パワーダイオードのDC出力は超高遮蔽同軸ケーブルで伝送してオシロスコープで、周波数はヘテロダイン方式で1GHz程度のIF信号にダウンコンバートし、デジタルオシロでフーリエ変換した後に観測した。観測したIF周波数はジャイロトロン本体の電位にPID制御フィードバックすることで発振周波数を長期安定化できる様にした。これによりジャイロトロン固有の発振周波数の揺れ>20MHzを1MHz以下に抑えることに成功した。

パワーダイオードの感度はサブミリ波の分極方向に依存するので、直行する二台の検出器で磁場ベクトル$\mathbf{B}_{1,SMMW}$の向きをリアルタイムに知ることが出来る。これとジャイロトロンの出力直後に設置した溝入りミラーを組み合わせ、$\mathbf{B}_{1,SMMW}$を$\mathbf{B}_{0,NMR}$に直行する様に常時調整、維持できる様にした。また、このとき確かにDNPエンハンスメントが最大化すると確かめた。この様にサブミリ波の状態をNMR測定中常時監視し、最適化／安定化する事でDNP至適条件の効率のよい探索が可能になり、また高磁場で有利と考えられる細いEPR線幅を持つ分極剤の利用も容易になった。

3. Mn^{2+}錯体を利用する新規分極剤の開発

高磁場条件では狭いEPR線幅を持つ常磁性中心の利用が有利と考えられる。半整数高スピンの遷移金属イオンは多種多様だし、細く強い中央遷移を持つ事から、極低温-高磁場に最適化した新規分極剤として大きな可能性を持っている。我々は最近Mn^{2+}-DOTAやこれを発展させた、マンガン錯体とニトロキソラジカルから成るバイラジカルMn^{2+}-Cyclen-TEMPOの設計と合成を進めており、精製と同定の段階まで進んでいる。

[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。

L2-4

NMR signals to light conversion through a membrane capacitor

○武田和行[1]，長坂健太郎[2]，宇佐見康二[2]
[1]京都大学・大学院・理学研究科
[2]東京大学・先端科学技術研究センター

NMR signals to light conversion through a membrane capacitor

○Kazuyuki Takeda[1], Kentaro Nagasaka[2], Koji Usami[2]
[1] *Division of Chemistry, Graduate School of Science, Kyoto University*
[2] *Research Center for Advanced Science and Technology, The University of Tokyo*

To open the possibility of sensitive measurement of broad resonance lines of quadrupolar nuclei with large quadrupolar interactions, we explore an unprecedented experimental approach, in which radiofrequency signals are up-converted to optical carriers[1] using a capacitor made of an elastic, high-Q SiN membrane.

In such a capacitor, displacement of the membrane changes the capacitance, thereby affecting the resonant mode of the probe circuit. Conversely, electric charges on the electrodes of the capacitor cause the Coulomb force that pulls the membrane. Thus, electromotive force due to nuclear-spin induction is converted to the membrane displacement, which can be read out by an optical interferometer. Since optical measurements can be performed with quantum-limited accuracy, the sensitivity of the NMR signal detected in this way is expected to be very high, provided that both thermal noise in the resonant circuit and thermal fluctuation of the membrane are suppressed. Here, we report our recent development of such an *opto-electro-mechanical NMR* system (Fig. 1).

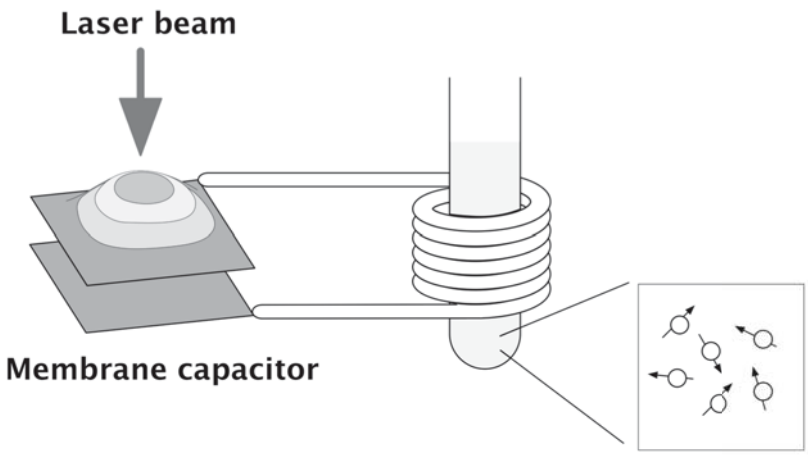


Fig. 1. Schematic description of opto-electro-mechanical NMR.
Nuclear induction develops the electromotive force in the tuned circuit, which, in turn, causes displacement of the membrane of the capacitor. The NMR signal originally appearing as an radiofrequency signal is eventually transferred to an optical carrier.

optomechanics, opto-electro-mechanical coupling, membrane capacitor

○たけだかずゆき，ながさかけんたろう，うさみこうじ

We purchased stoichiometric SiN membranes (Fig. 2(a)) with a size of 500×500 um and a thickness of 50 nm. To fabricate a capacitor, a metal (gold or aluminum) layer was deposited on the membrane. For the counter electrode, aluminum electrode was deposited on a SiO_2 substrate. In addition, pillars were grown on the SiO_2 plate, on which the Au-deposited SiN membrane was mounted, as described in Fig. 2(b). The capacitance was estimated to be ca. 0.1 pF. The metal layer on the membrane also serves for a mirror of an optical cavity. The capacitor was placed in a vacuum chamber to avoid mechanical damping of the membrance by air. We found the fundamental mode of the membrane oscillation at ~180 kHz.

Using the membrane capacitor and a coil, we built an LC circuit resonating at ~42.6 MHz, which corresponds to the Larmor frequency of protons in a magnetic field of ~1 T. To attain coupling between the mechanical mode and the circuit eigenmode, we applied a drive radiofrequency signal at a difference frequency, and successfully observed transfer of radiofrequency signals onto the optical carrier. Experiments confirmed the feasibility of opto-electro-mechanical NMR.

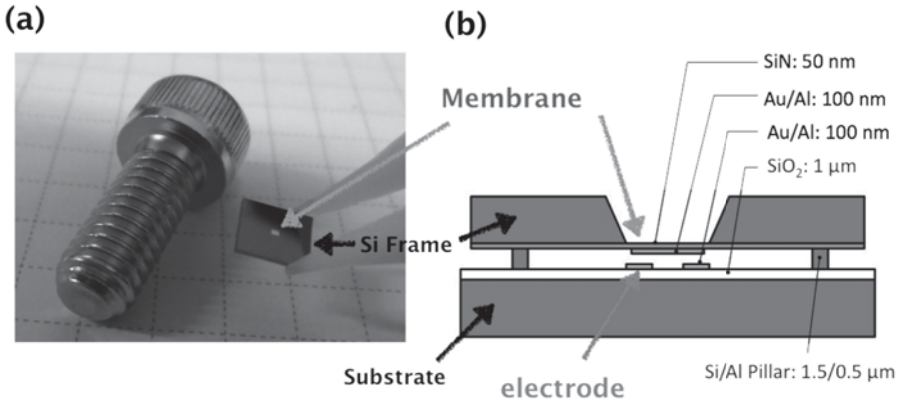


Fig. 2

(a) A SiN membrane (Norcada inc.). The membrane with a size of 500×500 um and a thickness of 50 nm is supported by 5×5 mm Si frame. (b) Schematic side view of the membrane capacitor.

References

[1] T. Bagci, A. Simonsen, S. Schmid, L. G. Villanueva, E. Zeuthen, J. Appel, J. M. Taylor, A. Sørensen, K. Usami, A. Schliesser, E. S. Polzik, *Nature* 507, 81-85 (2014).

L2-5

固体NMRを用いたイモリの肢再生制御蛋白質におけるアンカリングの役割の解明

○野村　薫[1]，谷本　泰士[2]，林　文夫[3]，原田　英里砂[1]，単　小遠[4]，森垣　憲一[5]，島本　啓子[1]
[1]公益財団法人サントリー生命科学財団・生物有機科学研究所
[2]神戸大学大学院・農学研究科
[3]神戸大学大学院・理学研究科
[4]サントリーグローバルイノベーションセンター株式会社研究部
[5]神戸大学・バイオシグナル総合研究センター

The Role of Anchor in the Prod1 essential in Newt Limb Regeneration

○Kaoru Nomura[1], Yasushi Tanimoto[2], Fumio Hayashi[3], Erisa Harada[1], Xiao-Yuan[4], Kenichi Morigaki[5], and Keiko Shimamoto[1]
[1] *Bioorganic Research Institute, Suntory Foundation for life sciences*
[2] *Graduate School of Agricultural Science, Kobe University*
[3]*Graduate School of Science, Kobe University, Rokkodaicho*
[4]*Research Institute, Suntory Global Innovation Center Limited*
[5]*Biosignal Research Center, Kobe University*

Prod1 is a regulator protein which specifies a salamander's limb regeneration direction. The functional role of the "membrane anchoring" by glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchor in Prod1 was investigated by using synthetic mimics in combination with solid-state NMR and fluorescent microscopic studies. Anchoring caused the formation of aggregates because the anchors align Prod1 on the two dimensional membrane surfaces, which drastically reduced motion on the membrane. Interestingly, the aggregated Prod1 interacted with Prod1 molecules tethered on other membrane surfaces, inducing membrane adhesion. These results strongly suggested that the role of anchor in the newt Prod1 is to assist the cell adhesion in the limb regeneration process.

Amphibians like newts have an amazing regenerative ability. Prod1 is a distinctive protein found in salamanders and works in their limb regeneration process.[1] To specify the direction of limb regeneration, Prod1 forms a gradation of their expression levels at the regenerating part. Newt Prod1 is composed of five β-strands and one α-helix and belongs to a three finger protein (TFP) family.[2] In addition, it is also tethered to the blastemal cell membrane surface by a glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor. Although GPI-anchored proteins play important roles, it is poorly understood how the anchor at the C-terminus of the protein contribute to their biological activities. In this study, we clarified the role for the "membrane anchoring" in Prod1 by examining the molecular interactions of newt Prod1 on the membrane surface.

固体NMR，脂質アンカ―型タンパク質，肢再生

○のむらかおる，たにもとやすし，はやしふみお，はらだえりさ，たんしょうえん，もりがきけんいち，しまもとけいこ

So far, solid-state NMR measurements of lipid-anchored proteins have rarely been reported due to the difficulty in acquiring sufficient amount of stable isotope labeled samples in the overexpression of lipid-anchored proteins requiring complex posttranslational modification. To overcome these problems, we prepared mimics of GPI-anchored protein, in which synthetic anchors were linked with proteins expressed in *E. coli*. In our previous report, maleimide containing anchor mimic were attached to the thiol groups in Cystein residue at the C-terminal of B1 domain of IgG-binding protein G (GB1) as a model protein.[3] In this study, instead of the maleimide group, we used the Sortase A mediated chemoenzmatic reaction for the coupling of disulfide rich protein Prod1 and examined the physicochemical properties of the anchored Prod1 by using solid-state NMR, fluorescence microscopy, and DLS measurement.

Anchoring to the membrane drastically reduced the motion of Prod1 which attributed to the aggregation formation of anchored Prod1 on membranes. Three dimensional structure of the anchored Prod1 was not affected by aggregates formation on the membranes. The aggregated anchored Prod1 easily interacted with the anchored Prod1 tethered on other membrane surfaces, inducing membrane adhesion. Even though GB1 was tethered on the membrane by the same way as Prod1, anchored GB1 did not show the aggregation on the membrane and cell adhesion effect. Therefore, anchoring to the membrane is one of the reason of the aggregation and following cell adhesion, but the unique property of Prod1 should be required for these phenomena. It is probably due to the high affinity between Prod1.

Our results strongly suggest that the anchor is used to support Prod1 cell adhesion function in the limb regeneration process. In this way, GPI anchoring, one of the difficult post translational modifications, plays a variety of roles in regulating biological phenomenon

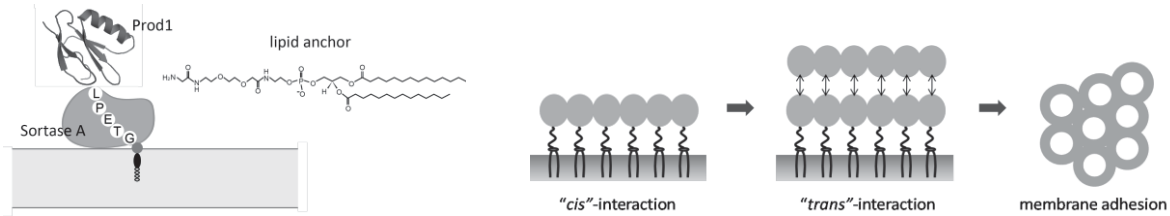


Figure 1. Schematic representation of the chemical structure of the lipid-anchor and lipid-anchored Prod1 (left) and the proposed cell adhesion mechanism mediated by Prod1 (right).

Acknowledgment

This work was supported by a Grant-in-Aid for Scientific Research (#25410187) to KN from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan.

References

(1) da Silva, S. M., Gates, P. B., and Brockes, J. P. (2002) The newt ortholog of CD59 is implicated in proximodistal identity during amphibian limb regeneration. *Dev Cell* , *3*, 547-555

(2) Garza-Garcia, A., Harris, R., Esposito, D., Gates, P. B., and Driscoll, P. C. (2009) Solution structure and phylogenetics of Prod1, a member of the three-finger protein superfamily implicated in salamander limb regeneration. *PLoS One*, *4*, e7123.

(3) Nomura, K., Harada, E., Sugase, K., and Shimamoto, K. (2014) Solid-state NMR spectra of lipid-anchored proteins under magic angle spinning. *J Phys Chem B*, *118*, 2405-2413.

L2-6

高分解能固体NMRおよびFIB-TOF-SIMSを用いたフライアッシュ中ホウ素の化学構造解析

○高橋貴文[1]，金橋康二[1]，林俊一[2]，長坂徹也[3]
[1]新日鐵住金　先端技術研究所
[2]新日鐵住金　技術開発本部
[3]東北大学　工学研究科

Chemical structure analysis of coal fly ash by using high-resolution solid state NMR and FIB-TOF-SIMS

○Takafumi Takahashi[1], Koji Kanehashi[1], Shun-ichi Hayashi[2], Tetsuya Nagasaka[3]
[1] *Advanced Technology Research Laboratories, Nippon Steel & Sumitomo Metal Corporation*
[2] *Technical Research & Development Bureau, Nippon Steel & Sumitomo Metal Corporation*
[3] *Graduate School of Engineering, Tohoku University*

【Introduction】 Coal fly ash (CFA) generated as a byproduct of coal combustion process is mostly reused in Japan to make cements, mortals, and soil amendments, and the residue is deposited in landfills. CFA with main components of SiO_2 and Al_2O_3 contains trace elements as B, As, and Se which are condensed from original raw coal. In Japan, discharge of these trace elements is strictly controlled by a law called Pollutant Release and Transfer Register (PRTR). A global organization of PECH also has categorized B into a trace element group of great concern in coal and residues. Therefore leaching of B from CFA has become an important issue in the energy industry and environmental science. It has been reported that the leaching ratios of B sometimes show pH dependence. This suggests that the leaching behavior of B is mainly controlled by its chemical structure where B is incorporated. Thus, chemical structure of B in CFA as well as its absolute contents should be an important factor to control its leaching behavior. However, chemical structure for B cannot be characterized by common analytical techniques such as XRD, because of its extremely low concentration. In this study, average chemical structure for B was characterized by ^{11}B MAS & ^{11}B satellite transition MAS (STMAS) NMR[1]. In addition, distribution of boron was estimated by microscopic elemental analysis using focused ion beam time-of-flight secondary ion mass spectrometry (FIB-TOF-SIMS)[2].

【Experimental】 Two kinds of CFA particles with different leaching behavior of B were analyzed. The samples with high and low leaching amount are described as α-CFA and β-CFA, respectively. ^{11}B MAS and STMAS spectra were acquired using a 16.4 T narrow bore magnet equipped with a STMAS probe that can generate the r.f. field strength up to 200 kHz for ^{11}B. A bottom part of 3.2mm zirconia (ZrO_2) rotor was filled with Na_2SO_4 for precise setting (±0.002^o) of magic angle, and a center part filled with CFA powders. Spinning rate of the sample rotor was optically controlled to be 20±0.003 kHz during the measurements. The ^{11}B STMAS spectra were acquired using double-quantum filter (DQF) pulse sequence combined with soft-pulse added mixing (SPAM) technique[3] to obtain the higher signal intensity.

固体 NMR、ホウ素、フライアッシュ
○たかはし たかふみ、かねはし こうじ、はやし しゅんいち、ながさか てつや

【**Results & Discussion**】 As shown in **Fig. 1**, the ^{11}B MAS NMR spectra of (a) α-CFA and (b) β-CFA have peaks around 0 and 17 ppm that correspond to a four-coordinate (tetrahedral BO_4) and a three-coordinate (trigonal BO_3) structure, respectively. These spectra clearly show that *α*-CFA has both BO_3 and BO_4 as main structure, while in *β*-CFA, BO_3 is a dominant structure. The remarkable spinning side bands for β-CFA suggest that paramagnetic elements like Fe occur close to BO_3.

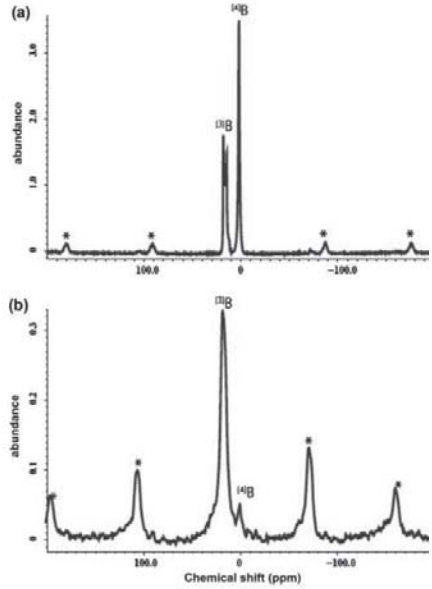


Fig. 1. ^{11}B MAS NMR spectra for (a) α -CFA and (b) *β* -CFA.

From comparison of STMAS spectra for CFA and some B-bearing reference samples (**Fig.2**), tetrahedral boron in α-CFA and trigonal boron in α- and β-CFA may coexist with Ca or Mg. To understand the element concentrated with B more clearly, elemental images for CFA particles were collected by FIB-TOF-SIMS. As shown in **Fig.3**, B in β-CFA coexits with Ca but not with Mg, but shows no correlation with matrix elements such as Si an Al. Furthermore Fe and B are concentrated in a same region, which supports the suggestion obtained by ^{11}B MAS NMR. On the other hand, B in α-CFA shows no correlation with specific matrix elements and is found on surface of every particle like a coating.

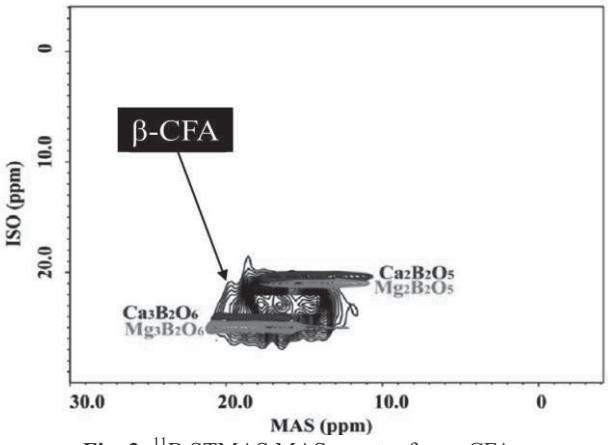


Fig. 2. ^{11}B STMAS MAS spectra for *α* -CFA.

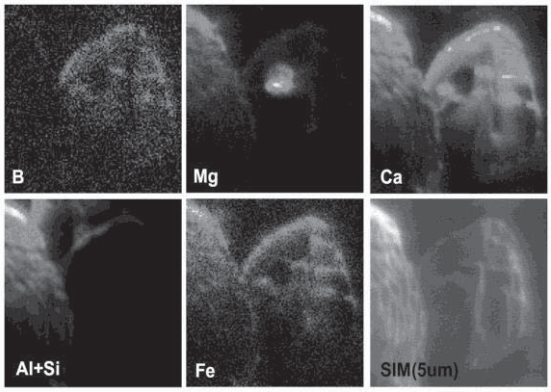


Fig. 3. Cross sectional elemental SIMS and SIM images. Bright region indicates high concentration of elements.

In summary, incorporation of boron into CaO-MgO partilces as BO_3 species will protect its elution into enviroments. The combined approach of solid state NMR bulk analysis and FIB-TOF-SIMS microscopic investigation allows us to clearly understand chemical structure of minor elements in inorganic materials.

References

(1) T. Takahashi, *et al.*, (2011) *Environ. Sci. Technol.*, 45, 890–895, (2) S. Hayashi,T. Tkahashi, K. Kanehashi *et al.* (2010) *Chemosphere,* 80, 881-887, (3) Amoureux, J. *et al*., (2005) *J. Magn. Reson.* 175, 285-299

L2-7

Solid-State NMR meets electron diffraction: Application to crystalline form determination

Tetsuo Oikawa,[1] Manabu Okumura,[2] Ryosuke Kusumi,[2] Fumiko Kimura,[2] Tsunehisa Kimura,[2] Manoj Kumar Pandey,[3] ○Yusuke Nishiyama[3]

[1] JEOL ASIA Pte. Ltd.

[2] Graduate School of Agriculture, Kyoto University

[3] JEOL RESONANCE Inc. & RIKEN CLST-JEOL Collaboration Center

The crystalline polymorphs attract attention in the pharmaceutical sciences. Although powder X-ray diffraction (pXRD) is widely used to identify the crystalline forms, its application is rather limited to pure materials. Instead, ^{13}C cross-polarization magic-angle spinning (CPMAS) solid-state (ss)NMR is complementally used to determine the crystalline polymorphs in mixtures like pharmaceutical tablets. This is particularly useful for quality control in pharmaceutical industries by monitoring a trace of a different crystalline polymorph. However, ^{13}C CPMAS sometimes fails to distinguish different crystalline forms especially if the molecular conformations are similar to each other. Electron diffraction (ED) is widely used to determine the atomic resolution structures of inorganic materials, and is potentially useful to distinguish crystalline forms of organic molecules. However, the severe sample degradation due to electron irradiation hampers the ED application to organic molecules.

Here we demonstrate the combined approach of ^{1}H ssNMR and ED to distinguish the crystalline polymorphs of small organic molecules. Fortunately, ^{1}H is more sensitive to molecular packing than ^{13}C. This is because ^{1}Hs are located on the surface of molecules, while ^{13}C is buried inside. The broad ^{1}H lineshape used to be an obstacle of ^{1}H ssNMR in rigid solids, however, the recent progress of ultrafast MAS makes ^{1}H ssNMR routine applications with highly resolved peaks by suppressing ^{1}H-^{1}H dipolar interactions [1]. ^{1}H ssNMR is highly useful with the combination of multi-dimensional methods, like double-quantum (DQ) / single-quantum (SQ) ^{1}H correlation experiments. On the other hand, to expand the ability of ED for organic molecules, we optimize the experimental conditions for ED. The combined approach of the minimum dose system (MDS) and very low electron dose of 10 e^{-}/nm^{2} together with highly sensitive CMOS camera allows successful ED pattern observation of polycrystalline organic molecules. Moreover, strong electron-scattering intensity realizes to observe ED patters from sub-micrometer crystals. We demonstrate on L-histidine in three different forms, L-histidine-A (form A), L-histidine-B (form B), and L-histidine.HCl.H_2O.

While ^{13}C CPMAS, ^{1}H/^{13}C CP-HSQC, ^{1}H/^{15}N CP-HSQC, and ^{1}H/^{14}N HMQC spectra allow clear distinction between L-histidine.HCl.H_2O and its dehydrated forms (L-histidine-A and B), L-histidine-A and B gives shows very similar spectra each other, making the differentiation of these two forms difficult. On the other hand, ^{1}H ssNMR gives different spectral patterns [2], reflecting the different molecular packing. Although the resolution of ^{1}H ssNMR is not enough to detect each form in the mixture, 2D DQ/SQ ^{1}H ssNMR at 70 kHz MAS rate gives well separated peaks for both L-histidine-A and B. Figure 1 shows the DQ/SQ ^{1}H ssNMR of the mixture of L-histidine-A and B. It is evident that the presence of correlation

---

solid-state NMR, electron diffraction, TEM

おいかわてつお、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、ぱんでぃまのじくまーる、○にしやまゆうすけ

peaks at (SQ, DQ) = (5.9, 8.5) and (4.6, 13.6) ppm, and (5.1, 8.0) ppm confirms the presence of L-histidine-A and B, respectively, as shown by the arrows in the figure.

On the contrary to the ssNMR which is sensitive to local structure, ED can clearly distinguish these two structures through the difference of lattice parameters. While the crystal parameters of L-histidine-A are the orthorhombic structure with a = 0.5177 nm, b = 0.7322 nm, c = 1.887 nm, those of L-histidine-B are the monoclinic structure with a = 0.5172 nm, b = 0.7384 nm, c = 0.9474 nm. As these parameters show, two crystalline structures are very similar to each other, however, the c axis in L-histidine-A is about two times longer than that in L-histidine-B because of slight loss of symmetry along the c axis. The ED pattern of L-histidine-B with the electron-beam axis close to parallel to [1 0 0] zone axis is shown in Figure 2. The numerically calculated ED patterns of L-histidine-A and B are also shown. As clearly seen in the patterns, the observed pattern can be never fit with the calculated one of L-histidine-A, showing this crystalline grain is L-histidine-B.

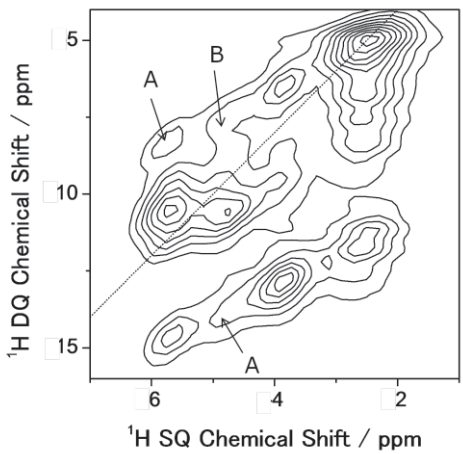


Fig. 1. DQ/SQ ^{1}H ssNMR spectra of the mixture of L-histidine-A and B. Isolated peaks from each form are indicated by the arrows.

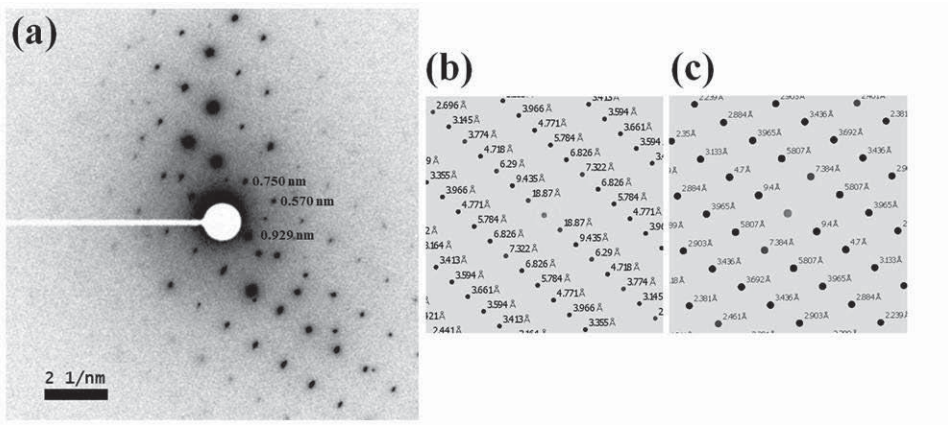


Fig. 2. Comparison experimental (L-histidine-B, (a)) and simulated (for L-histidine A (b) and B (c)) ED patterns. The d-spacing corresponding the diffraction spots are estimated by the calibrated camera length of 40 cm and wave length of 2.51 pm at 200 kV accelerating voltage. The simulated ED pattern are for [1 0 0] zone axis incident beam.

References

[1] Y. Nishiyama, Solid State Nucl. Magn. Reson. 78 (2016) 24-36.

[2] H. Kimura, K. Nakamura, A. Eguchi, H. Sugisawa, K. Deguchi, K. Ebisawa, E. Suzuki, A. Shoji, J. Mol. Struct. 447 (1998) 247-255.

IL1

Elucidation of Chain Trajectory and Chemical Reaction of Semicrystalline Polymers by Solid-State NMR

Toshikazu Miyoshi

[1]*Department of Polymer Science, The University of Akron, USA*

Solid-state(ss)-NMR spectroscopy is one of very powerful tools to characterize local structures and molecular dynamics of organic molecules such as small molecules, peptide, biomacromolecules as well as synthetic polymers. Especially, multi-dimensional NMR spectroscopy has significantly contributed to understanding of molecular dynamics and conformations, and packing of polymers in solid phases. In this talk, I will present two research topics of i) chain trajectory of semicrystalline polymers[1-8] and ii) chemical reactions of *atactic*-Polyacrylonitrile (*a*-PAN) for carbon fiber.[9] The first topic treats with structural formations of long polymer chains during crystallization. In the melt and solution state, polymer chains form random coils. Supercooling induces crystallization of polymers and leads to structural changes from random coils to folded chains in thin crystals. Various characterization techniques including neutron scattering (NS), IR spectroscopy, and Atomic Microscopy have challenged to elucidate chain trajectory of single chains after crystallization. However, insufficient resolutions and limitation of the sample preparations limited structural analysis of chain trajectory of polymers. In this talk, we will present a novel approach using ^{13}C-^{13}C double quantum (DQ) NMR spectroscopy combined with ^{13}C selective isotope labeling to investigate chain trajectory of semicrystalline polymers. Chain folding structure formed in dilute solution and melt states[1-7] as well as unfolding[8] of semicrystalline polymers under deformation will be demonstrated. In the second topic, we investigate chemical reactions of *a*-PAN heat-treated at various temperatures, to make carbon fibers. Heat-treatment under different atmospheres leads to largely different mechanical performances of final carbon fibers. Thereby, detailed structural analyses from molecular to large scales are necessary. However, limited spectroscopic resolutions did not allow one to access detailed chemical structures of heat-treated *a*-PAN which is insoluble in organic solvents. Selective isotope labeling and through-bond and space interactions provide detailed chemical structures produced by inter- and intramolecular reactions under air and vacuum. Moreover, kinetics of chemical reactions will be demonstrated. Newly obtained chemical structures will allow us to discuss about detailed chemical reactions of *a*-PAN in solid phase under different atmospheres.

References 1) Hong, Y-l.; MT; et al *ACS Macro Lett*. 2013, *2*, 501–505. 2) Li, Z.; MT.; et al *Macromolecules* 2015, *48*, 5752–5760. 3) Yuan, S.; MT.; et al *ACS Maco Lett.* 2015, *4*, 1382–1385. 4) Hong, Y-l.; MT.; et al *Macromolecules* 2015, *48*, 3282–3293. 5) Hong, Y.-l.; MT. *ACS Macro Lett*. 2014, *3*, 556–559. 6) Hong, Y.-l.; MT.; et al *Phys. Rev. Lett.* 2015, *115*, 168301. 7) Yuan, S.; MT.; et al *ACS Macro Lett*. 2015, *4*, 143–146. 8) Kang, J.; MT.; et al *ACS Macro Lett*. 2016, *5*, 65–68. 9) Liu, X.; MT.; et al *Macromolecules* 2015, 48, 5300–5309.

Acknowledgements. This work is financially supported by NSF DMR 1105829 and 1408855, and ACS PRF 56168-ND7.

Solid-State NMR, ^{13}C isotope labeling, Polymer, Chain trajectory, Chemical reaction

IL2

Advanced NMR studies of DNA conformational polymorphs

Lukas Trantirek
Central European Institute of Technology, Brno, Czech Republic

Advances and limitations of modern NMR approaches that are used to study DNA polymorphism will be summarized. The approaches will include: i) in-cell/ex-vivo NMR spectroscopy of nucleic acids for addressing environmentally promoted conformational polymorphism of DNA, and ii) hybrid approaches of structural and molecular biology allowing establishing of relationships between DNA function and its polymorphism behavior. Special attention will be paid to methodological advances in oligonucleotide sample preparations for NMR studies including phylogenetic-based approaches for oligonucleotide design accounting for excision of DNA sequence out of the genomic context. Among the specific results the following points will be discussed: 1) Latest results on a role of polymorphism of the G-quadruplex forming segment from promoter region of *c-myc* oncogene in regulation of the *c-myc* expression, 2) Difficulties in formulations of buffering systems for NMR studies of DNA.

References:

Školáková P, Foldynová-Trantírková S, Bednářová K, Fiala R, Vorlíčková M, Trantírek L. Unique C. elegans telomeric overhang structures reveal the evolutionarily conserved properties of telomeric DNA. *Nucleic Acids Res.* **2015,** 43(9):4733-45.

Hänsel R, Löhr F, Trantirek L, Dötsch V. High-resolution insight into G-overhang architecture. *J Am Chem Soc*. **2013,** 135(7):2816-24

Hänsel R, Foldynová-Trantírková S, Dötsch V, Trantírek L. Investigation of quadruplex structure under physiological conditions using in-cell NMR. *Top Curr Chem*. **2013**, 330:47-65.

Hänsel R, Löhr F, Foldynová-Trantírková S, Bamberg E, Trantírek L, Dötsch V. The parallel G-quadruplex structure of vertebrate telomeric repeat sequences is not the preferred folding topology under physiological conditions. *Nucleic Acids Res.* **2011**, 39(13):5768-75.

Fiala R, Spacková N, Foldynová-Trantírková S, Sponer J, Sklenár V, Trantírek L. NMR cross-correlated relaxation rates reveal ion coordination sites in DNA. *J Am Chem Soc*. **2011,** 133(35):13790-3

DNA, polymorphism, in-cell NMR, G-quadruplex

IL3

Cholesterol Binding to the C99 Domain of The Amyloid Precursor Protein as a Factor that May Promote Alzheimer's Disease

Charles R. Sanders[1]

[1]*Center for Structural Biology and Department of Biochemistry, Vanderbilt University, Nashville, Tennessee 37240 USA*

C99 is the transmembrane C-terminal domain of the amyloid precursor protein. C99 is cleavage by γ-secretase to release the amyloid-β polypeptides that are believed to for toxic oligomers and aggregates that initiate Alzheimer's disease. It is known that elevated cholesterol promotes amyloid-β, but the mechanism has not previously been clear. In this study the structure of C99 was determined using NMR and EPR spectroscopy in model membranes. It was also discovered the C99 binds cholesterol to a 1:1 complex. We hypothesize that the C99-cholesterol complex plays a central role in the mechanisms by which cholesterol promotes formation of amyloid-β. We describe our initial efforts to test this hypothesis and to elucidate the underlying mechanisms. We also describe work to find compounds that block binding of cholesterol to C99.

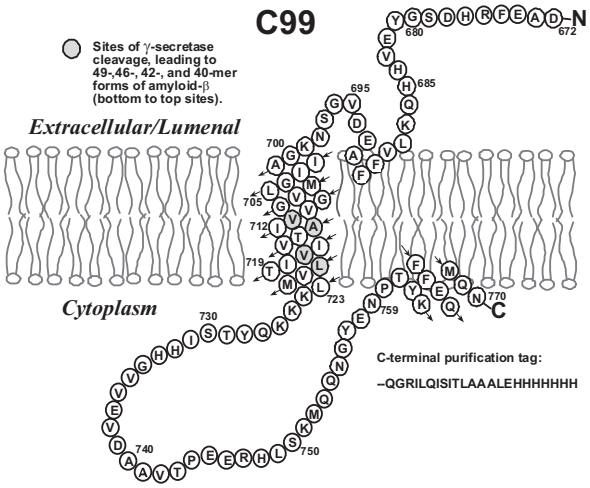


Figure 1. Sequence and Topology of C99

IL4

The Future of NMR in Metabolomics

David S. Wishart
Departments of Biological Sciences and Computing Science. University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada T6G 2E9

In principle, NMR is an ideal technique for metabolomics. It is non-destructive, non-biased, highly quantitative, requires no prior separation, permits the identification of novel compounds and needs no chemical derivatization. However, relative to other analytical techniques NMR is slow and relatively insensitive. Furthermore the identification and quantification of compounds in mixtures by NMR is manually intensive and often error-prone. Because of these limitations, NMR is being supplanted by mass spectrometry for many metabolomic applications. In this presentation I will describe a number of innovations that both my lab and other NMR spectroscopists have developed that are allowing NMR to match or even exceed the speed, sensitivity and metabolite coverage claimed by various mass spectrometry methods. In particular, I will describe efforts to increase NMR sensitivity to nanomolar levels through the use of higher magnetic fields, better probes and Dynamic Nuclear Polarization (DNP), to greatly reduce sample size requirements through the development of microprobes and tube-in-tube NMR, and to reduce signal complexity through the application of selective isotopic labeling and improved pulse sequences. Finally I will describe our recent efforts to completely automate NMR-based metabolomics using a software program called Bayesil. Bayesil is more than 95% accurate in terms of compound identification and is able to identify and quantify up to 60 compounds from an NMR spectrum in less than 2 CPU minutes. I will outline our efforts to extend Bayesil to the quantitative analysis of beverages (such as beer and wine) and how Bayesil has been integrated into inexpensive metabolomics kits, which should make NMR-based metabolomics accessible to anyone with an NMR spectrometer. These and other developments suggest the future of NMR in metabolomics is looking very promising.

NMR, Metabolomics, Technology, Health, Drug Discovery

HL1

Gazing NMR for Thirty Six Years

○Takashi Iwashita
(Former) SUNTORY FOUNDATION for LIFE SCIENCES
Bioorganic Research Institute, Structure and Function Group, Division of Structural Biomolecular Science

In my graduate student time, I challenged the synthesis of natural products using 1,3 dipolar cycloaddition reaction. We had to present a research proposal in the second year of the course, and I covered the ^{15}N-NMR as a research tool. When the director of Sunbor (Suntory Institute of Bioorganic Research), Prof. Koji Nakanishi of Columbia University, looked for the organic chemist who was interested in NMR, my supervisor, Prof. H. Kakisawa remembered my research proposal and wrote a letter to recommend me to Sunbor.

I started my NMR career of Sunbor in April of 1980, and the Nicolet NT360 machine was installed after a half year. This machine equipped the Oxford superconducting magnet (8.46 T), and the proton resonance frequency was 360 MHz. At first, we could acquire the two dimensional *J*-resolved data, and processed it to 2D spectra. However, we could not run COSY and NOESY yet for a while. When we got the newer operation program, we could run them.

In a time like this, we started collaboration with Prof. D. Uemura of Shizuoka University. Our target was Palytoxin, biggest natural organic molecule without repeated fragments at that time. Prof. Uemura prepared some fragments from Palytoxin using oxidation reaction. We deduced the fragment structures using selective decoupling technique on their ^{1}H NMR spectra. Concurrently, we tried to use COSY experiment on Palytoxin fragments.[1)-3)] The Palytoxin structure was ultimately judged by organic synthesis, which was done by Prof. Y. Kishi of Harvard University.

In these days, the decoupler of our NMR machine could not generate pulses, so that INEPT or DEPT experiments did not work on the machine. I asked the Nicolet engineer to modify the decoupler unit, and could acquire the DEPT spectra of Compactin that was synthesized by Dr. M. Hirama who moved to Tohoku University.

We experienced various kind of NMR experiments, and summarized them in a book “One-dimensional and Two-dimensional NMR Spectra by Modern Pulse Techniques”. This book was written in Japanese first, and then, translated to English.[6)]

In 1986, I worked with Prof. Dinshaw Patel of Columbia University for 6 months, and stayed at Bruker office in Billerica, because they had some troubles with subway in New York and their machine was installed in Birelica tentatively. I learned how to acquire the NMR data of water solution samples from Dr. Mike Zagorski. After coming back Sunbor, Dr. Mike Zagorski joined us, and elucidated the three dimensional structure of Paradaxin P-2 using distance restrained molecular dynamics calculations, which contained 33 amino acid residues, and was shark repellent.[7)]

Between 1992 and 1994, I worked with Prof. Ann McDermott of Columbia University. I learned SSNMR there, and studied the interaction between Suramin and phosphoglycerate kinases using solution NMR.[8)]

After coming back Sunbor, we got NMR machines equipped with field gradient system. The field gradient system revolutionized NMR spectroscopy. Especially, HMBC spectra was much improved without obstructive noise. We continued Palytoxin project, and assigned all protons and carbons of the molecule.[4] At the early days in 1980s, Dr. M. Maeda of Suntory company isolated Palytoxin from a red alga, *Chondria armata*. The proton spectrum of the compound was almost identical to that of Palytoxin, so that we thought it was Palytoxin. Recently, we carefully investigated the NMR spectra of the compound again, and concluded it was Palytoxin.[5]

The field gradient system brought us another possibility. It is diffusion measurement, in which a famous DOSY experiment is included. However, DOSY experiment is very sensitive to thermal convection of NMR sample. I tried to use various methods to suppress thermal convection. Finally, I found that the new method, insertion of capillaries in NMR sample tube, prevented thermal convection completely.[9] We can easily apply this method after measuring usual NMR spectra.

I thank my colleagues and collaborators. They give me various idea and information. I really hope their studies will be further developed.

References:

(1) Further studies on Palytoxin. I.,Daisuke Uemura, Katsuhiro Ueda, Yoshimasa Hirata, and Hideo Naoki, Takashi Iwashita, *Tetrahedron Lett.*, **22**, 1909-1912 (1981)

(2) Further studies on Palytoxin. II. Structure of Palytoxin, Daisuke Uemura, Katsuhiro Ueda, Yoshimasa Hirata, and Hideo Naoki, Takashi Iwashita, *Tetrahedron Lett.*, **22**, 2781-2784 (1981)

(3) Studies on Palytoxins, Daisuke Uemura, Yoshimasa Hirata, and Takashi Iwashita and Hideo Naoki, *Tetrahedron*, **41**, 1007-1017 (1985)

(4) Complete NMR signal assignment of palytoxin and N-acetylpalytoxin, Y. Kan, D. Uemura, Y. Hirata, M. Ishiguro, and T. Iwashita, *Tetrahedron Lett.*, **42**, 3197-3202 (2001)

(5) Insecticidal activity guided isolation of palytoxin from a red alga, *Chondria armata*, Soko Mori, Kohtaro Sugahara, Mitsuru Maeda, Kyosuke Nomoto, Takashi Iwashita, Tohru Yamagaki, *Tetrahedron Letts*., **57**, 3612-3617 (2016)

(6) One-dimensional and Two-dimensional NMR Specta by Modern Pulse Techniques (in English), Koji Nakanishi(ed.), Takenori Kusumi, Takashi Iwashita, Hideo Naoki, Kodansha(Tokyo)-University Science Books(California), 1990

(7) Solution structure of pardaxin P-2, M. G. Zagorski, D. G. Norman, C. J. Barrow, T. Iwashita, K. Tachibana, D. J. Patel, *Biochemistry*, **30**, 8009-8017 (1991)

(8) Conformation of the Trypanocidal Pharmaceutical Suramin in Its Free and Bound Forms: Transferred Nuclear Overhauser Studies, T. Polenova, T. Iwashita, A. G. Palmer III, and A. E. McDermott, *Biochemistry*, **36**, 14202-14217 (1997)

(9) Use of glass capillaries to suppress thermal convection in NMR tubes in diffusion measurements, Takashi Iwashita, Tsuyoshi Konuma, Erisa Harada, Shoko Mori, Kenji Sugase, *Magn. Reson. Chem.*, **54**, 729-733 (2016)

HL2

High Resolution Solid-State NMR Spectroscopy. Development and Application to Structural Biochemistry

Akira Naito

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

1. Close Encounter of High Resolution Solid-State NMR

In 1978, I started the post doctoral research under supervision of Prof. McDowell in the University of British Columbia, Canada after I completed Ph D degree in Kyoto University under supervision of Prof Akasaka. I actually started the research work on the determination of electronic state of Cu(II) doped-alanine complex by means of Electron Nuclear Double Resonance (ENDOR) spectroscopy [1]. I got some results on the hyperfine coupling tensor of the compound, and Prof. McDowell went to Switzerland to present the results in the conference. However, he suffered disease there in Switzerland, and he did not come back for about one and half year since then. In the meanwhile, new high resolution solid-state NMR spectrometer arrived to the University of British Columbia. Newly arrived spectrometer was something like a homemade machine and very difficult to use it. Anyway, that was my close encounter of the high resolution solid-state NMR field. I thought that high resolution solid state NMR would be a novel field and I decided to address the field hereafter.

Using the solid-state NMR spectrometer, I started to determine the ^{13}C chemical shift tensor of single crystal of L-alanine [2]. I first build the NMR probe with goniometer to observe the angular variation of the ^{13}C NMR signals. Using these data, ^{13}C chemical shift tensors with principal values and the direction cosines were precisely determined. In the course of the work, I found that asymmetric triplet dipolar splitting for ^{13}C-^{14}N pair. The origin of the asymmetric triplet was revealed to be attributed to the large nuclear quadrupole interaction of ^{14}N nucleus. As a similar phenomenon, asymmetric doublet pattern was observed for the carbon nuclei bonded directly to nitrogen nuclei in the magic angle spinning (CP-MAS) experiments [3,4]. This asymmetric doublet pattern was theoretically explained by taking into account of the ^{14}N quadrupole interaction. I further observed asymmetric patterns for ^{13}C-^{75}As [5] and ^{1}H-^{14}N [6] dipolar systems under the MAS condition.

It was quite difficult to observe CP-MAS ^{13}C NMR signals for imidazole crystals because ^{1}H spin-lattice relaxation time is very long. Cu(II) ions were doped in the imidazole crystals. This paramagnetic ions reduced the relaxation times of ^{1}H nuclei significantly, and consequently ^{13}C NMR signals of imidazole could successfully observed [7]. This paramagnetic doping is commonly used to observe the enhanced ^{13}C NMR signals of solid biological systems.

In the University of British Columbia, I further observed ^{13}C T_1 and $T_{1\rho}$ relaxation times in the solid state under MAS condition [8,9], anisotropy of NOE [10] and double quantum exchange processes of ^{13}C-^{14}N dipolar pairs of alanine crystals [11].

2. Development of State Correlated Two Dimensional NMR Spectroscopy

In 1984, I returned back to Kyoto University as an assistant professor and I developed microwave irradiation NMR spectrometer to establish the rapid temperature jump experiments with Prof. Akasaka [12]. This temperature jump experiments by microwave pulses applied to the liquid crystalline samples and we established the very fast phase transition from liquid crystalline phase-to-isotropic phase in the liquid crystalline samples. This newly developed techniques allowed us to detect the liquid crystalline-to-isotropic

state correlated two dimensional (SC-2D) NMR spectra [13,14,15]. In the APAPA system, ^{1}H-^{1}H dipolar patterns were clearly observed for individual proton nuclei with the resolution of isotropic state in the SC-2D NMR spectrum of APAPA [16]. We further observed SC-2D NMR spectrum between the native and denatured states of proteins [17].

3. Application of High Resolution Solid-State NMR to Small Solid Biological Systems

In 1990, I moved to Department of Life Science of Himeji Institute of Technology (present University of Hyogo) as an associate professor and worked together with Professor Saitô and Dr. Tuzi. In this institute, I tried to study biological systems using high resolution solid state NMR spectroscopy. I first established to determine accurately the inter-nuclear distances of ^{13}C-^{15}N dipolar systems and extended to the multiple nuclear systems using rotational echo double resonance (REDOR) methods [18,19]. We successfully determined the three dimensional structure of N-Ac-Pro-Gly-Phe tripeptide in the solid state using the accurately determined inter-nuclear distances [20,21]. We could even distinguish the tripeptide crystal from that with slightly different morphology.

We then found magnetically oriented properties in melittin-DMPC bilayer systems and defined this system as magnetically oriented vesicle system (MOVS) [22,23,24]. We further established that membrane bound melittin was rotating rapidly about the bilayer normal. Based on the dynamic structure, we further developed the new analytical procedure called chemical shift oscillation [25]. This chemical shift oscillation analysis allowed us to determine the structure and orientation of membrane bound structure of helical antimicrobial peptides such as melittin, dynorphin [26], bonbolitin [27], lactoferrampin [28] and alamethicin [29].

We also studied the amyloid fibrillation mechanism of human calcitonin (hCT) using solid state ^{13}C NMR experiments [30,31]. It turned out that anti-parallel β-sheet fibrils were formed at a neutral pH and mixture of anti-parallel and parallel β-sheet fibrils were formed at an acidic pH. The kinetic analysis of fibril formation revealed that hCT formed fibrils with autocatalytic two step reaction mechanism.

4. Application of High Resolution Solid-State NMR to Large Solid Biological Systems

In 2001, I moved to Graduate School of Engineering, Yokohama National University as a Professor. I continue to study development and application of high resolution solid state NMR to a variety of biological systems.

In case of amyloid fibril formation of hCT, we further proceeded the study to determine the fibril structure more accurately. Inter-nuclear distances of specifically labelled hCT were determined using REDOR methods [32], and the results indicated that anti-parallel β-sheet structure in which Phe16 and Phe19 were closely faced with 1 register shifted in the mutual β-strand in the β-sheet. Based on the structure obtained from solid-state NMR, MD simulation was performed to characterize the interaction between inter strand residues. It turned out that β-sheet structure stabilized by pi-pi interaction between Phe residues [33]. This interactions were further justified by observing the fibril formation kinetics using F16L and F19L mutants, and the results indicate slower fibril elongation rate (k_2) as compared with that of WT-hCT. We further observed that the spherical intermediates in the fibril formation process of hCT in the presence of HEPES [34]. This clearly support the autocatalytic two step reaction mechanism.

Structural changes in photoreceptor membrane proteins, bacteriorhodopsin (bR), sensory rhodopsin I (SRI) and sensory rhodopsin II (SRII), were investigated under external perturbations such as heat, pressure and photo-irradiation.

In the dark adapted bR, two types of retinal molecules with all-trans (AT) and 13-*cis*, 15-*syn* (CS) configurations coexist. We designed to apply the pressure to the sample by the centrifugal force generated by fast magic angle spinning. When pressure was applied to bR, CS state became dominated and it was also detected that the protein conformation and dynamics were simultaneously altered. On the other hand, when light was subsequently illuminated, AT state became dominant, that is a light adapted state, and detected by solid-state ^{13}C NMR spectra of retinal and protein [35,36].

It is important to reveal the photo reaction mechanism in the photoreceptor proteins. Thus, photoreaction pathways and photo intermediates were investigated using newly developed photo-irradiation solid state NMR spectroscopy. In case of SRI, M-intermediate was trapped by illuminating with green light at -40 °C, and subsequently P-intermediate was trapped by illuminating with blue light. This clearly indicate the color discriminating functional switching mechanism [37]. In case of SRII, multiple M-intermediate and N-intermediate were trapped by illuminating with green light [38]. When blue light was illuminated, the M-intermediates switched to O-intermediates. In case of Y185F-bR, CS*-intermediate, N-intermediates and O-intermediates were trapped and the configurations were characterized by analyzing the chemical shift values of ^{13}C NMR signals [39].

Microwave irradiation NMR spectroscopy was further applied to liquid crystalline sample to understand the microwave heating mechanism. We first developed the *in situ* microwave irradiation solid state NMR apparatus [40]. Using this spectrometer, it turned out that non-equilibrium local heating state was observed in liquid crystalline samples at the temperature lower than the phase transition temperature [41]. When the temperature was further increased higher than the phase transition temperature. Proton nuclei bonded to polar groups indicated much higher temperature than those bonded to non-polar groups. These results indicated the nature of the distinctive microwave heating process. It is stressed that the microwave irradiation NMR spectroscopy excite electronic dipole moment rather than electron spins and gain insight into the microwave heating mechanism in the molecular level.

References

1. C.A. McDowell, and A. Naito. J. Magn. Reson., 45, 205-222 (1981).
2. A. Naito, S. Ganapathy, K. Akasaka, and C.A. McDowell. J. Chem. Phys., 74, 3190-3197 (1981).
3. A. Naito, S. Ganapathy, and C.A. McDowell. J. Chem. Phys., 74, 74, 5393-5397 (1981)
4. A. Naito, S. Ganapathy, K. Akasaka, and C.A. McDowell. J. Magn. Reson., 54, 226-235 (1983).
5. D.L. Sastry, A. Naito, and C.A. McDowell. Chem. Phys. Lett., 146, 422-427 (1988).
6. A. Naito, A. Root, and C.A. McDowell. J. Phys. Chem., 95, 3578-3581 (1991).
7. S. Ganapathy, A. Naito, and C.A. McDowell. J. Am. Chem. Soc., 103, 6011-6015 (1981).
8. K. Akasaka, S. Ganapathy, C.A. McDowell, and A. Naito. J. Chem. Phys., 78, 3567-3572 (1983).
9. A. Naito, S. Ganapathy, K. Akasaka, and C.A. McDowell. J. Magn. Reson., 54, 226-235 (1983).
10. A. Naito and C.A. McDowell. J. Chem. Phys., 84, 4181-4186 (1986).
11. A. Naito, P.B. Barker, and C.A. McDowell. J. Chem. Phys., 81, 1583-1591 (1984).
12. K. Akasaka, A. Naito, H. Nakatani, and M. Imanari. Rev. Sci. Instrum., 61, 66-68 (1990).
13. A. Naito, H. Nakatani, M. Imanari, and K. Akasaka. J. Magn. Reson., 87, 429-432 (1990).
14. A. Naito, M. Imanari, and K. Akasaka. J. Magn. Reson., 92, 85-93 (1991).
15. K. Akasaka, M. Kimura, A. Naito, H. Kawahara, and M. Imanari.. J. Phys. Chem., 99, 9523-9529 (1995).
16. A. Naito, M. Imanari, and K. Akasaka. J. Chem. Phys., 105, 4504-4510 (1996).

17. K. Akasaka, A. Naito, and M. Imanari. J. Am. Chem. Soc., 113, 4688-4689 (1991).
18. A. Naito, K. Nishimura, S. Tuzi, and H. Saitô. Chem. Phys. Lett., 229, 506-511 (1994).
19. K. Nishimura, A. Naito, S. Tuzi, and H. Saitô. J. Phys. Chem. B, 103, 8398-8408 (1999).
20. A. Naito, K. Nishimura, S. Kimura, S. Tuzi, M. Aida, N. Yasuoka, and H. Saitô. J. Phys. Chem., 100, 14995-15004 (1996).
21. M. Aida, A. Naito, and H. Saitô. J. Mol. Struct. (Theochem) 388, 187-200 (1996).
22. A. Naito, T. Nagao, K. Norisada, T. Mizuno, S. Tuzi, and H. Saitô. Biophys. J., 78, 2405-2417 (2000).
23. A. Naito, T. Nagao, M. Obata, Y. Shindo, M. Okamoto, S. Yokoyama, S. Tuzi, and H. Saitô. Biochim. Biophys. Acta, **1558**, 34-44 (2002).
24. S. Toraya, T. Nagao, K. Norisada, S. Tuzi, H. Saitô, S. Izumi, and A. Naito. Biophys. J. 89, 3214-3222 (2005).
25. S. Toraya, K. Nishimura, and A. Naito. Biophys. J. 87, 3323-3335 (2004).
26. T. Uezono, S. Toraya, M. Obata, K. Nishimura, S. Tuzi, H. Saitô, and A. Naito. J. Mol. Struc. 749, 13-19 (2005).
27. S. Toraya, N. Javkhiantugs, D. Mishima, K. Nishimura, K. Ueda, and A. Naito. Biophys. J., 99, 3282-3289 (2010).
28. A. Tsutsumi, N. Javkhlantugs, A. Kira, M. Umeyama, I. Kawamura, K. Nishimura, K. Ueda, and A. Naito. Biophys. J. 103, 1735-1743 (2012).
29. T. Nagao, D. Mishima, N. Javkhlantugs, J. Wang, D. Ishioka, K. Yokota, K. Norisada, I. Kawamura, K. Ueda, and A. Naito. Biocim. Biophys. Acta, 1848, 2789-2798 (2015).
30. M. Kamihira, A. Naito, S. Tuzi, A.Y. Nosaka, and H. Saitô. Protein Science, 9, 867-877 (2000).
31. M. Kamihira, Y. Oshiro, S. Tuzi, A.Y. Nosaka, H. Saitô, and A. Naito, and M. Kamihira, J. Biol. Chem. 278, 2859-2865 (2003).
32. A. Naito, M. Kamihira, R. Inoue, and H. Saitô. Magn. Reson. Chem. 42, 247-257 (2004).
33. H. Itoh-Watanabe, M. Kamihira-Ishijima, N. Javkhlantugs, R. Inoue, Y. Itoh, H, Endo, S. Tuzi, H. Saitô, K. Ueda, and A. Naito. Phys. Chem. Chem. Phys. 15, 8890-8901 (2013).
34. H. Itoh-Watanabe, M. Kamihira-Ishijima, I. Kawamura, M. Kondoh, M. Nakagoshi, M. Sato, and A. Naito. Phys. Chem. Chem. Phys., 15, 16956-16964 (2013).
35. I. Kawamura, N. Kihara, M. Ohmine, K. Nishimura, S. Tuzi, H. Saitô, and A. Naito. J. Am. Chem. Soc. 129, 1016-1017 (2007).
36. I. Kawamura, S. Yamaguchi, H. Nishikawa, K. Tajima, M. Horigome, S. Tuzi, H. Saitô, and A. Naito. Polymer J. 44, 863-867 (2012).
37. H. Yomoda, Y. Makino, Y. Tomonaga, T. Hidaka, I. Kawamura, T. Okitsu, A. Wada, Y. Sudo, and A. Naito. Angew. Chem. Int. Ed., 53, 6960-6964 (2014).
38. Y. Tomonaga, T. Hidaka, I. Kawamura, T. Nishio, K. Ohsawa, T. Okitsu, A. Wada, Y. Sudo, N. Kamo, A. Ramamoorthy, and A. Naito. Biophys. J. 101, L50-L52 (2011).
39. K. Oshima, A. Shigeta, Y. Makino, I. Kawamura, T. Okitsu, A. Wada, S. Tuzi, T. Iwasa, and A. Naito. Photochem. Photobiol. Sci., 14, 1694-1702 (2015).
40. Y. Tasei, T. Yamakami, I. Kawamura, T. Fujito, K. Ushida, M. Sato, and A. Naito. J. Magn. Reson. 254, 27-34 (2015).
41. Y. Tasei, F. Tanigawa, I. Kawamura, T. Fujito, M. Sato, and A. Naito. Phys. Chem. Chem. Phys. 17, 9082-9089 (2015).

第三日目
11月18日（金）
日本語セッション

Day 3（Nov. 18, Fri）
（Japanese Sessions）

L3-1

化学物質のヒト脳への影響評価を目指したMR定量測定法の開発

○渡邉英宏[1]，高屋展宏[1]，Tin Tin Win Shwe[2]，三森文行[1]
[1] 国立環境研究所 環境計測研究センター 画像・スペクトル計測研究室
[2] 国立環境研究所 環境リスク・健康研究センター 生体影響評価研究室

Development of quantitative measurement methods in MR for evaluation of effects of chemicals to human brain

Hidehiro Watanabe, Nobuhiro Takaya, Tin Tin Win Shwe, Fumiyuki Mitsumori
[1] *Center for environmental measurement and analysis, National Institute for Environmental Studies*
[2] *Center for health and environmental risk research, National Institute for Environmental Studies*

Behavioral tests are widely used to evaluate the effects of chemicals to the brain in developmental disorders. For gaining the new information, we are developing a new evaluation method using MRI which consists of the two approaches from human and animal sides. While we pursue the biomarker on the developmental disorders in the human approach, we evaluate the response of that biomarker in the animal experiments after chemical exposure. Quantitation method with high accuracy is required for these approaches and we have been developed several quantitative measurement methods on anatomy, metabolism and bio-iron. In this work, we will discuss these measurement methods and accumulated data such as baseline data of healthy volunteers.

１．はじめに

社会問題のひとつとなっている発達障害の増加の原因として、遺伝的要因のほかに化学物質などの環境要因の疑いが指摘されている。この化学物質の影響評価には、一般的に化学物質曝露後のマウス、ラットなどの動物行動試験法が用いられている。我々は、これに加えて磁気共鳴装置（MRI）のヒト脳を非侵襲に直接測定できるという特徴を利用できないかという点に着目して研究を進めている。この考え方の基本は、ヒト脳の MR 測定から発達障害に関する指標（バイオマーカー）を見出すことと、化学物質曝露後のラット脳の MR 測定（in vivo, ex vivo）でヒト脳での同じ指標に関しての応答を評価することである。前者のためには、健常人ベースラインデータの集積と発達障害患者測定が必要となる。また、この指標に関して、健康と病気とは二律背反ではなく連続的なものと考えられるため、発達障害に関する健康影響指標となり得るのではないかと考えている。

指標に関しては、例えば、自閉症スペクトラム障害（Autism Spectrum Disorders）の MR イメージング測定や MRS 測定などを用いた研究が精力的に進められているが、データのばらつきなどが大きく難しいのが現状である。この原因として、疾患の程度の幅の広さによることが十分に考えられる一方で、MR 測定での定量の難しさという点で測定の側の問題もあり得ると考えている。そこで、この後者に着目し、定量精度という点に留意して MR 測定法開発を行ってきたので報告する。

２．方法

MR定量測定として形態、代謝に関して測定法を開発してきた。これに加えて、組織水^{1}Hの横緩和

ヒト脳，化学物質, 定量測定

○わたなべひでひろ，たかやのぶひろ，てぃんてぃんうぃんしゅい，みつもりふみゆき

時間測定からヒト脳内鉄濃度が測定できることを見出し、開発を行ってきた。形態に関しては、ヒト全脳形態画像に対して体積解析法を定量化法として開発、導入した。代謝に関しては、広く利用されている^{1}H MRS測定と定量のための線形結合モデル解析に加え、代謝物ピークの高分解のための2D ^{1}H MRS測定法、定量解析法を開発した。全ての測定は、ヒト全身用4.7 T MR装置（Agilent社製）を用いて行った。

形態画像測定：ヒト全脳測定には、90°－180°プリパルスでコントラストを付与する MDEFT シーケンスを用いた。再構成後、1 mm 等方ピクセルで得られた T_1 強調画像を得た。Statistical Parametric Mapping 12（SPM12、脳機能解析用ソフトウェア）上で、高磁場特有の画像不均一性補正を実施後、灰白質、白質、脳脊髄領域の全脳分画を行った。この結果から、各分画の体積および頭蓋内体積を算出した。続いて、FreeSurfer（部位解析（percellation）用ソフトウェア）により、帯状回、紡錘状回などの左右含めての全 111 領域の部位分画を行った。この部位分画結果と SPM12 の全脳 3 分画結果から、各部位の灰白質、白質、脳脊髄領域分画解析を行った。これらに関して、同意を得たボランティア（n = 358（男性 146 名，女性 212 名））の測定を実施し、解析を行った。

代謝物濃度測定：STEAM シーケンスを用いた。広く用いられている渦電流磁場補正、周波数シフト補正の他、生体由来の高周波磁場分布に起因する化学シフト方向の強度歪みの補正を行った後、線形結合モデル解析により濃度算出を行った。この 1D スペクトルでは、神経伝達物質のグルタミン酸やγ-アミノ酪酸のピーク分離は、強い ^{1}H, ^{1}H 間の同核種カップリングのため難しい。この高分解化のため、2D 定時間（Constant Time（CT））法を利用した ^{1}H でカップリングが可能な局所励起 CT-COSY シーケンス、CT-PRESS シーケンスを開発し、ヒト脳測定を実施した。現在、ヒト脳前部帯状回領域からの代謝物濃度ベースラインデータ集積を開始し、進めているところである。

脳内鉄濃度測定：我々はヒト脳内組織水 ^{1}H のみかけの横緩和速度 $R_2^{\dagger}$（$T_2^{\dagger}$ の逆数）は、脳内フェリチン鉄濃度[Fe]、高分子分画比 f_M と定数項の線形和で表せることを見出してきた。この測定では、精度の良い $T_2^{\dagger}$ 分布測定を目的とした断熱パルスによるマルチスピンエコー（MASE）シーケンスを用いた。これまでに、単一スライス面での測定を開発し、ボランティア測定を実施してきた。

３．結果

定量測定結果の一例として、図 1 に形態画像測定で得られた健常人の全脳分画に関するベースラインデータを示す。横軸に年齢、縦軸に各分画体積を各頭蓋内体積で除した割合を示す。この正規化によって男女共に似た分布を示した。ベースラインデータには、ばらつきが小さいことが求められ、この例の様な年齢に応じた展開、さらに必要であれば男女に応じた分類などを行うことが良いと思われる。

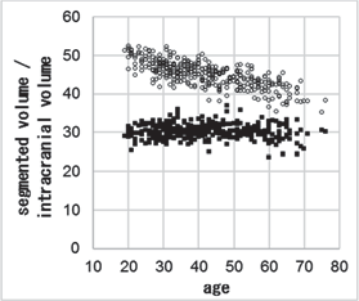


Fig. 1　A baseline data of health volunteers (Relationship between age and gray (○) and white matter (■) volumes.

４．まとめ

ヒト全身用 4.7 T MR 装置上で、ヒト脳 MR 定量測定として取り扱うことができる形態、代謝物濃度、脳内の鉄濃度の測定法および解析法を開発してきた。化学物質のヒト脳への影響評価という目標に対しては、幾つものハードルがあるが、健常人ベースラインデータの集積、指標抽出を目指した発達障害患者測定、ラット脳測定などと進めていきたい。

L3-2

磁石回転による主磁場制御型ＭＲＩのＴ１強調効果

○小林竜馬[1]，内海英雄[2]
[1]九州大学・先端融合医療レドックスナビ研究拠点
[2]静岡県立大学

New Type T1 weighted imaging of main field cycle MRI with rotary magnet

○Ryoma Kobayashi[1], Hideo Utsumi[2]
[1] *Innovation center for medical redox, Kyushu University*
[2] *University of shizuoka*

T1 weighted image(T1WI) is useful for clinical application. We suggest new type T1 weighted image using main magnetic field cycle MRI using rotary magnet. Because T1 depend on magnetic field, there is a possibility that we get different image from conventional T1WI by short TR.

MRIでは物質のT1緩和能の違いをもとにT1強調画像が一般的に撮像されてきた。特に臨床現場において、ガンなどの疾患や、ガドリニウム造影剤を用いた疾患造影に非常に効果を発揮し、なくてはならない存在となっている。

今回我々は、大小２つの対向型永久磁石を円周上に配置し、それを回転させることで主磁場強度が変化する新しい Field cycle MRI を開発した。磁場強度は0.3T（磁場均一領域　90mm*90mm*70mm）と円弧型の13.5mT（磁場均一領域　断面が直径30mm円の円弧状）である。二つの磁石間の磁場は連続的につながっており、下がることはない。磁石回転速度は可変であるが、周期３秒を目安として撮像している。回転するのは２つの対向型永久磁石のみであり、グラディエントコイル、共振器などは静止している。磁石回転によりdB/dtが生じ、エディカレントや誘導起電力など様々な問題が出るが、種々の改造や補正を施し、MRI画像の撮像に成功している。

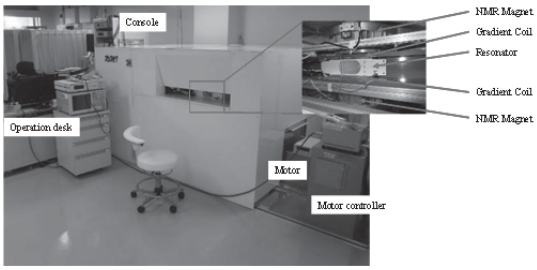


Fig. 1. System overview.

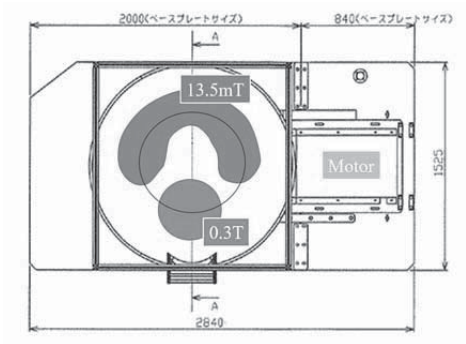


Fig. 2. Top view.
Rotary magnet has two magnets (0.3T and 13.5mT)

MRI　T1強調画像

○こばやしりょうま，うつみひでお

磁場中における物質の磁化は磁場強度に依存し、その緩和は物質のもつ縦緩和時間T1に依存する。通常のMRIにおいては、TRを短縮させることによりRF波励起時の磁化をT1に依存させてT1強調画像を撮像している。

本装置では強磁場領域に撮像対象が入ってからMRIのRF励起までの時間とT1との関係に磁化が依存し、それにより十分に早い回転速度での回転時撮像の画像はT1強調画像となる。よく知られているように磁場強度が増大すると、物質の持つT1は延長するため、主磁場強度が変化する本装置では、通常のT1強調画像とは少し違う画像が得られる可能性がある。

実際にT1の異なる３種類のファントムを用いて撮像し、解析を行った。回転時に撮像したMRI画像は、TR400msで撮像した通常のT1強調画像と同程度のT1強調効果を得ることができた。

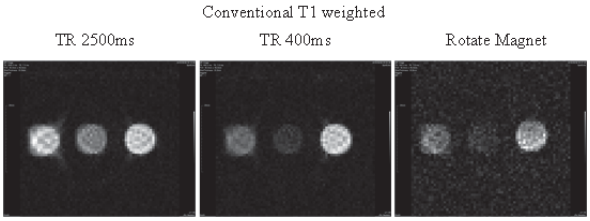


Fig. 3. Phantom images.
We take three images, conventional MRI image, conventional T1 weighted image, new type T1 weighted image with magnet rotation. Phantoms are CuSO4 1mM, milli-Q and CuSO4 5mM.

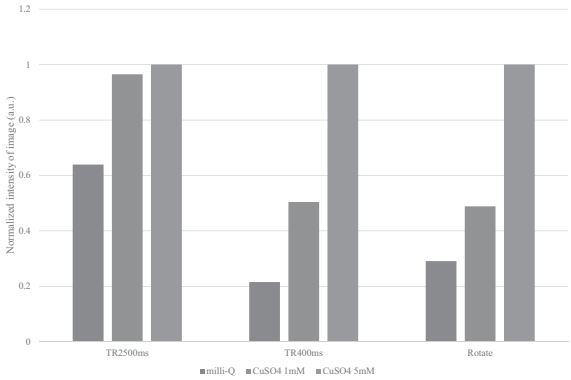


Fig. 4. Normalized intensity of images.
This is normalized intensity from Fig.3

L3-3

情報科学を活用したシグナル帰属法のin-cell NMRへの応用

○葛西卓磨[1,2]，樋口佳恵[1]，猪股晃介[1,3]，木川隆則[1,2,4]
[1]理化学研究所・生命システム研究センター
[2]JST・CREST
[3]JST・さきがけ
[4]東京工業大学・情報理工学院

Signal Assignment Strategy with Information Science for in-cell NMR

○Takuma Kasai[1,2], Kae Higuchi[1], Kohsuke Inomata[1,3], Takanori Kigawa[1,2,4]
[1] *Laboratory for Biomolecular Structure and Dynamics, RIKEN Quantitative Biology Center*
[2] *CREST, JST*
[3] *PRESTO, JST*
[4] *School of Computing, Tokyo Institute of Technology*

For structural or dynamical analyses of proteins in cellular environments, in-cell NMR methodologies have been developed. However, it is suffered from limited measurement time by cell viabilities and relaxation enhancements by molecular crowding and non-specific interactions. Although amino-acid selective isotope labeling provides useful information for main-chain signal assignments, it requires number of labeled samples for complete coverage of all amino acids. To solve this problem, various combinatorial selective labeling methods were proposed to reduce the number of samples. With quantitatively controlled isotope labeling, we developed a unique combinatorial method, named Stable Isotope Encoding (SiCode), which enables amino-acid typing of all 19 non-proline amino-acids at both residues i and i-1 using as few as 3 labeled samples[1]. We further improved decoding procedure of SiCode by model-fitting with prior knowledge of the labeling pattern and the amino-acid sequence, achieved with simultaneous optimization of both distinct and continuous variables using replica exchange Monte Carlo method[2]. These improvements enabled us to apply SiCode to in-cell NMR. This strategy will help in-cell NMR analyses of various proteins.

細胞内のタンパク質を観測するin-cell NMRでは、分子混雑による緩和促進や非特異的相互作用の存在、測定時間が細胞の生存時間によって限定されるなどの影響により、NMR信号の感度が低く、また、可能な測定法が限られてしまう。例えば、三重共鳴法による主鎖連鎖帰属は、一部の測定が緩和促進の影響を強く受けるため困難となり、このことが様々な解析対象タンパク質についてin-cell NMRをおこなう際の障壁のひとつとなっている。

アミノ酸選択的安定同位体標識法は、緩和促進の影響を受けにくい2次元NMR測定を利用し、連鎖帰属とは独立のアミノ酸型判別の情報を与えるため、連鎖帰属の補助として、または単独で、主鎖帰属のために用いることができる。しかし、単純な選択標識では必要な選択標識体の数が膨大になってしまうため、様々な組み合わせ選択標識法が考案されている。発表者らは、さらに必要は選択標識体数を削減するため、アミノ酸の情報を安定同位体標識パターンに符号化し、NMRスペクトルのシグナル強度比から復号する「符号化標識法（Stable Isotope Encoding; SiCode）」を開発した[1]。これにより、わずか3種類の選択標識体について、2次元^{15}N-HSQCと2次元HN(CO)ス

アミノ酸選択的安定同位体標識法、符号化標識法、in-cell NMR

○かさいたくま、ひぐちかえ、いのまたこうすけ、きがわたかのり

ペクトルを測定することで、各シグナルについてi位とi-1位のアミノ酸がプロリンを除く19種類のうちいずれであるかを判別できるようになった[1]。符号化標識法においては、標識パターン、すなわち符号語表の設計時に、情報科学の知見を活かして適切な設計をおこなうことによってノイズ耐性を高めることができる。アミノ酸間の情報学的距離を定義し、これを最大化することで、所与のアミノ酸数・標識体数に対して最適な標識パターンを設計する方法を考案した[1]。標識体数を増やすほど当然ノイズ耐性が上がるが、実験の手間や全体の測定時間が増えるので、問題の性質により最適な標識体数を選ぶべきである。

符号化標識法における復号は、NMRスペクトル上のシグナルの強度から安定同位体標識率を逆算し、標識パターンと照らし合わせることで達成されるが、シグナルが重なった場合やS/N比が低い場合には正しい強度取得が困難となり、結果として復号に失敗することが多くなる。より正しい復号のためには、標識パターンやアミノ酸配列など既知の情報を活用しモデルフィッティングをおこなうことが望ましい。こうしたモデルフィッティングは、組み合わせ最適化を含むこととなるため、パラメーターの探索空間が広いが、レプリカ交換モンテカルロ法を用い、離散変数であるアミノ酸と連続変数である化学シフト・線幅・強度を同時に最適化することで、現実的な計算時間でおこなう手法を開発した[2]。これにより、重複シグナルや弱いシグナルの復号の正確さが向上した。

こうした改善により、符号化標識法をin-cell NMRに応用することが可能となった。ヒトユビキチン変異体に適用した例を示す。in-cell NMRでは通常の溶液NMRよりも感度が低下するため、ノイズ耐性を向上させるため、4標識体からなる標識パターンを用いた。S/N比の低いスペクトルからより正しい情報を得るため、モデルフィッティングによる復号をおこなった（**Fig. 1**）。

このような解析方法は、様々なタンパク質のin-cell NMR解析にとって有用と期待される。

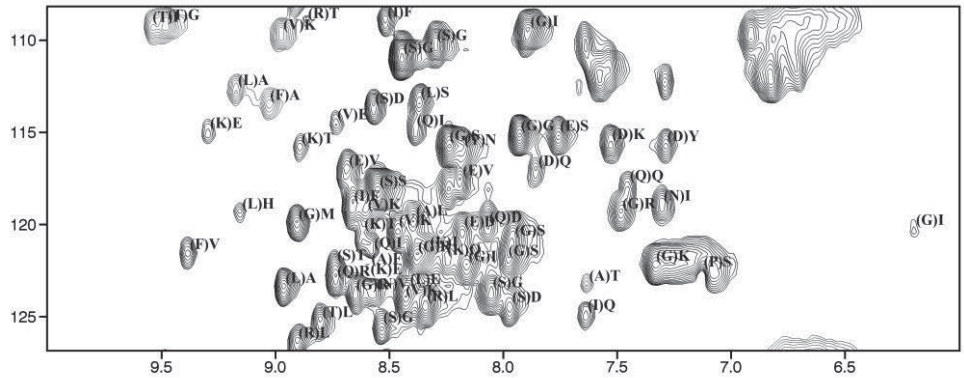


Fig. 1. SiCode analysis of in-cell ubiquitin 3A.
^{1}H-^{15}N SOFAST-HMQC spectrum of human ubiquitin 3A mutant in HeLa cells. Decoding results of SiCode are shown on main-chain signals.

References

(1) Kasai, T., Koshiba, S,, Yokoyama, J., and Kigawa, T. (2015) Stable isotope labeling strategy based on coding theory. *J. Biomol. NMR* 63, 213-221.

(2) Kasai, T., Nagata, K., Okada, M., and Kigawa, T. (2016) NMR spectral analysis using prior knowledge. *J. Phys. Conf. Ser.* 699, 012003.

L3-4

深層学習に支援されたNMRシグナルの自動解析

○小林直宏[1]、服部良一[2]、永田崇[3]、児嶋長次郎[4]、藤原敏道[1]
[1]大阪大学・蛋白質研究所
[2]徳島文理大学・薬学部
[3]京都大学・エネルギー理工学研究所
[4]横浜国立大学・理工学部

Automated analysis of NMR signals assisted by Deep Neural Networks

○Naohiro Kobayashi[1], Yoshikazu Hattori[2], Takashi Nagata[3], Chojiro Kojima[4], Toshimichi Fujiwara[1]
[1]*Institute for Protein Research, Osaka University*
[2]*Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokushima Bunri University*
[3]*Institute of Advanced Energy, Kyoto University*
[4]*College of Engineering Science, Yokohama National University*

NMR signal assignments are basically starting from peak identification on multi-dimensional and hetero- or homo-nuclear NMR spectrum followed by spin-system analysis using the identified peak lists considering coherence transfer pathway in the measured spectra, then completing sequential assignments based on inter-residual peaks to connect the residue specific spin-systems. There are a lot of programs which can automate NMR signal assignments, however, still it is difficult to start from automated peak identification. Here we are going to present our new generation of programs, id_robot and anneal_robot, which can facilitate automated backbone signals assignments assisted by Deep Neural Network (DNN) to achieve highly automatic, fast and accurate analysis.

NMR データのシグナル解析は多次元スペクトルからのピーク検出、スピン系の解析を経て配列特異的な連鎖帰属を達成することで完成する。この解析を自動化するためにはピーク検出を正確に実行することが求められるが、多くのプログラムにおいては十分な性能を実現できていないことが現状である。本研究ではピーク検出に最近技術的発展の著しい深層学習(DNN)を用いてノイズ検出を高精度に行い、高精度で高速な NMR シグナルの自動帰属法の開発を目的とした。
全ての計算にはOSとしてUbuntu14.04 LTS, CPUはCore i5 6700K (4-core), グラフィックカードとしてGTX980(4GB)を使用した。学習データとして残基長117の小さなタンパク質 (Pleckstrin homologue domain) により測定された主鎖シグナル帰属用のスペクトル3D HNCO, 3D HN(CA)CO, 3D HNCACB および3D CBCA(CO)NHのデータを用い、id_robotによる頂点検索、2次関数補完によるピーク検出を行った。目視ではノイズ判定不能と思われるピークのみを除去した後、検出ピークの標準的な半値幅を統計的に計算した後、適切なスペクトル範囲を切り出しMicrosoft CNTK ver 1.6 (Computational Network Tool Kit) [1]の学習用データ形式として出力した。約1200個のピークに対して回転、鏡像反転、符号反転などの処理を行って約26000個のグレースケール画像データとして拡張し、ランダムに並べ替えた後、更にランダムにその20%をテストデータして抽出した。GPUを用いたCNTKによるConvolutional Neural Network (CNN) [2]の学習計算を実行し、完了後テストデータの認識精度が97%であることを確認した。また8個の検出ピークの特徴量を入力とし、6ユニットの中間層を持つ3層のノイズ判定器(FNN)を作成し、誤差逆伝播法により学習させた。

自動帰属、深層学習

○こばやしなおひろ，はっとりよしかず、ながたたかし、こじまちょうじろう、ふじわらとしみち

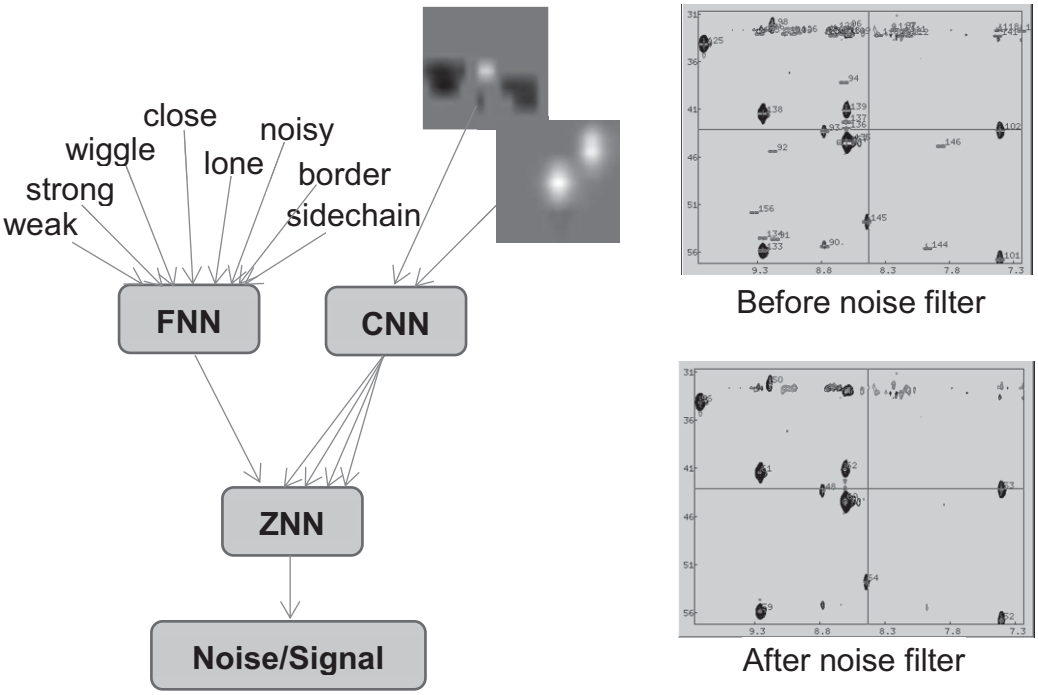


Fig. 1. A schematic representation of noise recognition system assisted by Deep Neural Network. Right panels are showing noises recognized as NMR peaks have been correctly eliminated on 3D CBCA(CO)NH of FKBP12.

入力には同様に1200個のピークデータを学習データとして学習させ、認識精度は80%の割合で98%の正解率であることを確認した。更にCNNとFNNからの入力として10ユニットの入力層を持ち、8ユニットの中間層を持つ3つ目の判別器(ZNN)をFig. 1のように配置した。これら３つのDNNで構成されるピーク判別器を作成し、id_robotに組み込んだところ３つのタンパク質データに対して平均 false_positive 5%, false_negative 2%と高性能なノイズ判別性能を獲得することに成功した。得られたピーク認識情報を元に、HN-^{15}Nピークの位置と個数、および該当するCα(i-1), Cα(i), Cβ(i-1), Cβ(i)のシグナルを判定し、OpenMPIにより高速化されたanneal_robotを用いて焼きなまし法によるHN-^{15}Nポジションのアミノ酸配列上での並べ替え計算を実行した。計算ではid_robotにより出力されるスピンシステムの組み合わをランダムに組み替えていく40ステージによる計算を実行する。111残基のタンパク質であるFKBP12の主鎖連鎖帰属ではピーク検出から開始しておよそ4分程度で全ての計算を完了し、その帰属精度は98%の完全性と97%の精度であった。手作業なしで同様の解析をGüntertらの開発した自動シグナル解析プログラムであるFLYA[3]で実行したところ87%の帰属完全性であり、ノイズの存在により複数の残基が帰属不能であった。

本研究により、スペクトルの性質さえ良ければ数分で純粋にピーク検出から主鎖シグナルの帰属情報が得られることを示すことが出来た。またノイズ判定に画像認識技術が応用できた事は今後のNMR解析技術に新しい展開が期待できると考えられる。

References

(1) Agarwal, A. et al., "An Introduction to Computational Networks and the Computational Network Toolkit", https://cntk.codeplex.com/, (2014)

(2) Fukushima, K. “Neocognitron: A self-organizing neural network model for a mechanism of pattern recognition unaffected by shift in position.” *Biol. Cybern.* 36,193–202 (1980).

(3) Schmidt, E. & Güntert, P. “A new algorithm for reliable and general NMR resonance assignment.” *J. Am. Chem. Soc.* 134, 12817–12829 (2012)

SL1

μ-オピオイド受容体のシグナル選択性制御機構の解明

奥出順也[1]，上田卓見[1,2]，幸福裕[1]，佐藤元彦[1]，延山尚幸[1]，近藤啓太[1]，
白石勇太郎[1]，水村拓也[1]，大西健人[1]，夏目芽依[1]，前田正洋[3]，辻下英樹[3]，
倉永健史[1]，井上将行[1]，○嶋田一夫[1]
[1]東京大学・大学院薬学系研究科
[2]日本学術振興会(JST)・さきがけ(PRESTO)
[3]塩野義製薬・創薬研究所

Identification of a Conformational Equilibrium That Determines the Efficacy and Functional Selectivity of the μ-Opioid Receptor

Junya Okude[1], Takumi Ueda[1,2], Yutaka Kofuku[1], Motohiko Sato[1], Naoyuki Nobuyama[1], Keita Kondo[1], Yutaro Shiraishi[1], Takuya Mizumura[1], Kento Onishi[1], Mei Natsume[1], Masahiro Maeda[3], Hideki Tsujishita[3], Takefumi Kuranaga[1], Masayuki Inoue[1], and ○Ichio Shimada[1]
[1] *Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo*
[2] *Precursory Research for Embryonic Science and Technology, Japan Science and Technology Agency*
[3] *Shionogi Co., Ltd., Discovery Research Laboratories*

G-protein-coupled receptor (GPCR) ligands impart differing degrees of signaling in the G-protein and arrestin pathways, in phenomena called “biased signaling”. However, the mechanism underlying the biased signaling of GPCRs is still unclear, although crystal structures of GPCRs bound to the G protein or arrestin are available. In this study, we observed the NMR signals from methionine residues of the μ-opioid receptor (μOR) in the balanced- and biased-ligand-bound states. We found that the intracellular cavity of μOR exists in an equilibrium between closed and multiple open conformations with coupled conformational changes on the transmembrane helices 3, 5, 6, and 7, and that the population of each open conformation determines the G-protein- and arrestin-mediated signaling levels in each ligand-bound state. These findings provide insight into the biased signaling of GPCRs and will be helpful for development of analgesics that stimulate μOR with reduced tolerance and dependence.

Gタンパク質共役型受容体(GPCR)のリガンドには，Gタンパク質とアレスチンを介したシグナル伝達経路の一方を選択的に活性化するものが知られており，この現象を「バイアスシグナル」と呼ぶ．これまでにGタンパク質またはアレスチンと結合したGPCRの結晶構造が解かれているが，このバイアスシグナルが生じる機構は不明である．我々は，μ-オピオイド受容体(μOR)のメチオニンメチル基に由来するNMRシグナルを，通常のリガンドが結合した状態とバイアスリガンドが結合した状態で解析した．その結果，μORは閉構造に加え，3，5，6，7番目の膜貫通ヘリックスが共役して変化する複数の開構造をとること，複数の開構造の割合がGタンパク質およびアレスチンを介したシグナル伝達の強度を決定していることを明らかにした．この解析結果は，GPCRのバイアスシグナルについて新たな知見を与えるとともに，より副作用の少ない鎮痛薬の開発につながるものである．

Gタンパク質共役型受容体，膜タンパク質，シグナル伝達

おくでじゅんや，うえだたくみ，こうふくゆたか，さとうもとひこ，のぶやまなおゆき，
こんどうけいた，しらいしゆうたろう，みずむらたくや，おおにしけんと，なつめめい，
まえだまさひろ，つじしたひでき，くらながたけふみ，いのうえまさゆき，○しまだいちお

SL2

アスパラギン結合型糖鎖転移反応の理解のための統合的構造生物学アプローチ

○神田大輔
九州大学・生体防御医学研究所

Integrative structural biology approach to decipher the molecular mechanism of Asn-glycosylation

○Daisuke Kohda
Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University

Asparagine-linked glycosylation (N-glycosylation) is the most ubiquitous protein modification. The defining event in N-glycosylation is clearly the formation of the covalent bond between the oligosaccharide and asparagine, which is catalyzed by an integrative membrane enzyme, oligosaccharyltransferase (OST). The archaeal OST is a single subunit enzyme consisting only of the AglB protein, and thus suitable for structural studies. The acceptor asparagine resides in the N-glycosylation sequon (Asn-X-Ser/Thr, X ≠ Pro). The glycan donor is the lipid-linked oligosaccharide (LLO). An oligosaccharide chain is assembled on a lipid-phospho carrier. We pursue an integrative strategy for the understanding the molecular mechanism of the N-oligosaccharyl transfer reaction. The approach include the structural analyses of the AglB structures in complexes with the glycan donor and acceptor. Unfortunately, we have little knowledge of biochemistry about archaeal N-glycosylation. Thus, we perform the chemical structure determination of N-glycans and LLOs from several archaeal species by MS and NMR. Our integrative approach using crystallography and NMR, with the combination of biochemical techniques including disulfide-bond tethering revealed the structure and dynamics of the AglB protein, which is essential to achieve the efficient and accurate N-glycosylation reaction.

タンパク質のアスパラギン残基への糖鎖付加（N型糖鎖付加）は翻訳後修飾の代表である．コンセンサス配列 Asn-X-Thr/Ser中のAsn残基への糖鎖の転移反応はオリゴ糖転移酵素と呼ばれる膜タンパク質酵素が触媒している（Fig. 1）．N型糖鎖修飾は真核生物だけではなく，古細菌にも広く存在する．また，真正細菌の一部にも存在する．オリゴ糖転移酵素の触媒サブユニットはSTT3/AglB/PglB（真核/古細菌/真正細菌）と呼ばれる膜タンパク質である．古細菌のオリゴ糖転移酵素は触媒サブユニットAglBのみからなるシングルポリペプチド酵素であり，大腸菌の膜フラクションに活性のある形で発現することができ，構造生物学研究に適している．

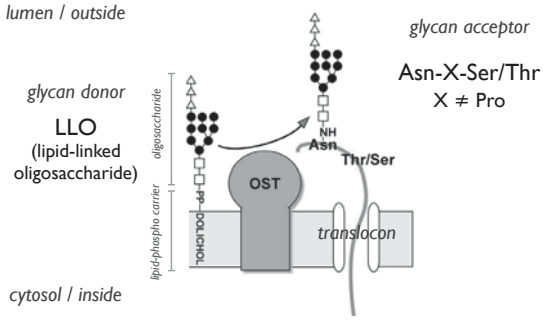


Fig. 1. Oligosaccharyltransferase catalyzes the transfer of oligosaccharide chain from LLO to the N-glycosylation sequon.

界面活性剤存在下で精製した超好熱性古細菌*Archaeoglobus fulgidus*のAglBタンパク質全長の結晶構造決定を行った[1]．同時に基質であるペプチ

N型糖鎖合成，オリゴ糖転移酵素，膜タンパク質結晶，オリゴ糖鎖化学構造決定

○こうだだいすけ

ドとの複合体構造を得ることを目指したが，ペプチドとの単純な混合では共結晶を得ることができなかった．そこで，AglBタンパク質にシステイン残基を導入し，ペプチド側にも導入したシステイン残基との間に分子間ジスルフィド結合を作らせた複合体を作製した．分子間ジスルフィド結合によって酵素上に固定されたペプチド中のアスパラギン残基に糖鎖付加が効率よく起こることを確認した．なお，システイン残基の導入位置は，ペプチドとの共結晶が既に得られている真正細菌のPglB酵素の立体構造を参照して行った．結晶構造解析の分解能は低下(2.5 Å → 3.5 Å)したが，ペプチド基質が伸びたコンホメーションで結合していることがわかった（Fig. 2）．糖鎖付加コンセンサス配列Asn-Val-Thrのうち, Asn残基の側鎖は２つの酸性アミノ酸残基および２価金属イオンと共に，carboxylate dyad structureと命名した特殊な構造を形成していること，Thr残基の側鎖はSer/Thr結合ポケットと命名した構造に結合していることが可視化できた．

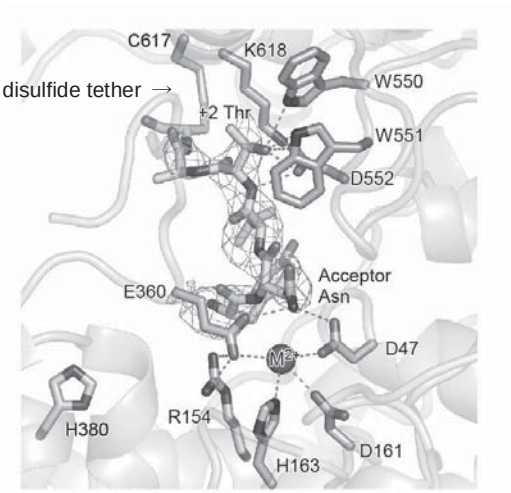


Fig. 2. Crystal structure of the cross-linked AglB-peptide complex

糖鎖供与基質である脂質結合型糖鎖(Lipid-Linked Oligosaccharide, LLO)との複合体構造決定を行うには，古細菌のLLOの化学構造を決定する必要がある．真核生物や真正細菌のLLOに比べ，古細菌のLLOの化学構造は多様であり，古細菌の種ごとに構造決定を行う必要がある．超好熱性古細菌の３種について，酵素反応により糖ペプチドを調製して，糖鎖分析（単糖組成分析と単糖のDL絶対配置決定）とMS分析，およびNMRによるlinkage解析とアノマー解析を行い，N型糖鎖の化学構造を決定した[2,3]．また，培養菌体からLLOを有機溶媒抽出したのち, 陰イオン交換と順相HPLCにより分離し，ESI-MSMS分析を行うことで，LLOの脂質リン酸基部分の化学構造決定を行った[4]．その結果，脂質結合型糖鎖のリン酸基の数はユーリ門(Eyryarchaeota)の古細菌では１，クレン門(Crenarchaeota)の古細菌ではリン酸基の数は２であることを提唱した（Fig. 3）．これはTACKスーパー門（クレン門を含む）に属する古細菌の方が，ユーリ門の古細菌より真核生物に進化的に近いという考えによく一致する．今回明らかにしたLLOの化学構造をもとに水溶性のLLOアナログの化学合成を進めている．水溶性のLLOアナログを用いて酵素との共結晶を得て，オリゴ糖転移酵素の糖鎖認識についての情報を得ることを目指している．

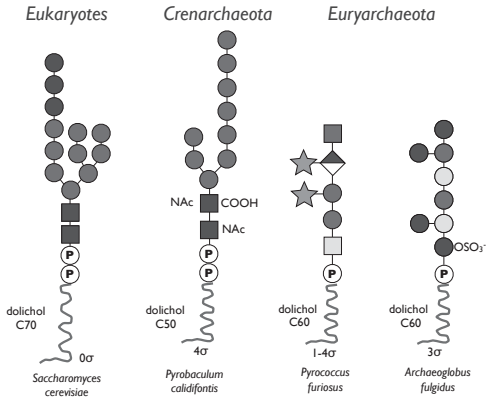


Fig. 3. Comparison of chemical structures of archaeal LLOs with that of eukaryotic LLO.

References

(1) Matsumoto, S. et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 110: 17868 – 17873 (2013)

(2) Fujinami, D. et al., *Carbohydr Res*, 387: 30-36 (2014)

(3) Fujinami, D. et al., *Carbohydr Res*, 413: 55-62 (2015)

(4) Taguchi, Y. et al., *J Biol Chem*, 291: 11042-11054 (2016)

SL3

四ヘムシトクロムにおける常磁性電子系の動的協同性とその生物学的意義

○阿久津秀雄
横浜市立大学生命医学研究科

Dynamic and cooperative behaviors of paramagnetic electron systems in tetra-heme cytochromes and their biological significance

○Hideo Akutsu
Graduate School of Medical Life Science, Yokohama City University

Cytochrome c_3 (cyt c_3) isolated from sulfate-reducing bacteria carries four *c*-type hemes making a cyclic configuration in single polypeptide. One of characteristic properties of cyt c_3 is its extremely low reduction potentials, ranging from –90 mV to –380 mV. We have investigated the thermodynamic nature of the paramagnetic electrons of the four heme architecture of *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F (*Dv*MF) cyt c_3. Contributions of residues to lowering the reduction potentials were also examined by site-directed mutagenesis. Their X-ray crystal structures were also determined. Comparison with the thermodynamic property of a linear tetra-heme protein strongly suggests a cooperative interaction among the four hemes also its contribute to lowering the reduction potentials of the protein.

稲垣冬彦先生の早すぎるご逝去に心から哀悼の意を表したい。本講演では故稲垣先生とは少し異なる視点からではあるが、タンパク質における常磁性金属イオン系の魅力的な世界について考えてみたい。鉄が中心金属であるヘムを持つシトクロムタンパク質は数多く知られている。中でも、呼吸器系の電子伝達に関わるシトクロム *c*（cyt *c*）は有名である。 *c* 型ヘムはタンパク質のポリペプチド鎖に共有結合しているヘムの名称であり、Cys-$(X_i)_n$-Cys-His の二つのシステインにチオエーテル結合している。第５配位子は例外なく Cys のとなりのヒスチジンイミダゾール基である。X_i はどんなアミノ酸でもよく、ほとんどの場合は n=２であるが、３や４の場合もある。電子伝達に関与するタンパク質では第６配位子が存在して低スピン状態をとるが、配位子はさまざまである。この場合、ヘム鉄は酸化状態では常磁性、還元状態では反磁性となる。

c 型の多ヘムタンパク質にはヘム密度の高いものが多い。例えば硫酸還元菌宮崎株（*Desulfovibrio vulgaris*, Miyazaki F, 以下 *Dv*MF）の電子伝達系を構成する cyt c_3 は 107 残基のアミノ酸に対して４つのヘムが結合しており、*Shewanella oneidensis* (*So*) の小型 cyt *c*（STC）では 91 残基のアミノ酸に対して４つのヘムが結合している。酸素を運ぶヘモグロビンでは 578 残基のアミノ酸に対して４つのヘムがあることを見ればヘム密度の高さが実感できる。このように高いヘム密度は強いヘム間相互作用を生じ、特異な物性を示す原因となる。ヘム間相互作用はヘムの配置の仕方によっても変わってくる。これをヘム構築と呼ぶ。cyt c_3 ではヘムは矩形の４頂点の位置にあるが、STC ではヘムは鎖状に並んでいる。さらに cyt c_3 ではミトコンドリアの cyt *c* に比較して約 560 mV も酸化還元電位が低い。このため、これらのシトクロムは嫌気状態で生命を支えることができる。本講演では下記の点を中心に述べる予定である。

四ヘムシトクロム*c*, 分子および個別ヘムの酸化還元電位

○あくつひでお

１）*c*型シトクロム発現は非常に困難である。そこで、*c*型シトクロム特に多ヘム*c*型シトクロムタンパク質の大量発現系を*S. oneidensis*を宿主、大腸菌プラスミドをベクターとして開発した。これにより、大量のタンパク質の取得と多様なアミノ酸置換が可能となった。
２）常磁性シフトを用いた四ヘムcyt *c*における分子内および分子間ヘム電子移動のダイナミックスと電子分布を解析し、分子および各ヘムの酸化還元電位を明らかにした。。
３）さらにこの酸化還元電位を用いてcyt c_3電子授受制御における個々のヘムの生物学的役割を以下のような系で研究した。
・分子の酸化状態に依存したヘム酸化還元電位の変化
・cyt c_3と [NiFe]ヒドロゲナーゼの電子授受機構
・COのヘム選択的結合により毒素が栄養素に変わる？
４）電子授受制御におけるヘム構築の役割
・鎖状ヘムSTCでの電子授受
・cyt c_3による脂質膜を通しての電子授受
５）ヘムの酸化還元電位を制御する因子
・四つのヘムの第５，第６配位子を一つずつ Met に変えてその性質を調べた。変異体の配位子を確認するために結晶化も行った。しかし、結晶が得られたのはヘム３の変異体 H25M cyt c_3 のみであった。その結晶構造では導入した Met が確かに第６配位子となっていた。^{1}H NMR スペクトルから､残りの３つの変異体も還元型では全て Met が配位子していることが確認された。しかし、酸化型においてはヘム２と３の変異体でのみ Met の配位が認められた。そこで、酸化型でも還元型でも Met が安定的に配位しているヘムについて、Met 置換の微視的酸化還元電位への影響を調べたところ、ヘム２でもヘム３でも野生型と比べて約 220 mV の上昇が観測された。
・次に非軸配位芳香族アミノ酸をアラニンやロイシンに置き換えて酸化還元電位への影響を調べると、進化的に保存されている Phe20, Tyr43, Tyr66 では約 40 mV の上昇が見られた。これは芳香環同士のπ–π相互作用が個別のヘムの酸化還元電位低下に寄与していることを示す。ヘム３の第６配位子 His25 のイミダゾールに水素結合しているスレオニン（Thr）24 をバリンに置き換えるとヘム３の酸化還元電位が約 50 mV 上昇した。
・硫酸還元菌の cyt c_3 の酸化還元電位がミトコンドリアの cyt *c* に比較して非常に低くなっている要因をまとめると以下のようになる。第６配位子が His であることによって約 220 mV、ヘム露出度の大きさによって約 180 mV、密度の高いヘム構築によって約 100 mV の約 500 mV の全体的な低下がもたらされている。これに加えて、個々のヘムにはπ–π相互作用や配位子との水素結合により 40-50 mV の局所的な（すなわち、ヘム毎の）低下が働いている。ヘム構築は長距離的な相互作用を含むと考えられる。

References

(1) Akutsu, H. and Takayama, Y. (2007) Functional roles of heme architecture and its environment in tetraheme cytochrome *c*. *Accounts Chem. Res*. *40*, 171-178.
(2) 阿久津秀雄（2008）固体物理＜生物物質科学―金属を含む分子系を中心に＞特集号，多ヘムタンパク質における電子授受制御. 43 巻 29−40.
(3) Takayama, Y., Taketa-Sato, M., Komori, H., Morita, K., Kang, S.-J., Higuchi, Y. and Akutsu, H. (2011) Role of π-electron systems in stabilization of the oxidized tetraheme architecture in cytochrome c_3. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, *84*, 1096-1101.

SL4

NMR Approaches to Dissect Oncogenic RAS Signaling in Biological Membranes

Zhenhao Feng, Teklab Gebregiworgis, Ki-Young Lee, Le Zheng, Mohammad Mazhab-Jafari, Mathew J. Smith, Christopher B. Marshall, **Mitsu Ikura**

Princess Margaret Cancer Centre and Department of Medical Biophysics, University of Toronto, Toronto, Ontario, Canada, M5G 1L7

RAS proteins are frequently mutated in cancer (~30% of all human tumours). Among three major isoforms of RAS, K-RAS is a well-established 'driver' in pancreatic, colorectal and lung cancers where the protein is mutated at three hotspots: G12, G13, and Q61. Despite of enormous efforts in the RAS research over three decades, there is no clinically approved RAS inhibitor and the RAS protein remains to be a challenging target for cancer therapy development. I believe that this is largely owing to the lack of understanding of how mutant RAS functions and alters related signaling pathways in the RAS-driven tumours. Fully-processed RAS is prenylated and methylated at the carboxy-terminus, which enables RAS to anchor to the plasma membrane where it functions. There is a large gap in understanding how the lipidated RAS protein functions at the surface of the plasma membrane. To overcome those outstanding issues in the RAS field, we sought to develop better conformational and functional assays for RAS both in isolation and on lipid bilayers. We are particularly interested in elucidating how oncogenic mutations alter the RAS structure and function especially when RAS is at the membrane. We combine isotope-aided, time-resolved, multi-dimensional NMR spectroscopy with the nanodisc technology (developed by Sligar and coworkers) to study membrane-anchored RAS. Strong emphasis will be given on the use of paramagnetic relaxation enhancement (PRE) probes in the RAS study, which helped us greatly to characterize the RAS-membrane interaction. I will discuss how the biological membrane affects the structure and function of K-RAS in both wild-type and mutants. These structural and functional characterizations of KRAS by NMR may help to develop therapeutic strategies with novel anti-cancer agents targeted to K-RAS driven cancers (Supported by CCSRI, CRS, CFI; Special thanks to the Princess Margaret Cancer Foundation). In memory of Professor Fuyuhiko Inagaki, Hokkaido University.

Oncogene, small GTPase, paramagnetic relaxation, membrane interaction

SL5

常磁性ランタノイド金属とBiomolecular NMR

○八木宏昌[1]
[1]理化学研究所・生命システム研究センター

Paramagnetic lanthanides for biomolecular NMR

○Hiromasa Yagi[1]
[1] *RIKEN Quantitative Biology Center*

Paramagnetic lanthanides (Ln^{3+}) offer great opportunities for protein analyses by NMR spectroscopy. Pseudocontact shifts (PCS) induced by paramagnetic Ln^{3+} contain unique distance and angular information, providing powerful restraints for the three-dimensional (3D) structure of proteins, protein-protein and protein-ligand complexes. As most proteins have no natural Ln^{3+}-binding sites except for some metalloproteins whose metal-binding sites can be substituted with Ln^{3+} ions, engineering introduction of Ln^{3+} ions into proteins is required. We have developed several small synthetic or DOTA-based Ln^{3+}-tags for site-specific labeling of proteins with Ln^{3+} ions. By using these tags, we established the new method for 3D structure determination of proteins in which the PCS of backbone amides are the only structural restraints. This method is particularly useful for solution structure determinations of proteins of limited solubility for which other NMR parameters are difficult to measure.

今からおよそ8年前、私はオーストラリア国立大学のGottfried Otting教授の研究室で、ランタノイド金属（Ln^{3+}）による常磁性効果をタンパク質NMRに応用する研究を始めた。時期を同じくして、北海道大学の稲垣先生のグループでも斉尾博士、小橋川博士、小椋博士を中心にランタノイド金属を使った研究が精力的に行われていた。ガドリニウム（Gd^{3+}）を除く全ての常磁性Ln^{3+}は磁化率テンソル（χテンソル）に異方性があるため（Δχテンソル）、常磁性緩和による信号強度の減少に加え、化学シフト値にも影響を与える。いわゆるPseudocontact shifts (PCS)と呼ばれる現象である。PCSには常磁性中心と各原子核間の距離情報および角度情報が含まれているため、原子核同士の相対配置を決定することができる。これはタンパク質の立体構造決定や相互作用解析に非常に有用である。しかし、ほとんどの生体分子は天然にはLn^{3+}結合部位を持たないので、何らかの方法で外部からLn^{3+}を導入する必要がある。その際、効果的なPCSを得るにはLn^{3+}をなるべく固く、しかも安定にタンパク質に固定する必要がある。我々はタンパク質に部位特異的なLn^{3+}標識を施すため、Ln^{3+}に対して高い親和性を持つ様々なタイプのLn^{3+}タグを合成した。それらのタグをタンパク質の複数箇所に導入することで主鎖アミド基のPCSをタンパク質全体から観測し、PCSのみを拘束条件としたタンパク質の立体構造決定法の開発を行った。この方法は、低濃度の試料や低感度でしか測定出来ない条件下でのタンパク質の立体構造決定に特に有効であると考える。

PCSの応用は年々広がりをみせており、構造決定の拘束条件としての利用はもとより、天然変性タンパク質の信号分散に応用したり、生きた細胞内での計測にも使われたりしてきている。前述の通り、PCSの利用は外部からLn^{3+}を導入することが必須である。裏を返せば、どこにでもLn^{3+}標識を行える可能性があるということを暗示している。自分の望む場所に自由に標識できる技術が開発できたなら、PCSの応用範囲はさらに広がるものと期待される。

ランタノイド金属，Pseudocontact shifts (PCS)

○やぎひろまさ

SL6

受容体チロシンキナーゼ FGFR1 のがん変異体の動的構造状態と阻害剤耐性機構の解析

○小橋川　敬博[1], 稲垣　冬彦[2]
[1]熊大・院・生命科学、[2]北大・院・先端生命

NMR analysis of dynamic feature and drug resistant mechanism of cancer mutant of tyrosine kinase

○Yoshihiro Kobashigawa[1], and Fuyuhiko Inagaki[2]
[1]Kumamoto University, Kumamoto, Japan. [2]Hokkaido University, Sapporo, Japan.

Tyrosine kinases are key enzyme for cellular signal transduction pathways. Their aberrant activation is related to various human cancers, thereby assumed to be attractive therapeutic targets. Various tyrosine kinase inhibitors (TKIs) are under clinical use, while acquisition of resistance to these drugs is a major problem. To clarify the mechanism of drug-resistance, we studied dynamic feature of drug-resistant mutants of fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1) and their interaction with ATP-competitive inhibitors by NMR, differential scanning fluorometry (DSF) and fluorescence spectroscopy.

チロシンキナーゼはタンパク質のチロシン残基のリン酸化を触媒する酵素であり、ヒトには 97 種類が存在する。細胞内シグナル伝達のトリガーとなるタンパク質であり、その活性は厳密に制御されている。発現の亢進、無秩序な活性化は様々ながんで見られ、抗がん剤開発の重要な創薬標的分子となっている。これまでに数多くのチロシンキナーゼ阻害薬が開発され、抗がん剤として使用されている。しかし、薬剤耐性変異体の出現が臨床上の課題となっている。本研究では阻害剤耐性機構の解明を目的として、受容体型チロシンキナーゼの 1 種である FGFR1 について阻害剤との相互作用およびがん変異体の動的構造状態について NMR、蛍光スペクトル、Differential Scanning Fluorometry (DSF)を用いて解析を行った。

最初に、がん変異体の動的構造状態について NMR を用いて解析した。チロシンキナーゼの活性は、キナーゼドメイン内の活性化ループのリン酸化により制御される。

tyrosine kinase, inhibitor, drug resistant mutant

○こばしがわ　よしひろ，いながき　ふゆひこ

チロシンキナーゼは活性型構造と不活性型構造の平衡状態にあるが、活性化ループのリン酸化により平衡が活性型構造に偏る(Fig. 1)。がん変異はこの構造平衡をリン酸化に非依存的に活性化型に偏らせるとされているが、その詳細は明らかではない。FGFR1 のキナーゼドメインはリン酸化により、大きく 3 箇所の領域が構造変化を起こす。一つ目は Helix-C、二つ目は活性化ループ、三つ目は P-loop の領域である (Fig. 1)。それらの領域の構造変化をモニターするためにメチオニンのメチル基を ^{13}C で標識した FGFR1 を調製し、^{1}H-^{13}C HMQC スペクトルを比較した。3 種類のがん変異体 (N546K、V561M、K656N)について解析を行った。N546K は N-lobe と C-lobe の間のヒンジ領域に存在し、不活性化型構造を安定化する Molecular Brake に関わる残基の変異体である。V561M は ATP 結合ポケットの最深部にあるゲートキーパー残基と呼ばれる部位の変異体である。K656N は活性化ループ周辺の変異体である。最初に、野生型 FGFR1 のリン酸化体と非リン酸化体の NMR スペクトルについて比較した。その結果、C-helix 周辺、P-loop 周辺、活性化ループ周辺の NMR シグナルが変化していた。次に一連のがん変異体について測定を行ったところ、リン酸化とは異なりシグナル変化は局所的であった。N546K は C-helix 周辺、V561M は P-loop 周辺、K656N は活性化ループ周辺のシグナルが変化していた。以上より、がん変異体は一様に構造平衡を活性化型に偏らせるのではなく、局所的に活性型構造を誘起することが示唆された。これらの変異体のうち、N546K と V561M は薬剤耐性変異体でもある。薬剤耐性機構についても検討を行っているので、本会ではその詳細についても紹介する予定である。

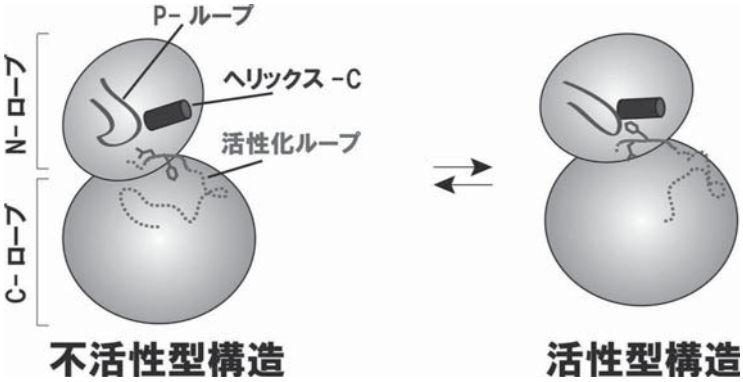


Fig. 1. Schematic representation of dynamic structural equilibrium between inactive and active kinase.

References

(1) Yoza, Kobashigawa *et al.*, . (2016) *Genes Cells.* doi: 10.1111/gtc.12405.

(2) Kobashigawa *et al.*, . (2016) *Genes Cells.* **21**: 350-357.

(3) Kobashigawa *et al.*, . (2015) *Genes Cells.* **20**: 860-870.

SL7

NMRとX線結晶解析の協業から迫るオートファジーの分子機構

○野田展生[1]，稲垣冬彦[1,2]
[1]微生物化学研究会・微生物化学研究所
[2]北海道大学・大学院先端生命科学研究院

Molecular mechanisms of autophagy revealed by collaboration of NMR and X-ray crystallography

○Nobuo N. Noda[1], Fuyuhiko Inagaki[1,2]
[1] *Institute of Microbial Chemistry (BIKAKEN), Microbial Chemistry Research Foundation*
[2] *Graduate School of Advanced Life Science, Hokkaido University*

Autophagy is an intracellular degradation system that delivers cytoplasmic materials to lysosomes for degradation via formation of autophagosomes. Atg8 and Atg12 are ubiquitin-like proteins that are conjugated to a lipid, phosphatidylethanolamine, and Atg5, respectively, through reactions similar to ubiquitination, and the conjugation products play essential roles in autophagy. In this study, we studied the structural basis of the Atg8 and Atg12 conjugation reactions using NMR and X-ray crystallography and revealed unique reaction mechanisms involved in these reactions. We also studied the mechanism of cargo recognition during selective autophagy, and identified Atg8-family interacting motif (AIM) that links specific cargoes to autophagosomes for their selective incorporation into autophagosomes. Furthermore, we revealed the structural features and receptor-mediated recognition of protein aggregates that are selectively incorporated into autophagosomes.

オートファジーは真核生物に保存された細胞内分解系で、オートファゴソームと呼ばれる二重膜オルガネラの新生を通して分解対象（積荷）を隔離し、リソソームへと輸送することで分解を行う。オートファゴソームの新生およびその内部への選択的な積荷の取込みには多くのAtgタンパク質が関与しており、そのうち8種類の因子がユビキチン様の結合系を形成している。ユビキチン様タンパク質Atg8およびAtg12は、共通のE1酵素Atg7により活性化されたのち、それぞれのE2であるAtg3およびAtg10へと渡され、最終的にAtg8はホスファチジルエタノールアミン（PE）と、Atg12はAtg5と結合し、結合体としてオートファジーに必須の役割を担う。我々はこれら結合反応に関わる8種類すべてのAtg因子の構造を決定し、反応機構の解明を進めてきた[1].

X線結晶解析の結果，E1酵素Atg7は既知のE1とは顕著に異なるホモ二量体構造を有すること，固有のN末端ドメインで二種類のE2酵素Atg3およびAtg10の両方を認識することが明らかとなった(Fig.1)[2,3]．同様に結晶構造からAtg8はアデニル化ドメインに結合するこ

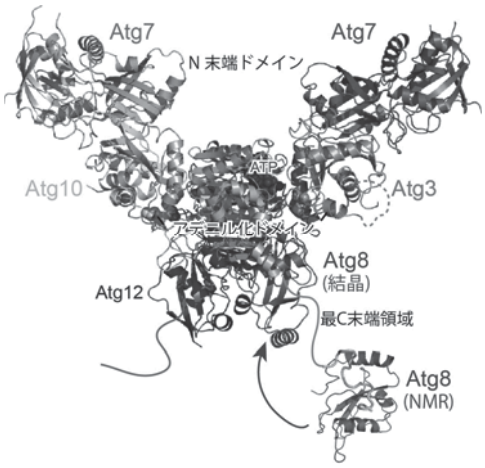


Fig. 1. Structure of Atg7 complexes.
Five structures (PDB 4GSL, 4GSK, 1WZ3, 3VH4, 2LI5) were used for model generation.

オートファジー，ユビキチン様結合反応

○のだのぶお，いながきふゆひこ

とが明らかとなったが，その構造ではAtg7の再C末端領域がAtg8結合に必須であるという生化学データを説明できなかった．そこでNMRによる構造解析を行った結果，再C末端領域とAtg8との複合体構造を決定することに成功し(Fig.1)，その構造は生化学データと良く一致した．以上の結果からAtg7はまずフレキシブルな再C末端領域でAtg8を捉えたのち（NMR構造），Atg8をアデニル化ドメインへと受け渡し（結晶構造），Atg8の活性化反応を行うという二段階反応機構が考えられた．

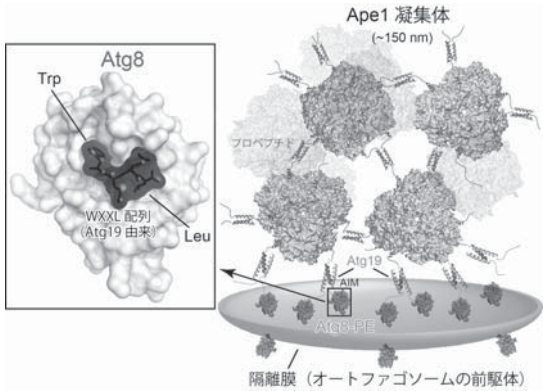


Fig. 2. Structural basis of selective autophagy.

Four structures (PDB 2ZPN, 5JGE, 5JH9,

Atg8-PE結合体はオートファジー関連膜にアンカーされ，積荷の認識に関与する．我々はNMR解析と結晶構造解析の併用により，Atg8ファミリーは選択的オートファジー受容体Atg19やp62に含まれるTrp-X-X-Leu様の配列を特異的に認識することを見出し(Fig. 2)[4]，この種の配列をAtg8ファミリー結合モチーフ（AIM）と名付けた．そののちオートファジーの選択的積荷およびそれぞれに固有の受容体が多数同定され，ほぼすべての受容体がAIMを有することが明らかとなった．続いて我々はアミノペプチダーゼI（Ape1）の凝集体の選択的オートファジーに着目し，凝集体の構造的特徴を解析した．Ape1は45残基からなるプロペプチドおよび酵素本体からなり，プロペプチドを介して凝集および受容体Atg19と結合することでオートファゴソームに特異的に取り込まれることがわかっていた．プロペプチドに関するNMR解析の結果，N末端側20残基が自己会合およびAtg19との結合に関わることが明らかとなり，その情報を活用することでプロペプチドの自己会合構造およびAtg19との結合構造を結晶解析により決定することに成功した．機能解析データと合わせることで，Atg19はApe1の自己会合と競合してApe1に結合すること，その結果Ape1の凝集体が適切なサイズに制御されるとともにその表面をAtg19が覆うように結合すること，表面を覆ったAtg19に膜上のAtg8-PEが結合することで，Ape1凝集体の表面に沿って，高い特異性を持ってオートファゴソームが形成されるというモデルを提示した(Fig. 2)[5].

References (*corresponding author)

(1) *Noda, N. N. and *Inagaki, F. (2015) Mechanisms of autophagy. *Annu. Rev. Biophys.* 44, 101-122.

(2) *Noda, N. N., Satoo, K., Fujioka, Y., Kumeta, H., Ogura, K., Nakatogawa, H., Ohsumi, Y., and *Inagaki, F. (2011) Structural basis of Atg8 activation by a homodimeric E1, Atg7. *Mol. Cell* 44, 462-75.

(3) Yamaguchi, M., Matoba, K., Sawada, R., Fujioka, Y., Nakatogawa, H., Yamamoto, H., Kobashigawa, Y., Hoshida, H., Akada, R., Ohsumi, Y., *Noda, N. N., and *Inagaki, F. (2012) Non-canonical recognition and Ubl-loading of distinct E2s by autophagy-essential Atg7. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 19, 1250-6.

(4) Noda, N. N., Kumeta, H., Nakatogawa, H., Satoo, K., Adachi, W., Ishii, J., Fujioka, Y., *Ohsumi, Y. and *Inagaki, F. (2008) Structural basis of target recognition by Atg8/LC3 during selective autophagy. *Genes Cells* 13, 1211-8.

(5) Yamasaki, A., Watanabe, Y., Adachi, W., Suzuki, K., Matoba, K., Kirisako, H., Kumeta, H., Nakatogawa, H., Ohsumi, Y., Inagaki, F., and *Noda, N. N. (2016) Structural basis for receptor-mediated selective autophagy of aminopeptidase I aggregates. *Cell Rep.* 16, 19-27.

ポスター発表要旨

Poster Abstracts

P1

化学修飾によるタンパク質の新たな安定同位体標識法の開発

○服部良一[1,2]，David Heidenreich[1]，横山敬一[3]，鈴木榮一郎[3,4]，田中好幸[2]，藤原敏道[1]，児嶋長次郎[1,5]
[1]大阪大学・蛋白質研究所
[2]徳島文理大学・薬学部
[3]味の素株式会社・イノベーション研究所
[4]バイオ産業情報化コンソーシアム・JBIC研究所
[5]横浜国立大学・大学院工学府

Newly developed stable isotope labeling methods of proteins via chemical modification

○Yoshikazu Hattori[1,2], David Heidenreich[1], Kei-ichi Yokoyama[3], Ei-ichiro Suzuki[3,4], Yoshiyuki Tanaka[2], Toshimichi Fujiwara[1], and Chojiro Kojima[1,5]
[1] *Institute for Protein Research, Osaka University*
[2] *Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokushima Bunri University*
[3] *Institute of Innovation, Ajinomoto Co., Inc*
[4] *JBIC Research Institute, Japan Biological Informatics Consortium*
[5] *Graduate School of Engineering, Yokohama National University*

Protein chemical modification-aided stable isotope labeling is one of the better strategies for NMR studies of biologically important but difficult samples to be expressed including isotopes. Here, we present a protein modification method of glutamine with a trifluoroethyl group using enzymatic reaction mediated by transglutaminase (TGase). ^{19}F-NMR is useful for interaction studies due to its susceptibility to local change of chemical environment, hence we could detect the interactions between ^{19}F-labeling proteins and a ligand or proteins, appeared as specific peak broadening. Furthermore, we are developing the modification methods for isotope labeling of other residues, and will present in the meeting.

タンパク質の安定同位体標識は異種核多次元 NMR 測定のために必須であるが，サンプルによっては大きなボトルネックとなる．化学修飾による安定同位体標識では，精製後のタンパク質に標識化合物を導入することができる．本発表では，既存の標識法を発展させ，NMR 解析に有用なサンプル調製を可能にする技術開発について報告する．

トランスグルタミナーゼ（TGase）はグルタミン側鎖とリジン側鎖の架橋反応を触媒する酵素である．わたしたちはこの酵素反応を利用し，基質化合物として 2,2,2-トリフルオロメチルアミン塩酸塩を用いることによって，グルタミン残基の ^{19}F 標識法を開発した（Fig. 1）．

Fig. 1. Transglutaminase (TGase)-catalyzed ^{19}F-labeling by trifluoroethylation of glutamine.

安定同位体標識，19F-NMR，化学修飾

○はっとりよしかず，だーびっとはいでんらいひ，よこやまけいいち，すずきえいいちろう，たなかよしゆき，ふじわらとしみち，こじまちょうじろう

標的タンパク質として，FKBP12 に TGase を用いた ^{19}F 標識を行ったところ、内在する 5 つのグルタミン残基のうち 2 残基が基質として反応し，^{19}F シグナルが観測された（Fig. 3a）．この 2 残基は溶媒露出度が高くかつ二次構造をとっていない残基であり，TGase の基質特異性が示された．さらに，FK506 添加によるスペクトル変化を調べた結果，結合ポケット近傍に存在する残基に由来するピークの化学シフト変化およびブロードニングがみられた（Figs. 3b, 3c）．

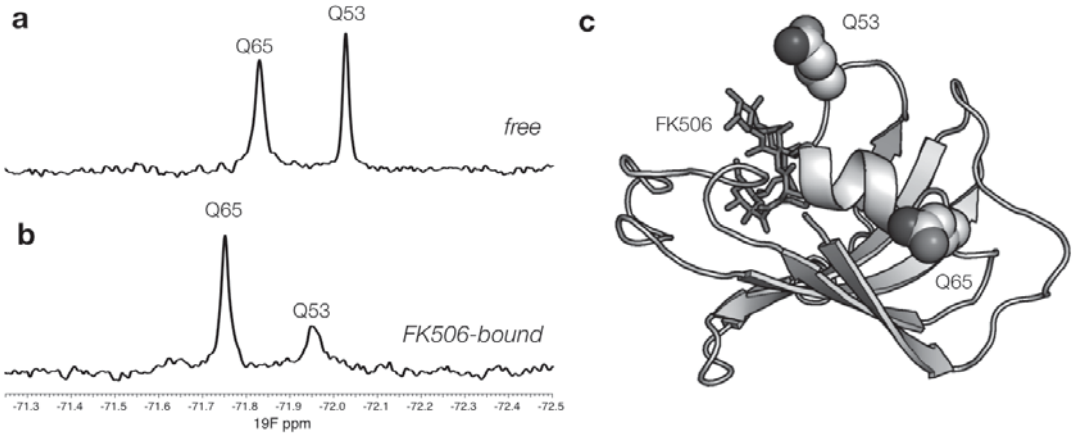


Fig. 2. ^{19}F-NMR spectra of (a) FKBP12 labeled by TGase and (b) that with FK506. (c) Complex crystal structure of FKBP12 with FK506 (PDB: 1FKF).

次にイネの開花に関わる 14-3-3 タンパク質（GF14b）に ^{19}F 標識反応を行ったところ，こちらも 5 残基中 2 残基の ^{19}F シグナルが観測された（Fig. 3a）。これに，GF14b と結合して開花促進複合体を形成するタンパク質 Hd3a および OsFD1 を加えた結果，FKBP12 の場合と同様，結合部位付近に存在する残基のピークの化学シフト変化およびブロードニングがみられた（Figs. 3b-3d）．相互作用にともなう ^{19}F シグナルのブロードニングは過去においても多数報告されており，化学シフト範囲が広く化学交換の影響を受けやすい ^{19}F-NMR に特徴的な現象であると考えられる．

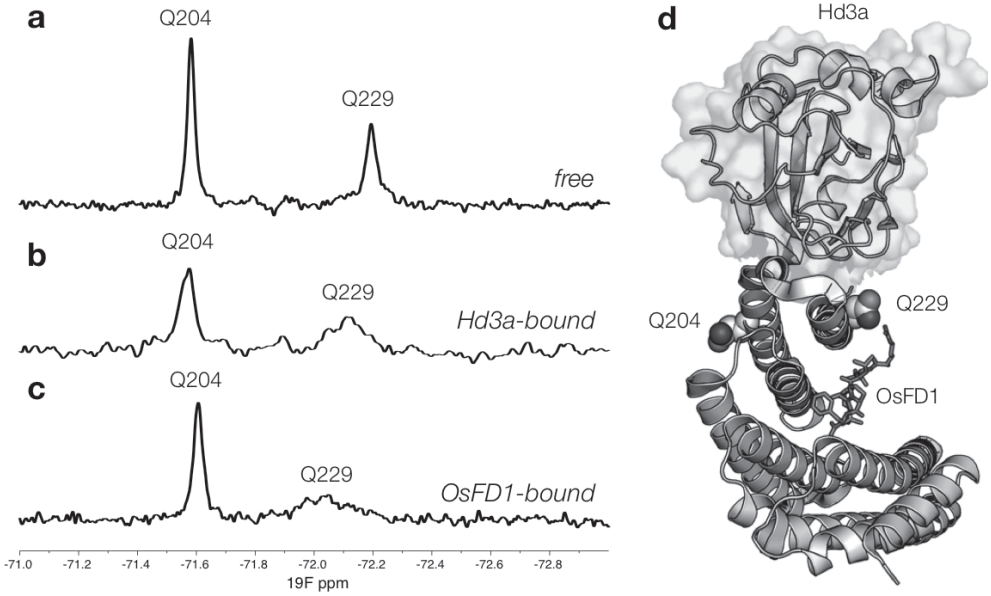


Fig. 3. ^{19}F-NMR spectra of (a) GF14b labeled by TGase, (b) that with Hd3a, and (c) with OsFD1. (d) Complex crystal structure with Hd3a and OsFD1 (PDB: 3AXY).

これ以外にも討論会では，現在実験検討中の標識法について発表する予定である．

P2

二重試料管を用いた定量NMR法の開発と応用

○大木慈子[1]，島田治男[1]
[1]資生堂グローバルイノベーションセンター

Development and application of quantitative NMR method using coaxial NMR tube

○Chikako Ooki[1], Haruo Shimada[1]
[1] *Shiseido Global Innovation Center*

A quantitative NMR (qNMR) method is widely used for the quantification of organic chemicals. To perform the qNMR method more easily, we prepared a coaxial NMR tube which consists of an inner tube containing a sample solution and an outer tube containing a standard solution. As the standard solution for qNMR is sealed in the area of surrounding the inner tube, this tube can be used repeatedly by replacing a sample in the inner tube. The protocols of quantification using this coaxial NMR tube are written below; At first, the sealed standard solution was standardized. This process is necessary just once when the coaxial NMR tube is prepared. Subsequently, a sample was added to the inner tube, and then a proton (^{1}H) NMR was measured. When the accuracy of this method was verified using an ethanol solution, the recovery was more than 97% and the linearity was R^2 = 1.000 in the range of concentration from 0.005 % to 100 %.

【背景】

近年, NMRを利用した有機化合物の定量分析法（定量NMR法）が普及し，第16改正日本薬局方 第二追補において一般試験法の部 5.01 生薬試験法の中に「核磁気共鳴（NMR）法を利用した生薬及び漢方処方エキスの定量指標成分の定量」が収載される等，広く認知されてきている．定量NMR法には目的に応じて種々の定量方法が報告されており，代表的な定量手法として，高精度な内標準法が用いられている(1)．しかし，内標準法では，測定対象化合物と内標準物質が共通の溶媒に溶け，かつ信号が重ならない事，またお互いに反応しない事が条件として求められる．更に，試料調製における測定対象化合物及び内標準物質の秤量に高い精度が求められるなど，ボトルネックとなる要素が多い．そこで，より簡便に定量NMR法を実施する事を目的に，NMR試料管の内管と外管の間に定量NMR用標準品を封入した内標入り定量用二重試料管を作製した（Fig 1）．

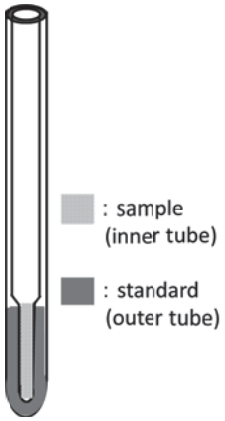


Fig. 1. Structure of a coaxial NMR tube.

【原理】

本二重試料管を用いた定量NMR法では，まず，外管に封入した標準品のプロトン濃度を内管に濃度既知の試料を入れて測定することで規定し（二重試料管としてのファクター値を定める），その後，濃度未知の試料を内管に入れ替えて測定を実施する．

二重試料管，定量NMR，原材料純度測定

○おおきちかこ，しまだはるお

本手法では，外管と内管を溶閉し，外管側に標準品を封入したため，内管の試料に関わらず標準品の面積値は常に一定であり，内管の試料を入れ替えるだけで繰り返し測定が可能である．そのため，サンプル管の違いによる誤差が無く，常に高い分析精度が期待できる．また，測定対象試料と標準品が混ざる事が無く，重溶媒の消費及び標準品調製の手間も省くことが出来る．

【精度の確認】

エタノールを重水に溶かし，様々な濃度（0.001, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 50 %）に調製し，試料とした．この試料及びエタノール（99.5）原液を本二重試料管に入れてプロトン核（^{1}H）のNMRを測定し，本手法の分析精度を検証した．その結果，測定試料のエタノール濃度の理論値と面積積分値との間に良好な直線性が得られた（$R^2 = 1.000$）（Fig. 2）．さらにエタノール濃度0.005 %から100 % において97 %以上の回収率が得られた（エタノール濃度 0.5 % 以上では回収率99 %以上）．

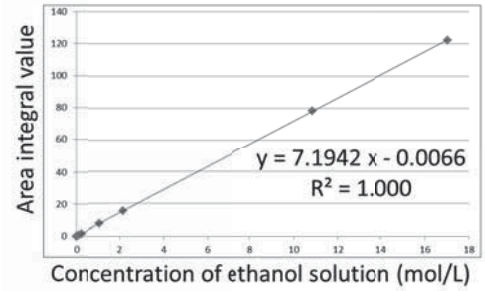


Fig. 2. Linearity of ethanol quantification using a coaxial NMR tube was R^2=1.000 in the range of concentration from 0.005 to 100 %.

【原料純度分析への応用】

抗炎症剤として一般用薬に広く使用されるグリチルレチン酸の純度を本二重試料管を用いて測定した．製剤中に含まれるグリチルレチン酸の濃度は通常，液体クロマトグラフィー（HPLC）で定量される．HPLCでの定量の際，HPLC用標準品の濃度をもとに試料の定量値を算出するが，グリチルレチン酸には日本薬局方標準品等の公的な標準品が存在しない．そのため，標準品とするグリチルレチン酸はHPLCでの面積百分率(%)の値をもとに純度の高いものを選定しているが，使用する標準品のロットによって，製剤中のグリチルレチン酸の定量値が異なるケースがあり，UV検出のみで純度を規定することができなかった．そのため，本手法を用いて標準品の真の濃度を明らかにすることにした．標準品候補として，購入時期の異なる3種類のグリチルレチン酸（Lot. A，Lot. B，Lot. C）を用意し，それぞれの純度を測定した．その結果，Lot. Aは98.3 %，Lot. Bは95.1 %，Lot. Cは95.7 %であり，ロットによって最大で3.2 % 定量値に違いがあることがわかった．また，構造中の各シグナルの面積値をもとに，それぞれの定量値を計算した結果では，定量値の高かったLot. Aに対して，Lot. B及びCにおいて低い定量値を示す部位（Fig. 3. ①）と，全てのロットでほぼ同じ定量値を示す部位（Fig. 3. ②）があった．本結果より，定量値が低めであったLot. B及びLot. Cでは，②の部位の構造は保持され，①近隣が異なる不純物の存在が示唆された．

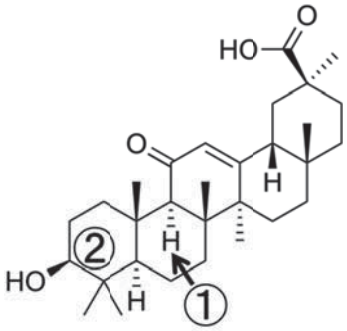


Fig. 3. Glycyrrhetinic acid.

【Reference】

(1) Guido F. Pauli, Birgit U. Jaki, and David C. Lankin. (2005) Quantitative 1H NMR：Development and Potential of a Method for Natural Products Analysis. *Journal of Natural Products*, *Vol. 68, No. 1*, 133–149.

P3

蛋白質選択的飽和によるタンパク質-リガンド相互作用観測の試み

○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

Protein-ligand interaction analysis using adiabatic spin lock as spin saturation

○Jun-ichi Kurita[1], Yuuka Hirao[1], and Yoshifumi Nishimura[1]
[1]*Graduate School of Medical Life Science, Yokohama City University, Japan.*

Direction method is well known as powerful technique for epitope mapping analysis of protein-ligand interaction using NMR. The method requires observation of longitudinal relaxation rate change in ligands due to the influence of protein spin saturation. Thus, to achieve selectively protein spin saturation, the method performs off resonance irradiation near -1 ppm with Gaussian pulse train. However, the Gaussian pulse train often unexpectedly irradiate methyl groups of ligands and then that gives systematic error to epitope mapping analysis. Here, we will show new selectively protein spin saturation method using adiabatic spin lock and its application to the direction method.

序論

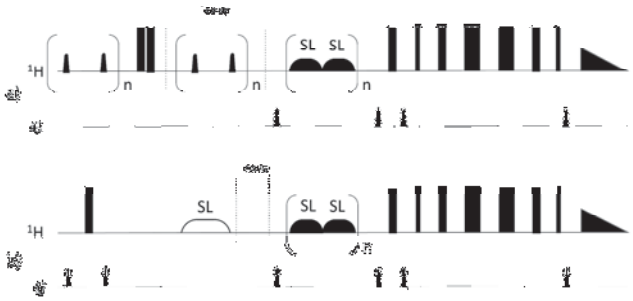


Fig1. a) conventional direction, b) adiabatic spin lock direction

現在,リガンド観測によるタンパク質との相互作用のNMR観測法としてwaterlogsy法，STD法，direction法やAFP-NOESY法などの多くの手法が報告されている.特にSTD法やwaterlogsy法は簡便にタンパク質との結合を検出することができるので,NMRによるスクリーニングに用いられることが多い.しかしながらこれらの方法はエピトープマッピングに用いるにはその信号強度がligandの緩和時間に依存するため,定量的な解析は一般的に困難である.この目的のために開発されたのがdirection法[1]である(Fig1a).direction法はタンパク質を選択飽和した状態でリガンド側のT_1を観測しその変化を得る手法である.0～-1ppmを連続的に照射する手法は選択励起として非常に優れているが、リガンドに高磁場で共鳴するシグナルがあるとリガンド自体を照射しまい定量性を損なってしまう場合がある.このような場合においてタンパク質とligandの$T_1\rho$の差が著しいことを利用しadiabatic spin lockにてタンパク質の選択励起を行う方法を試み,direction法に応用したのでこれを報告する(Fig1b).

方法

ウシ血清アルブミン(Sigma-Aldrich社)を20μM,トリプトファン(ナカライテスク社)およびリジン(ナカライテクス社)を500μMになるようにpH7.2 100mM リン酸バッファー(D_2O)に溶解し試料とした. NMRスペクトルの測定にはAVANCE III HD 700MHz(BRUKER社)を用い、タンパク質飽和のための選択パルスはガウスパルス(パルス幅:8.5ms, B_1:58Hz)、スピンロックはchirpパルス(pulse width:32ms, sweep:8kHz, B_1:407Hz)にて行い、$T_1\rho$フィルターにはChirpパルス(pulse width:2ms, sweep:8kHz, B_1:2.4kHz)を用いた.

protein ligand interaction, direction
○くりたじゅんいち，ひらおゆうか，にしむらよしふみ

結果

32ms程度のadiabatic spin lockを用いればligand由来のシグナルの強度変調は無視できる程度であり,その際のタンパク質の飽和は従来のガウストレインに比べても効率的に飽和されていた(Fig2).

またdirection法に本手法を適応し、リジンおよびトリプトファンのR_1を測定した結果,アルブミンに結合しないリジンでは、ガウストレイン(-0.4ppm照射)と同じ値を示し,アルブミンに結合するトリプトファンではR_1は僅かに大きい値を示した(Fig3).

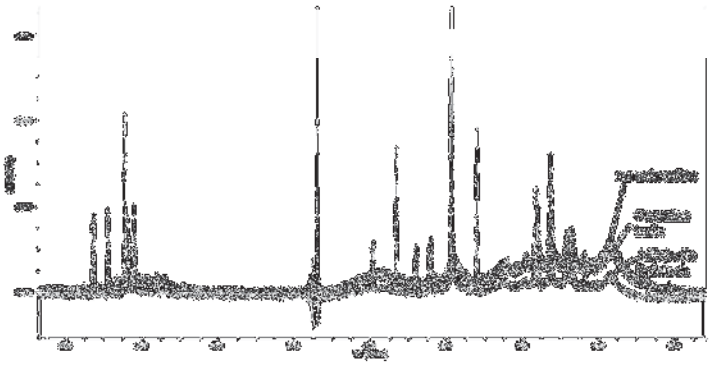
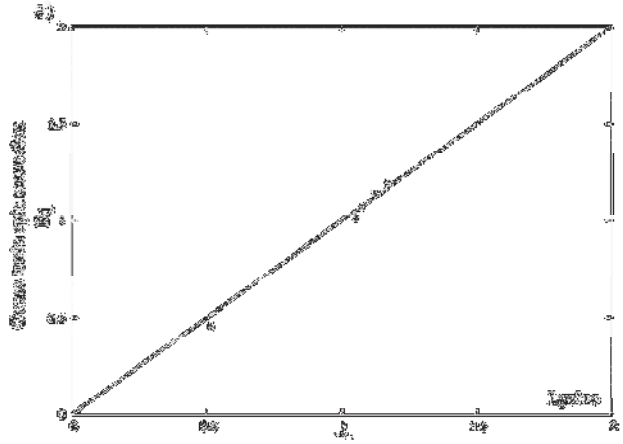


Fig2. proton saturation experiment.



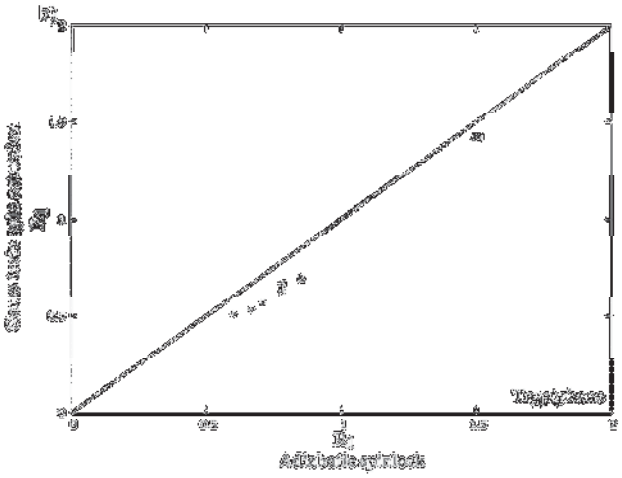


Fig3. longitudinal relaxation rate of (a) Lysine (b) Tryptophane

考察

本手法では,T_1遅延時間ではタンパク質の選択飽和は行わないものの緩和初期の点を用いれば十分に従来のdirectionと同質の情報が得られると考えられ、尚且つその緩和時間初期の点においてはガウス波形の連続照射よりもタンパク質のスピン飽和の度合いは大きいことから従来よりも緩和速度の変化をより感度良く観測できることが示された.また,若干aliphatic protonに流れるもののaromatic proton選択的飽和も行えるため、大雑把ではあるがタンパク質の芳香環とのligandの距離情報の知見が得られるのではないかと期待している.

[1] Y. Mizukoshi, A. Abe, T. Takizawa, H. Hanzawa, Y. Fukunishi, I. Shimada, H. Takahashi, An accurate pharmacophore mapping method by NMR spectroscopy., Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 51 (2012) 1362–5. doi:10.1002/anie.201104905.

P4

WET 法の新しい応用測定-Flip-Back-BBWET-TOCSY 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

Flip-Back-BBWET ---a new method to saturate huge sugars and to observe minor components and amide protons 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. Because the BB-WET method saturates signals of water and sugars, signal intensities of exchangeable protons are generally decreased. In purpose of observing the exchangeable protons such as amides, a new technique, named Flip Back-BBWET, has been developed. The proposed methods were applied to observe the minor components and amide protons in pineapple juice. The signals of minor components and exchangeable amide protons were clearly observed, resulting from the effective saturation of major components, which often interfere spectral analysis.

フルーツ等の食品の NMR スペクトルを測定する場合の問題点として、その溶液は軽水であり、また、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て、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-WET 法を開発し、食品中の微量成分の観測に有効な方法であることが示された。しかし、この BB-WET 法は軽水と糖のシグナルを saturation するという方法であるために、水との交換性プロトンのシグナルも saturation され、シグナル強度が低下するという問題があった。この問題を解決する方法として、軽水の saturation を押さえた、Flip-Back-BBWET 法の開発を試みた[1)]。その結果、水との交換性プロトンは saturation を受けることもなく感度良く測定できることが判明した。この Flip-Back-BBWET 法の応用として Flip-Back BBWET-TOCSY を検討しその有効性を検討した。この方 法を pineapple ジュース応用して、糖のシグナルを saturation し、アミドプロトンからの TOCSY シグナルを観測することが可能になった。

<u>Pulse 系列</u>

図 1 には Flip-Back BBWET に関係した 4 つのパルス系列を示す。
(a)WET-1D,(b)WET-NOESY1D,(c)BB-WET-1D, (d)FLIP-BACK-BB-WET-1D を示す。また 4 つの pulse に対応したスペクトルを図 2 に示す。BB-WET-1D 法は WET 法と NOESY1D 法を組み合わせたパルス系列である。この BB-WET 法のパルスの改良としての Flip-Back-BB-WET 法について、順次 (a)WET-1D,(b)WET-NOESY1D,(c)BB-WET, (d)Flip-Back-BBWET のスペクトルを示し、broad band saturation と水の flip-back の効果を示す。
(a)は WET1D のスペクトルである。WET-pulse は E-BURP を使用し、WET pulse の全てを 90° pulse に置き換えた。また saturation 範囲は 3.1ppm から 5.4ppm に設定した。糖のシグナルはエタノールのメチルシグナルの高さの 1/3 のレベルまで saturation することができた。

WET, Broad-Band-WET, Flip-Back-Broad Band WET
○ふりはたかずお、さくまちせこ、たしろみつる

しかし、軽水シグナルはpre-saturationを併用しているにもかかわらず強く観測された。(b)は WET1D と NOESY1D を結合した WET-NOESY1D のスペクトルである。Mixing time は 1.0msec を設定した。WET-NOESY1D スペクトルでは、WET1D スペクトルとほぼ同程度に軽水と糖の saturation が可能であった。Mixing time の間に homo spoil pulse を入れても大きな変化はない。

(c)は BB-WET1D のスペクトルである。WET-NOESY1D の Mixing period に g1-sel90-g2-180-g3-sel90-g4 を導入した。この二つの selective pulse は位相回しの結果、0° pulse と 180° pulse となり、selective pulse による水と糖のシグナルは消去される。その結果、水と糖のシグナルは WET-NOESY1D スペクトルよりさらに 1/5 の level まで大幅に saturation することがわかった。

（d）は Flip-Back-BBWET のスペクトルである。Flip-Back-BBWET 法は BB-WET のそれぞれの selective pulse に flip-back pulse を追加し、acquisition の手前に water gate pulse を導入した。Flip-back pulse はそれぞれの selective pulse90° (x)と結合させ，水のシグナルは z-軸に配向させる。一方糖のシグナルは gradient 磁場で消去される。Z-軸方向の水は強度の強いシグナルとして観測されるために、観測段階では water gate pulse を使用する。しかし、water gate を使用しても水シグナルを BB-WET1D ほどに低く抑えることは困難である。また、water gate によるスペクトルの定量性の低下は避けられない。一方 flip-back 効果によりアミド領域のシグナルが感度良く観測されているのがわかる。このように、BB-WET 法は広範囲にわたって効率よく saturation することが示されたが、水との交換性のプロトンのシグナルは水と同様に saturation されて、シグナル感度をさげてしまう。一方 Flip-Back-BBWET 法では水の saturation を回避するために水との交換性プロトンシグナルが感度良く観測されることが分かる。図 3 には Flip-Back-BB-WET の profile を示す。

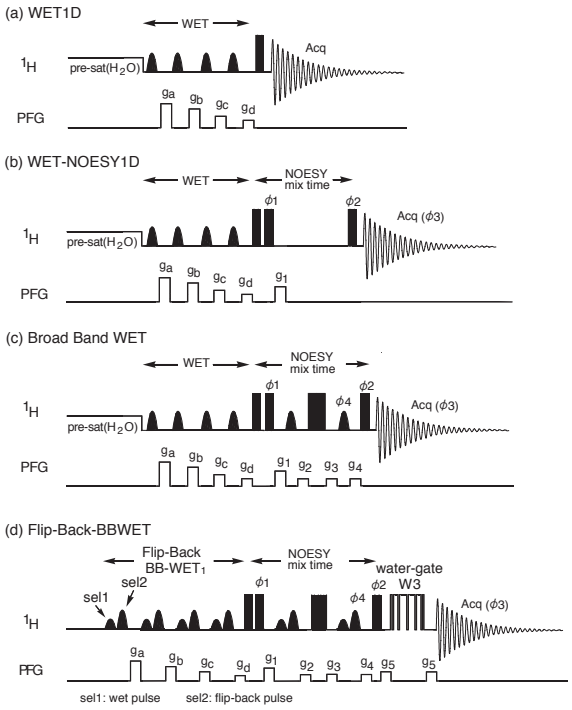


Fig.1 Pulse sequences of Flip-Back-BBWET. The thin and thick bars represent 90° pulse and 180° pulses respectively.

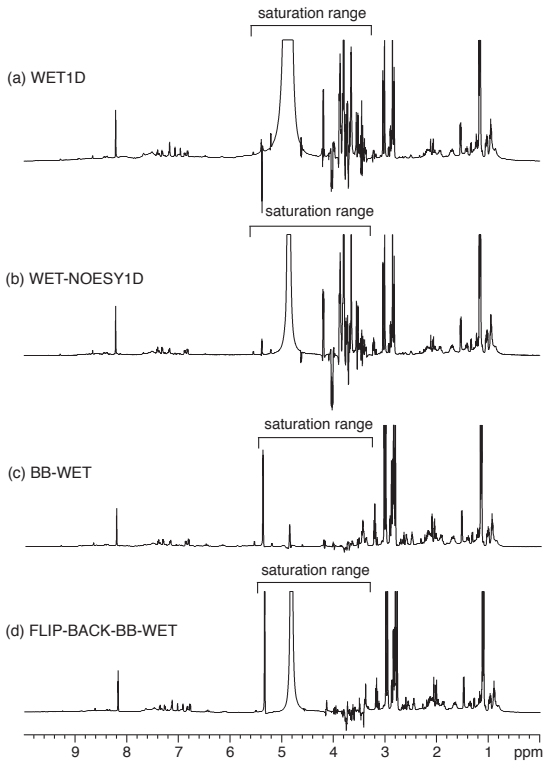


Fig.2 ^{1}H-NMR spectra of pineapple fruit juice. The saturation was set in the range of 3.10-5.40 ppm.

a)はwet1d、b)BB-WET、c)Flip-Back-BB-WETのprofileを示す。
水のシグナルを用いて、観測 offset を25Hz ステップに可変して測定した。Selective pulseはE-BURB pulseを使用し、1150Hz (2.3ppm) を saturation するように設定した。この時の selective 90° pulse は 3.92msec であった。(a)Conventional WET-1Dではsaturation範囲はBB-WETと同じであるが、saturation シグナルにおいて、WETパルスのselective pulseのflip angleが影響し、指定したsaturation範囲以上に saturation されシグナルの選択性は高くないことが分かる。
これに対して、(b)BB-WET の場合では、selective pulse の flip angle をすべて90°パルスに置き換えた結果、ほぼ1000Hz(2ppm) に渡り選択性の高いsaturationを示した。一方、軽水および糖の領域以外の観測領域においてはsaturationの磁場の影響はほとんどなく、均一なシグナル強度を示した。これは軽水及び糖を除いた領域ではそのまま積分測定が可能である。

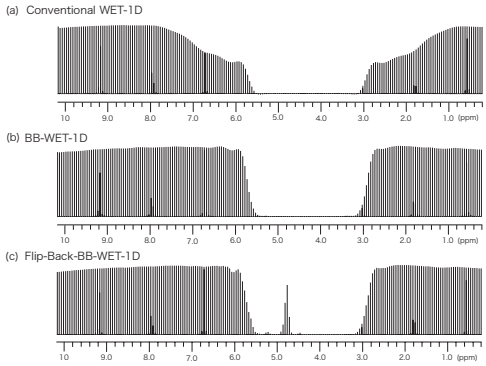


Fig.3 The saturation profiles aquired using (a) conventional WET, (b) BB-WET and (c) Flip-Back-BB-WET pulse sequences. The pulse width of E-BRUP and Flip-Back was 3.91 ms and 11.27 ms. Resonance offsets were recorded at 25 Hz increments. A solution containing 5% H_2O was used.

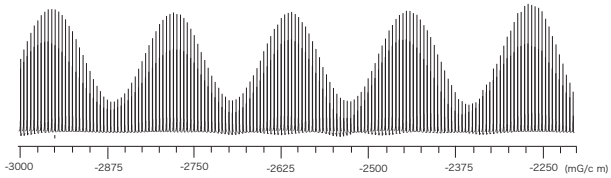


Fig.4 The gradient profiles of water gate pulse of Flip-Back-BB-WET pulse sequences. The strengh of pulse field gradient were recorded at 0.5mG/cm increments. A solution 95% H_2O was used.

(c)はflip-back-BBWETのprofileである。このprofileでは、flip-back pulseにより水シグナル(4.9ppm)領域はsaturationされず、水以外ではBB-WETと同様に広い範囲がsaturationされていることが示された。しかし、実際の測定においては、観測段階ではwater gate pulse を使用し、強い水シグナルを回避する必要があるため定量測定には不向きである。

Water gate pulse

図4にはFlip-Back-BBWETで使用したwater-gate pulseのgradient pulseの強さによる、シグナルの消去の profile である。どのくらいの強さを必要とするか押さえておくことは重要である。Flip-Back-BBWET法は水の磁化をz-軸に配向させるために、観測段階では水のシグナルが強く観測される。そのために、water-gate pulse を使用して、水の観測を避ける必要がある。観測段階のwater-gateに使用するgradientの強さは任意で最適値を求める必要がある。図4はwater gate pulseのgradient pulseのprofileデータである。water gateのgradientの強さを-3G/cmから0.0005G/cmステップで可変したwater gateの効果を示したものである。シグナル強度の一番低いポイントのgradientを使用した。

Flip-Back-BB-WET スペクトル

図5において、(a)BB-WET-1Dと(b)Flip-Back-BB-WET-1Dの低磁場領域のスペクトルを示す。
WET-pulseは2.98ppmから5.28ppmをsaturationするように設定した。Selective pulseはE-BURPを使用し、その pulse の巾は 3.9msec であった。一方 flip back pulse も E-BURP を使用し、400Hz(0.8ppm)をsaturationするように設定した。このときのselective 90° pulseは11.27msであった。そして、観測段階では Z-軸方向に配向した水を観測することになるために、water gate法を使用して、水シグナルを消去した。

(a)BB-WET-1D のスペクトルでは交換性プロトンの OH 由来のシグナルが観測されていないのに対して(b)Flip-Back-BB-WET のスペクトルは交換性 OH のシグナルを観測することができた。これは、(a)BB-WET-1D では軽水と糖の領域を saturation するために、軽水との交換性プロトンの OH も同時に saturation してしまう。

一方、(b)Flip-Back BB-WET では軽水の saturation を回避するために、交換性プロトン OH の観測が可能になった。

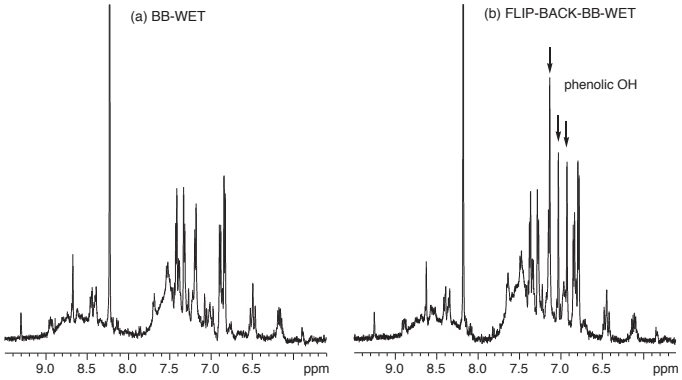


Fig.5 ^{1}H-NMR spectra of pineapple fruit juice. (a).BB-WET spectrum (b). Flip-Back BB-WET spectrum. The saturation was set in the range of 3.10-5.40 ppm. selective pulse = 3.92ms, flip back pulse = 11.27ms, scans = 64.

Flip-Back-BB-WET-TOCSY

図 6, 図 7 に Flip-Back-BBWET TOCSY の PULSE 系列とそのスペクトルを示す。

Flip-Back-BBWET が 2D-NMR に応用できるかが重要な問題である。Pineapple のように、溶媒が軽水でしかも糖のシグナルが強く観測される化合物では、微量成分の帰属を行うには 2D-スペクトルが測定できなければならない。図 6 に示すように、Flip Back BBWET TOCSY スペクトルにおいて、糖と軽水のシグナルを低く抑えることができた。しかも、saturation による t1-nise の問題もクリヤーした。また、アミド領域のプロトンのシグナルを感度良く観測できることを示した。

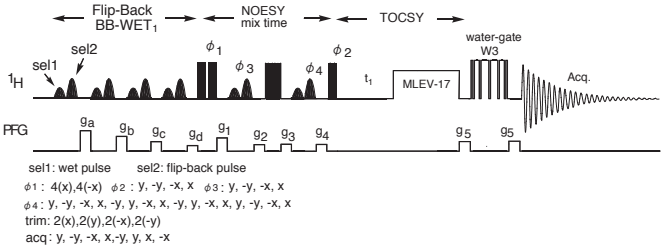


Fig.6 Pulse sequences of Flip-Back-BBWET-TOCSY. The thin and thick bars represent 90° pulse and 180° pulses respectively.

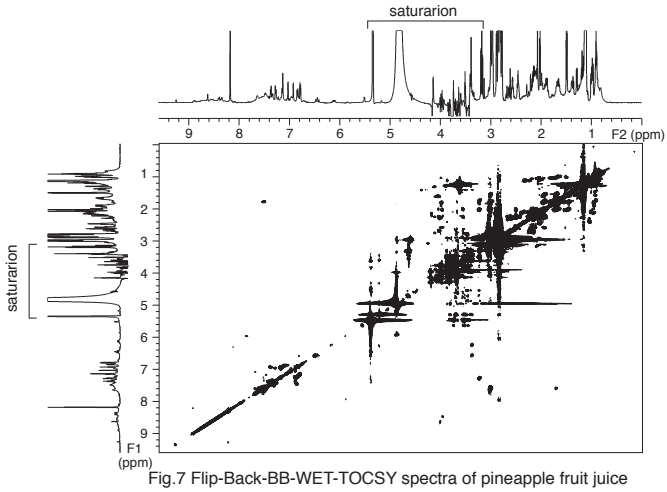


Fig.7 Flip-Back-BB-WET-TOCSY spectra of pineapple fruit juice
F1x F2 = 6700 x 6700 Hz, point = 512 x 2048 scans = 64,
mix=50 msex, sel-pulse=3.92 msec flip-back-pulse=11.27 msec

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、このシグナルを如何に小さく押さえるかが問題であった。Broad Band-WET 法は 1D-NMR としては、軽水と糖のシグナルを低く抑え、微量成分の観測を容易であった。しかし、この方法では水との交換性プロトンのシグナルが飽和して感度をさげるという問題があった。この問題に対して、Flip-Back-BB-WET 法により、交換性プロトンの問題を解決することができた。

1). K. Furihata, J. Zhang, M. Koda, T. Miyakawa and M. Tanokura: *Magn. Reson. Chem.* 2014, 52, 333-338

P5

ケモカイン受容体制御因子 FROUNT－新規制御化合物間の相互作用解析

江崎　宗一郎[1]，○吉永　壮佐[1], 石田　規人[1], 武田　光広[1], 柚木　芳[1],
寺島　裕也[2], 遠田　悦子[2], 松島　綱治[2], 寺沢　宏明[1]
[1]熊本大学大学院生命科学研究部, [2]東京大学大学院医学系研究科

Analyses of the interaction between the regulating factor of the chemokine receptor FROUNT and new anti-inflammatory compounds.

Soichiro Ezaki[1], ○Sosuke Yoshinaga[1], Norihito Ishida[1], Mitsuhiro Takeda[1], Kaori Yunoki[1],
Yuya Terashima[2], Etsuko Toda[2], Kouji Matsushima[2], and Hiroaki Terasawa[1]
[1]*Faculty of Life Sciences, Kumamoto University*, [2]*Graduate School of Medicine, The University of Tokyo*

Leukocyte chemotaxis is induced when chemokines bind to their receptors during the inflammation response. We previously identified the cytosolic regulator, FROUNT, which binds to the membrane proximal C-terminal region (Pro-C) of the chemokine receptors CCR2 and CCR5 and obtained two compounds that inhibit the FROUNT–receptors interaction and exert anti-inflammatory effects. To optimize the regulatory compounds, based on the structural information of FROUNT and CCR2/CCR5, we performed NMR titration analyses using ^{15}N-labeled FROUNT and the two compounds. Although chemical structures of compounds are different, a similar chemical shift perturbation pattern of the FROUNT peaks was observed, in a slow-exchange manner on the NMR time scale. These data suggested that the two compounds function via a common mechanism to inhibit FROUNT.

【背景・目的】白血球の遊走は、白血球が血管内から組織内へ浸潤し、炎症局所に移動・集積する現象である。この現象は、生体内で炎症が起きた際に、炎症部位からケモカインが産生され、細胞膜上に存在するケモカイン受容体に結合することで誘起される。白血球の遊走は、生体を防御する免疫機構に重要な役割を果たすとともに、関節リウマチ・がん・動脈硬化症などの様々な免疫性疾患の発症にも密接に関与している。

我々は、ケモカイン受容体 CCR2 および CCR5 の C 末端細胞膜近傍領域（Pro-C）に結合する細胞内制御因子 FROUNT を同定した [1]。また、細胞膜および FROUNT 結合時の Pro-C の立体構造を決定し、それぞれの結合部位を同定した [2]。近年、FROUNT 上のケモカイン受容体結合領域が C 末端領域（FNT-C）であることを明らかにし、FNT-C の立体構造を NMR 法に基づいて決定した [3]。一方、ケモカイン受容体－FROUNT 相互作用を阻害し、かつ、抗炎症効果をもつ化合物 A を、１３万化合物からなるライブラリーのスクリーニングにより取得した。NMR 滴定実験により、化合物 A が FNT-C 上の CCR2 結合部位とは異なる場所に Slow-exchange の様式で結合し、

ケモカイン，制御化合物，創薬

えざきそういちろう，○よしながそうすけ，いしだのりひと，たけだみつひろ，ゆのきかおり，てらしまゆうや，とおだえつこ，まつしまこうじ，てらさわひろあき

FNT-C－CCR2 間の相互作用をアロステリックに阻害することを示した [4]。化合物 A は生体内で代謝を受けることが知られており、生体内における阻害活性の低下が懸念されている。我々は、化合物 A とは化学構造が大きく異なるが阻害活性を持つ化合物 B の取得にも成功している。これら制御化合物は、FROUNT－CCR2 および FROUNT－CCR5 の相互作用を阻害するため、相乗的な抗炎症効果を得ることができると考えられる。

本研究は、制御化合物 A と B によるケモカイン受容体－FROUNT 相互作用阻害メカニズムを明らかにし、立体構造情報に基づいて制御化合物を最適化し、特異性の高い抗炎症薬の創製に貢献することを目的とする。

【方法】^{15}N 標識した FNT-C に対して 0.25、0.5、1、2 当量の制御化合物 A、一次代謝物 A_{met}、または制御化合物 B を滴定し、^{1}H–^{15}N HSQC を測定した。また、制御化合物の結合による FNT-C の運動性の変化を調べるため、^{15}N 標識した FNT-C および FNT-C－制御化合物 A 複合体を用いて緩和実験を行った。なお、全ての測定には、極低温信号検出器を装備した 600 MHz NMR 装置 (Bruker BioSpin) を、データ処理には NMRPipe suite (NIH)を、解析には Olivia (北海道大学) を用いた。

【結果・考察】FNT-C に対する制御化合物 A の一次代謝物 A_{met} の滴定実験において、スペクトル変化はほとんど見られなかった。以前行った制御化合物 A の滴定実験 [4] において、多数の FNT-C 単体由来のシグナルが消失し、制御化合物 A との複合体に由来するシグナルが Slow-exchange の様式で観測されたことを考慮すると、制御化合物 A は代謝の初段階において阻害活性を失うことが示唆された。

一方、制御化合物 B の滴定実験において化学シフト変化が見られたアミノ酸残基は、化合物 A 滴定時に変化が見られたものとほぼ一致し、どちらも Slow-exchange の様式で観測された。この結果は、これら制御化合物が似通った阻害様式を持つことを示している。

緩和実験において、FNT-C－制御化合物 A 複合体は FNT-C 単体と比較して、R_1 値および ^{15}N{^{1}H} NOE では顕著な変化が見られなかったが、Pro-C 結合部位の R_2 値に低下が見られた。FNT-C は制御化合物 A と結合することにより、CCR2 結合部位のミリ秒スケールの化学交換が抑制される可能性があることが分かった。本結果は、制御化合物がアロステリックに FROUNT－CCR2 相互作用を阻害していることを示唆している。

【展望】今後は、FNT-C の立体構造情報に基づいて制御化合物を最適化し、特異性の高い抗炎症薬の創製に貢献する。

【参考文献】

[1] Terashima, Y., *et al*., *Nature Immunology* **6**, 827–835 (2005), [2] Esaki, K., Yoshinaga, S. (equal contribution), *et al*., *The FEBS Journal* **281**, 5552–5566 (2014), [3] 吉永ら，第５３回 NMR 討論会，Ｌ３－４ (2014), [4] 石田ら，第５２回 NMR 討論会，Ｐ３７ (2013)

P6

HSP70基質結合ドメインにおけるリッドの動的構造と機能との相関解析

○梅原康平[1]，栃尾尚哉[2]，星川美穂[1]，楯真一[1,2]
[1]広島大学・大学院・理学研究科
[2]広島大学・クロマチン動態数理研究拠点(RcMcD)

Structural dynamics and functional relationship of the lid in the substrate binding domain of HSP70

○Kohei Umehara[1], Naoya Tochio[2], Miho Hoshikawa[1], and Shin-ichi Tate[1,2]
[1] *Department of Mathematical and Life Sciences, Graduate School of Science, Hiroshima University*
[2] *Research Center for the Mathematics on Chromatin Live Dynamics (RcMcD), Hiroshima University*

HSP70, a molecular chaperon, grasps in denatured protein in their C-terminal Substrate Binding Domain (SBD) to prevent protein aggregation in cells. SBD is composed of SBDβ, the core of SBD, and SBDα, the 'lid' is in a dynamic conformational equilibrium. In attempting to reveal the structure dynamics and function relationships of the lid par, we applied anisotropic spin interactions, rotational diffusion tensors analyses from ^{15}N nuclear spin relaxation data, and paramagnetic relaxation enhancement effects (PRE). The data showed SBD tends to in a open-lid structure in absence of the substrate. This is controversial to the predicted motions from the crystal structures of SBD. We suggested that the lid works as fly wheel to capture and release the substrate, instead it does not work as lid to seal down the captured substrate in SBD.

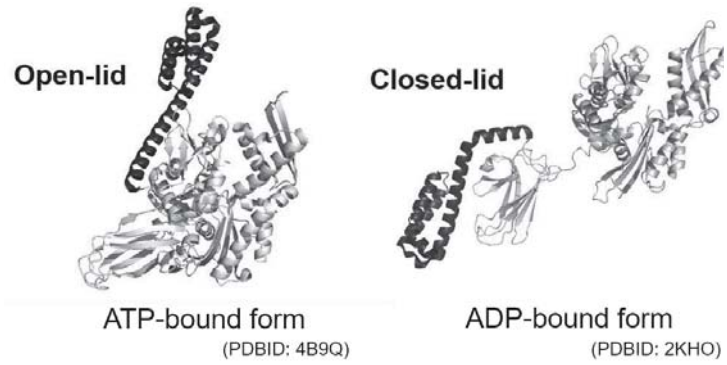


Fig. 1. Dynamic conformational changes of the lid
The lid shown as dark grey. Other part shown as light grey

分子シャペロンHSP70 （70 kDa Heat Shock Protein）はC末端側の基質結合ドメイン（SBD）で変性タンパク質を掴むことで，凝集を抑制し，正常構造への修正を行っている．SBDは基質結合部位を含む領域と，大きな構造変化をするリッド（Fig. 1）から構成されている．ヒトHSP70やホモログである大腸菌DnaKの結晶構造解析から，基質結合状態ではSBDのリッドが閉じた構造となると考えられている．しかし，これまで自己結合や多量体化のため，アポ状態のSBDの構造は明らかになっておらず，さらにそのリッドのダイナミクスと機能の相関も明らかになっていない．本研究では、このSBDのリッドに着目した．

我々はSBDのリッドに変異を導入することによって，リッドが基質結合部位に結合する自己結合を解消することに成功し，アポ状態での立体構造を決定した．そのアポ状態のSBDでは，他の領域と比べてリッドは非常に動的であるということが分かった．その動的な性質を明らかにする

70 kDa Heat Shock Protein（HSP70），基質結合ドメイン（SBD），リッド

○うめはらこうへい，とちおなおや，ほしかわみほ，たてしんいち

ために，リッドにラジカルスピン標識を導入し，常磁性緩和促進（PRE）法によりリッドの位置を観測した．アポ状態のときと比べて基質ペプチド結合状態では， PREによるNMR信号強度の減少度合いが小さくなるという結果が得られた．このことから，ペプチドが結合すると，リッドはSBDのコア部分からより離れた位置にあるということが考えられる．これはアポ状態ではリッドが閉じた構造，基質結合状態ではリッドが開いた構造となるという，過去に報告されていたX線結晶構造解析から考えられていたものと異なる挙動を示すということを示す．

高分子量タンパク質でも異方性核スピン相互作用から分子配向テンソルを決定できる，当研究室で開発したDIORITE（Determination of Induced ORIentation by Trosy Experiment）法[1-5]を用いて，SBDのコア部分に対するリッドの配向を決定した．その結果は，ペプチド結合状態ではリッドがコア部分とずれた配向であるということを示しており，SBDのリッドは基質の結合によって，斜めにスリップし開くという動きをもつということが示唆された．また，過去に報告されていたリッドのない基質結合ドメインと変性ペプチドとの解離定数と，今回のリッドがある基質結合ドメインでの解離定数は近い値となった．このことから，リッドは「蓋」として基質を基質結合サイトに留め，基質結合能を高めるのではないということが結論づけられる．

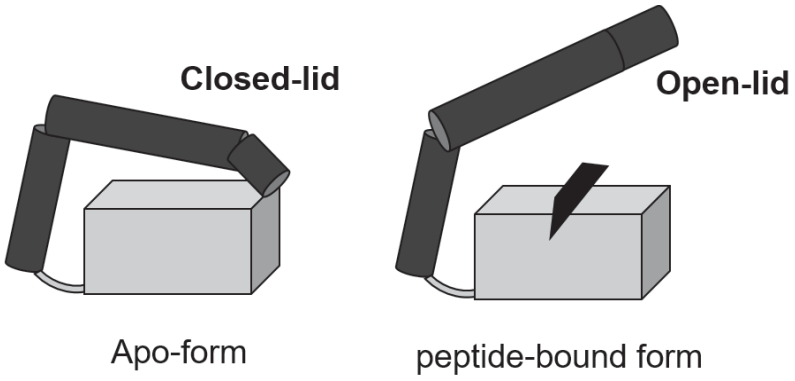


Fig. 2. The model of lid behavior corresponding to our results

結論

今回の結果から，リッドはSBDの基質結合能を高めるための「蓋」として働くのではなく，このダイナミックな動きにより，基質を掴むとき・放出するときに「フライホイール」として働いているのではないかということが示唆された．

REFERENCES

[1] Tate, S., Imada, A., and Hiroguchi, N. (2011) *Complementary Use of NMR to X-Ray Crystallography for the Analysis of Protein Morphological Change in Solution*, INTECH Open Access Publisher.

[2] Tate, S.-i., Shimahara, H., and Utsunomiya-Tate, N. (2004) Molecular-orientation analysis based on alignment-induced TROSY chemical shift changes, *Journal of Magnetic Resonance 171*, 284-292.

[3] Tate, S. (2008) Anisotropic nuclear spin interactions for the morphology analysis of proteins in solution by NMR spectroscopy, *Anal Sci 24*, 39-50.

[4] Kurita, J., Shimahara, H., Utsunomiya-Tate, N., and Tate, S. (2003) Measurement of ^{15}N chemical shift a nisotropy in a protein dissolved in a dilute liquid crystalline medium with the application of magic angle sample spinning, *J Magn Reson 163*, 163-173.

[5] Uewaki, J.-i., Kamikubo, H., Kurita, J.-i., Hiroguchi, N., Moriuchi, H., Yoshida, M., Kataoka, M., Utsunomiya-Tate, N., and Tate, S.-i. (2013) Preferential domain orientation of HMGB2 determined by the weak intramolecular interactions mediated by the interdomain linker, *Chemical Physics 419*, 212-223.

P7

天然変性領域(IDR)を介した過度的ドメイン間相互作用による基質結合能増強機構の解明

○井上涼平[1]，川嵜亮祐[1]，栃尾尚哉[2]，楯真一[1,2]
[1]広島大学・大学院・理学研究科
[2]広島大学・クロマチン動態数理研究拠点(RcMcD)

Enhancement of the ligand binding ability through the transient inter-domain interaction facilitated by intervening IDR

○Ryohei Inoue[1], Ryosuke Kawasaki[1], Naoya Tochio[2], Shin-ichi Tate[1,2]
[1] *Department of Mathematical and Life Sciences, Graduate School of Science, Hiroshima University*
[2] *Research Center for the Mathematics on Chromatin Live Dynamics (RcMcD), 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, intrinsically disordered region: the phosphor-peptide binding WW domain and the catalytic PPIase domain. It has been known that the WW domain connected by the linker is indispensable for cell-survival even though the isolated PPIase domain shows the isomerase activity. Recent studies demonstrated that the transient inter-domain interaction between the WW and PPIase domains mediated by the linker is strongly engaged in the regulation of the Pin1 isomerase activity. However, the correct role of the flexible linker in this regulatory-mechanism is still unclear. In this study, we introduced a mutation, I28A where is known to be the center of the inter-domain contacting-region, and investigated the effect on the substrate-binding-affinity and the Pin1-isomerase-activity by the less-inter-domain interaction mutation.

タンパク質の中には，複数のドメインがリンカーによって結ばれた構造をもつタンパク質が頻繁にみられる．特に特定の構造をもたないリンカーは従来ドメインをつなぐ単なるヒモと考えられ，その詳細な機能が言及されることはほとんどなかった．我々は，柔軟なリンカーで結ばれた2つのドメインをもつPin1をモデルとして，その天然変性タンパク質領域(IDR)であるリンカー部の役割について研究を進めている．

Pin1はIDRであるリンカーによって結ばれたそれぞれ独立して運動する2つのドメイン，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)ドメインで構成されており，2つのドメインのどちらもPin1の標的配列であるpSer/pThr – Proモチーフを認識する．この2つのドメインは溶液中で異なる2つの分子回転相関時間を示すが，結晶中ではPEGによって特定の構造に誘導される．結晶構造で見られるドメイン間接触は，溶液中においても過渡的に存在することが知られており，近年この過渡的なドメイン間相互作用によってPin1の

Fig. 1. Ternary structure of Pin1
Ile28 residue shown as black spheres (PDBID: 1PIN).

天然変性領域(IDR)，プロリン異性化酵素

○いのうえりょうへい，かわさきりょうすけ，とちおなおや，たてしんいち

異性化活性が制御されていることが報告された[1]．本研究では，ドメイン間接触部位の中心に存在するIle28をAlaに変異することで，ドメイン間接触を減じた変異体を作製した．野生型Pin1および単離したPPIaseドメインと変異体の化学シフトと^{15}N核緩和解析の結果を比較することで，作成した変異体ではドメイン間相互作用が減じていることを確認した．この変異体に対し，野生型での研究で用いた種々のペプチドとの相互作用解析を行い，その違いからドメイン間接触が及ぼす基質結合能および異性化活性への影響について考察する．

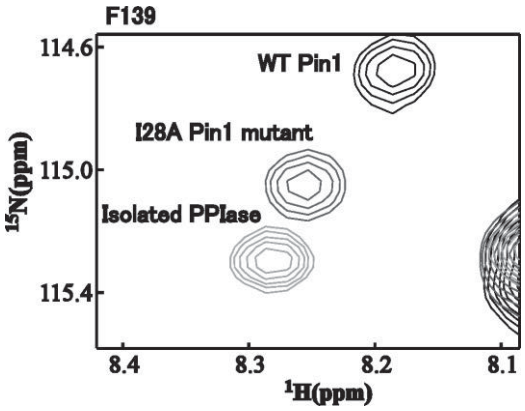


Fig. 2. The chemical shift changes of the inter-domain interface-residue (F139) for a series of Pin1 mutants.

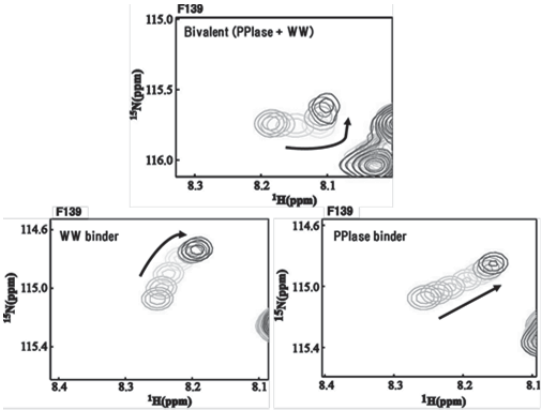


Fig. 3. NMR titration experiments of the bivalent ligand, PPIase-binder and WW-binder against the I28A Pin1 mutant.

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.

P8

ライゲーション反応を用いたマルチドメインタンパク質PKCの構造解析

○貴堂晃弘[1]，金場哲平[1,2]， 伊藤隆[1]， 三島正規[1]
[1]首都大学東京・大学院・理工学研究科
[2]ブルカー・バイオスピン株式会社

Structure determination of the multi-domain protein PKC by protein ligation

○Akihiro Kidou[1], Teppei Kanaba[1,2], Yutaka Ito[1], Masaki Mishima[1]
[1] *Graduate School of Science and engineering, Tokyo Metropolitan University*
[2] *Bruker BioSpin K.K.*

Multidomain proteins play pivotal roles in many important phenomena in eukaryotes. To understand their functions, it is essential to analyze their structures. However, structural studies are hampered possibly due to weak domain-domain interactions and flexibility of linkers. Our target is Protein kinase C (PKC).When PKC is activated by second messengers and diacylglycerol (DAG), it is believed that a large conformation change occurs and it localizes at plasma membrane, and thus phosphorylates cognate substrates. In this study, we are trying to determine the structure of full-length Protein kinase C (PKC), a multi-domain protein and investigate the regulation mechanism using long-range distance information derived from PRE detected by solution hetero-nuclear NMR.

【序論】

マルチドメイン蛋白質は，複数のドメインが繋がって全長を構成している蛋白質である．マルチドメイン蛋白質では，このドメインが相互作用することで蛋白質全体の活性等が制御されている．真核生物における高度な生命現象にはこのマルチドメイン蛋白質が密接に関わっている．したがって，このような生命現象の機構を分子レベルで理解するためにはマルチドメイン蛋白質の構造および機能の解析が必要不可欠となる．しかしながら柔軟なマルチドメイン蛋白質の全長の構造解析は一般に困難である．これは，ドメイン間の相互作用の弱さやリンカーの柔軟性などの理由から結晶化が難航することが多く，必然的に蛋白質構造解析の主要な手法の一つであるX線結晶構造解析による構造決定が困難となるためである．このような柔軟な構造や弱い相互作用の解析に対して，NMR法は一般に有利な手法であるが，マルチドメイン蛋白質全長で高分子量となるため通常のNMR法では，やはり構造決定は容易でない．

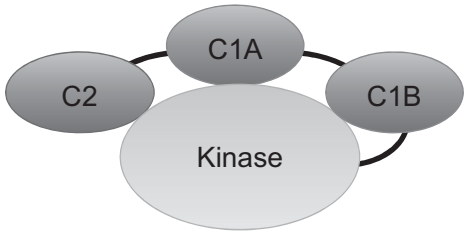


Fig.1 Schematic drawing of domains of PKC.

Protein kinase C (PKC)はC1，C2，kinaseドメインから構成されるマルチドメインタンパク質であり，細胞の増殖や分化，細胞死といった重要な細胞機能の調節に関わるとともに，発生，

ライゲーション，マルチドメインタンパク質

○きどうあきひろ，かなばてっぺい， いとうゆたか， みしままさき

免疫，記憶など多細胞生物の重要な生理現象を司っているリン脂質依存性プロテインキナーゼであることは良く知られているが，PKC の機能を分子レベルで理解するためにはそれらの構造および機能解析が必要不可欠である．

【実験】

まず，ドメインごとに同位体標識したものを精製し，NMR測定を行った．C1Bドメインは^{15}N標識したもののHSQC測定を行った．kinaseドメインは^{15}N標識しTROSY測定を行った．次にPKCのドメインであるC1B，kinaseドメインの精製をし，Sortase A(SrtA)を用いてライゲーション反応を行った．また，クリック反応を行うためにC2-C1A, C1Bドメインのコンストラクトの作製をし，精製を行った．

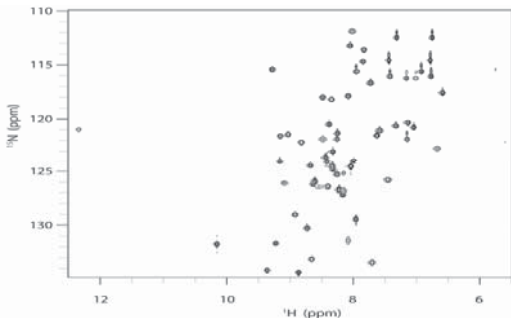


Fig.2　HSQC spectrum of the C1B domain of PKC

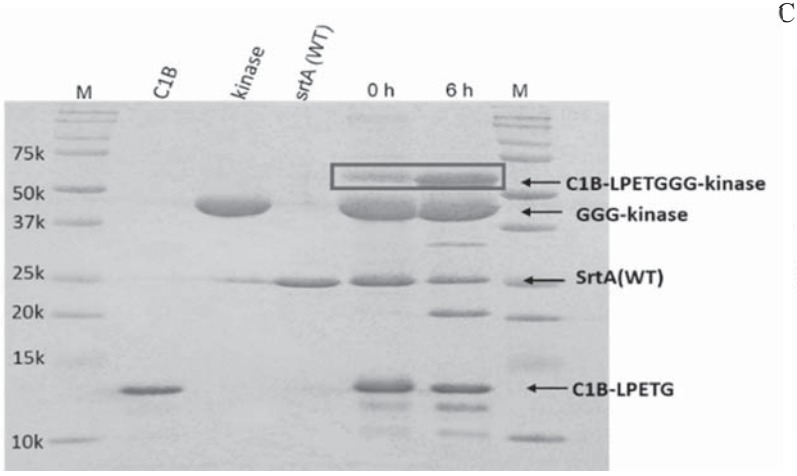


Fig.4 SDS-PAGE of the sortase-mediated ligation product of C1B and kinase domains.

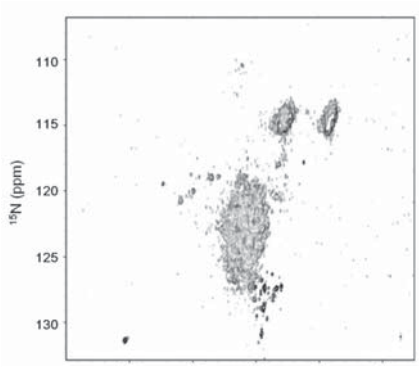


Fig.3　^{1}H-^{15}N TROSY spectrum of the kinase domain of PKC

【結果・展望】

NMR 測定の結果，C1B ドメインの HSQC スペクトルは良好なものが得られた(Fig.2)．TROSY 法を用いた kinase の測定に関しては NMR シグナルの観測に成功した(Fig.3)．SrtA を用いたライゲーション反応では SDS-PAGE より C1B ドメインと kinase ドメインのつながったもののバンドが確認できた(Fig.4)．一方，クリック反応による C2-C1A，C1B ドメインの連結では十分な収量が得られず，現在，その改善を行っている．今後は SrtA を用いるとともにクリック反応も利用することで C2 ドメインと C1 ドメインをつなげ，PKC 全長を再構成し，常磁性緩和効果の観測によって PKC 全長の構造解析を行っていく．

【謝辞】

本研究におけるNMR測定は，文部科学省先端研究基盤共用促進事業「NMR 共用プラットフォーム」(理研横浜)を利用しました．

P9

メチル基を利用した蛋白質の全自動NMR構造決定

○新家粧子[1]，小林直宏[1]，藤原敏道[1]，児嶋長次郎[1]
[1]大阪大学、蛋白質研究所

Automated protein structure determination using methyl groups

○Shoko Shinya[1], Naohiro Kobayashi[1], Toshimichi Fujiwara[1], Chojiro Kojima[1]
[1] *Institute for Protein Research, Osaka University*

High molecular weight protein causes the complicated NMR spectrum due to the low sensitivity of measurements and signal overlapping. Methyl-group specifically protonated Ile, Leu, and Val provide higher sensitivity and simplification of NMR spectra for large protein. On the other hand, automated NMR analysis program, MagRO-FLYA system, has been developed to provide the protein structure determination for small proteins within a day. To achieve the automatic structure determination of high molecular-weight protein, we challenged to assign the methyl group resonances automatically by MagRO-FLYA system using the ILV methyl-group specifically protonated protein.

【序論】

溶液NMRによる蛋白質の立体構造解析の分子量上限は、試料調製や技術的専門性の高さがネックとなり、事実上2～3万分子量にとどまっている。このような高分子量蛋白質の立体構造解析を行うために、メチル基選択的軽水素標識蛋白質を用いてスペクトルの簡素化と高感度化を行い、メチル基領域のNOE情報を収集することによって、高分子量蛋白質のグローバルフォールドを決定する手法が開発されている[1)]。しかしながら、高分子量蛋白質の化学シフト帰属にはトップレベルの専門家でも膨大な時間を必要とする。一方最近、全自動構造計算システムMagRO-FLYAが整備され、100残基程の蛋白質では1日で構造決定する事が可能となっている[2)]。そこで、メチル基選択的標識蛋白質を用いることによって、シグナルの複雑な重なりが克服されると考えられるので、MagRO-FLYAシステムによるメチル基の自動帰属を試みた。メチル基帰属の自動化が可能になれば、解析を困難にしていた技術的な専門性や時間による制限が緩和され、高分子量蛋白質のグローバルフォールド決定を高速化できると期待できる。

本研究ではユビキチンをモデルにメチル基選択的軽水素標識を行い、標識体のメチル基領域の4D高分解能NOESYスペクトルの測定によってメチル基由来のNOE情報を収集し、全自動構造決定を行うことを目的とした。

【方法】

メチル基由来のNOE情報をもとに構造計算を行うことを目的とするため、コア構造にメチル基クラスターをもつものを指標にモデル蛋白質（ユビキチン、プロテインG B1ドメイン、FKBP12）の評価を行った。全自動構造解析によるコントロール構造を得るために、常法に従ってユビキチンの^{13}C/^{15}N均一標識を行い、^{1}H-^{15}N HSQC、HNCO、HNCACB、CBCA(CO)NH、HBHACONH, ^{15}N-edited NOESY、^{1}H-^{13}C HSQC、HCCH-TOCSY、^{13}C-edited NOESYスペクトルを測定し、

自動構造決定、メチル基選択的軽水素標識

○しんやしょうこ、こばやしなおひろ、こじまちょうじろう、ふじわらとしみち

MagRO-FLYAシステムによりこれらのスペクトルについて自動シグナル帰属を行った。得られた化学シフトテーブルとNOE由来の距離情報、TALOS由来の二面角拘束条件を用い、CYANAによる自動構造計算を行った。

つづいて、イソロイシン、ロイシン、バリン残基のメチル基を選択的に標識するため[3)]、前駆体であるα-ketobutyric acid [^{13}C4, 3, 3-D2]とα-ketoisovalric acid [1, 2, 3, 4-^{13}C4, 3, 4', 4', 4'-D4]および、$^{15}NH_4Cl$、^{2}H, ^{13}C-glucoseを含む重水培地中で培養を行い、^{2}H,^{13}C,^{15}N, ILVメチル基選択的軽水素標識ユビキチンを得た。

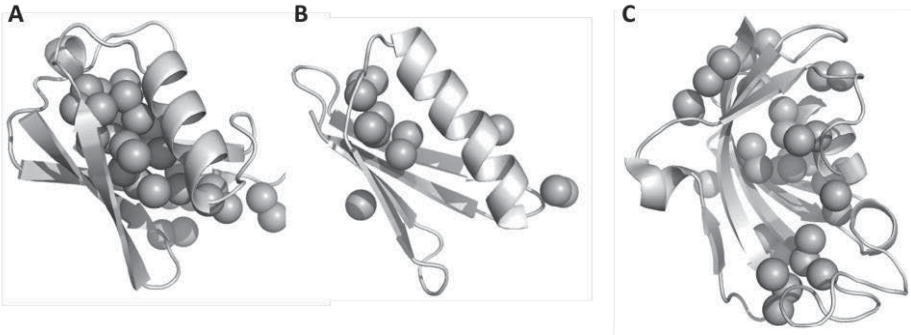


Fig. 1 Structures of (A)Ubiquitin, (B)GB1, (C)FKBP12. Ile, Leu and Val residues are shown as spheres.

【結果】

ユビキチンはイソロイシン７個、ロイシン4個、バリン9個と比較的多くのメチル基を蛋白質内部に有していることから、本研究のモデル蛋白質として選定した(Fig. 1)。

均一^{15}N, ^{13}C標識ユビキチンの主鎖領域とaliphatic側鎖領域のスペクトルを用いて、MagRO-FLYAシステムによる自動シグナル帰属と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が1.02 Åの構造を得た(Fig. 2)。現在、さらに芳香族領域のスペクトルを加え、構造計算を行っている。

^{2}H,^{13}C,^{15}N, ILVメチル基選択的軽水素標識ユビキチンの^{1}H-^{13}C HSQCスペクトルの測定を行った結果、ユビキチン中の全てのイソロイシン、ロイシン、バリン残基のシグナルが観測された(Fig. 3)。現在、この標識ユビキチンを用いて、4D HSQC-NOESY-HSQCスペクトルの測定を行い、メチル基間のNOE情報の収集を行っている。

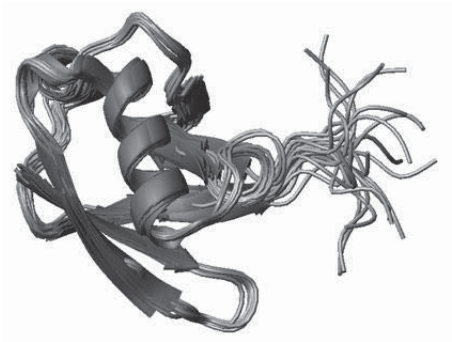


Fig. 2 Ubiquitin structure determined by automated NMR analysis system MagRO-FLYA.

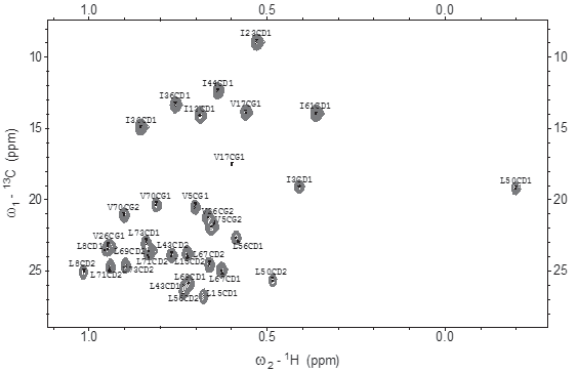


Fig. 3 ^{1}H-^{13}C HSQC spectrum of ILV-methyl labeled Ubiquitin.

References

1) Tugarinov et al., PNAS, 2005, 102, 622-627

2) 小林直宏ら, 第53回NMR討論会要旨集, 2014, P85, pp.364-365

3) Tugarinov el al., J. Am. Chem. Soc. 2003, 125, 13868-13878

P10

NMRによるR型レクチン改変体とシアル酸糖鎖との分子間相互作用解析

○逸見　光[1]，久野　敦[2]，平林　淳[2]
[1]農研機構・食品研究部門
[2]産総研・創薬基盤研究部門

NMR analysis of the interaction between a novel sialic acid-binding lectin mutant from the C-terminal domain of an R-type lectin and sialyllactose

○Hikaru Hemmi[1], Atsushi Kuno[2], and Jun Hirabayashi[2]
[1] *Food Research Institute, NARO.*
[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 have been determined. Recently, we reported that the binding mechanism of SRC with 6'-sialyllactose in solution state may be different from that in the crystal state because of observing two sets of NMR signals for some residues only in the 6'-sialyllactose-bound state. In this study, we performed ZZ-exchange experiments. The ZZ-exchange spectrum indicated that SRC in the 6'-sialyllactose-bound state had two conformations being chemical exchanged in a millisecond time scale. We also measured ^{1}H-^{15}N HSQC spectrum of SRC in the mixture of SRC and 3'-sialyllactose. The chemical shifts of NMR signals of SRC in the spectrum did not change upon addition of 3'-sialyllactose, indicating that SRC does not bind to 3'-sialyllactose.

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ことから、ラクトース結合状態に加え、遊離状態及びシアル酸糖鎖（6’-sialyllactose）結合状態でのSRCについて、ダブルラベル体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

レクチン，シアル酸糖鎖、分子進化工学

○へんみひかる，くのあつし，ひらばやしじゅん

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との比較を行い、１）結晶状態におけるSRCの6’ー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（糖結合に関係する残基に対して同時に２つのシグナルが観測されるため）、２）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を報告した[4]。本研究では、6’ーシアリルラクトースとの結合のみ同時に観測される同一残基の２つのシグナルの交換速度をZZ交換法により算出し、さらに、3’ーシアリルラクトース添加によるSRCのケミカルシフト変化を解析した結果についても報告する。

方法

大腸菌発現系を用いて^{15}N-, ^{13}C-SRCを発現した後、野性体EW29Chに比べ不安定であることから、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、遊離状態でも安定な^{15}N, ^{13}Cラベル体SRCを調製した。6’-シアリルラクトースおよび3’-シアリルラクトースを添加したSRCをそれぞれ調製し、Avance600MHz（Bruker）により、15℃で、^{1}H-^{15}N HSQCスペクトルやZZ交換測定を行った。

結果および考察

6’-シアリルラクトース結合状態でのSRCで、糖との結合に関係する残基において^{1}H-^{15}N HSQCスペクトルで同時に同一残基に観測される２つのNMRシグナルに対して、ZZ交換測定により交差ピークが観測されたことから、これらのシグナルが同一残基由来のシグナルであることが確認された。さらに、混合時間を変えて測定し、その交換速度を算出した。その結果、SRCは6’-シアリルラクトース結合状態で、ミリ秒オーダーで化学交換する２つのコンフォメーションを持つことが分かった。次に、3’-シアリルラクトースを添加したSRCの^{1}H-^{15}N HSQCスペクトルを測定し、遊離状態でのSRCの^{1}H-^{15}N HSQCスペクトルと比較した結果、NMRシグナルの変化が見られなかった。簡単なモデル実験として、SRC－6’-シアリルラクトース複合体結晶構造のラクトース残基と3’-シアリルラクトースのラクトース残基を重ね合わせSRC－3’-シアリルラクトース複合体のモデル構造を作製した結果、3’-シアリルラクトースのシアル酸残基がSRCとの結合で立体障害を起こすことが分かった。これらの結果から、3’-シアリルラクトースはラクトースとシアル酸がα2－3結合していることから、このシアル酸残基がSRCと立体障害を起こし、SRCと結合しないことが分かった。さらに、糖鎖側からのSRCとシアリルラクトースとの相互作用解析として、SRCに過剰量の6’-シアリルラクトースを添加したサンプルを用いて、STD-HSQCスペクトルを測定した結果、シアル酸残基がSRC－6’-シアリルラクトース複合体結晶構造でのシアル残基のSRCとの相互作用に比べ、SRCとより密接に相互作用していることも分かった[4]。

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.
4) Hemmi, H., Kuno, A., Unno, S., and Hirabayashi, J. (2016) FEBS Lett. 590, 1720-1728.

［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。

P11

ヘムと四重鎖DNAの複合体の構造解析

○越智健太郎[1]，柴田友和[1]，逸見光[2]，萩原正規[3]，山本泰彦[1]
[1]筑波大学・大学院・数理物質科学研究科
[2]農研機構・食品部門
[3]弘前大学・大学院・理工学研究科

Structural characterization of a complex between heme and G-quadruplex DNA formed from d(GGG(TGGG)$_3$)

○Kentaro Ochi[1], Tomokazu Shibata[1], Hikaru Hemmi[2], Masaki Hagihara[3], and Yasuhiko Yamamoto[1]
[1] *Department of Chemistry, University of Tsukuba*
[2] *Food Research Institute, NARO*
[3] *Graduate School of Science and Technology, Hirosaki University*

Heme has been shown to bind to G-quadruplex DNA formed from d(GGG(TGGG)$_3$) through a π-π stacking interaction between the porphyrin moiety of the heme and one of the G-quartets of the DNA in a manner similar to the binding of heme to the 3'-terminal G-quartet of all parallel G-quadruplex DNA formed from d(TTAGGG). Thus the preferential binding of heme to a G-quartet was not affected by the DNA conformation. This finding provides novel insights as to the design of the molecular architecture of a heme-DNA complex.

序論　ヘム(Fig. 1左)と四重鎖DNAの相互作用の研究が注目されている[1)]。ヒト染色体末端のテロメア部位に存在する繰り返し塩基配列d(TTAGGG)$_n$は、4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右)の形成を通して、四重鎖DNAを形成する[2)]。d(TTAGGG)$_n$では、$n = 4$の24塩基で３つのGカルテットを含む四重鎖DNAが形成されることになる。なお、d(TTAGGG)$_n$の類似塩基配列が形成する四重鎖DNAの安定性の比較研究から、d(GGG(TGGG)$_3$)の15merが形成する四重鎖DNA(Fig. 2)の安定性が著しく高いことが報告されている[3)]。そこで、本研究では、テロメア部位で形成される四重鎖DNAのモデルとして、d(GGG(TGGG)$_3$)の四重鎖DNAとヘムの相互作用を解析した。そして、d(TTAGGG) 4分子が会合して生じる平行型四重鎖DNA (d(TTAGGG))$_4$ (Fig. 3A)とヘムの相互作用[4)]との比較を通して、四重鎖DNAに対するヘムの分子認識に関する知見を得た。

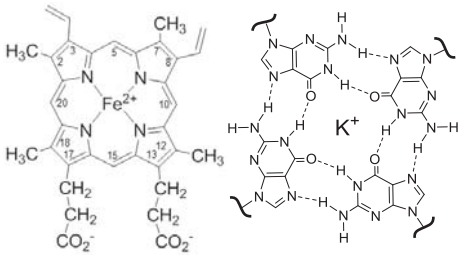


Fig.1. Structures of heme (left) and G-quartet (right).

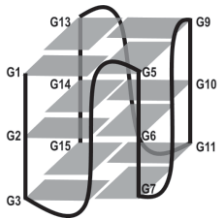


Fig.2. Structure of G-quadruplex DNA formed from d(GGG(TGGG)$_3$).

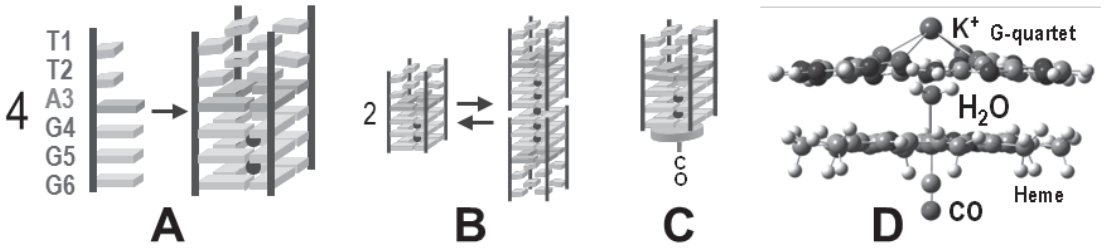


Fig. 3. Formation of G-quadruplex DNA from d(TTAGGG), (d(TTAGGG))$_4$, (A), its dimerization (B), structure of carbon monoxide (CO) adduct ofa heme-(d(TTAGGG))$_4$ complex (C), and its heme coordination structure(D).

ヘム，四重鎖DNA，機能性核酸

○おちけんたろう，しばたともかず，へんみひかる，はぎはらまさき，やまもとやすひこ

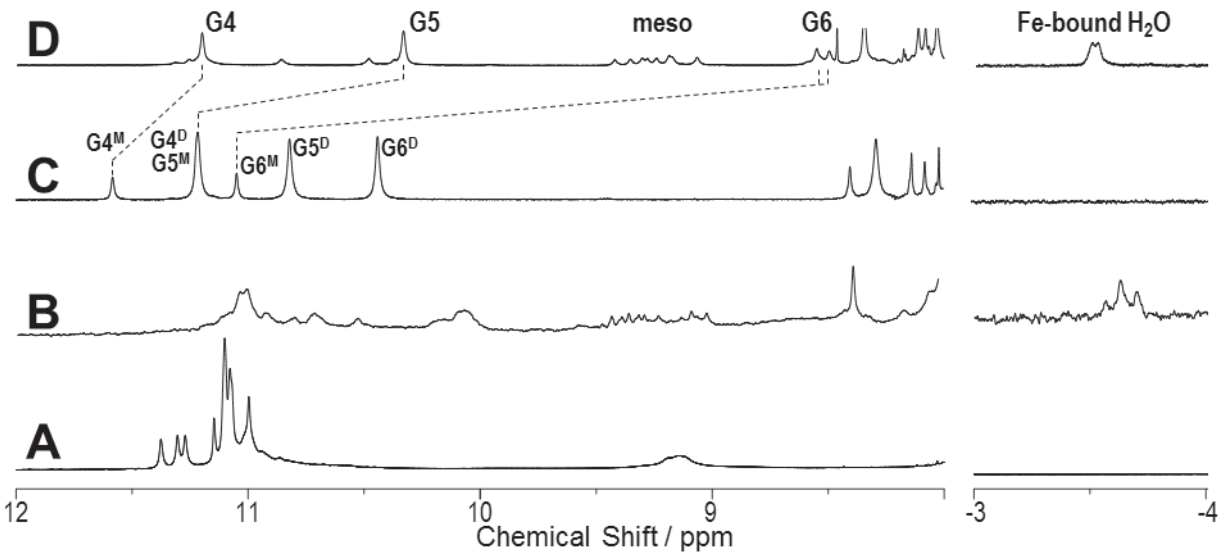


Fig. 4. Down- and upfield-shifted portions of ^{1}H NMR spectra of d(GGG(TGGG)$_3$) (A), CO adduct of heme-d(GGG(TGGG)$_3$) complex (B), (d(TTAGGG))$_4$ (C), and CO adduct of heme-(d(TTAGGG))$_4$ complex (D) in 90% H_2O/10% D_2O, 50 mM KCl, 50 mM potassium phosphate buffer at pH 7.0 and 25 ºC. Signal assignments are shown with the spectra. Y-gain of the shift range, −3 - −4 ppm, is expanded by a factor of 4 relative to that of the downfield-shifted one. Gn^M and Gn^D, where n = 4, 5, or 6, represent the monomer and dimer, respectively (see Fig 3B).

結果・考察　d(GGG(TGGG)$_3$)の四重鎖DNAの^{1}H NMRスペクトルでは、Gカルテットの形成に関与するイミノNHプロトンに由来するシグナルが観測される領域10-12 ppmに、プロトン12個分の強度のシグナルが観測された(Fig. 4A)。d(GGG(TGGG)$_3$)の四重鎖DNAにヘムを添加した後、一酸化炭素(CO)を吹き込んで$Na_2S_2O_4$で還元した試料で得られたスペクトルでは、四重鎖DNAのシグナルに加えて、ヘムが結合した複合体に由来すると考えられるシグナルが観測された(Fig. 4B)。ここで、d(GGG(TGGG)$_3$)の四重鎖DNAは、G1, G5, G9, G13が形成するGカルテットが分子間でπ-πスタッキングして二量体を形成することが知られているので[5)]、複合体でヘムはG3, G7, G11, G15が形成するGカルテットに結合すると推測される（後述）。

(d(TTAGGG))$_4$の場合は、立体構造がC_4対称であるので、G4、G5、G6 Gカルテットそれぞれのイミノ NHプロトンに由来するシグナルが１つずつ観測される。ただし、(d(TTAGGG))$_4$はG6 Gカルテットが分子間でπ-πスタッキングして二量化するので(Fig. 3B)、単量体と二量体のシグナル二組が混在している(Fig. 4C)。ヘムは(d(TTAGGG))$_4$のG6 Gカルテットに結合するので(Fig. 3C)、ヘムのポルフィリン環の環電流効果によるG4、G5、G6イミノNHプロトンシグナルの高磁場シフトの大きさは、G4＜G5＜G6となる。また、約−3.5 ppmのシグナルは、NOE相関や$H_2{}^{18}O$の同位体効果の観測から、複合体のヘム鉄に結合する水分子に由来すると帰属された(Fig. 3D)[4)]。

ヘム-(d(TTAGGG))$_4$複合体に関する知見は、ヘムとd(GGG(TGGG)$_3$)の相互作用の解析にも有用である。Fig. 4Bでも、ヘムのmesoプロトン(Fig. 1Aの5、10、15、20-プロトン)に由来すると考えられるシグナルが9.0 - 9.5 ppmに観測されること、ヘム鉄に結合した水分子に由来すると考えられるシグナルが~-3.7 ppmに観測されること、そしてこの~-3.7 ppmのシグナルがヘムと相互作用する(d(TTAGGG))$_4$のG6 Gカルテットのイミノ NHプロトンシグナルが観測される~8.5 ppmのシグナルとの間でNOE相関が観測されること（結果未記載）から、ヘムは、d(GGG(TGGG)$_3$)のGカルテットと、ヘム-(d(TTAGGG))$_4$複合体におけるG6 Gカルテットへの結合と同様に相互作用することが推測される。

Reference (1) D. Sen and L. C. Poon, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, ***46***, 478-492 (2011). (2) G. Biffi *et al.*, *Nature Chem.*, ***5***, 182-186 (2013). (3) A. Guédin *et al.*, *Nucleic Acids Res.,* ***38***, 7858-7868 (2010). (4)Y. Yamamoto *et al.*, *Biochemistry*, ***54***, 7168-7177 (2015). (5)V. Kuryavyi *et al.*, *Structure*, ***20***, 2090-2102 (2012).

P12

TRAF6の二量体形成機構のNMR解析

○上田和也[1]，栃尾尚哉[2]，楯真一[1,2]
[1]広島大学・大学院・理学研究科
[2]広島大学・クロマチン動態数理研究拠点(RcMcD)

NMR analysis for the dimerization mechanism of TRAF6

○Kazuya Ueda[1], Naoya Tochio[2], Shin-ichi Tate[1,2]
[1] *Department of Mathematical and Life Sciences, Graduate School of Science, Hiroshima University*
[2] *Research Center for the Mathematics on Chromatin Live Dynamics (RcMcD), Hiroshima University*

Tumor necrosis factor Receptor Associated Factor-6 (TRAF6) is a K63-polyubiquitin E3 ligase involved in the activation of NFκB. TRAF6 is composed of the N-terminal RING domain and four zinc fingers, and the C-terminal TRAF-C domain. Polyubiquitination is mediated by the N-terminal region; the RING domain and the 1st zinc finger (ZF1) are required for the interaction with ubiquitin conjugation enzyme (E2) and polyubiquitination-activity. In addition, the dimerization of the TRAF6-N-terminal region is known to be crucial for polyubiquitination-activity. Although the TRAF6-dimerization requires not only the RING domain but also ZF1, ZF1 is not involved in the dimer-interface. Instead, the linker between the RING domain and ZF1 adopts the helical structure and forms the dimer-interface together with the RING domain. However, the mechanism for the formation of the linker-helix and the resultant dimer-formation are still unclear. In fact, the construct for the RING domain and the linker region without ZF1 did not show the linker-helix formation and the resultant dimer formation anymore.

Here, we prepared the isolated RING domain, the RING and ZF1 region, and the RING and ZF1-3 region-constructs, and performed the size exclusion chromatography, dynamic light scattering, chemical cross-linking, and NMR experiments using these constructs. Our results suggested that the isolated RING domain even showed the weak dimerization-ability and the attachment of ZF1 enhanced the dimerization-ability accompanied with the formation of the linker-helix in solution.

Tumor necrosis factor Receptor Associated Factor-6 (TRAF6)は，K63型ユビキチンE3リガーゼであり，NFκBの活性化シグナル伝達において，自己を基質としてユビキチン化し，シグナル伝達の引き金となることが知られている．TRAF6はN末端のRINGドメイン，4つのZinc fingerドメインと，C末端側のCoiled coilドメインを含むTRAF-Cドメインからなる．E3リガーゼ活性はN末端領域が担っており，ユビキチン結合酵素E2との結合ならびにポリユビキチン化活性にはRINGドメインと1番目のZinc finger (ZF1)が必須である．さらにポリユビキチン化活性にはN末端領域の二量体化が不可欠であり，N末端領域のホモ二量体結晶構造が報告されている[1](Fig. 1)．一方で，NMRを用いたTRAF6-RINGドメインの構造解析および^{15}N核緩和解析の結果は, RINGドメイン単体は単量体であることを示した[2]．結晶構造が示す通り(Fig. 1)，ZF1は二量体相互作用面形成に直接関与しておらず, RINGドメインとZF1をつなぐリンカー領域がヘリックスを形成することでRINGドメインと共に二量体相互作用面を形成している．しかしながら，RINGドメインとリンカーのみの領域では，リンカーはヘリックス構造をとらず，二量体は形成されない(PDBID: 2ECI).

本研究では，RINGドメイン単体(R)，RとZF1からなる領域(RZ_1)，RとZF1-3からなる領域(RZ_{123})

腫瘍壊死因子受容体関連因子-6(TRAF6) ，二量体形成，リンカーヘリックス

○うえだかずや，とちおなおや，たてしんいち

を調製し，サイズ排除クロマトグラフィー，動的光散乱，Bis(sulfosuccinimidyl)suberate (BS^3)を用いた化学架橋，NMRを用いて解析を進めている．解析の結果，リンカーを含まないRINGドメイン単体も二量体化能を示したが, ZF1が存在することで二量体形成が強く促進されることが分かった．さらにRINGとZF1をつなぐリンカーは溶液中においてもヘリックスを形成することを明らかにした．

TRAF6-N末端側領域の二量体化形成を担うリンカーヘリックスの形成に焦点をあて，リンカーヘリックス形成過程と二量体化形成過程について議論する．

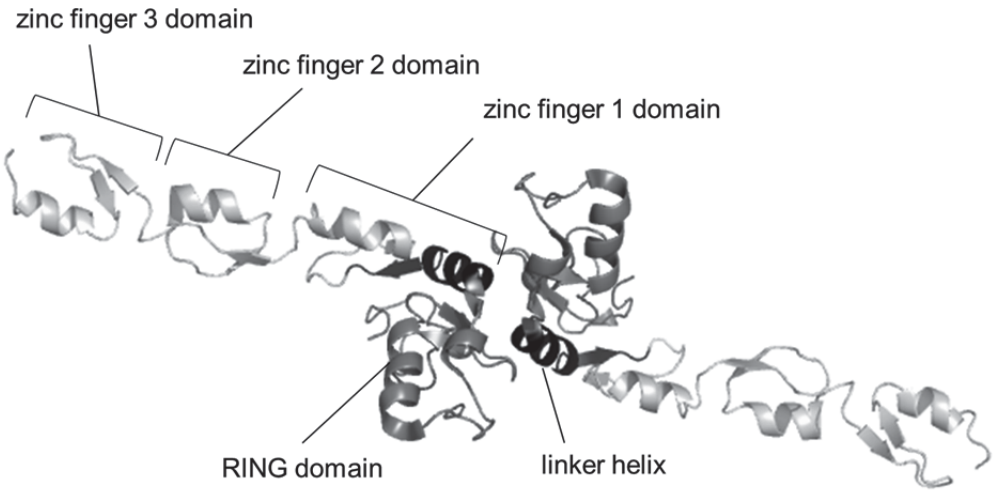


Fig. 1, Dimeric structure of TRAF6 $RZ_{1\text{-}3}$.
The RING domain, Zinc fingers, and the linker helix are shown as light gray, dark gray, and black, respectively. (PDBID: 3HCS).

References

(1) Yin, Q., et al., (2009) E2 interaction and dimerization in the crystal structure of TRAF6. *Nat. Struct. Mol. Biol. 16*, 658–667.

(2) Mercier, P., et al., .(2007) Structure, interactions, and dynamics of the RING domain from human TRAF6. *Protein Sci. 16*, 602-614.

P13

拡張moel-free解析法による
分子混雑環境下の蛋白質ダイナミクス解析

○岡村英保[1,7]，栃尾尚哉[2]，杉山修世[1,2]，伊東優拡[1]，渡部暁[1,2]，ワン ポーハン[3]，優乙石[3]，フェイグ マイケル[1,4]，杉田有治[1,3,5,7]，木川隆則[1,2,6,7]
[1]理化学研究所 生命システム研究センター，[2]理化学研究所 生命分子システム基盤研究領域，[3]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　情報理工学院，[7]CREST/JST

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

○Hideyasu Okamura[1,7], Naoya Tochio[2], Shusei Sugiyama[1,2], Masahiro Ito[1], Satoru Watanabe[1,2], Wang Po-Hung[3], Isseki Yu[3], Michael Feig[1,4], Yuji Sugita[1,3,5], Takanori Kigawa[1,2,6,7]
[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]School of Computing, Tokyo Institute of Technology, [7]CREST/JST

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 extended the conventional model-free formalism to be applicable to dual-mode overall rotational diffusion. This extension explain the NMR relaxation data obtained under macromolecular crowding environment in a straightforward way. Currently, by using the extended model-free analysis, we are studying protein dynamics under macromolecular crowding environment. Moreover, to explore the physical basis of the extended model-free formalism, we are examining the effects of mutations that modify protein surface electrostatic property and/or the effects of salt addition.

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、この方法のもつ物理的な意義などを調べている。

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，わん ぽーはん，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解析法は、分子全体の回転拡散運動が複数のモード（複数の相関時間）で成り立っている系を扱える（従来法は分子全体の回転拡散運動は単一モードと想定されている）。我々の拡張model-free解析法をVillinに適用した結果、~1 mM (4 mg/ml)以上の蛋白質濃度での蛋白質分子の回転拡散運動は共通して、希薄溶液環境下での回転拡散運動とほぼ同じ相関時間を持つ「速い回転拡散運動」と、蛋白質濃度の上昇に応じてより遅くなる「遅い回転拡散運動」との2つのモードの重ね合わせとして表現されることがわかった。そして、蛋白質濃度が上昇するにつれて、速い回転拡散運動の割合は減少し、遅い回転拡散運動の割合が増加することがわかった。希薄溶液環境下で既に存在する速い回転拡散運動はいわゆるブラウン運動に由来するものだと想定される。それに対して、蛋白質濃度の上昇に伴って、立ち上がってくる遅い回転拡散運動は何らかの蛋白質-蛋白質間相互作用が関係するものと考えられるが、その実体は必ずしも明らかではなかった。

そこで、我々は、2つのモードの回転拡散運動を始めとした、拡張model-free解析法から得られる運動パラメーターの意義を調べるために、Villin 0.1 - 32 mM解析結果を詳細に検証すると共に、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、また、NaClを添加、もしくは、塩の種類を変更するなどして、それぞれの^{15}N NMR緩和パラメーターを取得し、拡張model-free解析を行って、それらの影響を調べた。これらの結果から、分子混雑環境下では、各々の蛋白質のブラウン運動（ランダム運動）が互いに、周囲の水を介して流体力学的な干渉をすることによって、2つのモードの回転拡散運動が生じてくると解釈できることがわかった。

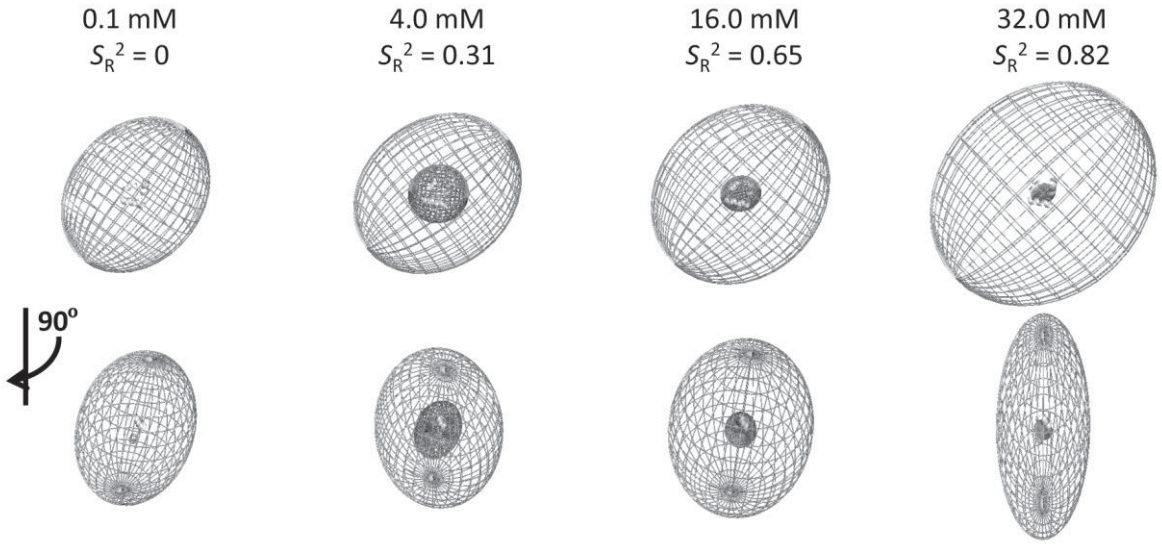


Fig.1. The rotational diffusion of Villin 0.1 – 32.0 mM obtained from the extended model-free analysis for highly concentrated systems. Ellipsoids represent the magnitudes and anisotropies of the rotational diffusion. S_R^2 is the abundance ratio of the slow mode rotational diffusion represented as a smaller ellipsoid. Except for the 0.1 mM Villin condition, rotational diffusion is divided into two modes.

P14

NMRを用いた脂質二重膜中における1回膜貫通型タンパク質C99の構造解析

○真嶋健大[1]，坂倉正義[1]，藤井萌[1]，三尾和弘[1,2]，Charles R. Sanders[3]，高橋栄夫[1]
[1]横浜市立大学・大学院・生命医科学研究科 [2]産業技術総合研究所
[3]Department of Biochemistry and Center for Structural Biology, Vanderbilt University School of Medicine

NMR study of a single transmembrane protein C99 in lipid bilayers

○Takehiro Mashima[1], Masayoshi Sakakura[1], Moe Fujii[1], Kazuhiro Mio[1,2], Charles R. Sanders[3], and Hideo Takahashi[1]
[1] *Graduate School of Medical Life Science, Yokohama City University*
[2] *National Institute of Advanced Industrial Science and Technology*
[3] *Department of Biochemistry and Center for Structural Biology, Vanderbilt University School of Medicine*

C99 is a single-span transmembrane protein and is cleaved by γ-secretase to produce amyloid β peptides (Aβs), such as Aβ40 or Aβ42. Aβ42 is more pathogenic than Aβ40 and membrane lipid composition has been shown to influence the Aβ42/Aβ40 production ratio. To reveal the molecular basis for this phenomenon, we analyzed C99 in different lipid bilayers by utilizing the nanolipoprotein particles (NLPs) and solution NMR spectroscopy. The main chain NHs of the transmembrane helix (TMH) of C99 did not provide detectable signals in NLPs, while the TMH signals were observed for the mutant that lacks C-terminal intracellular region (C99-del). The chemical shifts of the TMH signals were almost identical in different lipids (DMPC/DMPG = 4/1 and POPC/POPG = 4/1), however, the linewidths of the signals were different below 33 °C. These observations suggest that conformational dynamics exist for C99-TMH and they are influenced by the surrounding lipids well as C-terminal intracellular region of C99.

【背景】

一回膜貫通型タンパク質である C99 は、アルツハイマー病原因遺伝子産物である amyloid precursor protein (APP)の β-secretase 切断産物であり、γ-secretase によるさらなる切断を受けて、主として 40 残基のアミノ酸からなる Aβ40、または 42 残基のアミノ酸からなる Aβ42 へと変換される。Aβ42 は Aβ40 と比較して凝集性が高く、アルツハイマー病を引き起こしやすいと考えられている。Aβ42 と Aβ40 の生成比に影響を与える要因の一つとして、細胞膜の脂質組成が挙げられる。脂質組成の変化に伴って膜の厚さや流動性が変化し、C99 の膜貫通ヘリックス（TMH）の構造が変化すると考えられるが、その詳細なメカニズムは明らかにされていない。そこで本研究においては、脂質組成の違いが C99 の構造や運動性に与える影響を原子レベルにおいて明らかにすることを目的として、脂質二重膜を可溶性粒子として取り扱うことが可能なナノリポプロテイン粒子（nanolipoprotein particle ; NLP）中に可溶化したC99について、溶液NMR法を用いた性状解析を行った。

membrane protein, NLP, C99

○ましまたけひろ，さかくらまさよし，ふじいもえ，みおかずひろ，チャールズサンダース，たかはしひでお

【方法】

大腸菌を用いて、^{2}H, ^{15}N均一標識、またはMet-^{13}C$_{\varepsilon}$標識を行ったC99（C99-full）、およびC99の細胞内領域欠損体（C99-del）を発現させた。Ni^{2+}アフィニティークロマトグラフィーにより界面活性剤ミセル中に可溶化した状態で精製したC99を、界面活性剤で可溶化した混合脂質（DMPC/DMPG = 4/1, POPC/POPG = 4/1）、Membrane Scaffold Protein（MSP1D1）とともに混合し、透析によって界面活性剤を除去することにより、自発的にNLPを形成させた。Ni^{2+}アフィニティークロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィーによってC99が組み込まれたNLP（C99/NLP）を精製し、NMR解析用サンプルとした。

【結果と考察】

まず、[^{2}H, ^{15}N] C99-full/NLP について、^{1}H-^{15}N CRINEPT-HMQC スペクトルを測定した。この結果、TMH 上に存在する残基に由来するシグナルが観測されなかった（Fig. 1a）。一方、[Met-^{13}C$_{\varepsilon}$] C99-full/NLP について、^{1}H-^{13}C HSQC スペクトルを測定した結果、C 末端細胞内領域に存在する M768 由来シグナルについて、広幅化が観測された。これらの結果から、C99 の細胞内領域が、TMH のアミド基由来シグナルの広幅化を誘起している可能性があると考え、細胞内領域の欠損体（C99-del）について ^{2}H, ^{15}N 標識体を調製し、NLP 中で ^{1}H-^{15}N CRINEPT-HMQC スペクトルを測定した。この結果、C99-full においては観測されなかった TMH 上の残基に由来するシグナルが観測された（Fig. 1b）。C99 の細胞内領域が、TMH と MSP1 の非特異的な相互作用を促進し、TMH 由来シグナルの広幅化を誘起した可能性が考えられる。

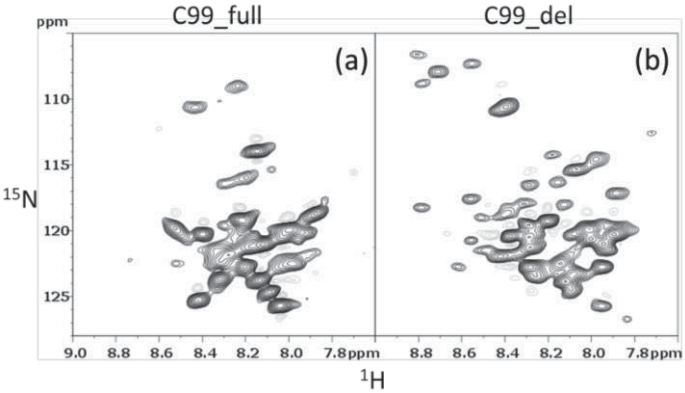


Fig. 1 ^{1}H-^{15}N CRINEPT-HMQC spectra of [^{2}H, ^{15}N] C99-full (a) and C99-del (b) in DMPC/DMPG-NLPs.

次に、脂質の変化に伴う TMH の構造状態の変化を解析するため、異なる脂質を用いて調製した C99-del/NLP について、^{1}H-^{15}N CRINEPT-HMQC スペクトルを測定した（Fig. 2）。DMPC/DMPG と POPC/POPG 中において、TMH 由来シグナルの化学シフトは、ほとんど同一であった。一方、TMH 由来シグナルの温度依存性を解析した結果、DMPC/DMPG 中においては、温度低下に伴うシグナルの広幅化が観測され、20 ℃ においてはシグナルが消失した。一方、POPC/POPG 中においては、線幅の変化が DMPC/DMPG 中と比較して小さく、20 ℃ においてもシグナルが観測された。温度低下に伴う TMH 由来シグナルの広幅化は、膜の流動性の低下に伴う TMH の運動性の低下に由来すると考えられ、TMH の周囲に存在する脂質の運動性が、C99 の TMH の運動性に影響を与えることが示唆された。

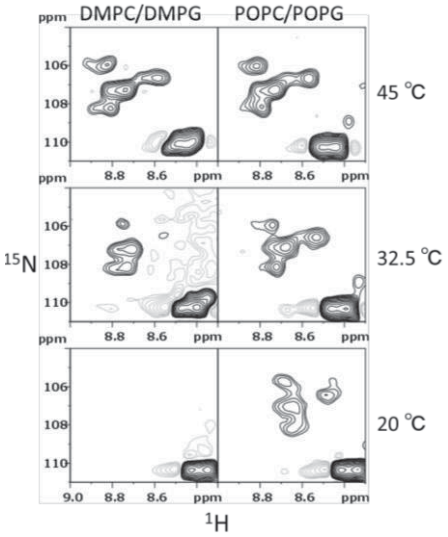


Fig. 2 ^{1}H-^{15}N CRINEPT-HMQC spectra of [^{2}H, ^{15}N] C99-del in DMPC/DMPG-NLPs, POPC/POPG-NLPs at 3 different temperatures.

P15

放線菌の接合伝達タンパク質TraBの構造研究

○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 study of the DNA translocase of Streptomyces, TraB

○Teppei Kanaba[1,2], Hirotaka Ueno[2], Ryoko Maesaki[1], Yutaka Ito[2], Masakazu 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 nigrifaciens* transfers DNA in a unique process involving a single plasmid-encoded protein TraB and a plasmid, pSN22. TraB is a multi-domain protein that consists of an N-terminal FtsK-like ATPase domain and a 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 performed the structural analysis of the TraB ATPase domain and the C-terminal DNA binding domain (TraB-C). Ultimate our goal is to determine the full length structure of TraB, and understand how TraB incorporates DNA as a molecular motor.

序論

接合伝達は細胞膜上に位置するタンパク質群により，プラスミドのような巨大DNAが細菌間で輸送される現象である．*Streptomyces nigrifaciens*のプラスミド，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している(1)．TraBはN末端のFtsK-like ATPaseドメインと，C末端のDNA結合ドメイン(TraB-C)から構成されるマルチドメインタンパク質である．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，ATP駆動的にプラスミドを伝達すると考えられている(2)．しかしその詳細な分子機構は未だ明らかにされていない部分が多い．本研究はTraBによる接合伝達の分子機構を明らかにすることを目的とし，TraBのATPaseドメインとTraB-Cの構造解析を行った．現在までに我々はTraB-Cの溶液構造を決定しており，TraB-Cはwinged helix-turn-helix(wHTH)型の構造であることを明らかにしている(Fig.1)．本研究ではTraB-Cと二本鎖DNAとの結合実験を行い，その相互作用に関する知見を得たため，それを報告する．

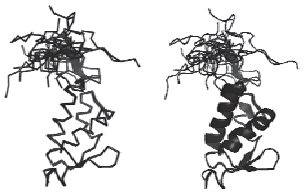


Fig.1 Solution structure of the TraB-C

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

TraB の ATPase ドメイン(123-538, 416 残基)と TraB-C(564-652, 89 残基)の発現系を作成し, NMR 測定を行った．TraB-C は二本鎖 DNA 中の CGCACA 配列(TraB recognition sequence，TRS)の 繰り返しモチーフを認識して結合することが報告されている[(1)]．本研究では TRS のシングルリピート配列(GCCCGCACAGC，TRS1)とダブルリピート配列(CCTCGCACACCGTGCGCACAGC，TRS2)の二種類の二本鎖 DNA と，TraB-C の結合実験を行った．

結果

1. TraB の ATPase ドメインの NMR 測定

TraB の ATPase ドメインの ^{1}H-^{15}N TROSY の測定を行った(Fig.2). ATPase ドメインの NMR シグナルは比較的シャープな線形を示しており，これは ATPase ドメインが六量体を形成していないことを示唆している．TraB による接合伝達機構の解析のためにはコンストラクトや測定条件の最適化が必要である．

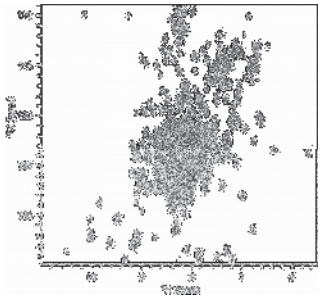


Fig.2 TROSY spectrum of the TraB ATPase domain

2. TraB-C と DNA の相互作用解析

既に報告されている wHTH モチーフと DNA の複合体の複合体構造のいくつかにおいて，wHTH モチーフは二価の金属イオンをキレートした状態で DNA と結合している[(3)]. 本研究でも Mg^{2+}イオン非共存下，共存下において DNA との結合実験を行い，TraB-C は Mg^{2+}共存下においてのみ DNA と相互作用をすることを明らかにした．また TRS1 と TRS2 を用いて TraB-C との結合実験を行った．TRS1 を用いた結合実験での NMR スペクトルは fast-exchange での変化を示したが，一部のピークにおいては著しいシグナルのブロードニングが観測された(Fig.3)．一方、TRS2 を用いた結合実験は intermediate から slow exchange のスペクトル変化となった．これは TRS1 に比べ TRS2 の方が TraB-C への結合が強いことを示しており，過去の知見と一致している．

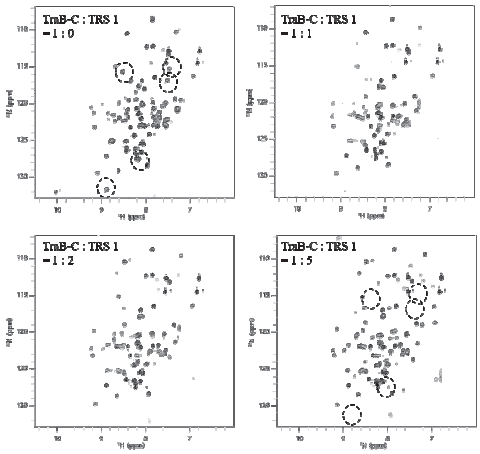


Fig.3 Titration experiments with TRS1
Extreme line broadening signals are indicated by dot circles.

考察

TRS1 を用いた結合実験において，シグナルのブロードニングが観測されたアミノ酸残基は，DNA との複合体形成においてより重要であると予想される．それらアミノ酸残基を TraB-C の溶液構造にマッピングを行ったところ, helix-3 に集中していることが分かった(Fig.4). wHTH モチーフは一般に helix-3 により DNA と相互作用することが知られており，TraB-C もこの領域で DNA と結合していると考えられる．

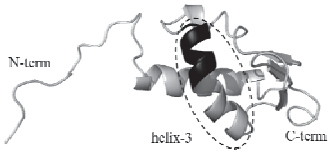


Fig.4 Mapping the affected residues for the TraB-C structure
Line-broadened residues are colored black. Helix-3 is indicated by dot circle.

【謝辞】
本研究におけるNMR測定は，文部科学省先端研究基盤共用促進事業「NMR 共用プラットフォーム」(理研横浜)を利用しました．

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　(3) Clark, KL. et al., *Nature* (1993) 364, 412-420

P16

酵母 *Pichia pastoris* 発現系を用いて調製した安定同位体標識ヒト膜タンパク質の NMR 解析

○坂倉正義，鈴木里佳，森雅樹，藤井萌，高橋栄夫
横浜市立大学・大学院・生命医科学研究科

NMR analyses of human membrane proteins produced by the yeast *Pichia pastoris* expression system

○Masayoshi Sakakura, Rika Suzuki, Masaki Mori, Moe Fujii, and Hideo Takahashi
Graduate School of Medical Life Science, Yokohama City University

Methyl-detected NMR spectroscopy is a useful tool to investigate the structure and interaction of membrane proteins. Cost efficient methyl-selective isotope labeling strategies using metabolic precursors of Ile, Leu, and Val (ILV) have been developed for the *E. coli* expression system, while they are not readily applicable to the yeast *Pichia pastoris* expression system that has advantages to express mammalian membrane proteins. To overcome this difficulty, we explored various culture conditions with which yeast cells can efficiently utilize ILV precursors, and found that the cultivation pH exerts a critical impact on the ILV precursor uptake. At an acidic pH, the uptake of the precursors was increased, and the synthesized recombinant protein provided intense ^{1}H-^{13}C correlation signals from its ILV methyl groups. Based on these results we present an optimized protocol for the methyl-selective ^{13}C incorporation by the *P. pastoris* expression system and an application of this approach to a human membrane protein.

NMR を用いた膜タンパク質の機能解析においては、線幅が狭く、測定感度が高いメチル基が、観測対象基として有用となる。タンパク質中のメチル基を高感度かつ選択的に観測するためには、メチル基を (^{1}H)-^{13}C 標識し、同時に他の非交換性プロトンを重水素標識したタンパク質試料の調製が有効であり、大腸菌発現系を用いる場合には、アミノ酸の代謝前駆体を利用することにより、低コストでメチル基選択的 ^{13}C 標識を導入する手法が確立されている[1]。しかし、大腸菌発現系を用いてヒト膜タンパク質を発現させた場合、生合成されたタンパク質の多くが菌体内の不溶性画分に蓄積することが知られており、ヒト膜タンパク質のリコンビナント発現系としての利用は限定的である。一方、メタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* (*P. pastoris*) 発現系は、GPCR、イオンチャネル、トランスポーターなどの膜タンパク質の発現例が多く報告されており、ヒト膜タンパク質のリコンビナント発現系として有用性が高いと考えられている。しかし、本発現系については、メチル基選択的 ^{13}C 標識に関する知見が乏しく、唯一の報告例においても、代謝前駆体を利用したメチル基選択的 ^{13}C 標識（特に Leu/Val 標識）の効率が低いと報告されている[2]。そこで本研究においては、NMR を用いて膜タンパク質を解析するために必要となる、汎用性の高い安定同位体標識膜タンパク質試料調製手法を確立することを目的として、*P. pastoris* 発現系を用いたメチル基選択的 ^{13}C 標識試料調製手法の探索・最適化を行った。

P. pastoris 発現系を用いたリコンビナントタンパク質の安定同位体標識条件を探索するため、β-lactoglobulin (β-LG) をモデルタンパク質として、検討を行った。

まず、Met および Ile に着目し、標識化合物添加量の最適化を行った。Met 残基のメチル基選択的標識においては ^{13}C$_{\varepsilon}$ 標識 Met を、Ile 残基のメチル基選択的標識においては、Ile の代謝前

膜タンパク質，酵母発現系

○さかくらまさよし，すずきりか，もりまさき，ふじいもえ，たかはしひでお

駆体である 4-^{13}C 標識 α-ketobutyrate を用いた。これらの標識化合物を、それぞれ 50~200 mg/L の割合で添加した最小培地を用いて酵母の培養を行い、得られた β-LG について、添加した標識化合物量の変化に伴うメチル基由来シグナルの強度変化を解析した。この結果、Met については、標識 Met を 100 mg/L 以上添加してもシグナル強度がほとんど変化しないこと、Ile については、α-ketobutyrate の濃度増加に伴ってシグナル強度が単調増加することが明らかとなった。

次に、Leu および Val への標識導入について検討を行った。Leu/Val の共通の代謝前駆体である 4-^{13}C 標識 α-ketoisovalerate (KIV) を添加した最小培地を用いて、通常の条件で酵母の培養を行ったところ、先行研究[2]と同様に、^{13}C 標識率の低い β-LG が得られた。この標識率の低さが、酵母細胞への KIV の取り込み率の低さに起因していると考え、培養液中の KIV 濃度の経時変化を解析した。pH を 6 と 7 に設定した培地を用いてそれぞれ培養を行ったところ、培養開始時の pH が 7 の場合、培養液の pH が約 6 まで低下し、培地中の KIV の濃度はほとんど変化しなかった。一方、培養開始時の pH が 6 の場合、培養液の pH が約 3 に低下するとともに、KIV 濃度の減少が観測された。それぞれの培養から得た β-LG について ^{1}H-^{13}C 相関スペクトルの測定を行ったところ、pH 7 の培養から得た β-LG については、Leu/Val のメチル基由来シグナルの強度が弱く、非標識体と同程度であったが、pH 6 の培養により得た β-LG については、Leu/Val のメチル基に由来すると考えられる強いシグナルが観測された（Fig. 1）。細胞内への有機酸の取り込みには各種トランスポーターが関与し、pH に依存する場合があることが知られているが、本アミノ酸前駆体の取り込み効率に関しても、培地の pH が重要な役割を果たしていると考えられる。

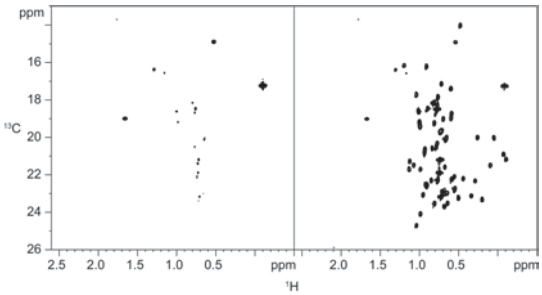


Fig. 1. ^{1}H-^{13}C HSQC spectra of β-LG obtained from the cultures supplemented with [4-^{13}C] α-ketoisovalerate and started at pH 7 (left) or pH 6 (right).

以上の検討により最適化した培養条件下において、Ile/Leu/Met/Val の側鎖メチル基に ^{13}C を導入したヒト膜タンパク質（5-lipoxygenase activating protein; FLAP）の発現を試みた。酵母細胞の膜画分に含まれる FLAP を、界面活性剤である DDM により可溶化し、Ni^{2+} アフィニティークロマトグラフィーによる精製を行った後、^{1}H-^{13}C 相関スペクトルを測定した。この結果、FLAP の Ile/Leu/Met/Val の側鎖メチル基に由来すると考えられるシグナルが観測された。さらに、FLAPの阻害剤であるMK-591を添加したところ、MK-591結合に伴うMet由来シグナルの化学シフト変化が観測された。以上の結果から、酵母膜から得られたFLAPが阻害剤に対する結合活性を有していることが示された。今後、^{13}C標識と同時に重水素標識を行うことにより、FLAPのNMRスペクトルをさらに改善することが可能であると考えられる。

References

(1) Goto, N. K., Gardner, K. H., Mueller, G. A., Willis, R. C., and Kay, L. E. (1999) A robust and cost-effective method for the production of Val, Leu, Ile (δ1) methyl-protonated ^{15}N-, ^{13}C-, ^{2}H-labeled proteins. *J. Biomol. NMR 13*, 369–374.

(2) Clark, L., Zahm, J. A., Ali, R., Kukula, M., Bian, L., Patrie, S. M., Gardner, K. H., Rosen, M. K., and Rosenbaum, D. M. (2015) Methyl labeling and TROSY NMR spectroscopy of proteins expressed in the eukaryote *Pichia pastoris*. *J. Biomol. NMR 62*, 239–245.

P17

免疫受容体Mincleによる糖脂質認識機構のNMR解析

○齊藤貴士[1]，須知佑介[2]，古川敦[3]，前仲勝実[3]
[1]北海道薬科大学
[2]北海道大学大学院・生命科学院
[3]北海道大学大学院・薬学研究院

NMR analysis of glycolipid recognition mechanism by innate immune receptor Mincle

○Takashi Saito[1], Yusuke Shuchi[2], Atsushi Furukawa[3], Katsumi Maenaka[3]
[1] *Hokkaido Pharmaceutical University School of Pharmacy*
[2] *Graduate School of life Science, Hokkaido University*
[3] *Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University*

Mincle activates expression of IFN-γ and IL-6 through Syk-CARD9-Bcl10-MALT1 pathway by binding trehalose dimycolate (TDM). We successfully determined the crystal structure of human Mincle. However, we have not obtained the crystal of complex of Mincle and glycolipid. Thus, the glycolipid recognition mechanism is still unknown. We are trying to reveal the detail recognition mechanism by NMR spectra analysis. We performed titration experiments to analyze the interaction mechanism, however most of the NMR signals disappeared during titration of glycolipid. This is due to multimeric complex formation by glycolipid. We found the condition of inhibition of the multimerization. NDSB-195 known as protein aggregation inhibitor inhibited the multimeric complex formation. We performed the titration experiments in the presence of 0.5 M NDSB-195. We observed the NMR chemical shift perturbation during titration of the glycolipid.

生体防御の最前線においては、免疫系を中心とする細胞表面受容体群とその相手となる分子との激しいやり取りが交わされている。相手となる分子としては、腫瘍細胞・ウイルス感染細胞・感染微生物の表面抗原蛋白質が挙げられる。これら細胞表面で起こる現象を明らかにし人為的に制御することで、自己免疫疾患やがん、感染症を克服する特異性の高い免疫制御が可能になると期待される。本研究では，細胞表面受容体のうち糖脂質の成分と結合するC型レクチン受容体Mincleと、そのリガンドとなるtrehalose dimycolate (TDM)との相互作用についてNMRスペクトルにより解析を進めた(Fig. 1)。Mincle は組織傷害により発生した死細胞を認識して炎症性サイトカインの産生や，好中球浸潤を誘導する。また、死細胞だけでなく，結核菌や病原性真菌も認識し、免疫活性を引き起こし、病原体排除に関与することが知られている。

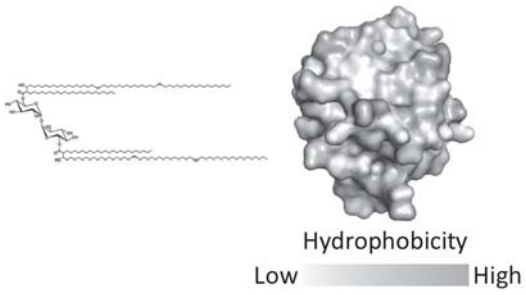


Fig. 1. Structure of Trehalose 6,6-dimycolate and Mincle. (PDBID:3WH2).

タンパク質，安定同位体ラベル，ミセル形成

○さいとうたかし，しゅうちゆうすけ，ふるかわあつし，まえなかかつみ

＜実験＞

Mincleは大腸菌による大量発現系を構築し、ここから得られた封入体の巻き戻し法により取得した。Mincleの安定同位体ラベルは^{15}N塩化ナトリウムと^{13}Cグルコースにより調製したM9培地、もしくは^{13}C, ^{15}Nラベルされた CHL培地（クロレラ工業）において大腸菌を培養することで行った。一方、TDM(C12)については化学合成により得た。

MincleのNMRスペクトルにおける主鎖の帰属は^{13}C, ^{15}Nダブルラベル体の連鎖帰属法により行った。続いて^{15}NラベルMincleへのTDM (C12)のNMR滴定実験を^{1}H ^{15}N HSQCスペクトル上で実施した。滴定については、NDSB-195 存在下と非存在下において実施した。

＜結果・考察＞

M9培地において大腸菌を培養した結果、1Lあたり10mgの封入体しか得られなかった。これはLB培地中で培養した祭と比較し、10%以下の量である。そこでCHL培地を使用したところ封入体の収量がほぼLB培地と同程度に上がった。すなわち、封入体の巻き戻し法での安定同位体ラベルはCHL培地による培養が有効であると言える。ここから得られた^{15}NラベルMincleについて^{1}H-^{15}N HSQCスペクトルを測定した結果、分子量から予想されるシグナル強度よりもSN比が低かった。また、いくつかの残基でシグナルが２つに分離していることから２状態の平衡状態に有ると予想される。^{13}C, ^{15}Nラベルサンプルを用いて連鎖帰属法により主鎖シグナルの帰属を行った結果、約90％まで終了しているが、シグナルが分裂するループ部分において帰属が未完成となっている。

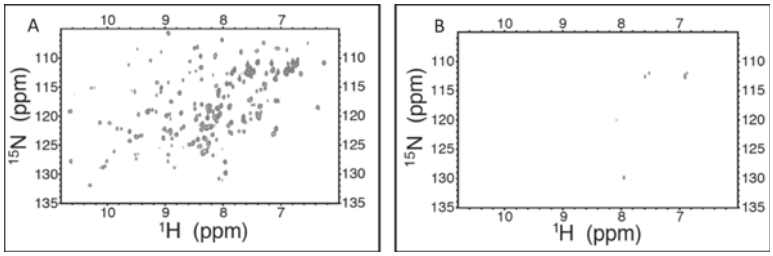


Fig. 2. ^{1}H ^{15}N HSQC spectra.
A: ^{1}H ^{15}N HSQC spectrum of ^{15}N labeled Minle. B: ^{1}H ^{15}N HSQC spectrum of ^{15}N labeled Minle adding TDM(C12) (1eq).

^{15}NラベルMincleへのTDM(C12)の滴定実験を実施したが、滴定量が増加するにつれシグナル強度が低下し、TDMを1等量滴定した時点でシグナルをほぼ観察することができなくなった(Fig. 2)。これはTDMがミセルを形成し、非特異的にMincleと結合したためであると予想した。そこでゲルろ過と動的光散乱法によりサンプルの径を測定した結果、予想通りTDM(C12)を滴下することで予想通りサンプルサイズが上昇していた(Fig. 3A)。そこでTDMのミセル化を防ぐためにNDSB-195を添加した結果、凝集の抑制が見られた(Fig. 3B)。これにより、TDM(C12)のNMR滴定実験上で化学シフト変化を観察することが可能となった。

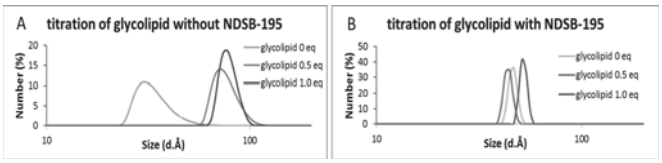


Fig. 3. Dynamic light scattering. The concentration of TDM(C12) is 250 μM.

P18

B型肝炎X蛋白質（HBx）BH3様モチーフとBcl-x_LのNMR相互作用解析

○楠英樹[1]，田中俊之[2]，河野俊之[3]，木村博一[4]，細田和男[5]，若松馨[5]，浜口功[1]
[1]国立感染症研究所，血液・安全性研究部
[2]筑波大学大学院生命環境科学研究科
[3]北里大学医学部，生化学
[4]国立感染症研究所，感染症疫学センター
[5]群馬大学大学院理工学府，分子科学部門

NMR analysis of the interaction between the BH3-like motif of hepatitis B virus X protein (HBx) and Bcl-x_L

○Hideki Kusunoki[1], Toshiyuki Tanaka[2], Toshiyuki Kohno[3], Hirokazu Kimura[4], Kazuo Hosoda[5], Kaori Wakamatsu[5], and Isao Hamaguchi[1]
[1]*Department of Research on Blood and Biological Products, National Institute of Infectious Diseases*
[2]*Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba*
[3]*Department of Biochemistry, Kitasato University School of Medicine*
[4]*Infectious Disease Surveillance Center, National Institute of Infectious Diseases*
[5]*Department of Molecular Science, Graduate School of Science and Technology, Gunma University*

Hepatitis B virus X protein (HBx) is a multifunctional protein, which is closely associated with the development of hepatocellular carcinoma. HBx (154 residues) possesses several domains or motifs, such as a transactivation domain, a DNA damage-binding protein 1 (DDB1) binding motif, a p53-binding domain, and an anti-apoptotic protein-binding motif (a BH3-like motif). HBx can directly interact with many host proteins via its domains or motifs. For example, HBx interacts with anti-apoptotic proteins, Bcl-2 and Bcl-x_L, through its BH3-like motif, and this interaction results in elevated cytosolic calcium level, efficient viral DNA replication, and the induction of apoptosis. In this study, to reveal the interaction between HBx and Bcl-x_L and to understand the role of the tryptophan (W120) of the HBx BH3-like motif in this interaction, we analyzed the interaction of the HBx peptide containing the BH3-like motif or its tryptophan mutants (W120A and W120L) with Bcl-x_L by NMR. The interaction of the BH3-like motif of HBx with Bcl-x_L will be described and compared with those of other related BH3 peptide/Bcl-x_L complexes.

【序論】

B型肝炎ウイルス（HBV）の慢性感染は、慢性肝炎、肝硬変、肝癌といった肝病変を引き起すことが知られている。HBVが産生する蛋白質の１つであるX蛋白質（HBx）は、発癌との高い関連性が示唆されている。HBxはアミノ酸154残基からなる蛋白質で、転写活性化ドメイン、DNA damage-binding protein 1 (DDB1)結合モチーフ、p53結合ドメイン、抗アポトーシス蛋白質（Bcl-2やBcl-x_L）結合モチーフ（BH3様モチーフ）といったドメイン又はモチーフを所有している。その結果、HBxは多くの宿主因子と直接相互作用し多機能性を示す。例えば、HBxは抗アポトーシス

B型肝炎ウイルスX蛋白質，Bcl-x_L，NMR相互作用解析

○くすのきひでき，たなかとしゆき，こうのとしゆき，きむらひろかず，ほそだかずお，わかまつかおり，はまぐちいさお

蛋白質であるBcl-2やBcl-x_LとそのBH3様モチーフを介して結合する。この相互作用は、ウイルスDNA複製を促進すると共に、アポトーシスを誘導する[1,2]。現在、我々はHBxと宿主因子との相互作用によるアポトーシス誘導メカニズムと肝病変との関連性に注目して研究を進めている。

本研究では、HBxのBH3様モチーフを含む残基101から136の領域ペプチド［HBx(101–136)］とBcl-x_L（残基1–44と85–196）の相互作用をNMRで解析し、その結合様式を明らかにすること、HBVジェノタイプで高く保存されている120番目のトリプトファン残基の役割を解明することを目的とした。

【方法】

HBx BH3様モチーフを含む101番目から136番目のペプチド［HBx(101–136)］及びその120番目のトリプトファンの変異体（W120AとW120L）をユビキチン融合蛋白質発現系を用いて調製した[3]。また、安定同位体標識したBcl-x_L（残基1–44と85–196）を大腸菌発現系で調製した。Bcl-x_Lの主鎖の帰属を35℃で測定した3D HNCO, CBCACONH, HNCACB, 2D ^{1}H-^{15}N HSQCスペクトルを用いて行った。HBx(101–136)とそのトリプトファン変異体（W120AとW120L）を^{15}N安定同位体標識したBcl-x_L水溶液に0.5、1.5、4、5又は8等量となるよう添加し、35℃で各HSQCスペクトルを測定した。

【結果と考察】

HBx(101–136)を^{15}N安定同位体標識したBcl-x_L水溶液に添加する滴定実験を行っところ、Bcl-x_Lのアミドシグナルの変化が観測された。HBx(101–136)を4等量添加したとき、各アミドシグナルはほとんど変化しなくなった。4等量のHBx(101–136)存在下で有意に変化したアミドシグナルの残基をBcl-x_Lの構造にマッピングしたところ、他のBH3様ペプチドと同様に、Bcl-x_L蛋白質の疎水性表面に結合することが示唆された。一方で、HBx(101–136)のトリプトファン変異体（W120AとW120L）においては、ワイルドタイプと比べてアミドシグナルの変化は大きくなかった（Fig. 1）。HBx BH3様モチーフ/Bcl-2複合体構造において、HBx BH3様モチーフの120番目のトリプトファンはBcl-2との直接的な結合に関与していることが報告されている[4]。この構造情報と我々のNMR結果から、HBx(101–136)の120番目のトリプトファン（W120）はBcl-2/Bcl-x_Lとの結合に重要であると考えれられる。

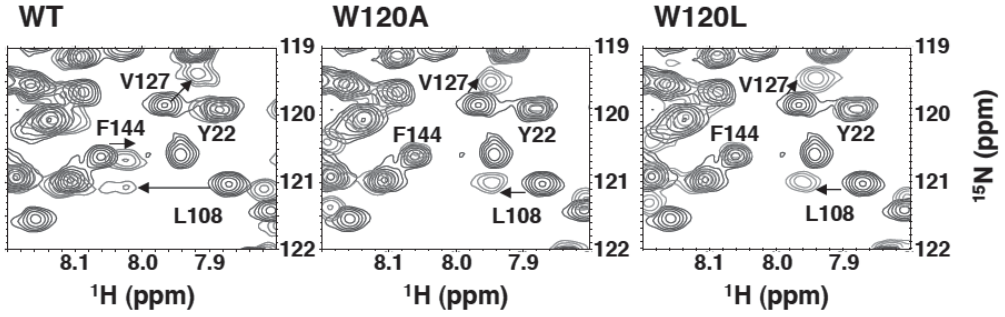


Fig. 1. Overlaid 2D ^{1}H-^{15}N HSQC spectra of ^{15}N-labeled Bcl-x_L (0.1 mM) in the absence and the presence of 0.4 mM of HBx(101–136) (left) or its tryptophan mutants, W120A (middle) and W120L (right).

References

(1) Geng X, *et al.*, (2012) *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**: 18465-18470

(2) Geng X, *et al.*, (2012) *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**: 18471-18476

(3) Kusunoki H, *et al.*, (2014) *Biochem Biophys Res Commun* **450**: 741-745

(4) Jiang T, *et al.*, (2016) *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**: 2074-2079

P19

昆虫細胞発現系における高度重水素標識を用いた脂質二重膜中のGタンパク質共役型受容体の動的構造解析

○幸福裕[1]，上田卓見[1,2]，奥出順也[1]，白石勇太郎[1]，近藤啓太[1]，水村拓也[1]，鈴木志歩[1]，嶋田一夫[1]
[1]東京大学・大学院薬学系研究科
[2]日本学術振興会(JST)・さきがけ(PRESTO)

Functional Dynamics of Deuterated β2-Adrenergic Receptor in Lipid Bilayers Revealed by NMR Spectroscopy

○Yutaka Kofuku[1], Junya Okude[1], Takumi Ueda[1,2], Yutaro Shiraishi[1], Keita Kondo[1], Takuya Mizumura[1], Shiho Suzuki[1], Ichio Shimada[1]
[1] *Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo*
[2] *Precursory Research for Embryonic Science and Technology, Japan Science and Technology Agency*

G-protein-coupled receptors (GPCRs) exist in conformational equilibrium between active and inactive states, and the former population determines the efficacy of signaling. However, the conformational equilibrium of GPCRs in lipid bilayers is unknown owing to the low sensitivities of their NMR signals. To increase the signal intensities, a deuteration method was developed for GPCRs expressed in an insect cell/baculovirus expression system. The NMR sensitivities of the methionine methyl resonances from the β_2-adrenergic receptor (β_2AR) in lipid bilayers of reconstituted high-density lipoprotein (rHDL) increased by approximately 5-fold upon deuteration. NMR analyses revealed that the exchange rates for the conformational equilibrium of β_2AR in rHDLs were remarkably different from those measured in detergents. The timescales of GPCR signaling, calculated from the exchange rates, are faster than those of receptor tyrosine kinases and thus enable rapid neurotransmission and sensory perception.

Gタンパク質共役型受容体(GPCR)は活性型構造と不活性型構造の動的平衡にあり，この平衡がシグナル伝達活性を制御している(ref. 1)．しかしながら，従来のGPCRの動的構造解析は界面活性剤ミセル中でおこなわれたものであり，生理的環境である脂質二重膜中のGPCRの動的構造不明であった．これは，活性を保持したGPCRの大量発現に必須な昆虫細胞発現系では，重水素標識によるNMR測定の高感度化が困難であることが原因である．そこで，我々は昆虫細胞発現系における重水素標識法を確立した上で，再構成高密度リポタンパク質(rHDL,

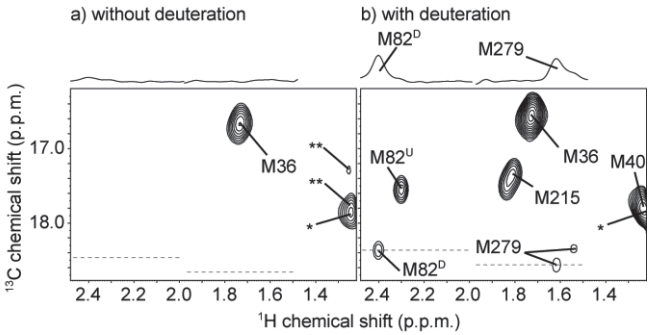


Fig. 1. Sensitivity enhancements of the methionine resonances of β_2AR in rHDLs upon deuteration. ^{1}H–^{13}C HMQC spectra of undeuterated β_2AR in rHDLs (a) and deuterated β_2AR in rHDLs (b) in the inverse agonist-bound state.

安定同位体標識，脂質二重膜，膜タンパク質

○こうふくゆたか，うえだたくみ，おくでじゅんや，しらいしゆうたろう，こんどうけいた，みずむらたくや，すずきしほ，しまだいちお

ナノディスク)の脂質二重膜中に再構成したβ_2-アドレナリン受容体(β_2AR)の動的構造を解析することとした(ref. 2).

我々は，昆虫細胞発現系において，重水素標識アミノ酸を適切な量とタイミングで添加することにより，観測するメチオニン側鎖メチル基の周囲を選択的かつ高度に重水素標識する方法を開発した．この方法を，rHDLの脂質二重膜に再構成したβ_2ARに適用した結果，NMR測定感度は約5倍上昇した(Fig. 1)．これにより，分子量が200 kDaを超えるrHDLにおいても，β_2ARのすべてのメチオニン残基に由来するNMRシグナルを観測することに成功した．

rHDLの脂質二重膜に再構成したβ_2ARのNMR解析が可能となったことから，シグナル伝達強度が様々に異なるリガンドが結合したβ_2ARについて, rHDLの脂質二重膜中と界面活性剤ミセル中のNMRスペクトルを比較した(Fig.2)．その結果，活性型構造と不活性型構造の平衡を鋭敏に反映するM82由来のNMRシグナルの化学シフトおよび線形は，脂質二重膜中とミセル中で大きく異なっていた．このことは，脂質二重膜中とミセル中で，平衡にある活性型構造と不活性型構造の量比，およびその間の交換速度が大きく異なっていることを示している．

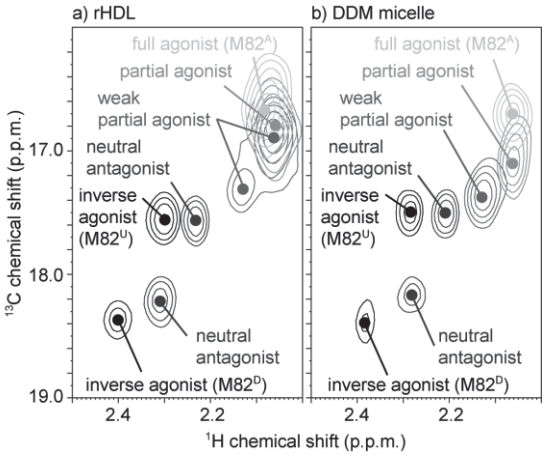


Fig. 2. Differences in the M82 resonances of β_2AR with various ligands bound, in rHDLs and in DDM micelles.

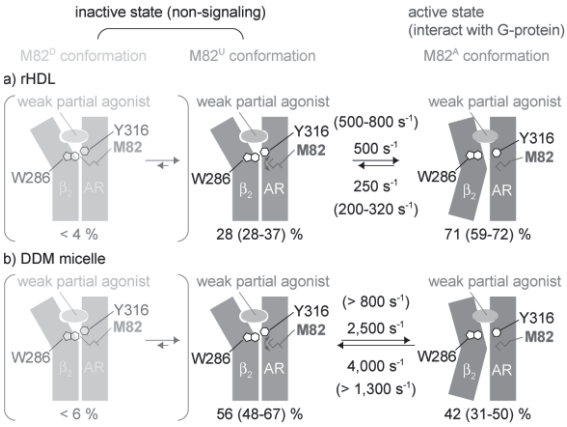


Fig. 3. The differences in conformational equilibrium between β_2AR in rHDLs and β_2AR in DDM micelles.

様々な条件でスペクトルのシミュレーションをおこない，実際のスペクトルと比較することで，活性型構造と不活性型構造の量比，およびその間の交換速度を算出した(Fig. 3)．その結果，ミセル中と比較して脂質二重膜中では，活性型構造の割合が多いこと，活性型構造と不活性型構造の交換速度が遅いことが示された．

本研究から，脂質二重膜中での活性型構造と不活性型構造の交換はミリ秒のタイムスケールで起こっていることが示された．この交換速度は，Gタンパク質の活性化およびその後のcAMP濃度の上昇が，百ミリ秒～秒のタイムスケールで起こることをよく説明できる．感覚受容などに関わるGPCRは，チロシンキナーゼ型の膜受容体よりも迅速に活性化することが知られている．今回明らかにした速いタイムスケールの構造平衡は，このGPCRの迅速な活性化に重要である．また，今回の結果は，GPCRなど膜タンパク質の構造平衡の解析において，脂質二重膜環境が重要であることを示している．

References

(1) Kofuku, *et al.*. *Nature Communications*, (2012), **3**, 1045.

(2) Kofuku, *et al.*. *Angew. Chem. Int. Ed.*, (2014), **53**, 13376-13379.

P20

複数の抗原を特異的に認識する抗体G2の抗原結合による構造及び揺らぎの変化

○鎌足雄司[1], 臼井大樹[2], 石黒直隆[3], 織田昌幸[2]
[1]岐阜大学・生命科学総合研究支援センター
[2]京都府立大学大学院・生命環境科学研究科
[3]岐阜大学・応用生物科学部

Structural and dynamical changes of multispecific antibody G2 induced by binding of different antigens

○Yuji O. Kamatari[1], Daiki Usui[2], Naotaka Ishiguro[3], Masayuki Oda[2]
[1]*Life Science Research Center, Gifu University*
[2]*Graduate School of Life and Environmental Sciences, Kyoto Prefectural University*
[3]*Faculty of Applied Biological Science, Gifu University*

A multispecific antibody G2 can react with three proteins other than the original antigen, chicken prion protein. In this study we made scFv of G2 and made binding experiments of the scFv and the antigen peptides. The result indicated that the free form of G2 has a flexible and it can adapt to rigid conformations depending on the antigens.

我々は、多くの教科書に載っている「一つの抗体は一つの抗原を認識する」という免疫学の基本概念から外れる「複数の抗原を特異的に認識する」抗体G2を発見した (1)。本発表では、このG2の発見とその機構解明のためのこれまでの結果を報告する。

我々は鶏プリオンタンパク質 (ChPrP) の中の174–247番目のペプチドに対するマウスのモノクローナル抗体 (mAb) を作成した。そこで得られた抗体の一つG2は非常に興味深い性質を示した。つまり、オリジナルの抗原 ChPrP だけではなく他の3つのタンパク質をも認識した (Fig. 1)。鶏の脳から得られたDNAライブラリーを免疫スクリーニングすることによりG2に結合する3つのタンパク質 (SEPT3, ATP6V1C1, C6H10orf76) を同定した。これらの配列の中にはChPrPと類似した配列は見つからなかった。我々は、ATP6V1C1の中のG2の認識するエピトープ配列を決定した。その配列 (Pep8) は、ChPrPの中のエピトープ配列 (Pep18mer) とは大きく異なっていた (Fig. 2)。

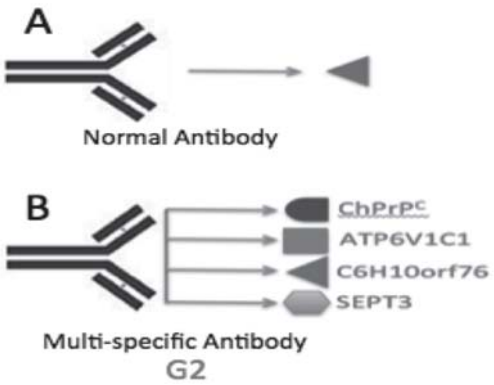


Fig. 1. Normal mAb (A) and multispecific Ab G2 (B).

Pep18mer: EAVAAANQTEVEMENKVV
Pep8: CQQTWEKLHAATTKN

Fig. 2. Epitpoe amino acid sequence of Pep18mer and Pep8 on ChPrP and ATP6V1C1, respectively.

抗体, 抗原認識機構, 構造揺らぎ

○かまたりゆうじ, うすいだいき, いしぐろなおたか, おだまさゆき

しかしながら、酵素結合免疫吸着法 (ELISA)、表面プラズモン共鳴法 (SPR)、等温滴定型カロリメトリー (ITC, Fig. 3) のいずれの手法を用いても、Pep18merとPep8はほぼ同等の強い結合をすることが分かった。SPR法で求められたPep18merの解離定数 (K_D) は2.9*10^{-8} Mであり、Pep9のK_Dは1.6*10^{-8} Mであった。しかしながら、結合の特性はそれぞれのペプチドで異なっていた。SPRの実験では、Pep18merの結合速度はPep8の結合速度と比べると早かった。ITCでも明らかな違いが見られた。また、それぞれのペプチドを用いた阻害実験から、二つのペプチドの結合サイトはオーバーラップしていることが分かった。

G2 mAbの分子量は150 kDaであり、NMRを用いた研究には適さないため、可変領域をループで繋いだ一本鎖可変領域抗体 (scFv, ~25 kDa) を作成して、NMR研究に用いた。フリーのG2のHSQCスペクトルはブロードであり、これにPep18merを加えるとスペクトルは大きく改善した (Fig. 4)。これは、フリーのG2の構造は比較的フレキシブルであり、抗原ペプチドの結合により揺らぎの抑えられたしっかりとした構造になることを示唆している。同様にフリーのG2にPep8を加えた場合にもスペクトルは大きく改善した。また、異なる抗原ペプチドを結合した複合体のスペクトルは異なり、二つの複合体構造は異なることを示唆した。

これらの情報に基づき我々は、タンパク質の構造揺らぎが、異なる二つの準安定構造を可能とし、それぞれが異なる抗原を認識しうるというモデルを提唱した (Fig. 5)。

.

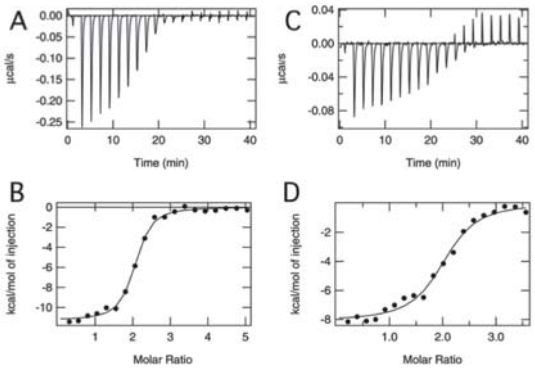


Fig. 3. ITC measurements for the interactions between G2+Pep18mer (A, B) and G2+Pep8 (C, D).

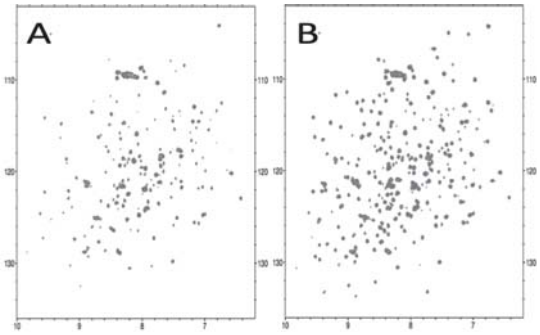


Fig. 4. ^{1}H/^{15}N HSQC spectra of G2 scFv (A) and G2 scFv+Pep18mer (B).

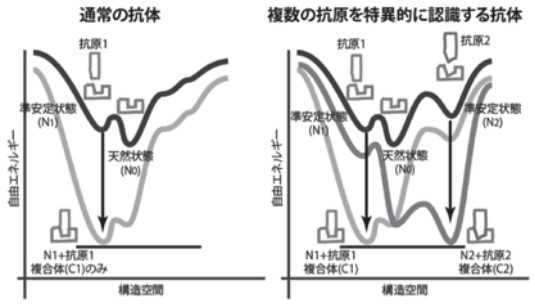


Fig. 5. A schematic view of the energy landscape of normal mAb (A) and multispecific Ab (B).

Reference

(1) Y. O. Kamatari, S. Ohta, Y. Inoshima, M. Oda, T. Maruno, Y. Kobayashi, N. Ishiguro. Identification and characterization of a multispecific monoclonal antibody G2 against chicken prion protein. Protein Sci. 23, 1050-1059 (2014).

P21

メチル化アミロイドβと金属イオンとの相互作用解析

髙井 朋代[1], 物部 容子[1], 山口 りつ子[1], 竹内 昌男[1], 竹内 喜久子[1],
児玉 高志[1,2], ○赤木 謙一[1]
[1]医薬基盤・健康・栄養研究所, [2]京都大学 理学研究科

Analysis of interaction between methylated Aβ42 and metal ions

Tomoyo Takai[1], Yoko Monobe[1], Ritsuko Yamaguchi[1], Masao Takeuchi[1], Kikuko Takeuchi[1], Takashi Kodama[1,2], and ○Ken-ichi Akagi[1]
[1]*National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition,* [2] *Faculty of Science, University of Kyoto*

The amyloidβ(Aβ) peptide is the main component of amyloid plaques in Alzheimer's disease, consists of 40 or 42 amino acids. From the point of view of the innovating drug development of Alzheimer's dementia, it is important to reveal the features of the Aβ aggregation process. In this study, to investigate the interaction between Aβ42 and metal ion, we performed the solution state NMR spectroscopy, thioflavin T assay and transmission electron microscopy using the Aβ42 obtained by *E. coli* expression system. The negative stain images of Aβ42 contained Zn ions resembled ones of lysine's side chain amino group methylated Aβ42. From NMR spectroscopy, Zn ions were interacted with N terminal regions of Aβ42 strongly. During conformational change to fibrils, Zn ions have a chance of located to K28 nearby.

序論

アルツハイマー型認知症の原因物質の一つと考えられているアミロイド β（以下 Aβ）は，アミロイド前駆体蛋白質が β–，γ– セクレターゼにより加水分解されることで生成される. Aβ は加水分解される位置により，アミノ酸残基数の異なるものが複数存在する．その中で，凝集能や細胞毒性が高いことを示すのは, 42 アミノ酸残基から成る Aβ（以下 Aβ 42）である. Aβ が凝集体になり，病変した脳組織に蓄積することで形成されると考えられている老人班には Zn や Cu などの金属が多く含まれることが知られており, Aβ の凝集には金属イオンが関与していると報告している．これまで溶液 NMR 法を用いた研究で, Zn^{2+} は N 末端の Hisと相互作用することが示されている[1)]．また，固体NMR 法では D23 と K28 の塩橋を破壊し，構造を安定化させるという報告もある[2)]．しかし, Aβ42 の凝集の過程において, Zn^{2+}の影響は明らかにされていない.

今回我々は，可溶性 Aβ 42 における D23 と K28 の塩橋と Zn^{2+} の関係を調べるため, Lys 側鎖アミノ基のみをメチル化した Aβ 42（以下 MeAβ 42）を作製した. Zn^{2+} 存在下の MeAβ 42 と Aβ 42 について，溶液 NMR スペクトルの変化，チオフラビンT（以下 ThT）アッセイ法を用いた凝集能を調べた．さらに，その際に形成する形態をネガティブ染色し，透過型電子顕微鏡（以下 TEM）を用いて詳細に観察した．以上の結果より，可溶性 Aβ 42の凝集の過程におけるZn^{2+} の影響を考察する.

溶液NMR，透過型電子顕微鏡，アミロイドβ

たかいともよ, ものべようこ, やまぐちりつこ, たけうちまさお, たけうちきくこ, こだまたかし, ○あかぎけんいち

実験

Aβ 42 は遺伝子組み換え大腸菌を用い，His-tag ユビキチンとの融合蛋白質として発現させた．His-Trap カラムで粗精製し，プロテアーゼ処理後に HPLC で精製した後, HFIP 処理をした Aβ 42 を試料として用いた．また, MeAβ 42 は N 末端アミノ基のメチル化を避けるために， His-tag ユビキチン融合蛋白質の状態でメチル化した後, Aβ42 と同様の手順で精製，処理した．精製した Aβ 42 および MeAβ 42 は MALDI-TOF-MS で分子量を測定し，同時にメチル化を確認した．多核種多次元溶液 NMR 測定には, ^{15}N, あるいは $^{15}N/^{13}C$ 安定同位体標識体を用いた. Aβ は最終濃度 10～50μM になるように PBS 緩衝液に溶かした. NMR 測定にはAvanceII800（BRUKER社）を用いた．Aβ 42 の凝集像の取得には日立H-7650透過型電子顕微鏡を用いた．

結果

MeAβ 42 について, His-tag ユビキチン融合タンパク質の状態でメチル化することにより, Lys 側鎖アミノ基のみをメチル化することに成功した（Fig. 1, 2）. SO-FAST HMQC スペクトルより, Zn^{2+} 存在下の MeAβ 42 と Aβ42 ではピーク強度が著しく低下する残基が同一であった. ThT アッセイの結果から, Zn^{2+} 存在下の MeAβ 42 と Aβ42 の凝集能，および蛍光強度の継時的，濃度依存的変化には相関が認められた．これらの結果は Zn^{2+} 非存在下の Aβ 42 と異なる傾向を示した．また, TEM 観察において MeAβ 42 と Zn^{2+} 存在下の Aβ42 の繊維状形態は非常に似ていた．しかし，両者の形態は Zn^{2+} 非存在下の Aβ42 とは明らかに異なっていた（Fig .3）. Zn^{2+} は MeAβ 42 の繊維状形態には影響を与えなかった．

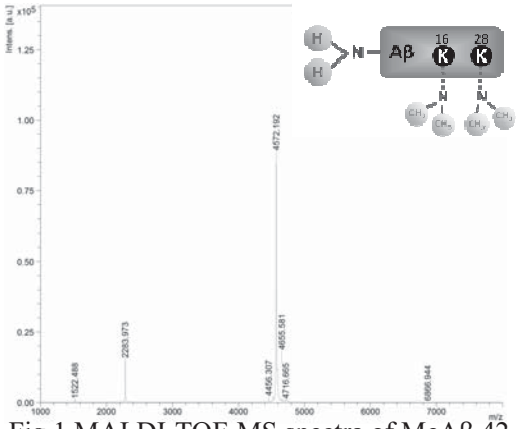


Fig.1 MALDI-TOF-MS spectra of MeAβ 42

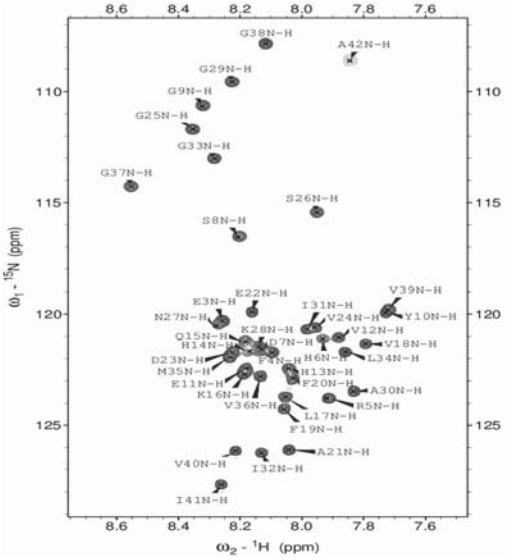


Fig.2 SO-FAST HMQC spectra of MeAβ 42

考察

TEM による形態観察の結果より, MeAβ 42 と Zn^{2+} 存在下の Aβ42で非常に似ていた. Zn^{2+} は可溶性 Aβ 42 に対して N 末端領域に作用し，可溶性オリゴマーから繊維構造へ移行する際に D23 と K28 の塩橋形成に対して影響を与えている可能性がある. Zn^{2+} 存在下での MeAβ42 と Aβ42 の SO-FAST HMQC スペクトルより, D23 と K28 間の塩橋は，可溶性 Aβ42 においては形成されていないことが示唆された．

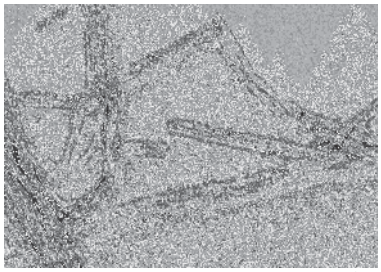


Fig.3 Aβ 42 with 100uM $Zn2^{+}$

参考文献

1) Jens Daniellson, *et al. FEBS J.* 2007. **274**. 46-59.

2) Venus Singh Mithu, *et al. Biophys. J.* 2011. **101**. 2825-2832.

P22

NMRとSAXSによるRNA結合性マルチドメインタンパク質Nrd1の構造解析

○小林彩保[1]，永井敢[1]，佐藤亮介[2]，伊藤隆[1]，杉浦麗子[2]，三島正規[1]
[1]首都大・理工，[2]近畿大・薬

Structural studies of the RNA-binding multi-domain protein Nrd1 by NMR and SAXS

○Ayaho Kobayashi[1], Kan Nagai[1], Ryosuke Satoh[2], Yutaka Ito[1], Reiko Sugiura[2] and Masaki Mishima[1]
[1]*Graduate School of Science and Engineering, Tokyo Metropolitan University*
[2]*School of Pharmaceutical Sciences, Kinki University*

Nrd1 (Negative regulator of differentiation 1), a multi-domain protein, consists of four RRMs (RNA recognition motif), which one of the key components of stress granules. In addition, Nrd1 functions as an RNA-binding protein and the physiological role is known as a negative regulator of sexual differentiation in fission yeast. Recently, it has been revealed that Nrd1 also regulates cytokinesis, in which physical separation of the cell is achieved by a contractile ring comprising many proteins including actin and myosin. Nrd1 binds and stabilizes the mRNA of Cdc4, which encodes a myosin II light chain, required for cytokinesis. Interestingly, Nrd1 is phosphorylated by Pmk1 (fission yeast MAPK) and results in markedly reduced RNA binding activity. The mechanism by which Pmk1 regulates the RNA binding activity of Nrd1 is unknown. In an effort to delineate the relationship between Nrd1 structure and function, we took the combination approach that utilize NMR and SAXS (small angle X-ray scattering).

【序論】

Nrd1は4つのRRMドメイン(RNA recognition motif)を持つ分裂酵母のRNA結合タンパク質で，アクトミオシン環の収縮に必須なミオシンIIの軽鎖をコードする*Cdc4*のmRNAに結合し安定化することで，細胞質分裂を制御することが知られている[(1)]．興味深いことに，Nrd1は，Pmk1 MAPキナーゼによってThr40及びThr126がリン酸化されるとRNA結合能が抑制される(Fig. 1)[(1)]．またストレス顆粒に取り込まれ，その形成に重要な役割を果たすことが知られており，その際，Cpc2(RAC K1)と結合する[(2)]．本研究は，マルチドメインタンパク質であるNrd1の構造解析により，MAPキナーゼによる翻訳マシナリーの直接のリン酸化が分子スイッチとして機能するメカニズムを明らかにすることを目的としている．柔軟なリンカーによってRRMが結ばれた数珠状の構造を成すNrd1の構造解析をNMRとSAXSにより行い，結晶化が困難であるマルチドメインタンパク質の構造解析の手法の確立も目指している．

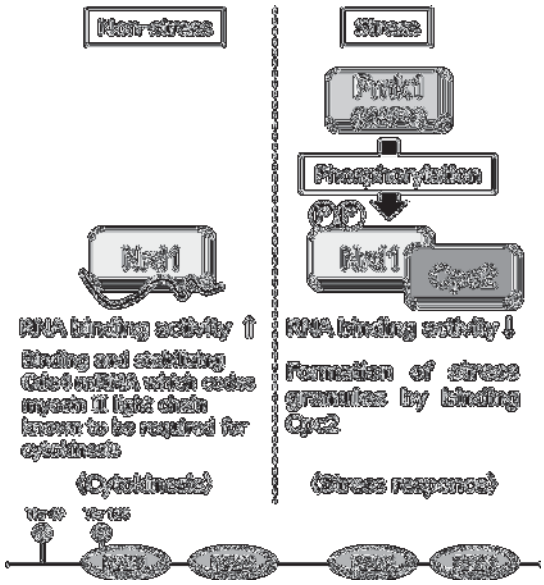


Fig. 1. Biological background.
(Top) Schematic drawing of Nrd1 function.
(Bottom) The domain organization of Nrd1.

SAXS，マルチドメインタンパク質
○こばやしあやほ，ながいかん，さとうりょうすけ，いとうゆたか，すぎうられいこ，みしままさき

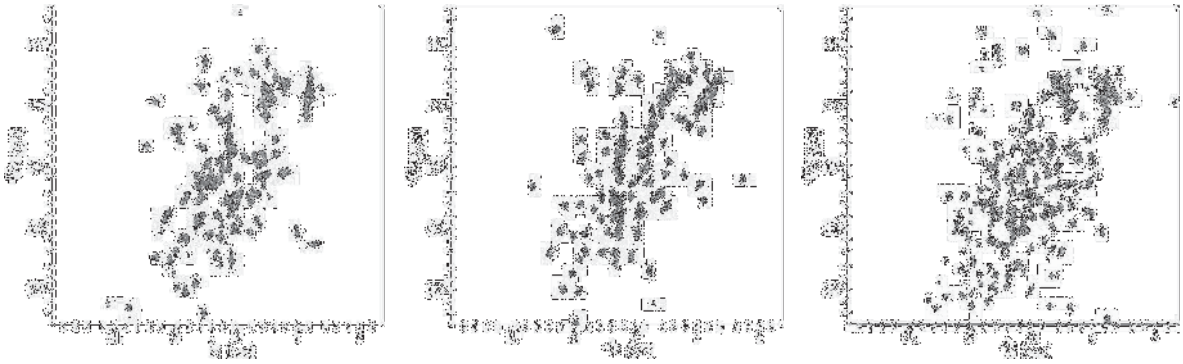


Fig. 2. The ^{1}H-^{15}N HSQC spectra of RRM1, RRM2 and RRM3-4.

The ^{1}H-^{15}N HSQC spectra of the ^{15}N -labeled RRM1, RRM2, and RRM3-4 shown of the left, middle and right, respectively. The spectra of RNA-free and 4-fold excess unlabeled UUCUU are shown in black and red, respectively.

【結果】

RNAとの結合実験

はじめに，Nrd1のどの領域がRNAとの結合に重要であるのかを調べるため，各RRMごとに発現系を作製し，その調製を行い，NMRによる*Cdc4* mRNAとの結合実験を行った．大変興味深いことに，Pmk1によりリン酸化されるThr126が存在するRRM1ではRNAとの結合が見られず，RRM3-RRM4タンデム領域で比較的強い結合が確認された(Fig. 2). RRM3単独サンプルは高塩濃度下においてのみ調製可能であったため，RNAとの結合実験を行うことができなかったが，RRM4単独ではRNAとの結合が見られなかったことから，RRM3がRNAとの結合に重要であることが示唆された.

RRM間の相互作用

RNAとの結合実験の結果，直接リン酸化されるRRM1ではなく，リン酸化部位からはアミノ酸配列的には遠いRRM3がRNAとの結合に重要であることが示唆されたことから，Nrd1のRNA結合能の制御を理解するためには，ドメイン間の配置がリン酸化によってどのように変化するのかを調べる必要がある．そこで，RRM1-RRM2のタンデム領域と該当する各RRM単独の^{1}H-^{15}N HSQCスペクトルを比較したところ，化学シフトは一致しなかったことから，RRM1とRRM2のドメイン間相互作用の存在が示唆された．RRM3-RRM4タンデム領域に関しても同様の結果が得られた．4つのRRM全てを含んだ領域であるRRM1-2-3-4についてもサンプル調製に成功し，スペクトルをRRM1-2及びRRM3-4と比較したところ，それぞれのスペクトルと一致した(Fig. 3). したがって，RRM1-2とRRM3-4の間には相互作用が存在しないことが示唆された．また，RRM2-3，RRM1-2-3のサンプル調製も行ったが，どちらも凝集を起こした．RRM1-2-3-4, RRM2-3-4, RRM3-4でのサンプル調製には成功しており，RRM4はRRM3の安定化に寄与していると考えられた.

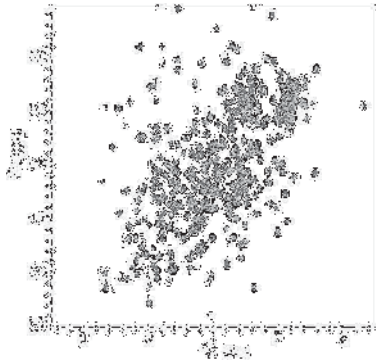


Fig. 3. The ^{1}H-^{15}N HSQC spectra of RRM1-2-3-4, RRM1-2 and RRM3-4.

The spectra of RRM1-2-3-4 in black, RRM1-2 in light gray, and RRM3-4 in dark gray are superimposed. The peaks of RRM1-2 and RRM3-4 were well corresponded to those of RRM 1-2-3-4.

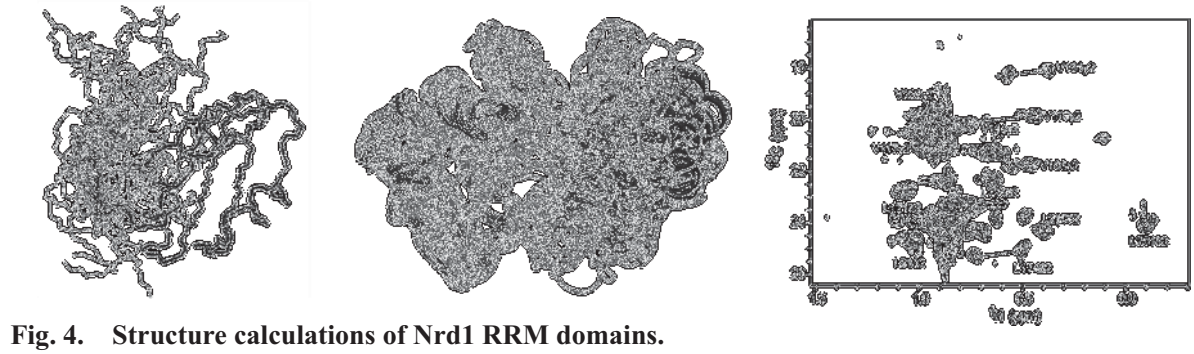


Fig. 4.　Structure calculations of Nrd1 RRM domains.
(Left) Backbone superposition of the final 20 simulated annealing of RRM2.
(Middle) Structure calculations of Nrd1 RRM1-RRM2 tandem region.
(Right) PCS observed in tandem RRM1-2 (monitoring methyl group). The spectra of RRM1-2-DOTA-M8-Lu (diamagnetic) in black and Dy (paramagnetic) in gray, respectively.

NMRによるRRMドメインの構造解析

全長の構造解析のために，まず，各ドメインの立体構造の知見を収集した．RRM2単独ドメインの構造及びRRM1-RRM2タンデム領域の構造解析を行っている(Fig. 4)[3]．RRM1-2に関してはドメイン間の配向を決めるためにDOTA-M8[4]を用いたpseudo contact shiftを観測し，構造解析中である．

SAXS測定

それぞれの部分の構造解析と並行して，Nrd1全体構造のドメイン配置の知見を得るためにX線小角散乱(SAXS)の測定を行った．測定試料はRRM1-2，RRM3-4及びN末端とC末端を除いた4つのRRMすべてを含む領域であるRRM1-2-3-4を用いた．SAXS測定から得られたKratkyプロットから，

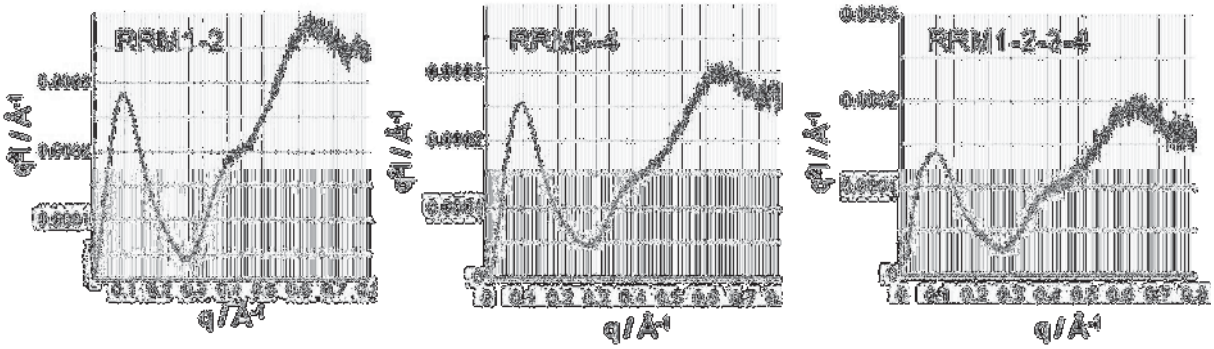


Fig. 5.　Kratky plots of Nrd1 RRM1-2 (Left), RRM3-4 (middle) and RRM1-2-3-4 (right) derived from SAXS data.

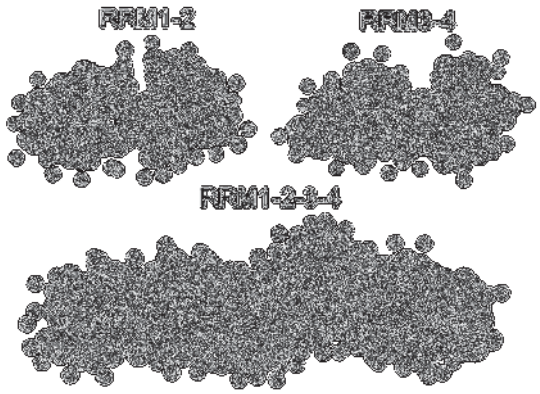


Fig. 6. Pseudo atomic models of Nrd1 derived from SAXS data.
GASBOR (*Biophys. J.*, 80, 294, 2001) was used to generate the model.
(Top left) The pseudo atomic model of RRM1-2.
(Top right) The pseudo atomic model of RRM3-4.
(Bottom) The model of RRM1-2-3-4 in light gray, RRM1-2 in dark gray, RRM3-4 in dark gray are superimposed.

RRM1-2，RRM3-4はそれぞれ，ひと固まりのホールディングをしていることが示された(Fig. 5). 次に，GASBORを用いて各試料の擬原子モデル構造を構築したところ，非リン酸化状態においてNrd1(RRM1-2-3-4)は4つのRRMが一直線上に並んだ伸びた棒状の構造であることが明らかとなった(Fig. 6). この結果はRRM1-2とRRM3-4との間に相互作用の見られなかったNMRでの結果とも一致する．非リン酸化状態では伸びた構造であることにより，RNAと結合可能な領域であるRRM3が露出していることによりRNA結合可能な状態となっているのではないかと考えられた.

Cpc2との相互作用

Nrd1 と Cpc2との複合体形成はストレス刺激に応答してストレス顆粒を形成する重要な因子として知られている[2]．そこでこの相互作用を調べるため，Cpc2(314残基)の^{1}H-^{15}N TROSY測定を行ったところ，分離の良いピークが得られた．TROSY-HNCACB, TROSY-HN(CO)CACB, TROSY-HNCACO, TROSY--HNCOにより主鎖の帰属に成功した(Fig. 7)．またNrd1全長との結合実験をNMRにより行ったところ，スペクトルの変化が観測された．今後Cpc2と結合するNrd1の領域を特定していく.

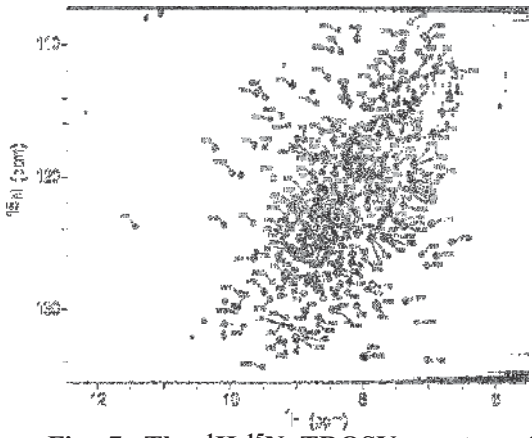


Fig. 7. The ^{1}H-^{15}N TROSY spectra of Cpc2.
0.5 mM ^{15}N,^{13}C,^{2}H Cpc2, 303 K, 600 MHz
30 mM HEPES (pH 7.5), 1 mM TCEP.

【結論】

Nrd1とRNAの結合実験の結果からRRM3がRNAとの結合に重要なドメインであることが明らかとなった．また，NMR結果から，RRM1とRRM2の間で相互作用があり，またRRM3とRRM4の間で相互作用があり，RRM1-2とRRM3-4の間には相互作用がないことが示唆された．SAXS測定からNrd1は4つのドメインが一直線上に並んだ伸びた構造であることが明らかとなり，NMRでの結果と一致した．Nrd1は伸びた構造であることにより，RNAとの結合が示唆されているRRM3の結合領域が露出していることによりRNAが結合しているものと考えられる.

【展望】

sortaseを用いた全長の再構成及び常磁性緩和効果を用いたNMR解析, 及び全長のSAXSデータを組み合わせて構造解析を行い，マルチドメインタンパク質の構造解析手法として確立し，リン酸ん化が及ぼす全長の構造(ドメイン配置)の変化を可視化する．また，Cpc2に結合するNrd1の領域の特定を行った上で，Nrd1/Cpc2複合体の構造解析を行い，ストレス顆粒形成機構の一端を解明する.

【参考文献】

(1) Satoh R, et al., *Mol. Biol. Cell.*, 20, 2473-2485 (2009)
(2) Satoh R, et al., *PLoS one*, 7, e29683 (2012)
(3) Kobayashi A, et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 437 12-17 (2013)
(4) Hikone Y, et al., *submitted*

【謝辞】

本研究におけるNMR測定は，文部科学省先端研究基盤共用促進事業「NMR 共用プラットフォーム」の(理研横浜)を利用しました．SAXS測定は，創薬等支援技術基盤プラットフォームの支援(高エネルギー加速器研究機構　清水伸隆准教授，西條慎也助教)によるものです.

P23

FGFR4 活性化に関わる FGFR4-FGFR1 キナーゼドメイン間相互作用の NMR による解析

○逆瀬川　知香[1]，雨宮　舜[2]，与座　魁斗[1]，姫野　梨花[1]，
林田　大輝[1]，赤星　璃[1]，佐藤　卓史[3]，森岡　弘志[3]，
小橋川　敬博[3]
[1]熊大・薬、[2]熊大・院・薬、[3]熊大・院・生命科学

NMR analysis of the interaction between kinase domains required for activation of the receptor tyrosine kinase FGFR4

○Chika Sakasegawa[1], Shun Amemiya[1], Kaito Yoza[1], Rika Himeno[1], Hiroki Hayashida[1], Aki Akahoshi[1], Takashi Sato[1], Hiroshi Morioka[1], and Yoshihiro Kobashigawa[1]
[1]*Kumamoto University, Kumamoto, Japan.*

Tyrosine kinases are key enzyme for cellular signal transduction pathways. Their catalytic activity is tightly regulated by phosphorylation of the tyrosine residues in the activation-loop, which proceeds via inter-molecular fashion. Recently, we reported interaction between kinase domains critical for phosphorylation of the activation-loop of the receptor tyrosine kinase FGFR1. Key residues for interaction between kinase domains were conserved among FGFR1, FGFR2 and FGFR3, while one of the residues was replaced in FGFR4. Reportedly, FGFR4 was activated not by FGFR4 itself but by other FGFR proteins. Here we studied interaction between kinase domains of FGFR4 and FGFR1, critical for activation of FGFR4, by biochemical techniques and NMR.

チロシンキナーゼはタンパク質のチロシン残基のリン酸化を触媒する酵素である。細胞内シグナル伝達のトリガーとなっており、その活性は厳密に制御されている。発現の亢進、無秩序な活性化および不活性化はがんをはじめとして様々な疾患に関わり、重要な創薬ターゲットになっている。受容体型チロシンキナーゼは、細胞外領域へのリガンドの結合により 2 量体化し、細胞膜近傍の領域が構造変化することで細胞質領域内のキナーゼドメイン同士が近接し、分子間で互いにリン酸化し合うことで活性化する。チロシンキナーゼの活性はキナーゼドメイン内の活性化ループのリン酸化により制御されるが、その過程において、キナーゼドメイン同士が 2 量体構造を形成する。

---

receptor tyrosine kinase, transphosphorylation, paramagnetism labeling

○さかせがわ　ちか，あめみや　しゅん，よざ　かいと，ひめの　りか，
はやしだ ひろき，あかほし　あき，さとう　たかし，もりおか　ひろし，
こばしがわ　よしひろ

このキナーゼドメイン間 2 量体構造の相互作用は弱く、過渡的なものであるため、構造生物学的解析は容易ではない。 これまでに、我々は細胞増殖、創傷治癒、血管新生等に関わる受容体型チロシンキナーゼである FGFR1 のキナーゼドメイン間 2 量体構造を明らかにしてきた[1]。その結果、helix-G を中心とした広い相互作用面を介してキナーゼドメインが対象な 2 量体構造を形成することを明らかにした (Fig. 1)。この helix-G 周辺の相互作用残基は FGFR1~3 では保存されているものの FGFR4 では一部が保存されていない (Fig. 2)。そのため、FGFR4 は FGFR1~3 とは異なった 2 量体構造を介して活性化されることが示唆される。FGFR4 は FGFR4 自身ではなく、FGFR1~3 によりヘテロに活性化されることが明らかにされている[2]。そこで、本研究では FGFR1 と FGFR4 のヘテロのキナーゼドメイン間相互作用について検討した。

最初に、Cross-Link 実験により FGFR1 と FGFR4 のキナーゼドメイン間相互作用について検討した。その結果、これまでに報告した FGFR1 とは異なったキナーゼドメイン間 2 量体構造が、FGFR1 と FGFR4 のキナーゼドメイン間で形成されることが示唆された。現在、部位特異的ランタノイド標識とアミノ酸選択的標識を用いた溶液 NMR により詳細な相互作用および立体構造解析を進めている。

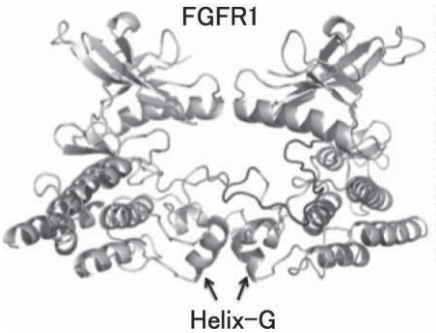


Fig. 1. Kinase domain dimer structure of FGFR1 related to the phosphorylation of the activation-loop tyrosine residues[1].

Fig. 2. Amino acid sequence of the helix-G. Mutation to the shaded residue in FGFR1 markedly reduced auto-phosphorylation activity. Shaded residues are completely conserved among FGFR1, FGFR2 and FGFR3, while one of the residues was replaced in FGFR4.

References

(1) Kobashigawa *et al.*, (2015) *Genes Cells.* **20**:860-870.

(2) Kwiatkowski *et al.*, (2008) *J Cell Physiol.* **215**: 803-817.

P24

LINEの逆転写酵素がLINE RNAの1残基の違いを識別するメカニズムの解析

○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・生命理工学院

Mechanism of the discrimination of a single residue difference in LINE RNAs by LINE reverse transcriptase

○Maina Otsu[1], Masaki Kajikawa[2], and Gota Kawai[1]
[1] *Faculty of Engineering, Chiba Institute of Technology, Japan.*
[2] *School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology, Japan.*

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 RT, we are analyzing the tertiary structures of RT recognition sites of two related LINE RNAs from zebrafish. Structures of the RT recognition sites of ZfL2-1 and ZfL2-2, R2-1 and R2-2, respectively, are already determined and furthermore it was confirmed that mutations of A10 to G10 in R2-1 and G8 to A8 in R2-2 did not change the tertiary structures. In the present study, interaction between the RNAs and peptides derived from RTs was analyzed by using the wild type and mutant RNAs. In addition, stable-isotope labeled peptides were prepared by the in vitro protein synthesis system.

序論

Long interspersed nuclear element（LINE）は転移因子の一種で散在性反復配列であり，様々な生物種が様々な種類のLINEを持っていることが知られているが，その役割や増幅機構の詳細などは解明されていない．LINEは生物種によって含まれている種類や数に特徴があるため，LINEを解析することはLINEの役割の解明や生物の進化の解析に重要であると考える．また，ゲノム内のLINEの種類や数の偏りには，逆転写酵素によるLINE RNAの特異的な認識が大きく影響していると考えられる．

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の領域および逆転写酵素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．

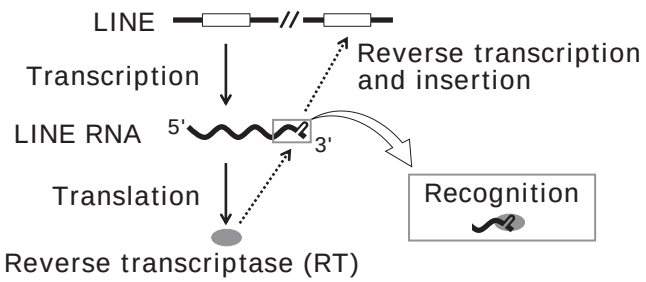


Fig. 1 Retrotransposition

RNA, reverse transcriptase, interaction

○おおつまいな，かじかわまさき，かわいごうた

本研究では，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（R2-2）の立体構造をすでに決定し[1]（PDB ID：1wks），さらに最近，ZfL2-1由来のLINE RNA（R2-1）の立体構造を決定した[2]（PDB ID：2rvo）．それぞれの立体構造をFig. 2に示す．

R2-2の構造生物学的および生化学的な解析から，ループ部分の1残基（G8）が認識に重要であることが推測されている[1]．さらに，R2-2においてはG8をAに置換しても立体構造は変わらないが，この変異が逆転写活性を抑制することが分かっている[1]．一方，塩基配列および二次構造の比較から，R2-2のG8に対応する残基は，R2-1ではA10であると考えている．なお，このA10をGに置換した変異型（R2-1-G10）について，すでにNMRスペクトルを解析し，R2-1とR2-1-G10の立体構造がほとんど同じであることを明らかにしている[2]．これらのことから，逆転写酵素がR2-1のA10およびR2-2のG8を直接認識していることが示唆されている．

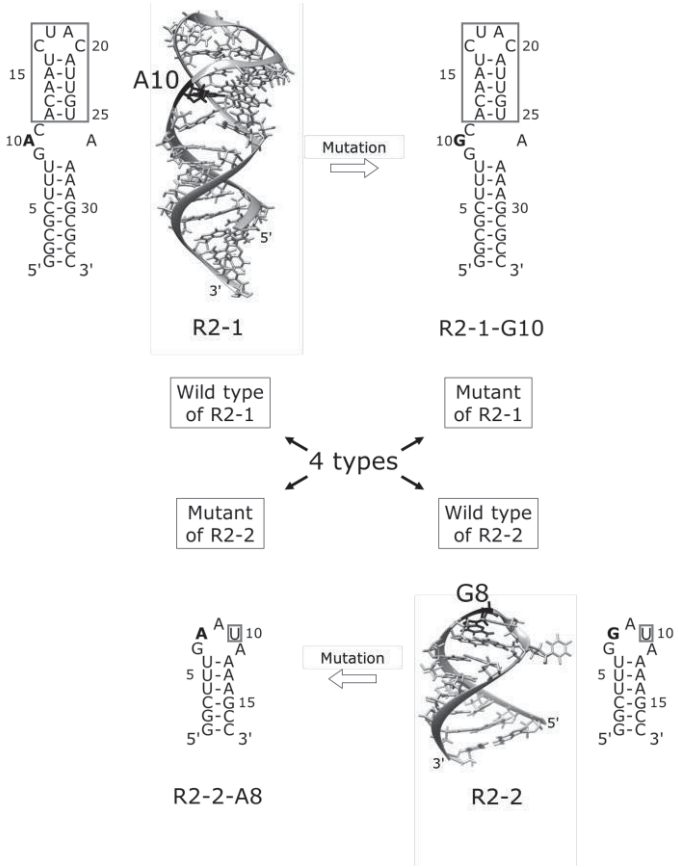


Fig. 2　RNAs used for the NMR analysis, the solution structures of R2-1 (Upper left, PDB ID: 2rvo[2]) and R2-2 (Lower right, PDB ID: 1wks[1])

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]（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ペプチドの立体構造解析について報告する．

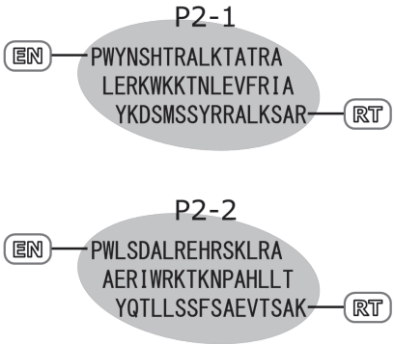


Fig. 3　Peptides used for the NMR analysis, P2-1 (Top) and P2-2 (Bottom)

EN: Endonuclease domain

RT: Reverse transcriptase domain

方法

【RNAとペプチドの相互作用解析】

4種類のRNA（R2-1およびR2-1-G10，R2-2，R2-2-A8，Fig. 2）と2種類のペプチド（P2-1およびP2-2，Fig. 3）を用いて相互作用解析を行った．R2-1およびR2-1-G10は試験管内転写合成法により調製し，R2-2およびR2-2-A8は化学合成法により調製した．ペプチドは北海道システム・サイエンス株式会社に委託して化学合成した非標識ペプチドを用いた．

電気泳動法による相互作用解析は，非変性条件化における12%ポリアクリルアミドゲルを用いて行った. RNA : ペプチドがモル比で1 : 3になるよう調製し, 室温で泳動した. 泳動後, SYBR-GOLD（Thermo Fisher Scientific Inc.）を用いてRNAを染色した.

NMR法による相互作用解析では，RNA : ペプチドがモル比で1 : 1になるよう調製し，NMRスペクトルを測定した．測定は，AVANCE600分光計を用い，288 Kにおいて行った．溶媒は，50 mMの塩化ナトリウムを含む20 mMのリン酸ナトリウム緩衝液（pH 6.5，5% D_2O）を用いた．溶媒のシグナルは，jump-and-return法によって抑制した．R2-1の濃度は，ペプチドを混合する前と後で，それぞれ0.2 mMおよび0.08 mMであった．R2-1-G10の濃度は，ペプチドを混合する前と後で，それぞれ0.1 mMおよび0.05 mMであった.

【標識ペプチドの調製】

大陽日酸株式会社との共同研究として理化学研究所に標識ペプチドの合成を委託した（13-700-007，14-700-012）．標識ペプチドは，無細胞タンパク質合成系を用いてSUMOタンパク質との融合タンパク質として発現させ，精製後にSUMOプロテアーゼによって切断し，SUMOタンパク質を除去することによって調製した．これまでに，単体でのNMRスペクトルの測定および非標識RNAを用いた相互作用解析を行った.

NMRスペクトルの測定は，AVANCE600分光計を用い，288 Kにおいて行った．溶媒は，50 mMの塩化ナトリウムを含む20 mMのリン酸ナトリウム緩衝液（pH 6.5，5% D_2O）を用いた．P2-2の濃度は0.1 mMであった.

結果および考察

【RNAとペプチドの相互作用解析】

R2-1-G10は，R2-1の10番目のA残基をG残基に置換した変異型であり，R2-2-A8はR2-2の8番目のG残基をA残基に置換した変異型である．R2-1およびR2-2において置換した1残基は，それぞれを特異的に認識するために重要であると推測している残基である．この残基がR2-1ではA残基でありR2-2ではG残基であるため，この1残基のみを取り換えることで認識の特異性が変化するのではないかと考え，1残基のみ置換した変異型を調製して解析に用いた.

Fig. 4は，電気泳動法による相互作用解析の結果を示している．RNAとしてはR2-1およびR2-1-G10を用いた．2つのRNAは，単体ではほぼ同じ泳動度を示した．P2-1を混合すると，R2-1およびR2-1-G10の両方において複合体のバンドがみられた．このことから，P2-1は，R2-1およびR2-1-G10の両方に同程度の親和性をもって結合することがわかった．一方，P2-2を混合すると，R2-1に比べて，R2-1-G10においてより強い複合体のバンドが観察された．このことから，P2-2はA10とG10の1残基の違いを識別していることが分かった．このことは，生化学的な実験の結果とも対応していた.

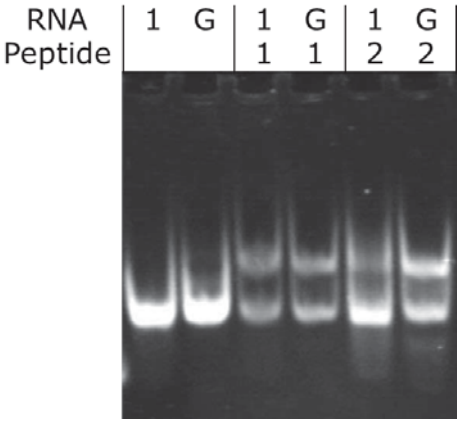


Fig. 4　Gel shift assay

RNA　1: R2-1
　　G: R2-1-G10
Peptide　1: P2-1
　　2: P2-2

次に，電気泳動法において1残基の違いを識別できることがわかったP2-2を用いて，NMR法による解析を行った（Fig. 5）．R2-1およびR2-1-G10のそれぞれのRNAにP2-2を加えてNMRスペクトルの測定を行ったところ，

スペクトルの変化に差が見られた．すなわち, R2-1にP2-2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, R2-1-G10とP2-2の場合には変化が見られた．NMRスペクトルの解析から，R2-1とR2-1-G10の立体構造はほとんど変化していないことが分かっている．したがって，G10がP2-2による認識の特異性に重要であることが示唆された．

P2-2を加えることによって, R2-1-G10の内部ループ周辺の塩基対に由来するシグナル（U6, U7, U23, G24）が変化した．このことは，P2-2が内部ループのG10に相互作用し，内部ループ周辺の構造が変化したことを示唆している．

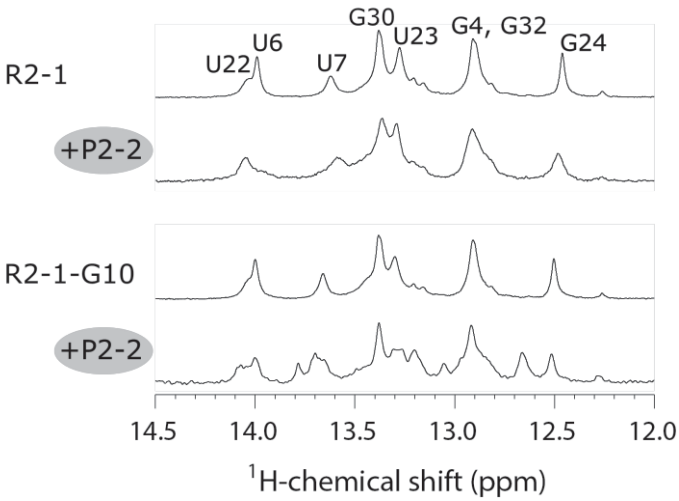


Fig. 5　Interaction of R2-1/ R2-1-G10 and P2-2

【標識ペプチドの調製】

ペプチドの立体構造を効率よく解析するためには, 標識ペプチドを調製し三次元のNMRスペクトルを測定することが有効である．そこで，無細胞タンパク質合成系を用いた標識P2-2の調製方法の開発を試みた．その結果，標識P2-2の^{15}N-^{1}H SQCスペクトルを得ることができた（Fig. 6）．したがって，この手法によって標識ペプチドを調製し，RNAとの相互作用解析に利用することが可能となった．なお，標識P2-1の調製も試みたが，沈殿が生じたために高濃度試料を調製することができず^{15}N-^{1}H SQCスペクトルを得ることができなかった．現在は高濃度試料を得るため，無細胞タンパク質合成系（無細胞くん，大陽日酸株式会社）を用いて標識ペプチドの合成条件の最適化を試みている．

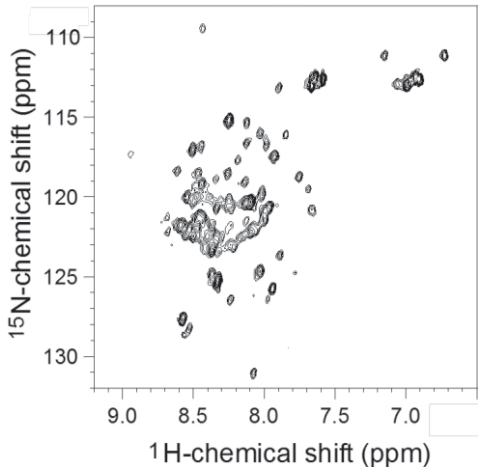


Fig. 6　^{15}N-^{1}H SQC spectrum of P2-2

今後の展望

現在は，R2-2とR2-2-A8を用いた相互作用解析を進めている．また，高濃度の標識ペプチドの調製を試みており，ペプチド単体での立体構造解析も進めている．

今後は，非標識RNAと標識ペプチドを用いた相互作用解析や複合体の立体構造解析を行い，特異的な認識メカニズムの解析を行う．

【引用文献】

1. Baba S. et al., *RNA* **10**, 1380–1387 (2004)
2. 大津ほか，第54回NMR討論会，2015年11月，習志野
3. Hayashi Y. et al., *Nucleic Acids Res.* **42**, 10605-10617 (2014)

P25

RMF mRNA 5'-UTRにおいて1残基の変異がRNA構造およびスペルミジンとの相互作用に与える影響

○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

Effect of a point mutation in RMF mRNA 5'-UTR on RNA structure and interaction of 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, [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 a single mutation between the SD and initiation codon abolishes the translational regulation by polyamine. 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 NMR. It was found that different secondary structures are formed for the wild type and mutant, suggesting that the difference in the secondary structure affects the interaction with Spd.

序論

細胞内において，ポリアミンが遺伝子発現を制御している例が知られており，これらの遺伝子群はポリアミンモジュロンと呼ばれている．Ribosome modulation factor（RMF）遺伝子はその一つであり，翻訳量がポリアミン濃度に依存すること，および，そのmRNAの5'-UTRの1塩基置換によって翻訳量のポリアミン依存性が消失することが確認されている[1)]．そこで本研究では，1残基の変異によるmRNAの構造およびポリアミンとの相互作用の違いを明らかにするため，NMR解析用の複数のRNA断片を調製して，その構造解析およびポリアミンとの相互作用解析を進めている．

方法

【RNA断片の設計】

rmf mRNAのSDおよび開始コドンを含む領域を2種類の二次構造予測プログラム（MFOLDおよびvsfold5）で解析したところ，異なる結果が得られた．これまでにvsfold5の結果に基づいて設計したRNA（RMF52-WT，RMF52-37G，Fig. 1）のイミノプロトンスペクトルの解析から，1残基の違いによって異なる二次構造であることを報告した[2)]．今回はMFOLDの結果に基づいてRMF47-WTおよびRMF47-37Gを設計し，さらに短いRNA（RMF47-WT_SD，RMF-37G_SD）を設計した．

【試料調製およびNMRスペクトルの測定】

RMF47-WTおよびRMF47-37G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．SD配列に含まれるG32を特異的に安定同位体標識したRMF47-WT_SDおよびRMF-37G_SDは，標識アミダイトユニット（大陽日酸株式会社）を用い，化学合成法によって調製した．

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，AVANCE600（ブルカー・バイオスピン）を用いて，288 KでNMRスペクトルの測定を行った．

mRNA, Spermidine, site-specific labeling

○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

結果

RMF52とRMF47について，WTおよび37Gはそれぞれスペクトルが類似していることがわかった(Fig. 2)．なお，RMF52のスペクトルの＊は，5'側に付加したステムループに由来するシグナルである．一方，RMF52とRMF47のいずれにおいてもWTと37Gでは互いにスペクトルが異なっている．したがって，RMF52とRMF47は類似した二次構造を形成し，C37G変異による影響も共通であることが示唆された．

RMF47-WT_SDとRMF-37G_SDでは共通のシグナルが観測された．また，^{1}H-^{15}N HMQCスペクトルにおいて，残基特異的に標識したG32に由来するシグナルの位置が一致した．すなわち，RMF47-WT_SDとRMF-37G_SDは同様な二次構造を形成しており，Fig. 1のRMF-37G_SDに示されている二次構造を形成している可能性が高いことがわかった．なお，RMF-37G_SDのG32に由来するシグナルが2組観測されたことから，このRNAは多型であり，その一方がRMF47-WT_SDに似た構造であった．

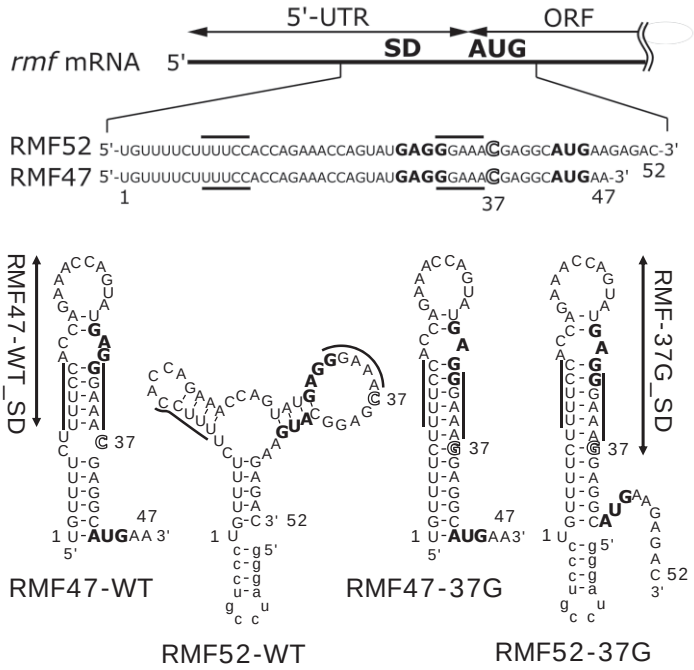


Fig. 1　RNAs used for the NMR analysis

考察

RMF52-WTとRMF47-WTは同様の二次構造を形成し，どちらにおいてもC37Gの1残基変異により二次構造が同様に変化していることが示唆された．一方，RMF47_SDは互いに異なる二次構造となるように設計したが，同じ二次構造を形成していた．このことから，*rmf* mRNAのSDおよび開始コドンを含む領域は，vsfold5によって予測された二次構造（Fig. 1のRMF52）を形成している可能性がある．

現在は，NMR法およびゲルシフト法によってスペルミジンとの相互作用についても解析を進めており，1残基変異が*rmf* mRNAの構造に与える影響と合わせて報告する．

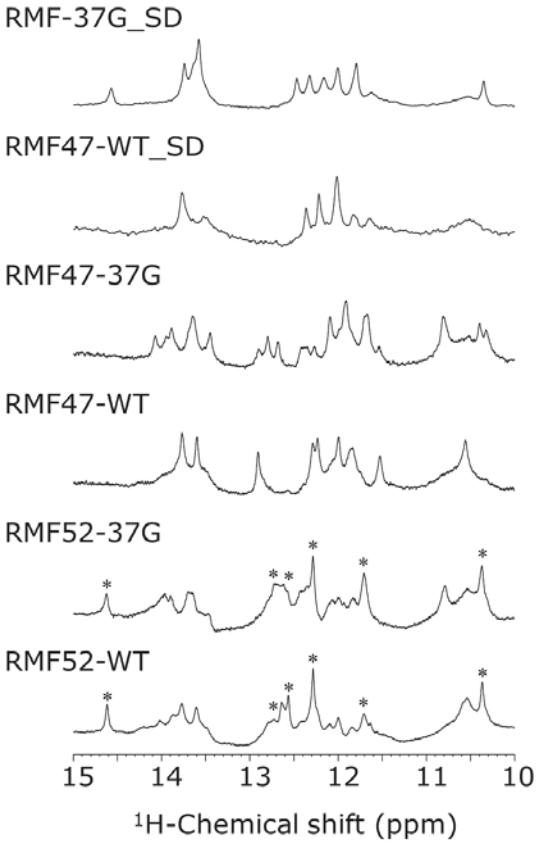


Fig. 2　600 MHz ^{1}H-NMR spectra

引用文献

1) Terui, Y. et al., *J. Biol. Chem.* **285**, 28698-28707 (2010).

2) 佐原ほか, 第54回NMR討論会, 2015年11月, 習志野.

P26

*Cyclin D1*遺伝子転写制御やテロメア長制御に関わるTLS/FUSタンパク質と非コード核酸間の相互作用のNMR法による解析

○近藤 敬子[1]，真嶋 司[1,2]，大吉 崇文[3]，米田 竜馬[4]，黒川 理樹[4]，
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・エネルギー科学研究科
[3]静岡大学・理学部
[4]埼玉医科大学・ゲノム医学研究センター

NMR analysis of interaction of TLS/FUS and non-coding RNA/DNA, a key event for regulation of *CCND1* transcription and telomere shortening

○Keiko Kondo[1], Tsukasa Mashima[1,2], Takanori Oyoshi[3], Ryoma Yoneda[4], Riki Kurokawa[4], Takashi Nagata[1,2], Masato Katahira[1,2]
[1] *Institute of Advanced Energy, Kyoto University*
[2] *Graduate School of Energy Science, Kyoto University*
[3] *Department of Chemistry, Shizuoka University*
[4] *Research Center of Genomic Medicine, Saitama Medical University*

Translocated liposarcoma protein (TLS/FUS) plays crucial roles in the regulation of *cyclin D1* (*CCND1*) transcription and telomere lengthening via interactions with non-coding RNA and DNA. In these two regulation processes, structural basis of RNA and DNA recognition by TLS are still unexplained. TLS is tethered to the *CCND1* promoter region by promoter-associated non-coding RNA (pncRNA). We determined secondary structure of TLS-binding motif (pncRNA-1-1) in pncRNA. Furthermore, Our NMR analysis revealed that the third RGG motif (RGG3) of TLS preferably interacts with single-stranded region of pncRNA-1-1. RGG3 also interacts with G-quadruplexes of telomeric DNA (telo) and telomeric repeat-containing RNA (TERRA) to form ternary complex. We identified the guanine residues involved in binding with RGG3. Triple-resonance NMR experiments proved that both Phe and Tyr can interact with both telo and TERRA. Phe and Tyr are the central players for the recognition of telo and TERRA, respectively. Based on these results, we propose models of binary and ternary complexes of RGG3 with telo and TERRA.

［序論］

TLSは様々な遺伝子の発現やゲノム維持の制御に携わる核酸結合タンパク質である。近年TLSが*CCND1*の転写やテロメア伸長の制御に関わることが報告された。どちらの制御においても、TLSが機能を発揮する上で鍵となるのは非コードRNAやDNAとの結合である。しかし、TLSによる非コードRNAやDNAの認識に関する構造基盤は明らかにされていない。

TLSは*CCND1*の上流から転写されるpncRNAとの結合をきっかけにヒストンアセチル基転移酵素 (CBP/p300)の活性を阻害する[1]。我々はpncRNAのTLS結合領域 (pncRNA-1-1)についてNOESYにより二次構造を同定した。またTLSのZnFドメインおよび三番目のRGGドメイン (RGG3)が、pncRNA-1-1のステムループ構造と一本鎖領域にそれぞれ結合することを明らかにした。

天然変性タンパク質，非コードRNA，タンパク質-核酸相互作用

○こんどうけいこ，ましまつかさ，おおよしたかのり，よねだりょうま，くろかわりき，ながたたかし，かたひらまさと

他方TLSはRGG3を用いてTeloおよびTERRAが形成するグアニン四重鎖 (Telo-qおよびTERRA-q)と三者複合体を形成し、テロメア上にヒストンメチル基転移酵素をリクルートする[2]。特にRGG3のPheに富むC端領域とTyrに富むN端領域がそれぞれTelo-qおよびTERRA-qの結合に重要である[3]。我々はこれらの分子における結合部位をNMR法で同定した。さらに、天然変性領域（IDR）であるRGG3が二つの四重鎖構造を特異的に認識するモデルを構築することに成功した。

[結果・考察]

初めに、NOESYを用いてpncRNA-1-1が5'側に一本鎖領域、3'側にステムループ構造を持つことを明らかにした[4]。TLSはC端領域でpncRNA-1-1と結合する。この領域の各種断片化タンパク質について結合能を検証した。二つの領域、ZnFとRGG3が特に重要であり、これらについて^{15}N標識体を作製し、pncRNA-1-1を添加する滴定実験を行った。主鎖アミドの化学シフト摂動解析(CSP)からZnFとRGG3のどちらもpncRNA-1-1に結合することが示された。解析では、pncRNA-1-1を一本鎖領域とステムループ領域に断片化したものも用いることで、相互作用部位を正確に同定した。以上の結果、ZnFとRGG3はそれぞれステムループ領域と一本鎖領域に結合し、これにより高い結合能・認識能がもたらされていることが明らかになった (Fig. 1)。

TLS と四重鎖との結合に関しては、まず RGG3:telo-q および RGG3:TERRA-q 二者複合体の解析を行った。RGG3 添加に伴う、telo-q および TERRA-q のイミノプロトンの CSP から結合に関わるグアニン残基を特定した。逆に ^{13}C,^{15}N 標識化 RGG3 に Telo-q あるいは TERRA-q を添加する滴定も行い、RGG3 側の相互作用部位の同定を行った。この際、主鎖 ^{1}H^{N},^{15}N のシグナルは他核多次元 NMR 実験により帰属した。滴定の結果、Telo-q と TERRA-q のどちらに対しても、Y479, Y484, F494, F506 の周囲のアミノ酸残基が結合することが分かった。続いて、RGG3:telo-q:TERRA-q 三者複合体の解析を行った。その結果、三者複合体では F494 と Y479 がそれぞれ Telo-q と TERRA-q に結合することが明らかになった。IDR である RGG3 はシグナルの重なりが激しく、また滴定に伴う広幅化のため、解析が困難であった。そこで RGG3 を断片化した N 端領域の ^{13}C,^{15}N 標識体を調製し、解析の高効率化と高精度化を図った。その結果、Y479 だけでなく Y484 も TERRA-q の方へ結合することが分かった。従って、二者複合体と三者複合体のどちらの場合も四重鎖との結合を担うアミノ酸残基は同一であるが、Phe が Telo-q、Tyr が TERRA-q に優先的に結合することで三者共存下での三者複合体形成をもたらすことが明らかになった。以上の結果から、テロメア短縮に繋がる三者複合体のモデルを構築した (Fig. 2)。

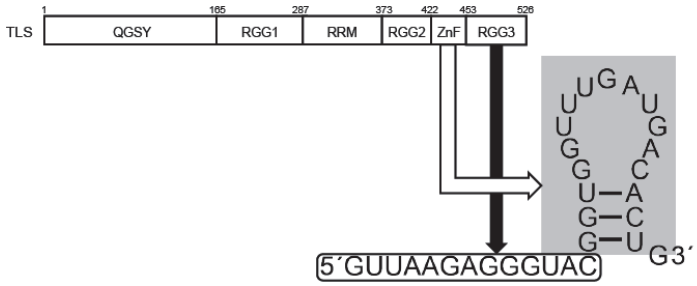


Fig. 1. Mode of interactions between TLS and pncRNA for high affinity and discrimination

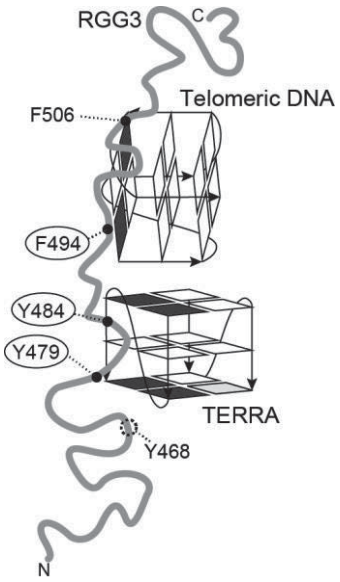


Fig. 2. Schematic structure of RGG3:telo-q:TERRA-q ternary complex

References

[1] Wang et al., *Nature*, 2008, 454, 126-130; [2] Takahama et al., *Chem. Biol.*, 2013, 20, 341-350; [3] Takahama et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 2013, 135, 18016-18019; [4] Yoneda et al., *Cell Biosci.*, 2016, 6, 4.

P27

転写共役因子天然変性領域（IDR）の低存在率構造と核内受容体の結合能の相関解析

○伊藤慎一郎[1]，栃尾尚哉[2]，中嶋直大[1]，楯真一[1,2]
[1]広島大学・大学院・理学研究科
[2]広島大学・クロマチン動態数理研究拠点(RcMcD)

Functional roles exerted by the low population structures in the intrinsically disordered region (IDRs) of the co-activator protein

○Shin-ichiro Ito[1*], Naoya Tochio[2], Naohiro Nakashima [1], and Shin-ichi Tate[1,2]
[1] *Department of Mathematical and Life Sciences, Graduate School of Science, Hiroshima University*
[2] *Research Center for the Mathematics on Chromatin Live Dynamics (RcMcD), Hiroshima University*

Steroid Receptor Coactivator-1 (SRC1) interacts with a nuclear receptor, PPARγ, in a ligand-dependent manner and regulates the transcriptional activation. SRC1 is known to be an intrinsically disordered protein, while PPARγ-binding site of SRC1 is also known to adopt the helical structure upon PPARγ-binding. Our previous study demonstrated that PPARγ-binding site of SRC1 showed about 10% helix structural probability even in the absence of PPARγ. However, it has been unclear how the low-probability structural components contribute to PPARγ-binding. In this study, we prepared a series of PPARγ-binding site mutants those showed the distinct structural probabilities evaluated by the backbone chemical shift values, and we examined the PPARγ-binding-affinity of each mutant using Time-Resolved Förster Resonance Energy Transfer (TR-FRET) method. Our results showed that the transient structural stability of SRC1 was engaged in PPARγ-binding-affinity.

核内受容体タンパク質PPARγは多様な骨格構造をもつ化合物を基質として認識し，結合した基質に応じてリクルートする転写共役因子を替えて脂肪酸代謝や脂肪細胞分化を制御する．しかしながら，PPARγが示す基質の化学構造に依存した転写共役因子のリクルート制御についてはほとんど理解されていない．我々は基質に依存したPPARγの構造変化の解析に加えて，転写共役因子側の構造の特徴を研究してきている．本研究では，転写共役因子SRC1に着目した．

これまでの研究で，SRC1のPPARγ結合部位は天然変性領域であり，非結合状態では安定な立体構造を持たないが，PPARγとの結合の際にヘリックス構造が誘導されることが知られている(Fig. 1).

我々は，SRC1のPPARγ結合領域が非結合状態においても約10%の低い存在率でヘリックス構造をとることを見出している．また，この低存在率構造が基質の化学構造に応じたSRC1のリクルート制御に関わる可能性を報告している[1)]．本研究では，SRC1のPPARγ結合部位周辺に変異を導入し, NMRによる低存在率構造の評価と時間分解蛍光－Förster共鳴エネルギー転移法（TR-FRET）による相互作用解析を行い，非結合状態でSRC1が示す低存在率構造のPPARγ結合における役割を解析した．

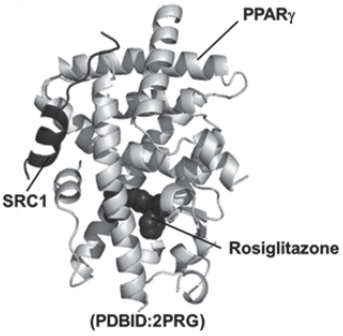


Fig. 1. Complex assembly of PPARγ - SRC1

SRC1，天然変性領域（IDRs），低存在率構造

○いとうしんいちろう，とちおなおや，なかしまなおひろ，たてしんいち

我々は，SRC1のPPARγ結合部位（LxxLLモチーフ；xは任意のアミノ酸）の低存在率ヘリックス構造を安定化していると考えられる残基に変異を導入した．変異によって疎水性コアを崩す（ヘリックス構造の存在率を減少させる）ような変異体を作成することで，PPARγとの結合能の減少が見出せると考えた．SRC1の各変異体を用いて主鎖帰属用測定を行い，得られた化学シフト情報を用いて残基レベルの二次構造存在率をδ2D法[2)]を用いて評価した．期待されたとおりLxxLLモチーフ付近の二次構造存在率は変化した（Fig. 2）．
これらの変異体に対し，TR-FRETを用いてPPARγとSRC1の定量的な相互作用解析を行った．全てのSRC1変異体において，野生型に比べPPARγとの解離定数K_dの増加が観測された（Fig. 3）．しかしながら，ヘリックス構造の存在率とK_d値には相関は見られなかった．

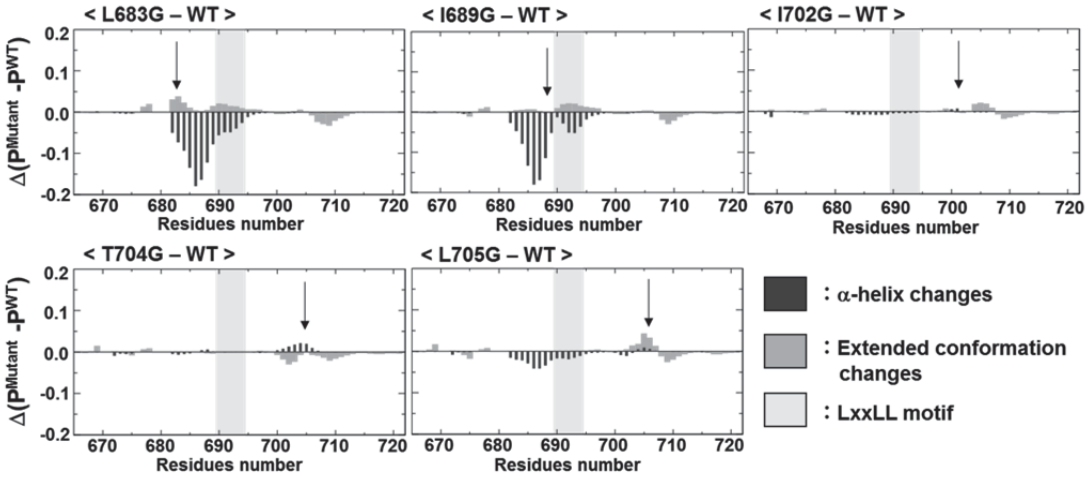


Fig. 2. Secondary structural probability changes of SRC1 mutants (Non-LxxLL motif mutations)

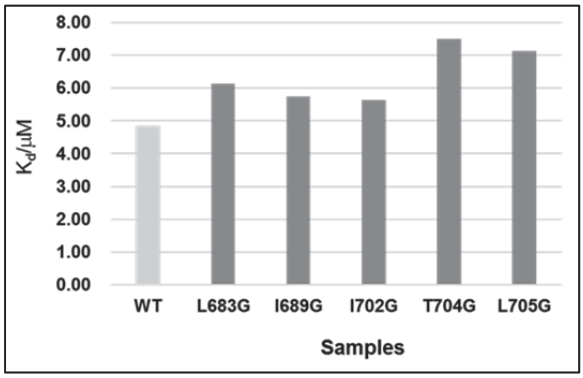


Fig. 3. Binding affinity of SRC1 to PPARγ

本研究で我々は，SRC1のPPARγ結合部位の低存在率構造に変化を与える変異体の作成に成功した．また，全ての変異体のPPARγ結合能が野生型に比べて減少したことから，LxxLLモチーフ周辺の構造安定性が変化することによってPPARγ結合能が変化することを示した．しかし，当初期待されていた，低存在率ヘリックス構造の存在率だけでPPARγ結合能の変化を説明することはできないということがわかった．今後は，PPARγ結合部位の特定の領域または特定の残基の低存在率構造に着目することでPPARγ結合能との相関を見出したいと考えている．

引用文献

1) S. Tate. (2013) *SEIKAGAKU*, 85, 638-645

2) Camilloni, C., De Simone, A., Vranken, W.F., & Vendruscolo, M. (2012) *Biochemistry*, 51, 2224-2231

P28

C:G塩基対を選択的に認識する人工塩基を含む三重鎖DNAの構造解析

○真嶋司[1,2]、岡村秀紀[3]、王磊[3]、谷口陽祐[3]、佐々木茂貴[3]、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、
[3]九州大学大学院薬学研究院

Structural analysis of triplex DNA containing an artificial nucleoside which selectively recognizes the C:G base pair

○Tsukasa Mashima[1,2], Hidenori Okamura[3], Lei Wang[3], Yosuke Taniguchi[3], Shigeki Sasaki[3], Masato Katahira[1,2]
[1] Institute of Advanced Energy, Kyoto University, [2] Graduate School of Energy Science, Kyoto University, [3] Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University

Triplex-forming oligonucleotide (TFO) that binds to DNA in a sequence specific manner has the potential to become therapeutical applications. However, the sequence of target DNA is limited to a homopurine-homopyrimidine duplex. Dr. Okamura developed an artificial nucleosides that selectively recognizes the inverted C:G base pair within homopurine strand. In this study, we have performed structural analysis of triplex DNA containing the artificial nucleoside. Screening of triplex DNA which exists in a single-conformation was conducted by ^{1}H NMR spectra. ^{1}H-^{15}N-HSQC spectra at natural abundance showed the possibility of alternative structure of base triplet that was not anticipated.

序論

人工核酸を用いる遺伝子治療法の中に、アンチジーン法と呼ばれるものがある。この方法は、人工的に設計された三重鎖形成オリゴ核酸(Triplex-forming oligonucleotide, 以下TFO)を標的二重鎖DNAに結合させることで三重鎖構造を形成させて、その標的部位の遺伝子を不活化させる方法である。しかし天然の核酸塩基によって安定な三重鎖構造を形成させるには、標的DNAの配列がホモプリン:ホモピリミジン領域に制限されてしまう問題があった。九州大学の岡村博士等はC:G塩基対を選択的に認識する擬シチジン誘導体を合成した[1] (Fig. 1)。この誘導体をTFOに導入することで、C:G塩基対を1つ含むホモプリン:ホモピリミジン二重鎖DNAに対してもTFOを選択的かつ安定に結合させることに成功した。本研究では、この擬シチジン誘導体を含む三重鎖DNA (以後Triplex DNA)の溶液NMRスペクトルを測定・解析し、擬シチジン誘導体とC:G塩基対が形成するトリプレット構造を明らかにすることを目指した。

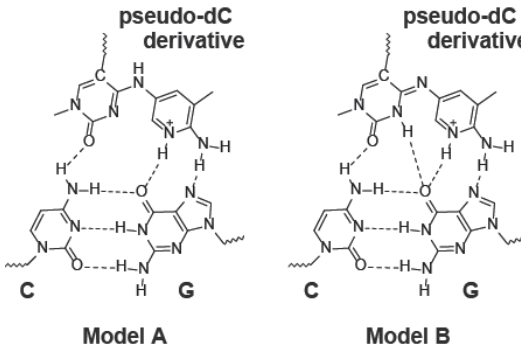


Fig. 1. Putative models of recognition of the C:G base pair by pseudo-dC derivative.

立体構造，三重鎖核酸，人工塩基

○ましまつかさ，おかむらひでのり，わんれい，たにぐちようすけ，ささきしげき，かたひらまさと

方法

Triplex DNAは化学合成法によって調製した。配列の末端残基や、DNA鎖を繋ぐリンカーの種類を系統的に変化させ、最も性質の良い物を選んだ。選ばれたDNAを濃度500 μMあるいは 1 mMとなるように95/5% H2O/D2OあるいはD2O中に溶解させた。これらのサンプルをAVANCE III HD 600 MHz (ブルカー・バイオスピン社)を用いて、^{1}H NMRスペクトル、^{1}H-^{1}H NOESYスペクトル、DQF-COSYスペクトル、TOCSYスペクトル、^{1}H-^{13}C HSQCスペクトルおよび^{1}H-^{15}N HSQCスペクトルを測定した。

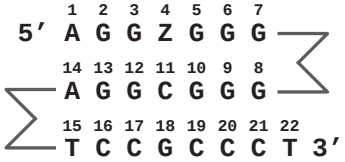


Fig. 2. The sequence of the triplex DNA containing pseudo-dC derivative. The derivative is indicated by Z.

結果と考察

Triplex DNAの構造解析を始めるにあたり、最も性質の良い配列のスクリーニングを行った。10数種類のTriplex DNAについて、イミノプロトンの領域の^{1}H NMRスペクトルを観測した。ここで共鳴線の本数と各共鳴線の分離の良さを評価し、3つまで配列の候補を絞り込んだ。候補となる3つのTriplex DNAについて、TOCSYスペクトルによるC残基のH5-H6相関シグナルおよび^{1}H-^{13}C HSQCスペクトルによるA残基のH2-C2相関シグナルを観察した。3つのDNAのうち2つは配列中の各残基数よりシグナルの本数が多いため、立体構造に多型性があるとわかった。残る1つは配列中の各残基数とシグナルの本数が一致することから、多型性のない構造解析に適した配列を見出すことに成功した。このTriplex DNAの配列は、G7残基とG8残基およびA14残基とT15残基の間をエチレングリコール系のリンカーによって繋いだものであった (Fig. 2)。

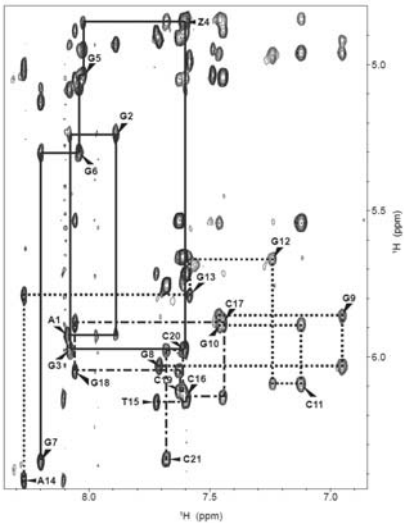


Fig. 3. Sequential assignment of triplex DNA. Solid line, dotted line and dashed line indicates H6/H8-H1′ connectivities of the residues 1-7, 8-14 and 15-21, respectively.

得られたTriplex DNAの共鳴線の帰属を行った。本DNAは3つのDNA鎖が2つのリンカーによって繋がれているため、H6/H8-H1′の連鎖帰属は途中で途切れてしまうが、3′末端のT22を除いて各鎖の連鎖帰属が出来た。現在H5′/H5″を除く非易動性プロトンの90%以上を帰属出来た。

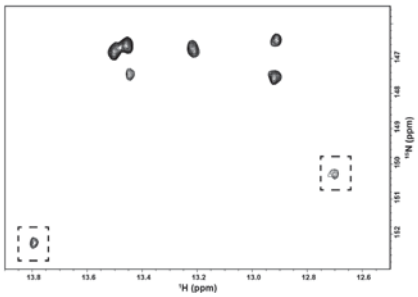


Fig. 4. ^{1}H-^{15}N HSQC spectrum of triplex DNA.

擬シチジン誘導体とC:G塩基対によって形成されるトリプレット構造についての情報を得るため、^{1}H-^{15}N HSQCスペクトルを測定した。本DNAには^{15}N安定同位体標識を施していないため、^{15}N核は天然存在比でしか存在しない。しかし良好なスペクトルが得られ (Fig. 4)、擬シチジン誘導体由来と思われる^{1}H-^{15}N相関シグナルが2つ観測された (Fig. 4 囲み)。当初はFig. 1のモデルAのようなトリプレット構造を想定していたが、シグナルが2つあることからFig. 1のモデルBのトリプレット構造を形成している可能性を見出した。

References

(1) Okamura, H., Taniguchi, Y. and Sasaki, S. (2016) Aminopyridinyl–Pseudodeoxycytidine Derivatives Selectively Stabilize Antiparallel Triplex DNA with Multiple CG Inversion Sites. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*in press.

P29

NMR を用いた汗のメタボロミクスと皮膚表在微生物叢

○筒井 聡志 [1]，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

NMR-based human sweat metabolomics and skin microbiome

○Satoshi Tsutsui[1], 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 metabolomics enables to find important knowledge because of high comprehensiveness and easy handling of sample preparations. Especially in the study of metabonomics on human, many researchers focused on plasma, urine and feces as non-invasive sample because those biological samples were known as closely connected to systemic metabolisms and their products circulated through the body. Similarly, human sweat is known as closely connected to the systemic metabolisms like plasma and urine. However, there were few reports on sweat study using NMR. In this study, we evaluated the metabolic fluctuations between intra- and inter-individuals with annotating the signal derived from human sweat. In addition, we collected and analyzed skin microorganism that is supposed to have close relationships with sweat. The evaluation and characterization of sweat samples by NMR and Miseq measurements with multivariate analyses revealed metabolic and microbial features that were characteristic of each part in human body.

【序論】

近年、NMR や MS、次世代シークエンサーなどといったハイスループット機器の急速な発展により、網羅的なデータ取得が比較的容易となり、統計的な手法と組み合わせてトップダウン的に、あるいはデータ駆動的に関係性を明らかにする研究手法が盛んに用いられるようになってきた。中でも代謝物に重きを置いた代謝動態解析はメタボロミクス（あるいはメタボノミクス）と呼ばれ、高い網羅性とサンプル調製の簡便性から、NMR は当該研究において広く用いられている。[1] とりわけ当該分野において、ヒトや実験動物を主対象とした研究が最も盛んに行われており、健康状態の把握や病気の診断・疾患マーカーの探索などに応用されている。[2] これらの研究の多くは血液や尿、糞便といった生体試料が好んで使われているが、ヒト由来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、既存報告に無い試料を対象として NMR 分析することで新たなバイオマーカー等の発見に繋がるのではないかと考えた。そこで本研究では、尿や糞便などと同様に非侵襲的な採取が可能で、且つ血液から即時に産生・排出され、尿や糞便などよりもより短い期間の体内環境を反映することが期待できる汗に注目し、汗のメタボノミクスにより個体内変動等の評価可能性について検討した。また、汗と関係性が高いことが知られている皮膚表在微生物叢についても次世代シークエンサーを用いて分析し、NMR で得られた代謝物と次世代シークエンサーによって得られた微生物を統合的に解析することで、汗中代謝物と皮膚表在微生物の関係性について評価することを目的とした。

汗、メタボノミクス、データマイニング

○つついさとし，だてやすひろ，きくちじゅん

【実験】

汗の採取には、セルロース由来の吸水シートを用いて行い、複数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。採取した汗サンプルは独自に最適化した汗抽出プロトコルを用いて前処理を行い、NMR 測定を行った。得られたデータを数値化した後、フリーの統計解析ソフトウェアである R を用いて多変量解析等を行った。また、HSQC などシグナル帰属用の測定では、前述の採取法とは異なり汗を液体のまま採取し、凍結乾燥を行う事で高濃度の汗サンプルに調整したものを用いた。シグナル帰属は ^{1}H-^{1}H TOCSY、2D-*J*res、HSQC および HSQC-TOCSY 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る SpinCouple や SpinAssign など[3]を用いるとともに、既存報告論文も参考にした[4-5]。皮膚表在微生物叢については、セルロース由来の swab（無菌綿棒）を用いて採取を行い QIAGEN 社の DNA 抽出キット[6]を用いた。抽出された DNA は次世代シークエンサーの一種である Miseq を用いて分析を行った。得られたデータは数値化し、NMR サンプルと同様に R を用いて解析した。

【結果・考察】

NMR による代謝物の一斉解析の結果、各種アミノ酸や乳酸を始めとした有機酸など幅広い物質の帰属を行うことが出来た(Fig. 1)。また、多変量解析等を行うことで個体内外変動の可視化を試みた結果、採取部位の違いによる変化は比較的クラスタリングされる傾向にあったが、個人の違いに起因する個体間変動については大きな違いが見られなかった。

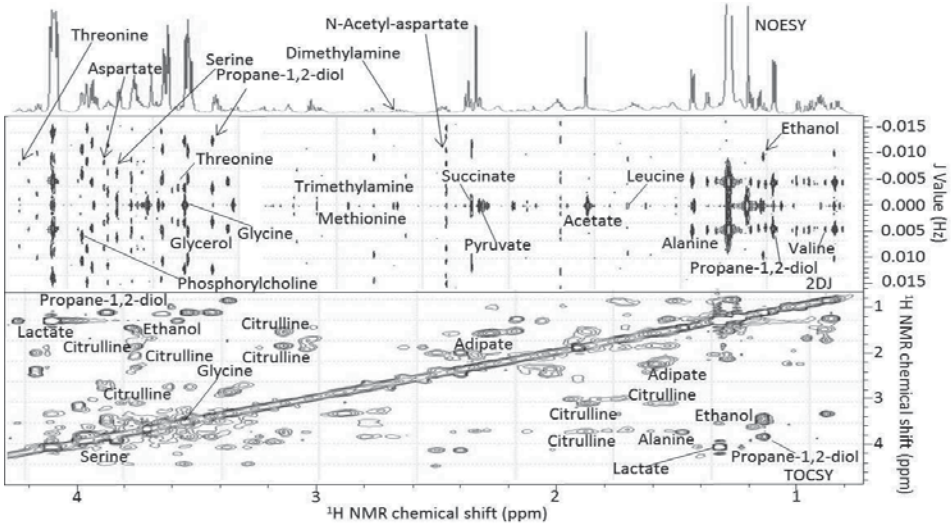


Fig. 1 Annotation of metabolites based on 1D-NOESY, 2D-*J*res, and TOCSY spectra of human sweat collected from eccrine and apocrine grands.

また、次世代シークエンサーによる皮膚表在微生物叢の解析結果より、皮膚及び汗中には 200 種を超える微生物がおり、Proteobacteria や Actinobacteria などが多く存在していることが分かった。また、代謝物と同様に多変量解析を行った結果、足と腕、顔と首では比較的似たような微生物叢プロファイルを示した。さらに、代謝物データと皮膚表在微生物叢データを統合し相関解析等を行うことで両者の関係性について明らかにした。本会では皮膚表在微生物叢とヒトの発汗代謝活動の関係性について議論したい。

【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) Chikayama, E.; et al., *Anal Chem* **2010**,*82*,1653-1658.

(4) Harker, M.; Coulson, H.; Fairweather, I.; Taylor, D.; Daykin, C. A. *Metabolomics* **2006**, *2*, 105-112.

(5) Kutyshenko, V. P.; Molchanov, M.; Beskaravayny, P.; Uversky, V. N.; Timchenko, M. A. *PLoS One* **2011**, *6*, e28824.

(6) Kimberly A.; et al., *Journal of Investigative Dematology* **2011**, *131*, 2026-2032.

P30

天然変性領域を介した動的なドメイン協働による基質認識機構の解明

○川嵜 亮祐[1]，栃尾 尚哉[2]，楯 真一[1,2]
[1]広島大学・理学研究科・数理分子生命理学専攻
[2]広島大学・クロマチン動態数理研究拠点(RcMcD)

Enhanced substrate binding through the inter-domain dynamics linked by the intrinsically disordered region (IDR)

○Ryosuke Kawasaki[1], Naoya Tochio[2], Shin-ichi Tate[1,2]
[1] *Department of Mathematical and Life Sciences, Graduate School of Science, Hiroshima University*
[2] *Research Center for the Mathematics on Chromatin Live Dynamics (RcMcD), Hiroshima University*

Intrinsically disordered regions (IDRs) in proteins have become known to play important roles in exerting functions. In this work, we will report a new role of IDR that regulates the inter-domain communication among the folded domains linked by IDR. Peptidyl prolyl isomerase, Pin1 has two folded domains linked by a 10-residue long IDR. Pin1 has 1000-fold amplified affinity to bivalent ligand over the single site ligand. We found the affinity enhancement in binding to the bivalent ligand is achieved by the inter-domain ligand migration mechanism, in which IDR plays as 'fly-casting'. IDR linking the folded domains is not just a tethering rope, instead it *per se* has the optimized structural feature for efficiently capturing the ligand. This IDR-mediated mechanism is essential for Pin1 to grasp the phosphorylated target existing in small amount in cells.

天然変性領域(IDR)が持つ様々なタンパク質機能に対する役割が近年明らかになりつつあり，安定な立体構造を持つ部位の構造解析を主として発展してきたタンパク質構造生物学において，新しい概念として研究が盛んに行われている．しかし，タンパク質機能上のIDRの役割や必要性，またそれらを担うメカニズムについては未だに新たな側面が明らかにされつつある．本研究では，二つの安定構造を持つドメインが10残基からなる柔軟なリンカーでつながった構造を持つ酵素Pin1を対象とし，IDRを介して2つのドメインが協奏的に働くことで効率的な基質認識を実現することを示している．

プロリン異性化酵素Pin1は，リン酸化Ser/Thr-Proモチーフを特異的に認識し，モチーフ中のプロリンの*cis/trans*構造の異性化を触媒する．Pin1は酵素活性ドメインと基質結合ドメイン，またそれらをつなぐ構造を持たない10残基のリンカー(IDR)から構成されるマルチドメインタンパク質であり(Figure1)，その特徴的な構造から，溶液中では2つのドメインが独立して運動していることが知られている．先行研究により酵素活性ドメイン単体でも酵素活性を持つが，細胞中での正しい機能は失われることが示されている[1].

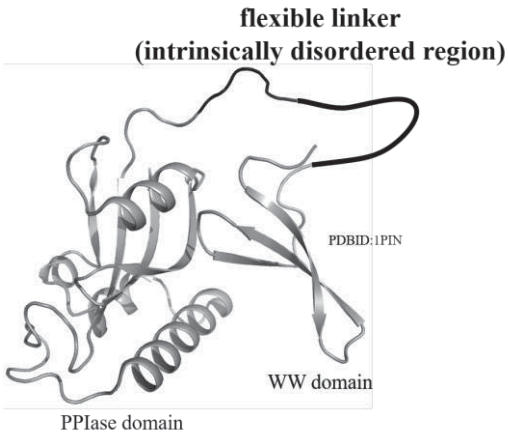


Figure1: Pin1 has PPIase domain and WW domain, and two domains are linked by flexible linker (IDR)

天然変性領域(IDR)，ドメイン間ダイナミクス，マルチドメインタンパク質

○かわさき りょうすけ，とちお なおや，たて しんいち

このPin1において，2つのドメインそれぞれに特異的な結合サイトを有する二価型リガンド[2]に対する結合力が，結合サイトが1つのものと比べて約1000倍も向上することが示された．NMR滴定測定でのスペクトル変化から(Figure2)，このリガンドに対する結合様式が単純な結合―非結合でないことは明らかである．

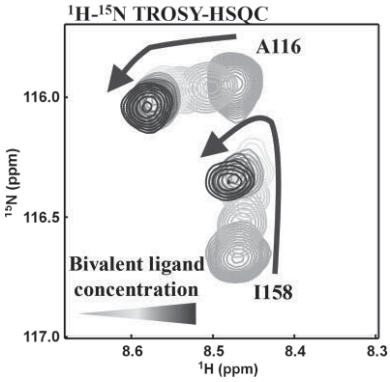


Figure2: NMR titration measurement using bi-valent ligand shows curvature peak shifting

様々なNMR測定結果をもとにした解析から，この結合力の向上が一般的なアロステリック効果によるものではなく，IDRを介した2つのドメインの協奏的な働きによって引き起こされる，リガンドのドメイン間相互移行によるものであることを明らかにした．(Figure3)

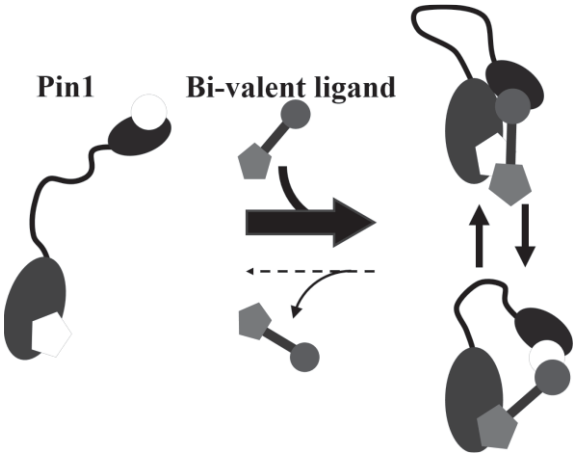


Figure3: Model figure of ‘inter-domain ligand migration’ mechanism to improve the affinity against Bi-valent ligand

さらに，2つのドメインをつなぐ天然変性領域の一連の変異体を用いた測定結果から，効率的なリガンドのドメイン間相互移行が，IDRの長さ，構造上の堅さが適切に保たれていることで実現していることも示された．

本研究では，IDRの構造柔軟性が効率的なドメイン間コミュニケーションを可能とし，Pin1の基質認識能が向上することを示した．リガンドのドメイン間移行機構は，基質が極めてわずかにしか存在しない細胞中において，効率的に基質を探し出しPro異性化を行うためには合理的な機構である．今回明らかにした機構は，ドメイン間をつなぐIDRが持つ新たな機能上の役割といえる．

References

[1] Pei-Jung Lu, et al., *Science* 283, 1325-1328 (1999)
[2] Sebastian Daum, et al., *J. Mol. Biol.* 374, 147-161 (2007)

P31

NMRによる多様な水産資源のビックデータ解析に基づく代謝・物理特性の総合評価

○魏菲菲[1]，福地実[2]，朝倉大河[1,2]，坂田研二[1]，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

NMR-based comprehensive evaluation of metabolic and physical characteristics of the diversified aquatic resources

○Feifei Wei[1], Minoru Fukuchi[2], Taiga Asakura[1,2], Kenji Sakata[1], 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.

The surrounding marine zones of Japan is one of the three major fishing grounds in the world, which hold extremely high productivity but a low level of resource evaluation at present. In this report, we focused on the marine resource evaluation including a wide variety of fish using nuclear magnetic resonance (NMR)-based metabolomics and physical characteristics. Solution NMR measurements were performed on the muscle tissue extracts of more than 200 species of fish. The spin-spin relaxation time and the physical solidity of selected typical fish muscle tissues were measured using NMR and autograph, respectively. The data mining were performed using many statistical techniques such as principle component analysis and discriminant analysis. The correlation between NMR-based metabolic fingerprints and physical solidity property were evaluated using predictive analysis as well as machine learning to comprehensively evaluate the diversity of marine fish resources.

【背景・目的】

日本は海洋大国であり、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。そこで我々はこの多様性豊かな水産資源に対し、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（1-4）。その一端として本研究では、多種多様な海産魚類の筋肉中代謝物および物性から化学・物理プロファイルの違いとその関係性を評価することに着目した。

【材料・方法】

本研究では日本近海から合計200種以上、1000個体以上の魚類を収集した。得られた多種多様な魚類の筋肉から溶液（700MHz）NMRを用いて代謝プロファイル（watergate, 2D-Jres, diffusion edited）と横緩和（^{1}H-T_2）減衰曲線（CPMG）を計測するとともに、オートグラフを用いて魚肉の食感と関わる硬度（solidity）を計測した。また、逆ラプラス変換法によりT_2緩和分布を求めるとともに、主成分分析（PCA）や相関分析などの統計学的手法を用いて、魚類筋肉の物理特性とNMRで観測された代謝・緩和時間プロファイルの関係性について評価した。

【結果・考察】

CPMG法で得られた多様な魚類筋肉の^{1}H-T_2減衰曲線から逆ラプラス変換によりT_2緩和分布

魚類多様性、物理特性、緩和時間、代謝プロファイリング

○うぇいふぇいふぇい，ふくちみのる，あさくらだいが，さかたけんじ，だてやすひろ，きくちじゅん

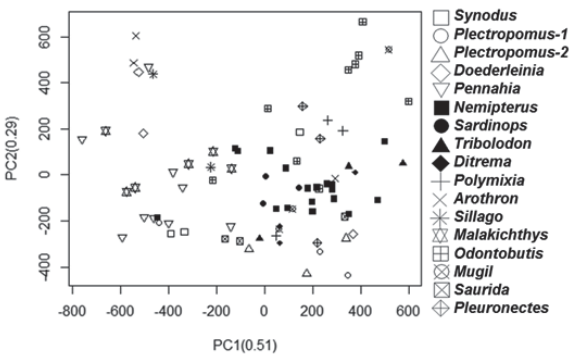


Figure 1. PCA score plot of T_2 relaxation distributions for muscle of typical fish genus

を求め、PCAで評価した（Figure 1）。Figure 1で示されたように、魚類筋肉のT_2分布は魚の種類ごとに特徴的なプロファイルを示した。また、オートクラブで計測した魚類筋肉の硬度分布から、筋肉の硬度も魚の種類によって異なることが確認された（Figure 2）。

さらに、魚肉のT_2分布では大きく二つのwater poolに由来するピークが観測された（Figure 3(A)）。魚の筋肉の場合では、T_2-1の横緩和時間を持ち、強度I-1を示すwater poolである20-80 msのピーク（WP1）は、運動性のより低い水分子（water located within highly organized protein structures）の情報を示すものであり、80-800 msのピーク（WP2）は、より高い運動性を示す水分子（water outside the myofibrils）に由来するものと報告されている（5）。このT_2分布データを基に魚類の筋肉硬度との関係性を相関解析により評価した結果、魚類筋肉の硬度は、WP1の緩和時間（T_2-1）と弱い正の相関を示し、WP1の強度（I-1）と強い負の相関を示すことが明らかになった（Figure 3(B)）。すなわち、魚類筋肉組織中タンパク質と結合している結合水が多ければ多いほど、硬度が低いことが示唆された。

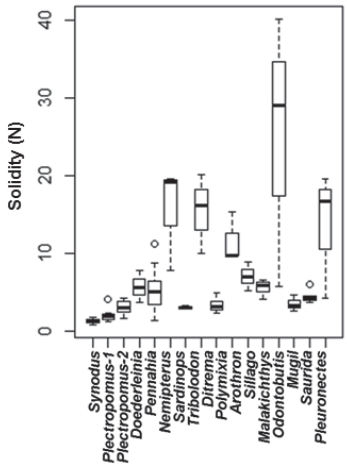


Figure 2. Boxplots of muscle solidity for typical genus of fish

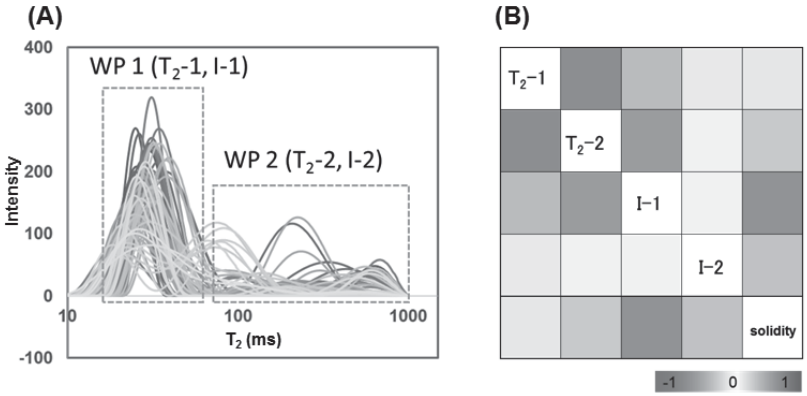


Figure 3. **(A)** T_2 relaxation distributions after inverse Laplace transform for typical species of fish muscle; **(B)** Spearman's coefficients between fish muscle solidity and NMR-observed T_2/intensity of different muscle water pools (WP).

あわせて、合計200種以上、1000個体以上の魚類の代謝プロファイリング・緩和時間・物理特性の関係性などを総合的に評価可能な、NMRを用いた水産資源の化学・物理特性評価法についても本会で議論したい。

【引用文献】

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. Wei, F., Ito, K., Sakata, K., Date, T. and Kikuchi, J. (2015) *Anal. Chem.* **87**, 2819-2826.
4. Misawa, T., Wei, F. and Kikuchi, J. (2016) *Anal. Chem.* **88**, 6130-6134.
5. Aursand, I. G., Veliyulin, E., Bocker, U., Ofstad, R., Rustad, T. and Erikson, U. (2009) *J. Agric. Food Chem.* **57**, 46–54

P32

天然変性領域の多重リン酸化によるFACTヌクレオソーム結合の超高感度応答性機構

○青木大将[1]，上脇準一[2]，栃尾尚哉[2]，楯真一[1,2]
[1]広島大学・大学院・理学研究科
[2]広島大学・クロマチン動態数理研究拠点(RcMcD)

Ultra-sensitive regulation of the nucleosome binding of FACT, a chromatin remodeling factor, through multiple phosphorylation to its intrinsically disordered regions (IDRs)

○Daisuke Aoki[1], Jun-ichi Uewaki[2], Naoya Tochio[2], Shin-ichi Tate[1,2]
[1] *Department of Mathematical and Life Sciences, Graduate School of Science, Hiroshima University*
[2] *Research Center for the Mathematics on Chromatin Live Dynamics (RcMcD), Hiroshima University*

Regulation of biological process often involves phosphorylation of intrinsically disordered regions (IDRs), thereby modulating protein interactions. Some IDRs are known to have multiple phosphorylation sites and their binding ability to their partners depends on the number of phosphorylation to the IDRs. Since its response is sigmoidal, the response is called ‘ultra-sensitive’ response. In this study, we worked to see how IDRs achieve such a specific functional regulation regardless of their lack of defined three-dimensional structure. Eventually, we found that the ultra-sensitivity is achieved by the scissoring motion of the IDRs with the Gly-rich region as the hinge.

天然変性領域(Intrinsically Disordered Regions, IDRs)は，安定な3次元立体構造を持たないにも関わらず特定の機能を有し，細胞内における様々な制御機構に関わっている．また，その構造柔軟性からしばしば複数のリン酸化修飾部位をもち，構造および電荷の大きな変化を伴うことで分子スイッチとしての役割を果たすことが知られている．複数のリン酸化部位をもつIDR(Sic1)と構造タンパク質(Cdc4)との分子間相互作用において，その結合能がIDRへのリン酸化の度合いによって敏感に制御を受けることが実際に報告されており，リン酸化度合いに対してシグモイダルな応答を示すことから超高感度応答(ultra-sensitive response)と呼ばれている[1].

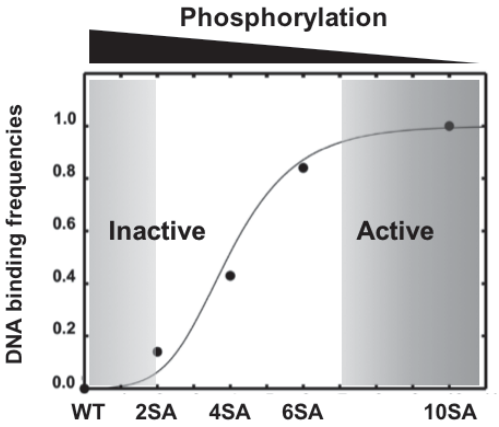


Fig. 1. Ultra-sensitive response of DNA binding ability of FACT

以前私たちは，FACTタンパク質がもつIDR同士の分子内相互作用においてリン酸化に対する超高感度応答性を報告している．FACTはクロマチン構造変換因子のひとつであり，ヌクレオソーム構造を崩すことでDNA転写を促進する．FACTはIDRを介してヌクレオソーム上のDNAと結合する．FACT-IDRは，酸性残基に富んだ酸性領域と，塩基性残基に富んだ塩基性領域の2つのIDRから成り立ち，塩基性領域がDNA結合に直接関わっている．しかし，酸性および塩基性領域間の分子内相互作用によってFACT-IDRは自己阻害複合体を形成し，

天然変性領域(IDR)，多重リン酸化，超高感度応答性

○あおきだいすけ，うえわきじゅんいち，とちおなおや，たてしんいち

そのDNA結合を制御していることを私たちは示した．また酸性領域中には10ヶ所のリン酸化部位が存在し，これら全てがリン酸化を受けることで自己阻害複合体は安定化しFACTはDNA結合能を失う．しかし，リン酸化の数の減少に伴ってDNA結合能はシグモイド曲線を描きながら回復することが分かった(Fig. 1)[2, 3].

本研究で私たちは, IDR全体のハサミ運動がFACTのリン酸化に対する超高感度応答性にとって重要であることを示した. そして, 酸性領域へのリン酸化の度合いが増えるにしたがってIDR中の分子内相互作用は次第に強くなり，IDRのDNA結合能は減少する．酸性領域と塩基性領域の間には柔軟なGlyリッチ領域が存在し，私たちはIDR全体のハサミ運動においてこの領域が蝶番として働いていると考えた．このハサミ運動が実際にIDRの機能制御に重要であるのかを確かめるため，Glyリッチ領域に変異を導入し，Glyリッチ領域の制御的役割を調べた．NMRを用いたIDRの構造および運動性の評価、生化学的実験の結果から，Glyリッチ領域がFACTの超高感度応答性にとって重要であることが明らかとなった(Fig. 2).

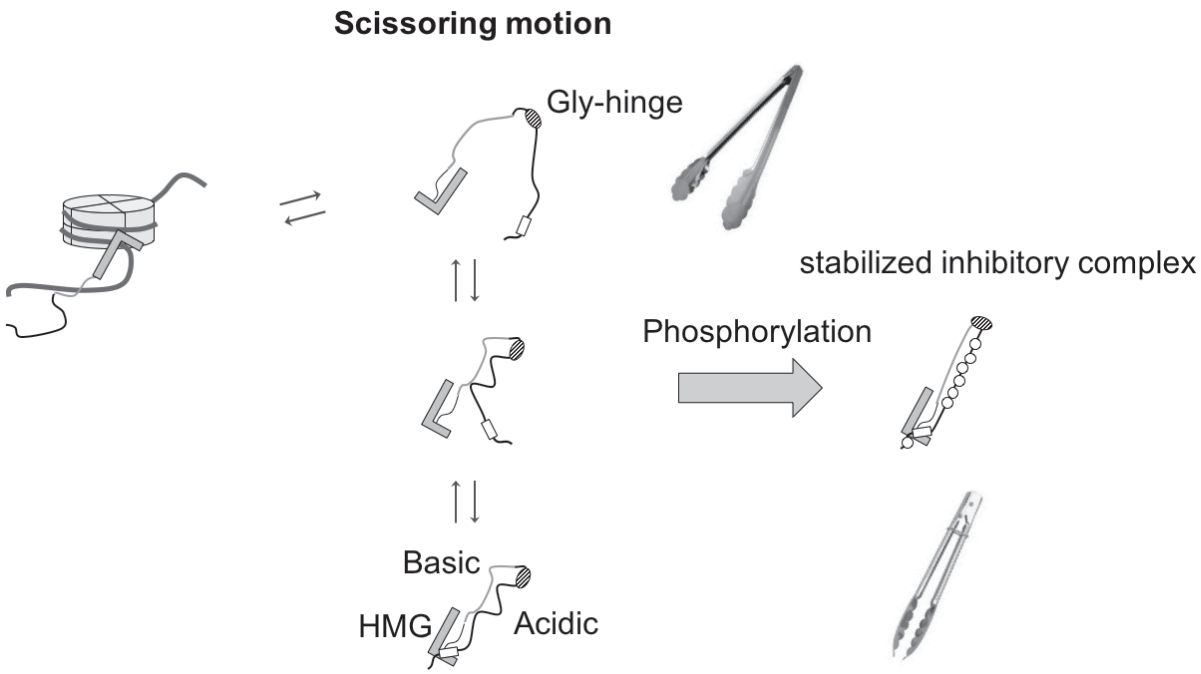


Fig. 2. The regulation mechanism of the nucleosome binding of FACT

References

[1] Mikael, B., Tanja, M., Tony, P., Mike, T., Julie, D. F., and Hue S., C., (2007) Polyelectrostatic interactions of disordered ligands suggest a physical basis for ultrasensitivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 9650-9655

[2] Tsunaka, Y., Toga, J., Yamaguchi, H., Tate, S., Hirose, S., and Morioka, K. (2009) Phosphorylated Intrinsically Disordered Region of FACT Masks Its Nucleosomal DNA Binding Elements *J. Biol. Chem.* 284, 24610-24621

[3] Hashimoto, M., Kodera, N., Ysunaka, Y., Oda, M., Tanimoto, M., Ando, T., Morikawa, K., and Tate, S. (2013) Phosphorylation-Coupled Intramolecular Dynamics of Unstructured Regions in Chromatin Remodeler FACT *Biophys. J.* 104, 2222-2234

P33

魚類多様性の生息環境・表現型の体内物質・微生物群のビッグデータ解析

○佐藤有穂[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・生医，[2]理研CSRS，[3]名大院・生命農

Big data analysis of metabolic and microbial profiling for characterization of habitat and phenotype in fish diversity

○Sato Yuho[1], Asakura Taiga[1,2], Sakata Kenji[2], Date Yasuhiro[1,2], Kikuchi Jun[1,2,3]
[1] *Grad. Sch. Med. Life Sci.*, *Yokohama City Univ.*, [2] *RIKEN CSRS*, [3] *Grad. Sch. BioAgriSci.*, *Nagoya Univ.*

NMR-based metabolic profiling is a useful and versatile approach to evaluate organic matter profiles and variations in various environments for an effective use of fish resources responded to increasing global demand. The metabolic profiling for fish samples, for example, revealed the compositional differences among body tissues and habitats of three fish species in estuarine ecosystem in Japan [1]. This study focused on metabolic and microbial profiling for characterization of habitat and body type in wild fish biodiversity. Integration analysis of microorganisms and metabolites revealed that lactate and bacteria belonged to family *Vibrionaceae* was associated with "fish-eater", "crustacea-eater", and "migratory-type" fish species.

【背景・目的】日本沿岸部は南からの黒潮や北からの親潮が交わり、豊かな水産資源を提供している。とりわけ魚類は日本の和食文化を支える重要な食糧資源であるが、日本沿岸には多種多様な魚類が生息しているにもかかわらず、ごく一部の魚類しか有効利用されていないのが現状である。従って、日本近海で得られる多様な魚類の特徴や生態を簡便に評価し、天然資源の活用につながる技術開発が求められている。そこで本研究室ではこれまでに、高品質のデータを生成することができる核磁気共鳴（NMR）に基づくメタボロミクス（メタボノミクス）のアプローチによって、日本の沿岸からサンプリングした 3 種類の魚種から、組織や環境の違いを反映することが可能な代謝プロファイル法を構築した[1]。また、自然環境から採取した 21 種の魚類の糞便・腸内容物の代謝物・腸内細菌叢プロファイルから、摂餌の違いや時系列変動の特徴を抽出する評価技術についても構築した[2]。さらに、マーケティングで使用されているマーケットバスケット分析（MBA）をメタボロミクス分野に応用し、定量的および定性的なデータを統合的に評価可能な技術開発も行ってきた[3]。

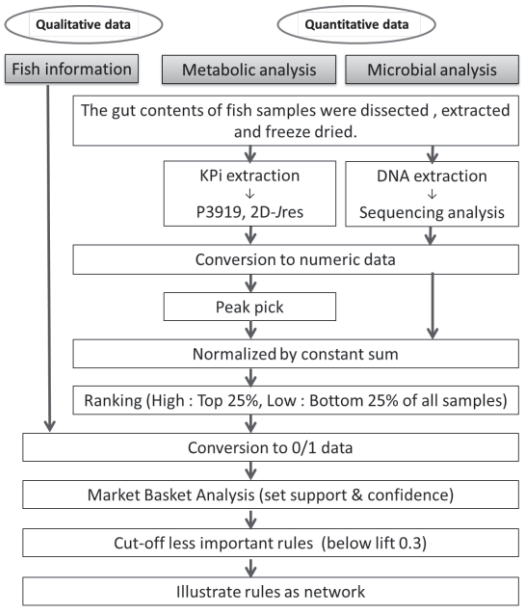


Figure 1. Flowchart for the method used in this study.

代謝プロファイリング，データマイニング，腸内フローラ

○さとうゆほ，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

これらの既往研究を踏まえて本研究では、自然環境から採取した多様な形態を持つ魚類をサンプルとして用い、生息環境や体型の特徴といった定性情報に、有機物・微生物叢プロファイルという定量情報を組み合わせることにより、魚類の表現型とプロファイリングデータを統合的に評価することを目的とした(Fig. 1)。

【実験方法】日本の様々な河川や海域から採集した 100 種以上の魚類の腸内容物を解剖して取り出し、凍結乾燥後、破砕して粉末状にした。NMR による計測では、Bruker 社製の装置（700MHz）を用い、HSQC, 2D-*J*res など各種計測を行った。また、Miseq による計測では、腸内容物から DNA を抽出し、シーケンシングによって配列を決定後、RDP classifier によって細菌群の分類を行った。これらの計測における詳細な実験手順やパラメータセッティングは既往研究と同様に行った[1, 2, 3]。得られた 2D-*J*res projection プロファイルと Miseq の微生物プロファイルに対し主成分分析（PCA）を行った。また、それぞれのプロファイルに魚の定性情報（生息環境や食性、体系など）(Fig. 2) を加え統合し、統計解析ソフト R を用いて MBA 解析を行った。得られた解析結果は Gephi を使用しグラフを作成した。

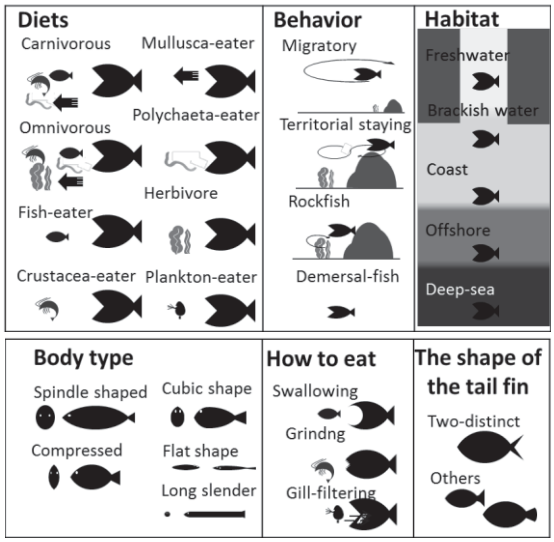


Figure 2. Classification table of fish information

【結果・考察】 NMR による計測で得られた魚類腸内容物中に含まれる代謝物プロファイルを PCA により解析した結果、生息環境の違い（海水と汽水・淡水の違い等）や魚類の系統学的分類群による違いに基づきクラスタリングされる傾向にあることがわかり、汽水や淡水に住む魚類は乳酸、スレオニン、チロシン、アルギニン等といった代謝物が海水魚と比べて特徴的であることがわかった。また、微生物叢による解析では、最も多く含まれる微生物群は Proteobacteria であり、これらの微生物群は淡水、汽水、海水の順で割合が高くなる傾向にあることを明らかにした。さらに、MBA による解析の結果、コリン、リン脂質等は「魚食」・「二股尾鰭」・「丸呑み食」といった定性情報と、乳酸は「魚食」・「甲殻類食」・「回遊」といった定性情報と、フェニルアラニンは「丸呑み食」・「側偏型」・「居つき」といった定性情報と関係がみられた(Fig. 3)。また、乳酸は *Vibrionaceae* 科のバクテリアとの関係性もみられた。以上のことから、MBA を用いることで魚類サンプルのもつ多様な生活環境、生息環境および体型の特徴といった魚の定性の情報と、機器分析による定量的情報とを組み合わせた統合解析が可能であることを示した。

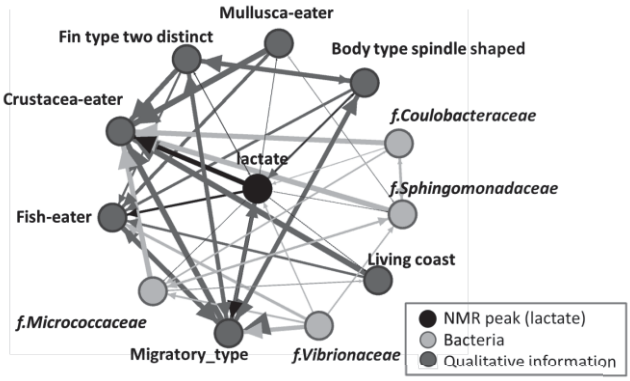


Figure 3. Association networks of lactic acid computed by MBA approach.

References

[1] Yoshida, S., Date, Y., Akama, M. and Kikuchi, J. *Sci. Rep.* 4, 7005 (2014).

[2] Asakura, T., Sakata, K., Yoshida, S., Date, Y. and Kikuchi, J. *PeerJ.* 2, e556 (2014).

[3] Shiokawa, Y., Misawa, T., Date, Y. and Kikuchi, J. *Anal. Chem.* 88, 2714-2719 (2016).

P34

機械学習理論に基づく生体分子複雑系の解析技術高度化

○伊達康博[1,2]，菊地淳[1,2,3]
[1]国立研究開発法人理化学研究所・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

Machine learning as advanced analytical technique of complex biomolecular mixtures

○Yasuhiro Date[1,2], Jun Kikuchi[1,2,3]
[1] *RIKEN Center for Sustainable Resource Science*
[2] *Graduate School of Medical Life Science, Yokohama City University*
[3] *Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University*

Machine learnings such as deep learning are one of the most important analytical tools for not only artificial intelligence programs but also data mining in the field of metabolomics. However, the technical levels in terms of utilization, application, and research have a big gap between most-advanced artificial-intelligence research and data mining for metabolomics data. This study focused on advancement of data mining methods based on machine learnings in the field of metabolomics. The advanced method enabled to establish the useful discriminant models for identification of specific fish species based on metabolic profiles and capture the metabolic features in muscle tissue for bluefin tuna or leopard grouper.

【背景・目的】

ディープラーニングに代表される機械学習理論の飛躍的な進歩は、人工知能プログラムに基づく検索システム等に応用され、産業界にブレークスルーを引き起こしつつある。こうした人工知能ブームのベースとなっている機械学習理論は、NMRを用いた代謝混合物の解析（メタボロミクス）においても利用されつつあるが、当該分野における利用例はpartial least squares-discriminant analysis (PLS-DA)等のような従来法と比べて遥かに少なく、近年最も注目されている機械学習理論の一つであるディープラーニングに至っては、2016年9月1日時点において未だ研究の報告例がない状況にある（Fig. 1）。また、ディープラーニング以外の機械学習理論に関しても、当該分野における現状の技術レベルは最先端の人工知能研究と大きな隔たりがあり、NMR計測データの解析技術は依然として未成熟なままである。これは、メタボロミクス分野において分類や回帰分析等を誰でも簡単に行うことが出来るパッケージやツールに

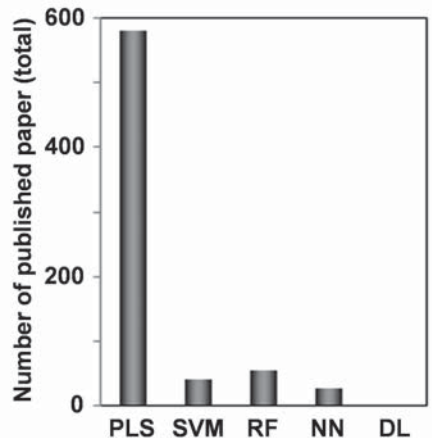


Fig. 1. Number of published paper that include PLS or machine learnings in the field of metabolomics. The data is retrieved from Thomson Reuters' ISI web of Science using keywords [metabolomics; PLS, PLS-DA, and PLSDA], [metabolomics; support vector machine] (SVM), [metabolomics; random forest] (RF), [metabolomics; neural network] (NN), or [metabolomics; deep learning] (DL).

metabolic profiling, data science, artificial intelligence programming

○だてやすひろ，きくちじゅん

PLS-DAが広く利用されており、多くの研究者が代替技術の可能性を考慮していないことも一因である[1]。しかしながら、PLS-DAを機械的に利用する問題点も指摘されており[1]、従来法のみによる解析では、データセットによってはビッグデータから“埋もれた情報”を発掘しきれないという大きな問題が生じている。このことから、メタボロミクス分野においても最先端の機械学習理論を取り入れ、当該分野の発展に資する有用な解析技術の構築が急務の課題である。そこで本研究では、機械学習理論の代表的な解析手法であるディープラーニング、サポートベクターマシン（SVM）およびランダムフォレスト（RF）を基軸として、生体分子複雑系へと適用可能なデータマイニング技術の構築および最適化を行った。また、当研究室でサンプリングし、NMR計測した2000個体以上の魚類代謝プロファイルを対象として、高度化されたデータマイニング技術の魚類多様性に対する特徴抽出能を評価した（Fig. 2）。

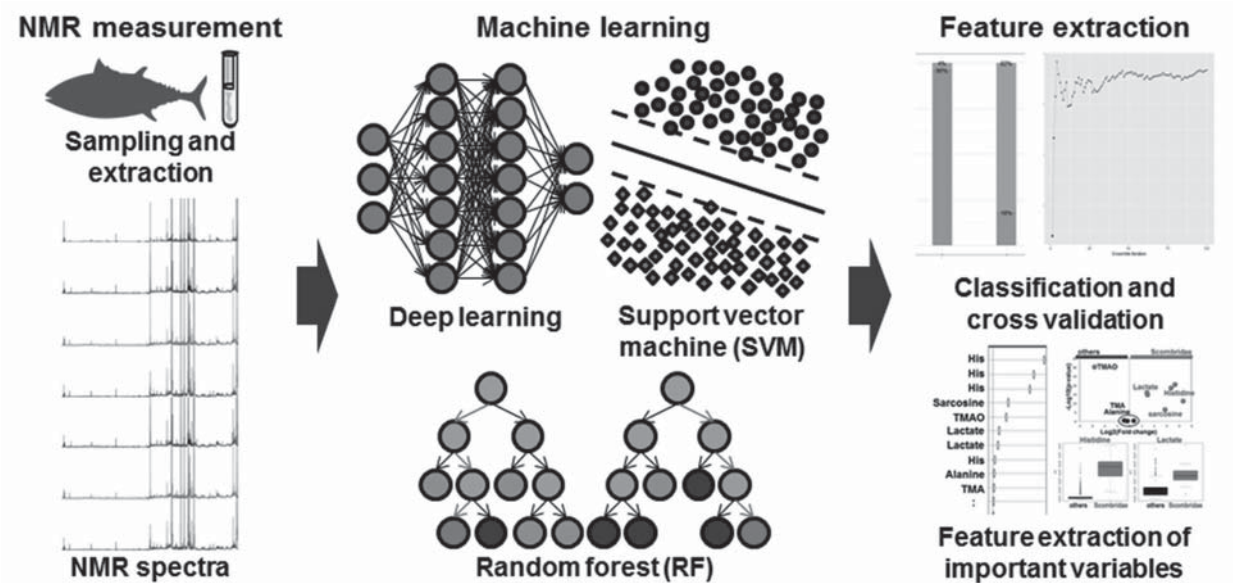


Fig. 2. Conceptual diagram of this study.

【実験方法】

本研究では日本各地の沿岸および河口域等から採集した多様な魚類（83科230種2115個体）を研究対象とし、魚類筋肉中に含まれる代謝混合物を^{1}H-NMR（2D *J*res NMR）により計測した。得られたスペクトルデータ（2D *J*res NMRのskyline projection）は数値化・マトリクス化し、機械学習（ディープラーニング、SVM、RF）や多変量解析等に供試した。これらの解析は統計解析・開発実行環境である“R”ソフトウェア上で行い、機械学習等の解析に有用なパッケージツールであるclassyfire [2]、kernlab [3]、muma [4]、mxnet [5]、randomForest [6]等をベースに多少の改変を加えつつデータマイニング技術の構築および最適化を行った。また、魚類筋肉から抽出された代謝混合物中における代謝物のアノテーションには^{1}H-NMR、^{13}C-NMR、2D *J*res NMR、^{1}H-^{13}C HSQCおよびHSQC-TOCSY等のNMR計測、statistical total correlation spectroscopy（STOCSY）[7]、statistical heterospectroscopy（SHY）[8]、signal enhancement by spectral integration（SENSI）[9]等の解析技術、human metabolome database（HMDB）[10]、biological magnetic resonance data bank（BMRB）[11]、SpinAssign [12]、SpinCouple [13]等のデータベースや解析ツールおよび当研究室でこれまでに蓄積した魚類代謝物の分析データ[14-16]等を駆使して行った。

【結果・考察】

日本近海から採集した多様な魚類（83科230種）のNMRスペクトルデータから、従来法および機械学習理論に基づく解析手法それぞれを用いて、魚類（Scombridae、bluefin tuna、Serranidae、leopard grouper）の特徴抽出が代謝物レベルで可能かどうかを比較検討した。従来法である通常の主成分分析（PCA）では、多様な魚類の代謝プロファイルに特定魚種のプロファイルが埋もれてしまい、bluefin tunaやleopard grouperの特徴を正しく捉えることが出来なかった。また、同じく従来法であるPLS-DAを用いた場合、特定魚種とそうでない魚種の識別はある程度可能であったものの、識別モデルの構築に必要な変数の数が膨大で重要変数の選別に至らず、結果として代謝物レベルでの特徴を抽出することが出来なかった。一方、機械学習法の一種であるSVMを用いて解析を行った結果、特定魚種の識別に関する精度の良い分類モデルが構築され、bluefin tunaやleopard grouperに関してはほぼ100%の識別が可能であった（Fig. 3）。同様に、他の機械学習法であるディープラーニングやRF等においても類似の傾向が得られたことから、機械学習理論を用いることでbluefin tunaやleopard grouper等の特定魚種の特徴を正しく捉えることが可能であった。

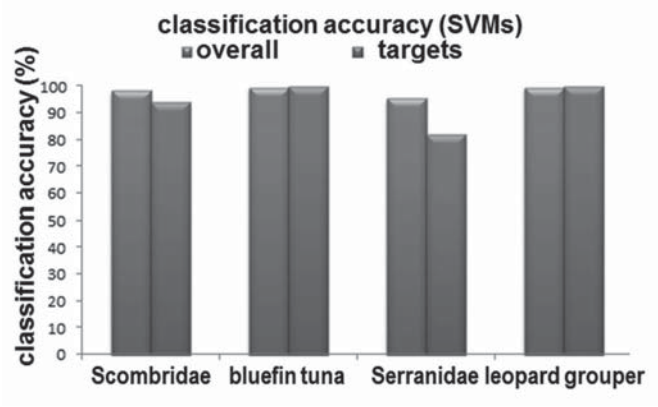


Fig. 3. Classification accuracy of Scombridae, bluefin tuna, Serranidae, and leopard grouper by support vector machine (SVM).

次に、PLS-DAでは選別出来なかった代謝物レベルでの特徴抽出を、機械学習法を用いて試みた。重要変数の選別には上記で構築した識別モデルを用い、bluefin tunaおよびleopard grouperにおける重要変数（代謝物）についてそれぞれ解析した結果、bluefin tunaではhistidineやlactate、IMP等の代謝物を、leopard grouperではglycineやserine等のアミノ酸をそれぞれ重要変数として見出すことに成功した（Fig. 4）。これらの代謝物がbluefin tunaやleopard grouperにおいて実際にどの程度含まれているかを検証するために、volcano plotおよびbox plotを用いて各物質の含有量を比較した結果、bluefin tunaやleopard grouperで共通して特徴的な代謝物と判定されたTMAO等の物質は、どちらの魚種においても有意に少なく、histidineやlactate、IMP等の代謝物はbluefin tunaにおいて有意に多く含まれていることを明らかにした（Fig. 5）。Histidineやlactate、IMP等の代

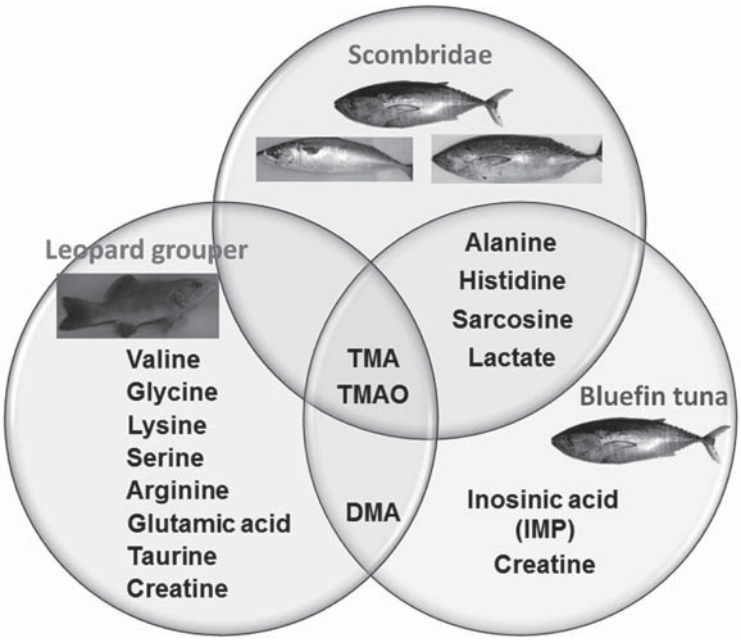


Fig. 4. Summary of evaluation results in terms of extraction of metabolic features included in bluefin tuna or leopard grouper by machine learnings.

謝物は運動性の高いScombridaeやbluefin tunaに多く含まれていることが周知の事実であり、得られた結果の妥当性を支持している。以上のことから各種機械学習法を用いることで、多様な魚類から対象となる特定魚種の代謝物レベルでの特徴抽出が可能であった。本研究では代表的な機械学習法であるディープラーニング、SVMおよびRFの特徴抽出能についても比較・解析し、メタボロミクスデータに対する各種手法の利点や欠点等についても本会で議論したい。

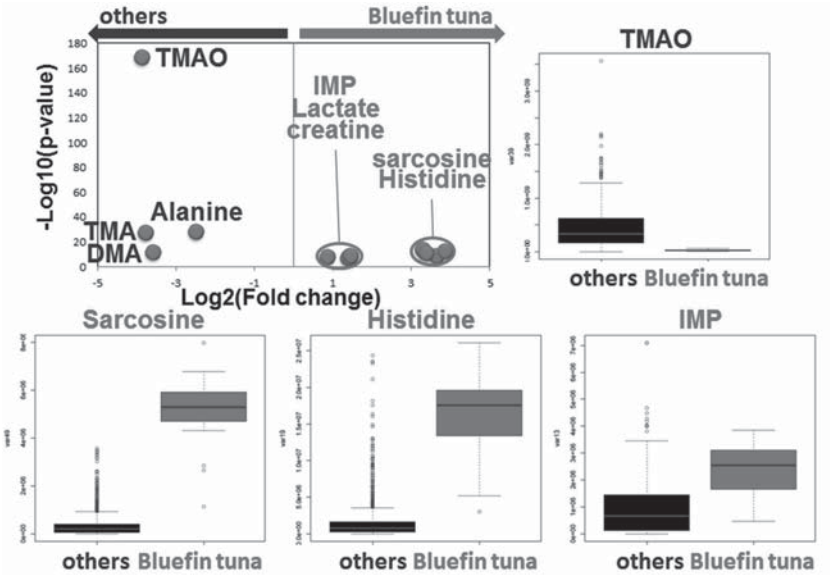


Fig. 5. Significant differences between Bluefin tuna and the other fish species evaluated by volcano plot and box plots. The significant differences were calculated based on Welch's t test.

【引用文献】

[1] Gromski, P.S., Muhamadali, H., Ellis, D.I., Xu, Y., Correa, E., Turner, M.L., and Goodacre, R. (2015) *Analytica Chimica Acta*, **879**, 10–23.

[2] Chatzimichali, E.A., and Bessant, C. (2016) *Metabolomics*, **12**, 16.

[3] Karatzoglou, A., Smola, A., Hornik, K., and Zeileis, A. (2004) *J. Statistical Software*, **11**, 9.

[4] Gaude, E., Chignola, F., Spiliotopoulos, D., Spitaleri, A., Ghitti, M., Garcia-Manteiga, J.M., Mari, S., and Musco, G. (2013) *Current Metabol.*, **1**, 180–189.

[5] Chen, T., Li, M., Li, Y., Lin, M., Wang, N., Wang, M., Xiao, T., Xu, B., Zhang, C., and Zhang, Z. (2015) *arXiv preprint*, arXiv:1512.01274.

[6] Svetnik, V., Liaw, A., Tong, C., Culberson J.C., Sheridan, R.P., and Feuston, B.P. (2003) *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, **43**, 1947–1958.

[7] Cloarec, O., Dumas, M.E., Craig, A., Barton, R.H., Trygg, J., Hudson, J., Blancher, C., Gauguier, D., Lindon, J.C., Holmes, E., and Nicholson, J.K. (2005) *Anal. Chem.*, **77**, 1282-1289.

[8] Crockford, D.J., Holmes, E., Lindon, J.C., Plumb, R.S., Zirah, S., Bruce, S.J., Rainville, P., Stumpf, C.L., and Nicholson, J.K. (2006) *Anal. Chem.*, **78**, 363–371.

[9] Misawa, T., Komatsu, T., Date, Y., and Kikuchi, J. (2016) *Chem. Commun.*, **52**, 2964-2967.

[10] Wishart, D.S., et al. (2007) *Nucleic Acids Res.*, **35**, D521−526.

[11] Ulrich, E.L., et al. (2008) *Nucleic Acids Res.*, **36**, D402−D408.

[12] Chikayama, E., Sekiyama, Y., Okamoto, M., Nakanishi, Y., Tsuboi, Y., Akiyama, K., Saito, K., Shinozaki, K., and Kikuchi, J. (2010) *Anal.Chem.*, **82**, 1653−1658.

[13] Kikuchi, J., Tsuboi, Y., Komatsu, K., Gomi, M., Chikayama, E., and Date, Y. (2016) *Anal. Chem.*, **88**, 659−665.

[14] Asakura, T., Sakata, K., Yoshida, S., Date, Y., and Kikuchi, J. (2014) *PeerJ*, **2**, e550.

[15] Yoshida, S., Date, Y., Akama, M., and Kikuchi, J. (2014) *Sci. rep.*, **4**, 7005.

[16] Misawa, T., Wei, F., and Kikuchi, J. (2016) *Anal. Chem.*, **88**, 6130–6134.

P35

シアロ糖鎖α,β結合の判別とセレン含有糖鎖のNMRによる解析

○鵜澤 洵[1)]、山口芳樹[1)]、田中浩士[2)]、鈴木達哉[3,4)]、安藤弘宗[3,4)]、木曽 真[3,4)]
[1]理研 糖鎖構造、[2]東工大 物質理工、[3]岐阜大 応用生物、[4]京大 物質−細胞統合システム拠点

Determination of alpha, beta connectivity of sialo-glycans and analysis of seleno-carbohydrates using NMR spectroscopy

○Jun Uzawa[1], Yoshiki Yamaguchi[1], Hiroshi Tanaka[2], Tatsuya Suzuki[3], Hiromune Ando[3], Makoto, Kiso[3]
[1]Structural Glycobiology Team, RIKEN,
[2]Department of Chemical Science and Engineering, Tokyo Institute of Technology,
[3]Department of Applied Bioorganic Chemistry, Gifu University,
[4]Institute for Integrated Cell-Material Science, Kyoto University

Bioactive sialo-glycans were chemically synthesized and their anomericity (alpha/beta) was examined by ^{1}H-^{13}C HMBC spectra. Differences were observed between alpha and beta sialoglycans, in the characteristic cross peaks between H-3ax/H-3eq and C1 carbonyl carbon. In order to obtain the $^{3}J_{CH}$ values, LSPD (Long-range Selective Proton Decoupling) method was applied for these samples. To get further insights into the conformational property of sialo-glycans, we tried to measure selenium (Se)-containing glycans, in which glycoside oxygen atom is replaced with selenium atom. ^{1}H-^{77}Se HMBC spectral analysis provide unique structural information which has not been obtained so far. 1D ^{77}Se-NMR measurements were conducted in the presence of sialoglycan-binding lectins, and we found that ^{77}Se-NMR is a sensitive method to monitor the glycan-lectin interaction through changes in chemical shift and line width.

序論

様々な活性を有するシアロ糖鎖のモデル化合物を合成し[1)]、そのα結合とβ結合をNMRで判別するために、HMBCスペクトルを測定した。キーとなるH-3axとH-3eqから1位カルボニル炭素へのクロスピークの強度に違いが見られた。さらにスピン結合定数を得る測定法を検討した後、LSPD (Long-range Selective Proton Decoupling) 法[2)]を用いたところ明らかな違いが $^{n}J_{C,H}$ として示された。

セレン含有糖鎖はグリコシド結合の酸素がセレンに置き換わった糖鎖である[3)]。セレンによる相互作用はもとより、立体構造や配座解析に^{77}Se-NMRの情報も得られるので興味が持たれる。^{77}Seはスピン1/2、天然存在比率7.58%、共鳴周波数は^{13}Cに比べて4/5程度であり比較的測定し易い核と言える。各種NMR測定を行った後、^{77}Se-HMBCを測定したところ、多くのクロスピークが得られた。立体構造による違いは^{13}Cと同様に見られるが、酸素がセレンに置き換わったことによるいくつかの知見も得られた。さらにこれらの知見を深めるために、最近、筆者らが行っている $^{n}J_{C,H}$ の設定値を変えながらSIMBA (Selective Inversion Multiple Bond Analysis)[4)] を測定して、プトロンとセレンのスピン結合定数を求めた。同時にT_2の近似値も得て、糖鎖結合部位と自由度のより大きい部分との違いを見た。

グルコース還元末端をセレノメチルとした試料により^{77}SeNMRを用いてレクチンとの相互作用を見た例はすでに報告されている[5)]。今回、糖結合部位も含めて３個のセレンによる知見を求めているが、レクチンを加えたことによる一次元^{77}Seスペクトルの線幅が大きく変化する現象も見られた。

Determination of α,β connectivity , Seleno-carbohydrates, ^{77}Se-HMBC and 3D structure

○うざわじゅん，やまぐちよしき、たなかひろし、すずきたつや、あんどうひろむね、きそまこと

装置

NMR装置は Bruker 社製 DRX-600にブロードバンドプローブを接続し、DRX-500に Cryo probe を接続させて使用した。データ解析は主として JEOL-Resonance 社製のアリスを使用した。測定温度は特にことわらない限り25℃で行った。

シアロ糖鎖のalphaとbeta結合の判別

NMRによるシアロ糖鎖のα結合とβ結合の判別はシアル酸残基のH-3axとH-3eqから1-COへの $^3J_{CH}$ を見ることにより判明する。**Fig.1**の化合物**1**は二つのα結合があり、**2**ではそれぞれ一つである。α結合とβ結合の部分構造は**3**および**4**となる。それぞれのニューマンプロジェクションは**5**および**6**で示される。**5**ではH-3axと1-COは anti の関係にあり大きな $^3J_{CH}$ が予想される。一方、H-3eq と1-COは gauche の関係にある上、H-3eqの anti の位置にO_6があり、小さな $^3J_{CH}$ が予想される[6)]。

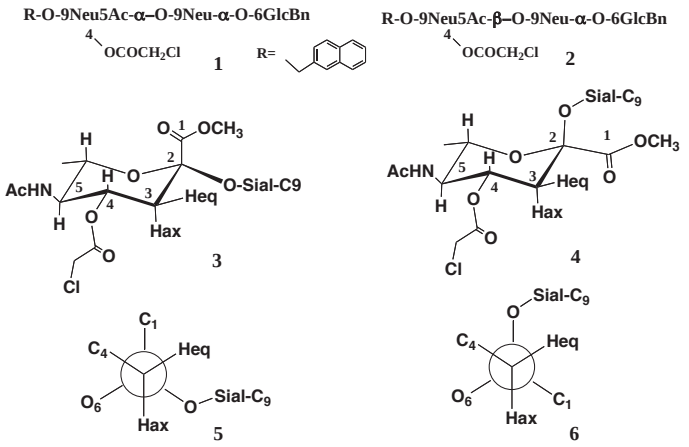


Fig.1. **1** and **2** are structure of sialo-glycan, **3** is partial structure of Neu α-O-9Neu, **4** is partial structure of Neu β-O9Neu, **5** is Newman projection down the C3-C2 bond of α, and **6** is β.

6ではH-3axとH-3eq共に anti の位置に酸素があるので、両方とも小さな $^3J_{CH}$ が予想される。**1**および**2**のHMBCスペクトルを見ると上記予想通りの結果であった。本来、クロスピークの強弱だけでなく $^3J_{CH}$ の値が判れば理想的である。ここで、信号の重なり具合などを見た上で測定法を検討した結果、$^3J_{CH}$ を観測する優れた測定法であるHR-HMBC法をあきらめ、LSPD法を採用した。**1**を測定した結果を**Fig.2**に示す。二つのシアル酸(Neuraminic acid, 図中では Neuと記す)の1-COは168.0ppmと168.6ppmに出るが、それぞれに結合した$O\text{-}CH_3$を照射することにより、H-3axとの$^3J_{CH}$は6.2Hzであった。一方、H-3eqからの$^3J_{CH}$は線幅に隠れる位の値と見られる。同様に、**2**のLSPDも測定した。**6**に示すように、β結合部分のH-3axと1-COは gauche となり、小さな$^3J_{CH}$となった。

シアル酸残基の4位に結合したH4-C4-O-CO部分の$^3J_{CH}$は3.2Hzとなり、この部分のtorsion angle情報を示している。以上の結果、α結合とβ結合に関する、確実な情報が得られた。

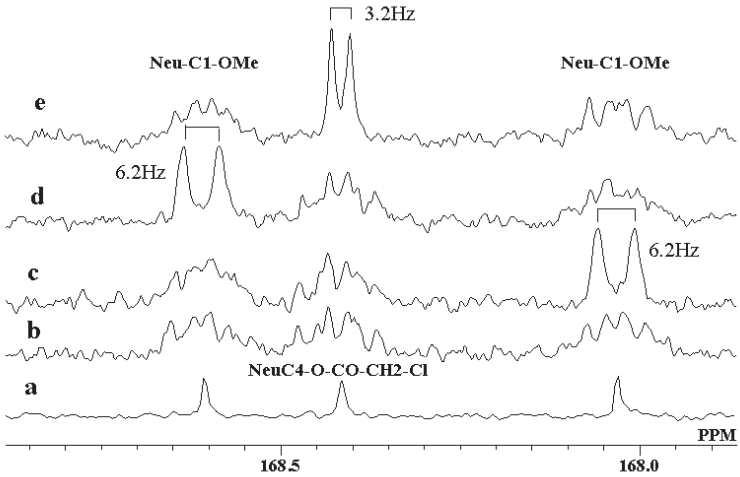


Fig. 2. LSPD spectra of **1**. (a) is original 1D, (b) is 20ppm irradiation, (c) is 3.74ppm(OCH_3) irradiation, (d) is 3.84ppm(OCH_3) irradiation, (e) is 4.06ppm(CH_2-Cl) irradiation.

セレノ糖鎖の解析

糖鎖結合部分の酸素がセレンに置き換わった糖鎖であるセレノ糖鎖をNMRで解析する場合、プロトンおよびカーボンの帰属・解析も始めに行う必要がある。DQF-COSY、HSQC、HSQC-TOCSY、およびHMBCを測定して得られた結果を**Fig.3**に示す。セレンに置き換わったことによるプロトンおよびカーボンのシフト変化が見られた。

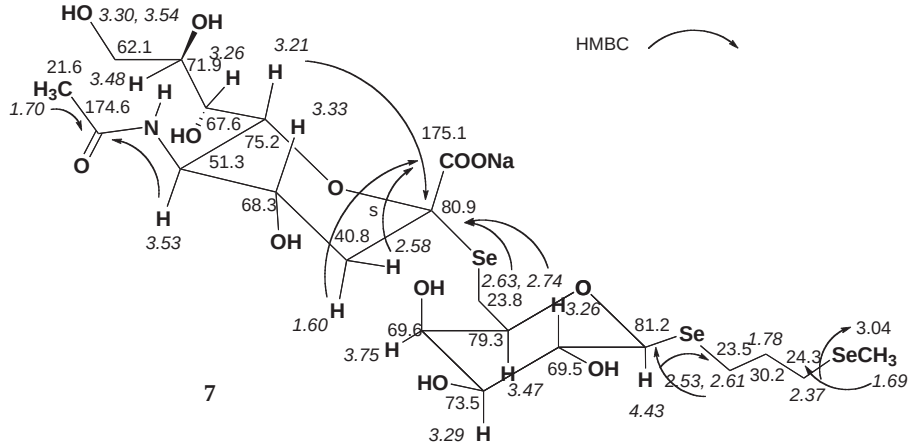


Fig.3. ^{1}H, ^{13}C assignment and ^{13}C-HMBC correlation of seleno-carbohydrates.

^{77}Seの一次元スペクトルを測定した結果、化学シフトはシアル酸とガラクトース結合部分は426.6ppm、ガラクトース1位結合部分は269.4ppm、Se-CH_3部分は53.4ppmであった。^{77}Se-HMBC測定による相関は**Fig.4**に示す通りであった。HMBC測定をする時に設定する$^{n}J_{Se,H}$を8Hzおよび6Hzで測定したところ、クロスピークの大きさは8Hzの方が予想に反して概ね大きかった。また、H-3eqから426.6ppmにあるセレンへのクロスピークは見られなかった。これはカーボンの場合とほぼ同じVicinal couplingの原則[6)]として見ることができる。このように、酸素がセレンに置き換わってセレン自身のNMRスペクトルが得られるばかりでなく2〜3ボンド離れたプロトンとの結合状態がわかったので、$^{n}J_{Se,H}$ を得られないか検討した。演者らが2014年の本討論会で報告したように[7)]、HMBC法の一次元版であるSIMBA法で設定する$^{n}J_{Se,H}$を10Hz以上から1Hz以下まで変化させて測定し、その相対強度の絶対値の変化をグラフにする手法を用いることにした。本試料ではセレンの化学シフトが53、269、426ppmと大きく離れているので、rectangular pulse 2ms を^{77}Se選択パルスとして用いて426ppmを選択して得られたスペクトルを**Fig.5**に示す。横軸に設定した$^{n}J_{Se,H}$をとり縦軸に相対強度をとると$^{n}J_{Se,H}$の大きさとT_2によってある減衰曲線が得られる[8)]。HMBCを測定する者にとっては悩みの種である"T_2 *decay*"であるが、これを逆用している訳である。ここで得られる$^{n}J_{Se,H}$値は真の値に近いと考えられる。いわゆるnull pointからみて、Neu-3ax-Se、Gal-6-Seの$^{n}J_{Se,H}$を値は12Hzより少し大きい値と見られた。

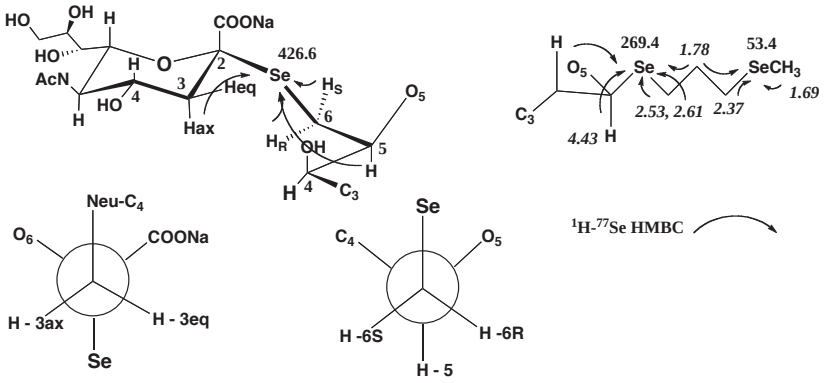


Fig.4. Results of ^{77}Se-HMBC correlation and ^{77}Se chemical shifts of **7**, Newman projection down the Neu-C3-C2 bond and Gal-C6-C5 bond.

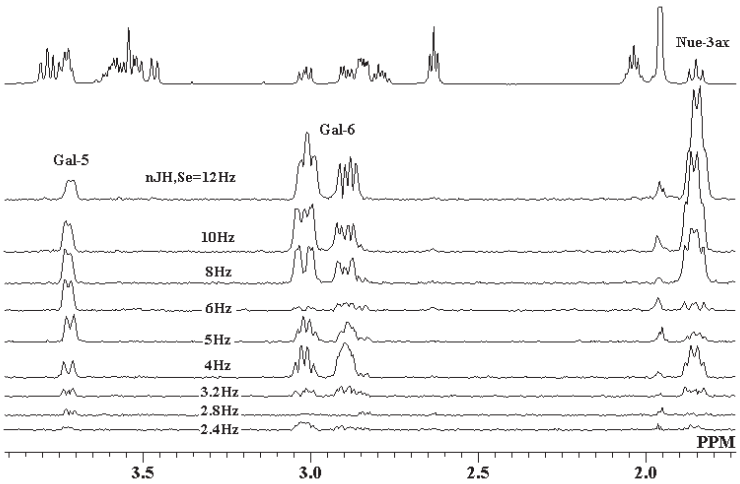


Fig.5.^{1}H,^{77}Se-SIMBAspectra of **7** by variable $^{n}J_{Se,H}$ settings.

T_2値については近似値として見た方が良いであろう。それでも自由度の高い53ppmの値よりも426ppmの値が短くなり、269ppmのそれはその中間と見られた。これは77Se スペクトルの線幅から得た値、426ppm:38ms、269ppm:32ms、53ppm:26msという傾向と一致した。この線幅から得たT_2値は温度を約10℃上げて測定すると53ppmの値は変わらず426ppmの値は長くなり、269ppmのそれはわずかに変化する。この結果はセレンそれぞれの運動のし易さを反映しているものと思われる。

最後に、この試料に分子量の異なるレクチンを加えて線幅の変化を見てT_2の変化を考察した。本格的な測定の予備実験として行ったが、モル濃度を横軸にT_2値を縦軸にとると、それぞれがほぼ直線的に短くなることを観測できた。この結果を得てさらに研究を進める予定である。

結果と展望

シアロ糖鎖2位のαとβ結合の判別をHMBC法とLSPD法を用いて確実に行うことができた。セレン含有糖鎖の化学シフトばかりでなく、$^{3}J_{Se,H}$に関する知見をHMBC法とSIMBA法により得た。

Sial2-6および1-6結合糖鎖はφ、ψ、ωで定義される3bondを持っており、自由に回転するので、この配座をめぐる議論は続いている。ωについては^{1}H-NMRにより、超伝導磁石時代になった1980年代当初から盛んに研究されてきた。一方、φとψに関しては結合部分に^{1}Hのスピン結合定数を観測できない酸素と4級炭素があってNMRによる研究は困難であった。本研究に示すように、酸素をセレンに置き換えることにより一つの道が開けた。また、HR-HMBCやFG-SIMBAを温度可変も含めてフルに活用することにより、φやψも含めて結合部分の配座に関する研究が発展することが予想できる。糖鎖間の相互作用の研究にT_1を測定するのが正道であるが、長い測定時間を要することが多く、その間に試料の変質や析出などが考えられるので。本報告で述べた実験法も有益と考えている。

References

(1) T.Aoyagi, S.Ohira, S.Fuse, J.Uzawa, Y.Yamaguchi and H.Tanaka, *Chem.Eur.J.* **2016**, 22, 6968.

(2) J.Uzawa and M.Uramoto, *Org.Magn.Reson*, 1979, 12, 612.

(3) T.Suzuki, H.Makyio, H.Ando, N.Komura, M.Menjo, Y.Yamada, A.Imamura, H.Ishida, S.Wakatsuki, R.Kato and M.Kiso, *Bioorg.Med.Chem.* **2014**, 22, 2090.

(4) G.E.Martin and R.Cruch, *J.Nat.Prod.*, **1991**, 54, 1.

(5) C.Hamark, J.Landstrom and G.Widmaln, *Chem.Eur.J.* **2014**, 22, 6968.

(6) J.A.Schwarcz and A.S.Perlin, *Can.J.Chem.*,**1972**,50,3667.

(7) 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、**2014年**、160.

(8) J.Keeler, *Understanding NMR Spectroscopy – 2nd Edition*, **2010**, J.Wiley & $ons, Ltd Publication.

P36

NMR を用いた定量法の比較—内部標準法と外部標準法

○片平律子、大澤弘幸、大室喜久子、望月正
JFE テクノリサーチ株式会社　分析ソリューション本部　先端有機分析部
先端医薬品解析センター

Comparison of quantitative methods by NMR- Internal and External Calibration Methods

○Ritsuko Katahira, Hiroyuki Osawa, Kikuko Oomuro, Tadashi Mochizuki
Advanced pharmaceuticals Analysis center, Advanced Organic Analysis Dept., Analysis Solution Division, JFE Techno-Research Corporation

Quantitative nuclear magnetic resonance (qNMR) is now used in a variety of applications including the purity determination of certified reference materials, and the purity tests of drugs described in Japanese pharmacopoeia 16th edition. One of the advantages of qNMR is that it is simple and easy while maintaining the high accuracy. Since the standard method of purity determination of pharmaceutical is subtracting various impurities from the total weight, a lot of effort has been paid. In contrast, in qNMR, it was shown to be capable of quantifying accurately by weighing with high accuracy[1]. The lowest uncertainty was reported to be less than 0.1%[2] (coverage factor = 2).

In qNMR, there are two ways of internal and external calibration methods. The internal calibration method, dissolving reference material and analyte in the same solution, exhibits higher precision than the external calibration method which dissolved both materials separately.
Here we report on the results of validation of two methods.

〔序〕

近年、NMR による定量法（q NMR）は、標準物質の純度の値付けに用いられたり、日本薬局方第 16 改正などの公定法に採用されるなど、そのアプリケーションが広がりつつある。qNMR の長所の一つは、高い精度を保ちつつ簡便であることである。医薬品では、原薬の標準品の純度の決定法は、不純物を定量し全重量がら差し引くことによって行われるため、多くの労力が裂かれていた。これに対し、qNMR では、精密に化合物を秤量することによって、精度よく定量できることが示され[1]、その精度（不確かさ）も、最も小さいものでは、0.1%未満[2]（包含係数＝2）と報告されている。
qNMR には、定量標準物質を分析対象と同じ溶液 に溶解させて測定する内部標準法と、別々の

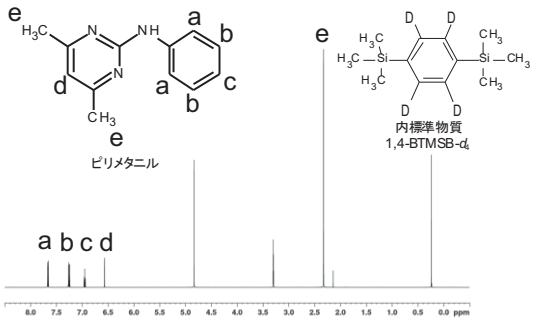


Fig. 1. ^{1}H NMR spectrum of pyrimethanil and 1,4-BTMSB-d$_4$ (internal reference).

定量NMR、内部標準法、外部標準法
○かたひらりつこ，おおさわひろゆき，おおむろきくこ，もちづきただし

溶液に溶解させて測定する外部標準法がある。一般的に、内部標準法の精度は外部標準法よりも高いとされているが、その報告は少ない。そこで本発表では、認証標準物質ピリメタニルの純度を定量の標準物質 1,4-BTMSB-d_4 を用いて測定し、内部標準法と外部標準法の定量結果を Eurolab テクニカルレポート[3]に基づいて評価したので、以下に報告する。

〔実験〕ピリメタニルは、和光純薬製のピリメタニル標準物質（純度98.9±0.8%, k=2)を用い、定量用標準物質は、和光純薬製の1,4-BTMSB-d_4標準物質(純度99.9±0.5%, k=2)を用いた。
秤量は、メトラー・トレド製のウルトラミクロ天秤を用いた。ピリメタニルと定量用標準物質は、重メタノールに溶解した。NMR装置は、クライオプローブ（TCI）を装備したブルカーバイオスピン株式会社製AVANCEIIIHD-600を用いた。データプロセスは、全てtopspin3.5で行った。外部標準法は、PULCON（ERETIC2）を用いた。

〔結果〕図1に定量に用いたスペクトル例を示した。
〔内部標準法〕
①真度と精度
真度と精度について表１に示した。ピリメタニルの平均純度の認証値は、NMRとDSCによって決定されており、そのうちNMRによる測定値は、98.7±0.9% と報告されている[4]。我々の純度測定値は、本結果と極めて近い値を示し、また併行精度も非常に良いことがわかった。

Table1. Trueness and precision

	真度	併行精度	室内精度 [a]	室内精度 [b]
平均精度（認証値＝98.9±0.8%）	98.6%	------	------	A=98.6% B=98.7%
相対標準偏差	------	0.05%	0.05%	A=0.02% B=0.05%

[a] 日間差
[b] オペレーター間差

②直線性
図2に積分比とモル比の相関を示した。ピリメタニルと1,4-BTMSB-d_4のモル比は、1～11の間で面積比との間に直線性を示した。
〔外部標準法〕
外部標準法の真度の評価については、試料管精度等の試料調製の精度に依存するため注意が必要であることがわかった。

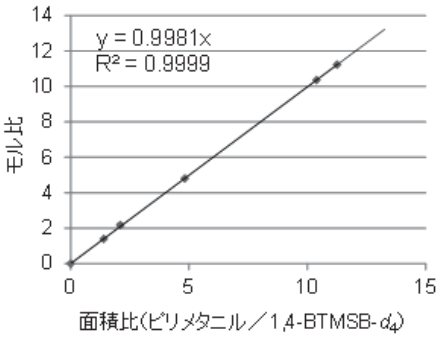


Fig.2. Correlation between molar ratio and integration ratio.

References

(1) Weber, M., Hellriegel, C., Ruck, A., Sauermoser, R., and Wuthrich, J. Using high-performance quantitative NMR (HP-qNMR) for certifying traceable and highly accurate purity values of organic reference materials with uncertainties <0.1% *Accred Qual Assur* (2013) 18:91-98.
(2) Saito T., Ihara T, Koike M, Kinugawa W, Fujimine Y, Nose K., Hirai T A new traceability scheme for the development of international system-traceable persistent organic pollutant reference materials by quantitative nuclear magnetic resonance (2009) *Accred Qual Assur* (2009) 14:79-86.
(3) “Guide to NMR Method Development and Validation – Part I: Identification and Quantification” Euro Labo technical report1/2014.
(4) ピリメタニル校正証明書 技術情報より

P37

無機材料結合ペプチドと無機ナノ粒子の相互作用解析

○鈴木悠[1]，神藤平三郎[2]，朝倉哲郎[3]
[1]福井大学テニュアトラック推進本部
[2]東京薬科大学
[3]東京農工大学大学院工学研究科

Structure and dynamic properties of Ti-binding peptide bound to inorganic nanoparticles

○Yu Suzuki[1], Heisaburo Shindo[2], Tetsuo Asakura[3]
[1] *Tenure-Track Program for Innovative Research, University of Fukui*
[2] *Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences*
[3] *Tokyo University of Agriculture and Technology*

Saturation transfer difference (STD) NMR spectroscopy is a powerful method for detecting and characterizing ligand–receptor interactions. In this study, the STD method was used to characterize the interactions of a Ti-binding peptide (TBP:RKLPDA) with TiO_2 nanoparticles. The water peak in the NMR spectrum was selectively saturated, and the STD amplitudes for TBP were observed in the presence of TiO_2, demonstrating that the side chains of the N-terminal residues Arg1 and Lys2 exhibit the strongest saturation transfer effect from water molecules; i.e., the two N-terminal residues are in contact with the TiO_2 surface. The relaxation rate in the rotating frame, R1ρ was observed to be high at the N-terminal residues; R1ρ decelerated toward the C-terminus, indicating that the N-terminal residues serve as anchors on the TiO_2 surface and that the TBP motion bound to TiO_2 particles is modeled as a wobble-in-cone with a fairly flexible C-terminus. The dissociation constant Kd of the TBP–TiO_2 nanoparticle complex was 4.9 ± 1.8 mM, as estimated from the STD experiments and R1ρ measurements. The combination of these results and the negative zeta potential of the TiO_2 surface validate that both the positively charged guanidyl group of Arg1 and amino group of Lys2 play key roles in interaction with the TiO_2 surface by electrostatic force.

【緒言】

無機材料と生体高分子材料のハイブリッド材料創成において、界面の接着は重要な課題である。この解決策のひとつとして、無機材料表面に特異的に結合するペプチドの探索が行われている。ペプチドはタンパク質と融合させて生産することが可能であるため、様々な分野での利用が期待されている。例えば、タンパク質やDNA、ウイルスといった生体物質の自己凝集能を利用したボトムアップ型のナノデバイス構築、インプラント材表面の抗菌性や細胞接着性の付与、ドラッグデリバリー担体表面への細胞透過性の付与、His-tagなどに代わるタンパク質精製tag、といった開発研究が行われている。ペプチドの結合能・材料選択性とペプチド配列との関係性が理解されれば、目的に応じたペプチドの設計が可能になる。しかし現状では、構成アミノ酸の種類だけでなく配列が重要であると示唆されるものの、両者の関係性についてはわかっていないことが多い。

そこで、無機材料結合ペプチドの結合様式の解明を目指し、６残基からなるチタン結合ペプチド(アミノ酸配列 : Arg-Lys-Leu-Pro-Asp-Ala、Ti-binding peptide: TBP)[1]をターゲットとして研究を進めている。TBPと酸化金属表面の相互作用について、これまでにフェリチン提示ペプチドのAFM観察やMDシミュレーションなどの手法を用いた研究が行われているが、実験系により結論が異な

無機材料結合ペプチド，ナノ粒子，ＳＴＤ

○すずきゆう，しんどうへいさぶろう，あさくらてつお

るという状況である。そこでTBPと酸化金属表面の相互作用メカニズムを解明するためNMR法を適用した。本法はペプチド単体で観測可能であり、液中で相互作用を直接観察でき、原子レベルの情報を得ることができるという点で優れている。発表では、TiO_2およびSiO_2ナノ粒子分散系を用い、saturation transfer difference法を用いたTBPとナノ粒子表面の相互作用解析　(2)R1ρによるペプチドの運動性評価 (3)ナノ粒子結合型TBPの立体構造　について報告する。

【実験】

無機ナノ粒子は、TiO_2ナノ粒子（Degussa, P25 直径20nm）、SiO_2ナノ粒子（Aldrich, ナノパウダー直径10-20nm）を用い、水分散系でTBPとの相互作用を評価した。測定試料は、ナノ粒子濃度 1mg/ml, ペプチド濃度 6mM, 20mMリン酸バッファー、pH7.0に調整した。 TBP/ナノ粒子混合試料は調整し一晩静置後に測定し、測定温度は25℃、NMR装置はECA-II 600を用いた。

【結果・考察】

TiO_2表面と特異的に相互作用する TBP 中のアミノ酸残基を、saturation transfer difference 法 (STD 法)[2]を用いて検討した。STD 法はもともと、巨大レセプター分子に結合するリガンドの結合部位を特定するために開発された。本実験では、レセプター分子の代わりに水分子の ^{1}H 磁化を飽和させることにより、TiO_2表面と特異的に相互作用するペプチド残基を検討した。Fig.1(a)に、選択的飽和時間に対するSTD強度(A_{std})変化のプロットを示す。このSTD強度ビルドアップカーブの初期勾配(STD_0)を求め、1D STDスペクトルで分離可能な各^{1}Hピークで比較した。Fig. 1(b)に、比較のために最大のSTD_0をもつArg1 Hδを100としてノーマライズした値を示す。Arg1 HδとLys2 Hεは高いSTD_0値、100%と89%を示し、一方で、Leu3 Hδ, Pro4 Hβ, Asp5 Hβは小さな値(16～25%)であった。C末端のAla6 Hβは最も小さく9%であった。このことから、N末端側残基Arg1, Lys2とTiO_2表面との間に特異的な相互作用の存在が示唆された。この結果は、R1ρ測定から得られた、N末端側残基はC末端側残基に比べて運動性が低いという結果とも一致した。これらの結果から、TBP-TiO_2系において、結合部位はArg1とLys2であり、Arg側鎖のグアニジノ基(NH_2^+)とLys側鎖のアミノ基(NH_3^+)のプラス電荷とTiO_2表面に表出するTi-O^-のマイナス電荷との静電的相互作用が支配的であることが明らかとなった。[3]

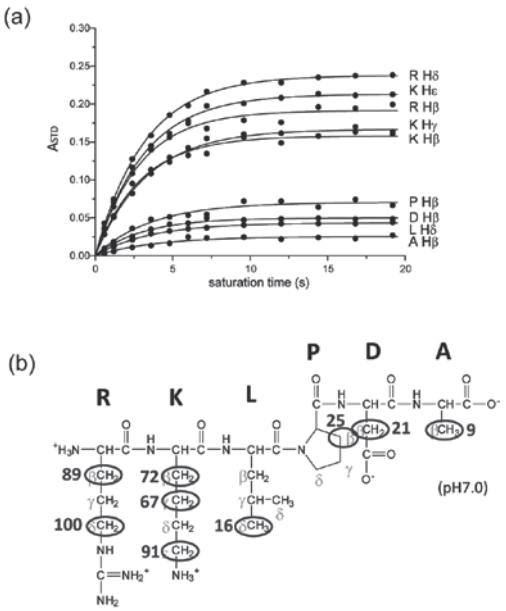


Fig. 1 (a) STD amplification factors plotted against saturation time for well-separated peaks and (b) the structure of TBP and the value (%) of STD_0 relative to that of Arg H_δ, which was set as 100%.

一方、SiO_2ナノ粒子との混合試料ではTiO_2とは異なる結果が得られ、同じペプチドでもTiO_2表面とSiO_2表面とでは異なる結合メカニズムが予想される。詳細は発表において報告する予定である。

References

1. Sano, K. I.; Shiba, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2003,** 125, 14234-14235.
2. Mayer, M.; Meyer, B. *J. Am. Chem. Soc.* **2001,** 123, 6108-6117.
3. Suzuki, Y., Shindo, H., Asakura, T., *J. Phys. Chem. B*, **2016**, 120, 4600-4607

P38

NMR多変量解析による食用油の熱劣化解析

○大田陽介, 早河裕子, 岡田明子, 平田真吾, 塩成さゆり, 森美詞, 則武智哉
株式会社UBE科学分析センター

Thermal degradation analysis of edible oils by multivariate analysis of NMR

○Yousuke Ohta, Hiroko Hayakawa, Akiko Okada, Shingo Hirata, Sayuri Shionari, Yoshifumi Mori and Tomoya Noritake
UBE Scientific Analysis Laboratory, Inc.

In this study, we have developed a new thermal degradation analysis of edible oils using multivariate analysis of NMR. Edible oils are known as a mixture of various triglycerols, and supposed to be difficult to determine the components by only comparing with each simple NMR spectrum. On the other hand, multivariate analysis which is useful to analyze complex mixture at a time, has been applied as a powerful method to diverse analytic fields. Therefore, we embarked on our study to provide a new effective analytical manner of the oils. The results suggested that principal component analysis (PCA) of edible oils mainly indicated the difference of fatty acid moiety depending relative degradation degree, revealed the degradation mechanism, and moreover showed almost complete correlation with the result of multivariate analysis of MS. Our method can be applied to further investigation and development.

１．緒言

食用油は、様々な脂肪酸骨格を有するトリグリセライドの混合物として知られており、これらの NMR スペクトルは類似のパターンを示すことが多い。そのため、単純なスペクトルの比較のみでは、解析や評価が困難であることが想定される。一方、多変量解析は、精製や分離を必要とせず、多数のスペクトル／シグナルから、その試料群の傾向や特徴を探る解析手法として、様々な分析に適用されている。そこで本研究では、食用油について、NMR による多変量解析（主成分分析）を行い、脂肪酸骨格の組成比や MS 分析による多変量解析（主成分分析）との比較から、食用油の分類、熱劣化解析における多変量解析の有効性について検討を行った。

２．実験

市販食用油（15種）を試料とし、未劣化品及び熱劣化品の重クロロホルム溶液について^{1}H－NMR測定を行い、多変量解析（主成分分析）を行った。熱劣化品には、ホットプレート上で200℃にて7時間（劣化（小））及び40時間（劣化（大））加熱したものを用いた。^{1}H－NMR測定は、Bruker BioSpin社製 AV400Nにて行い、多変量解析（主成分分析）にはBruker BioSpin社製 AMIXを用いた。また、MS測定は、Waters社製Synapt G2－S（大気圧固体試料プローブ）にて行い、多変量解析（主成分分析）にはWaters社製 Markerlynx XSを用いた。食用油の脂肪酸骨格の組成を調べるため、食用油に5%塩酸メタノール溶液を加えて90℃２時間加熱し、クロロホルムにて希釈した後、GC分析及びGC／MS分析を行い、各脂肪酸メチルのGC面積百分率を算出した。

多変量解析，食用油，熱劣化

○おおたようすけ，はやかわひろこ，おかだあきこ，ひらたしんご，しおなりさゆり，もりよしふみ，のりたけともや

３．結果・考察

食用油（未劣化）の主成分分析

^{1}H－NMR スペクトルによる食用油（15 種）の主成分分析を行った（Fig.1）。この結果と、脂肪酸骨格の組成（GC 面積百分率）を照らし合わせた結果、図中の矢印で示したように、不飽和度の異なる C18 脂肪酸の存在比の傾向をおおよそ反映した分類となっていることが確認された。また、MS スペクトルによる食用油の主成分分析結果とほぼ同一の傾向を示す分類であることが確認された。これらの結果から、NMR による主成分分析は、食用油の解析において有効な解析法であることが示唆された。

食用油（未劣化、劣化）の主成分分析による熱劣化解析

未劣化、劣化（小）、劣化（大）計 45 種の食用油について、主成分分析を行った（Fig.2）。その結果、未劣化、劣化（小）、劣化（大）ごとの３つのグループに大別できることが確認された。各グループは、劣化の進行に伴い一定方向に移動していることから、主成分分析によって劣化度の相対比較が可能であることが示唆された。また、すべての食用油が、おおよそ同じ方向へ平行移動しているという結果は、すべての食用油の熱劣化機構が同一であるということを示唆していると考えられる。脂肪酸の劣化は、不飽和部やその隣接部の変化によるものと言われており、今回の主成分分析結果（ローディングプロット）も、それの傾向を示す結果を与えることが確認された。

以上の結果、食用油の熱劣化現象に対し、多変量解析（主成分分析）は、劣化度の相対比較、劣化機構の同一性、劣化箇所の特定といった知見を得る有効な解析手法であることが確認された。

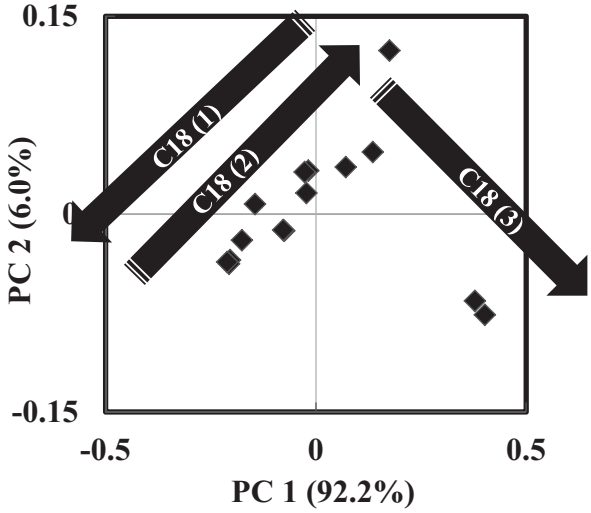


Fig. 1. PCA score plot of edible oils (1)

◆ : 15 kinds of edible oils (untreated)

C18(1) : Octadecenoic acid (e.g. Oleic acid)

C18(2) : Octadecadienoic acid (e.g. Linoleic acid)

C18(3) : Octadecatrienoic acid (e.g. Linolenic acid)

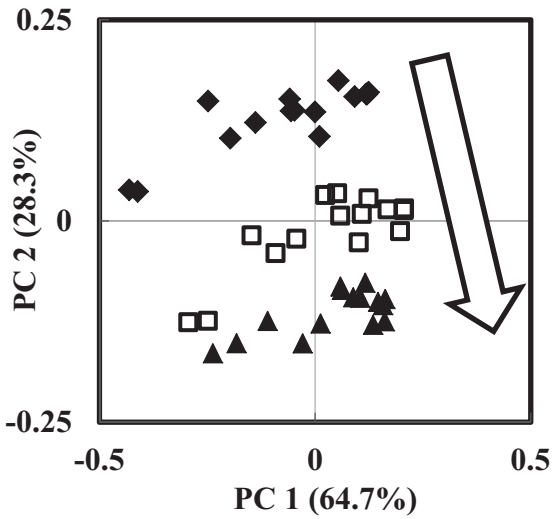


Fig. 2. PCA score plot of edible oils (2)

◆ : 15 kinds of edible oil (untreated)

□ : 15 kinds of edible oil (200℃,7hr)

▲ : 15 kinds of edible oil (200℃,40hr)

P39

紅藻ハナヤナギ由来パリトキシンの構造解析

○森 祥子[1]，菅原孝太郎[1]，前田 満[2]，岩下 孝[1]，山垣 亮[1]
[1]（公財）サントリー生命科学財団・生物有機科学研究所
[2] サントリーグローバルイノベーションセンター（株）

Palytoxin isolated from a marine red alga, *Chondria armata*

○Shoko Mori[1], Kohtaro Sugahara[1], Mitsuru Maeda [2], Takashi Iwashita[1], Tohru Yamagaki
[1] *Bioorganic Research Institute, Suntory Foundation for Life Sciences*
[2] *Suntory Global Innovation Center Ltd.*

Chondria armata is a marine red alga used as a vermifuge in Japan many decades ago. Domoic acid was isolated as a vermifugal compound from *C. armata*, and we investigated insecticidal compounds in this alga against American cockroaches. In the course of our investigation of insecticidal compounds other than domoic acid and its congeners, we found an unknown compound with one-thousand times more toxicity than domoic acid. It showed lethal activity at 5 ng against cockroaches. The insecticidal compound was identified as palytoxin by means of NMR and MS. Palytoxin was first isolated from a zoanthid, *Palythoa toxica*, in 1971. Palytoxin is famous for its potent toxicity, and its intravenous LD_{50} is 33–450 ng/kg. Moreover, our careful interpretation of the NMR spectra also allowed us to refine the previously reported NMR assignment of palytoxin. Palytoxin has been isolated from various organisms, and it is significant that palytoxin was isolated from marine plants.

海洋生物の産生する二次代謝物は、特徴的な構造や顕著な生物活性を有する化合物が多い。近年も、魚介類を介した食中毒が多数報告されており、原因化合物の微量分析や産生者の同定は科学的のみならず社会的にも重要である。

紅藻ハナヤナギは、古くは鹿児島県において駆虫剤として用いられ、また殺虫活性を有する化合物を含むことで知られる[1]。ハナヤナギに含まれる活性成分としては、記憶喪失性貝毒の要因であるドウモイ酸があり、その類縁体の探索研究も行われてきた。我々は、American cockroachを用いた殺虫活性試験によるドウモイ酸類縁体の探索の過程で、ドウモイ酸の1000倍程度の活性を有する化合物CA-IIを単離した[2]。さらに、この化合物は、FAB MSスペクトルの解析で分子量が2,700程度であった。得られた分子量および1D^{1}H NMRスペクトルの情報をもとに、我々はこの化合物がパリトキシンであると推定し、その確証を得るため詳細な構造解析を行った。

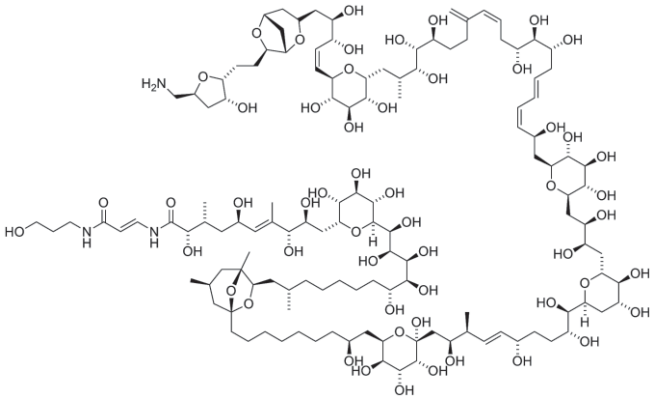


Fig. 1. Structure of palytoxin.

構造解析，海洋天然物

○もりしょうこ，すがはらこうたろう，まえだみつる，いわしたたかし，やまがきとおる

パリトキシンは、繰り返し構造を持たない天然物としては極めて大きく、また非常に強い毒性を有する海洋生物毒である。パリトキシンは1971年にハワイ大のMooreらによる腔腸動物Palythoaからの単離以降、分光学的および化学合成的手法を駆使した構造解析により、その完全な構造が決定された[3]。生物活性については、Na^+/K^+-ATPaseの阻害作用や、冠動脈収縮活性等が知られている[4]。パリトキシンはこれまでいくつかの類縁体が報告されており、それらの由来も魚類からカニまで幅広い海洋生物に及んでいるが、その真の産生者や生合成については不明な点が多く、興味が持たれている。

我々は、紅藻ハナヤナギから単離した殺虫活性物質CA-IIについて、主にNMRを用いた詳細な構造解析を行った。NMRでは、1D^{1}H, 1D^{13}Cスペクトルで観測されたシグナルを、各種NMR法を用いて解析した。特に、DQF-COSYでは決定できない、^{1}Hのケミカルシフトが重複するシグナルの帰属においては、HMQC-COSYが有効であった。また、水素間のカップリングが小さいなどプロトンスピンネットワークの帰属が難しい箇所に関しては1D selective TOCSYを用いた。以上の結果より、CA-IIはパリトキシンと同一の平面構造であることが明らかとなった。さらに、^{13}C NMRシグナルの化学シフト、高分解能質量分析、旋光度、HPLCでの保持時間の結果を含めてこの化合物がパリトキシンと完全に一致することを明らかにした。これまでの数ある報告を見ても、パリトキシンが海洋植物から単離されたという報告はこれが初めてとなり、今後、真の産生者や生合成経路を突き止めるにあたっても有用な知見であると考えられる。

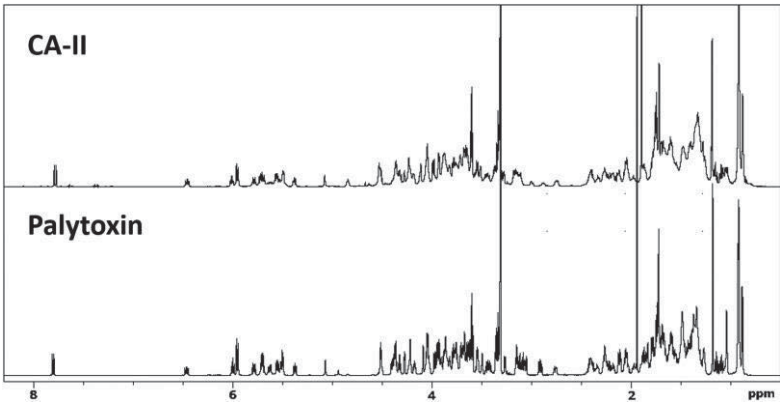


Fig. 2. 800 MHz ^{1}H NMR spectrum of CA-II from *C. armata* and authentic palytoxin from *P. tuberculosa*.

また、今回のハナヤナギ由来パリトキシンの構造決定の過程において、既報のパリトキシンのNMRシグナル帰属[5]と異なる箇所が判明したので修正した。正確なシグナル帰属の情報は、パリトキシンのみならず類縁体の構造決定においても非常に重要な役割を果たすと考えられる。

References

(1) Daigo, K. (1959) *J. Jpn. Pharm. Assoc. 79*, 353–356.

(2) 前田ほか，第 27 回天然有機化合物討論会，1985 年 10 月，広島.

(3) (a)Moore, R. E.; Scheuer, P. J. (1971) *Science (Washington, D.C.) 172*, 495–498; (b) Uemura, D. et al. (1981) *Tetrahedron Lett. 22*, 2781–2784; (c) Moore, R. E.; Bartolini, G. (1981) *J. Am. Chem. Soc. 103*, 2491–2494; (d) Cha, J. K. et al. (1982) *J. Am. Chem. Soc. 104*, 7369–7371.

(4) (a) Böttinger, H. et al. (1986) *Biochim. Biophys. Acta 861*, 164–176; (b) Havermann, E. (1989) *Toxicon 27*, 1171–1187; (c) Kaul, P. N. et al. (1974) *Proc. West. Pharmacol. Soc. 17*, 294–301.

(5) Kan, Y. et al. (2001) *Tetrahedron Lett. 42*, 3197–3202.

P40

リポソーム/水分散液における水分子のダイナミクス解析

○川口翼[1]，喜多理王[2]，新屋敷直木[2]，八木原晋[2]，福崎稔[3]
[1]東海大学大学院総合理工学研究科
[2]東海大学理学部物理学科
[3]東海大学熊本教養教育センター

Water Dynamics Analysis in Liposome/Water Dispersion

○Tsubasa Kawaguchi[1], Rio Kita[2], Naoki Shinyashiki[2], Shin Yagihara[2], Minoru Fukuzaki[3]
[1] *Graduate School of Science and Technology, Tokai University*
[2] *School of Science, Department of Physics, Tokai University*
[3] *Liberal Arts Education Center, Kumamoto Campus, Tokai University*

Water dynamics in liposome/water dispersion was analyzed by diffusion coefficient measurements using Pulsed Field Gradient (PFG) NMR method. Two types of water diffusion were found as the fast and the slow components in the dispersion, respectively. The fast component shows a closed value to the diffusion coefficient for the pure water diffusion coefficient and its temperature dependence also shows the same tendency. The slow component of the diffusion coefficient shows three or two orders of magnitude lower than the fast component, and agreed with the diffusion coefficient of liposome particles estimated from Stokes-Einstein's law. Moreover, the slow component shows a drastic increase according to the phase transition of liposome membranes. Thus, the fast and slow components respectively reflect dynamics for the free water and hydrated water of the liposome membrane cooperatively moving with liposome particles. These results suggest that the various dynamics in the liposome/water dispersion are clearly characterized by PFG-NMR method.

[序論]

生体の細胞膜のモデルとしてリポソームに関する研究は古くから行われており、現在ではその応用も多岐に渡る。様々な脂質分子やコレステロール等を組み合わせることにより、細胞膜の安定性をpHや温度などにより任意にコントロールする技術が知られている。一方で、脂質二重膜を構成するために必要不可欠である疎水性相互作用や、これに伴う水分子のダイナミクス変化については十分に報告がなされていない。本研究では、PFG-NMR法[1)]を用いることで、水分子のダイナミクスを直接観測し、脂質二重膜の形成や相転移に伴う水分子ダイナミクスを解析することを目的とする。

測定試料として1,2-Dipalmitoyl-*rac*-glycero-3-phosphocholine(DPPC)を用いてリポソーム水分散液を調製した。この際、エクストルーダーを用いてフィルタリングを行うことで粒径が50nmの一枚膜リポソームを調製した。DPPCは41.4℃[2)]でゲル相から液晶相へと相転移することが知られており、温度を含む範囲で測定を行い相転移が分子ダイナミクスに及ぼす影響について調べた。Fig.1に1H PFG-NMR法による分散液中の水の測定結果を示す。得られたプロットを以下の式

$$\frac{I(g)}{I(0)} = \exp\{-(\gamma g\delta)^2(\Delta - \delta/3)D\}$$

リポソーム，ダイナミクス，並進拡散

○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

を用いて解析すると拡散係数Dが得られる。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は拡散時間をそれぞれ表す。特に右辺のD以外のパラメータを纏めB-valueと呼ぶ。$I(g)$及び$I(0)$はある傾斜磁場強度gにおける信号強度と原点における信号強度をそれぞれ表す。この関係から、減衰過程を片対数グラフに描けばその傾きが拡散係数Dを示していることがわかるが、Fig.1に示すようにリポソーム水分散液中の水では途中で屈曲した減衰過程を示したことから複数の拡散成分が混在していることが示唆される。ここでは二成分の拡散成分が存在していると仮定し、解析を行った。ここで拡散係数が大きい成分をfast成分、小さいものをslow成分とした

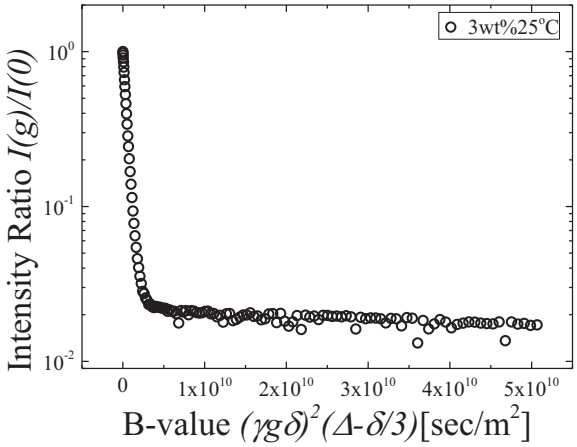


Fig. 1. The attenuation curve of water in 3wt% 50nm liposome/water dispersion at 25 °C.

Fig.2に水の拡散係数のfast成分、slow成分、リポソーム粒子を50nmとしてStokes-Einstein則から計算した拡散係数D_{calc}、純水の拡散係数D_{water}、^{2}H核により観測した天然に含まれる重水(DHO)の拡散係数D_{2H}、及び^{31}P核により観測したリン脂質の拡散係数D_{31P}の温度依存性をそれぞれ示す。低温域におけるD_{slow}の値はStokes-Einstein則から求めたリポソーム粒子の拡散係数D_{calc}と近い値を示していることがわかる。また、相転移温度41.4℃(≒317K^{-1})においてD_{slow}が不連続な増加を示している。これらのことから、D_{slow}はリポソームに水和し、リポソーム粒子と協同運動をしている水分子の拡散を反映しており、相転移温度以降の急激な増加については膜の流動性が増加したことを表している。一方で、D_{fast}成分及びD_{2H}の拡散係数は全温度を通じて純水の拡散係数D_{water}と近い値を示していることから分散液中の自由水の拡散係数を表していることがわかる。さらに、31P NMR測定から得られた結果から、D_{31P}の値はfast成分より小さく、slow成分よりは大きい値を示しており、粒子自体の並進拡散とリン脂質のヘッドグループの局所的運動を含んだダイナミクスを反映していることがわかった。

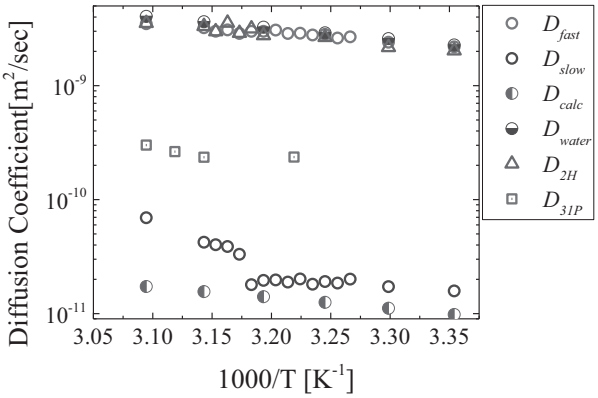


Fig. 2. Arrhenius plot of several diffusion coefficients for 3wt% 50nm liposome/water dispersion.

以上のことからPFG-NMR測定を用いることでリポソーム水分散液における水分子の拡散現象を含む多様なダイナミクスを捉えることができたと言える。発表ではこれらの結果をふまえ水分子のダイナミクスについて詳細に論ずる。

Acknowledgment
本研究の一部はJSPS科研費15K13554の助成を受け実施された。

References

1) E. O. Stejskal and J. E. Tanner, *J. Chem. Phys.*, **42**, 288-292 ,1965
2) S. Kundu, et. al., *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **17**, 18449-55, 2015

P41

セルロース誘導体の化学シフト帰属と構成モノマー組成の決定

○甲野裕之，藤田彩華，大島和浩，橋本久穂，清水祐一
[1]苫小牧高専　応用化学・生物系

Chemical shift assignment of cellulose derivatives: Determination of the mole fractions of monomers comprising sodium carboxymethylcellulose

○Hiroyuki Kono, Sayaka Fujita, Kazuhiro Oshima, Hisaho Hashimoto, Yuuichi Shimizu
Division of Applied Chemistry and Biochemistry, National Institute of Technology, Tomakomai College

The chemical shifts of the substituent groups of sodium carboxymethyl cellulose (CMC) were assigned by examining a series of CMC samples with different degrees of substitution. Comparative analysis of the ^{1}H–^{13}C heteronuclear single quantum coherence (HSQC) and heteronuclear multiple bond correlation (HMBC) spectra allowed the complete assignment of the substituent groups at the 2-, 3-, and 6-positions of the seven substituted monomers comprising the CMC chains, namely, 2-mono-, 3-mono-, 6-mono-, 2,3-di-, 2,6-di-, 3,6-di-, and 2,3,6-tri-substituted anhydroglucose units (AGUs). In addition, the mole fractions of the monomers were determined by lineshape analysis of the carbonyl carbon resonances. The comparison between the chemical shifts of the substituents revealed strong interactions between 2- and 3-substituents in the same AGU, and showed that the steric hindrance by a substituent at the 2- or 3-position suppresses subsequent substitution at the adjacent position.

【緒言】セルロースの誘導体特性を決定する主な構造因子は置換基種とその置換度(DS)と考えられるが、その分布状態も機能物性と強い相関がある。しかし2,3,6位水酸基を完全置換したDS=3の誘導体を除くと、置換基の分布状態を精密に決定すること自体がセルロース化学における問題のひとつであった。即ち、単一置換基による誘導体であっても、その構造中には非常に類似した構造を持つ8種類のグルコース残基（AGU）が含まれており、簡便にその存在比を決定することは困難であった。最近、我々のグループは各種二次元NMR法を駆使することで、カルボキシメチルセルロース（CMC）に含まれる8種類のグルコース骨格の^{1}Hおよび^{13}C化学シフトを帰属した。その結果、骨格の化学シフト変化はカルボキシメチル（CM）基による置換基効果のみで説明でき、隣接残基による化学シフトへの影響は殆ど無視できることを示した[1, 2]。

AGU骨格構造の化学シフトはセルロース誘導体のグルコース環構造変化に鋭敏に応答するが、分子鎖全体のコンフォメーション、分子鎖間の相互作用については置換基の立体構造が強く関係する。さらに置換基の局所情報を得るには置換基の化学シフトをダイレクトに決定する必要がある。CMCの場合、CM基のメチレン基(CH2)とカルボニル炭素C=Oが対象となる。そこで本研究ではこれら8種類のAGUについて、CM置換基の化学シフトの帰属を行い、その化学シフトの変化から同一および隣接残基におけるCM置換基間の相互作用を明らかにすることを検討した。

【実験方法】CMC合成は既報[1]に準じて行なった：Whatman社製CF11粉末セルロースを水酸化ナトリウム水溶液/イソプロパノールカルボキシメチルセルロース中、モノクロロ酢酸によりCM化を行なった。メタノールで洗浄、乾燥後、CMCを得た。本CM化反応を2、4、6、10、13回繰返し、DS＝0.94、1.59、1.86、2.44、2.76の試料（CMC1–5）を合成した。各CMCを重水に溶解し、500MHz NMR装置を用いて、363Kで各種NMR実験を実施した[3]。

【結果と考察】CMC試料についてHSQC、HSQC-TOCSY、HMBCスペクトル測定を行ない、相関解析から、未置換、2-, 3-, 6-一置換、2,3-, 2,6-, 3,6-二置換、2,3,6-三置換グルコース残基におけるCM置換基の^{1}H、^{13}C化学シフトの全帰属を行なった（Table 1）。

セルロース，モノマー組成，置換状態

○こうのひろゆき，ふじたさやか，おおしまかずひろ，はしもとひさほ，しみずゆういち

Table 1. ^{1}H and ^{13}C chemical shifts (ppm) for the substituents at 2-, 3-, and 6-positions of CMC.

AGU	2-position			3-position			6-position		
	$\underline{C}H_2$	$C\underline{H}_2$	$\underline{C}$=O	$\underline{C}H_2$	$C\underline{H}_2$	$\underline{C}$=O	$\underline{C}H_2$	$C\underline{H}_2$	$\underline{C}$=O
2-mono-	73.90	4.77 4.64	180.30						
3-mono-				73.70	4.85 4.71	181.04			
6-mono-							73.19	4.53 4.50	179.90
2,3-di-		4.81 4.75	179.30	73.22	4.84 4.76	179.30			
2,6-di-	73.86	4.76 4.63	180.18				72.95	4.53 4.51	179.81
3,6-di-				73.51	4.81 4.74	180.92	73.22	4.54 4.51	179.69
2,3,6-tri	74.13	4.76 4.63	179.30	73.19	4.83 4.77	179.21	73.02	4.53 4.51	179.73

CH_2水素はいずれも4.9〜4.5 ppm付近に重複し、そのカップリング定数はジェミナル^{1}H核の典型的な値$J_{H,H}$ = 16〜18 Hzであった。一方、二つの炭素の化学シフトは同じ置換位置であっても変化を示した。例えば、2位に置換したCM基のCH_2炭素は一置換AGUでは73.90 ppmに現れた。二置換AGUになると、2, 6位二置換では73.86 ppmと殆ど変化を示さないが、2, 3位二置換と2, 3, 6位三置換では、順に74.16, 74.13 ppmと低磁場シフトを示した。また3位に置換したCM基のCH_2炭素でも一置換および3, 6位二置換AGUの場合、その化学シフトはほぼ同一であるが、2, 3位二置換と2, 3, 6位三置換では、0.5 ppm程度の高磁場シフトが生じた。6位に置換したCM基のCH_2炭素ではそのような化学シフトの変化は殆ど見られないことから、同一AGUにおいて2位CM基と3位CM基の間で立体障害などの相互作用が働き、6位CM基と2および3位CM基の間ではそのような相互作用が極めて低いことが示唆された。C=O炭素ではその傾向がより顕著となった。即ち、3位C=O炭素は2位でのCM基置換によって1.8 ppmの高磁場シフトを示し、2位C=O炭素は3位でのCM基置換により1 ppm程度の高磁場シフトを示した。一方、2位及び3位での置換基による6位C=O炭素への影響は殆ど確認できなかった[3]。

2位と3位に置換したCM基のコンフォメーションは二面角θと3つの回転角φ, ψ, ωで決定できる（Fig. 1）。全てのCM基（CH_2）の^{1}H–^{1}HのJ値は16~18Hzであり、二面角θはいずれもほぼ同一である。また既報[1]で述べたようにグルコース環の化学シフトは置換基効果で説明できることから、2および3位でのφは置換基により変化しない。つまり2位、3位置CM基は隣接水酸基の置換により、回転角ψ, ωを変化させていると言える。これら置換基は共にグルコースの環構造に対しequatorialで配置しているため、その立体障害は低いと予想される。つまりカルボン酸塩間の静電反発を回避するために側鎖のコンフォメーションを変化させ、構造安定化が図られていると予想される。

Fig. 1. Dihedral angles θ, φ, ψ, and ω of the CM-groups.

以前の報告において、セルロースCM化では置換度が1.5以上では2,6位二置換AGUが優先して生成し、3位置換は抑制されることを明らかにした[1]。この理由として、隣接するAGU間に存在する2, 6位分子内水素結合の切断による、2位6位置換の相乗効果と結論した。本研究で明らかになった同一残基内2, 3位置換基の静電反発が3位水酸基の反応性低下の一因になっている可能性が高い。

謝辞　本研究はJSPS科研費JP 16K05802およびJP25410134の助成を受けたものである。

参考文献

[1] H. Kono, et al., *Carbohydr. Polym.* **146,** 1-9 (2016).
[2] H. Kono, et al., *Cellulose* **22,** 2927-2942 (2015).
[3] H. Kono, et al., *Carbohydr. Polym.* **150,** 241-246 (2016).

P42

ゴム状高分子の溶液NMRを用いた種々の測定

○宮代亜紗美[1]，吉水広明[1]
[1]名古屋工業大学・大学院・工学研究科

A variety of measurements using solution NMR of the rubber-like polymer

○Asami Miyashiro[1], Hiroaki Yoshimizu[1]
[1] *Graduate school of Engineering, Nagoya Institute of Technology*

Because it is possible to rubber-like polymer is soft deformation, it has been attracting attention for application to gas separation membrane. In this study, we measured the gas diffusion coefficient as a study of gas separation membranes using a rubber-like polymer. The measurement in addition to the conventional method using a gravimetric method, measurements with a solution NMR was also performed. The measurement you made were carried out, such as PFG-NMR measurement and selection irradiation experiment. As a result the difference in any measuring method it was possible to obtain a value equivalent gas diffusion coefficient without. Therefore it can be said that it is possible to measure the gas diffusion coefficient with a solution NMR.

【緒言】

近年高分子膜を用いた気体分離膜に注目が集まってきている。その理由として気体分離の際に必要なエネルギーが圧力差のみであるため低エネルギー・低コストだといえるからである。その中でもゴム状高分子は柔らかく変形が可能であるため今後ゴム状高分子を用いた気体分離膜に注目が集まるといえる。より良い気体分離膜を開発するためには気体分離膜の性質を測定する必要がある。その中で本研究では膜内での気体の動き、気体拡散係数について測定を行った。従来では重量法を用いて膜への気体の収着過程の経時変化により気体拡散係数を求めていた。それに加え今回はNMRを用いた測定でも気体拡散係数を測定することができるのではないかと思い実験を行った。

【実験】

今回研究に用いたゴム状高分子はブタジエンゴムである。溶液キャスト法により膜厚0.1㎜の薄膜を生成した。収着気体には材料との相互作用のない^{129}Xeを用いた。

初めに従来の重量法を用いた気体拡散係数測定を行った。任意の圧力に対して収着測定を行い平衡収着量に対する各時間の収着量を求めプロットした。

次にNMR測定である。行ったのは選択照射実験とPFG-NMR測定の２つである。まず選択照射実験行う前にInversion Recovery法を用いて、材料に収着した気体と材料外で遊離している気体のT_1を測定した。その結果収着気体のT_1は９秒、遊離気体のT_1は６７秒という結果を得て、この差を利用して選択照射実験を行った。

気体拡散係数、気体分離膜

○みやしろあさみ、よしみずひろあき

選択照射実験は遊離気体に対するピークの周波数を選択的に照射することによってスペクトル上の遊離気体のピークを消すことができる。観測までの間に材料内と外で気体の交換が起こることにより、収着気体側のピークの減少が見える。この減衰により気体拡散係数を求める。
続いてPFG-NMRである。条件は拡散時間20 ms、δ1 ms、G 0 ～ 10 T/mで行った。

【結果・考察】
まず重量法により求めた気体拡散係数である。平衡収着量に対する各時間の収着量をプロットしたところ圧力に依存せずに同一の曲線を描くことを確認できた。そのプロットに対し理論式を用いることにより気体拡散係数4.5×10^{-7}（cm^2/sec）を得た。
続いてNMR法である。選択照射実験では照射時間を0.5，1.0，2.0，3.0，4.0，5.0秒の6点測定した。照射時間が長くなるにつれて収着気体によるピークが減衰していることが確認できた。このピーク強度の減衰をプロットし理論式を用いて気体拡散係数4.5×10^{-7}（cm^2/sec）を得た。また現在収着気体によるピークを選択照射することでピークを消し、その後の待ち時間を変えることにより消えたピークが復活してくる様子により気体拡散係数を求める実験を行っている。その結果については学会発表の時に述べたい。
最後にPFG-NMR測定である。磁場勾配が大きくなるにつれてピーク強度が減衰したことが確認できた。その減衰より自己拡散係数を求めることができる。結果5.5×10^{-7}（cm^2/sec）を得た。

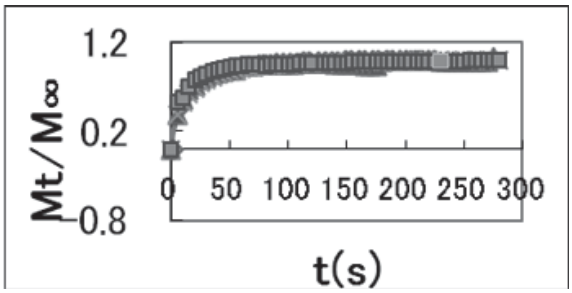


Fig.1 Time dependence Xe sorption relative for BR membrane.

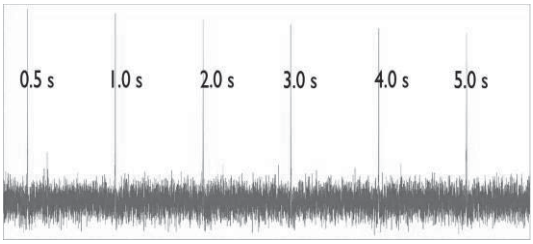


Fig.2 An example of the selective-irradiation NMR experiment.

以上のことによりNMRを用いて求めた気体拡散係数は従来の重量法で求めた気体拡散係数と同等の値を得ることが分かった。これによりNMRを用いての気体拡散係数測定が可能となったといえる。

P43

ポリプロピレンのF_2選択励起TOCSY

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

F_2-selective TOCSY of polypropylene

○Koshi Matsubara[1,2]
[1]*R&D Center, Mitsubishi Chemical Corporation*
[2]*Research and Development Division, Japan Polychem Corporation*

Selective excitation of small signals along F_2 axis was effective to avoid the disturbance of large t_1 noise of polypropylene when the t_1 noise obscured small correlation signals in conventional and F_1-selective TOCSY spectra. Because the t_1 noise and a F_1-selected strip were orthogonally oriented in the F_1-selective TOCSY spectrum, the detection of small signals under the t_1 noise was severely hampered. On the other hand, because the t_1 noise and a F_2-selected strip were parallel-oriented in the F_2-selective TOCSY spectrum, small correlation signals were readily detected even if the signals of minor components were less than those of polypropylene by 4 orders of magnitude.

序論　^{1}H NMRスペクトル上の巨大なシグナルを回避して、微小シグナルを選択的に励起することにより、微小シグナルの二次元NMRスペクトルを得ることができるが、巨大なシグナルのt_1ノイズと微小な相関シグナルが重なる領域では相関シグナルを認識できない場合がある。従来の選択励起二次元NMRはいわゆるF_1選択法であったが、F_2選択法にすればこのt_1ノイズによる妨害を回避でき、食品中の微量成分の分析に有効であることが示された[1]。この方法はポリオレフィン中の微量な末端基や異種構造を解析するために利用できる可能性があるので、F_2選択励起二次元NMRをポリプロピレンに適用した。

方法　ポリプロピレンをo-ジクロロベンゼン/ブロモベンゼン-d_5＝4/1（v/v）混合溶媒に溶解し、120℃で非選択励起TOCSY、F_1選択励起TOCSY、F_2選択励起TOCSYスペクトルを測定した。リフォーカス180°パルスにRe-BURPを用いたDouble Pulse Field Gradient Spin Echoで3.4－5.4ppmの領域を選択励起した。このDPFGSEブロックをF_1選択励起TOCSYでは最初の90°パルスの直後に、F_2選択励起TOCSYではFID取得開始の直前に組み込んだ[1]。

結果と考察　ポリプロピレンの非選択励起TOCSY、F_1選択励起TOCSY、F_2選択励起TOCSYスペクトルをFig.1に示す。1－2ppmのポリプロピレンと7－7.5ppmのo-ジクロロベンゼンのシグナルはF_1軸に平行な巨大なt_1ノイズをともない(a)、t_1ノイズに埋もれた2－7ppmの領域の微小な相関シグナルは認識できない。ただし、F_1=F_2の対角線に対して対称な領域では相関シグナルがわずかに確認できる(d)。自動調整したレシーバーゲインは非選択励起TOCSYでは3であったが、F_1選択励起TOCSYでは25となり、t_1ノイズが抑制されている(b)。しかし、F_1選択励起TOCSYではt_1ノイズと選択領域が“直交”するために、t_1ノイズに埋もれた微小な相関シグナルを認識できない(e)。一方、F_2選

F_2-selective TOCSY

○まつばらこうし

択励起TOCSYではレシーバーゲインは203となり、t_1ノイズがさらに抑制されている(c)。F_2選択励起TOCSYでは相関シグナルがt_1ノイズと“平行”な領域に生じるので、t_1ノイズに妨害されることなく微小な相関シグナルが検出されている(f)。なお、(f)に示した領域のシグナルの高さは^{1}H NMRスペクトルではポリプロピレンのメチル基の1/20000程度であった。

巨大なシグナルと微小なシグナルが共存する系ではF_1選択励起よりF_2選択励起二次元NMRのほうが微小な相関シグナルの検出に期待がもてる。ただし、F_2選択励起二次元NMRでは十分なF_1軸のデジタル分解能のために必要なデータ点数を取得するための時間的なコストを要する。

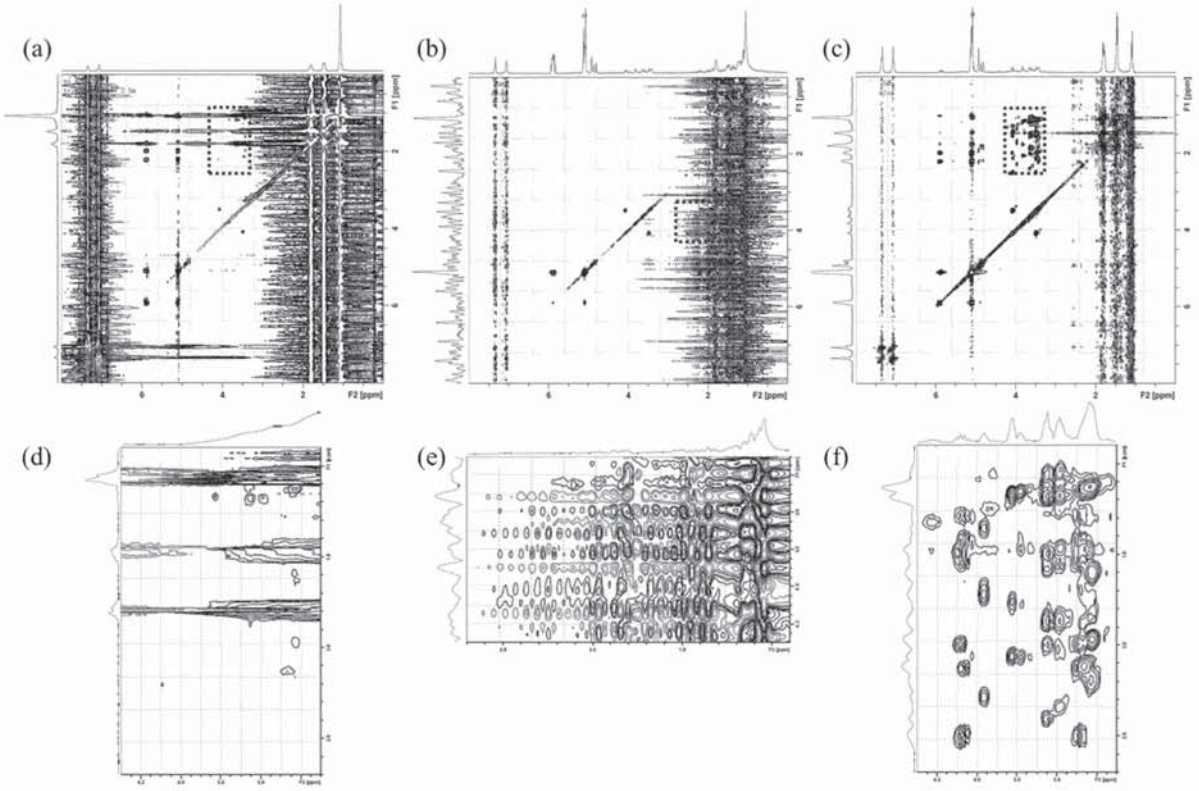


Fig. 1. (a) Non-selective TOCSY, (b) F_1-selective TOCSY, and (c) F_2-selective TOCSY spectra of polypropylene measured in *o*-dichlorobenzene/bromobenzene-d_5=4/1(v/v) mixed solvent. The rectangle regions enclosed with a broken line in (a)–(c) were expanded in (d)–(f), respectively. Projection 1D spectra were attached in the upper- and the left-side of each 2D spectrum. A DPFGSE block was incorporated just after the first 90° pulse for the F_1-selective TOCSY spectrum, and just before FID acquisition for the F_2-selective TOCSY spectrum[1]. A Re-BURP pulse of 5 ms was used to refocus magnetization in the 3.4–5.4 ppm region.

参考文献

[1] M. Koda, K. Furihata, F. Wei, T. Miyakawa and M. Tanokura. *Magn. Reson. Chem.* **2011**, *49*, 710–716.

P44

さまざまな低分子液体のPFG-NMR法と誘電分光法による並進および回転拡散の評価

○堀雄貴[1]，川口翼[2]，喜多理王[3]，新屋敷直木[3]，八木原晋[3]，福崎稔[4]
[1]東海大学大学院理学研究科
[2]東海大学大学院総合理工学研究科
[3]東海大学理学部物理学科
[4]東海大学熊本教養教育センター

Evaluation of the translational and rotational diffusion of various low-molecular liquid by PFG-NMR and dielectric spectroscopy.

○Yuki Hori[1], Tsubasa Kawaguchi[2], Rio Kita[3], Naoki Shinyashiki[3], Shin Yagihara[3], Minoru Fukuzaki[4]
[1] *Graduate School of Science, Tokai University*
[2] *Graduate School of Science and Technology, Tokai University*
[3] *School of Science, Department of Physics, Tokai University*
[4] *Liberal Arts Education Center, Kumamoto Campus, Tokai University*

In the present work molecular dynamics of the low molecular weight liquids such as alcohol, were analyzed by the diffusion coefficient obtained from Pulsed Field Gradient Nuclear Magnetic Resonance (PFG NMR) and the dielectric relaxation time from dielectric spectroscopy. It has not been reported yet to unify interpretations from the transitional diffusion and rotational diffusion for low molecular weight liquids in categories kinds. Results of the comparison between these analyses, indicate that there exists a significant correlation with power low between the reciprocal diffusion coefficient and dielectric relaxation time for the series of low molecular weight liquids. In addition, we also consider the mobility of a small amount of water contained in these liquids.

低分子液体はそれぞれ特有な物性や分子ダイナミクスを持ち合わせており、さまざまな産業で利用されている。これまで、限定的な低分子液体に関する分子ダイナミクスを研究した報告はなされているが、数十種類の低分子液体に関して並進拡散と回転拡散を比較し、統一的な解釈をした例は発表者らの知る限りこれまでにはない。本研究では、NMR法によってプロトンの並進拡散係数を、また誘電分光法では極性分子全体もしくは局所的な運動モードの回転拡散を特徴づける誘電緩和時間を解析することによって、アルコールなどの低分子液体の分子運動を特徴づけることを目的とする。

実験試料として、アルコール、エーテル、エチレングリコール、ケトン、水等を用意した。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。拡散係数を求めるために下式(1)のStejskal-Tannerの式[2)]を用いた。

$$I_{(g)}/I_0 = \exp\left(-\gamma^2 g^2 \delta^2 (\Delta - \delta/3) \cdot D\right) \quad (1)$$

ここで、γは磁気回転比、δは傾斜磁場印加時間、gは傾斜磁場強度、Δは拡散時間を表す。右辺の$\gamma^2 g^2 \delta^2 (\Delta - \delta/3)$をB-valueと呼び、B-valueに応じて減衰していく信号強度比$I_{(g)}/I_0$の過程から

磁場勾配NMR，低分子液体，誘電分光法

○ほりゆうき，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

拡散係数 D[m^2/sec]が求められる。NMR測定には、Bruker Ascend^{TM} 400WB NMRにDiff50 diffusionプローブを用いた。また、誘電分光法ではTime Domain Reflectometry (TDR)法、Impedance Analyzer (IA)、Impedance/Material Analyzer (IMA)を複合して用いることで、40Hz~20GHzに渡る広帯域測定を行った。

Fig.2に25℃におけるそれぞれの低分子液体の拡散係数の逆数$1/D$と誘電緩和時間τ[sec]の関係を示す。この関係は大きく3種類に分類され、それぞれが傾き1の直線にのることから、$1/D$とτは比例関係にあると言える。また、ケトン、水、二価のアルコールが同一の直線に乗ったのに対し、一価、三価のアルコールはそれぞれ異なる群として現れた。これらのことからそれぞれの分子種を分類する要素の一つとして水素結合数が関係していると思われる。

Fig.3に各低分子液体について拡散係数Dと粘度η[cP]の両対数グラフを示す。実線の傾きはほぼ-1であり、Dとηに反比例の関係があることが分かる。一方で、一価の直鎖アルコールでは直線の傾きの絶対値はわずかに大きくなっている。これは分子構造の異方性を反映している結果と考えられる。

これらの結果から、さまざまな低分子液体の誘電緩和時間や拡散係数について水素結合や粘性から特徴づけることが出来たと考えられる。さらに発表では、これらの低分子液体に含まれる微量な水の運動性についても検討する。

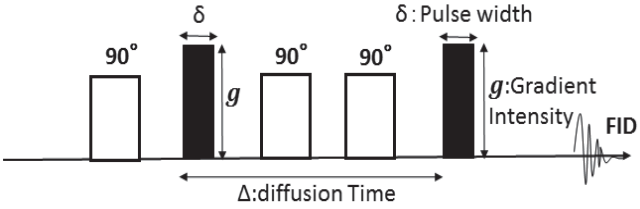


Fig. 1. Stimulated Echo sequence

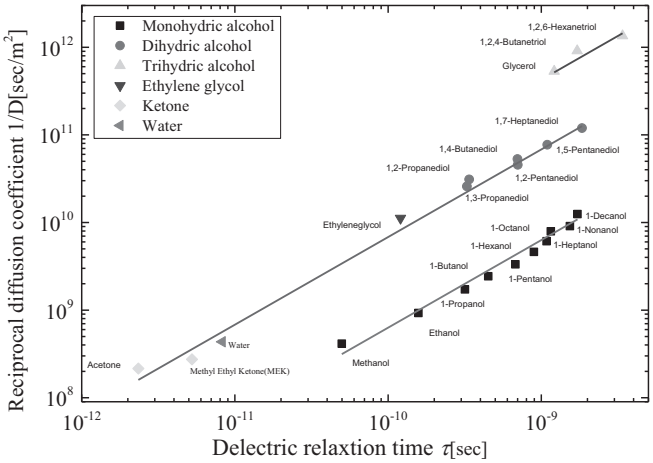


Fig. 2. The relationship between the reciprocal diffusion coefficient and dielectric relaxation time for pure liquids. Each solid lines represent slope as 1.

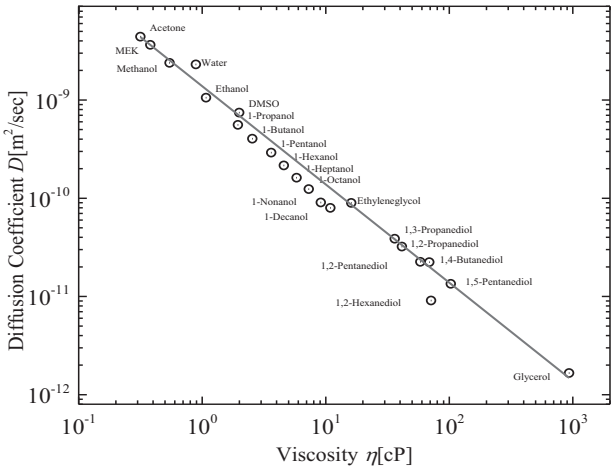


Fig. 3. The relationship between the diffusion coefficient and the viscosity for alcohols. The solid line represents slope as -1.

Acknowledgment
本研究の一部はJSPS科研費15K13554の助成を受け実施された。

References

(1) J. E. Tanner, *J. Chem. Phys.*, **14**, 2523-2526, 1970.
(2) E. O. Stejskal, and J. E. Tanner, *J. Chem. Phys.*, **42**, 288-292, 1964.

P45

金属ルテニウムを含む新規イオン液体のガラス転移温度降下メカニズム

○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

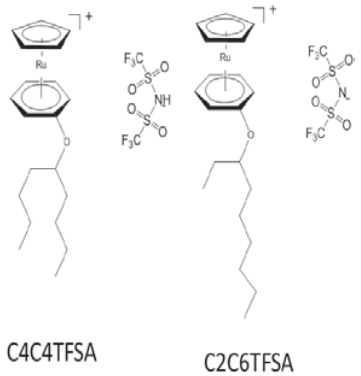
The mechanism of glass transition temperature drop for new type ionic liquids involving Ruthenium

○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. Our partner have also done it for years. However, the reason of the glass transition temperature drop of ionic liquid has not been resolved yet. Therefore, we used liquid and solid state NMR to focus in alkylating metallocene ionic liquid and reveal the mechanism of its temperature drop. We researched this mechanism from last year. In this year, we used Solomon theory for C4C4TFSA and C2C6TFSA. These sample's structure is very similar, however, the viscosity's temperature dependent curve showed big difference. We made efforts to analyze the difference of their molecular distance and dynamics by temperature from Solomon equation.

序論

最近、金属 Ru を含むイオン液体が神戸大学 持田研究室によって合成され[1]、構成成分（カチオンとアニオン）の側鎖置換、対称性、光学異性化が、イオン液体の融点降下、ガラス転移温度降下に影響を及ぼすことが示された[1]。金属 Ru を含むイオン液体は、構成成分（カチオンとアニオン）の構造変化や光学異性化で粘性の温度依存曲線が大きく変化し、結果として融点やガラス転移温度も大きく変化する [1]。その理由は構成成分の構造変化，光学異性化に伴うエントロピー変化に起因する。また金属 Ru を含むイオン液体は、カチオンとアニオンを少し変化させるだけで、粘性の温度変化が大きく変化する。この現象は構造変化、光学異性化によるエントロピーの変化を考慮するだけでは合理的に説明できない。我々は温度変化による分子ダイナミクスの変化がこの現象を解決する鍵と考えている。



方法：

固体および溶液NMR手法を駆使して基本的なNMRパラメータの測定を行い、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、異種核選択的緩和測定、CHF三重共鳴)。研究に用いた装置はTecmag Apollo分光計（Doty社 MASプローブ）、ECA-500（日本電子 溶液プローブ）

イオン液体、交差緩和、スピン間距離
○てい　ちかい、くわはら　だいすけ、もちだ　ともゆき

結果&考察

昨年に引き続き、新たに作製した Ru 金属を含むイオン液体について基本的な NMR 測定を行った。さらに交差緩和速度定数を決定するために、Solomon [2]の方法で異種核 ^{19}F 選択的緩和測定も行い、交差緩和速度定数を[2]の方法でフィッテイングし決定した。磁場勾配を用いた拡散係数測定では、85℃ですべてのサンプルの自己拡散係数が 25℃の純水(2.30*10^{-9}[m^2/s])に比べ二桁小さかった。このことから 85℃まではカチオンとアニオン間の距離はほとんど変わらないことがわかる。一方アルキル側鎖は温度によって動きが異なり、アニオンとの距離が変化すると考えられる。

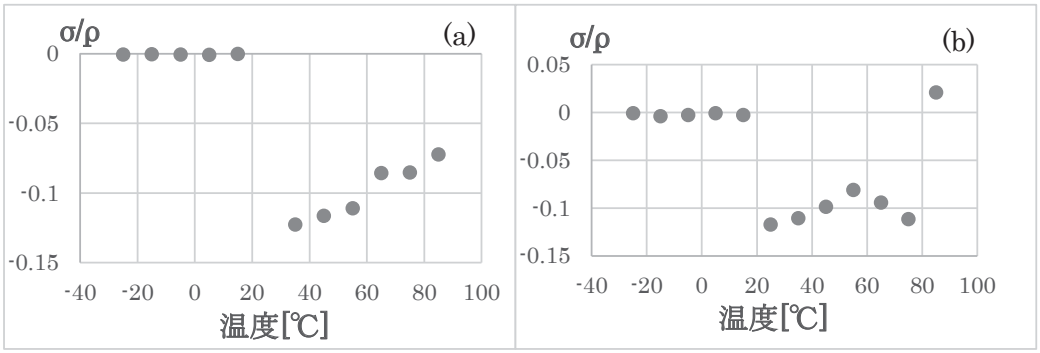


Figure 1. Variation of σ / ρ with temperature. (a) C4C4TFSA, (b) C2C6TFSA.

図 1 に交差緩和速度 σ とスピン格子緩和速度 ρ の比をプロットした。(a) は C4C4TFSA、(b) は C2C6TFSA の結果である。解析においてはカチオンとアニオンをそれぞれ 1 スピンと単純化し、制限つき条件のもとで下記のフィッテイング曲線

$$Sz(t) = -S_0\{\exp(-t(\rho-\sigma)) + \exp(-t(\rho+\sigma)\} + \mathrm{S}_0 \ldots (1)$$

(1)から σ と ρ を求めた。

$$\sigma / \rho = \frac{W_2 - W_0}{W_0 + 2W_1^I + W_2} \ldots (2)$$

式(2)は交差緩和にけるスピンの遷移確率と σ / ρ の関係式である。15℃以下ではどちらのサンプルも σ / ρ =0 なので、カチオンのアルキル側鎖の動きが殆ど無く、アニオンと 5Å以上離れていると考えられる。25℃からそれぞれのサンプルのアルキル側鎖が動き始め、側鎖とアニオンの距離が 5Å以内に近づく。温度が上がるにつれて、動きが激しくなり、σ / ρ の値の負値が小さくなる。C2C6TFSA に関しては 25℃から 75℃の間で大きな変動はなく、動的状態の変化はないと考えられる。85℃では一点して正の値に至り、これは急激に側鎖の運動性が高くなったと考えられる。揺動場のスペクトル密度関数を考えると、15℃以下では、カチオンとアニオンの距離が離れているため、運動状態にかかわらず異種核交差緩和が観測されない。25℃以上では 0 量子遷移の周波数成分が 2 量子遷移を上回り、温度の上昇とともに 2 量子遷移の周波数成分を多くなる。85℃では C2C6TFSA で 2 量子遷移が 0 量子遷移の周波数成分を上回る。しかし、アニオンの ^{19}F は 15℃以下で T_1 の値が小さくなる。15℃以下でカチオンとアニオンの距離が離れ、交差緩和が観測されない場合、アニオン単独の双極子-双極子緩和が支配的とは考えにくい。この点は今後注力して検証すべき問題である。

[1]Tomomi Higashi, Takahiro Ueda and Tomoyuki Mochida. Phys. Chem. Chem. Phys, 2016, 18 10041-10048

[2]I. Solomon.Phys.Rew.99 559-565(1955)

P46

PS，PMMS 内に収着させた Xe をプローブとし，^{129}XeNMR によって評価する気体輸送特性

○西口枝里子，吉水広明
名古屋工業大学・大学院・工学研究科

The gas transport properties characterized by ^{129}Xe NMR observations of the Xe in PS and PMMA as a probe

○Eriko Nishiguchi, Yoshimizu Hiroaki
Graduate school of Engineering, Nagoya Institute of Technology

In order to develop the high performance gas barrier polymers, the gas solubility and diffusivity for poly(styrene) (PS) and poly(methyl methacrylate) (PMMA) were investigated by sorption and ^{129}Xe NMR measurements at various temperatures. Glass transition temperatures, fractional free volumes, and gas sorption properties of PS and PMMA are similar with each other. However, the gas diffusion properties of them are significantly different. ^{129}Xe NMR chemical shift of the Xe in PS was larger than that in PMMA, meaning that the amounts and/or size of free volume in PS samples is smaller than those in PMMA. On the other hand, because the peak width of PS narrower than that of PMMA, diffusivity of the Xe in PMMA was lower than that of PS. From these results, it can be said that the gas diffusion properties of PS and PMMA should be explain only by their free volumes but also, for example, the local molecular mobility.

諸言

近年，高性能ガスバリア膜の開発需要が高まっている。既存のバリア材は，酸化防止目的で食品包装などに用いられたりしているが，水素カー並びに水素ステーションや太陽光発電パネルなどでは，格段に遮断する性能が要求される。ポリスチレン(PS)とポリメタクリル酸メチル(PMMA)は，ガラス転移温度や気体の溶解量(Fig. 1参照)はほとんど差が無いにもかかわらず，PMMAの気体拡散性はPSより大幅に低い。PMMAの気体拡散性を低下させている要因を解明できれば，気体遮断性の高いガスバリア膜の開発に貢献できると考えた。本研究ではPSとPMMAにXeを収着させ，法を用いて，圧力と温度を様々に変えながらガラス状態からゴム状態までの範囲で^{129}XeNMRスペクトル測定し，PSとPMMAの気体拡散性について化学シフトと線幅のデータから考察を行った。

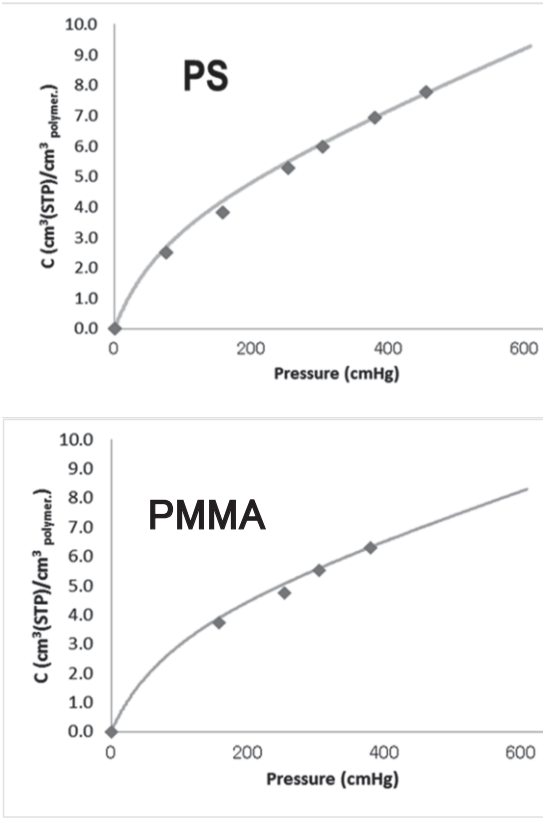


Figure 1 Xe sorption isotherms of PS and PMMA at 25 ℃.

---

^{129}XeNMR，気体拡散性

○にしぐちえりこ，よしみずひろあき

実験

PS と PMMA はそれぞれのメーカーから供与されたものを用い，常法に従って精製後，溶液キャスト法にてフィルム状に成形した。短冊状に切ったフィルム状サンプル約 50 mg を，外径 5 mm φ の耐圧 NMR 管に入れ，十分に真空乾燥させたのちに約 6 気圧の Xe ガスを導入し，長時間放置して収着平衡になるのを待ってから，25～125 ℃の範囲で ^{129}Xe NMR スペクトルを得た。測定には JEOL RESONANCE 社製 JNM-ECA 700 NMR 分光計を用い，観測周波数 192 MHz にて，シングルパルス法により観測した。待ち時間は 10 秒とした。^{129}Xe NMR 化学シフト値は同時に観測される気相 Xe の信号を内部基準とし，圧力 ＝0 の値を 0 ppm とした。Xe ガスは ^{129}Xe が約 81 ％に濃縮されたものを用いた。

結果

本研究で実施した測定では，PS の場合は全温度域にわたり収着 Xe のピークが観測されたが，PMMA では 85 ℃以上でのみ観測された。PMMA 中の Xe は拡散性がかなり低いために，線幅が拡がりすぎて見掛け上ピークが観測されなかったものと考察される。化学シフト値と線幅（FWHM）の結果をそれぞれ Fig. 2 と 3 にまとめた。全測定温度域にわたり，化学シフト値は PS の方が大きく，FWHM は PMMA の方が大きい。化学シフト値が温度上昇に伴い高磁場シフトするのは，主に各サンプルの熱膨張に起因する。化学シフト値の結果（Fig. 2）からは，少なくとも Xe が存在する極微小空間は，PMMA の方が PS よりも疎といえる。一般に気体拡散性は高分子の自由体積分率で半定量的に解釈可能であるが，これに従って判じるならば，PMMA 中にある Xe の方が拡散性は高いということになる。一方，FWHM は収着 Xe の運動性に対応すると解釈できるので，温度上昇とともに値が小さくなるのは拡散現象の熱力学的な理解の範疇でうなずける。しかしながら，PS と PMMA の比較において，少なくとも 125 ℃程度までは，PMMA 中の Xe の方が PS 中のそれよりも拡散性が低い，と判断せざるを得ない結果（Fig. 3）となった。以上より，PS と PMMA の気体拡散特性の違いは自由体積の大小だけでは説明できないことが明らかとなった。

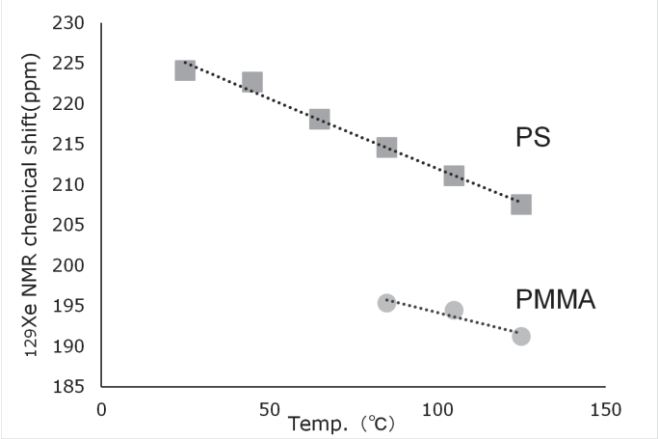


Figure 2 ^{129}Xe NMR chemical shift of the Xe in PS and PMMA as a function of temperature.

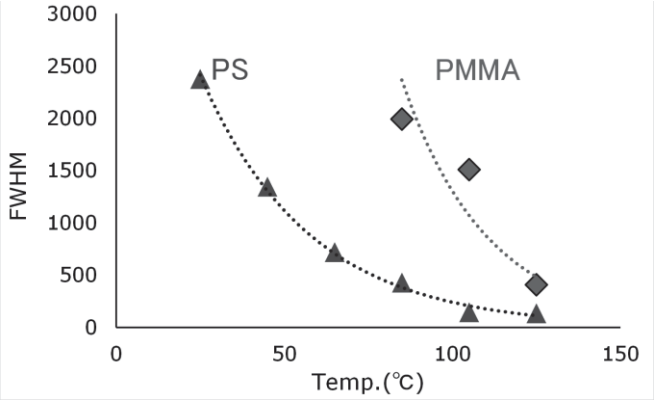


Figure 3 ^{129}Xe NMR peak width (FWHM) of the Xe in PS and PMMA as a function of temperature.

P47

重金属のスピン分極シフトの測定

○横山拓海[1]，花坂明[1]、桑原大介[1]、中川直哉[1]
[1]電気通信大学・大学院・情報理工学研究科

Measurement of the chemical shift of the heavy metal by the spin polarization

○Takumi Yokoyama[1], Akira Hanasaka[1], Daisuke kuwahara[1], Naoya Nakagawa[1]
[1]*Faculty of Informatics and Engineering Graduate School of Science,*
The University of Electro-Communications

In 1967, Nakagawa et al. [1] presented the study on the NMR chemical shifts of heavy atom. This was the first study for the NMR chemical shifts generated by spin polarization of heavy atoms. In addition, the NMR chemical shifts were the first relativistic effect found in chemistry. Following this pioneer work, there has been considerable research on the calculations of the relativistic effect on the NMR chemical shifts. [2] However, the relativistic effect has not been thoroughly investigated experimentally. In this study, we present the experimental observations for the chemical shifts of lead and iodine covalently bonded to water molecules.

1．序論

1967 年に中川ら[1]は、重原子によるスピン分極シフトについての学会発表をはじめて行った。のちに Pekka Pyykko [2]が 2000 年代にまとめたように、その発表は化学の分野における相対論的効果の研究の初めての研究として有名になった。本研究では、重金属のスピン分極化学シフトの NMR 測定を行った。スピン分極シフトとは、重原子との共有結合でできている分子中の重原子に現れる化学シフトである。外部磁場による 2 次常磁性電流は重原子の場合大きいので、結合軌道にスピン分極を生じる。そのシフトの大きさは原子番号の 4 乗以上に比例して大きくなることが理論的に明らかにされている。本研究ではさまざまな重金属化合物について、水溶液の濃度変化による化学シフトの変化を実験的に検証した。

2．方法

はじめに濃度約 15%の重水の作成をした。この重水に化合物を溶かして目的の濃度の試料を作成し測定を行った。作成した試料の濃度は 5.0mol/kg から 0.001mol/kg の間である。それぞれの物質のついては、緩和時間を測定して最適な測定条件を設定した。濃度の薄いものについては、十分な感度の信号が得られるまで積算した。すべての測定は温度 30℃で行った。研究に用いた装置は ECA-500NMR 分光計である（11.7T）。

スピン分極、重金属、化学シフト

○よこやまたくみ，はなさかあきら，くわはらだいすけ，なかがわなおや

3. 結果および考察

図1にヨウ化カリウムのヨウ素の測定結果を示す。高周波数側から 5.0mol/kg、1.0mol/kg、0.1mol/kg、0.01mol/kg、0.001mol/kg の5つの濃度においての測定結果である。濃度と積算回数の違いからスペクトルの強度に差が生まれたが、5つの濃度についてスペクトルを得ることができた。またこれらのスペクトルは、濃度が薄くなるにつれて低周波数方向に変化していることがわかる。この変化をまとめたものを図2として示す。図2は測定したヨウ素の濃度と ppm の関係を示している。濃度が薄くなるにつれて低周波数方向に変化していることが明確にわかる。また、濃度が 0.1mol/kg より薄くなったときに変化をしなくなった。これはスピン分極シフトの変化に限界があるためではないかと考えられる。

次に硝酸鉛から作成した溶液中の鉛の測定結果を図 3 として示す。低周波数側から 1.5mol/kg、1.0mol/kg、0.1mol/kg の結果である。硝酸鉛の試料も 0.001mol/kg まで作成したが、0.1mol/kg までしか結果を得ることができなかった。0.1mol/kg の測定結果は 1.5mol/kg のノイズに埋もれて見えづらくなっているが、スペクトルを得ることができた。ヨウ化カリウムの測定結果と見比べると、鉛の ppm の変化のほうが大きくなっていることがわかる。これはスピン分極シフトの理論において、シフトの大きさは原子番号が大きいほど大きくなることを示している。要旨には掲載しなかったが、軽金属の測定結果もスピン分極シフトの変化が原子番号に大きく依存することを示している。詳細については、他の化合物の測定結果とともに当日報告する。

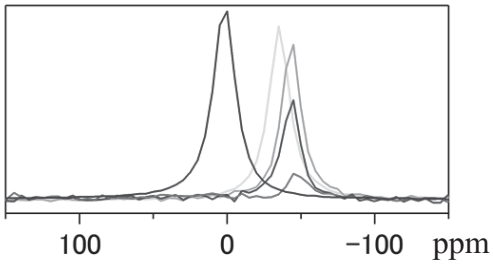


Fig1. NMR chemical shift of iodine in a KI solution

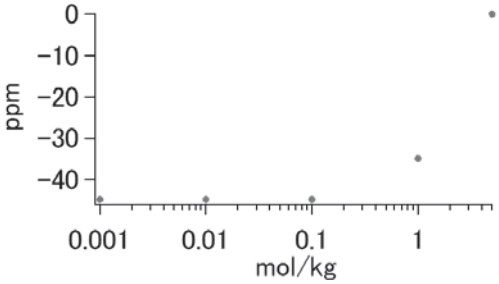


Fig2. Variation of the iodine chemical shift with concentration of a KI solution

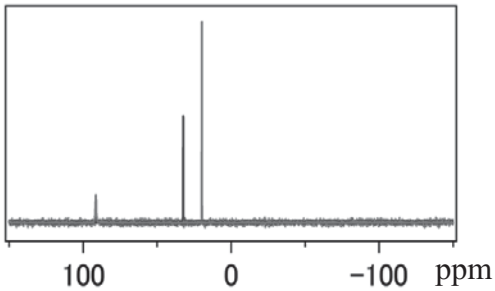


Fig3. NMR chemical shift of lead in a $Pb(NO_3)_2$ solution

References

[1]Nakagawa, N; Sinada, M. Proceedings of The 6th Annual Meeting of The Nuclear Magnetic Resonance Society of Japan, 1967

[2]Pekka Pyykko. Annu. Rev. Phys. Chem. 2012, 63, 45-64

P48

定量NMR法における不純物の重なる信号に対するクロマトグラフィーを併用した新規評価法の確立

○斎藤直樹[1]、北牧祐子[1]、大塚聡子[1]、西﨑雄三[2]、杉本直樹[2]、井原俊英[1]
[1]産業技術総合研究所　計量標準総合センター　物質計測標準研究部門
[2]国立医薬品食品衛生研究所　食品添加物部

Establishment of a Novel Evaluation Method for Analyte Signals Overlapping with Impurity Signals by Using Chromatography in Combination with Quantitative NMR

○Naoki Saito[1], Yuko Kitamaki[1], Satoko Otsuka[1] Yuzo Nishizaki[2], Naoki Sugimoto[2] and Toshihide Ihara[1]
[1]*National Metrology Institute of Japan, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Ibaraki, Japan*
[2]*Division of Food Additives, National Institute of Health Sciences, Tokyo, Japan*

In this study, we devised a novel evaluation method of analyte signals overlapping with impurity signals by using chromatography in combination with quantitative NMR. For demonstrating usefulness of the method, we performed a verification test. As an example, we conducted purity evaluation of 2-chlorophenol containing a phenol as similar structure impurity by using the method. And furthermore, we validated the method through verification of the purity of 2-chlorophenol under an experiment condition being enable to separate signals of an impurity phenol by changing pD in a sample solution without chromatography. As the results, we confirmed the difference in the purities between the two methods was about 0.1 %, concluding the devised method worked fine.

1.　はじめに　　近年実用化に至った^{1}H核磁気共鳴法による定量分析（以下、定量NMR）法[1)]は、内標準物質の信号量を基準として、1つの化学シフト軸上で異なる種類の分析対象成分の信号量を定量する手法であるため、精確な定量を実現するためには、分析対象成分の信号と重なりやすい類似構造不純物等の信号を如何にして分離するかが重要かつ普遍的課題となる。演者はこれまで、液性[2)]や組成[3)]など溶媒条件を変化させることでこれを解決する手法を検討してきたが、いずれの手法でも解決できない場合があった。そこで本研究では、分離能が優れたクロマトグラフィーを併用することで、定量NMR法において分析対象成分の信号と重なる不純物の信号量を評価ならびに補正することができる新たな手法を考案し、その有用性の実証実験を試みた。

2.　考案した手法の概念　　本研究では、水質分析等で用いるクロロフェノール混合標準液の原料のうち、類似構造の不純物としてフェノールが5000 mg/kg以上含まれる2-クロロフェノールを分析試料に用いて、考案した手法の実証実験を試みた。Fig.1に当該物質を例とした、本手法の概念図を示す。なお、内標準物質に国際単位系にトレーサブルな標準物質である1,4-ビス（トリメチルシリル）ベンゼン-d_4（以下、1,4-BTMSB-d_4、関東化学製）を、溶媒にアセトン-d_6（和光純薬製）を用いた。2-クロロフェノールに含まれる不純物フェノールの信号は、^{1}H NMRスペクトル上では2-クロロフェノールの信号に重なるが、クロマトグラム上では当該信号から分離できる。そのため、クロマトグラムにおける不純物フェノールと内標準物質の信号量比を用いて、試料溶液

quantitative NMR、chromatography、overlapping

○さいとうなおき、きたまきゆうこ、おおつかさとこ、にしざきゆうぞう、すぎもとなおき、いはらとしひで

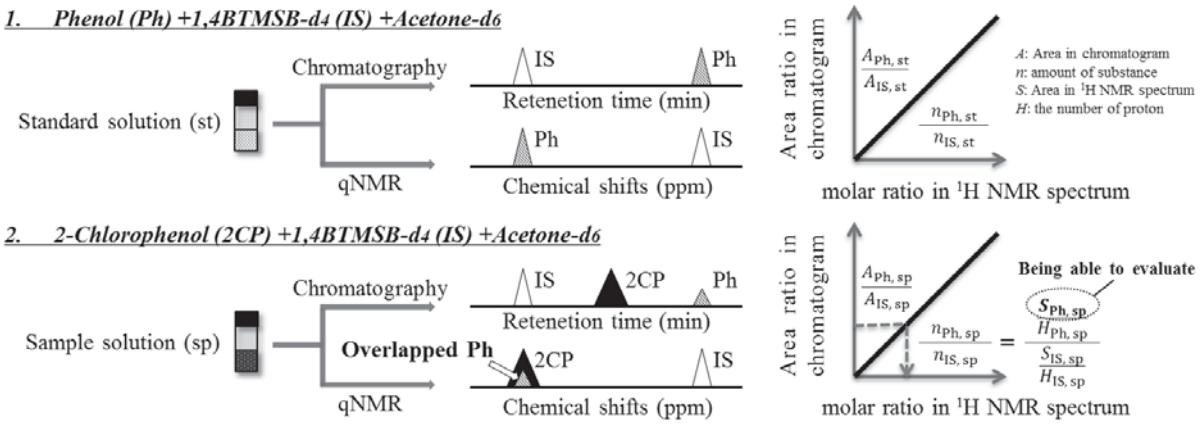


Fig. 1　Concept of our devised method

中の不純物フェノールと内標準物質の物質量比を求めることができれば、このうち内標準物質の物質量は^{1}H NMRスペクトル上で評価できるため、2-クロロフェノールに重なる不純物フェノールの物質量を間接的に評価できる。^{1}H NMRスペクトル上で不純物フェノールの寄与分を補正することで、定量したい2-クロロフェノールの信号量を精確に評価できると考えた。具体的にはFig.1に示す通り、フェノールおよび内標準物質が重溶媒に溶解した標準溶液を用意し、これをクロマトグラフィーと定量NMR法で測定することで、クロマトグラムにおけるフェノールと内標準物質の信号量比を定量NMR法で得た両者の物質量比とあらかじめ関係付けておく（紐付定数の取得）。次に、不純物としてフェノールが含まれる2-クロロフェノールおよび内標準物質が重溶媒に溶解した試料溶液をクロマトグラフィーで測定すると、クロマトグラムにおける不純物フェノールと内標準物質の信号量比および求めておいた紐付定数から両者の物質量比を得ることができる。この試料溶液を定量NMR法で測定すると、2-クロロフェノールの信号に不純物フェノールの信号が重なるが、得ている不純物フェノールと内標準物質の物質量比から計算できる不純物フェノールの寄与分を補正することで、定量したい2-クロロフェノールの信号量の精確な評価が実現できる。

3.　実験　　試料調製にはミクロあるいはウルトラミクロ天びん（メトラー・トレド製XP56あるいはXP6U）を、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ECS400）を、スペクトル解析のソフトウェアにはMestReNova（MestreLab製、Ver.7.0.2）を用いた。また、溶媒に1 mol/L NaOD/D_2O（ACROS製D_2OおよびCIL製NaOD/D_2Oで調製）を用い、内標準物質に認証標準物質であるDSS-d_6（和光純薬製）を用いることで、^{1}H NMRスペクトルにおいて2-クロロフェノールの信号から不純物フェノールの信号を分離し、本研究で考案した手法の妥当性確認を行った。なお、クロマトグラフには水素炎イオン化検出器付ガスクロマトグラフ（以下、GC、アジレント製7890A）を用いた。

4.　結果と考察　　フェノールと1,4-BTMSB-d_4をアセトン-d_6に溶解し、約10000 mg/Lのフェノールおよび約5000 mg/Lの1,4-BTMSB-d_4とした標準溶液をGCと定量NMR法で測定し、紐付定数を得た後、2-クロロフェノールと1,4-BTMSB-d_4をアセトン-d_6に溶解し、約10000 mg/Lの2-クロロフェノールおよび約5000 mg/Lの1,4-BTMSB-d_4とした試料溶液をGCと定量NMR法で測定し、紐付定数より^{1}H NMRスペクトルにおける2-クロロフェノールの信号に重なる不純物フェノールの信号量を求めた。この寄与分を補正し、2-クロロフェノールの純度を評価した結果、99.28 %（RSD：約0.04 %）となった。一方、2-クロロフェノールとDSS-d_6を1 mol/L NaOD/D_2Oに溶解し、約10000 mg/Lの2-クロロフェノールおよび約2500 mg/LのDSS-d_6とした試料溶液を定量NMR法で測定した。^{1}H NMRスペクトルで2-クロロフェノールの信号と不純物フェノールの信号の分離を確認し、2-クロロフェノールの純度を評価した結果、99.35 %（RSD：約0.08 %）となった。両者の純度が測定の繰返し性の範囲で十分に一致したことから、本研究で考案した手法の有用性を実証することができた。

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)
3) 斎藤直樹ほか, 第 54 回 NMR 討論会, 千葉 (2015)

P49

リチウムイオン二次電池用無機固体電解質のリチウム拡散挙動

○栗間昭宏，石川朋希、夏目穣、橋本康博、松岡直樹、吉野彰
旭化成株式会社

Lithium ion migration of inorganic solid electrolytes for lithium ion batteries

○Akihiro Kurima, Tomoki Ishikawa, Yutaka Natsume , Yasuhiro Hashimoto, Naoki Matsuoka, Akira Yoshino
ASAHI KASEI CORPORATION

Lithium ion migration phenomena in a series of solid electrolytes were studied. Lithium self-diffusion coefficients of $Li_{1.3}Al_{0.3}Ti_{1.7}P_3O_{12}$ measured with Pulsed Gradient Spin Echo (PGSE) -NMR were 10^{-11}-10^{-12} m^2/s and two diffusion components were observed. Their diffusion distance dependency may be due to the crystal defects. Main lithium ion conduction paths were predicted from the crystal structure. Activation energies of the path estimated with quantum chemical calculation and diffusion coefficients were almost same, therefore lithium ion conduction path was identified.

電解液の代替として無機固体電解質を用いることで、従来の電池に比べ、安全性、耐久性の向上を目指した全固体型リチウムイオン電池の開発が期待されている。しかし無機固体電解質は一般的に電解液に比べてイオン伝導度が低く、全固体電池の実用化にはイオン伝導度の改善が必要である。無機固体電解質がイオン伝導性を発現するメカニズムには不明な点が多く、性能向上にはリチウムイオン伝導を支配する因子を明確にする必要がある。近年、素材のキャラクタリゼーションとして無機固体電解質に対し、Pulsed Gradient Spin-Echo (PGSE) -NMRを用いたLi拡散挙動の解析が行われるようになってきた[1]。そこで、本研究では$Li_{1.3}Al_{0.3}Ti_{1.7}P_3O_{12}$組成を有する酸化物系固体電解質に対し、PGSE-NMRを用いてリチウムイオン拡散挙動の解析を行った。

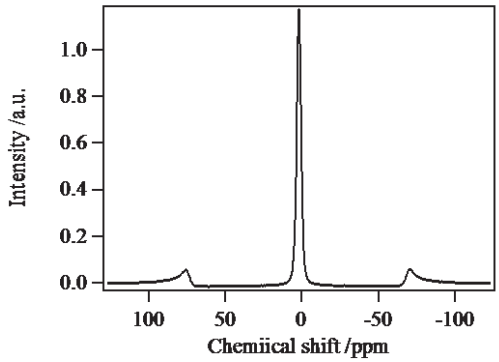


Fig. 1. ^{7}Li-NMR spectrum of $Li_{1.3}Al_{0.3}Ti_{1.7}P_3O_{12}$.

Fig. 1に$Li_{1.3}Al_{0.3}Ti_{1.7}P_3O_{12}$における^{7}Li-NMRスペクトルを示す。MASなしでもリチウム由来のピークが見られ、イオン伝導に寄与する運動性の高いリチウムが存在することがわかった。PGSE-NMRにより得られた拡散プロットをFig. 2に示す。拡散係数D /$m^2 \cdot s^{-1}$は以下で求められる。

$$\ln(E/E_0) = -D \times (\gamma^2 \delta^2 g^2 (\Delta - \delta/3))$$

E：ピーク強度　E_0：磁場勾配を与えない場合のピーク強度　γ：核スピンの磁気回転比 /$s^{-1} \cdot T^{-1}$
Δ：拡散時間 /s　δ：磁場勾配印加時間 /s　g：磁場勾配強度 /$T \cdot m^{-1}$

PGSE-NMR，固体電解質

○くりまあきひろ，いしかわともき、なつめゆたか、はしもとやすひろ、まつおかなおき、よしのあきら

拡散プロットは直線ではなく屈曲しており、拡散成分が少なくとも2成分以上存在することがわかった。求めたリチウムイオンの拡散係数と拡散距離 (拡散時間と拡散係数から算出) との関係をFig. 3に示す。溶液中の均一拡散では拡散係数は拡散距離に対して一定であるが、リチウムイオンの固体電解質中での拡散係数は、拡散距離に依存することから、不均一な拡散であることがわかった。結晶欠陥などの拡散障壁の影響と考えられた。$Li_{1.3}Al_{0.3}Ti_{1.7}P_3O_{12}$におけるリチウムイオンの拡散係数は$10^{-11}$-$10^{-12}$ m^2/sオーダーであり、一般的な電解液におけるリチウムイオンの拡散係数～10^{-10} m^2/sよりも2桁程度小さかった。電解液に比べ、固体電解質のイオン伝導度が低いのは、拡散係数が小さいことと拡散障壁が存在するためであり、固体電解質実用化に向けてこれらの改善が必要であることがわかった。

次に固体電解質中のリチウムイオンの伝導パスを見積もるために、量子化学計算を行った。Fig. 4で示した$Li_{1.3}Al_{0.3}Ti_{1.7}P_3O_{12}$の結晶構造から、リチウムサイトはL1とL2の2種類があり、伝導パスはL1→L1のパス①とL1→L2のパス②が考えられた。量子化学計算から求めたパス①の活性化エネルギーと拡散係数から求めた活性化エネルギーは良く一致し、リチウムイオンの拡散は主にパス①の経路で生じていると推定した。

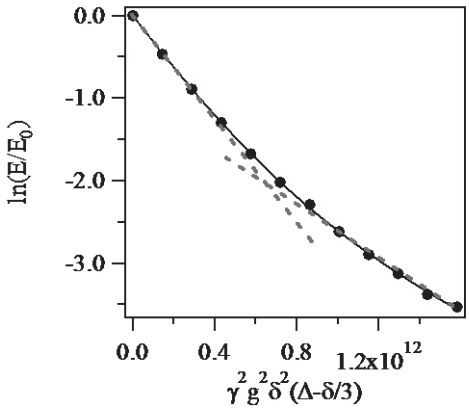


Fig. 2. ^{7}Li-PGSE-NMR echo attenuation curves of $Li_{1.3}Al_{0.3}Ti_{1.7}P_3O_{12}$.

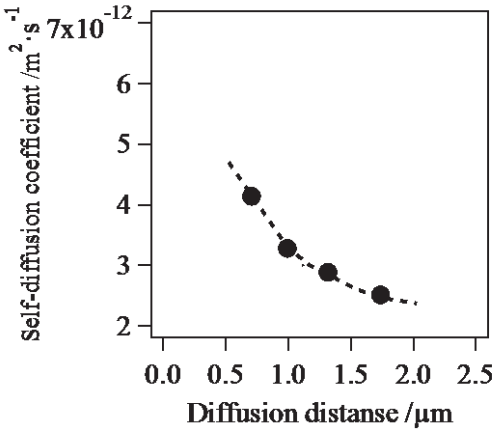


Fig. 3. Diffusion distance dependency of lithium ion self-diffusion coefficients on $Li_{1.3}Al_{0.3}Ti_{1.7}P_3O_{12}$ (Δ=20-200 ms) .

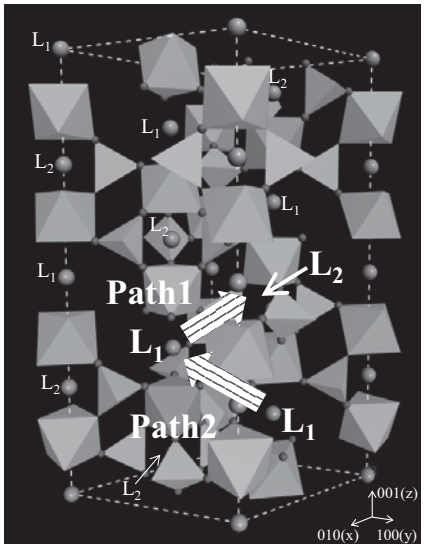


Fig. 4. Candidates for a lithium ion conduction path in crystal structure[2] of $Li_{1.3}Al_{0.3}Ti_{1.7}P_3O_{12}$.

References

(1) K. Hayamizu and Y. Aihara. (2013) *Solid State Ionics*, 238, 7-14., K. Hayamizu and Y. Aihara. (2014) *Solid State Ionics*, 259, 59-64., A. Kuhn, V. Duppel and B. V. Lotsch. (2013) *Energy & Environ. Sci.*, 6, 3548-3552., A. Kuhn, O. Gerbig, C. Zhu, F. Falkenberg, J. Maier and B. V. Lotsch. (2014) *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 16, 14669-14674., P. Bron, S. Johansson, Klaus Zick, J. S. Günne, S. Dehnen and B. Roling. (2013) *J. Am. Chem. Soc.*, 135, 15694-15697.

(2) E. Dashjav, F. Eietz. (2014) *Z. Anorg. Allg. Chem.*, 640, 3070-3073.

P50

光励起三重項状態を用いた動的核偏極による安息香酸の高偏極化

○田中良樹[1]，根来誠[1]，香川晃徳[1]，北川勝浩[1]
[1]大阪大学大学院・基礎工学研究科

Hyperpolarization of benzoic acid with dynamic nuclear polarization using photoexcited triplet states.

○Yoshiki Tanaka[1], Makoto Negoro[1], Akinori Kagawa[1],Masahiro Kitagawa[1]
[1] *Department of Advanced Electronics and Optical Science, Graduate School of Engineering Science, Osaka University.*

Dynamic nuclear polarization (DNP), a means of transferring spin polarization from electrons to nuclei, can enhance the nuclear spin polarization (hence the NMR sensitivity) in bulk materials at most 660 times for ^{1}H spins, using electron spins in thermal equilibrium as polarizing agents. By using electron spins in photo-excited triplet states instead, DNP can overcome the limit. We have succeeded in hyperpolarization of various materials by this way so far. However, all the materials have low solubilities in water. In this study, we succeeded in hyperpolarization of water-soluble benzoic acid. We demonstrated that the polarization of ^{1}H spins can be increased with increasing the concentration of pentacene up to 0.04 mol%. We achieved higher polarization using partially deuterated benzoic acid. We compared the polarizations of ^{1}H spins in single crystal and powder samples. Room temperature hyperpolarization of the water-soluble material can apply to biological systems.

光励起三重項状態を用いた動的核偏極（Triplet-DNP）とは、光励起三重項状態にある大きな電子スピンの偏極（Fig.1A）をマイクロ波を照射することで核スピンに移動させる方法であり、従来の動的核偏極に比べ、室温でも高い偏極率を得られるという利点がある。これまで我々は、Triplet-DNPによって、様々な物質の高偏極化に成功しているが、それらは水に溶かすことが困難なものばかりであった[1]。水溶性物質の高偏極化が可能となれば、高偏極水溶液の作製が可能となり、生体系への応用が拓けると期待される。

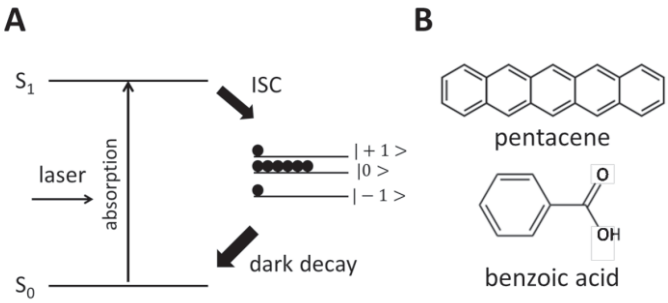


Fig. 1. photo-excited triplet states and pentacene doped in a benzoic acid crystal
(A) Energy diagram of pentacene doped in a benzoic acid crystal. The electronic state excited with laser irradiation are transited to the triplet state by intersystem crossing (ISC). (B) Structural formulae of pentacene and benzoic acid.

本研究では、Triplet-DNPを用いて水溶性である安息香酸の高偏極化を行った。サンプルとして、ペンタセンを約0.01mol%ドープした安息香酸単結晶を使用し(Fig.1B)、偏極率、緩和時間（T_1）の測定を行った。静磁場は約0.4T、室温で実験を行った。ペンタセンはパルス幅1μs、10mJ/pulse、

動的核偏極，光励起三重項状態，安息香酸

○たなか　よしき，ねごろ　まこと，かがわ　あきのり，きたがわ　まさひろ

590 nmの色素レーザを用いて励起した。三重項電子スピンの偏極は最大の22%となるように、ペンタセンの長軸と静磁場の方向が平行となる様にサンプルを配置した。得られた^{1}Hスピン偏極率は0.27%であり、T_1は4.3分であった（Fig.2）。

固体中では、安息香酸のカルボキシル基の水素は隣り合うカルボキシル基の酸素と水素結合しており、2つの分子間を行き来している。この振動により、双極子相互作用に起因する局所磁場が変調され、^{1}Hスピンのスピン格子緩和が促進していると考えられる。そこで、安息香酸のカルボキシル基を重水素化したものをホストに用いた。安息香酸の部分的重水素化により、T_1が7.5分と安息香酸単結晶に比べ約２倍伸ばすことに成功し、偏極率0.75%を達成した（Fig.2）。

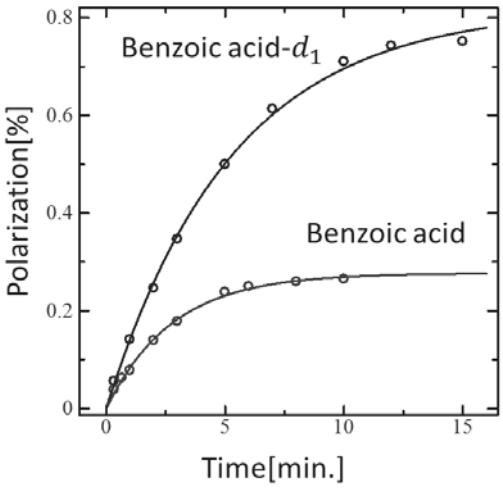


Fig. 2. Polarization buildup curves of ^{1}H spins in crystals of benzoic acid and benzoic acid-d_1.

粉末の安息香酸で同様の実験を行い、単結晶と比較した。約0.01mol%ペンタセンをドープした粉末試料で得られた偏極率は0.13%であり、単結晶時に比べ0.23倍小さい結果となった。これは、サンプルを粉末にすることにより、ペンタセン分子の向きがランダムになり、静磁場との向きに依存する電子スピン偏極が小さくなったためである。さらに安息香酸粉末の偏極率向上のため、ドープするペンタセンの濃度依存性についても実験を行った。ドープ量0.04mol%までの範囲では偏極率の向上が見られ、それ以上は偏極率が向上することはなかった。ドープ量を増やすことにより、偏極源が多くなる一方で、光励起時の電子スピンによる核スピン緩和への影響が強まることが考えられる。

今後、安息香酸の部分的重水素化、またペンタセンの重水素化により、粉末時の更なる偏極率向上を目指す。高偏極水溶液の作製が実現されれば、生体系へのTriplet-DNPの応用が拓けると期待される。

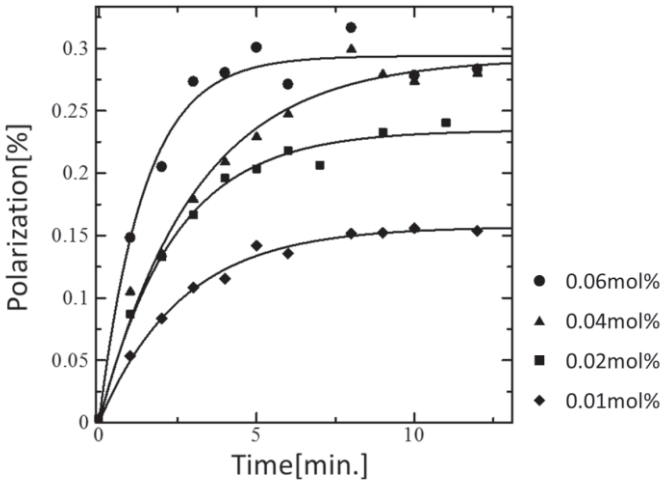


Fig. 3. Polarization buildup curves. Powder of Benzoic acid doped with pentacene 0.01 mol%, 0.02 mol%, 0.04 mol%, 0.06 mol%

本研究は科研費（No.26620009）の支援によって行われた。

References

[1]K.Tateishi, M.Negoro, A.Kagawa, and M.Kitagawa
Dynamic nuclear polarization with photoexcited triplet electrons in a glassy matrix. Angew. Chem. 125, 13549-13552

P51

磁場掃引 NMR パターン上の特異点を用いた四極子パラメータの決定法

○一条直規 [1]，武田和行 [1]，山田和彦 [2]，竹腰清乃理 [1]
[1] 京都大学大学院 理学研究科 化学専攻
[2] 高知大学 教育研究部 総合科学系 複合領域科学部門

Determination of quadrupolar parameters using singularities in field-swept NMR patterns

○Naoki Ichijo[1], Kazuyuki Takeda[1], Kazuhiko Yamada[2], K. Takegoshi[1]
[1] *Department of Chemistry, Graduate School of Science, Kyoto University*
[2] *Interdisciplinary Science Unit, Multidisciplinary Sciences Cluster, Research and Education Faculty, In charge of Science Research Center, Kochi University*

We propose a simple data-analysis scheme to determine the coupling constant and the asymmetry parameter of nuclear quadrupolar interactions in field-swept NMR for static powder samples. This approach correlates the quadrupolar parameters to the positions of the singularities, which can readily be found out as sharp peaks in the field-swept pattern. Moreover, the parameters can determined without quantitative acquisition and elaborate calculation of the overall profile of the pattern. Since both experimental and computational efforts are significantly reduced, the approach presented in this work will enhance the power of the field-swept NMR for yet unexplored quadrupolar nuclei. We demonstrate applications of this approach to various examples. The accuracy of the obtained quadrupolar parameters is also discussed.

スピン量子数が 1/2 より大きい核種の固体 NMR スペクトルには、異方的な化学遮蔽相互作用や双極子相互作用に加え、局所的な静電環境に依存する電気四極子相互作用が反映される。四極子相互作用は結合定数 C_Q および非対称性パラメータ η によって特徴付けられ、原理的には、実験で得た静止粉末スペクトルをフィッティングすることによって C_Q および η の値を決定することができる。

四極子相互作用の厄介な点のひとつは、その大きさが外部静磁場とのゼーマン相互作用と同程度、あるいは上回る場合があり得ることである。そのような場合、粉末スペクトルはプローブ回路の帯域幅を超えるほど広幅化し、共鳴線全体を得るには搬送周波数を段階的に変えて取得した多数の断片を繋ぎ合わせなければならないこともある。搬送周波数の変更は測定システムの再構成を必要とするため非常に手間が掛かる上に、信号強度の定量性も疑わしくなってしまう。遷移金属やハロゲン、硫黄などの核種は純四極子分裂の大きさが数十、数百 MHz にもなり得る [1, 2] ため、その化学的・工業的重要性にもかかわらず、NMR に関する知見は十分に深まっているとは言い難い。

装置構成の変更を回避するため、山田らはある一定の周波数におけるスペクトル強度の磁場依存性を記録し、そのパターンから四極子パラメータを決定する方策を提案した [3]。彼らは磁場可

磁場掃引 NMR，四極子相互作用，特異点

○いちじょうなおき，たけだかずゆき，やまだかずひこ，たけごしきよのり

変型の超伝導マグネットを用いて磁場を 0.5 から 6.3 T まで変化させ、^{33}S 同位体濃縮した斜方硫黄（α-S_8）の磁場掃引 ^{33}S NMR パターンを得た。そしてそれをフィッティングすることにより C_Q, η 値を決定したものの、そのような磁場掃引パターンの計算には、多数の磁場強度における粉末スペクトルを計算した上で観測周波数でのスライスを取るという繁雑な手続きが不可避である。また一般的に、フィッティングの成否に大きく影響する線幅の効果を客観的に取り入れることにも難しさがある。そこで、より簡便で客観性の高いデータ解析の処方が望まれる。

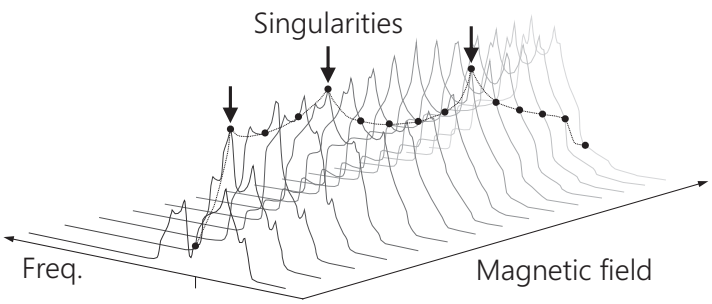


Fig. 1 Powder spectra under various magnetic fields and a field-swept pattern.

よく知られているように、遮蔽テンソルの主値や双極子結合定数は粉末線形のピークやショルダの位置と直接的に対応しており、スペクトルフィッティングをするまでもなくそれらの値を決定することができる。粉末線形のピークは信号強度が理論上無限大に発散する点であり[4]、ここではこれを特異点と呼ぶことにする。本研究では、粉末線形上の特異点位置と C_Q, η 値とを対応付ける理論を構築し、磁場掃引パターンと通常のスペクトルとで特異点は一致する（Fig. 1 参照）ことを用いて、磁場掃引実験で得た特異点の位置のみから C_Q, η 値を決定する簡便なデータ解析法を提案する [5]。本手法は Chu & Gerstien [6] や Granger [7] の方法と意図を同じくするが、任意の大きさの四極子相互作用に適用可能であるという点で一線を画すものである。

ポスターでは、構築した理論を解説し、本手法を α-S_8 の ^{33}S をはじめとする種々の磁場掃引 NMR パターンに適用して有効性を実証した結果を示す。

謝辞

本研究は JSPS 特別研究員奨励費 15J01779 の助成を受けて行われた。

参考文献

[1] E. A. C. Lucken, *Nuclear Quadrupole Coupling Constants*, Academic Press, London/New York (1969).

[2] H. Chihara, N. Nakamura, *Landolt-Börnstein Numerical Data and Functional Relationships in Science and Technology, New Series, Group 3, Vol. 20a–c, 31a–b, 39, Nuclear Quadrupole Resonance Spectroscopy Data*, Springer-Verlag, Berlin (1988–89, 1993, 1997).

[3] K. Yamada, K. Kitagawa, M. Takahashi, *Chem. Phys. Lett.* **618**, 20–23 (2015).

[4] M. Mehring, *Principles of High Resolution NMR in Solids, 2nd Edition*, Springer-Verlag, Berlin (1983).

[5] N. Ichijo, K. Takeda, K. Yamada, K. Takegoshi, *J. Chem. Phys.* (under review).

[6] P. J. Chu, B. C. Gerstein, *J. Chem. Phys.* **91**, 2081–2101 (1989).

[7] P. Granger, *Magn. Reson. Chem.* **28**, 156–158 (1989).

P52

固体NMRによる光駆動型ナトリウムイオンポンプKR2のpH変化に対するレチナール結合サイトの構造変化の解析

○重田安里寿[1]・伊藤奨太[2]・沖津貴志[3]・和田昭盛[3]・井上圭一[2,4]・神取秀樹[2]・川村出[1]
[1]横浜国立大学大学院・工学府　[2]名古屋工業大学大学院・工学研究科
[3]神戸薬科大学　[4]JST・さきがけ

Structural analysis upon pH-change of retinal binding site in light-driven sodium ion pump rhodopsin, KR2, by solid-state NMR

○Arisu Shigeta[1], Shota Ito[2], Takashi Okitsu[3], Akimori Wada[3], Keiichi Inoue[2,4], Hideki Kandori[2], Izuru Kawamura[1]
[1] *Graduate School of Engineering, Yokohama National University*
[2] *Department of Frontier Materials, Nagoya Institute of Technology*
[3] *Department of Organic Chemistry for Life Science, Kobe Pharmaceutical University*
[4] *JST・PRESTO*

Recent research revealed crystallographic structure of sodium ion pumping *Krokinobacter* rhodopsin 2 (KR2) extracted from marine bacteria. In the vicinity of retinal, specific residues are conserved depending on its function, for example, Asp85, Thr89 and Asp96 (DTD motif) for Bacteriorhodopsin (BR) and BR-like proton pump, and Asn112, Asp116 and Gln123 (NDQ motif) for KR2 and other sodium ion pump. These motifs are thought to be essential to express proper function, especially Asp116, a counterion, which side chain flips depending on its charge. Hence, we focused on the retinal binding pocket at neutral and acidic pH and determined chemical shifts of Retinal C20, Retinal C14, Lys255Cε, Schiff base and Tyr218Cζ. Chemical shift of Lys255Nζ indicated the torsion around retinal Schiff base which we revealed to be caused by the different location of Asp116 compared to BR-Asp85. This peak shifted upon pH-change which may indicate the protonation of Asp116 and reorientation of hydrogen bond. At the other side of retinal, Tyr218 forms weak hydrogen bond with nearby Asp251 in comparison with BR, which is probably characteristic feature for sodium ion pump as Asp251 works as temporal Na^+ binding site. These features may give us new insights about unique mechanism of sodium pump.

【緒言】近年結晶構造が明らかになった光駆動型ナトリウムイオンポンプ*Krokinobacter* rhodopsin 2は海洋性細菌*K. eikastus*由来のロドプシンタンパク質である[1,2]。他のロドプシンと共通して、タンパク質中に結合したレチナール発色団の光異性化により機能を発現する。これまでに研究されてきたプロトンポンプロドプシンやクロライドイオンポンプロドプシンでは、レチナールのシ

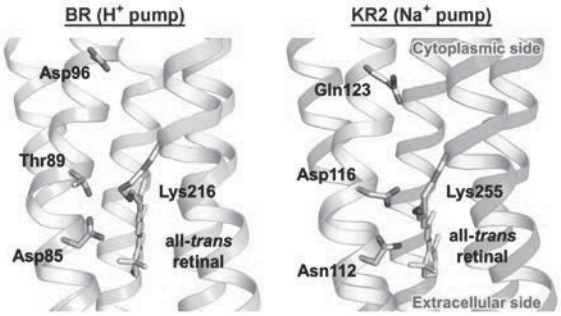


Fig. 1 DTD motif in BR and NDQ motif in KR2 [3]

膜タンパク質、光駆動型ナトリウムイオンポンプ、固体NMR

○しげたありす，いとうしょうた，おきつたかし，わだあきもり，いのうえけいいち，かんどりひでき，かわむらいずる

ッフ塩基に結合したプロトンを輸送に利用、ないしは、そのプラス電荷をアニオン輸送に利用していた。しかし、プロトン以外のカチオン輸送に関しては前例がなく、他のロドプシンには見られないユニークな機構を持つと考えられる。レチナール近傍には機能に特有な残基が保存されており、バクテリオロドプシン様プロトンポンプではDTDモチーフ(BRの場合Asp85, Thr89, Asp96)、KR2を含むナトリウムイオンポンプではNDQモチーフ(KR2の場合Asn112, Asp116, Gln123)を有している[3]。特にKR2の極大吸収波長が変化する酸性の結晶構造において、シッフ塩基から遠ざかるAsp116のフリップが観測されている。そこで我々は、pH変化に対してレチナールのプロトン化シッフ塩基の対イオンであるAsp116の荷電状態及び側鎖の向きが異なることに注目し、レチナール及びその近傍残基を含むレチナール結合サイト(Fig. 2)の固体NMR構造解析を行った。

【方法】 *E. coli* による大量発現時に安定同位体ラベルアミノ酸とレチナールを導入し、[14, 20-^{13}C]Retinal, [Phenyl-4-^{13}C]Tyr, [6-^{13}C]/[6-^{15}N]Lys-WT-KR2 を得た。安定同位体ラベル KR2 は POPE/POPG 膜に再構成した。水和した膜試料を 4.0 mm のジルコニア製 MAS ローターに詰めて、固体 NMR 測定を実施した。固体 NMR 測定は Bruker Avance III 600 MHz 固体 NMR 分光器および 4.0 mm の E-free プローブを用いて、測定温度 5°C・MAS 周波数 10 kHz の条件で、^{13}C-^{13}C Dipolar Assisted Rotational Resonance (DARR)測定および ^{13}C CP-MAS、^{15}N CP-MAS 測定を行った。DARR 法は原子核間距離が長い ^{13}C 核同士の間のスピン拡散を観測できるため、結晶構造に含まれるレチナールからの距離情報を基に、レチナール近傍のアミノ酸残基の帰属に用いた。

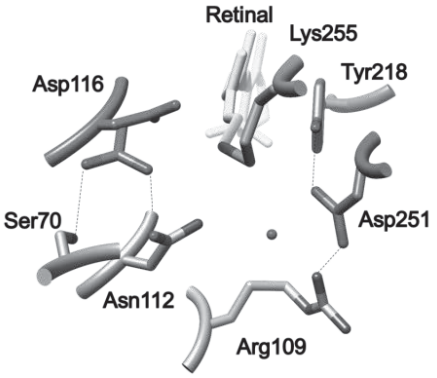


Fig. 2 Residues in the vicinity of retinal and hydrogen bonds

【結果と考察】 上記の方法により、pH 8.0、pH 6.0、pH 4.0 での、基底状態における、レチナール C20、C14、Tyr218Cζ、Lys255Cε、Lys255Nζ の信号帰属に成功した(Fig. 3)。また、これらの化学シフト値の pH 変化から、以下 4 点の評価を行った。

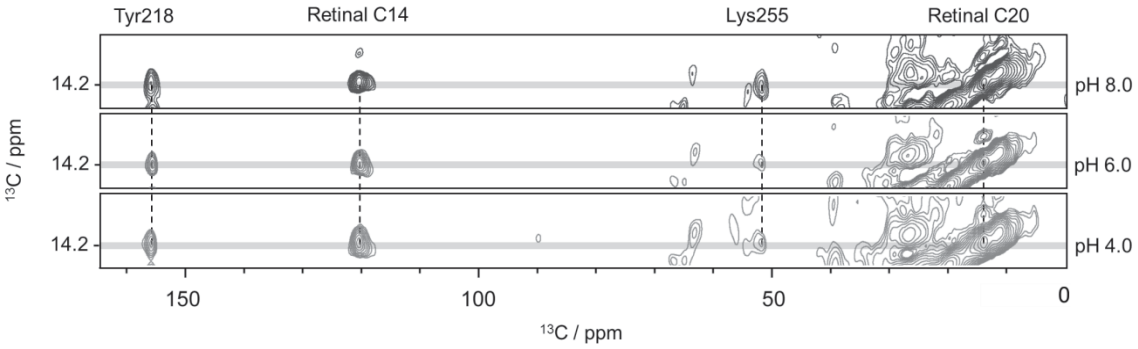


Fig. 3 Correlation peaks with retinal C20 at different pH

<u>①レチナールの構造</u>

レチナールC20とC14の信号はそれぞれ13位の*trans*/*cis*、15位の*syn*/*anti*の異性化に敏感である。DARRの結果より、レチナールC20は14.2 ppm、レチナールC14は120.5 ppmに信号を観測した。C20の信号は、13-*trans*のとき13 ppm付近、13-*cis*のとき20 ppm付近に、C14 の信号は15-*anti*のとき120 ppm程度、15-*syn*のとき110 ppmに観測される[4]ことから、基底状態におけるレチナールの構造はall-*trans*, 15-*anti*型と帰属した。pH変化に対し、化学シフト値は変化せず、レチナールの構造は変化しないことが明らかになった。

②Lys255のシッフ塩基の構造とAsp116のプロトン化状態

ロドプシンの極大吸収波長は、レチナールのねじれを反映している。レチナールシッフ塩基の化学シフト値も同様にねじれを反映しやすい為、その相関には一様な傾向が見られる[5]。我々は^{15}N CP-MASより、シッフ塩基の信号は150.2 ppmと帰属した(pH 8.0)。この値はBRやセンサリーロドプシンII(*Np*SRII)と比較し、吸収波長に対して高磁場シフトしている。このことは、カウンターイオンであるAsp116が他のロドプシンと比べてヘリックス1巻き分細胞質側にあり、相互作用によりシッフ塩基に捻じれが生じていることを示している(Fig. 4)。また、他のロドプシンに比べ強い信号強度を示したことから、pH 8.0におけるシッフ塩基の構造の均一性が高いことが示唆される。シッフ塩基の信号は、pHの変化に伴って低磁場シフト及び信号強度の減少が観測された。シフトはpH 6.0と5.0の間で特に大きく(pH 5.0のピークはpH 4.0の時とほぼ変化がない)、Asp116のプロトン化を反映していると推測される。また低磁場シフトと信号強度の減少から、Asp116のプロトン化に伴い、シッフ塩基の^{15}N-Hが構造的な揺らぎを有しつつも、やや強い水素結合様式に変化したと推測される。

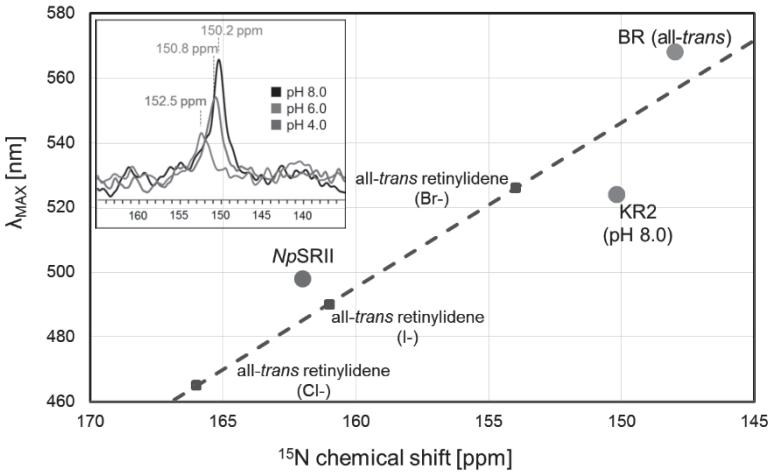


Fig. 4 Correlation between ^{15}N chemical shift of Schiff base and maximum absorbance wavelength and pH change of Schiff base signal

③Tyr218のAsp251との間の水素結合の強度

レチナール近傍のTyrは他のロドプシンでも保存されている残基で、近傍のAspと水素結合を形成する。TyrのCζ位の炭素は水素結合に敏感で、その化学シフト値から水素結合の強度を決定することが可能である[6]。KR2中に存在する15個のTyrのうち、DARR測定より唯一レチナール近傍に存在するTyr218の^{13}Cζ化学シフト値を決定した(155.8 ppm)(Fig. 5)。BRやSRIIでは同残基(BR-Tyr185, SRII-Tyr174)が強い水素結合を有する(BR:158.0 ppm, SRII: 157.7 ppm)[7]のに対し、KR2は比較的弱い水素結合を有することが明らかになった。KR2には他のロドプシンでは見られないAsp251とArg109との間の相互作用が認められており、このことでAsp251とTyr218の水素結合強度が弱くなっていると考えられる。Asp251およびArg109は機能に重要であることが明らかになっており、基底状態におけるTyr218との弱い水素結合はKR2のナトリウム輸送機構に特徴的であるといえる。Tyr218のAsp251との相互作用は、pH 4.0 においても変化はなく、Asp251は脱プロトン化状態を保っていることが示唆される。

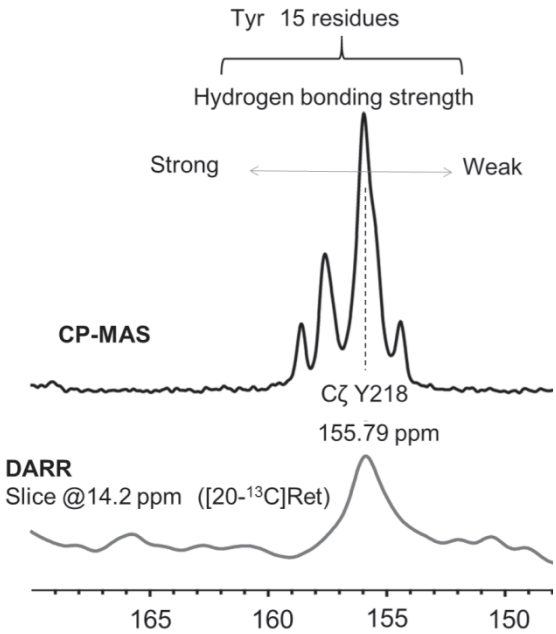


Fig. 5 ^{13}C CP-MAS and DARR spectra of ^{13}Cζ Tyr

④Tyr25水素結合状態から見る細胞外側Na^+結合サイト

KR2は膜中にて5量体を形成することがX線結晶構造解析により示されている[8]。その際、輸送に関与しないNa^+が2つのモノマーと水素結合を形成し、モノマー同士の位置を固定している(Fig. 6)。細胞外側Na^+結合サイトのNa^+はpH 3.6で解離することが報告されている[1]。^{13}C CP-MASスペクトルのpH 8.0とpH 4.0における比較から、^{13}Cζ Tyrの信号に変化が観測された。pH 8.0では157.7 ppmに存在した信号が、pH 4.0では155.2 ppmにシフトしており、その信号強度は15残基のうちの1残基分に対応していた。中性から酸性への変化で水素結合強度が弱くなる変化は、細胞外側Na^+結合サイトに存在するTyr25のNa^+結合状態と解離状態を示していることが示唆される。よって、Tyr25 のNa^+結合状態は157.7 ppm、解離状態は155.2 ppmであると帰属した(Fig. 7)。

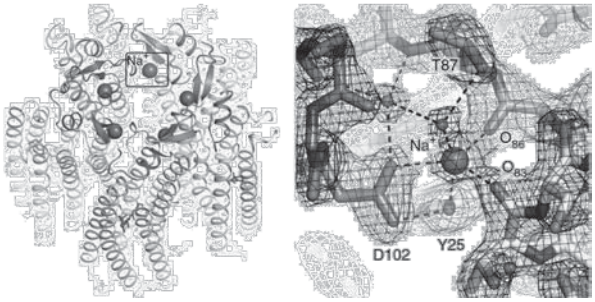


Fig. 6 Structure of Na^+ binding site at extracellular side [8]

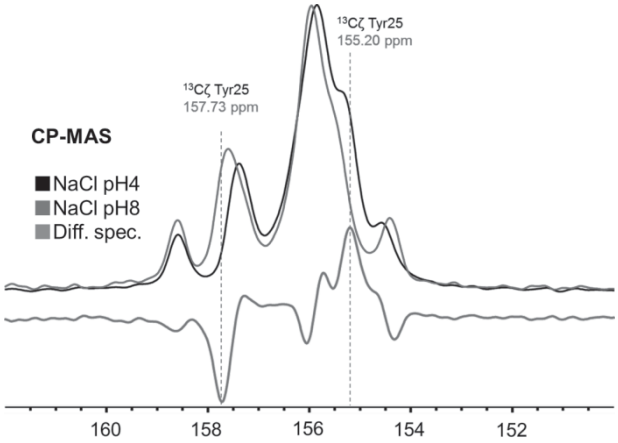


Fig. 7 ^{13}C CP-MAS spectra change in ^{13}Cζ Tyr region at pH 8.0 and pH 4.0

【結論】我々は、^{13}C CP-MAS、DARRによりレチナールC20、レチナールC14、Tyr218Cζ、Lys255Cε、シッフ塩基の帰属に成功した。これらの化学シフト値のpH変化から、レチナールのコンフォメーション、シッフ塩基の構造とAsp116のプロトン化状態、Tyr218のAsp251との相互作用とAsp251の脱プロトン化状態が明らかになった。これらの結果は、KR2のレチナール結合ポケットの構造が、中性と酸性においてシッフ塩基以外構造変化しないことを示した。一方で、細胞外側ナトリウムイオン結合サイトのNa^+結合・解離状態によるTyr25の水素結合の変化を観測した。

References

(1) K. Inoue et al. (2013) A light-driven sodium ion pump in marine bacteria. *Nat. Commun.* 4, 1678.

(2) H. Kato et al. (2015) Structural basis for Na^+ transport mechanism by a light-driven Na^+ pump. *Nature* 521, 48-53.

(3) K. Inoue et al. (2015) The Role of the NDQ Motif in Sodium-Pumping Rhodopsins. *Angew. Chem.* 54(39):11536-11539.

(4) V.S. Bajaj et al. (2009) Functional and shunt states of bacteriorhodopsin resolved by 250 GHz dynamic nuclear polarization-enhanced solid-state NMR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 106*, 9244–9249.

(5) J.G. Hu et al. (1997) The predischarge chromophore in bacteriorhodopsin: A ^{15}N solid-state NMR study of the L photointermediate. *Biochemistry 36*, 9316–9322.

(6) J. Herzfeld et al. (1990) Solid-state ^{13}C NMR Study of Tyrosine Protonation in Dark-Adapted Bacteriorhodopsin. *Biochemistry 29*, 5567–5574.

(7) X. Ding et al. (2016) Mediation mechanism of tyrosine 185 on the retinal isomerization equilibrium and the proton release channel in the seven-transmembrane receptor bacteriorhodopsin. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 11, 1786-1795.

(8) L. Gushchin et al. (2015) Crystal structure of a light-driven sodium pump. *Nat. Struct. Mol. Biol. 22*, 390–395.

P53

^{13}C固体NMRを用いたDMPC脂質二重膜存在下におけるペプチドホルモングルカゴンの線維構造の解析

○羽矢　和未[1]，川村　出[1]，内藤　晶[1]
[1]横浜国立大・院工

Glucagon fibril structure in the presence of DMPC lipid bilayers as studied by ^{13}C solid-state NMR

○Kazumi Haya[1], Izuru Kawamura[1], and Akira Naito[1]
[1]*Graduate School of Engineering, Yokohama National University*

Glucagon is a 29-amino acid peptide hormone and shows the function to regulate blood glucose level. In an acidic solution, it is known that glucagon easily forms amyloid fibrils. ^{31}P solid-state NMR experiments of the glucagon-DMPC bilayer system indicated that glucagon progressed from monomers to fibrils by taking several types of oligomers and some of them markedly disrupt the membrane. Here, we measured structural change of Gly^4 and Ala^{19} in glucagon during fibrillation by using ^{13}C solid-state NMR in the glucagon-DMPC bilayer systems at neutral pH. We found that the secondary structure around Gly^4 changed from α-helix to β-sheet, and that around Ala^{19} changed from initial β-form to different β-sheet. And from the growth of signal intensity, we found that the fibril nucleation rate constant(k_1) is larger and fibril elongation rate constant rate constant(k_2) is smaller compared to previous work(absence of DMPC bilayer). These results provide structural insight into glucagon fibril formation in the lipid bilayers.

［序論］　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が形成するアミロイド線維が関与している。最近の研究において、アミロイド線維よりもその中間体の方が細胞に対して高い毒性を示すと報告されているが、その詳細は明らかにされていない。本研究ではアミロイド線維の細胞毒性の機構を明らかにするため、グルカゴンをモデルペプチドとしてより生理条件に近い中性条件及び生体膜存在下でのグルカゴンのアミロイド線維形成機構、またその過程で細胞膜に与える作用を解明することを目的とする。

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。一方酸性溶液中ではミスフォールディングを起こし、容易にアミロイド線維を形成する。^{31}P NMRによる研究でグルカゴンは線維形成の過程で様々な凝集体を形成し、それぞれ特異的に脂質二分子膜と相互作用することが示唆された。本研究では中性条件かつ脂質二分子膜存在下でグルカゴンの線維形成に伴う二次構造変化及び線維形成速度を^{13}C 固体NMRを用いて解明した。

[実験]　4残基目のグリシン(Gly^4)と19残基目のアラニン(Ala^{19})を^{13}C標識したグルカゴンとDMPCをPeptide/Lipid=1:10(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、^{13}C 固体NMRで測定した。測定では運動性の高い成分（モノマー）を主に観測するDD-MAS法と運動性の低い成分（線維）を主に観測するCP-MAS法を交互に繰り返し、ペプチドの二次構造変化を追跡した。^{13}C標識アミノ酸近傍の二次構造は化学シフト値-二次構造相関を基に決定した。NMRはCMX-400分光器、測定温度は30℃、MAS周波数は5 kHzで行った。

固体NMR、グルカゴン、アミロイド線維

○はや　かずみ，かわむら　いずる，ないとう　あきら

[結果] 反応開始からDD-MAS法→CP-MAS法を交互に繰り返したところ、DD-MASにおいては、Gly[4]の1-[13]CのNMR信号は反応開始から300時間後まで信号は観測されなかった。

一方、CP-MAS法を用いると(Fig.1)、Gly[4]においては反応開始から時間経過に伴いαヘリックスからβシートへ構造転移が確認された。Ala[19]においては、初期状態で二種類のβシート構造①、①'が観測され、時間が経つと新たなβシート構造②へと転移することが示された。この信号はこれ以降変化がないことから成熟した線維成分であると同定した。さらにこの線維の信号の成長を横軸に時間、縦軸にピーク強度としたグラフを作成した。その結果、アミロイド線維の成長の特徴である自己触媒反応[1]でフィッティングできるS字曲線を描いて信号強度が増加した。このグラフから算出した反応速度定数をTable 1にまとめた。

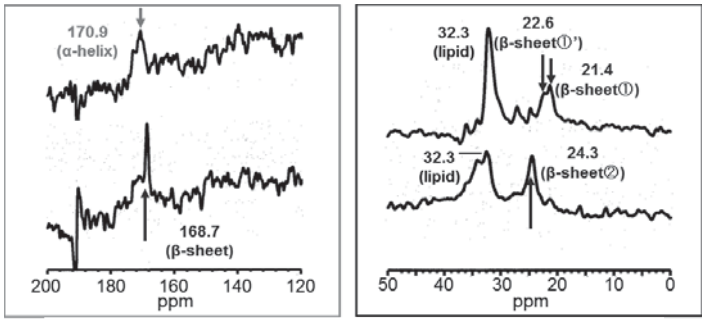


Fig.1 ^{13}C CP-MAS NMR spectra of [1-^{13}C]Gly[4], [3-^{13}C]Ala[19] glucagon in DMPC at 30°C (left : Gly[4], right : Ala[19]) (top : 12h, bottom : 300h)

Table 1 Fibril nucleation rate constant(k_1) and fibril elongation rate(k_2) of glucagon

Neutral condition, Presence of membrane		
	$k_1(s^{-1})$	$k_2(M^{-1}s^{-1})$
Gly[4]	2.28×10^{-6}	2.69×10^{-4}
Ala[19]	8.57×10^{-7}	9.11×10^{-4}
Acetonitrile solution(Neutral condition, Absence of membrane)		
Ratio of acetonitrile(%)	$k_1(s^{-1})$	$k_2(M^{-1}s^{-1})$
20	1.17×10^{-24}	0.44
30	7.88×10^{-12}	0.56

[考察] 繰り返し時間を短く設定したDD-MAS法ではGly[4]の信号が観測されず、反応開始直後のCP-MAS法でGly[4]の信号が観測されたことから、グルカゴンは初めからモノマーではなくオリゴマーを形成していたと考えられる。化学シフト値からグルカゴンオリゴマーはGly[4]部位ではαヘリックス構造、Ala[19]部位では2種類のβシート構造によって形成されていることが考察された。一方、300時間後の試料ではGly[4]部位ではβシート構造、Ala[19]部位ではオリゴマーと異なるβシート構造を形成していることが示唆された。(Table 2)

Table 2 Secondary structure of glucagon oligomer and fibril in DMPC

	Oligomer	fibril
Gly[4]	α-helix (170.9 ppm)	β-sheet (168.7 ppm)
Ala[19]	β-sheet (21.4 ppm, 22.6 ppm)	β-sheet (24.3 ppm)

またTable.1より反応速度定数に関して今回の結果(中性・膜存在下)と先行研究の結果(中性・膜なし)を比較すると線維核形成速度定数(k_1)は膜存在下で大きな値をとり、線維伸長速度定数(k_2)は膜が存在しない条件のほうが大きな値をとった。このことから、膜が存在することで線維核は形成しやすくなるが、線維伸長は阻害されることが考察された。

(まとめ) 脂質二分子膜が存在することでアミロイド線維の核形成は促進されるが、一方で線維伸長は阻害される。このことはグルカゴンの線維前駆体が脂質二分子膜の存在によって溶液中よりも長い時間存在できることを示唆する。

[参考文献]

[1] M.Kamihira et al. (2000) *Protein Sci*. 9 867-877

P54

ナトリウムポンプ型ロドプシンにおけるイオン結合サイトの役割

○田巻初[1,2]，斉藤優太[2]，江川文子[1]，菊川峰志[3]，相沢智康[3]，出村誠[3]，藤原敏道[1]
[1]大阪大学・蛋白質研究所
[2]北海道大学・大学院生命科学院
[3]北海道大学・大学院先端生命科学研究院

Role of cation binding site of sodium pump rhodopsin

○Hajime Tamaki[1,2], Yuta Saito[2], Ayako Egawa[1], Takashi Kikukawa[3], Tomoyasu Aizawa[3], Makoto Demura[3], Toshimichi Fujiwara[1]
[1] *Institute for Protein Research, Osaka University*
[2] *Graduate School of Life Science, Hokkaido University*
[3] *Faculty of Advanced Life Science, Hokkaido University*

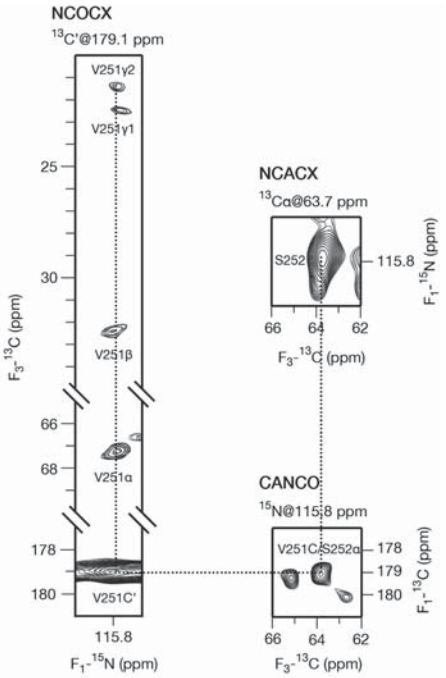
Sodium ion pump family of rhodopsin (NaR) was recently discovered in bacteria. They are proposed to perform dual-function light-driven H^+/Na^+ pumps. In 2015, X-ray structures of the NaR were revealed and the structural basis for Na^+ transport mechanism was proposed. Interestingly, some NaRs have Na^+ binding sites in the ground state, however the mechanism does not require the Na^+-binding. To investigate the role of Na^+ binding activity, we have studied NaR by solid-state NMR spectroscopy. The backbone chemical shift and signal intensity are changed by the presence of Na^+. These perturbations suggest that the Na^+ binding can change the conformation of NaR segments including far from the binding site and contribute to forming a structure for the Na^+ pumping adopt state.

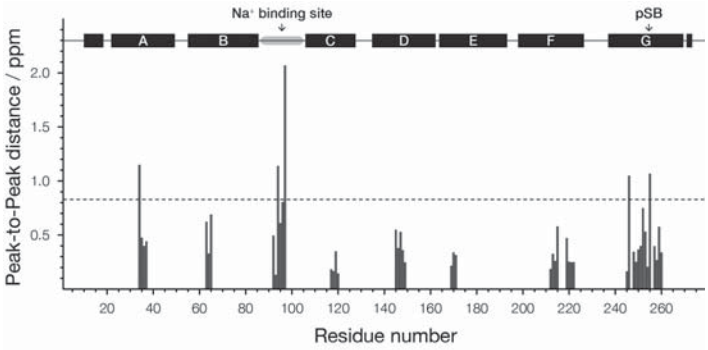
微生物型ロドプシンは7回膜貫通型ヘリックス構造をもち、発色団レチナールがシッフ塩基を介して結合しているタンパク質である。光駆動のイオンポンプやチャネル、光センサーとして機能し、微生物のエネルギー生産や走光性など、生命活動に重要な役割をもつ。また、特にイオン輸送に関与するロドプシンは、活性を光照射によりに容易制御できるため、神経活動を光で制御する光遺伝学への応用が進められている。よって、イオン輸送の機構解明は非常に重要である。

イオンポンプ型ロドプシンは、H^+、Cl^-、そしてNa^+を輸送するものが発見されている。H^+とCl^-ポンプは基底状態でシッフ塩基に結合しているH^+や、そのカウンターイオンであるCl^-を、光反応の開始に伴なって分子外に放出し、その逆端からイオンを取り込むことでイオン輸送することが広く知られている。Na^+を輸送するロドプシン (NaR) は2013年にH^+/Na^+ハイブリットポンプとして初めて発見された。しかし、Na^+の輸送機構をH^+と同様のモデル説明することは、ロドプシン内部のプロトン化シッフ塩基が正電荷をもつことから、困難であった。2015年に結晶構造が解かれ、NaRは基底状態でNa^+を内部に保持しておらず、細胞内側から外側へ直接輸送する、というモデルが提唱された。また、細胞外側にNa^+結合サイトをもつことも結晶構造解析やFT-IR測定によって明らかにされた。しかし、上のモデルではこの結合サイトは不要であり、その役割は不明瞭である。そこで、脂質二重膜中の膜タンパク質を様々なイオン濃度条件で測定可能である固体NMRを用いて、分子の構造・運動性の観点から、その役割を解明することを目的に研究をおこなった。

膜タンパク質，微生物型ロドプシン，イオンポンプ

○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，あいざわともやす，でむらまこと，ふじわらとしみち





←**Fig.1** An example of CX[i-1]-N[i]-CX[i] signal connectivities. V251-S252 spin system is illustrated.

↑**Fig.2** Difference between the chemical shifts with and without Na^+. The peak-to-peak distance is defined as Euclidean distance between the 3D-CANCO peaks. The secondary structures, Na^+ binding site and protonated Schiff base bonding site are also shown.

■ 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均一標識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、Ni-NTAアガロースによって精製した。これをDMPC:DMPA = 9:1 (重量比) の混合脂質へ、タンパク質:脂質=1：20 (モル比)で再構成した。Na^+存在・非存在の試料を調製するために、前者は100 mM NaClを含む10 mM CHES-NaOH (pH 9.0)、後者は100 mM Choline Clを含む 10mM CHES-NMDG (pH 9.0)バッファーで洗浄した。過剰なバッファーを超遠心分離によって除去した後、3.2 mmローターにパッキングした。測定はVarian T3-HXYプローブを装備したJEOL RESONANCE ECA II 700 MHzで行なった。測定中は試料温度が5℃程度となるようにプローブ温度を調整した。

■ 結果・考察

Na^+を含む試料において、3D-CANCO, NCACX, NCOCXを測定し、CX[i-1]-N[i]-CX[i]スピン系を構築した (Fig. 1)。このスピン系を基に連鎖帰属を行ない、60残基の帰属に成功した。さらに、CA[i-1]-N[i]-CA[i]相関が得られる3D-CAN(CO)CAスペクトルによるベリファイも行なった。得られたCαとCβの化学シフトの多くがα-ヘリックス特有のパターンであること、さらにShiftX2を用いて結晶構造から計算されたものと類似していることから、NMR試料は天然構造を保持しており、また帰属に大きな誤りがないことが示唆された。

Na^+を含む試料の化学シフトを基にNa^+を含まない試料のCANCOスペクトルの帰属をおこない、Na^+の有無に伴う化学シフトと信号強度変化を解析した。その結果、膜外に存在するNa^+結合サイト周辺で大きな化学シフト変化 (Fig. 2) とNa^+非存在下における信号強度の減少が確認された。これは固体NMR測定によって、Na^+の有無による構造・運動性の変化を捉えることに成功したことを示唆している。さらに、膜内の残基でも同様の変化が見られた。つまり、Na^+の有無による構造・運動性の変化は結合サイト周辺のみならず、シッフ塩基周辺の残基を含むタンパク質全体に及んでいることを示唆している。以上を踏まえて、我々はNa^+結合サイトがNaRのコンフォメーションをNa^+輸送に適した状態に保持するために重要な役割を持っているのではないかと考えている。

P55

固体NMRを用いたミドルロドプシンの温度変化に対する構造変化の解析

○川村　出[1]、関 隼斗[2]、槙野義輝[1]、重田安里寿[1]、沖津貴志[3]、和田昭盛[3]、須藤雄気[4]
1.横浜国立大学・大学院・工学府
2.横浜国立大学・理工学部 化学生命系学科
3.神戸薬科大学
4.岡山大学 院医歯薬

Temperature-dependent structural changes of middle rhodopsin as studied by solid-state NMR

○Izuru Kawamura[1], Hayato Seki[2], Yoshiteru Makino[1], Arisu Shigeta[1], Takashi Okitsu[3], Akimori Wada[3], Yuki Sudo[4]
[1]*Grad. Sch. Eng., Yokohama Natl. Univ., Japan,*
[2]*Col. Eng. Sci., Yokohama Natl. Univ., Japan,*
[3]*Kobe Pharm. Univ., Japan,*
[4]*Grad. Sch. Med. Dent. Pharm., Okayama Univ., Japan.*

Middle rhodopsin (MR), isolated from the *Haloquadratum walsbyi*, is evolutionarily transitional between bacteriorhodopsin (BR) and sensory rhodopsin II (SRII). MR has quite unique properties: coexistence with *all-trans*, 13-*cis* and 11-*cis* retinal isomers, and bR-like fast photocycle without H^+ pump activity, but SRII like orange color. Here, we showed distinct cross peaks of ^{13}Cζ Tyr185 of MR with ^{13}C-20 all-*trans* and 11-*cis* retinal based on ^{13}C spin diffusion solid-state MAS NMR experiment. We also checked temperature dependent of isotropic chemical shifts of retinal. The NMR signal of retinal in MR is sensitive to temperature compared with those of BR and SRII. Therefore, our solid-state NMR data revealed the flexibility of the structure of retinal binding pocket in MR.

[序論]　ミドルロドプシン(MR)は畳のような形をした高度好塩菌*Haloquadratum walsbyi*から発見されたレチナールを発色団にもつ微生物型ロドプシンである。このロドプシンはバクテリオロドプシン(BR)とセンサリーロドプシンII(SRII)の分子系統樹で中間に位置し、all-*trans*型と13-*cis*型に加えて、動物型のロドプシンで見られる11-*cis*型のレチナールを持っていることが報告されている[1, 2]。さらに、BRのような速いフォトサイクルを示すがプロトン輸送は示さず、一方でSRIIのようなオレンジ色を示す特徴を持つことから、MRは極めてユニークなロドプシンタンパク質である。本研究では、固体MAS NMRを用いた細胞膜中でのMRのレチナール結合サイトの構造解析を行った。特に、レチナールと周辺アミノ酸残基の相互作用の違いを調べるために、レチナール近傍の保存性が高いTyr残基の信号を比較した。また、温度に対するレチナールの化学シフトの温度依存性を調べ、結合ポケットの挙動を解析した。

固体NMR, レチナール結合ポケット、膜タンパク質

○ かわむらいずる，せきはやと，まきのよしてる，しげたありす，おきつたかし，わだあきもり，すどうゆうき

[実験]　大腸菌C41株を用いて、C末端にHis-tagをもつ[14, 20-^{13}C]レチナール, ^{15}Nζ Lysおよび^{13}Cζ Tyr標識MRを発現させた。精製にはNi-NTA resinを用い、pH=7.0に調製した溶液中でタンパク質と脂質のモル比が1:30になるようにタンパク質をPG膜へ再構成した。NMR測定はBruker Avance III 600 MHz 固体NMR分光器と4.0 mmのE-freeプローブを用いて行った。MAS周波数は10.0 kHz、DARR mixing timeは500 msで測定を行った。

[結果と考察]　これまで当研究室ではレチナールの信号を基点として、近傍Tyrの信号を観測し、微生物型ロドプシンの信号を比較してきた[3]。^{13}C-^{13}C DARR測定(温度10℃)により、MRのall-*trans*型レチナール(12.60 ppm)と原子間距離が近いTyr185の^{13}Cζ(157.15 ppm)との交差ピークを得た。この化学シフト値はBRやSRIIと比べて、やや高磁場側にシフトしているが、同じく高く保存されているAsp残基(BR:Asp212)との水素結合は認められる値である。それと同時に、MRの中で存在比の低い11-*cis*型レチナール(16.20 ppm)とTyr185の^{13}Cζ(156.14 ppm)との間で弱い交差ピークを得た。これより、レチナールの配座に対して、周辺アミノ酸残基の構造が変化していることが示唆された。

つづいて、温度10℃と30℃の^{15}N CP-MAS(Figure 1)により、温度に対するレチナールのシッフ塩基の信号変化を観測した。MRのシッフ塩基の信号はall-*trans*由来の160.62 ppmの信号と13-*cis*および11-*cis*由来の153.59 ppmの信号に分かれて観測され、それぞれ他のロドプシンに比べて線幅が広いことがわかった。30℃では主鎖やLysの信号は変化しないが、シッフ塩基の信号のみがシフトし、信号強度が大きく減少した。また、^{13}Cレチナールの化学シフトを温度に対してプロットすると、他のロドプシンに比べて変化の割合が大きいことがわかった。この結果から、MRのレチナール結合ポケットの構造はBRなどのロドプシンと比べて柔軟であり、このことが様々なレチナール異性体を取りやすくさせていると考えられる。

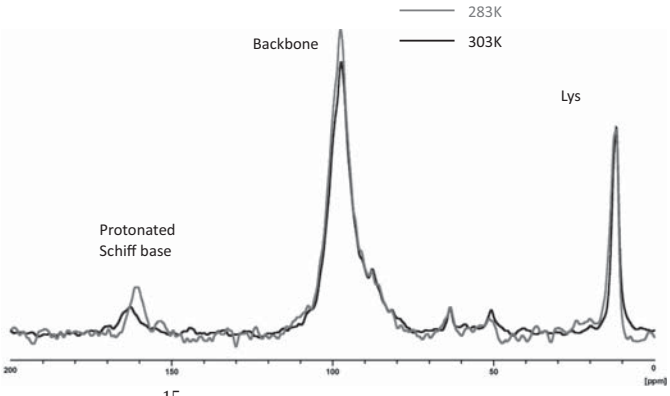


Figure 1. ^{15}N CP-MAS NMR spectra of [14, 20-^{13}C]retinal, ^{15}Nζ Lys and^{13}Cζ Tyr-labeled MR in PG liposome at 283 and 303 K.

[まとめ] 11-*cis*型の信号や温度に対する変化など今回観測した固体NMRデータは、BRをはじめとする微生物型ロドプシンの中ではユニークであり、MRの構造の柔軟性を示すものである。討論会では酸性条件にすることで、MRの極大吸収波長を変化させたNMRデータについても発表し、対イオンとの相互作用がレチナール結合ポケットにどのような影響を与えるか議論したい。

[References]

[1] Y. Sudo et al. (2011) *J. Biol. Chem. 286*, 5967–5976.
[2] Y. Furutani et al. (2013) *J. Phys. Chem. B 117*, 3449–3458.
[3] 西川亮汰ら (2015) 第54回NMR討論会　要旨集

P56

光照射固体NMRによるセンサリーロドプシンIIの光反応過程における光中間体構造の解明

○槙野　義輝[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]、上田　一義[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

Photo-intermediates in sensory rhodopsin II as revealed by in-situ photo-irradiation solid-state NMR

○Yoshiteru Makino[1], Izuru Kawamura[1], Takashi Okitsu[2], Akimori Wada[2], Yuki Sudo[3], Naoki Kamo[4], Akira Naito[1], and Kazuyoshi Ueda[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.*

pharaonis phoborhodopsin (*p*pR) is a photo receptor with a retinal chromophore and shows a negative phototaxis during photocycle. To reveal the photoreaction pathway and the conformational changes in retinal, we measured ^{13}C and ^{15}N NMR in [14,20-^{13}C]Ret, [ε-^{15}N] Lys-*p*pR using *in-situ* photo-irradiation solid-state NMR. Using the system, we demonstrated conformational changes in the retinal from the peak shifts of 20-^{13}C NMR signal. Under the green light illumination, the retinal isomerized form all-trans (13.6 ppm) of ground state to 13-cis (22.6、23.9 ppm) of the M-intermediates and 13-trans (16.4 ppm) of the O-intermediate. However, after the accumulation of the M-intermediates, the signal at 23.9 ppm was not decreased by the UV light illumination. Therefore, we assigned the signal to bR-like N'-intermediate. In addition, we measured NMR for [14-^{13}C]Ret, [ε-^{15}N]Lys-*p*pR. We also calculated chemical shift values of retinal by means of quantum chemical calculation to reveal the difference of interaction of retinal with protein. The calculations indicated that the multiple NMR signals of M-intermediates were generated by twisted conformation of retinal. Thus we revealed structural changes of retinal by the solid-state NMR and the chemical shift calculations.

［序論］
センサリーロドプシン II(*p*pR)はレチナール発色団を持つ微生物由来の光受容膜タンパク質であり、近紫外光からの忌避応答である負の光走性を担う。この光走性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光反応過程を経て発現する。このような光応答する膜タンパク質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ので、その詳細は解明されていない。*In situ* 光照射固体 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)の光異性化の解明に、大変強力な手段として確立されてきている[1、2、3]。

---

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，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、うえだかずよし

[実験方法]

*p*pRは*E. coli* (BL21)を用いてそれぞれ発現した。部位特異的な測定を行うために、*p*pRは発現過程で[14,20-^{13}C] retinalおよび[ε-^{15}N]Lysを導入することで[14,20-^{13}C] retinal, [ε-^{15}N]Lys-*p*pRを調製し、脂質二重膜であるEgg-PC膜に*p*pR複合体 : PC膜＝1：30のモル比で再構成した。

再構成後の試料を*in situ*光照射固体NMR法によって光照射下で^{13}C および^{15}N NMRスペクトルを測定した。LED光源からの光を光ファイバーによって試料管に導入し、光ファイバーをNMR試料管に非接触とすることで、マジック角回転数4 kHzで試料を高速回転しながら光照射下で、^{13}Cおよび^{15}N CP MAS NMR測定を行った。

[結果と考察]

基底状態(G-state)の*p*pRに対して－60℃で520 nmの光照射条件で^{13}C NMR測定をしたところ、G状態(13.6 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(22.6、23.9　ppm)の信号の増加が観測できた(Fig.1)。また同時に、13-*trans*構造のO-中間体を示す16.4 ppmの信号の増加も観測できた。十分にM中間体を溜めた状態で、光源を365 nmに切り替えたところ、22.6 ppmの信号は減少した。M-中間体はシッフ塩基が脱プロトン化しているために極大吸収波長が390 nmである。そのため、365 nmの光照射で減少した22.6 ppmの成分はM中間体であり、減少しない成分23.9 ppmの成分をバクテリオロドプシン(bR)のN-中間体様のN'-中間体と帰属した。また365 nmの光を照射することによって、O中間体を示す16.4 ppmの信号が増加したことにより、青色光によるM中間体からO中間体への光反応経路が明らかになった。

また、レチナールの15-syn/anti配座を決定するために、[14-^{13}C]retinalの信号変化を観測したところ、M-中間体（127.1 ppm）、O-中間体（118.2 ppm）は15-anti構造を持ち、N'-中間体(115.4 ppm)は15-syn配座であることが示唆された。

さらに、[ε-^{15}N]Lysの信号をモニタリングすることでM-中間体が確かに脱プロトン状態であることを確認した。以上の結果より、我々は*p*pRの光反応経路（フォトサイクル）をFig. 2のように改良した。

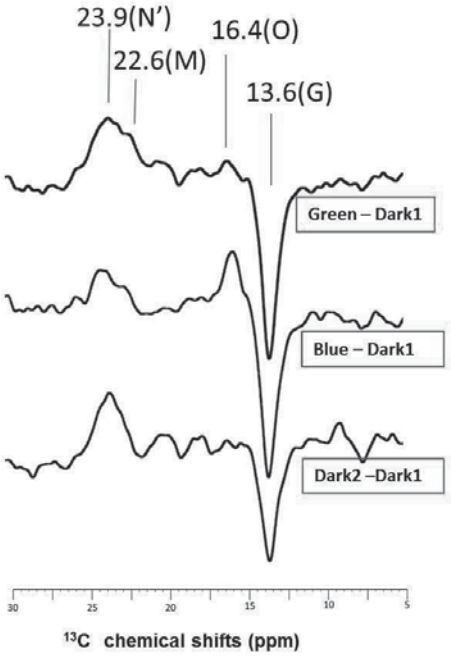


Fig. 1 ^{13}C NMR spectra of [20-^{13}C] retinal in *p*pR in light illumination.

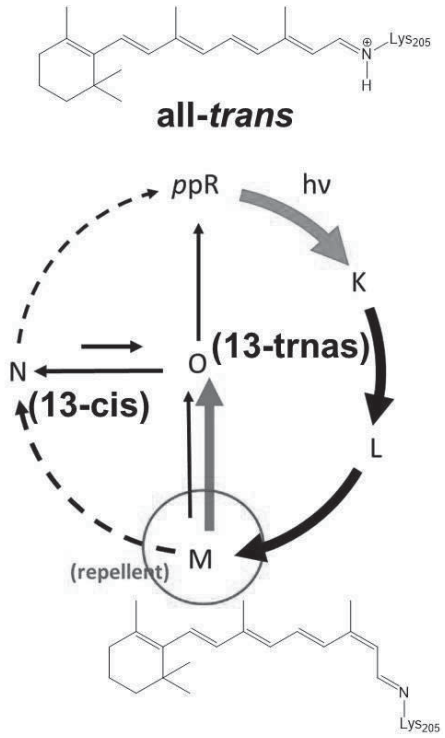


Fig. 2 photocyle of *p*pR as reveal by in-situ photo-irradiation solid-state NMR.

[1] Y. Tomonaga et al. *Biophys. J.* **101**, L50-L52 (2011).

[2] H. Yomoda et al. *Angew. Chem. Int. Ed.* **53**, 6960-6964. (2014)

[3] K. Oshima et al. *Photochem. Photobiol. Sci.* **14** 1694-1702. (2015)

P57

In-situ光照射固体NMRによるバクテリオロドプシンD96N変異体の光反応過程でのレチナールおよびタンパク質構造変化の解析

○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

Structural change of retinal and protein during photoreaction of bacteriorhodopsin D96N mutant as revealed by *in-situ* photo-irradiation 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 membrane protein consisting of 248 amino acid residues and retinal in a purple membrane of *H. salinarum*. When bR absorbs light, at first photoisomerization of the retinal occurs and at subsequently bR transports a proton from cytoplasmic side to extracellular side during the photocycle through K, L, M, N, O-intermediates and finally return to the ground state. When the M-intermediate generates, Schiff base is deprotonated along with a large dynamic changes of cytoplasmic side. Therefore, the M-intermediate plays an important role to express of proton transport function. Here, we observed NMR spectra of [14, 20-^{13}C] Ret, [1-^{13}C] Tyr, [^{15}N] Pro, [ε-^{15}N] Lys-D96N-bR mutant using *in-situ* photo-irradiation solid-state NMR because this mutant has a long half-life of M-intermediate. We could trap the M-intermediate and other photo-intermediates by irradiation with green light (520 nm), and retinal configuration could be determined by comparing chemical shift values of retinal of D96N mutant with those of wild-type.

【序論】

バクテリオロドプシン(bR)は高度好塩菌*H.salinarum*の細胞膜に存在する膜タンパク質であり、248残基のアミノ酸と内部にLys216とのシッフ塩基結合を介したレチナールから成る。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反応を示し、そのフォトサイクル中に、1つのプロトンを細胞質側から細胞外側へ能動輸送する。M-中間体が形成されることにより、細胞質側に大きな変化が生じ、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が生じる。そのため、M-中間体は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。しかし、その寿命が短いため、固体NMRによる観測が困難であり、動的な構造情報は少ない。そこで、本研究ではシッフ塩基の再プロトン化を阻害することでM-中間体を長寿命化する特徴をもつD96N-bR変異体を用い、当研究室で開発した*in-situ*光照射固体NMR[1]によって、M-中間体を定常的に捕捉し、光反応過程におけるレチナールおよびタンパク質の局所的な構造変化とプロトン輸送機構の解明を目的とした。

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

【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，[ε-^{15}N] Lys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標識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-[ε-^{15}N] Lys 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た。これにより、試料管内部から光照射が可能なシステムを構築した。この光照射システムを用いて、プローブ内で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。光源として緑色LED光(520 nm)と青色LED光(365 nm)を用い、暗条件下や緑色光照射下、青色光照射下などの条件で測定を行った。光照射前後のスペクトルを比較することで、NMR信号の変化から反応物と生成物を観測した。また、帰属したD96N変異体の信号と野生株bRの信号の化学シフト値を比較することで、D96N変異体特有のレチナールの構造を明らかにした。

【結果および考察】

[14, 20-^{13}C]Ret-[1-^{13}C] Tyr-[^{15}N] Pro-[ε-^{15}N] Lys D96N-bR試料を-30℃において、暗順応状態(Dark adapted)のNMRスペクトル(Fig.1(a))を測定した。次に、緑色光を照射した状態(Green light 1)で測定し、緑色光によって定常的に励起された状態のスペクトルを得た。その後、光を止め、暗条件下で測定することで、明順応状態(Light Adapted ;LA1)のNMRスペクトル(Fig.1(b))を得た。次に、LA1に緑色光を照射した状態(Green light 2)で測定し、NMRスペクトル(Fig.1(c))を得た。その後、光の波長を切り替え、青色光を照射した状態で測定し、NMRスペクトル(Fig.1(d))を得た。変化後から変化前の差スペクトルを作り、反応物と生成物を判断し、信号を各中間体に帰属した。

暗順応状態(Fig.1(a))において、[20-^{13}C]Ret領域では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。緑色光照射後の暗条件下であるLA1のスペクトル(Fig.1(b))では、all-*trans*型レチナールのみが存在した。この状態に緑色光を照射したNMRスペクトル(Fig.1(c))では、20.0 ppmと18.6 ppmの信号が増加したことから、M-中間体とN-中間体が生成したことが示唆された。その後、波長を切り替え、M-中間体が吸収する青色光を照射した状態のNMRスペクトル(Fig.1(d))では、20.0 ppmの信号が減少し、18.6 ppmの信号は変化しなった。これにより、20.0 ppmの信号をM-中間体、18.6 ppmの信号をN-中間体と帰属した。また、[14-^{13}C]Retと[20-^{13}C]Retのそれぞれの化学シフト値から、M-中間体及びN-中間体は13-*cis*,15-*anti*型であると決定した。さらに、D96N変異体のM-中間体と野生株bRのM-中間体の化学シフトを比較した結果、D96N変異体のレチナールは野生株bRのM_2-中間体におけるレチナールの構造と似ており[2]、D96N変異体のM-中間体のレチナールの構造はプロトンを受け取りやすい構造(N中間体-like)で安定することが判明した。

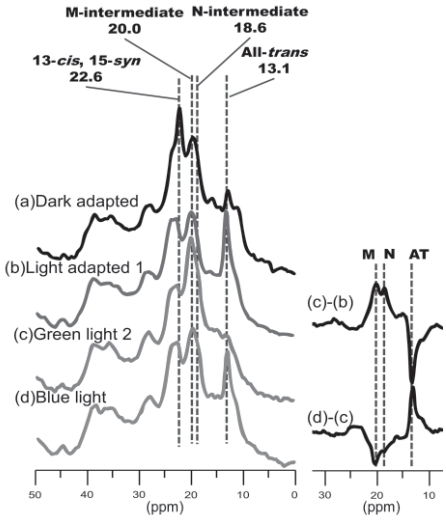


Fig. 1. ^{13}C-NMR spectra of [20-^{13}C] Ret-D96N-bR
(a)Dark-adapted state
(b)Light-adapted state
(c)Green light irradiation state
(d)Blue light irradiation state

以上から、*in-situ*光照射固体NMRによりD96N変異体の光中間体捕捉に成功し、レチナールの構造を決定することができた。

【参考文献】

[1]H.Yomoda et al. (2014) *Angew. Chem. Int. Ed.* 53 6960-6964.
[2]Jingui G. Hu et al. (1998) *Biochemistry. 37. 8088-8096*

P58

^{2}H, ^{19}F NMRを用いた脂質膜中における アンフォテリシンBの配向解析

○山本智也[1,2]，梅川雄一[2,1]，山上正輝[1,2]，花島慎弥[1]，
土川博史[1]，松森信明[3,1]，村田道雄[1,2]
[1]大阪大学大学院・理学研究科, [2]JST-ERATO, [3]九州大学大学院・理学研究院

Orientation Analysis of Amphotericin B in membrane using ^{2}H and ^{19}F NMR

○Tomoya Yamamoto[1,2], Yuichi Umegawa[2,1], Masaki Yamagami[1,2], Shinya Hanashima[1], Hiroshi Tsuchikawa[1], Nobuaki Matsumori[3,1], Michio Murata[1,2]
[1] *Graduate school of Science, Osaka University*
[2] *JST-ERATO Lipid Active Structure Project*
[3] *Graduate School of Sciences, Kyushu University*

Amphotericin B (AmB **1**) is the drug of choice to treat mycotic diseases and known to form an ion-channel complex with ergosterol in cell membrane. The orientation of AmB in membrane is particularly important for elucidating the structure of the ion channel. Therefore, we prepared ^{2}H- and ^{19}F-labelled AmB derivatives, and these labeled compounds were mixed with phospholipid and subjected to solid-state ^{2}H and ^{19}F NMR measurements. The ^{2}H quadrupolar splitting value and ^{19}F chemical shift anisotropy values obtained from liposome samples at 40 °C were much smaller than those of powder form, indicating fast axial rotation in membrane. Based on these averaging effects, the orientation of AmB molecules in membrane was deduced.

【背景と目的】アンフォテリシン B (AmB **1**, Fig. 1) は放線菌 *Streptomyces nodosus* によって生産されるポリエンマクロライド化合物であり、真菌症の治療薬として広く用いられている。AmB は真菌の細胞膜に含まれるエルゴステロール（Erg）と相互作用し、樽板型モデルのチャネル複合体を形成することで真菌に対する選択毒性を発現すると考えられている。我々はこの複合体構造を解析するために、固体 NMR によるアプローチを試みてきた。これまでに固体 NMR による分子間 REDOR 測定から、チャネル複合体中における AmB-AmB 間 [1)]、AmB-エルゴステロール間 [2, 3)]の分子間距離を測定している。

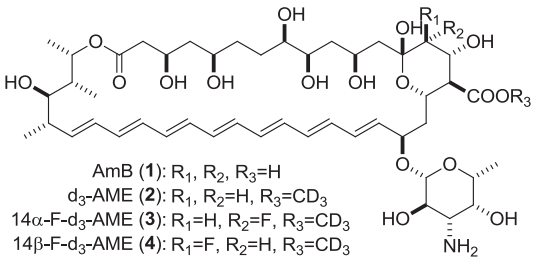


Fig. 1 Structure of AmB and labeled AmBs

一方で、チャネル複合体の詳細な構造を決定するためには脂質膜中におけるAmBの配向情報も重要である。そこで、今回我々は^{19}F NMRと^{2}H NMRにより化学シフト異方性（CSA）および四極子分裂幅を解析することで配向解析を行った。

アンフォテリシンB、化学シフト異方性、配向解析

○やまもとともや、うめがわゆういち、やまがみまさき、はなしましんや、つちかわひろし、まつもりのぶあき、むらたみちお

【実験】^{2}H および ^{19}F 標識体として合成化学的に調製した d_3-AME (**2**), 14α-F-d_3-AME (**3**), 14β-F-d_3-AME (**4**) を用いた(Fig. 1)。これら標識体について粉末状態および、10% の Erg 含有 DMPC 水和膜における NMR スペクトルを測定した。

【結果】脂質膜中に d_3-AME を取り込ませ、静止状態での ^{2}H NMR 測定を行った(Fig. 2a)。20℃においては粉末状態とほぼ同じ四極子分裂幅を示したことから AmB は大きな会合状態にあり、分子の運動が抑制されていることが示唆された。一方で 40℃まで昇温すると四極子分裂幅の明確な減少が確認され、AmB の運動性が上昇し四極子相互作用が分子運動により平均化されたことが明らかになった。

次に 14α-F-d_3-AME (**3**), 14β-F-d_3-AME (**4**)について粉末試料の ^{19}F NMR 測定(MAS: 5 kHz)を行った。これらスペクトルから ^{19}F CSA の主値(δ_{11}, δ_{22}, δ_{33})をそれぞれ(−187.84 ppm, −207.32 ppm, −225.37 ppm), (−178.16 ppm, −198.39 ppm, −223.97 ppm)と求めることができた。主軸の向きは計算化学的手法により求めた。

これら標識体を脂質膜に取り込ませ、^{19}F NMR 測定を 40℃、静止条件にて測定した(Fig. 2b, c)。その結果、^{2}H NMR 測定と同様に明確な ^{19}F CSA の減少が観測され、AmB が高い運動性を持っていることが示唆された。また、14β-F-d_3-AME の試料においては 2 つのピークが重複したスペクトルが得られており、2 種類の配向の存在が示唆された。この 2 種類のピークは温度依存的に割合が変化することが明らかになり、2 種類の配向の交換や温度依存的な配向変化について考慮した解析を行う必要がある。本討論会ではこれらの解析を合わせて、本配向解析の詳細について発表する。

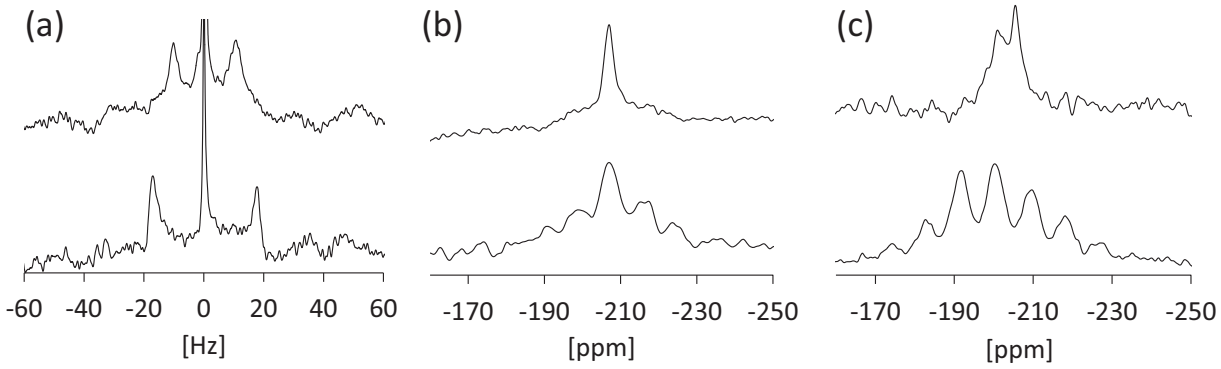


Fig. 2 The ^{2}H and ^{19}F NMR spectra of labeled AmBs. (**a**) ^{2}H NMR spectra of d_3-AME/Erg/DMPC (1/5/45) at 20 °C (bottom) and 40 °C (top). (**b**) ^{19}F NMR spectra of 14α-F-d_3-AME. (**c**) ^{19}F NMR spectra of 14β-F-d_3-AME. The top and bottom ones of (**b**) and (**c**) were measured in static hydrated membrane at 40°C, and in a dry powder form with 5kHz MAS, respectively.

References

(1) Umegawa, Y.; Matsumori, N.; Oishi, T.; Murata, M. *Biochemistry* **2008**, *47*, 13463–13469.

(2) Umegawa, Y.; Nakagawa, Y.; Tahara, K.; Tsuchikawa, H.; Matsumori, N.; Oishi, T.; Murata, M. *Biochemistry* **2012**, *51*, 83–89.

(3) Nakagawa, Y.; Umegawa, Y.; Matsushita, N.; Yamamoto, T.; Tsuchikawa, H.; Hanashima, S.; Oishi, T.; Matsumori, N.; Murata, M. *Biochemistry* **2016**, *55*, 3392–3402.

P59

固体NMRによるポリヒドロキシアルカン酸ブレンドのマルチスケール解析評価

○西田 雅一[1]，田中 智子[1]，早川 由夫[1]，伊藤 嘉晃[2]，安田 洸平[2]，西田 政弘[2]
[1]産総研・構造材料，[2]名工大院・電気機械工学専攻

Multi-scale analysis of poly(hydroxyalkanoic acid) blend with solid-state NMR

○Masakazu Nishida[1], Tomoko Tanaka[1], Yoshio Hayakawa[1], Yoshiaki Ito[2], Kouhei Yasuda[2], and Masahiro Nishida[2]
[1]*National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Japan.*
[2]*Nagoya Institute of Technology, Japan.*

Effects of poly(hydroxyalkanoic acid) (PHA) / poly(butylenesuccinate) (PBS) / poly(ε-caprolactone) (PCL) blend with a cross-linking agent (PERHEXA) were examined by multi-scale instrumental analysis. X-ray CT observation of the PHA/PBS/PCL blend showed a sea-island structure, which was homogenized by 1% of PERHEXA. The quasi-static tensile test of the PHA/PBS/PCL blend showed higher breaking elongation than the PHA/PBS/PCL blend with PERHEXA. ^{1}H MAS NMR spectra of the PHA/PBS/PCL blends showed lower signal intensity for PHA than PBS and PCL. PHA could be detected in enough signal intensity for both ^{13}C CP-MAS and ^{13}C PST-MAS NMR spectra; PST/CP signal ratio was, however, unchanged by the addition of PERHEXA. Furthermore, the T_1H values were decreased in the addition of PERHEXA as well as in addition of PCL. Although the breaking elongation of the quasi-static tensile test was dominated by the PCL unit, the homogenization by PERHEXA disturbed the motion of the PCL unit in the quasi-static tensile test to result the lower breaking stress.

序論

非可食バイオマスから微生物によって産出されるポリヒドロキシアルカン酸（PHA）は単独では十分な成形性を持たないため、ポリマーブレンドにより機械特性の向上を図る必要がある。一例として、PHAにポリブチレンサクシネート（PBS）を加えたペレットが入手できるが、加工性や耐衝撃性などの問題があって、そのままでは機械材料として利用は困難である。このPHA/PBSブレンドにポリεカプロラクトン（PCL）を加えた３成分系のポリマーブレンドに対して、X線CTで観察されるミクロスケール、及び、準静的及び動的引張試験で評価できる製品スケールの挙動を固体NMRによる分子～ナノスケールでの解析を行い、機械特性の発現メカニズムを調べた。

試料の調整

PHA/PBSペレットにPCL及び架橋剤であるPERHEXAを加え、溶融混練機により175^{o}C, 50rpmで20分間混練を行った後、ホットプレスで175^{o}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、準静的及び動的引張試験を行った。試験後の試料をX線CT、固体NMR測定に供した。

ポリマーブレンド、核磁気緩和解析、引張試験

○にしだまさかず，たなかともこ，はやかわよしお，いとうよしあき，やすだこうへい，にしだまさひろ

結果及び考察

ポリヒドロキシアルカン酸ブレンドとしてPLA/PBS/PCL=32.5/15/50の試料に対して、機械特性の変化を調べた。添加剤を用いない場合、準静的引張試験で比較的大きな伸度（150%）を示したが、動的引張試験では速やかな破断が見られた。一方、架橋剤として1%のPERHEXAを加えた場合、逆に準静的引張試験で伸度は小さかったが、最大応力は添加剤なしの場合と比較して大きくなっていた。

図１に静的引張試験で用いた破断部のX線CTの結果を示すが、添加剤なしでは海島構造が観察されていたのに対して、PERHEXAを加えた場合は、全体に均質になり微細構造は観察できなかった。

図２にPCLの組成の違いによる固体NMRスペクトルの変化を示すが、^{1}H MAS NMRにおいてはPBS/PCLのシグナルが優位に現れ、PHAのシグナルは組成と比較して小さな強度でしか観察できなかった。一方、^{13}C CP-MAS NMRでは比較的はっきりとPHAのシグナルを観察することができたが、PERHEXAの添加により特定のシグナルが変化することはなかった。

続いて、CP-MAS法におけるInversion recovery法で求めたT_1Hの組成及び架橋剤に対する変化を図３に示す。PHA/PBS/PCL=32.5/15/50の試料のT_1HはPBS(1.23)とPCL(0.88)のほぼ中間の値をとるが、1%のPERHEXAを加えることにこれが0.75~0.90程度まで低下する。PCL添加によるT_1Hの低下はPHAからPCLへのスピン拡散によるものである一方、PERHEXAによるT_1Hの低下はPHA/PBSとPCL架橋による運動性の低下によるものであると考えられた。

以上より、準静的引張試験で添加剤のない場合はPCLの延性が支配的であるのに対して、PERHEXAを加えた場合は架橋により運動性が下がることで延性が低下すると考えられる。一方、動的引張試験ではいずれの場合もPCLの延性が十分に働かないため、むしろ海島構造のないPERHEXA添加ブレンドの方が破断応力が大きくなったと考えられる。

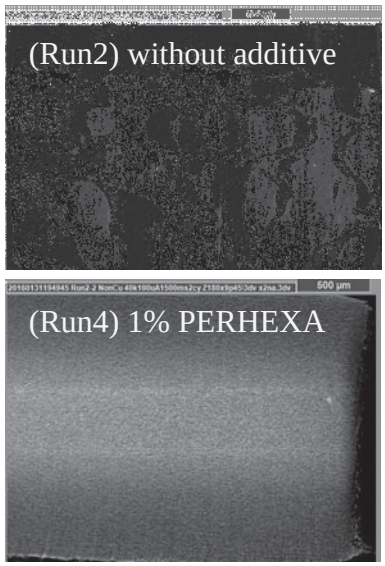


Fig. 1 X-ray CT image of PHA/PBS/PCL = 32.5/15/50

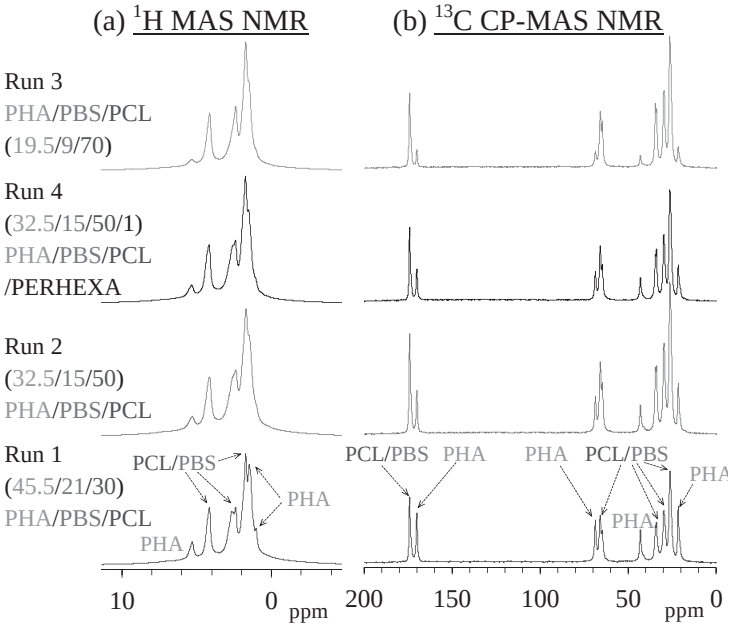


Fig.2 Solid state NMR spectra of the PHA/PBS/PCL

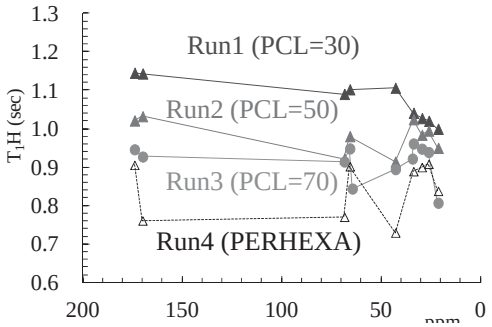


Fig. 3 T_1H of PHA/PBS/PCL

【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。

P60

固体ＮＭＲ法によるエチレンアイオノマーの結晶構造と運動性解析

○松川隆幸[1]，中澤千香子[1]，浅野敦志[1]
[1]防衛大学校・応用化学科

Solid-State NMR study of crystalline phase and molecular motions of Poly (ethylene-co-methacrylic acid) Ionomers

○Takayuki Matsukawa[1], Chikako T. Nakazawa[1], Atsushi Asano[1]
[1] *Department of Applied Chemistry, National defense Academy, Kanagawa, Japan*

Ethylene-methacrylic acid random copolymer (EMAA) with Na^+-ion (EMAA-Na) is one of ionomers. The physical properties of ionomers such as transparency, modulus, mechanical strength, elasticity, and adhesion, are related on existence of both the flexible long hydrophobic chain and the hydrophilic ionic cluster region. The ionomers have also recently attracted attention as polymeric electrolytes. In this study, we investigated and focused on the crystalline phase of EMAA-Na ionomers by the solid-state NMR. The carboxy carbon signal of EMAA was divided to apparently three peaks after neutralization with Na^+-ions. We assigned the three peaks to the COO^--Na^+ interacted carbons at ca. 188 ppm, the original COOH carbon near 185 ppm, and the dissociated but not interacted with Na^+ or hydrogen at ca. 184 ppm. We found that the crystalline phase consisted of ethylene main chain of EMAA includes three distinguished phase. The T_1^C measurements and the temperature dependence of spectra revealed that the one of them has the similar tendencies with those of the amorphous phase.

＜緒言＞

エチレンアイオノマーは、主鎖骨格に少量のメタクリル酸部位を持ち、そのカルボキシ基を陽イオンで中和することで優れた物性を発現している。このメタクリル酸部位のカルボキシ基と陽イオンの相互作用部位は、イオンクラスター構造を形成[1)]していると考えられている。また、エチレン主鎖骨格は結晶相を構築するが、メタクリル酸部位で結晶成長が阻害されるため、一般的なポリエチレンの結晶相よりもサイズが小さくなると考えられる。このようなアイオノマーは最近高分子電解質としても注目されており、様々な工業製品用途として利用されているが、詳細な構造についての知見は良く知られていない。そこで本研究では、エチレンアイオノマーの結晶構造に着目し、その構造様式と分子運動を固体NMR法から検討した。

＜実験・解析＞

エチレンアイオノマー（EMAA-Na）は三井デュポンポリケミカル社より提供された。EMAA中のメタクリル酸部位（MAA）は質量比で15%であり、この部位をNa^+イオンで54%中和したEMAAアイオノマー（EMAA-54Na）と30%中和したEMAA-30Naを使用した。示差熱分析（DTA）はRigaku製のThermo Plus TG8120を用い、大気雰囲気下で2 K/minの昇温/降温速度にて30℃から130℃の範囲を繰り返し測定した。用いた試料の質量は約15 mgであり、Al_2O_3を標準試料とした。固体高分解能^{13}C NMRスペクトルは、Varian社（現Agilent社）製NMR systems 400WBを用いて測定した。マジック角試料回転（MAS）速度は5 kHz、高出力^{1}Hデカップリング（DD）はTPPM法を用いて62.5kHz

---

アイオノマー，固体 NMR，結晶相

○まつかわたかゆき，なかざわちかこ，あさのあつし

のパワーで行った。用いた^{1}H核の90度パルス幅は3.3 μs、CPのラジオ波強度は^{1}Hが55.6 kHz、^{13}Cが53.8 kHzである。

＜結果・考察＞

Fig. 1の左側に(a) EMAA、(b) EMAA-30Naおよび(c) EMAA-54Naのカルボキシ基領域を拡大した固体^{13}C CPMAS NMRスペクトルを示した。右側にシュミレーション結果を示した。EMAAのカルボキシ基は185 ppmに単一のピークとして観測されるが、Na^{+}イオンで中和することにより、高磁場側の184 ppm近傍と低磁場側の188 ppm近傍にピークが観測された(c)。また、中和度が低いEMAA-30Naでは、EMAAと同じピークもはっきりと観測された(b)。中和されていない元の状態と同じEMAAのカルボキシ基由来と考えられる185 ppm近傍のピークは、30%(b)から54%(c)へと中和度が高くなるとピーク面積は15%から8%へと減少した。Na^{+}イオンと相互作用していると考えられる188 ppmのピーク面積は、中和度が高くなると逆に36%から42%へと増大した。また、183 ppmのカルボキシ基の面積強度は中和度にほとんど影響されない。元のEMAAの化学シフトより高磁場であるので、水素結合していない独立している解離したカルボキシ基と考えられる。

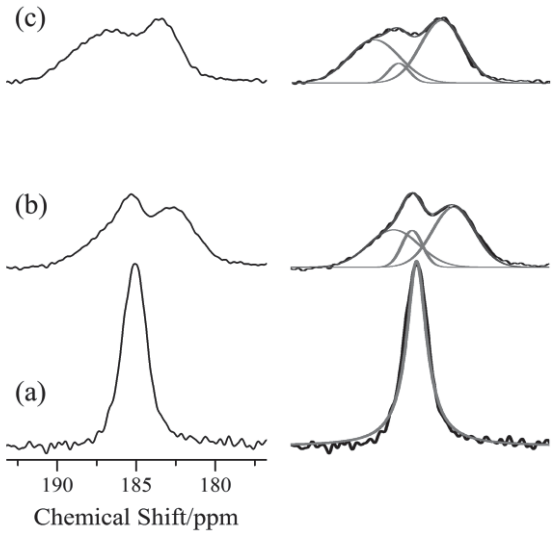


Fig. 1. ^{13}C CPMAS NMR spectra of carboxy group region for (a) EMAA, (b) EMAA-30Na, and (c) EMAA-54Na. The simulated spectra were depicted on the left side.

Fig. 2には、T_1^Cを観測している途中の^{13}C スペクトルのCH_2領域を示した。33 ppmのピークは結晶相由来、31 ppmに観測される幅広いピークは非晶相由来である(a)。31 ppmの非晶相由来のピークは、(a)から(c)にかけてそのまま減衰したが、33 ppmの結晶相由来と考えられるピークは最初の1本からピーク強度が減衰するにつれて2本に分裂して観測された。これら一連のピーク変化は、3本のピークを用いないと再現できなかった。スペクトルの温度依存性やT_1^Cの値から、結晶相由来と考えられる3本のピークのうち、中央の33.4 ppmに観測されるピークは他の2本のピークに比べて、非晶相由来のピークと同様の変化を示すことが分かった。以上の観測結果から、1本の結晶相と考えられたピークのうち、中央に出現する33.4 ppmのピークは、コンホメーションがトランスをとるが非晶相と同様の性質をもつ相であると結論づけた。当日は、これら3つのピークの、より定量的な議論とT_1^Cの解析による運動および温度変化によるスペクトル変化について報告する。

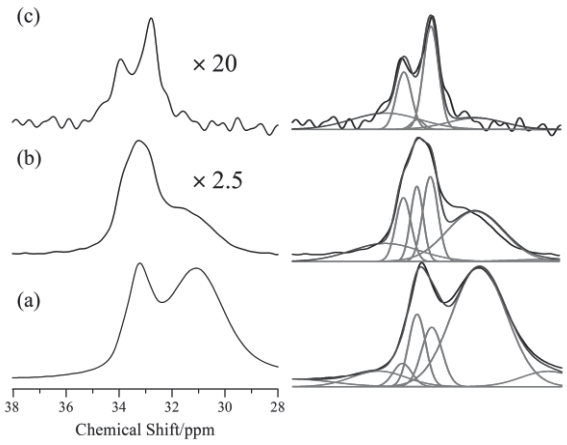


Fig. 2. ^{13}C NMR spectral change of CH_2 carbon region of EMAA-54Na occurred during T_1^C measurement. The elapsed times after 90° pulse following CP for ^{13}C in the Torchia pulse sequence were (a) 1 ms, (b) 2 s, (c) 10 s.

＜参考文献＞

1) A. Eisenberg, B. Hird, and R. B. Moore, *Macromolecules*, **23**, 4098-4107 (1990).

P61

ポリ（γ - グルタミン酸）の固体ＮＭＲによる構造解析

○藤井美暉子，柿下拓史，前田史郎
福井大院工

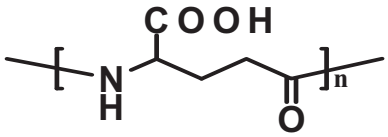
Characterization of Poly(γ-glutamic acid) by Solid NMR

○Mikiko Fujii, Takafumi Kakishita, and Shiro Maeda
Division of Applied Chemistry and Biotechnology, Graduate School of Engineering, University of Fukui, Fukui, Japan.

Characterization of poly(γ-glutamic acid)s (γ-PGA) with different D/L ratio was done by using IR and solid NMR. Free form (acid form) of γ-PGA shows a characteristic peak at 171ppm in ^{13}C solid NMR spectrum and a strong absorption band at 1735 cm^{-1} in IR spectrum which are not observed in its sodium salt, γ-PGA/Na. Carbonyl carbon peak of γ-PGA was deconvoluted into three peaks: Two peaks in the higher field side were assigned to two different kinds of side-chain carboxyl groups, probably one for the carboxyl group which forms the strong hydrogen bonds among carboxyl groups (dimeric form) and the other for free carboxyl group.

【はじめに】

ポリ(γ-グルタミン酸)、γ-PGAは主に納豆菌*Bacillus subtilis*が生産し、グルタミン酸のα-アミノ基とα-カルボキシル基がアミド結合により結合した通常のポリ(α-グルタミン酸)とは異なり、α-アミノ基とγ-カルボキシル基が結合したポリアミノ酸であり、水溶性および生分解性を有する陰イオン性のポリマーである。また、ポリ(γ-グルタミン酸)には反応性の高い側鎖カルボキシル基があるため、容易に化学修飾できる。ナトリウム塩型ポリ(γ-グルタミン酸ナトリウム)、γ-PGA/Naは水に可溶であるが、通常フリーの酸型のγ-PGAは水に溶解しない。Figure1に、D/L比が7/3のγ-PGAとγ-PGA/Naのパウダーの^{13}C固体NMRスペクトルを示す。カルボニル炭素領域において、(a)のγ-PGAのみに171ppmに鋭いピークが現れている。 (a)のγ-PGAは3つのピークに分けることができる。最も低磁場側のピークは主鎖のカルボニル炭素のピーク、他２つのピークは側鎖のカルボニル炭素のピーク、そのうち低磁場側のピークはフリーのCOOHのピーク、高磁場側171ppmは、２量体を形成しているCOOHのピークと考えていた[1]。また、



Scheme1. Repeating units of poly(γ-glutamic acid)s (γ-PGA).

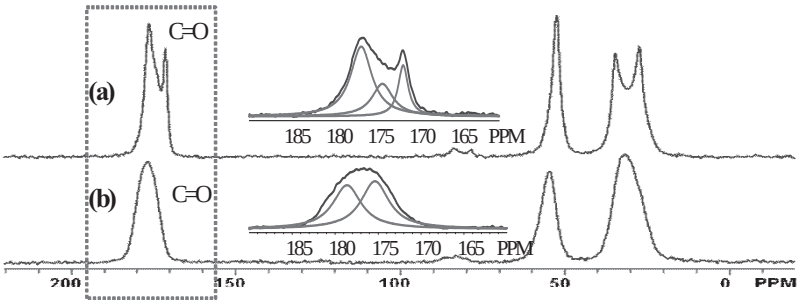


Figure 1. ^{13}C solid NMR spectra of (a) γ-PGA powder and (b) γ-PGA/Na powder.

ポリ(γ-グルタミン酸)，固体NMR，微生物産生高分子

○ふじいみきこ，かきしたたかふみ，まえだしろう

(b)のγ-PGA/Naでは、2つのピークに分けることができ、低磁場側のピークは主鎖のカルボニル炭素、高磁場側は、側鎖のCOO^-のピークと帰属した[1]。γ-PGA/Na水溶液のpHをγ-PGAのpKa値(=2.23)よりも低くすると白色沈殿が生じ，^{13}C固体NMRスペクトルの形はγ-PGAとほぼ一致し、171ppmに鋭いピークが現れた。このpHがγ-PGAのpKa以下のものをγ-PGA と考え、D/L比がそれぞれ8/2、7/3、5/5のγ-PGAのIRおよび固体NMRスペクトルを測定し、γ-PGA の171ppmのカルボン酸二量体のピークについて検討してきた。D/L比が0/10のL型γ-PGAについて検討した結果を報告する。

【実験】

D/L=7/3のγ-PGA/Naとγ-PGA（和光純薬）は購入した試薬をそのまま用いた。D/L=8/2（味の素）、5/5（ヤクルト薬品工業）、0/10（東洋紡）のγ-PGA/Naは各社から提供していただいた試料をそのまま用いた。D/L比は各社が発表している比率である。各γ-PGA/Naを0.1MHClに溶かし1.0MHClを加え、pHを1以下とした。D/L比が8/2、7/3、5/5のサンプルついては沈殿が生じるので遠心分離を行った後、上澄み液を捨て、蒸留水で洗浄し、テフロンシャーレ上にキャストし数日間減圧乾燥しIRと固体NMR測定を行った。D/L比が0/10のサンプルについては、pHを1以下にしても沈殿を生じなかったため、そのままCaF_2窓板の上にキャストし減圧乾燥した後にIR測定を行った。

【結果・考察】

Figure2にD/L比がそれぞれ8/2、7/3、5/5、0/10のγ-PGA/Naの^{13}C固体NMRスペクトルを示す。D/L比が異なっていてもγ-PGA/Naのスペクトルはほぼ一致していることがわかる。Figure3(a)にD/L=7/3の試料のpH1以下での沈殿物のIRスペクトルを示す。D/L比が8/2、7/3および5/5のγ-PGAでは、D/L比に関わらず、^{13}C固体NMRスペクトルとIRスペクトルはほぼ一致し、前者では171ppmに、後者では1735cm^{-1}に特徴的なピークを与えた。Figure3(b)にD/L比=0/10のpH1以下の塩酸溶液をキャストした乾燥膜のIRスペクトルを示す。1735cm^{-1}付近に特徴的なピークを持つ。このピークはD/L比に依存しないと考えられる.。D/L=0/10の試料について、pH=1以下で沈殿が生じない理由および^{13}C固体NMRスペクトルについては現在検討中である。

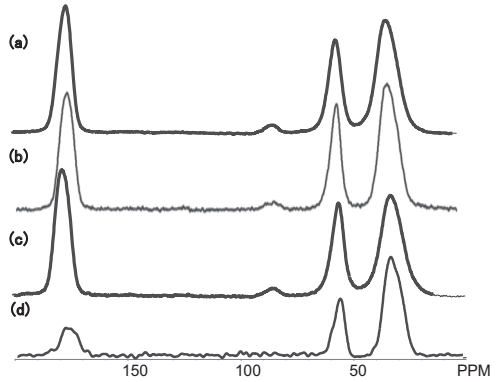


Figure 2. ^{13}C solid NMR spectra of (a) D/L=8/2, (b) 7/3, (c) 5/5 and (d) 0/10 γ-PGA/Na.

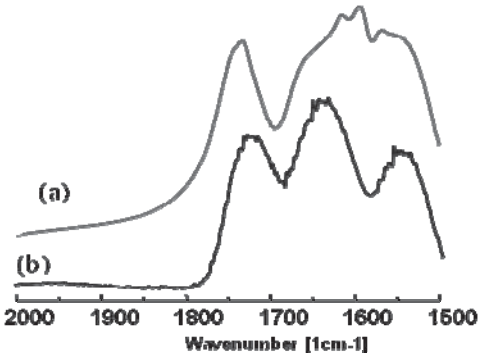


Figure 3. IR spectra of (a) precipitate from pH<1 aqueous solution of D/L=7/3 and of (b) film cast from pH<1 aqueous solution of D/L=0/10.

Reference

[1] S. Maeda and Y. Shimizu, *Polym. Preprints, Jpn*. **57**(2), 3300(2008).

P62

メチレン鎖長の異なる半芳香族ポリアミドの物性と構造解析

○田中佑弥[1]，米山賢[1]，上原宏樹[1]，山延健[1]
[1]群馬大学・大学院・理工学府

Structure and Physical property of semi-aromatic polyamides with various methylene length

○Tanaka Yuuya[1], Yoneyama Masaru[1], Uehara Hiroki[1], Yamanobe Takeshi[1]
[1] *Graduate School of Science and Technology, Gunma University*

Semi-aromatic polyamides having aromatic ring and methylene chain are polymer materials which have high thermal stability and moldability. The physical properties depend on the methylene chain length. The number of methylene carbon is related to the formation of intermolecular hydrogen bonds. In the case of polyamide having an odd number methylene carbon, the formation of hydrogen bond requires the distorted conformation. In this study, the structures of semi-aromatic polyamides with various methylene length and the effects of methylene chain on the physical properties were investigated. Consequently, it was found that the melting point was reduced as methylene chain becomes longer, the conformation around hydrogen bond changes dependent on the number of methylene carbon. In addition, annealing enhances the crystallinity of polyamide.

[序論]

剛直性を有する芳香環と柔軟性のあるメチレン鎖を有する半芳香族ポリアミドは高い耐熱性と成型加工性を有する高分子材料である。半芳香族ポリアミドはメチレン鎖長を変えることによって物性に違いが変化する。この変化の原因はメチレンの長さによる柔軟性の変化とメチレン炭素が偶数であるか、奇数であるかによって生じる構造の変化である。メチレン炭素の数は分子間水素結合の形成に関係している。ポリアミドはC=OとNH間で水素結合ネットワークを形成することでその強度が生まれる。メチレン炭素の数が奇数の場合にはトランスコンホメーションでは水素結合形成に障害がある。本研究では、これらの点に注目し、半芳香族ポリアミドの構造及び物性へのメチレン鎖長の影響を明らかにすることを目的とする。

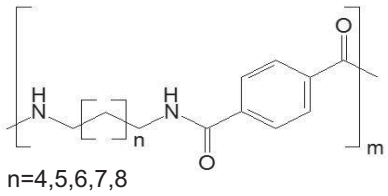


Fig. 1 Chemical structure of semi-aromatic polyamides.

[実験]

本研究では、界面重合法により合成した半芳香族ポリアミドを用いた。Fig.1に合成したポリアミドの構造を示した。以後、メチレンの数nを用いてPAnTと表す。PA9Tはクラレ(株)より提供された。これらの試料に対して、示差熱分析(DTA)測定、固体高分解能^{13}C-NMR測定を行った。また、熱処理後、徐冷結晶化した試料についても固体高分解能^{13}C-NMR測定を行った。

[結果と考察]

Fig.2にDTA測定の結果を示した。PA7T,PA8T,PA9T,PA10Tでは300℃付近に2つの吸熱ピークが観測された。低温側のピークは融解によるもので、高温側のピークは再配列のピークであると考

半芳香族ポリアミド，固体NMR，水素結合

○たなかゆうや，よねやままさる，うえはらひろき，やまのべたけし

えられる。一方、PA6Tは吸熱ピークが1つしか観測されない。PA6Tはメチレン鎖長が短く、剛直な芳香族の影響が強いために再配列が起こらず、吸熱ピークが一つとなると考えられる。各試料の低温側の融解ピークをみると、メチレン炭素数が偶数のものが奇数に比べて融解ピークが高めに現れ、偶奇効果が発現していることを確認できた。また、メチレン鎖長が長くなるにつれて融点は低下し、偶奇効果は小さくなっていた。これは、メチレン鎖が長くなったことによる芳香族性の低下と単位分子鎖長あたりの水素結合数の減少による水素結合の寄与の低下が原因であると考えられる。

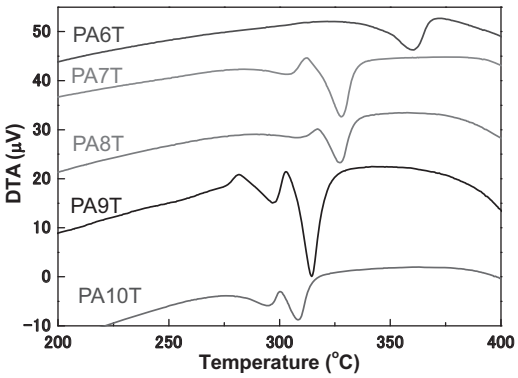


Fig. 2 DTA curves of semi-aromatic polyamides.

Fig.3に未処理試料の固体高分解能^{13}C-NMRスペクトルを示した。170ppm付近のピークはカルボニル炭素由来、120～140ppm付近のピークはフェニル炭素由来、20～40ppm付近のピークはメチレン炭素由来である。40ppm付近のピークはNHに結合したメチレン炭素であり、偶数のものは2つ、奇数のものは1つ観測された。緩和時間測定の結果、高磁場側のピークはT_1が短く、低磁場側のピークが結晶のピークであり、高磁場側のピークは非晶のピークである。奇数の場合は偶数の場合の高磁場側の非晶のピークと類似した化学シフトをとっているため、偶数の場合とはコンフォメーションの異なる結晶であると考えられる。結晶構造が異なる原因として、奇数と偶数ではアミド基の向きが異なるために水素結合付近のコンフォメーションが異なることが考えられる。

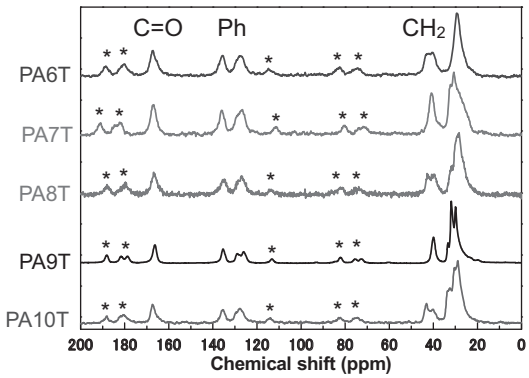


Fig. 3 ^{13}C CP/MAS spectra for unannealed semi-aromatic polyamides. *:SSB

Fig.4に徐冷結晶化試料の固体高分解能^{13}C-NMRスペクトルを示した。未処理試料と徐冷結晶化試料で比較すると、カルボニル基については、徐冷結晶化試料のピークが高磁場シフトしていた。これは、徐冷結晶化によって、より強い水素結合が形成されていることを示している。フェニル基については、高磁場側のピークの数が変化していた。これは、フェニル炭素の環境が非等価になったことを意味している、つまり、アミド結合面内にフェニル面が存在していると考えられる。メチレン基については、低磁場側の結晶ピークが増加していた。よって、メチレン鎖がトランスコンフォメーションを取っている割合が増加していると考えられる。また、全体的にピークはシャープになっていた。したがって、熱処理によって水素結合が強くなり、構造の均一化が起こっていると考えられる。

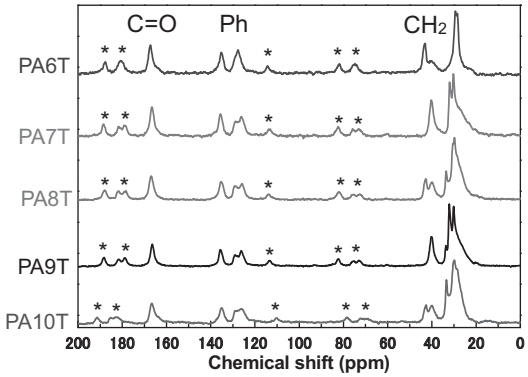


Fig. 4 ^{13}C CP/MAS spectra for annealed semi-aromatic polyamides. *:SSB

P63

界面活性剤及びシランカップリング剤を利用した シリカエアロゲルの構造解析

○日下 康成[1]，大鷲 圭吾[1]，遠藤 健司[2]，安孫子 大祐[2]，酒井 秀樹[2]
[1]積水化学工業株式会社
[2]東京理科大学工学部工業化学科

Structure analysis of silica aerogel using surfactant and silane coupling agent by solid state NMR

Ysunari Kusaka[1], Keigo Oowashi[1], Takeshi Endo[2], Daisuke Abiko[2], Hideki Sakai[2]
[1] *SEKISUI CHEMICAL CO., LTD., 2-1 Hyakuyama, Shimamoto-cho, Mishima-gun, Osaka 618-0021, Japan* [2] *Faculty of Science and Technology, Tokyo University of Science, 2641 Yamazaki, Noda, Chiba 278-8510, Japan* [1]Tel & Fax: +81-75-962-8818/+81-75-961-5353 E-mail: kusaka007@sekisui.com

Abstract: Structure of silica aerogel prepared by using surfactant and silane coupling agent was analyzed by solid state NMR. Relaxation time measurement and 2D solid state NMR method were used. The existence of multiple structure sites was detected by a difference of molecular dynamics.

[緒言] シリカエアロゲルは、ゲル中に含まれる溶媒を空気によって置換した低密度多孔質シリカである。その特徴として、低密度、高断熱性、高透明性などが知られており、捕集材、断熱材、光学材料などの応用が期待されている。しかし、柔軟性が無い、吸水による劣化の懸念がある などの問題を解決するために、シランカップリング剤を原料に用い、有機官能基を導入したシリカエアロゲルが知られている。これまでに、メチルトリメトキシシランを用いた先行研究は知られていたものの、実用化において柔軟性が不十分であった。[1)]

筆者らはエチルトリメトキシシラン(ETMS)および界面活性剤を用いたエアロゲルの合成について検討し、エチル基の存在により疎水性、柔軟性の向上が見られることを見出した。さらに、ETMS を分散させる界面活性剤量の調整および強酸・強塩基下での反応を導入することで、反応が進行することが明らかになった。しかし、その構造は未だ明らかになっていない。本報では固体 NMR 法を用いた微細構造の解析を行った。

[実験] 以下に示す方法で、2 種類のシリカエアロゲルを合成した。

通常品（弱酸/弱塩基系）：非イオン性界面活性剤であるプルロニック F-127 ($HO(C_2H_4O)_{87}(C_3H_6O)_{70}(C_2H_4O)_{87}H$)を 2.0 g、pH 調整剤である酢酸、及び尿素を混合し室温で 24 時間撹拌後シランカップリング剤である ETMS を 5.0 ml 添加し、室温で 30 分撹拌することにより ETMS を加水分解させた。その後、温度を 60 ℃に上昇させ、尿素の分解により反応溶液の液性をアルカリ性にさせ、重縮合反応を進行させることにより湿潤ゲルを得た。

得られた湿潤ゲルをメタノールで洗浄し、低表面張力溶媒であるバートレルXF($C_5H_2F_{10}$)を用いて溶媒置換(60 ℃, 12 h×2回)後、乾燥させてシリカエアロゲルを得た。

シランカップリング剤, 界面活性剤, エアロゲル

○くさかやすなり，おおわしけいご，えんどうたけし，あびこだいすけ，さかいひでき

高度縮合品（強酸/強塩基系）：通常品の合成プロセスのpH調整剤を塩酸にしてETMSを超純水中で室温2時間の撹拌後、プルロニック F-127を2.0 g添加し室温で溶解させた。水酸化ナトリウムでpHを調整することで湿潤ゲルを得た。その後は通常品と同様の処理を行い、シリカエアロゲルを得た。

生成物の評価は、JEOL RESONANCE製ECX400(9.4 T、400 MHz)を用い、8 mm MASプローブを使用した。その他、電界放出型走査電子顕微鏡(FE-SEM)、窒素吸脱着測定、フーリエ変換型赤外分光法(FT-IR)を用いて行った。

[結果と考察] 図１にシリカエアロゲルの^{29}Si Dipolar Decoupling/ Magic Angle Spinning (DD/ MAS) NMRスペクトルを示す。スペクトルに現れているETMSのケイ素の内、二つのシロキサン結合を有するケイ素T^2のピークおよび三つのシロキサン結合を有するケイ素T^3のピークの面積比T^2 ratio (T^2/ T^3)を、ガウス関数を用いたカーブフィッティングにより求めたところ、高度縮合品(T^2 ratio =0.095)は通常品(T^2 ratio =0.38)に比べて、縮合反応が進行していることがわかった。さらに、ショルダーを持つT^3のピークは単一のガウス関数ではフィッティングの残渣が大きくなる傾向があり、2つ以上のガウス関数でフィッティングする必要があった。このことは、複数の構造的な差異のあるサイトの存在を示唆している。そこで縦緩和時間T_{1Si}を測定することにより、複数サイトの分子運動の差異による分離が出来ると考え、Saturation Recovery法を用いてT_{1Si}の測定を行った。得られたアレイスペクトルに関して、それぞれのスペクトルにカーブフィッティングを行い、成分毎に$M_z(t_d) = M_0(1-\exp\{-t_d/T_{1Si}\})$の式を用いて縦緩和時間$T_{1Si}$を算出した。その結果、$T^3$成分中には少なくとも異なる緩和時間を持つサイトが2種類以上混在していることが示された。

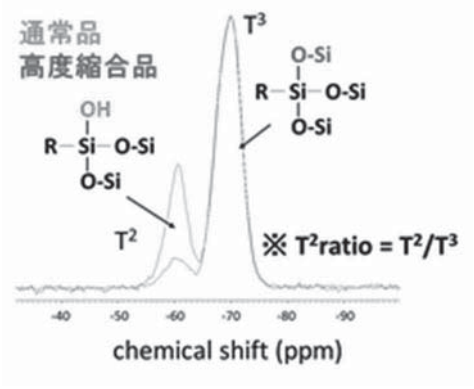


Fig.1 ^{29}Si DD/MAS NMR spectra of silica aerogel samples.

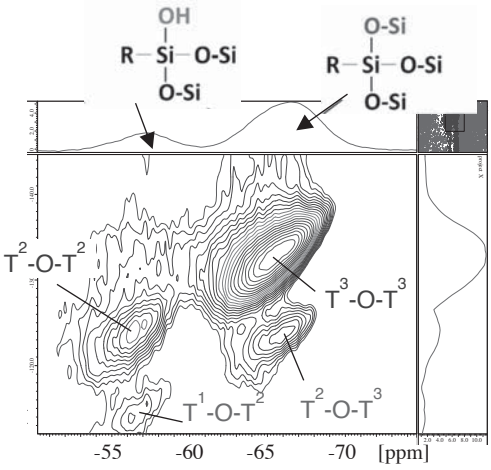


Fig.1 ^{29}Si DQ MAS NMR spectra of normal silica aerogel sample.

次に、^{29}Si 2量子遷移NMR測定をback-to-back法を用いて実施した。(図２) その結果、ここでもT^3成分中の複数のサイトの存在が明らかになった。

本発表では、構造的に複数のサイトを持つ理由に関しても議論する。現在、1次粒子中もしくは高次構造中の密度分布の影響などの可能性を考えている。

[謝辞] 本研究にあたり、新日鉄住金㈱の金橋康二博士に有益な助言をいただいた。㈱JEOL RESONANCEの下池田勇一氏には2次元測定の実施にあたり多大なご協力をいただいた。ここに感謝を述べる。

References

1) Kazuyoshi Kanamori et, al, *Adv. Mater* **2007**, 19, 1589-1593

P64

固体NMRおよびDFT計算による二次電池負極炭素中のリチウムおよびナトリウムの状態分析

○森田凌平[1]・後藤和馬[1,2]・福西美香[2,3]・久保田圭[2,3]・駒場慎一[2,3]・西村直人[4]・湯村尚史[4]・出口健三[5]・大木忍[5]・清水禎[5]・石田祐之[1]
[1]岡山大学大学院　自然科学研究科
[2]京都大学ESICB
[3]東京理科大学　理学部
[4]京都工芸繊維大学　工芸科学部
[5]物質・材料研究機構

Analysis of the state of lithium and sodium in carbon anode for secondary battery using solid state NMR and DFT calculation

○Ryohei Morita [1], Kazuma Gotoh [1,2], Mika Fukunishi [2,3], Kei Kubota [2,3], Shinichi Komaba [2,3], Naoto Nishimura [4], Takashi Yumura [4], Kenzo Deguchi [5], Shinobu Ohki [5], Tadashi Shimizu [5], Hiroyuki Ishida [1]
[1] *Graduate School of Natural Science and Technology, Okayama University*
[2] *Element Strategy Initiative for Catalysts and Batteries (ESICB), Kyoto University*
[3] *Department of Chemistry, Tokyo University of Science*
[4] *Department of Chemistry and Materials Technology, Kyoto Institute of Technology*
[5] *National Institute for Materials Science*

Hard carbon (HC) has been used as an active material of negative electrode in lithium ion batteries, and also explored as an electrode in sodium ion batteries. Our group achieved a high capacity of sodium insertion and steady cycling performance using a cell containing HC electrodes [1], and reported the state of sodium using ^{23}Na solid state NMR [2]. Previous work revealed that Na is stored in the voids between misaligned graphene sheets and in the closed pores in HC [1, 3]. In the present work, HC samples carbonized at between 700 ~ 2000 °C were used as electrodes to study the correlation between the structure of HC and the state of Na. A condensation mechanism of Li and Na were discussed using DFT calculation. We proposed the models of Na and Li storage in HC based on the results of NMR measurement and DFT calculation.

炭素材料の一種である難黒鉛化性炭素(ハードカーボン、HC)は、リチウムイオン電池の負極活物質として用いられるが、リチウムをナトリウムに置き換えたナトリウムイオン電池の負極活物質としても利用が期待できるため、研究が進められている。我々の研究グループでは、適切な電解液や添加剤を選択することによって、ナトリウムイオン電池の負極にHCを用いて優れた電気容量やサイクル特性が得られることを見出した[1]。また固体^{23}Na NMR測定により、リチウムイオン電池用市販HCに吸蔵されたNaの信号はいずれも+30 ～ -60 ppmの範囲で観測されること、Liの場合と異なり、半金属的なNaクラスターは生じないこと、充電状態の変化に伴う大きな化学シフト値の変化は見られないことを報告している[3]。

本研究では、700～2000 ℃の範囲で炭素化したHCを電極として用い、HCに吸蔵されたNaの状態を調べた。また、HCの細孔内におけるアルカリ金属(Li、Na)の吸蔵状態を調べるためにDFT計

固体 NMR・DFT 計算・二次電池負極

○もりたりょうへい，ごとうかずま，ふくにしみか，くぼたけい，こまばしんいち，にしむらなおと，ゆむらたかし，でぐちけんぞう，おおきしのぶ，しみずただし，いしだひろゆき

算を行った。作用極にHC、対極に金属ナトリウム、電解液に1 M $NaPF_6$ / PC+FEC (98 : 2、体積比)を用いて二電極式セルを作製し、0～2 Vの範囲で定電流(25 mA g^{-1})充放電試験を行ったところ、1600 ℃で得たHC(HC-1600)を用いた場合に最も大きな電気容量が得られた。この結果は1000～1200 ℃で得たHCで最も大きな容量が得られるリチウムイオン電池の場合と異なっており、NaとLiで吸蔵に最適な構造が異なることを見出した。HC-1600サンプルの各種充電状態におけるNMR信号はいずれも+30 ～ -60 ppmの範囲に現れ、充電状態の変化に伴う化学シフト値の変化はほとんど見られなかった(Fig. 1)。そのほかの温度で熱処理されたHCの場合も同様であり、いずれもNaはイオンの状態で存在し、Liの場合と異なって金属・半金属的な状態は現れなかった。DFT計算によってグラフェン面のモデル物質($C_{150}H_{30}$)上のLi、Naの最適構造を調べたところ、Liの場合ではLi_2やLi_4がグラフェン面に沿って平面的に配置する傾向が見られた(Fig. 2(b))。一方で、Naの場合、Na_3がグラフェン面に対して直立した配置が得られた(Fig. 2(c))。これらの結果からHCへのLiやNaの吸蔵に関する新たなモデルを構築した(Fig. 3)。HCは熱処理温度が高くなるにつれて平均細孔径が大きくなることが知られている[4]。Liの場合、細孔壁に沿って吸蔵されるため、HCの熱処理温度が1300 ℃より低い場合には密に吸蔵されて大きな容量が得られるが、1400 ℃より高くなるとLiの吸蔵されない空間が増加することにより容量は減少すると説明できる。Naの場合、クラスターが細孔壁に対して直立した配置を取るため、細孔径が大きなほうが容易にNa_3などのクラスターが形成され、吸蔵量が増加すると説明できる[5]。

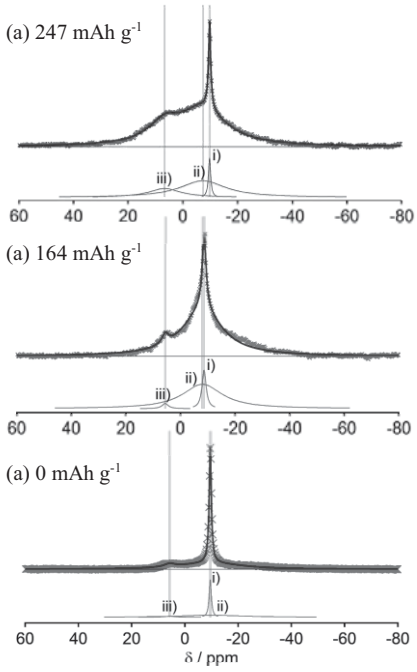


Fig. 1. ^{23}Na MAS NMR spectra of HC-1600 samples.

References
[1] S. Komaba, K. Gotoh et al., *Adv. Funct. Mater.,* **21**, 3859 (2011).
[2] K. Gotoh et al., *J. Power Sources,* **225,** 137 (2013).
[3] D. A. Stevens, J. R. Dahn, *J. Electrochem. Soc.,* **148**, A803 (2001).
[4] A. Gibaud, J. S. Xue and J. R. Dahn, *Carbon*, **34**, 499 (1999).
[5] R. Morita, K. Gotoh, et al., *J. Mater. Chem. A*, **4**, 13183 (2016).

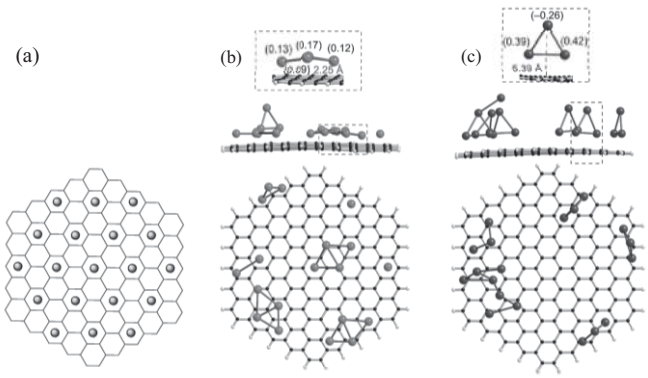


Fig. 2. Initial configuration of nineteen alkali atoms on a $C_{150}H_{30}$ plane (a) and its optimized geometry for lithium (b) and sodium (c).

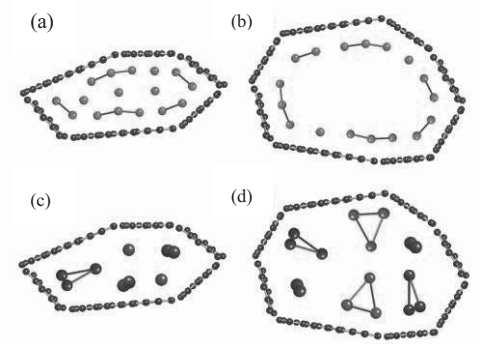


Fig. 3. Schematic models of lithium storage in pores of HC-1300 (a) and HC-1600 (b), and sodium storage in HC-1300 (c) and HC-1600 (d).

P65

ジシラシクロファン誘導体の溶液中並びに固体中でのコンフォメーション変化に関する研究

○服部峰之[1]、治村圭子[1]、林繁信[1]、島田真樹[2]、山野井慶徳[2]、西原寛[2]、尾本賢一郎[2]、田代省平[2]、塩谷光彦[2]
[1]産業技術総合研究所・計量標準総合センター・物質計測標準研究部□
[2]東京大学大学院・理学系研究科・化学専攻

Conformational Consideration of Octamethyltetrasila[2,2]cyclophanes in Solution and Solid State

○Mineyuki Hattori [1], Keiko Jimura [1], Shigenobu Hayashi [1], Masaki Shimada [2], Yoshinori Yamanoi [2], Hiroshi Nishihara [2], Kenichiro Omoto [2], Shohei Tashiro [2], Mitsuhiko Shionoya [2]
[1] *Research Institute for Material and Chemical Measurement, National Metrology Institute of Japan, AIST.*
[2] *Department of Chemistry, Graduate School of Science, The University of Tokyo.*

Abstract: A new class of cyclophanes of containing disilane units has been synthesized and characterized. Structural analysis of 1,1,2,2,8,8,9,9-octamethyl-1,2,8,9-tetrasila[2,2](2,5)-thiophenophane **(1)** was investigated by variable-temperature NMR experiment in solution and solid state. ^{1}H NMR spectra at low temperature showed a set of signal with equal intensity assignable to Si-CH_3 moiety detected at 0.30, 0.50 ppm. With increasing temperature, these signals broadened and coalesced at around 300K and became a broad singlet above ambient temperature. The activation enthalpy and entropy for the flipping motion in **1** were estimated by using an Eyring plot. This result indicated that flipping of **1** became fast for these proton signals and allowed the calculation of an energy barrier of 61 kJ/mol.

［概要］芳香族ケイ素化合物はケイ素－芳香環のσ－π共役によって蛍光特性や電子輸送特性を示す。一方、シクロファン分子はその特異な形状から軸不斉分子として注目されており、シクロファン骨格に発光素子を導入することで円偏光発光への応用が期待されている。一般に[2,2]パラシクロファンの架橋部位はエチレン基(-CH_2-CH_2-)が使われているが、この部位をケイ素に修飾したジシラシクロファンは上記の理由より発光性を示しうる。しかし、合成上の問題からジシラン架橋シクロファン分子は報告例が限られていた。ケイ素を含む有機化合物は有機EL材料や電子輸送材料に利用されている。なかでも Si-Si結合を有するジシラン類、オリゴシラン類は C=C結合を有するアルケンや芳香族化合物と同程度のイオン化ポテンシャルを有する。化学的性質が類似しているため Si-Si結合を芳香環と連結させると共役系が拡張することが知られている。しかしながら、Si-Si結合を有する化合物を効率良く合成する手法は、分子変換中にSi-Si結合がしばしば切断するために研究例がそれ程多くはない。この研究で、ジシランユニット（Si-Si 結合）を有する分子を合成し、この化合物が固体状態で発光を示すとともに溶液中で様々なコンフォメーションを取ることがわかった。ここでは、合成した化合物の溶液中並びに固体状態の構造状態を核磁気共鳴スペクトルにより追跡する。特に温度変化に伴うコンフォメーション変化を調査し、発光挙動との相関について綿密な解析に役立てる。^{1}H NMRでは2つのコンフォメーションの化学シフトの差が小さいために^{13}C NMRでの検討を行った。

固体NMR、フリッピング運動、異性体

○はっとりみねゆき，じむらけいこ，はやししげのぶ，しまだまさき，やまのいよしのり，にしはらひろし，おもとけんいちろう，たしろしょうへい，しおのやみつひこ

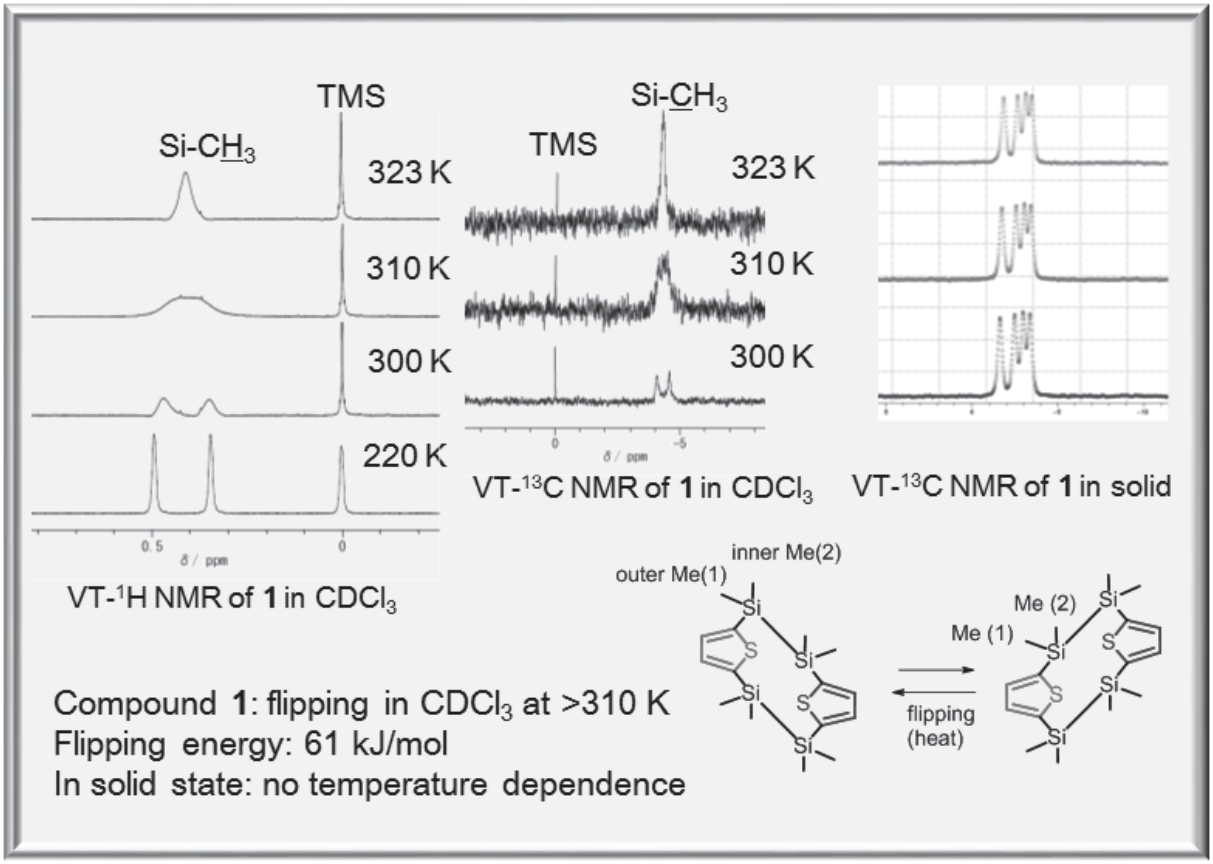


Fig.1　Temperature dependences of NMR spectra of Octamethyltetrasila[2,2]cyclophanes **(1)** in Solution and Solid State. ^{1}H and ^{13}C NMR spectra in solution were recorded on Bruker US-500 spectrometer at 500MHz and 125MHz, respectively. ^{13}C NMR spectra in solid state were recorded on Bruker Avance Ⅲ HD 600WB spectrometer at 150MHz. ^{1}H NMR spectra at low temperature showed a set of signal with equal intensity assignable to Si-CH_3 moiety detected at 0.30, 0.50 ppm. With increasing temperature, these signals broadened and coalesced at around 300K and became a broad singlet above ambient temperature.

[まとめ]ジシラシクロファンを触媒の存在下、効率良く合成し、これらの構造化学に関する知□を核磁気共鳴スペクトルにて行った。特に固体中での状態変化について、高感度な600MHzの装置を使用した。ジシラシクロファンは非常に合成が難しい化合物の１つであるが、触媒を用いて様々な誘導体を効率良く合成することに成功した。溶液中でこれらはおよそ40℃付近でフリッピング運動を起すことがわかった。固体中の構造はX線構造解析により、密にパッキングしていることが判明した。固体中でも温度変化による解析を行い、分子のフリップ運動は抑制されていることがわかった。

[謝辞] 本研究（の一部）は、文部科学省委託事業ナノテクノロジープラットフォーム課題として産業技術総合研究所微細構造解析プラットフォーム　先端ナノ計測施設（ANCF）の支援を受けて実施されました。

[参考文献]

1. Shimada, M.; Tsuchiya, M.; Sakamoto, R.; Yamanoi, Y.; Nishibori, E.; Sugimoto, K.; Nishihara, H. Angew. Chem. Int. Ed. 2016, 55, 3022-3026.

2. Shimada, M.; Yamanoi, Y.; Matsushita, T.; Kondo, T.; Nishibori, E.; Hatakeyama, A.; Sugimoto, K.; Nishihara, H. J. Am. Chem. Soc. 2015, 137, 1024-1027.

P66

^{2}H NMRによる黒鉛層間エーテル分子の構造および動的挙動の解析

○後藤和馬[1,2]，○丸山寿史[1]，森田凌平[1]，宮東達也[3]，水野元博[3]，
瓜田幸幾[4]，石田祐之[1]
[1]岡山大学　大学院・自然科学研究科
[2]京都大学　触媒・電池元素戦略研究拠点（ESICB）
[3]金沢大学　大学院・自然科学研究科
[4]長崎大学　大学院・工学研究科

Structure and dynamics of ether molecules intercalated in graphite layers studied by ^{2}H NMR

○Kazuma Gotoh [1]，○Hisashi Maruyama[1]，Ryohei Morita[1]，Tatsuya Miyatou[3]，Motohiro Mizuno[3]，Koki Urita[4]，Hiroyuki Ishida[1]
[1] *Graduate School of Natural Science & Technology, Okayama University, 3-1-1 Tsushima-naka, Okayama 700-8530, Japan*
[2] *Element Strategy Initiative for Catalysts and Batteries (ESICB), Kyoto University*
[3] *Department of Chemistry, Graduate School of Natural Science and Technology, Kanazawa University, Kakuma-machi, Ishikawa 920-1192, Japan*
[4] *Division of Chemistry and Materials Science, Graduate School of Engineering, Nagasaki University, 1-14 Bunkyomachi, Nagasaki 852-8521, Japan*

Sodium is hardly intercalated into graphite although Li can be easily inserted into graphite. Because low-stage secondary graphite intercalation compound (GIC) (NaC_X) don't form electrochemically, amorphous carbon or modified carbon materials had been used as anodes of sodium ion batteries (NIBs). The possibility of the use of graphite to NIB's electrode is largely expected, but the structure of the ternary GIC has not been understood. Our group synthesized a ternary GIC consisting of sodium, deuterated diglyme (diglyme(d14)) and graphite by a solution reaction (Na-diglyme(d14)-GIC), and investigated the dynamics and the coordination structure of diglyme(d14) molecules using ^{2}H solid state NMR observation. Diglyme molecules should coordinate rigidly to sodium ions at low temperature. At ambient temperature, at least three components having different qcc were observed. It means that diglyme's fluctuation motions are activated, which enable sodium-diglyme complexes to diffuse between carbon layers.

序論

リチウムイオンは黒鉛層間に容易に挿入することができ、黒鉛層間化合物（GIC）を形成するため、黒鉛はリチウムイオン電池の負極として広く用いられている。一方でナトリウムはそのままではほとんど黒鉛に挿入されないため、黒鉛負極を利用したナトリウムイオン電池は不可能であると長らく思われてきた。また、ナトリウムは有機電解液と黒鉛に共挿入して三元系GICを形成することが知られているが、このような三元系GICを二次電池負極に用いた場合、電池の充放電に伴い黒鉛が剥離していくため負極には適さないとされてきた．しかし近年、Adelhelmら[(1)]がジエチレングリコールジエチルエーテル（diglyme）がナトリウムと共に黒鉛に共挿入された系がナトリウムイオン電池負極として安定した充放電サイクルを示すことを報告したことから、このような三元系GICを用いたナトリウムイオン電池の実現可能性が高まっている。本研究では重水素化し

ナトリウムイオン電池，^{2}H NMR，ジグライム
○ごとうかずま，○まるやまひさし，もりたりょうへい，みやとうたつや，みずのもとひろ，うりたこうき，いしだひろゆき

たジグライムを用いて溶媒中での反応により三元系GIC（Na-diglyme(d14)-GIC）を作製し、^{2}H広幅NMRを用いてGIC中でのdiglyme分子の構造や動的挙動を調べた。

実験

Na-diglyme(d14)-GICは以前の研究で我々が作製したNa-en(d4)-GICやNa-thf(d8)-GICと同様の方法[(2)]で合成した。アルゴンガス中で黒鉛、金属ナトリウム、少量のナフタレンを1:1 diglyme / diglyme(d14) 混合溶媒に加え、室温で一週間ほど攪拌を続けた。得られた混合物からGICを遠心分離機で分離し、diglymeで表面を軽く洗浄して残留金属ナトリウムを除去したのち、真空中で乾燥させて目的とするGICサンプルを得た。粉末X線回折（XRD）でGICの炭素層間距離を確認したうえで、走査透過型電子顕微鏡（STEM, JEOL JEM-2010UHR）でサンプルの形態を確認した。^{2}H 広幅NMR スペクトル（45.3 MHz）を123 K から室温の間で測定した（標準：D_2O，四極子エコー法）。ICP-AESおよびCHN 元素分析結果からNa-diglyme(d14)-GIC の化学的組成を求めた。

結果・考察

XRD パターンから Na-diglyme(d14)-GIC がステージ 1 構造の GIC であること、層間距離が 1.161 nm であることを確かめた。元素分析から Na-diglyme(d14)-GIC の組成は C_{24}(diglyme)$_2$Na$_1$ であり、Na は炭素層間では 2 つ diglyme 分子に配位された状態で存在していることがわかった. STEM イメージ（**Fig. 1**）から、GIC は薄膜状であるがある程度炭素が積層していること、また EDX より Na が全体に分散して存在していることを確認した。**Fig. 2** に ^{2}H NMR スペクトル（123 K ～室温）を示す。233 K 以下では四極子定数 qcc =165 kHz と 50 kHz の粉末パターンが得られたが、これは固定された-CD_2-(167 kHz)および回転している-CD_3(50 kHz)に一致しており, diglyme 分子が rigid な状態で Na に配位していることがわかった。室温では複雑なスペクトルが得られたが、これをシミュレーションした結果、diglyme 分子は **Fig. 3.**のように炭素鎖が黒鉛の炭素面にほぼ垂直に立ち、炭素平面に沿った方向を揺動しているモデルで説明することができた。

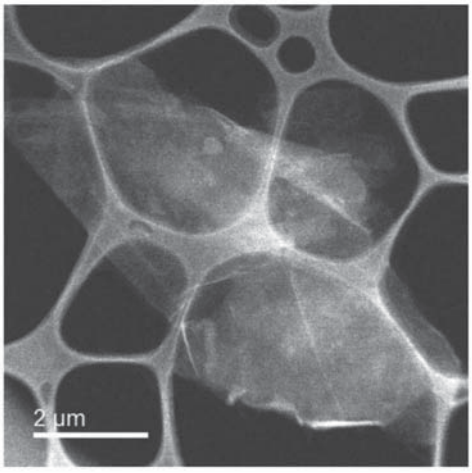


Fig. 1. STEM image of a Na-diglyme(d14)-GIC particle.

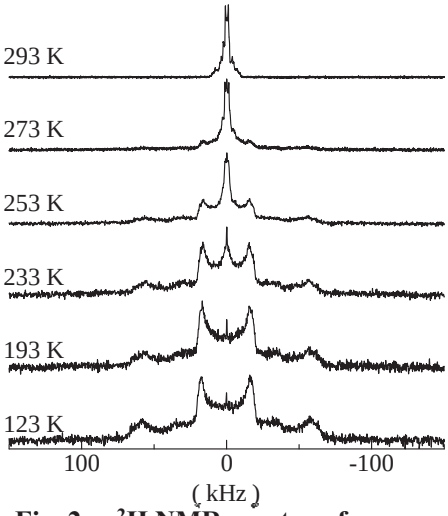


Fig. 2. ^{2}H NMR spectra of Na-diglyme(d14)-GIC.

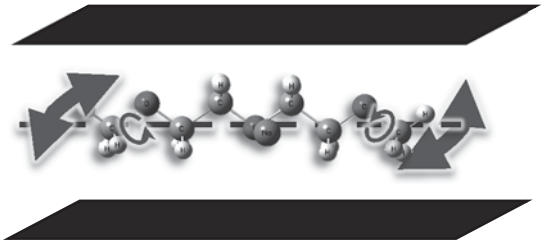


Fig. 3. Molecular motion of diglyme in Na-diglyme(d14)-GIC at r.t..

謝辞

This work was partially supported by JSPS KAKENHI Grant Number 26870385.

References

(1) Jache, B. and, Adelhelm, P. (2014) *Angew. Chem. Int. Ed.*, **53**, 10169-10173.

(2) Gotoh, K., Sugimoto, C., Morita, R., Miyatou, T., Mizuno, M., Sirisaksoontorn, W., Lerner, M.M. and Ishida H, (2015) *J. Phys. Chem. C*, **119**, 11763-70.

P67

固体NMRによるNaI-$LiBH_4$固溶体のLiイオン伝導機構の解明

○野田泰斗[1]，内林渓[1]，宮崎怜雄奈[2]，栗原大[2]，日原岳彦[2]，竹腰清乃理[1]
[1]京都大学大学院理学研究科化学専攻
[2]名古屋工業大学大学院工学研究科物理工学専攻

Solid-State NMR reveals Li-ion transport mechanism in NaI - $LiBH_4$ solid-solution

○Yasuto Noda[1], K. Uchibayashi[1], R. Miyazaki[2], D. Kurihara[2], T. Hihara[2], and K. Takegoshi[1]
[1] *Division of Chemistry, Graduate School of Science, Kyoto University*
[2] *Department of Physical Science of Engineering, Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology*

15NaI·$LiBH_4$ prepared by ball-milling NaI with a small amount of $LiBH_4$ shows pure Li^+-ion conduction. By applying solid-state NMR to the solid-state Li^+ conductor, we clarified that the solid-electrolyte consists of 2 phases of NaI - $LiBH_4$ solid-solution and impurity, and that the solid-solution played the main roll in Li-ion conduction in the solid-electrolyte. We propose from the structural point of view that Li-ion conduction mechanism in the solid-solution is the vacancy mechanism.

1. 背景

Liイオン電池の安全性を高めるために不燃性の固体電解質が注目を集めている。これまで固体電解質の合成はリチウム化合物を出発物質にして行われてきた。近年、ボールミリングを用いて微量の$LiBH_4$をNaIへ添加することにより、リチウムを含まないNaIからLiイオン伝導体が合成された[1]。この固体伝導体はXRDから岩塩構造をとっており、室温で1.7×10^{-6} $S\cdot cm^{-1}$の伝導度を示し、リチウムイオンの輸率は1であった。イオン伝導機構がわかればイオン伝導度を向上させるための指針が得られる。固体中のイオン伝導機構は欠陥機構と格子間機構の2つに大別され、それぞれイオン伝導度を向上させる方策が異なる。メカノケミカルな固相合成ではしばしば生成物が単相ではなく不定形相などが共存する複合体となる。不定形相は往々にしてイオン伝導度が高く、イオン伝導機構を調べるには微視的な視点からの観測が必要である。固体NMRはXRDといった回折現象を利用した測定手法とは異なり、不定形相やナノ粒子といった長周期の構造を持たない相も解析できる分光法である。本研究では、固体NMRを用いることにより、ボールミリングにより合成されたNaI – LiBh4系Li+伝導体の組成を調べ、次に固溶体相がLiイオン伝導を担っていることを明らかにし、微視的構造からLiイオン伝導機構を探る。

2. 実験

グローブボックス中で、クロム鋼製容器に15対1の割合でNaIと$LiBH_4$を密封し、直径10 mmのクロム鋼製ボールを用い、400 rpmの速度でボールミリングすることによりLiイオン固体伝導体を合成した。加熱を防止するために15分間ミリングした後に5分間の休みを繰り返し、合計で5時間ミリングした。Ar雰囲気のグローブボックス中で気密試料管に詰め、14 Tの磁場中で^{1}H-^{7}Li-^{23}Naの3重共鳴の4 mm T3プローブを用いて固体NMRを測定した。^{1}Hと^{7}Li、^{23}Naの共鳴周波数はそれぞれ600.13 MHzと233.23 MHz、158.75 MHzで、MAS回転速度は15 kHzであった。

固体高分解能 NMR，固体電解質，リチウムイオン伝導機構

○のだ やすと，うちばやし けい，みやざき れおな，くりはら だい，ひはら たけひこ，たけごし きよのり

3. 結果と考察

3-1 Liイオン伝導体を構成している相の解析

合成した15NaI·$LiBH_4$中にNaI - $LiBH_4$固溶体相以外の相が存在するか調べるために、^{7}Li MAS NMRを測定した。Fig. 1にLiイオン固体伝導体のスペクトル（実線）と、$LiBH_4$のスペクトル（破線）、LiIのスペクトル（点線）を示す。Liイオン固体伝導体は2つのピーク（-1.1 ppmと-3.9 ppm）を示し、後者は高周波側に肩を伴っていた。原材料の$LiBH_4$と、NaIと同じ岩塩構造のLiIのピーク位置から、それぞれ$LiBH_4$中のLiとNaIに固溶したLiの信号である可能性が高い。

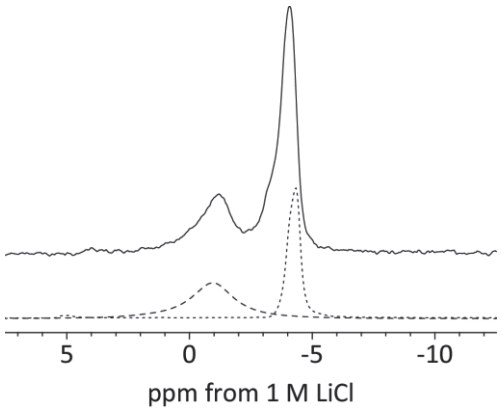


Fig. 1. ^{7}Li MAS NMR spectra of Li-ion solid-electrolyte (solid line), $LiBH_4$ (dashed line), and LiI (dotted line).

固溶体だけが、リチウム近傍にナトリウムが存在するため、ナトリウム周囲のリチウムを選択的に観測できる^{23}Na-^{7}Li CP/MAS NMRを用いれば固溶体中のLiと不純物相のLiの信号を区別できる。Fig. 2に^{23}Na-^{7}Li CP/MAS NMRの結果を示す。接触時間を増加させても肩を伴う-3.9 ppmの信号のみが観測されたため、これはNaI中に固溶してたLiと帰属し、その他の信号を不純物相中のLiの信号と帰属した。XRDでは固溶体単相であると見えた15NaI·$LiBH_4$は、固溶体の他に少量の$LiBH_4$を含んでいる複合体であることが固体NMRより判明した。

3-2 Liイオン伝導を担っている相の同定

Liイオン固体伝導体がNaI-$LiBH_4$固溶体と少量の$LiBH_4$から成る複合体であると判明したが、Liイオン伝導体である$LiBH_4$がマクロに繋がればLiイオンはNaI-$LiBH_4$固溶体ではなく不純物を介して伝導することができる。NaI-$LiBH_4$固溶体がLiイオン伝導体であるを判定するために、^{6}Liを95%エンリッチしたLi金属電極を用いて通電させた試料(a)と、通常のLi金属電極を用いて通電させた試料(b)を用意し、それぞれの^{7}Li NMRを測定した（Fig. 3）。^{6}Liをエンリッチした電極を用いた試料は、伝導経路となる物質中のLiは^{6}Liで置換されるため、^{7}Li NMR信号強度が小さくなる。通常のLi電極のスペクトルから差し引くと、$LiBH_4$の信号が消え、固溶体の信号と小さな不純物の信号（恐らくLiI水和物）のみが残った。これより、試料のLiイオン伝導は固溶体相が主に担っていることが分かった。

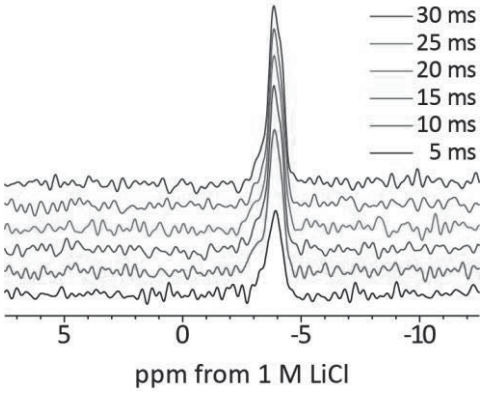


Fig. 2. ^{23}Na-^{7}Li CP/MAS NMR spectra of Li-ion solid-electrolyte.

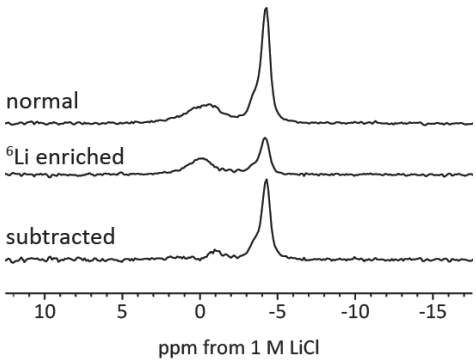


Fig. 3. ^{7}Li MAS NMR spectra of Li-ion solid-electrolyte applied for DC of ^{7}Li for natural abundance (top) and 5% (middle), and the

3-3 Liイオン伝導機構の解明

前述したようにNaI中に固溶下^{7}Li MAS NMRの信号は高周波数側に肩を伴うピークである。このことから固溶体には少なくとも2つのLiサイトがあると考えられる。どのようなサイトなのか明らかにすることでLiイオン伝導機構を解明していく。BH_4アニオンは大きいため、NaI格子中には入らずにNaI-$LiBH_4$固溶体中ではIイオンと置換しているであろう。一方、LiカチオンはNaI格子間に存在しえる。固溶体中におけるLiイオンとBH_4イオン間の距離を調べることによりLiサイトの同定をまず試みた。

Fig. 4に接触時間τを変えて測定した^{1}H-^{7}Li CP/MAS NMRのスペクトルを示す。^{1}Hから磁化を移して固溶体中に存在するLiの^{7}Li NMR信号が観測できたことから、BH_4が固溶体中に存在することが確認された。固溶体中のLiのピークに注目すると、まず-3.2 ppmの肩のピークが現れ、τが長くなるにつれ-3.9 ppmのメインピークが成長していった。それぞれのピーク高さをτに対してFig. 5にプロットした。交差分極の信号強度yのτ依存性は、τの短い領域では

$$y \propto [1 - \exp(-\tau/T)]$$

と表される。ここでTは交差分極の時定数で、磁化移動させた核間距離の情報をもつ。τの短い領域で、肩のピークとメインのピークの高さをフィッティングすると、Tは0.64 msと9.9 msとそれぞれ見積もられた。Liに近いBH_4の数が等しいとすると、Tの比とLiとBH_4の距離rの比には

$$T_a/T_b = (r_a/r_b)^6$$

の関係がある。Fig. 6に示す固溶体のモデルを考える。すなわち、BH_4から見ると、近い順に格子間Li（距離r_1）とNaサイトに置換したLi（距離r_2、r_3）が存在する。立方格子であるから、$T_2/T_1 = (r_2/r_1)^6 = 2.4$、$T_3/T_2 = (r_3/r_2)^6 = 27$となった。実験値は$9.9/0.64 = 15$であるから、固溶体のLiはNaと置換していると推定される。

さらに固溶体のLiが占めているサイトを^{7}Li MAS NMRの信号強度から検証する。Liイオン固体伝導体の^{7}Li MAS NMRを定量的に測定し、ピーク分離を行った（Fig. 7）。分離したピーク面積比をTable 1にまとめた。仕込みのLiは6.25%であるが、反応しきっていないため実際の固溶体中のLi量は減っているはずで

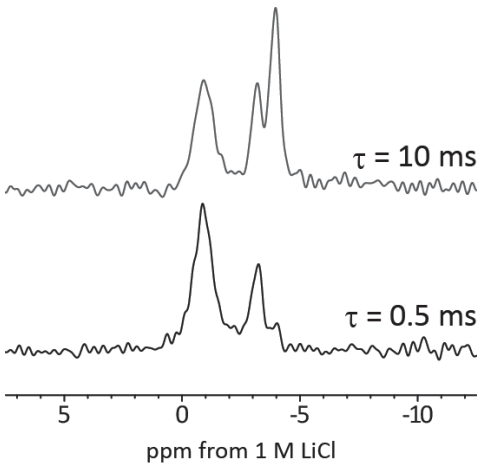


Fig. 4. ^{1}H-^{7}Li CP/MAS NMR spectra obtained with varying contact time τ.

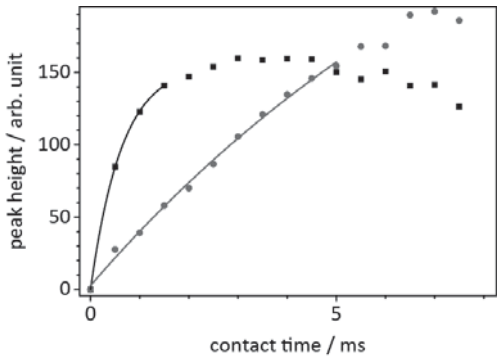


Fig. 5. Contact time dependence of ^{1}H-^{7}Li CP/MAS NMR signals of Li-ion solid-electrolyte at –3.2 ppm (closed circles in black) and –3.9 ppm (closed circles in red), and fitting curves for signals at -3.2 ppm (black) and -3.9 ppm (red).

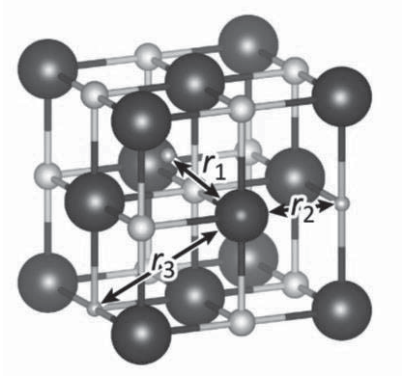


Fig. 6. A structure model of NaI-$LiBH_4$ solid-solution containing an interstitial Li-ion and substituted Li-ions.

The balls in blue, green, purple, and yellow indicate BH_4-, Li-, I-, and Na-ions, respectively.

Table 1. Area ratio of fitted peaks of ^{7}Li MAS NMR of Li-ion solid electrolyte

phase	solid-solution phase		impurity phase	
peak	$P1_{fit}$	$P2_{fit}$	$P3_{fit}$	$P4_{fit}$
ratio (%)	47.4	16.2	35.5	0.9

ある。仕込みの$LiBH_4$量に固溶体中のLiのピーク強度比をかけることにより実際の固溶量は4%と求められた。LiイオンがNaイオンと置換して固溶体を形成しているのであれば、Liイオンにはn個のBH_4イオンと$(6-n)$個のIイオンが配位している。BH_4イオンがx mol%ランダムに固溶した時、n個のBH_4イオンが配位しているLiの割合は

$$P_n(x) = \binom{6}{n} x^n (1-x)^{6-n}$$

から計算できる。固溶量x =4%のとき、$n = 0$のLiと$n > 0$のLiの割合は78:22と求まる。一方、実験からは$P1_{fit}:P2_{fit} = 75:25$と求まり、両者はよく一致している。

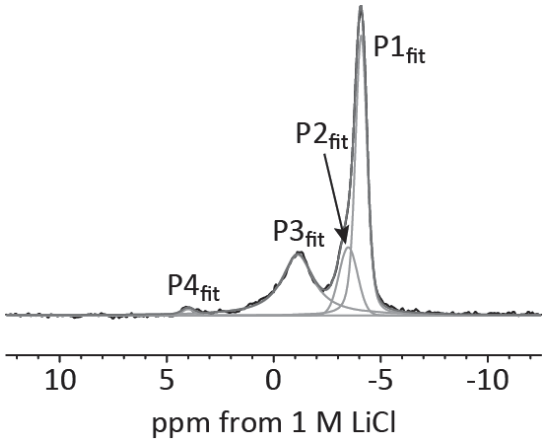


Fig. 7. A quantitatively measured ^{7}Li MAS NMR spectrum of Li-ion solid-electrolyte (black) and fitting curves (green).

以上の2つの検証より、LiはNaサイトを占めていると結論され、固溶体中のLiは欠陥機構で伝導していると考えられる。欠陥機構のため多価カチオンをドープすることができれば、より高いイオン伝導性をもつ物質を合成できると期待される。

4. 結論

Liを含有しないNaIと極微量な$LiBH_4$をボールミルすることにより合成されたLiイオン固体伝導体は、粉末XRDからは$NaI\text{-}LiBH_4$固溶体の単相と考えられていたが、固体高分解能NMR測定により$NaI\text{-}LiBH_4$固溶体と不純物の複合体であることが判明した。このLiイオン固体伝導体のLiイオン伝導を担っている相を調べるために、^{7}Li含有率が5%と92%のLiイオンを直流で流してLiイオン伝導経路を選択的に標識して^{7}Li NMR信号を測定し比較することで、固溶体中をLiが伝導していることを確認した。$Li\text{-}BH_4$距離測定と^{7}Li MAS NMRの定量測定から、固溶体中のLiイオンの占めているサイトがNaイオンサイトであることから、Liイオン伝導機構が欠陥機構であると結論した。

【謝辞】本研究はJSPS科研費 基盤研究(B) JP26288006と新学術領域JP16H06440の助成を受けて実施された。

【参考文献】

(1) R. Miyazaki, D. Kurihara, and T. Hihara, J. Solid State Electrochem. (2016) doi:10.1007/s1008-016-3287-3.

P68

無機固体酸塩$Cs_2(HSO_4)(H_2PO_4)$におけるアンモニウムイオン置換とスピン－格子緩和

○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

Ammonium ion exchange and spin-lattice relaxation in 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.

The inorganic solid acid salt $Cs_2(HSO_4)(H_2PO_4)$ shows high proton conductivity in a high-temperature phase, so-called “a superprotonic phase”. The high-temperature phase is retained for a considerably long period on cooling. Thus, $Cs_2(HSO_4)(H_2PO_4)$ shows a large thermal history. Tetrahedral AO_4 anions form hydrogen bond networks in this compound. The hydrogen bond networks are expected to correlate intimately with the above thermal behavior. We have attempted to study the hydrogen bond networks by solid-state NMR. In the room-temperature phase, the proton motions are suppressed by the hydrogen bond, and the spin-lattice relaxation times exceed 100 s even for ^{1}H. In the present work, we have tried to shorten the spin-lattice relaxation times. A small fraction of alkali cations is replaced by ammonium ions, and the effect of ammonium ions on the relaxation is investigated.

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、いわゆる「超プロトン伝導相」において高いプロトン伝導を示すものがある。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の温度に冷やしても超プロトン伝導相が長い時間維持される[1,2]。このよう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。我々は、$Cs_2(HSO_4)(H_2PO_4)$における水素結合について固体NMRを用いて調べている。

$Cs_2(HSO_4)(H_2PO_4)$の室温相ではプロトン伝導が抑制されているため、^{1}Hであってもスピン－格子緩和時間T_1が100 sを越す値を示す[1,3]。NMR測定の効率を高めるためには緩和時間を短くする必要がある。そこで、本研究ではアルカリ金属と同じ1価のイオンであるアンモニウムイオンを選択し、カチオンのごく一部をNH_4^+で置換して、NH_4^+が緩和に及ぼす効果について検討した。予備的な結果についてはすでに発表しているが[3]、今回はNH_4^+の置換量を増加するとともに、緩和曲線を詳細に検討した。さらに、マジック角回転の影響についても検討した。

方法

少量の水に$CsHSO_4$、CsH_2PO_4、$NH_4H_2PO_4$を所定量混合した後、水を蒸発させることにより$(Cs_{1-x}(NH_4)_x)_2(HSO_4)(H_2PO_4)$を合成した。

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 NMR測定はBruker Avance III HD 600WB（測定周波数：600.39 MHz）を用いて行った。T_1はsaturation recovery法によって測定した。

結果および考察

TG-DTA、DSC、およびXRD測定を行い、仕込みのNH_4^+置換量 x_N が0、1、2、3、5%の試料について超プロトン伝導相への転移および結晶構造の同等のものが得られたことを確認した。

Fig. 1に、^{1}H MAS NMRスペクトルを例示した。13.2、11.5 ppmに酸性プロトン、6.7 ppmにNH_4^+プロトンが観測された。NH_4^+の置換量はx_N = 1、2、3、5%の試料に対し、x_{obs} = 0.71、1.04、1.83、2.69%であった。

Fig. 2に、x_N = 5% の試料の緩和曲線を示した。短時間領域で非指数関数的減衰を示した。長時間領域の指数関数的減衰部分で緩和時間を求めた。Fig. 3に緩和速度$1/T_1$のNH_4^+濃度依存性を示した。酸性プロトンの２つのシグナルは同一の緩和時間を示したが、NH_4^+プロトンは若干短い緩和時間を示した。8 kHzの回転によって、酸性プロトンとNH_4^+プロトンの間のスピン拡散が一部抑制されていることがわかった。

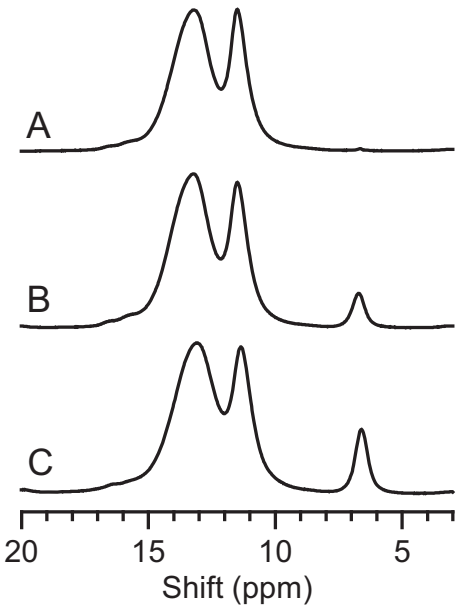


Fig. 1. ^{1}H MAS NMR spectra at a spinning rate of 8 kHz. The NH_4^+ nominal contents (x_N) were (A) 0%, (B) 3% and (C) 5%.

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) S. Hayashi, K. Jimura, 日本化学会第96春季年会, 4E6-32 (2016).

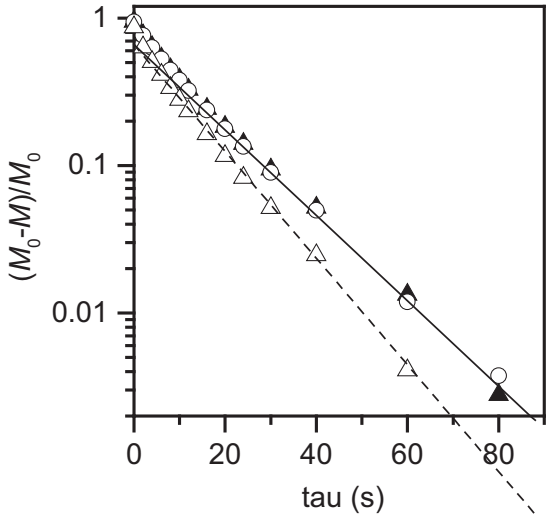


Fig. 2. ^{1}H spin-lattice relaxation curves of the sample with x_N = 5% spinning at 8 kHz. ○: 13.2 ppm, ▲: 11.5 ppm, △: 6.7 ppm.

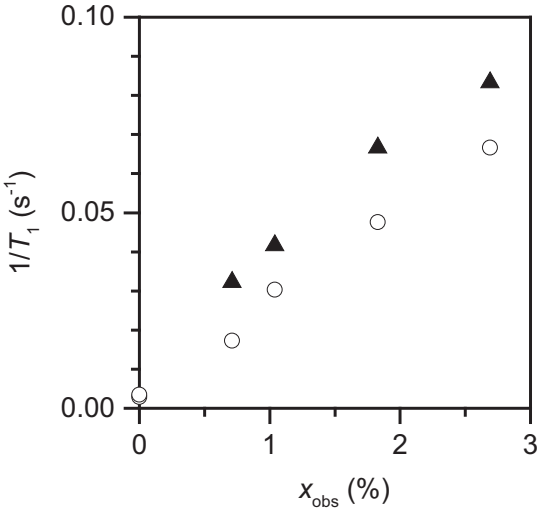


Fig. 3. ^{1}H spin-lattice relaxation rates of the samples spinning at 8 kHz. ○: 13.2 and 11.5 ppm, ▲: 6.7 ppm.

P69

超高速 MAS NMR を用いた石炭の化学構造解析

○金橋康二
新日鐵住金・先端研

Ultra-fast MAS NMR of coal

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

Ultra-fast MAS have been applied to structural analysis of organic species in coal. Higher spinning frequency drastically spectral resolution of ^{1}H and ^{1}H-related (e.g. ^{1}H-^{13}C correlation) NMR spectra because of partially averaging out the ^{1}H-^{1}H dipole interaction. Simple one-dimensional ^{1}H MAS spectra of brown coal shows that a signal assigned to methoxy group are separated from other aliphatic signals. Information on proximity between hydrogen-carbon/hydrogen-hydrogen have also been obtained by using an indirect (^{1}H detection) ^{1}H-^{13}C HETCOR (heteronuclear-correlation) and a DQ (double-quantum) MAS spectroscopy.

はじめに

天然物である石炭の化学構造は非常に複雑であり、未だ未解明な部分も多いものの、近年の分析・解析技術の飛躍的な進展を背景に、様々な化学構造情報が得られつつある。例えば、石炭中の有機質に着目した場合、NMR や IR、ラマン分光等により、石炭の化学構造解析に関して数多くの報告がなされてきた。特に固体 NMR については、^{13}C を観測対象として、芳香族指数や各炭素官能基の定量等の有用な情報が得られている [1)]。

一方、^{1}H については、他の核種に比べて報告例は極めて少ないのが現状である。これは、他の有機物と同様、^{1}H-^{1}H 間の強い双極子相互作用が存在するため、化学構造解析に耐えうるような分解能を持つ固体 NMR スペクトルを得るのが困難なためである。これまでに CRAMPS（Combined Rotation And Multi-pulse Spectroscopy）法 [2)]を用いて石炭の固体 ^{1}H NMR スペクトルが取得された例もあるが [3)]、CRAMPS 特有の問題により広く普及していない。

近年、最高で 110 kHz の試料回転を可能とする固体 NMR プローブが市販されるようになり、固体の有機化合物の ^{1}H や ^{14}N 等に対して、超高速 MAS 法は高感度な構造情報を与えることができつつある [4)]。そこで今回、我々は超高速 MAS 法を用いて、石炭の ^{1}H スペクトルの高分解能化について検証した。また、^{1}H-^{13}C 間および ^{1}H-^{1}H 間の 2 次元相関 NMR 測定を通じて、石炭の化学構造解析を行った結果について報告する。

超高速 MAS、固体 ^{1}H NMR、石炭

○かねはしこうじ

実験

炭素濃度の異なる石炭 5 種類（[C]=66.5～78.8 mass%）を測定サンプルとした。石炭は大気中で 110℃にて事前乾燥を行い、表面に吸着した水分を除去した。

1D ^{1}H MAS スペクトルの測定には、JEOL ECA700（16.4 T）および Agilent INONA500（11.7 T）を用い、試料回転周波数を 10～80 kHz で変化させた。プローブのバックグラウンドシグナルの影響を排除するため、パルスシーケンスはスピンエコーあるいは DEPTH2 を用いた。また、スピンエコーを用いて、各 MAS 周波数における横緩和時間（T_2’）を測定した。

2D ^{1}H DQMAS スペクトルおよび ^{1}H-^{13}C HETCOR スペクトルの測定には、JEOL ECA700 を用いた。試料回転周波数は 70 kHz とした。DQMAS スペクトル測定のパルスシーケンスは、BaBa-xy16 を用いた [5)]。^{1}H-^{13}C 相関 NMR では、^{1}H の磁化を一旦 ^{13}C に移し、その磁化を再度 ^{1}H に移動する（Cross Polarization による磁化移動を 2 回行う）ことによって、^{1}H 観測のスペクトルを取得した。

結果・考察

16.4 T における石炭 E（[C]=66.5 mass%）の 1D ^{1}H MAS スペクトルの MAS 周波数（ν_r）依存性を Fig. 1 に示す。ν_r=20 kHz 程度までは、脂肪族水素と芳香族水素に由来するピークがかろうじて区別できる程度のスペクトル分解能であったが、30 kHz を超えたあたりから、4 ppm 付近に別のピークの存在が明らかとなった。このピークは酸素含有量の多い石炭 E および D（[C]=68.3 mass%）で特徴的に見られ、メトキシ基（-OCH_3）に帰属されると考えられる。また、石炭 E の T_2’測定においても、MAS 周波数の増加にしたがって長くなっていくことが確認され、homogeneous broadening が減少していく様子が確認できた。

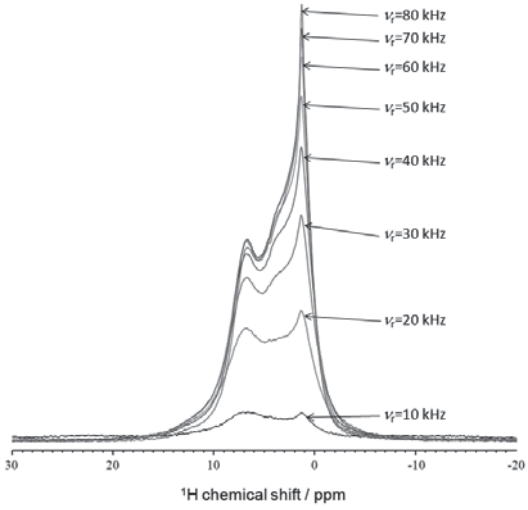


Fig. 1 ^{1}H MAS spectra of coal E at 16.4 T with different MAS rates.

^{1}H MAS スペクトルの 4 ppm 付近のピークは、^{1}H-^{13}C double CP/MAS スペクトルの ^{13}C 次元側の 90 ppm 付近のピークとの間に相関を示していることも、脂肪族炭素-酸素結合に由来する構造の存在を支持している。当日は DQMAS スペクトルの結果も併せて報告する。

文献

1) 例えば Solum, M. S.; Sarofim, A. F.; Pugmire, R. J.; Fletcher, T. H.; Zhang, H.: *Energy & Fuels*, **15**, 961 (2001)
2) 例えば Gerstein, B. C.; Pembleton, R. G.; Wilson, R. P.; Ryan, C. M.: *J. Chem. Phys.*, **66**, 361 (1977)
3) 例えば Jurkiewicz, A.; Bronnimann, C. E.; Maciel, G. E.; *Fuel*, **68**, 872 (1989)
4) 例えば Pandey, M. K.; Nishiyama, Y.: *J. Magn. Reson.*, **258**, 96 (2015)
5) Saalwachter, K.; Lange, F.; Matyjaszewski, K.; Huang, C. –F.; Graf, R.: *J. Magn. Reson.*, **212**, 204 (2011)

P70

クライオMASプローブによる^{43}Ca NMRの研究

○最上祐貴[1]，清水禎[1]，水野敬[2]，竹腰清乃理[3]
[1]国立研究開発法人物質材料研究機構
[2]株式会社 JEOL RESONANCE
[3]京都大学　大学院理学研究科

^{43}Ca NMR by using the cryo-coil MAS probe

○Yuuki Mogami[1], Tadashi Shimizu[1],Takashi Mizuno[2], Kiyonori Takegoshi[3]
[1] *National Institute for Materials Science*
[2] *JEOL RESONANCE Inc*
[3] *Graduate School of science, Kyoto University*

^{43}Ca plays an important role in many systems such as, cements, glasses, minerals, biomaterials and high temperature superconductors. Application of NMR, which is one of the primary spectroscopic probes of the local environment of a nucleus, is difficult for ^{43}Ca because of the low natural abundance (0.135%), low-γ (-1.80×10^{7} rad s^{-1} T^{-1}), and the presence of the quadrupole interaction (spin-7/2). In this work, we show that, by using cryo-coil MAS-NMR probe, the NMR sensitivity is enhanced about four times and demonstrate the ^{43}Ca NMR experiment for some solid samples.

^{43}Ca は生体高分子、無機材料、セメントなど多様な物質の中に存在しており、NMR 測定によって Ca の局所的な磁気環境に関する有意な情報を得ることができる。しかし、^{43}Ca は磁気回転比が小さい、天然存在比が小さい(0.14%)、四極子核である（I=7/2）ため、低信号雑音比が小さく効率の良い測定が難しい。これまで ^{43}Ca NMR は同位体置換(~50%)を行うことや[1,2]、径が 9.5mm[3,4] や 14mm[5] といった大容量ローターを用いることで信号雑音比の問題を克服し測定を行ってきた。しかしこれらの手法にはコストがかかる事や、強いパルスを印加できない、MAS を高速で回せないなどの問題がある。そこで我々は天然存在の 43Ca NMR における低信号雑音比の問題を克服するために、4mm のクライオコイル MAS プローブ試作機を用いた

クライオコイル MAS プローブはコイルなど検出系を極低温まで冷却することで固体高分解能ＮＭＲの感度を従来機より～4 倍向上する装置である[6,7]。このクライオプローブ一式を Fig.1 に示す。これらは冷媒循環系およびプローブから成っており、冷却に液体ヘリウムなどを必要とせず気体ヘリウムを循環することでプローブ内のコイル温度 14K を実現している。そのため液体ヘリウムを用いて冷却した時のようなヘリウムの損失は全くなくランニングコストも抑えられるものとなっている。

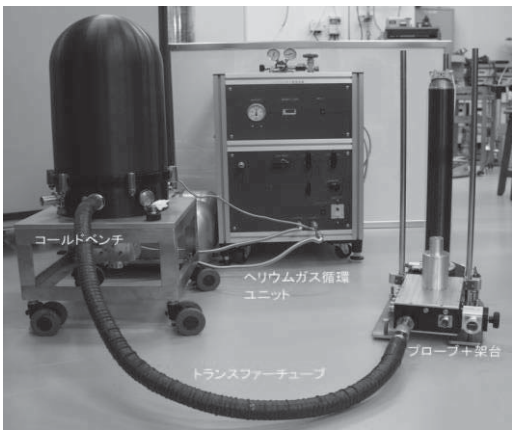


Fig1. The set of cryo-coil MAS probe

クライオコイルMASプローブ、Ca NMR
○もがみゆうき、しみずただし、みずのたかし、たけごしきよのり

Fig.2にいくつかのカルシウムを含有する一般的な試料(炭酸カルシウムの結晶系の一つである(a)カルサイト(三方晶)と(b)アラゴナイト(斜方晶)、(c)CaF_2、(d)CaO)のsingle pulse NMR結果を示す。

14.1Teslaの磁場、ECA-600分光計を用いて実験を行った。すべての実験においてMASの回転速度は16kHzであり、pulse幅は0.8μs(π/8 pulse)である。標準試料として$CaCl_2$溶液を0ppmとした。積算回数はそれぞれ(a)10000回、(b)100回、(c)64回、(d)1000回であり繰り返し時間はそれぞれ(a)10s、(b)5s、(c)100s、(d)10sであった。

クライオコイル MAS プローブを用いることでおよそ 10 分～1 日程度で ^{43}Ca NMR スペクトルを得ることができた。4mm ローターを用いており、また低温下でコイル Q 値が上昇するため比較的強いパルスを照射でき、高速 MAS 下での測定も可能である。
今後、いくつかのカルシウムを含有する一般的な試料について T_1 などを測定する予定である。

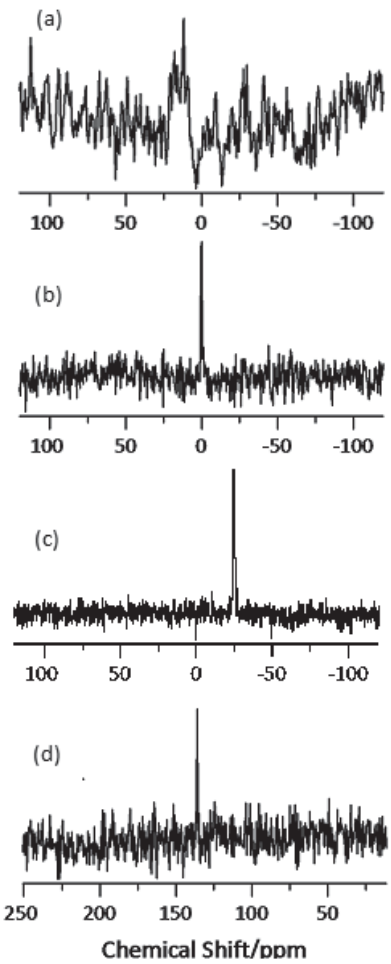


Fig2.The ^{43}Ca NMR spectra of some samples (a)$CaCO_3$ (calcite), (a)$CaCO_3$ (aragonite), (c) CaF_2, (d)CaO

【reference】

1. R.G. Bryant, S. Ganapathy and S. D. Lennedy, *J. Magn, Reson.* 72 (1987) 376.
2. P. Nieto, R.Dron, R. Thouvenot, H. Zanni and F. Vrivot, C.R. Acad. *Sco., Ser. Iia: Sci. Terre Planetes* 320 (1995) 485.
3. Z. Lin and M. E. Smith *Phys. Rev. B* 69 (2004) 224107
4. A. Wong, A. P. Howes, R. Dupree and M. E. Smith *Chem. Phys. Lett* 427 (2006) 201
5. R. Dupree, A.P. Howes, and S.C. Kohn, *Chem. Phys. Lett.* 276 (1997) 399
6. T. Mizuno, K. Hioka, K. Fujioka and K. Takegoshi, *Rev. Sci. Instrum*. 79 (2008) 044706
7. T. Mizuno and K. Takegoshi, *Rev. Sci. Instrum.* 80 (2009) 124702

P71

^{13}C 固体NMRおよび^{2}H溶液緩和NMRによるクモ糸の超収縮機構の解明に関する研究

○田制侑悟[1]，亀谷俊輔[1,2]，朝倉哲郎[1]
[1] 東京農工大学大学院　工学研究科
[2]（株）三井分析センター

Study of super-contraction phenomenon of spider by ^{13}C solid state and ^{2}H solution relaxation NMR

○Yugo Tasei[1], Shunsuke Kametani[1,2] and Tetsuo Asakura[1]
[1] *Department of Biotechnology, Tokyo University of Agriculture and Technology, Koganei, Tokyo, Japan*
[2] *Mitsui Chemical Analysis & Consulting Service, Sodegaura, Chiba, Japan*

Spider dragline silk attracts comprehensive scientific interests because of its unique combination of strength and extensibility that makes it highly tough material. In addition, interaction with water causes spider dragline silk to contract up to 50% in length and swell in diameter, a process known as “super-contraction”. In this study, ^{13}C solid state NMR was used to study the super-contraction phenomena of recombinant spider dragline silk and the synthesized model peptides for the crystalline and non-crystalline regions of spider dragline silk in the hydrated state. In addition, the ^{2}H solution NMR relaxation times, T_1 and T_2 were observed for $^{2}H_2O$ in the presence of the spider silks to study change in the water dynamics by water-silk interaction coupled with an inverse Laplace transform algorithm in the analysis. Several reservoirs were detected in the ^{2}H T_1-T_2 correlation maps which reflect the presence of $^{2}H_2O$ molecules with different water-silk interactions as different relaxation times and different fractions.

クモは捕食のために絹タンパク質の糸を産生し巣を作る。クモの糸の中で、自分がぶら下がる牽引糸は天然で最も強い繊維と言われている。その一次構造は結晶部に相当する Ala 連鎖領域と非晶部に相当する Gly リッチ領域で構成される場合が大部分である。近年、一次構造を制御したリコンビナントクモ糸から高強度・高弾性の繊維を開発する実用化研究が活発に行われている。一方、クモ牽引糸のもう一つの大きな特徴は、水を含むと長さが半分になる“超収縮”と呼ばれる現象である。しかしながら超収縮のメカニズムについては十分に解明されていない。

そこで本研究は、結晶部 Ala 連鎖領域と非晶部 Gly リッチ領域について ^{13}C ラベルモデルペプチドを合成を行い、含水状態で各種 ^{13}C 固体 NMR(CP/MAS, DD/MAS, refocus-INEPT)を測定、含水構造とダイナミクスを検討した。さらにクモ糸と相互作用した水のダイナミクスに関する情報を得るために、クモ糸存在下での重水の ^{2}H 緩和時間測定を行った。同様の NMR 実験をリコンビナントクモ糸についても行った。本稿ではモデルペプチドの場合のみについて述べる。

【実験】アメリカジョロウグモ(*Nephila clavipes*)の牽引糸 MaSp1の一次配列において、Ala連鎖領域とGlyリッチ領域から成る典型的な連鎖のモデルペプチドを合成、選択的に^{13}Cラベルを行った。その際、両端をグルタミン酸連鎖で挟んで親水性を持たせた。以下に示すのが合成したモデルペプチドの一次配列になる。

クモ糸，固体NMR，緩和時間測定

○たせいゆうご，かめたにしゅんすけ、あさくらてつお

試料 1：$(E)_4$GGLGGQ- GAGAA[3-^{13}C]A^{16}AAAGGAGQGGYGG$(E)_4$
試料 2-a：$(E)_4(A)_6$G[2-^{13}C]G^{12}[3-^{13}C]A^{13}[1-^{13}C]G^{14}QGGYGGLGSQGAGRGGLGGQGAG$(A)_6(E)_4$
試料 2-b：$(E)_4(A)_6$GGAGQGGYGGLGSQ[2-^{13}C]G^{25}[3-^{13}C]A^{26}[1-^{13}C]G^{27}RGGLGGQGAG$(A)_6(E)_4$
試料 2-c：$(E)_4(A)_6$GGAGQGGYGGLGSQGAGRGGLGGQ[2-^{13}C]G^{35}[3-^{13}C]A^{36}[1-^{13}C]G$^{37}(A)_6(E)_4$

試料 1 は Gly リッチ領域に挟まれた Ala 連鎖 $(Ala)_6$ の中央部位を一か所 ^{13}C ラベルした 33 量体ペプチド、試料 2 は Ala 連鎖領域に挟まれた Gly リッチ領域を、部位を変えて 3 カ所 ^{13}C ラベルした 3 種類の 47 量体モデルペプチドである。モデルペプチドの NMR 測定は Brucker Avance 400 を用い、含水状態で ^{13}C r-INEPT, ^{13}C CP/MAS および ^{13}C DD/MASNMR スペクトルを得た。

また NMR 管中でペプチドを 12 時間以上重水に浸した試料について、JEOL ECX400 を用い反復回転法と CPMG 法を組み合わせて重水の ^{2}H NMR 緩和測定を行った。測定結果の逆ラプラス変換を行うことによって、重水の ^{2}H T_1-T_2 相関マップを作成した。

【結果と考察】

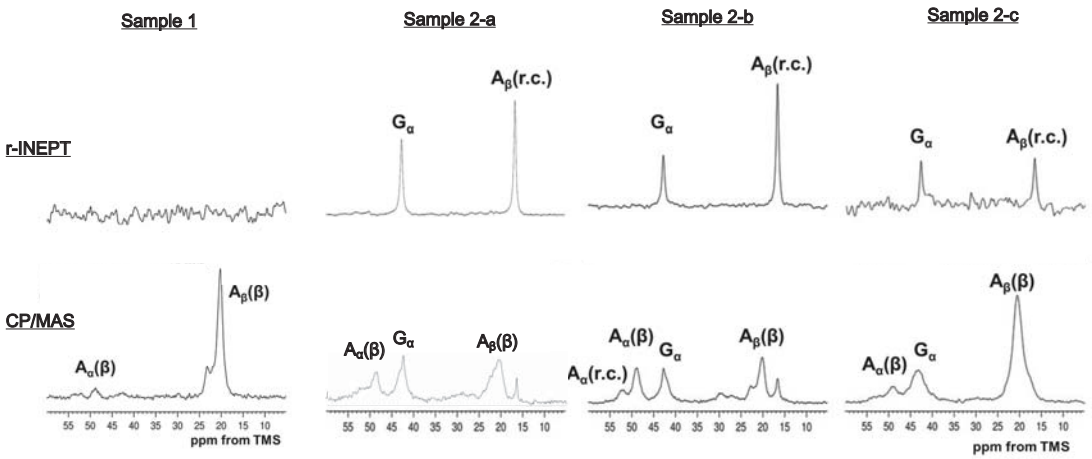


Fig. 1 ^{13}C r-INEPT and CP/MAS NMR spectra of ^{13}C site-specific labeled model peptides of *N. clavipes* dragline MaSp1 sequence (Sample1: $(Ala)_6$ region and Sample 2-a, b, c: Gly rich region).

Fig.1 に ^{13}C r-INEPT および CP/MAS NMR スペクトルを示す。試料 1 では、含水状態でも、CP/MAS でβシート構造を示す 20 ppm(Ala Cβ) のピークが観測されたが、r-INEPT では全く観測されなかった。すなわち、Ala 連鎖域中央部は含水しても運動性は低下したままであった。一方、Gly リッチ領域が部位特異的にラベルされた試料 2 の CP/MAS では、βシート構造に加えランダムコイルのピークが観測された。また r-INEPT では、試料 2-a および 2-b においてシャープな Gly Cα と Ala Cβ ピークが観測され、標識された残基が含水に伴い、選択的に運動性が上昇したことを意味する。一方、試料 2-c では r-INEPT での運動性の上昇は小さいことがわかる。すなわち、Gly リッチ領域は、含水に伴い、Ala 連鎖に近い N 端や中央部では高い運動性を有するが、C 端の場合は、運動性が低いことがわかる。

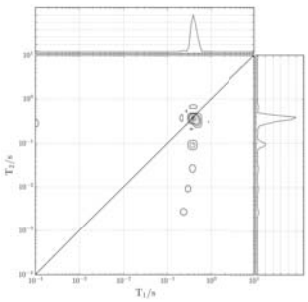


Fig.2 ^{2}H T_1-T_2 correlation map of $^{2}H_2O$-model peptide 2 system

さらに、ペプチドと相互作用した水のダイナミクス挙動について検討した。Fig.2 に試料 2 のペプチドの存在下での重水の ^{2}HT_1-T_2 相関マップを示す。多くの不連続なスポットが観測された。T_1 と T_2 が同じ値を示す対角線上にあるスポットは、NMR 管中でペプチドの周囲で等方運動している自由水を示す。特徴的なことは、T_1 値の分布は狭いが T_2 値の分布は広いことである。この結果は、自由水と交換しているペプチドのサイトが複数個存在することに起因すると考えられる。

＜謝辞＞本研究は一部、平成 26 年度科研費基盤 A（課題番号 26248050）、ならびに ImPACT プロジェクトにより実施された。

P72

プロトン伝導体 PVPA / *x*Im（*x* ≧ 2）における イミダゾールの運動性および局所構造

○成田貴光，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

Mobility and local structure of imidazole in proton conductor, PVPA / *x*Im ($x \geq 2$)

○Takamitsu Narita, Ryutaro Ohashi, Tomonori Ida, Motohiro Mizuno
Graduate School of Natural Science and Technology, Kanazawa University, Ishikawa, Japan.

The composite of proton conducting 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 investigated the mobility and local structure of the imidazole in PVPA / *x*Im ($x \geq 2$) using ^{13}C{^{1}H} CP/MAS spectra and spin-lattice relaxation time (T_1). T_1 (^{1}H) measurements revealed that the imidazole in composite with $x \geq 3$ has two states and the state of x = 4 is nearer the bulk imidazole than x = 3.

【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**）は現在一般的に用いられている高分子電解質とは異なり，プロトンの伝導に水を必要とせず，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]．PVPA / *x*Im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]．これまでの研究から，この複合体のプロトン伝導機構にはイミダゾールの運動が深く関わっていることが示されてきた[3]．しかしながら，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．

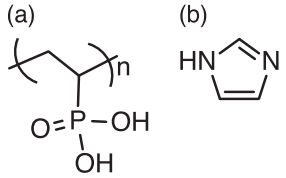


Fig. 1 Structures of poly(vinylphosphnic acid) (a), and imidazole (b).

そこで本研究では，プロトン伝導度がより高い，$x \geqq 2$ の複合体について注目し，^{13}C{^{1}H} CP/MAS スペクトルやスピン―格子緩和時間を用いることにより，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局所構造の変化およびその運動性について調べた．

【実験】

固体 NMR 測定には，PVPA / *x*Im（x = 2, 3, 4）およびバルクのイミダゾールを用いた．分光器は JEOL ECA-300 を用い，静磁場強度 6.928 T（^{1}H：294.988 MHz，^{13}C：74.175 MHz）の下で，^{13}C{^{1}H} CP/MAS スペクトルおよび，飽和回復法による T_1 (^{1}H) の測定を行った．

プロトン伝導，イミダゾール

○なりた たかみつ，おおはし りゅうたろう，いだ とものり，みずの もとひろ

【結果と考察】

Fig. 2 に室温における PVPA / *x*Im（*x* = 2, 3, 4）およびバルクのイミダゾールの $^{13}C\{^1H\}$ CP/MAS スペクトルを示す．*x* = 2, 3, 4 のすべての試料でイミダゾリウムイオンに帰属されるピーク（3, 4）が観測された．*x* ≧ 3 では，*x* = 2 では観測されなかったイミダゾールのピーク（5, 6, 7）が観測され，これらのピークは繰り返し時間を 20 s から 30,000 s に延ばすことにより強度が増大した．この結果は，x ≧ 3 の試料では非常に長い T_1 (^{1}H) をもつイミダゾールが存在することを示しており，イミダゾールは集団を形成しバルクに近い状態になっていることが予想される．

Fig. 3 に室温での，PVPA / *x*Im（*x* = 3, 4）およびイミダゾールの飽和回復法による T_1 (^{1}H) 測定の結果を示す．**Fig. 3** の各回復曲線について，多成分を仮定したフィッティングを行うことにより，すべての試料において，イミダゾールに帰属される成分が 2 つずつあることが分かった．**Table 1** にそれぞれの試料におけるイミダゾールの T_1 (^{1}H) を示す．*x* = 4 とバルクのイミダゾールでは，T_1 (^{1}H) のどちらの成分も同じオーダーにあり，イミダゾールの状態に大きな違いはないと考えられる．

x = 3 では *x* = 4 よりも緩和時間が短くなっており，*x* = 3 では *x* = 4 よりもイミダゾールの運動性が高いことが分かる．これらの違いは，PVPA / *x*Im 内で形成されているイミダゾールの分子集団のサイズと関係していると予想される．

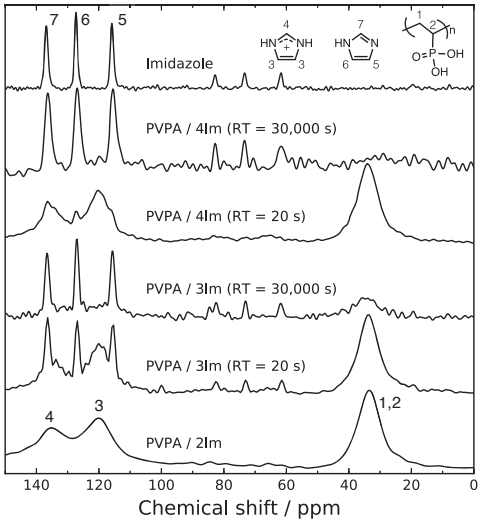


Fig. 2 $^{13}C\{^1H\}$ CP/MAS spectra of PVPA / *x*Im (*x* = 2, 3, 4) and bulk imidazole at room temperature. (RT: repetition time)

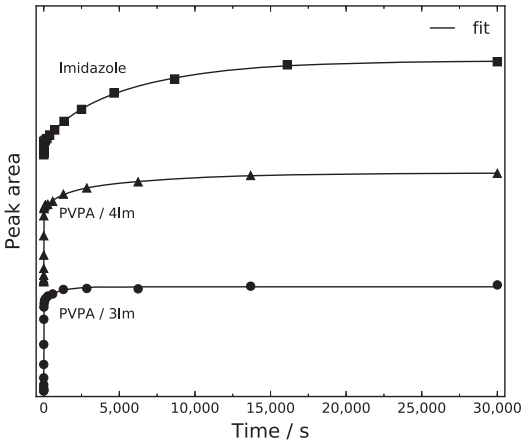


Fig. 3 Recovery curves of PVPA / *x*Im (*x* = 3, 4) and imidazole at room temperature in the saturation recovery experiment for T_1 (^{1}H) measurement.

Table 1 T_1 (^{1}H) of the imidazole.

Sample	$T_{1,short}$ (^{1}H) / s	$T_{1,long}$ (^{1}H) / s
PVPA / 3Im	40	989
PVPA / 4Im	1,171	6,874
Imidazole	1,368	6,175

【参考文献】

[1] F. Sevil, and A. Bozkurt, *J. Phys. Chem. Solids* **2004**, *65*, 1659–1662.

[2] M. Yamada, and I. Honma, *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 5522–5526.

[3] M. Mizuno, A. Iwasaki, T. Umiyama, R. Ohashi, and T. Ida, *Macromolecules* **2014**, *47*, 7469–7476.

P73

固体NMRによるプロトン伝導性ジホスホン酸イミダゾリウム結晶の構造解析

○畝 亮太[1], 不破 寛規[1], 大橋 竜太郎[2], 井田 朋智[2], 水野 元博[2,3]
[1]金沢大学理工学域物質化学類，[2]金沢大学大学院自然科学研究科
[3]金沢大学新学術創成機構

Structural Analysis of Proton Conducting Imidazolium Diphosphonate Crystals Using Solid-State NMR

○Ryota Une[1], Hiroki Fuwa[1], Ryutaro Ohashi[2], Tomonori Ida[2], Motohiro Mizuno[2, 3]
[1] *School of Chemistry, College of Science and Engineering, Kanazawa University*
[2] *Department of Chemistry, Graduate School of Natural Science and Technology, Kanazawa University*
[3] *Institute for Frontier Science Initiative, Kanazawa University*

The development of solid proton-conductive materials using imidazole has attracted considerable attention. Imidazolium salts of dicarboxylic acids are known to show relatively high proton conductivity. Imidazole and dicarboxylic acid are connected by a hydrogen bond and form a two-dimensional network in the crystal of these salts. Proton conductivity is dominated by continuous proton transfer in the hydrogen network between imidazolium ions and the carboxyl group. We have found that imidazolium diphosphonate crystals also exhibit high proton conductivity. In the present work, the local structure and dynamics of imidazolium ions in imidazolium diphosphonate crystals were investigated using solid-state ^{2}H, ^{31}P NMR in order to elucidate the mechanism of proton conduction.

【序】固体のプロトン伝導物質は燃料電池の電解質等への利用が期待され，研究が盛んに行われている。近年，イミダゾールを用いたプロトン伝導体が注目されており，ジカルボン酸とイミダゾールからなる有機結晶においては，比較的高いプロトン伝導度を示すことが報告されている(1)。これらの結晶中では，イミダゾールとジカルボン酸による水素結合ネットワークが形成されており，このネットワークを介してプロトン伝導が起こる。その際，イミダゾールの運動が重要な役割を果たすと考えられている(2,3)。このような，高プロトン伝導性はジホスホン酸とイミダゾールの結晶においても期待できる。そこで本研究では，ジホスホン酸イミダゾリウム結晶のプロトン伝導性を調べた。また，固体^{2}H，^{31}P NMRにより結晶の内部構造と分子運動を解析し，プロトン伝導メカニズムを考察した。

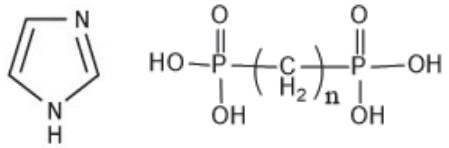


Fig. 1. Imidazole (left) and diphosphonic acid (right). n is the number of carbons in the chain.

【実験】デシルジホスホン酸(DDPA, n = 10)とイミダゾール(Im)をモル比1:2で混合し，加熱融解させることで試料(Im_2DDPA)を調製した。プロトン伝導率の測定には交流インピーダンス法を用いた。固体 ^{2}H，^{31}P NMRの測定にはJEOL ECA-300分光器を用い，共鳴周波数はそれぞれ45.828 MHz，119.413 MHzで行った。^{2}H NMRスペクトルは四極子エコー法で測定した。

固体プロトン伝導体，イミダゾール，^{2}H NMR

○うねりょうた，ふわひろき，おおはしりゅうたろう，いだとものり，みずのもとひろ

【結果と考察】DSCの測定により，Im_2DDPAは昇温時にT_{c1} =258 K, T_{c2} = 282K, T_{c3} = 362Kで固相-固相転移を起こすことがわかった。ここで，それぞれの相を高温側からI，II，III，IV相とする。また，融点は396 Kであった。

Fig. 2にIm_2DDPAのプロトン伝導率（σ）の温度変化を示す。I相ではσは急激に増大し，最大値1.2×10^{-2} Sm^{-1}を示した。

Fig. 3にIm_2DDPAとバルクのDDPAの室温での固体高分解能^{31}P NMRスペクトルを示す。バルクのDDPAでは30.8 ppmに1本のピークが観測されたが，Im_2DDPAでは25.9 ppmと27.3 ppmに2本のピークが観測された。25.9 ppmと27.3 ppmのピークの面積強度比は3：2であった。これらのピークはバルクのDDPAに比べ高磁場側にシフトしており，ImとDDPAのホスホン酸基には水素結合が形成されていることがわかる。

Fig. 4にIm_2DDPAの各相における^2H NMRスペクトルを示す。スペクトルの測定にはImの炭素と結合した水素のみを重水素化した$(Im\text{-}d_3)_2DDPA$を用いた。赤線はImの分子運動を考慮したシミュレーションを表す。スペクトルの線形からIV相ではImは静止状態であることがわかる。I，II，III相では0 kHz付近のシャープなピークとブロードな成分が観測された。シャープなピークは等方回転運動をしているImが存在すること示している。等方回転運動をしているImは，II相では全体の15%程度であったが，I相では温度が高くなるにつれて増大し，393 Kでは35%となった。ブロードな成分の線形からImの運動を解析したところ，I相では面内回転，II相では180°フリップ，III相では静止状態であることがわかった。面内回転の速さは377 Kで4×10^6 s^{-1}, 180°フリップの速さは303 Kで3×10^5 s^{-1}であった。また，面内回転と180°フリップの活性化エネルギーはそれぞれ37 kJ mol^{-1}と46 kJ mol^{-1}と見積もられた。I相での高いプロトン伝導性には，Imの等方回転運動や面内回転運動が大きく関与していると予想される。

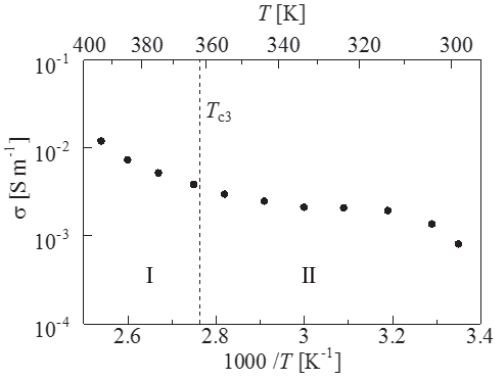


Fig. 2. Temperature dependence of proton conductivity for Im_2DDPA.

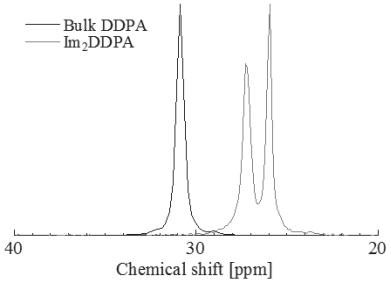


Fig. 3. ^{31}P NMR spectra for Im_2DDPA and bulk DDPA.

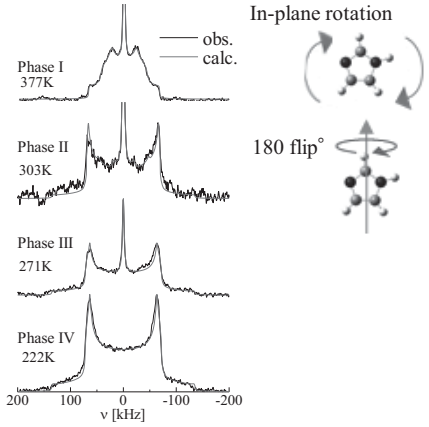


Fig. 4. ^2H NMR spectra for $(Im\text{-}d_3)_2DDPA$.

References

(1) K. Pogorzelec-Glaser *et al.*, *J. Pow. Sou.*, **173**, 800-805 (2007).

(2) T. Umiyama *et al.*, *Chem. Lett.*, **42**, 1323-1325 (2013).

(3) M. Mizuno *et al.*, *Hyperfine Interact.*, **230**, 95–100 (2015).

P74

多孔性配位高分子の空隙に物理吸着させた気体分子のダイナミクス

○田村優実[1]，犬飼宗弘[1]，中村浩一[1]
[1]徳島大学大学院　理工学研究科

Dynamics of gas molecules in porous coordination polymers.

○Masanori Tamura[1], Munehiro Inukai[1], Koichi Nakamura[1]
[1] *Graduate School of Science and Technology, Tokushima University*

Porous coordination polymers (PCPs) constructed from metal ions and organic ligands have been recently expected for functions including gas storage and separation. In addition to new schematic synthesis, fundamental understanding such as the dynamics and the local structure of gas molecules has been essential to improve the amount of the gas storage. In this work, we show high-resolution NMR for CO_2 and D_2 adsorbed into PCPs. To tightly seal gas molecules into the NMR rotor, we fabricated a inner cap with two O-rings. ^{13}C or ^{2}H MAS NMR spectra reflected the interaction of CO_2 or D_2 molecules with the $[Zn(CH_3\text{-}ip)(bpy)]_n$ or $[Ca(C_4O_4)(H_2O)]_n$ .This analyses indicate a slow dynamics of CO_2 or D_2 molecules in PCP, leading to a new design to trap the gas molecules in pores.

［序論］

水素や二酸化炭素の貯蔵・分離技術を確立させることは、環境・エネルギー問題を解決するための重要な課題の一つである。近年、ガスの貯蔵・分離を低エネルギーで可能とする材料として多孔性配位高分子 (PCP:Porous Coordination Polymer) が期待されている。PCPは金属イオンと架橋配位子から成り、その組み合わせ次第で細孔の大きさや形状、化学的性質を精密に設計することができる結晶性の金属錯体である[1-3]。これまでに、PCPが有する巨大な細孔表面積や自由度の高い設計性を活かして、様々なガス分子の優れた吸着・分離能を示すPCPが報告されている[4]。今後、実用化に向けて優れたH_2貯蔵能やCO_2分離能を示すPCPを設計する上で、これまで行われてきた体系的な合成に加えて、細孔内部に取り込まれたガス分子の物性解析が重要である[5]。中性子やX線回折により、吸着させたガス分子の局所構造解析の研究[6-7]は僅かにあるが、詳細なダイナミクスの解明には至っていない。

本研究の目的は、PCPにガス分子を封入させながらMAS NMR測定を可能とするNMRロータを作製し、吸着させたガス分子の局所構造・ダイナミクスに関する新たな知見を得ることである。製作したインナーキャップはO-ringを2つ用いることでロータ内にCO_2、H_2、D_2等のガスを封入可能である。得られたMAS NMRスペクトルやT_1解析を元に、PCP細孔内に吸着したガス分子が特異的に遅い運動性を示すことを明らかにした。

多孔性配位高分子，気体分子

○たむらまさのり，いぬかいむねひろ，なかむらこういち

[ガス封入用の特殊インナーキャップ製作]

市販品のキャップ等を用いて、ロータ内部にファンデルワールス半径が小さい水素分子(2.75 Å)を封入することは困難である。本研究では、特殊インナーキャップを製作し、水素ガスの封入を試みた。図にインナーキャップの写真と模式図を示す。インナーキャップにはO-ringを2つ取り付けることが可能となっている。使用するO-ringは内径4.2 mm×線径0.5 mmのシリコーンゴム ($[Si_2O_2C_5H_{12}]_n$)、インナーキャップ本体の材質には水素を含まないKel-F ($[CF_2\text{-}CFCl]_n$) を用いた。一般的にO-ringの密封性能はつぶし率（O-ring線径に対する圧縮させた量の割合）に依存する。円筒面において、O-ringが破断せずに使用できる最大のつぶし率である25%を実現するインナーキャップを作成した。

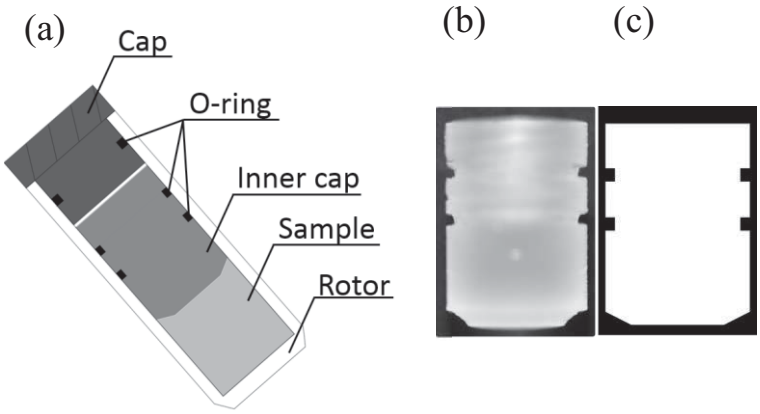


Fig. 1. (a) Home-made inner cap in a rotor, (b) photograph of the inner cap, and (c) schematic illustration of the cap.

[PCPの合成と構造]

CO_2 の吸着材料として、亜鉛イオン、4,4- bipyridine (bpy)、5-methlisophtalic acid (CH_3-ip) から組み上がる一次元シート構造を持つ PCP に注目した。Zinc nitrate hexahydrate と 5-methylisophthalic acid を DMF に溶かした溶液 1 と bipyridine を MeOH に溶かした溶液 2 を混合し、70℃で一晩撹拌加熱し、$[Zn(CH_3\text{-ip})(bpy)]_n$ (以下 CID-Me と呼ぶ) を得た (Fig.2.(a))。CID-Me は、c 軸方向に左右を bpy に挟まれた細孔入口 (1.9×4.5 Å^2) があり (Fig.2.(a)中央)、細孔内部に CO_2 をトラップすることが可能な、6.2×6.8×4.5 Å^3 の CH_3-ip に挟まれた空隙を有している (Fig.2.(a)右)。296 K の等温吸着測定により、100 kPa 下で 8wt%、1 細孔あたり 1.4 個の CO_2 吸着を示した。

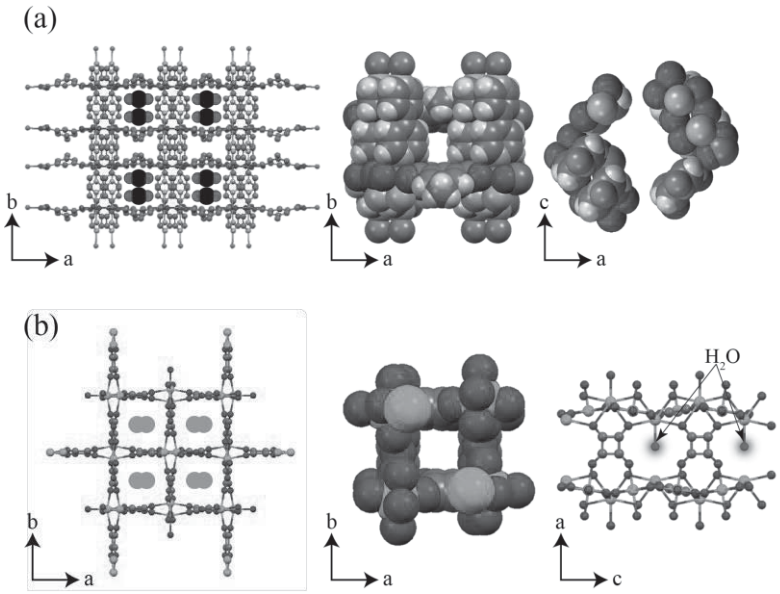


Fig. 2. Crystal structures of (a) CID-Me adsorbed CO_2 and (b) CaSq adsorbed H_2.

一方、H_2 の吸着材料として、カルシウムイオン、squaric acid から組みあがる$[Ca(C_4O_4)(H_2O)]_n$ (以後、CaSq と呼ぶ)[8] に注目した。CaSq は c 軸方向に配位子の squaric acid に囲まれた正方形の 1 次元細孔 (3.4×3.4 Å^2) を有する (Fig.2.(b))。3,4-dihydroxy-3-cyclobutene-1,2-dione と NaOH を水に溶かした溶液 1 と $CaCl_2$ と $C_2H_3NaO_2$,CH_3COOH を水に溶かした溶液 2 を混合し、室温で撹拌させて CaSq を得た。300 K の等温吸着測定により、室温 10 気圧下で 0.1wt%の H_2 吸着を示した。

[NMR 測定条件]

^{13}C MAS-NMR、^{2}H MAS-NMR測定はBruker製AVANCEIII 400を用い、7mmロータで行った。磁場強度9.4 T、回転速度6 kHzで測定した。

CID-Meに吸着させるCO_2は^{13}Cを99% ^{13}CラベルしたCO_2を用いた。一方、H_2は吸着等温線より吸着量が極めて少なく (5μg程度)、O-ringやステーターに起因するバックグランドに埋もれてしまう。そこで^{1}H NMRとケミカルシフトの差がほぼない^{2}H NMRに着目した[9]。99% ^{2}HラベルしたD_2ガスを吸着させ、^{2}H NMR測定を行った。D_2分子の局所構造・ダイナミクスに関する解析により、同じ挙動を示すと考えられるH_2分子の物性を明らかとした。$^{13}CO_2$もしくはD_2雰囲気下に、予めPCPを詰めたロータを置き、ガスを吸着させた。CID-Meの1細孔あたり1.1個のCO_2、CaSqの1細孔あたり0.03個のD_2を吸着させた状態で、インナーキャップを装着した。

[CID-Me 内部に閉じ込めた CO_2 の運動性]

300 Kの^{13}C CP-MAS NMRスペクトルをFig. 3. (a)に示す。CO_2を吸着させたCID-Meのスペクトルにおいて、CO_2に起因する122.2 ppmのピークを確認した。室温での物理吸着にも関わらず、PCP骨格の^{1}HからCO_2の^{13}Cへの磁化移動を示しており、CO_2の固体ライクな遅い運動が予想できる。室温、大気圧下のCO_2のケミカルシフト (125.4 ppm)[10] と比較すると、-3.2 ppm高磁場にシフトしている。分子結晶内でベンゼン環3つに閉じ込められたCO_2のケミカルシフトが-2.1 ppmシフトしている先行研究[10]と比較しても、大きな高磁場シフトである。CO_2は細孔表面のCH_3-ipのベンゼン環によって吸着していると考えられる。

CO_2の運動性をより詳細に調べるために、296–313 Kの温度域で^{13}C T_1測定を行った。得られた緩和時間は強衝突領域に確認でき、τ_0:1.58×10^{-10} s, E_a:12.67 kJ/molと見積もった。他のPCPに化学吸着したCO_2のτ_0が5.0×10^{-12} sであること[11]を考慮しても、得られたτ_0は特異的に長い。CO_2の遅い運動状態は、細孔入口に位置するbpyの運動が寄与していると考えられる。bpy内のピリジン環は回転運動 (k ~ 200 kHz) することが報告されており (図3(c))[12]、その回転により、CID-Meの細孔入口の大きさが1.9×4.5 Å^{2}から5.8×4.5 Å^{2}へと変わることが予想できる。結果、CO_2 (3.3×4.5 Å^2) が空隙内に拡散することが可能になると考えられる。そして一度取り込まれたCO_2分子は、CO_2より遅い運動性を有するbpyが立体障害となり、これがCO_2の遅い運動状態を引き起こしていると予想している。

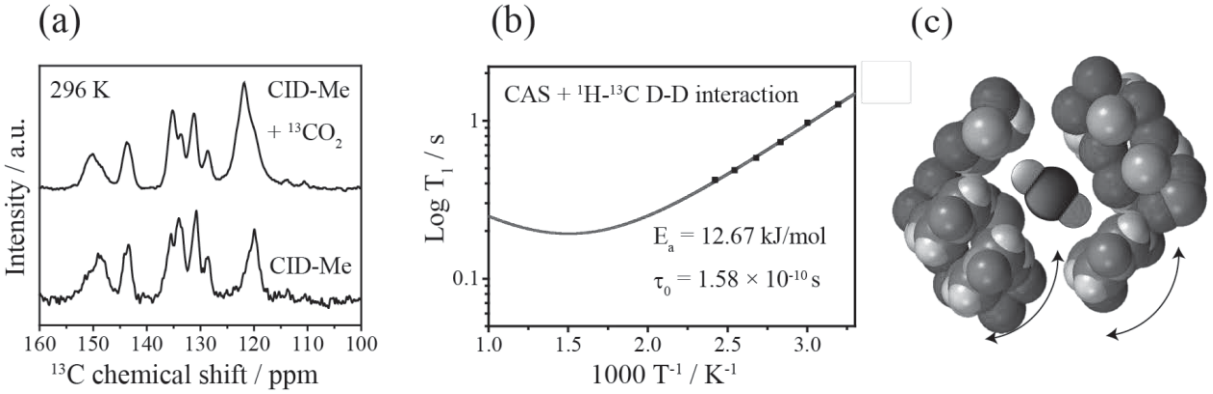


Fig. 3. (a) ^{13}C CP-MAS NMR spectra of $^{13}CO_2$ in CID-Me and (b) ^{13}C T_1 at various temperature. (c) CO_2 influenced from steric hindrance of bpy.

[CaSq に吸着した D_2 の運動性]

5.2 ppm 付近に CaSq 内に吸着させた D_2 分子に起因するピークが確認できた。加えて興味深いことに 100 ppm 付近にスピニングサイドバンドを確認した (Fing.4.(a))。このことから、5.2 ppm にアサイメントできる速い運動状態、及びに四極子相互作用等によりブロード化した遅い状態の D_2 が CaSq の細孔に共存していると予想される。これまでに、細孔表面の H_2O が H_2 の吸着サイトとなり、高い H_2 貯蔵能を実現した報告例がある [13]。このことから、CaSq 細孔内に存在する H_2O (Fig.2.(b)右) が D_2 を強くトラップしていると予想できる。これまでに室温下において D_2 の遅い運動を観測した報告例は無く、PCP 細孔内の H_2O を利用した、新たな吸着機構を示唆している。

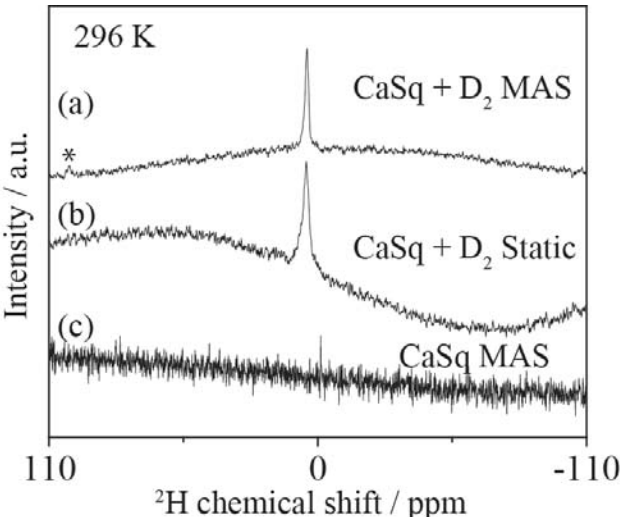


Fig. 4. ^{2}H MAS NMR spectra of D_2 in CaSq (a) with MAS and (b) without MAS. (c) ^{2}H MAS NMR of CaSq.

[まとめ]

本研究では、CO_2 や D_2 をロータ内に封入可能な特殊インナーキャップを製作した。製作したインナーキャップを用いてガス雰囲気下 MAS NMR 測定を行い、PCP 細孔内部に吸着したガス分子のダイナミクスを明らかにした。CID-Me の細孔内に取り込まれた CO_2 分子は、架橋配位子 bpy の立体障害によって非常に遅い運動性を示すことが明らかとなった。加えて、D_2 ガスを吸着させた CaSq の MAS NMR 測定により、遅い運動成分を持つ D_2 が確認できた。CaSq に配位している H_2O と相互作用していることが考えられ、新たな吸着機構を示唆する結果を得た。

[Reference]

(1) S. Kitagawa, R. Kitaura, S. Noro, *Angew. Chem. Int. Ed*., 2004, **43**, 2334.

(2) B. Chen, M. Eddaoudi, S. T. Hyde, M. O'Keeffe, O. M. Yaghi, *Science* 2001, **291**, 1012.

(3) M. P. Suh, H. J. Park, T. K. Prased, D. W. Lim, *Chem. Rev*., 2012, **112**, 782.

(4) G. Ferey, G. C. Serre, *Chem. Soc. Rev*., 2009, **38** 1380.

(5) P. Canepa, N. Nijem, Y. J. Chabal, T. Thonhauser, *Phys. Rev. Lett.,* 2013, **110**, 026102.

(6) H. Wu, W. Zhou, T. Yildirim, *J. Am. Chem. Soc*., 2007, **129**, 5314.

(7) J. Luo, H. Xu, Y. Liu, Y. Zhao, L. L. Daemen, C. Brown, T. V. Timofeeva, S. Ma, H. C. Zhou, *J. Am. Chem. Soc.,* 2008, **130**, 9626.

(8) C. Robl, A. Weiss, *Matter. Res. Bull*., 1987, **22**, 373.

(9) H. H. Mantsch, H. Saito, I. C. P. Smith, *Prog. NMR. Spec.*, 1977, **11**, 211.

(10) P. Sozzani, S. Bracco, A. Comotti, L. Ferretti, R. Simoutti, *Angew. Chem. Int. Ed.,* 2005, **44** 1816.

(11) X. Kong, E. Scott, W. Ding, J. A. Manson, J. R. Long, J. A. Reimer, *J. Am. Chem. Soc.,*2012, **134**, 14341.

(12) M. Inukai, T. Fukushima, Y. Hijikata, N. Ogawa, S. Horike, S. Kitagawa, *J. Am. Chem. Soc.,* 2015, **137**, 12183.

(13) P. Cheng, Y. H. Hu, *J. Phys. Chem. C,* 2014, **118**, 21866.

P75

擬単結晶試料を用いた単結晶NMR法による四極子結合テンソルの解析

○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]，
藤戸輝昭[2]，清水禎[2]
[1]京大・院農
[2]物材機構

Determination of quadrupole coupling tensor by single-crystal NMR measurement using magnetically oriented microcrystal arrays

○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 quadrupole coupling tensor as well as the chemical shift tensor reflects the local electron distribution around the resonance nucleus under consideration. Single-crystal NMR measurement is used to determine these tensors. However, large single crystals are required for this measurement. To overcome this limitation, we have proposed a 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. We reported previously the determination of chemical shift tensors for dipole nuclei by using MOMAs. In this study, we prepared MOMAs of Rochelle salt and determined the ^{23}Na quadrupole coupling tensor.

序論

四極子結合テンソルは観測核周りの電荷分布を反映するため，化学シフト異方性 (CSA) と同様に結晶中での局所構造を解析するのに用いられる．単結晶法は主軸の方向を含め四極子結合テンソルやCSAを完全に決定できる有用な方法である．しかし単結晶法を利用するには数 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．これを克服するため，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て得られる擬単結晶 (MOMA) を単結晶NMR法により測定することを提案している．これまでにMOMAを用いて^{13}Cや^{31}PのCSAを決定することに成功している[1-3]．しかし今まで対象にしていた測定核は双極子核（I=1/2）に限られており，NMR測定が可能な核の内 75 %を占める四極子核（I>1/2）に対しては検討していなかった．そこで本研究では本手法のさらなる応用を目指し，ロッシェル塩をモデル物質として^{23}Na 核（I=3/2）の四極子結合テンソルの決定を試みた．

実験

ロッシェル塩微結晶を紫外線硬化樹脂中に分散させ, 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，変調回転磁場(ω_s=20 rpm, ω_f=30 rpm, α=90º)を180分間印加した．その後，UVを30分間照射

四極子結合テンソル，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

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った．その結果，円柱軸と磁化軸 χ_1，χ_2, 又は χ_3 が平行に配向した，異なる3つのMOMAを作製した(Fig.1)．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．MOMAの^{23}Na固体NMRスペクトル測定にはゴニオプローブを設備した日本電子 (株) 製 JNM-ECA 500を使用した．MOMAの長軸を回転軸として，回転角ψ =0～180°まで5°毎に回転させながら測定を行い，各々のψに対して ^{23}Na 固体NMRスペクトルを集積した．

結果

得られたロッシェル塩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8° 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 ^{23}Na NMRスペクトルの一部をFig.3 に示す．得られたスペクトルから中央遷移に由来するピークを帰属し，ズレ角を補正して角度ψ vs 化学シフト値のグラフを作成した(Fig.4)．その後，以下の理論式$\delta_{lab}(\psi)$を用いて最小二乗法でフィッテイングを行った．

$$\delta_{lab}(\psi)=n_i + p_i\cos 2\psi + r_i\sin 2\psi + u_i\cos 4\psi + v_i\sin 4\psi$$

その結果，精度の高いフィッテイングを行うことができ，単結晶を測定試料とした場合とほぼ同じ形の曲線を得ることができた．このことから四極子結合テンソルについてもMOMAを用いれば，粉末微結晶からでも単結晶と同等の解析が行うことが可能だとわかった．今後はフィッテイングによって得られた結果に数値解析を行い，四極子結合テンソルを決定する予定である．

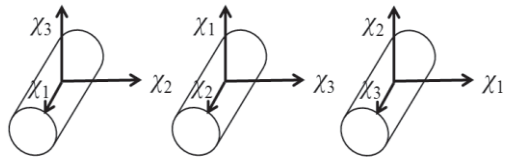


Fig.1 Magnetic axes χ_1, χ_2, and χ_3 of three MOMAs prepared for single crystal NMR measurements.

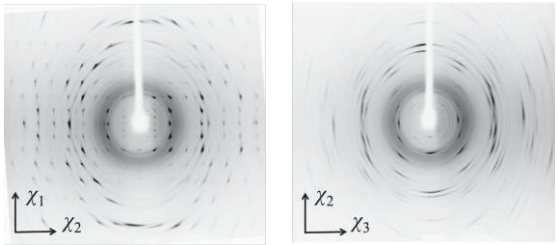


Fig.2 X-ray diffraction patterns of MOMAs of Rochelle salt.

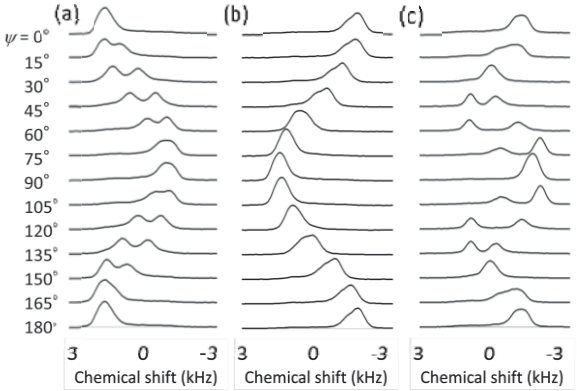


Fig.3 ^{23}Na NMR spectra of Rochelle salt measured for various rotation angles ψs about (a) χ_1, (b) χ_2, and (c) χ_3 axis.

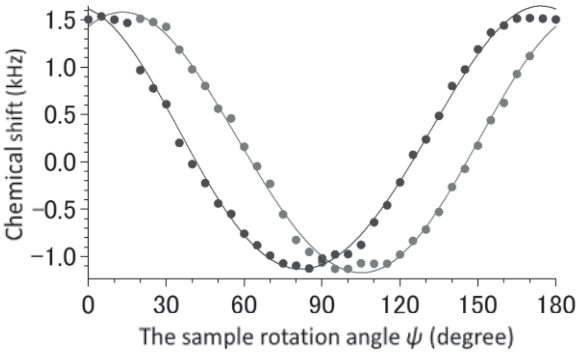


Fig.4 Chemical shifts plotted against the sample rotation angle ψ about the χ_1 axis.

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

P76

結晶多形を示すシンジオタクチックポリスチレンの固体NMR法を用いた結晶構造解析

○伊藤美翔[1]，吉水広明[1]
[1]名古屋工業大学大学院　工学研究科

Crystal structure analysis of syndiotactic polystyrene showing a crystal polymorphism by solid-state NMR method

○Mika Ito[1], Hiroaki Yoshimizu[1]
[1] *Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology*

Syndiotactic polystyrene show polymorphism, some are those applications as separation membranes is expected. The α and δ form crystals of sPS are consisted by the chains in TT and TTGG conformations, respectively. In this study, to analyze the crystal structures as the first step in order to know its separation properties, we evaluated the molecular mobility of benzene rings in the α, δ, and amorphous phases by solid-state ^{13}C CP/MAS NMR. The sPS samples were prepared according to conventional methods. ^{13}C CP/MAS NMR spectra were recorded at 15kHz by a JEOL JNM ECA600 NMR spectrometer. The ^{13}C spin-lattice relaxation time (T_1^C) was determined by Torchia's method. The results of T_1^C measurements were summarized in Table 1.　As a result, it was suggested that three things. The first is that mobility of the benzene ring is in the order of α form < amorphous < δ form. The second is that mobility of the benzene ring of amorphous became bigger with increasing temperature. The third is that mobility of the benzene ring of δ form does not depend on the temperature.

＜緒言＞

シンジオタクチックポリスチレン(sPS)のα結晶はTTコンホメーションをとる3本のsPS主鎖がトリプレット束を形成し、それが六方晶に配列しており、主鎖を取り囲むように外側を向いたベンゼン環がパッキングを阻害して、その鎖間隙に分子鎖方向、即ちc軸方向に延びる「キャピラリー状空孔」を形成する。sPSのδ結晶はTTGGコンホメーションをとるsPS主鎖間に特定の有機低分子をゲスト分子として包接した結晶構造をしており、このδ結晶のゲスト分子を二段階抽出法により脱離させると、コンホメーションおよび主鎖間距離を維持したままゲスト分子のサイズおよび形状を反映した微細孔「分子キャビティー」を有するメゾフェイズ結晶が得られる。α結晶におけるキャピラリー状空孔、メゾフェイズ結晶における分子キャビティーの存在により両結晶はアモルファスsPSよりも密度が低いという特性を持ち、なおかつ結晶であるためこれらの空孔はサイズ分布がないと考えられる。このキャピラリー状空孔および分子キャビティーの利用により優れた分離機能膜の実現が期待できる。本研究ではsPS膜の分離特性を知る第一歩として結晶構造を解析するため、α結晶、δ結晶含有膜およびアモルファス膜の固体^{13}C NMRでCP/MAS測定、緩和時間（T_1^C）測定を行いsPS中のベンゼン環の分子運動性を評価した。

＜実験＞

アモルファス膜はsPSペレット（出光興産（株）提供；rr=99.9%、Mw=200,000、Mw/Mn=2.00）を280℃以上の溶融状態でプレスし、氷水により急冷して調製した。α結晶含有膜はアモルファス膜と同様にsPSペレットを溶融した後、室温まで徐冷して調製した。δ結晶含有膜はアモルフ

シンジオタクチックポリスチレン，固体NMR，分子運動性

○いとうみか，よしみずひろあき

ァス膜をクロロホルムに24時間浸漬し調製した。調製したサンプルの主鎖コンホメーションと結晶構造の確認はFT-IR測定およびX線回折測定から行った。固体NMR測定はJEOL RESONANCE社製 ECA600Ⅱで行い、3.2mmローターを用いMAS速度を15kHzとした。緩和時間T_1^Cは室温～90℃での値をTorchia測定により得た。^{13}Cの緩和時間T_1^Cは局所分子運動を検討するのによく用いられ、Torchia測定はCP法を用いることで通常の方法に比べて短い時間での測定が可能となったものである。

＜結果・考察＞

FT-IR測定およびX線回折測定から各サンプルの構造を確認した。その各サンプルにおいて22（室温）、70、90℃でTorchia測定を行い、得られたT_1^Cの値をTable1にまとめた。まずアモルファス膜を見ると、どの炭素も温度上昇とともにT_1^Cの値が短くなっており、運動性が増加していることがわかる。これはアモルファスのガラス転移温度が120℃付近であることから、ゴム状態に近づくことにより運動性が大きく増加したと考えられる。次にα結晶含有膜を見ると、CP/MAS測定で得られたスペクトルFigure1を見てわかるように、α結晶含有膜においては40ppm付近に見られるdのピークが2本（d_1、d_2）に分裂しているため、T_1^Cの値が2つ得られた。これらの2つのT_1^Cの値は大きく異なっており、これはサンプルがα結晶100%ではなく非晶部を含むことが原因で、値が大きいほうd_1が結晶中、小さいほうd_2が非晶中によるものと考えられる。そして、d_2を除いたすべての炭素が同一温度においてアモルファス膜よりT_1^Cの値が大きく、運動性が低いことがわかる。これは、凝集結晶中にあるため運動が制限されていると考えられる。最後にδ結晶含有膜を見ると、こちらは同一温度においてアモルファス膜よりT_1^Cの値が小さく、運動性が高いことがわかる。これは、ゲスト分子としてクロロホルムを含むため空間的に余裕があり、運動性が高いと考えられる。また、温度を上げても炭素b、dのT_1^Cの値はあまり変化せず運動性が変わらない一方、炭素cのT_1^Cの値は減少し、運動性が高くなっていることがわかる。これはsPSがクロロホルムと共結晶の形態をとるため、クロロホルムを取り囲んでいる炭素b、dの運動性は変化せず、炭素cの運動性は減少したと考えられる。よって今回T_1^Cの値からsPS中のベンゼン環の分子運動性評価を行った結果、「運動性はα結晶、アモルファス、δ結晶の順に大きい」、「アモルファスの運動性は温度上昇とともに増加」、「δ結晶の運動性はあまり温度に依存しない」以上のことが示唆された。今後、緩和時間T_1^Hの測定、δ結晶中のゲスト分子の運動性評価などを行っていき、sPSの分離特性の解明につなげていきたい。

Table 1 ^{13}C spin-lattice relaxation time, T_1^C of amorphous, α and δ form

Temperature(℃)	T_1^C(s)									
	amorphous			α				δ		
	b	c	d	b	c	d_1	d_2	b	c	d
22	50	39	60	62	75	94	34	33	41	38
70	43	39	40	62	41	99	45	30	39	38
90	18	24	27	48	50	62	44	32	27	40

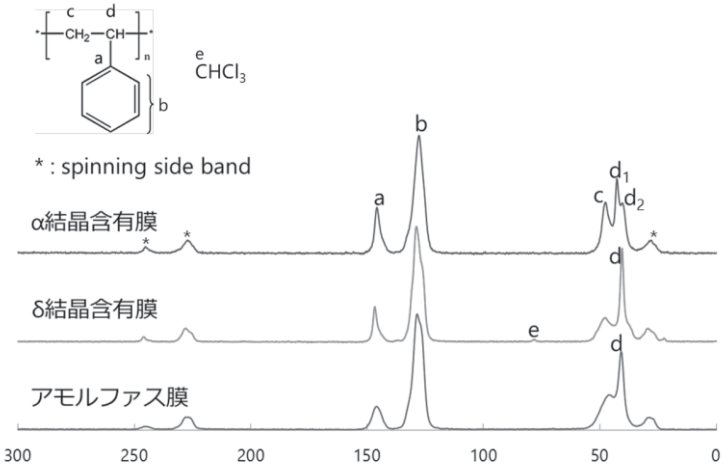


Figure 1 ^{13}C CP/MAS NMR spectra of sPS amorphous, α and δ form.

P77

NMR 法による種々の高次構造を形成する液晶性ポリエステルの気体輸送特性評価

○石神 稜大，吉水 広明
名工大院・工

A Gas Transport Properties of liquid crystalline polyester to form various conformation by NMR method

○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。

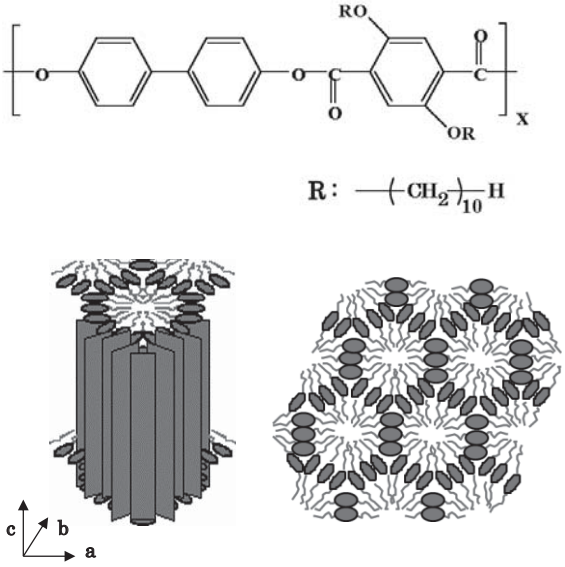


Fig. 1 Schematic illustrations of the chemical and honeycombed structures of PBpT-O10.

液晶性ポリエステル，　磁場配向，　気体拡散性

○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(Table 1)，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。これらの結果から、レイヤー構造を示すB-C14よりハニカム構造を示すPBpT-O10の方が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。

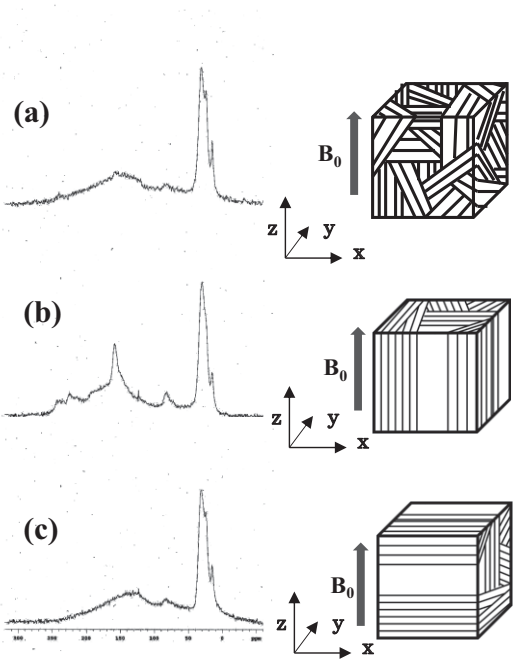


Fig. 2 ^{13}C CP/Static NMR spectra of PBpT-O10 at 22 ℃: (a) randomly oriented (b) z axis is parallel to B_0 (c) z axis is

Table 1 Self-diffusion coefficients of the methane in liquid-crystalline polyesters at 25°C

	$D_{self} \times 10^7$ (cm^2/sec.)	
	B-C14	PBpT-O10
random	4.62	134
parallel	4.28	156
perpendicular	3.61	58

P78

^{31}P 固体 NMR による抗菌ペプチドボンビニン H2 および H4 の細菌模倣膜に対する作用の解析

○金田志穂[1]，北橋由貴[1]，内藤晶[1]，川村出[1]
[1]横浜国立大学大学院　工学府

Analysis of membrane interaction of antimicrobial peptide bombinin H2 and H4 on bacterial mimetic membrane by ^{31}P solid-state NMR

○Shiho Kaneda[1], Yuki Kitahashi[1], Akira Naito[1], Izuru Kawamura[1]
[1] *Graduate School of Engineering, Yokohama National University*

Bombinin H2 and its diastereomer H4 are antimicrobial peptides from frog skin secretions of the *Bombina variegata.* In this study, we used two kinds of negative charged mimetic membranes like *Leishmania* protozoa (DOPC/DOPE/DOPI/DOPS/ergosterol) and *Staphylococcus aureus* (DMPG/DMPC/cardiolipin) to investigate the interaction with the peptide. ^{31}P solid-state NMR spectra of *Leishmania* model membrane (peptide:lipid=1:20) showed clearly an isotropic signal at 0.0 ppm deduced from strong membrane disruption by bombinin peptides. Meanwhile, in the *S. aureus* model (peptide:lipid=1:20), the isotropic signal did not appear in spite of similar negative charged membrane, although changes in the lipid motion were observed. It is indicated that bombinin H2 and H4 specifically interact with membrane of *Leishmania* protozoa, respectively.

[緒言]ボンビニンH2およびH4はキバラスズガエルの皮膚分泌物に含まれるカチオン性の抗菌性ペプチドであり、イソメラーゼによる翻訳後修飾を受けて、ボンビニンH2の2残基目のL-イソロイシンがD体のアロ-イソロイシンに置換されることでボンビニンH4が産生される[1]。

Bombinin H2: I-(L-Ile)-GPVLGLVGSALGGLLKKI-NH_2

Bombinin H4: I-(D-allo-Ile)-GPVLGLVGSALGGLLKKI-NH_2

世界保健機関WHO指定の深刻な感染症のひとつであるリーシュマニア症の原因となるリーシュマニア原虫をはじめとして、幅広く抗菌性を示し、ほとんどのケースでH2よりもH4が強い活性を示すことが報告され、特にリーシュマニア症の治療薬として期待されている[1]。しかしながら、これらのペプチドがなぜ抗菌活性を示すのか、また、たった1アミノ酸残基の立体異性の違いによってなぜ活性が変化するのか、その理由は解明されていない。本研究では、^{31}P固体NMRを用いて、カルジオリピンを含む黄色ブドウ球菌を模倣した膜、およびエルゴステロールを含む5種類の成分で構成されるリーシュマニア原虫に模倣した膜に対するペプチドの作用の違いを明らかにする。

[方法] ボンビニンH2およびH4はペプチド合成機(Biotage Initiator+ Alstra)を用いて固相法により合成し、得られたペプチドを黄色ブドウ球菌模倣膜およびリーシュマニア原虫模倣膜に再構成した。黄色ブドウ球菌模倣膜は細胞膜組成を模倣したDMPG:DMPC:カルジオリピン=12:5:1のモル比で調製した。リーシュマニア原虫模倣膜はDOPC:DOPE:DOPI:DOPS:ergosterol=4:4:2:1:6のモル比で調製し、ペプチドと脂質の比率を変化させて、^{31}P固体NMR測定を行った。NMR測定はBruker Avance Ⅲ600 固体NMR分光器で4 mmの二重共鳴プローブを用い、プロトンデカップリング条件で^{31}P staticおよびMAS NMR実験を行った。MAS周波数は8 kHz、測定温度は主に40℃に設定した。

---

^{31}P固体NMR，抗菌ペプチド
○かねだしほ，きたはしゆき，ないとうあきら，かわむらいずる

[結果と考察]^{31}P固体NMR測定(温度40℃、static)の結果、黄色ブドウ球菌模倣膜にペプチドを加えることによって^{31}P化学シフト異方性(CSA)が減少した(Fig. 1)。これは脂質分子の軸回転運動に加えて、振動運動が混ざったことによるものである。このように、ボンビニンは黄色ブドウ球菌模倣膜の脂質分子間の相互作用を乱すように作用することが分かった。また、MASスペクトルの線幅が大きく広がったことから、ペプチドが脂質分子のリン酸基部分と強く相互作用していることが示唆された。それらの程度から黄色ブドウ球菌模倣膜を乱す作用の強さはH2>H4と決定した。これはMangoniらによる抗菌試験の結果と一致している[2]。

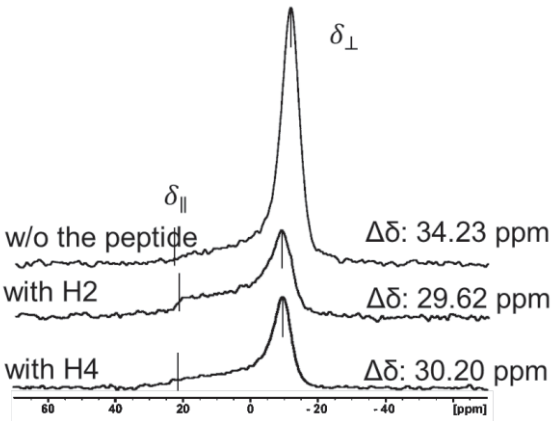


Fig. 1　^{31}P static NMR spectra of *S. aureus* mimetic membrane at 40℃.

それに対し、リーシュマニア原虫模倣膜ではペプチド：模倣膜=1:20の場合、ペプチド添加によって、0 ppm付近にシャープな信号が観測された(Fig. 2)。これは、ボンビニンH2およびH4がリーシュマニア原虫模倣膜に対して極めて特異的に作用し、細胞膜をミセル様に膜分断していることを示している。また、ペプチド：模倣膜の割合を1:100、1:200とペプチド濃度を薄めた場合では、膜分断由来のピークとパウダーパターンが混ざって観測された。これより、ペプチドの膜分断能には濃度依存性があることが明らかになった。

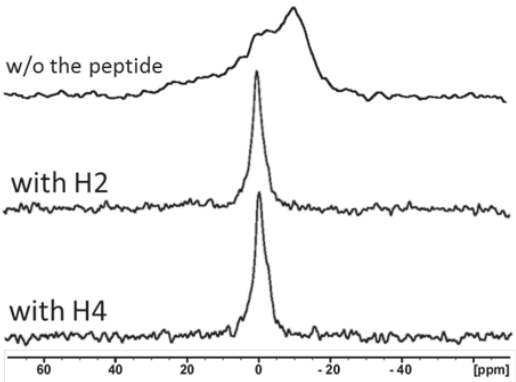


Fig. 2　^{31}P static NMR spectra of *Leishmania* model membrane at 40℃.

さらに、主成分であるエルゴステロールを含まないリーシュマニア原虫模倣膜を調製し、ペプチド:模倣膜=1:20で加えた場合、エルゴステロール有りの場合に比べて、膜分断ピークの割合は55%以下に減少した(Fig. 3)。また、ボンビニンH4ではH2に比べて膜分断を示す信号がさらに弱いことが明らかになった。これは、膜分断を引き起こす場合にエルゴステロールとペプチドの相互作用が必要であり、H4がリーシュマニア原虫模倣膜中でエルゴステロールに対して特異的に相互作用していることを示している。

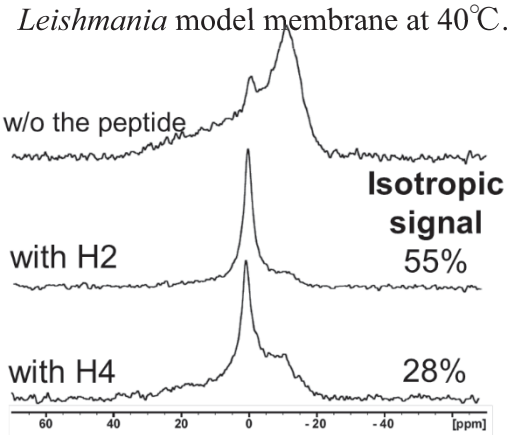


Fig. 3　^{31}P static NMR spectra of *Leishmania* model w/o ergosterol at 40℃.

[結論]ボンビニンH2とH4は黄色ブドウ球菌模倣膜を乱すように作用することが分かった。それに対してリーシュマニア原虫模倣膜に対しては特異的に作用して膜分断を引き起こすが、その中でも2残基目にD-allo-IleをもつH4はエルゴステロールと特に選択的な相互作用をしていることが明らかとなった。

References

[1] M. L. Mangoni, *Current Protein and Peptide Science*, 13, 734-743 (2013).

[2] C. Coccia et al., *Eur. Biophys. J.*, 40, 577-588 (2011).

P79

1.5T/280mm水平開口型超伝導磁石のための小動物用勾配磁場コイルの開発と応用

〇矢野順也，小林優太，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

Development and application of an insertable gradient coil for a 1.5T/280mm horizontal bore superconducting magnet

〇Junya Yano，Yuta Kobayashi，Yasuhiko Terada，Katsumi Kose
Graduation School of Pure and Applied Sciences, University of Tsukuba

Currently, a 220mm large-bore gradient coil is installed for a 1.5T/280mm horizontal bore superconducting magnet in our laboratory. However, the gradient efficiency and the switching speed of the gradient coil are not sufficient for small animal imaging, especially with fast imaging methods. We solved this problem making a smaller gradient coil. This was because current efficiencies of the gradient coil elements were inversely proportional to square of the coil diameter, and the inductance which limited the rise time of gradient coil, is also inversely proportional to the diameter. Additionally, eddy currents also drastically decay when the distance between the gradient coil and metallic materials that comprise the cryostat of the magnet becomes larger. In this research, we designed and manufactured an about half-size gradient coil of the original one for small animal imaging.

1. 勾配磁場コイルの設計

勾配磁場均一領域を直径 60mm 球とし，target field 法を用いて設計を行った[1]．今回設計に用いたパラメータを以下の Table 1 に示す．

Table 1.1: 勾配磁場コイルの設計値

	Gx コイル	Gy コイル	Gz コイル
円筒直径[mm]	96	99.2	102.4
高さ[mm]	220	220	250
導線径[mm]	0.8	0.8	0.8
巻き数	48	48	40
勾配磁場効率[mT/m/A]	4.99	4.86	5.25
非線形性[%] (ROI:60[mm]DSV)	8.37	9.07	6.54

2. 勾配磁場コイルの製作

製作した勾配磁場コイルを Fig.2 に示す．Gx，Gy，Gz の各勾配磁場コイルエレメントは，透明フィルムに印刷した平面コイルパターンの上に両面テープを貼り，その上に直径 0.8mm のポリウレタン被覆銅線を粘着させて巻くことにより製作した．それらを，外径 95mm，内径 87mm，長さ 1m のアクリルパイプ上に，内側から Gx，Gy，Gz の順に固定して完成させた．それぞれの電気抵抗は，0.979 Ω，0.977 Ω，0.965 Ω，インダクタンスは，155 μH，158 μH，218 μH であった．

勾配磁場コイル，超電導磁石MRIシステム，小動物イメージング

〇やのじゅんや，こばやしゆうた，てらだやすひこ，こせかつみ

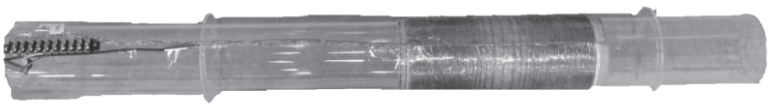


Fig.2 : 本研究で製作した勾配磁場コイル

今回製作したコイルを測定した結果得られたパラメータを以下の Table 2 に示す.

Table 2: 勾配磁場コイルの測定パラメータ

	Gx コイル	Gy コイル	Gz コイル
勾配磁場効率[mT/m/A]	4.48	4.73	4.95
最大非線形性[%] (60[mm]DSV 領域内)	10.40	12.19	5.82

3. 装置

Fig. 3(a) に 1.5T/280mm 永久磁石 MRI システムの全体像 (永久磁石+ MRI コンソール), Fig.3(b) に今回測定に使用した 60mm 径バードケージ RF プローブを示す. さらに, 静磁場均一性を向上させるため, Fig.3(c)に示す 2 次シムコイルの設計・実装を行った[2].

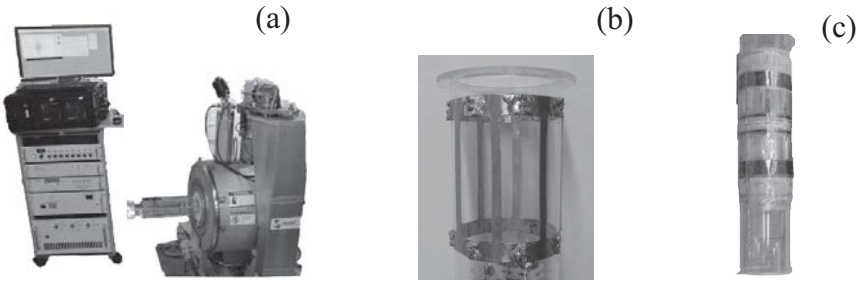


Fig. 3: (a) 本計測で用いた MRI システム, (b) 計測に用いた 60mm 径プローブ, (c) 2 次シムコイル

4. 実験・結果

これらの装置を用いて, 化学固定マウス(Fig.4)の撮像実験を行った. その結果を Fig.5 に示す. 測定パラメータは 3D spin-echo(TR/TE = 800ms/12ms, matrix size= 256×64×512)であり, 結果は中央部連続 2 枚の画像を示す.

Fig. 4: 化学固定マウス

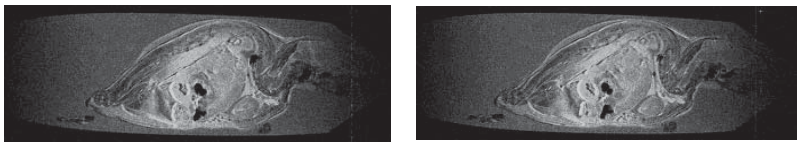


Fig.5 マウス撮像結果

5. 結論

本研究では1.5T/280mm超伝導磁石のための挿入型勾配磁場コイルの製作しその評価・小動物撮像を行った. その結果, 評価領域内での線形性確保, 渦電流磁場の影響が十分に小さいことを確認し, マウス撮像を行う上で十分な性能を備えていることを確認した. 今後は本コイルを用いた小動物の撮像, 高速T1マッピングに応用する予定である.

References

[1] Turner R. A target field approach to optimal coil design. J. Phys. 1986; D19: L147-151

[2] Roméo F, Hoult DI, Magnetic field profiling: analysis and correcting coil design, Magn Reson Med 1984; 1:44-65

P80

楕円筒型勾配磁場コイルの開発と小児骨年齢計測への応用

○松澤晃樹[1]，阿部充志[2]，巨瀬勝美[1]，寺田康彦[1]
[1]筑波大学数理物質科学研究科 電子・物理工学専攻
[2](株)日立製作所 研究開発グループ CTI-Energy

Development of an oval gradient coil set for child bone age measurements

○Koki Matsuzawa[1], Mitsushi Abe[2], Katsumi Kose[1], Yasuhiko Terada[1]
[1] *Department Institute of Applied Physics, University of Tsukuba, Tsukuba, Japan*
[2] *Applied Energy Systems Research Department Center for Technology Innovation, Hitachi, Ltd., Hitachi, Japan*

Gradient coil is a primary component of an MRI system. It generates linear magnetic field gradients in the region of interest. Until now, open MRI systems have used bi-planar type gradient coils. However, the target region of the magnetic field gradients is usually a sphere or an ellipsoid. Therefore, in point of a current efficiency, we think some curved shape is more desirable. In this study, we developed an oval gradient coil by using the singular value decomposition method, and evaluated its performance. The wire pattern output from the calculation program was sufficiently simple to be manufactured. Its current efficiency was very high and succeeded in acquiring MR images of a human hand. In conclusion, we found an oval shape is more advantageous for a gradient coil in open MRI.

勾配磁場コイル(gradient coil)は，MRIの主要なコンポーネントの一つである．これは撮像空間内に線形な磁場分布を発生させる役割をもち，開放型MRIにおいては長らく円形平板型が用いられてきた．その理由としては磁石空間を消費しないこと，巻線パターンの計算が簡単であることなどが挙げられる．しかし，ターゲット領域として勾配磁場を均一化する領域は通常球または楕円体を設定するため，電流効率の面ではこの形状は不利である．曲率を持ち，ターゲット領域との距離が平均的に近くなる電流面形状の方が勾配磁場コイルとして有利であると予想される．そこで，本研究では小児骨年齢計測用MRIシステムを対象にし，楕円筒型の勾配磁場コイルを設計・製作してその性能の評価を行った．

ターゲット領域として100 mm x 100 mm x 50 mmの径をもつ楕円体を設定し，電流面として長径158 mm，短径108 mm，奥行き220 mmの楕円筒を定義した．この計算体系に対し特異値分解法[1,2]による計算を行い，コイルの巻線パターンを出力して勾配磁場コイルを製作した．次に，製作した勾配磁場コイルに対し勾配磁場電流効率測定，非線形性測定の2つを行い性能を評価した．最後に，3D勾配エコーシーケンスを用いて23歳健常男性の手根骨を撮像した．このときの撮像パラメータは，TR = 40 ms，TE = 10 ms，DW = 10 us，FOV = 250 mm x 100 mm x 50 mm，Matrix = 1024 x 128 x 32，NEX = 4とした．

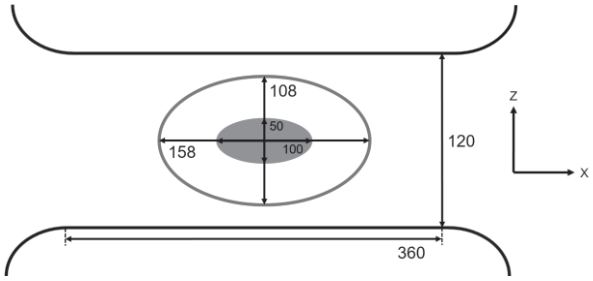


Fig. 1. Geometry of the gradient coil design

勾配磁場コイル，特異値分解法，小児骨年齢計測

○まつざわこうき，あべみつし，こせかつみ，てらだやすひこ

Fig. 2は特異値分解法を用いて計算したコイルの巻線パターンである．このパターンに沿って銅線を楕円周曲面上に巻きつけ，Fig. 3のような勾配磁場コイルを作成した．勾配磁場電流効率の測定結果はGX: 0.740 G/cm/A，GY: 0.422 G/cm/A，GZ: 0.670 G/cm/A となり，GX方向においては既存の円形平板型の3倍以上に向上した．非線形性の測定結果は65mm x 65mm x 24 mmの領域でGX: 12.0 %，GY: 13.6 %，GZ: 10.2 %となり，小児の手が収まる範囲で十分な線形性を有していた．また，3D勾配エコーシーケンスを用いた手の撮像結果がFig. 4である．システムの対象である小児に対しても，同等の画像を取得できることが予想される．今後は，勾配磁場電流効率の高さを活かし，さらなる撮像シーケンスの改良を行っていきたい．

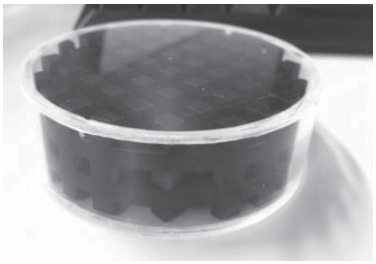


Fig. 2. Lattice phantom

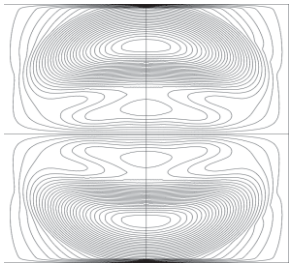


Fig. 3. Wire pattern of gradient coil (GY layer)

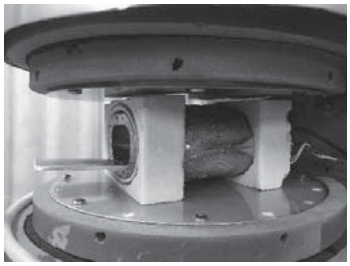


Fig. 4. Oval gradient coil and whole MRI system

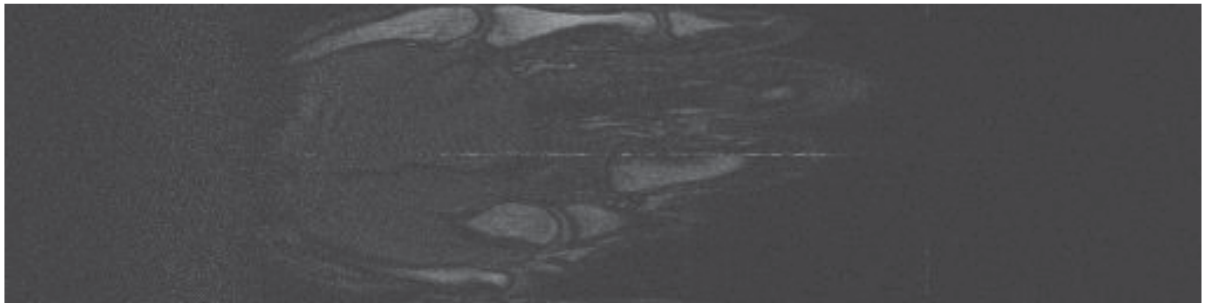


Fig. 5. Image of a 23-year-old man's hand

References

(1) M. Abe, T. Nakayama, S. Okamura and K. Matsuoka. (2003) A new technology to optimize the coil winding path for the arbitrarily distributed magnetic field and application to a helical confinement system. *Phys. Plasmas, vol. 10, no. 4*, 1022-1033.

(2) M. Abe. (2013) A design tool for magnetic resonance imaging gradient coils using DUCAS with weighted nodes and initial current potentials. *IEEE Trans. Magn., vol. 49, no. 12*, 5645-5655.

P81

連続供給超偏極^{129}Xeから固体表面の生体分子上^{13}Cへの超偏極移行

○服部　峰之[1]
[1] 産業技術総合研究所・計量標準総合センター・物質計測標準研究部門

Hyperpolarization transfer from continuously provided hyperpolarized ^{129}Xe to ^{13}C included in bio-molecules on surface of solid-state materials

○Mineyuki Hattori[1]
[1] *Research Institute for Material and Chemical Measurement, National Metrology Institute of Japan(NMIJ), National Institute of Advanced Industrial Science and Technology*

^{129}Xe Nuclear Magnetic Resonance (NMR) techniques have been applied to probe porosity of mesoporous materials and the pore size is known to relate with the chemical shift. We have developed an apparatus to produce the laser induced hyperpolarized (HP) Xe gas continuously and tried to apply it to mesoporous materials. Hyperpolarization transfer from continuously provided hyperpolarized ^{129}Xe to ^{13}C included in bio-molecules on surface of solid-state materials was investigated.

NMRの検出感度を飛躍的に向上させる超偏極は、観測核スピン周りの物理化学的な情報を含むスペクトルや化学シフト画像の実時間取得を実現し、時間軸の新次元開拓が期待される。炭素原子は、ほとんどの生体物質の分子骨格を成すので、^{1}Hを観測するより直接的な代謝の情報が得られる。^{13}C MRSは、安定同位元素を含む化合物を投与し、スペクトルをモニタすることにより、生体内の代謝過程等を無侵襲的に測定して、生体内物質代謝の上で最も重要な炭素鎖化合物の動態を検索する。^{13}C NMRは、^{1}Hに比べると感度が低い。パラ水素を不飽和脂肪酸に付加反応させた直後に生じる超偏極(PHIP)を^{13}Cへ移行させる方法と、高磁場・極低温下でのマイクロ波照射を行う動的核偏極（DNP）により超偏極を生成する方法がある。超偏極化された化合物は、血管内投与できる様に水溶性液体で、^{13}CのT_1は約40秒程度である。ピルビン酸代謝の臓器による違いを、ピルビン酸とその代謝物、乳酸，アラニン，CO_2の化学シフト画像を取得されている[1]。 DNP法による超偏極^{13}Cの生成には、GE Healthcare社から知財ライセンスを受けてOxford社から販売されたHyperSense™ [2]により、数ヶ所の臨床研究拠点で医学への有効性の検討がされた。今後も、様々な^{13}C化合物を超偏極化したのちに投与することにより、バイオマーカーの集積や代謝など生化学的な情報が得られると期待される。^{129}Xeの超偏極を^{13}Cへ移行することにより、^{13}C含有プローブ分子の偏極させる方法[3]も検討されており、ここでは、超偏極希ガス生成装置の利用技術として、このアプローチによる開発の可能性を検討する。

超偏極，サーマルミキシング、^{129}Xe、^{13}C、多孔質

○はっとりみねゆき

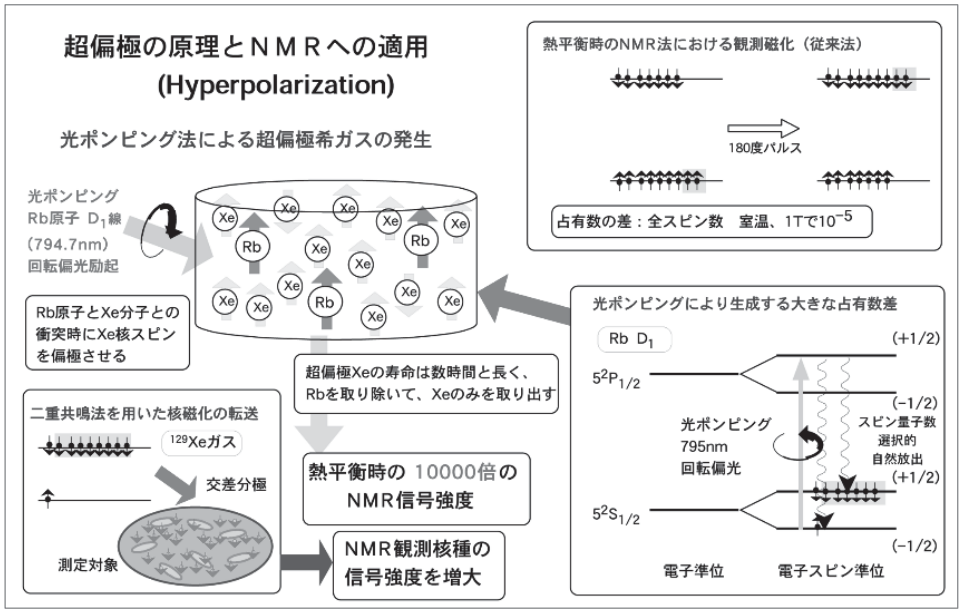


図 1．超偏極の原理

【超偏極 ^{129}Xe 生成装置と狭帯域化光源による高効率化】

^{3}He, ^{129}Xe の核スピンが 1/2 の希ガスは、Rb の D_1 線 ($5^2S_{1/2}$-$5^2P_{1/2}$) を光ポンピングしたアルカリ金属とのスピン交換を行って、NMR 信号を飛躍的に増強できる(図 1)。簡便なバッチ式の超偏極キセノンガス製造装置(東横化学：HPXE2105)[4]が、既に利用されているが、今回は、連続フロー生成モードでの運用を行えるように構成を変更した。また、セルや配管等の内壁と衝突によるスピン緩和の発生を抑制して、3～5m の長距離を送給しても超偏極 ^{129}Xe の信号強度を低下しないように、生成セルの下流に内径 0.1～1.25mm の極細キャピラリー管を利用して NMR 試料管への導入[5]を行った。

照射するレーザー光の光パワー密度が充分に生かせる範囲の照射面積を有する平面型フローセルの隙間に希ガスと光ポンピング用触媒(Rb)の混合気体を流通させることを考案し、40W 狭帯域化 LDA を 4 個製作し（線幅 0.1nm 以下、40W×2×2＝160W）、このセルに適用して、40～100ccm の流速で、偏極率約 20%の超偏極キセノンガスの生成に成功している[6]。円筒型セルと薄型セルでは、混合ガスの励起セルの滞在時間に違いがあるが、常圧のガスと共存している Rb の吸収線幅は、通常の LDA に比較すると 20 倍程度狭いという状況であり、LDA の発振線幅を、常圧における Rb の吸収線幅程度まで狭帯域化し、波長の長時間安定性も向上が必要である。今回、AR コートを施した LDA を採用し、体積グレーティング(VHG)による波長ロックの性能を向上した。1.5mm 厚の VHG を採用すると線幅 0.06nm まで、12mm 厚の VHG によると線幅 0.01nm まで狭線化に成功した。1.5mm 厚の LDA を 2 個搭載しビームを大面積の照射用に均一化、拡大した光学系を組込んでシステム化(794.7nm±0.06nm, 54W，アウレアワークス製)し、これを連続フロー方式の生成装置に適用した。

【多孔質体の超偏極 ^{129}Xe NMR】

^{129}Xe NMR 法は、多孔質のポロシティの測定に応用されている。超偏極により積算なしでも十分な検出感度が得られ、リアルタイム測定が可能になった。超音波画像診断用に気体を吸着させられる有機多孔質(Levovist®)について、室温以下 Xe の凝固点直下(-130℃)までの温度範囲において、スペクトルの取得した。【超音波画像診断用有機物多孔質材料】名称:Levovist®、code name:SH/TA-508、製造元:Schering（独）、国内販売元:日本シエーリング、平均径:2～4μm、殻材質:なし（パルミチン酸）、気体:空気[7]。^{129}Xe NMR スペクトルは、6.3T（^{129}Xe：74.747MHz）で、tecmag Apollo Spectrometer により得た。Levovist® 約 0.3g を 10mm 径 NMR 試料管に入れ、マニュホールドを用いて試料管内をロータリーポンプにより真空引きして、水分等の吸着物を除いた後に、キャピラリーチューブつきのマニュホールドに付け替え、超偏極 Xe ガスを大気圧下で連続フロー導入した。流速 20sccm で、超偏極 ^{129}Xe 含有混合ガス (Xe:N_2:He 混比,1%:5%:94%)

を流通させながら、吸着した Xe の ^{129}Xe NMR スペクトルを 143～303 K の温度変化を取得した。1 回積算で 20 回連続励起収集(FA=90º、T_r=10s，NEX=20)で測定した。^{129}Xe の化学シフト、線幅を 1 番目のスペクトルから解析した。図 2 に測定した、^{129}Xe NMR スペクトルと化学シフト、線幅を示す。室温付近では、狭い線幅のガスピークの脇に広幅の吸着した Xe ガスの信号が観測された。これは、ポアの大きさは 2～4μm と一致している。温度を下げていくと、シフト値が大きい方に吸着相ピークがシフトしていくのがわかる。Xe が液化する、165.03 K (-108.12℃)以下の　-109℃では、さらにシフトして 90ppm となった。さらに、Xe の凝固点 161.4 K(-111.7℃)以下の-129℃では、126ppm となり、ガス相の信号減少が観測された。

^{129}Xe NMR 線形は、それぞれの測定温度での Xe ガス相と吸着相のメソポアーへの滞在時間と数密度による平均を観測する。これらは、温度と圧力により変化し、^{129}Xe NMR の各種パラメータに影響を与える。超偏極 ^{129}Xe を連続フローで流通させた状態で、時間分解測定を行うことにより、Xe の振る舞いに関する知見を反映した化学シフトと線幅の解析からポアのサイズと分布および、Xe ガス吸着と交換に関する情報を得られた。室温付近では、狭い線幅のガスピークの脇に広幅の吸着した Xe ガスの信号が観測されたが、温度を下げていくと、Xe の凝固点 161.4 K (-111.7℃)以下の-129℃では、126ppm となり、ガス相の信号減少が観測され、Xe の多孔質への吸着および流□する超偏極 ^{129}Xe との交換により吸着相の磁化が保持されていることが確認された。Xe が液体になる温度では、吸着した Xe が多孔質試料との接触により緩和が起こり、^{129}Xe 超偏極 NMR 信号が減少していくことが観測された(図 3)。多孔質体に ^{13}C 核を含む分子を吸着させておくことにより、^{129}Xe から ^{13}C への偏極移行を検討できる。

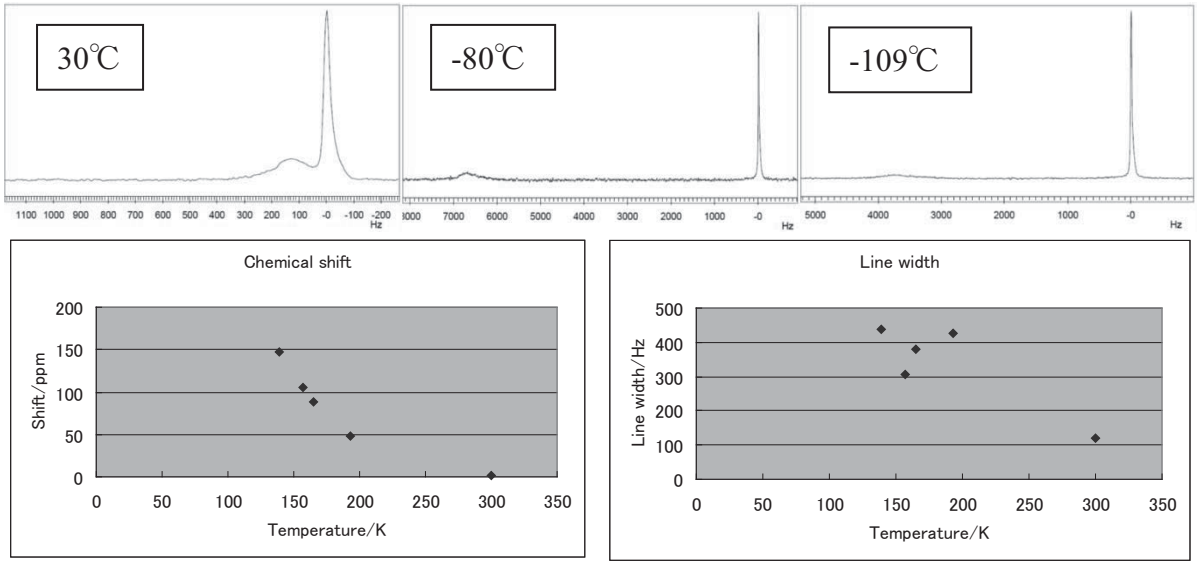


図 2. Levovist® のポアに収着された Xe の ^{129}Xe NMR 化学シフトと線幅の温度依存性

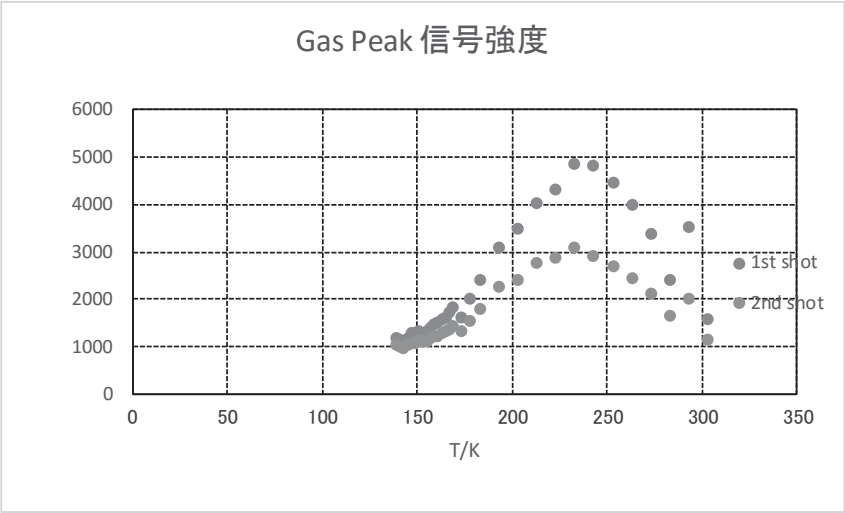


図 3. ガス相の ^{129}Xe 信号強度の温度依存性。1,2 回目励起を表示

参考文献[3]では、酢酸（1-^{13}C-AcH）^{13}C NMR 信号を超偏極 ^{129}Xe からの分極移動（thermal mixing）により、増強している。酢酸をガス状にして、HP Xe 中に分散させて、混合物を 0.5T、液体窒素で凍結させ、分極交換したのちに元の 4.7T に上昇している。観測された ^{13}C 分極は、熱平衡状態の 10 倍。この値は、理論的な最大値(偏極率 100%)の 1/1,000 である。

[Reference]
[1] Yen Y-F. et al: Imaging considerations for in vivo ^{13}C metabolic mapping using hyperpolarized ^{13}C-pyruvate, Magn. Reson. Med., **62**, 1–10 (2009).
[2] Ardenkjaer-Larsen JH, et al. Increase in signal-to-noise ratio of >10,000 times in liquid-state NMR. Proc Natl Acad Sci USA, **100**, 10158–10163 (2003).
[3] Lisitza N et al: Toward ^{13}C hyperpolarized biomarkers produced by thermal mixing with hyperpolarized ^{129}Xe, J. Chem. Phys., **131**, 044508-1-5 (2009).
[4] 服部峰之: 開発事例：超偏極キセノンガス生成装置実用機の研究開発，工業材料, 52(3), 86-89 (2004).；大竹紀夫、村山守男、平賀隆、服部峰之、本間 一弘，特開 2004-262668 号公報；M. Hattori, et. al., Proc. ISMRM, 1264 (2007).
[5] 服部峰之、平賀隆、浅沼達哉，特開 2006-322802 号公報
[6] 服部峰之、平賀隆、村山守男，特開 2003-245263 号公報；M. Hattori, et. al., Proc. ISMRM, 2577 (2010).
[7] 森安史典、飯島尋子、映像情報 Medical，5 月号，570-578 (2006).

P82

0.2T永久磁石MRIを用いた屋外樹木中の水輸送計測

○長田晃佳[1]，福田健二[2]，巨瀬勝美[1]，寺田康彦[1]
[1] 筑波大学大学院　数理物質科学研究科　電子・物理工学専攻
[2] 東京大学大学院　農学生命科学研究科　森林科学専攻

Measurement of water transport in an outdoor tree using a 0.2T permanent magnet MRI

○Akiyoshi Nagata[1], Kenji Fukuda[2], Katsumi Kose[1], Yasuhiko Terada[1]
[1] *Institute of Applied Physics, University of Tsukuba*
[2] *Department of Forest Science, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo*

We have developed a 0.2T permanent magnet MRI system to measure an outdoor tree since 2013. In this study, we measured water transport in principal cross-section of an outdoor *Zelkova serrata* tree using the MRI. The tree height was about 4 m. Water transport was measured by q-space imaging (QSI) and the volume flow maps were calculated on basis of the propagator approach. We analyzed diurnal changes in the volume flow in the xylem and phloem regions where the sap flow was transported. The xylem exhibited upward flow which was faster at midday than at night. The phloem exhibited downward flow which was almost constant during the day.

1. はじめに

我々の研究室では 2013 年に屋外樹木用の 0.2 T 永久磁石 MRI を開発した[1]。そして、2015 年 11 月には q-space imaging(QSI)によるケヤキ内樹液の流速計測に成功した[2]。しかしその頃のケヤキは落葉途中で樹液流速が活発な時期ではなかった。そのため現在は、ケヤキの葉が再び芽生え、樹液の水輸送が活発となる時期(5～8 月頃)の樹液の水輸送計測を目指している。

主幹断面における樹液には、葉で行われる光合成に必要な水を供給するための上向きの流れと、光合成により生成された糖などの養分を樹木全体に供給させるための下向きの流れがある。それぞれ通導に関与する組織が異なり、上向きの流れは木部内の導管、下向きの流れは師部内の師管を流れる。

そこで、本研究では 8 月における屋外ケヤキ内の両方向の樹液流を QSI により計測し画像化した。

2. 実験方法

実験には 2013 年 2 月に苗木を移植した樹高約 4 m、目通り(地上 1.2 m の高さでの幹の外周の長さ) 0.26 m のケヤキを用いた (Fig. 1)。測定部は地面から 40 cm の高さとした。測定に使用した磁石は 0.2T 永久磁石磁気回路、ギャップは 16 cm である。グラジエントコイルの勾配磁場効率は Gx = 6.76 mT/m/A , Gy = 1.23 mT/m/A , Gz = 2.62 mT/m/A であった。ただし、各軸の方向は木の伸長方向を x、磁石の奥行き方向を y、磁石の静磁場方向を z とした。RF プローブには直径 120 mm、長さ 60 mm、ターン数 12 のソレノイドコイルを用いた。

Plant imaging, Outdoor MRI system, Flow

○ながたあきよし，ふくだけんじ，こせかつみ，てらだやすひこ

木部と師部の樹液流速にはかなり違いがあるため、それぞれ別の QSI パラメータを用いた。

2.1 木部内を流れる樹液流の QSI

木部の計測には pulse field gradient - spin echo (PFG-SE)シーケンスを用い、撮像パラメータを TR/TE = 800 ms/40 ms、field of view (FOV) = 256 mm×128 mm、スライス厚 = 40 mm、matrix size =256×64 とした。motion probing gradient (MPG) のパラメータをΔ = 20ms、δ = 8 ms、q値の範囲を-23.0～22.7 mm^{-1} とし、この間を 128 等分するようにq値を変えて画像を取得した。全測定時間は 2 時間 18 分であった。ピクセルごとに縦軸を信号強度、横軸をqとした減衰曲線を作成し、propagator を計算した。求めた propagator から 1 ピクセル当たりの体積流の分布を出力した[3]。ただし、得られた信号減衰曲線にノイズ除去のため移動平均フィルターをかけた。さらに画像化にはピクセルの近傍 8 点を用い、平均化処理を行った propagator を用いた。

2.2 師部内を流れる樹液流の QSI

師部の計測には pulse field gradient - stimulated echo (PFG-STE)シーケンスを用い、撮像パラメータを TR/TE = 800 ms/40 ms、FOV = 256 mm×128 mm、スライス厚 = 40 mm、matrix size =256×64 とした。MPG のパラメータをΔ = 200ms、δ = 10 ms、q値の範囲を-28.8～27.7 mm^{-1} とし、この間を 32 等分するようにq値を変えて画像を取得した。全測定時間は 34 分であった。こちらも 2.1 節と同様の方法で体積流を画像化した。こちらも、得られた信号減衰曲線にノイズ除去のため移動平均フィルターをかけた。平均化処理は行っていない。

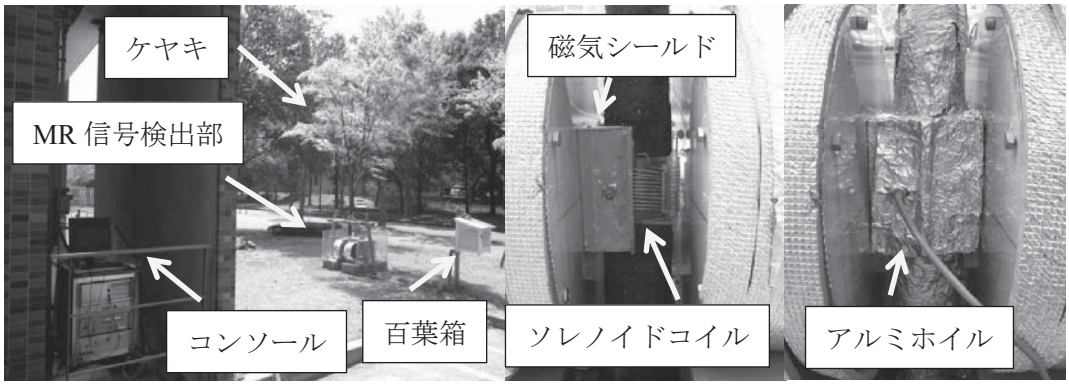


Fig. 1 (Left) MRI system and Stevenson screen. (Center, right) Installation of the RF probe. The solenoid RF coil was (center) covered by the shield box and (right) covered by aluminum foil.

3. 実験結果

3.1 木部内を流れる樹液流の QSI

QSI による木部の樹液流計測を行った結果を Fig. 2 に示す。Fig. 2 (a) は spin echo (SE) 法により取得した屋外ケヤキの主幹断面像である。周囲には 4 つのオイルファントムと水ファントムを設置している。これらは、渦電流磁場により発生する一次の位相シフトの補正や、QSI 解析時の静止水リファレンスファントムとして使用される。外側の層に形成層という組織があり、その内側が木部、外側が師部である。

Fig. 2 (b) は、2.1 節で述べた木部計測用の QSI パラメータにより、2016 年 8 月 2 日の 13 時に計測した主幹断面の体積流分布である。ケヤキは環孔材と呼ばれる木部構造をもち、年輪に沿って大径導管が分布している。そのため円状に大きな体積流の値が観測された。特に今年生成された

木部の体積流値が大きかった。これより、今年生成された木部を中心に多くの樹液を輸送していると言うことができる。

Fig. 2 (c) は 2016 年 8 月 3 日の 0 時半に計測した主幹断面の体積流分布である。Fig. 2 (b) の分布と比べ大きな体積流の値は観測されていない。これは夜間では葉に日が当たらず気孔からの蒸散が行われないため、水輸送も活発でなかったためだと考えられる。

また、昼夜にかかわらず体積流の値は正であった。これは木部の流れが上向きであることを示している。

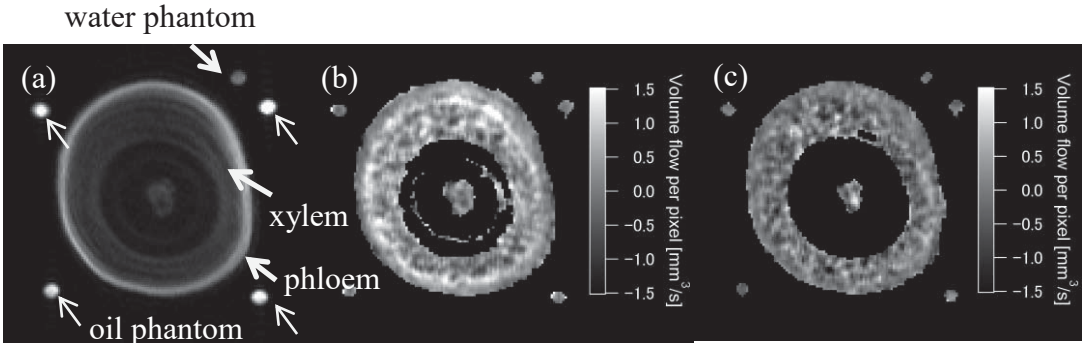


Fig. 2　Diurnal change in the volume flow in the xylem.　(a) SE image (q=0). (b),(c) Volume flow maps measured with PFG-SE (b) at 13:01 on August 2, 2016 and (c) at 0:36 on August 3, 2016.

3.2 師部内を流れる樹液流の QSI

QSI による師部の樹液流計測を行った結果を Fig. 3 に示す。Fig. 3 (a) は stimulated echo (STE) 法により取得した屋外ケヤキの主幹断面像である。

Fig. 3 (b) は、2.2 節で述べた師部計測用の QSI パラメータにより、2016 年 8 月 2 日の 12 時半に計測した主幹断面の体積流分布、Fig. 3 (c) は 2016 年 8 月 3 日の 0 時に計測した体積流分布である。それぞれ、STE 画像を基に師部の領域のみを抽出して表示している。師部の体積流は昼夜で差が表れなかった。また、師部の体積流の値は負であり、師部の流れが下向きであることを示していた。

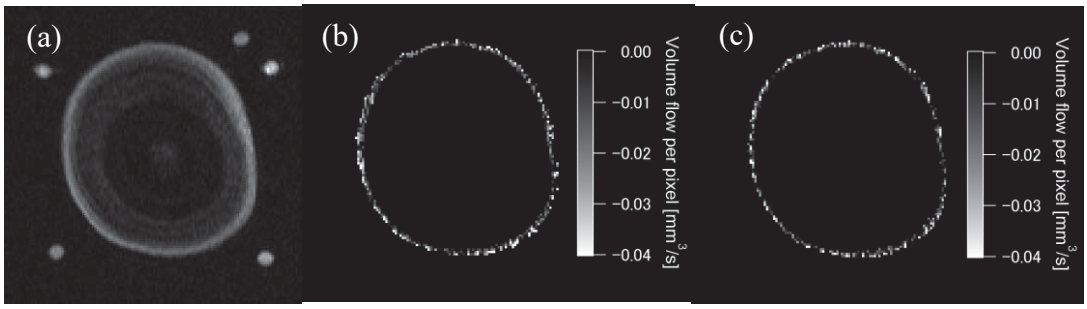


Fig. 3　Diurnal change in the volume flow in the phloem.　(a) STE image (q=0). (b),(c) Volume flow maps measured with PFG-STE (b) at 12:26 on August 2, 2016 and (c) at 0:01 on August 3, 2016.

3.3 樹液流の QSI による連続計測

木部と師部の樹液流を 8 日間連続で計測した。関心領域の propagator を平均したものから体積流を求め、その時刻の体積流とした。また同時に、樹液流計測のスタンダードである Sap flow meter を使って樹液流速を計測し、体積流に換算して比較した。Sap flow meter は熱拡散による温度変化を計測することで樹液流速を求めることができる。Fig. 3 (a) に示すグラフは今年生成された木部

の体積流の時間変化である。これと、Fig. 3 (c) に示す Sap flow meter で計測した流量変化とは定性的に一致していることが分かる。しかし、全体的に、QSI で計測した流量の方が大きかった。

Fig. 3 (b) に示すグラフは師部の体積流の時間変化である。師部の体積流の時間平均値は-0.0122 ±0.00483 mm^3/s であり、定常的に下向きの流れが観測された。師部の体積流には時間帯による違いは表れなかった。

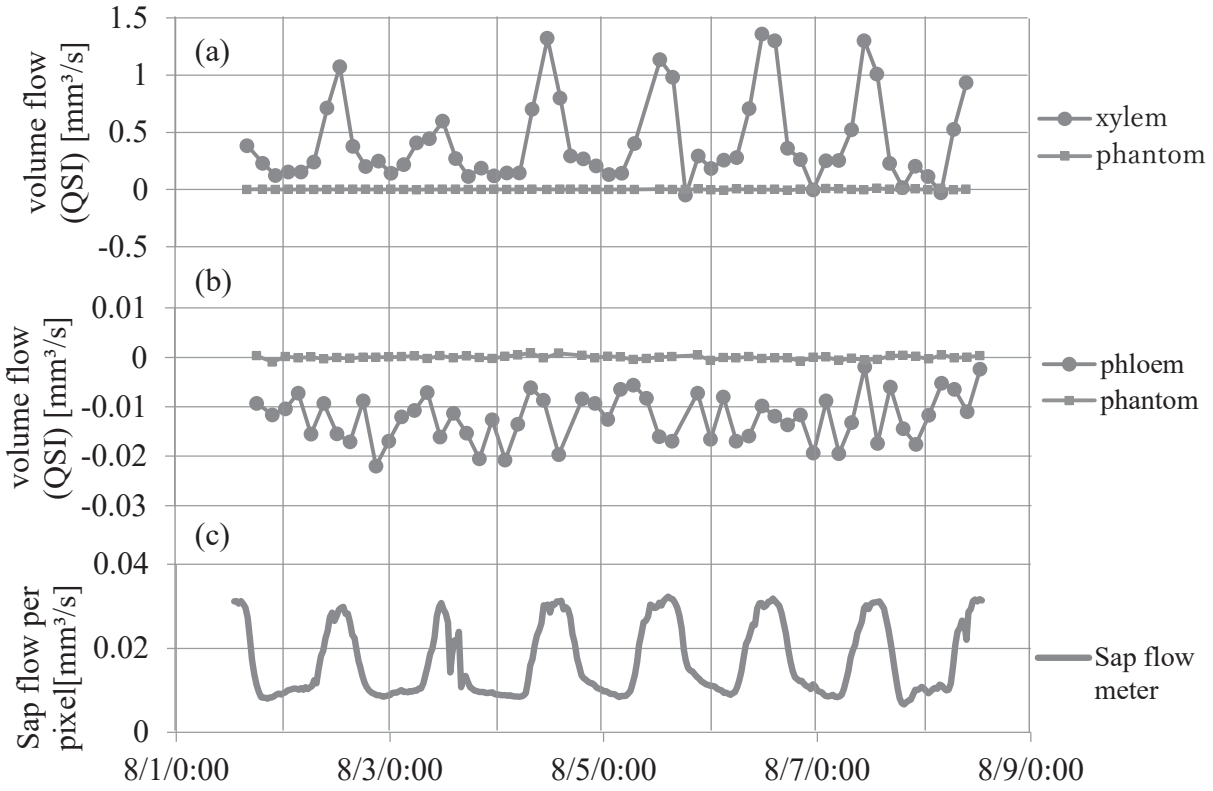


Fig. 3　Volume flow measured at different times of the day (from 8/01/2016 to 8/08/2016).(a) Volume flow averaged over the whole region of xylem developed in 2016. (b) Volume flow averaged over the whole region of phloem. (c) Sap flow measured with the conventional sap flow meter.

4. 結論

屋外樹木計測用 MRI を用いて、QSI により木部と師部を流れる樹液の体積流計測を行った。木部においては、上向きの流れが観測され、昼夜で水輸送の活動に変化が見られた。一方、師部においては、下向きの流れが観測され、時間帯によって明らかな変化は表れなかった。

References

[1] Y. Terada, A. Fukita, S. Moriwaki, K. Kose, In situ living tree measurements using a 0.2 T permanent magnet. August, 2013, 12th International Conference on Magnetic Resonance Microscopy, Fitzwilliam College, Cambridge, UK (P79).

[2] A. Nagata, K. Kose, Y. Terada, Development of an outdoor MRI system for measuring flow in a living tree, J. Magn. Reson. 265(2016), 129-138.

[3] C. W. Windt, F. J. Vergeldt, P. A. de Jager, and H Van As, MRI of long-distance water transport: a comparison of the phloem and xylem flow characteristics and dynamics in poplar, castor bean, tomato and tobacco, Plant, Cell and Environment, 29(2006),1715-1729.

P83

動物培養細胞のin-cell NMR要素技術開発の更新とその応用への試み

○猪股晃介[1,5]，杤尾豪人[2]，伊藤隆[3]，白川昌宏[4]，木川隆則[1]
[1]理化学研究所・生命システム研究センター
[2]京都大学大学院・理学研究科
[3]首都大学東京・理工学研究科
[4]京都大学大学院・工学研究科
[5]JST・さきがけ

Technical improvements for advanced in-cell NMR of mammalian cells

○Kohsuke Inomata[1,5], Hidehito Tochio[2], Yutaka Ito[3], Masahiro Shirakawa[4], Takanori Kigawa[1]
[1] *Quantitative Biology Center (QBiC), RIKEN*
[2] *Department of Biophysics, Kyoto University*
[3] *Department of Chemistry, Tokyo Metropolitan University*
[4] *Department of Molecular Engineering, Kyoto University*
[5] *PRESTO, JST*

In-cell NMR spectroscopy is one of the most promising techniques to observe protein structure, interactions, and dynamics at atomic level in living cells. We are trying technical improvements of in-cell NMR method to be more versatile experiment. In this presentation, two technical improvements for advanced in-cell NMR methodology of mammalian cells will be presented. The first one is the introduction of stable isotope labeled proteins into mammalian culture cells. The second one is the improvement of the medium flow system in a NMR tube. In addition to these technical improvements, a few trial results for investigating protein structure and protein-protein interactions in living mammalian cells will be presented.

タンパク質の３次元立体構造や動的挙動がその生理機能と深く関わっていることは既に自明であるといっても差し支えなかろう。一方で、それらタンパク質の構造・動態は外部環境（温度、pH、密度等）に影響を受けて変化しうる。これを念頭に置いてタンパク質の多くが実際に機能する細胞内の環境を考えてみると、細胞内部は多種多様な生体分子が高密度に分布し、細胞骨格や細胞小器官によって内部が区分けされて非常に混み合っている。更に、外部刺激等により内部環境が変化する非平衡性もある。ゆえにタンパク質の生理機能を厳密に理解するためには、実際に機能する“その場”もしくはそれを模した環境下で計測した知見をもとに議論することが望ましい。しかしながら、細胞内環境を試験管内に再構築することは極めて困難であり、現状では実現されていない。そこで、生きた細胞内におけるタンパク質の構造・動態を原子レベルで解析可能な手法であるin-cell NMR法が有効となる。

In-cell NMRとは、磁気共鳴法の生体非侵襲性・原子核選択性を活かすことによって、生きた細胞内におけるタンパク質の挙動を原子レベルで観察するための手法であり、生きた細胞内におけるタンパク質の立体構造やその変化、分子間相互作用、化学修飾、動的挙動などを原子レベルで解析することが可能である。発表者等は近年、ヒト等高等動物細胞を利用したin-cell NMR法の開

in-cell NMR，NMRバイオリアクター

○いのまたこうすけ，とちおひでひと，いとうゆたか，しらかわまさひろ，きがわたかのり

発とその応用研究を進めてきた。これにより、タンパク質の酵素反応過程、低分子薬剤認識、タンパク質間相互作用、構造安定性解析などを、タンパク質が実際に機能するヒト細胞内での計測を実現させてきた。これら成果の中で、構造安定性解析において特に注目すべき知見を得ている。すなわち、細胞内タンパク質の構造安定性が、試験管内の均一溶液中に比べて大きく低下することを見出した。これは細胞内のような分子が混み合った環境下ではタンパク質の構造はより安定化する、という定説を覆す結果である。つまりこの一例から、細胞内のタンパク質は、均一溶液中に比べ多様かつ柔軟に構造を変化させ、機能をより発揮しやすくしている可能性があることが想像される。

本発表はでは、我々が行っている動物培養細胞のin-cell NMRについて、より汎用性を高め、より高度な実験が可能となるように、以下の２つの要素技術を更新した成果を紹介する。まず１つ目は、これまで用いてきた膜透過性ペプチド（CPP）による、細胞内への蛋白質導入法における問題点を克服するため、電気穿孔法を検討し、実験条件を最適化した成果である(Fig. 1)[1,2]。次に２つ目は、細胞試料をより健全な状態に保ちながらNMR測定を行うための培地循環システムの構築に関する成果である(Fig. 2)[3]。さらにこれらに加えて、上記を用いた細胞内タンパク質の構造・動態解析に向けた試みについて、現在取り組んでいることについて紹介する。

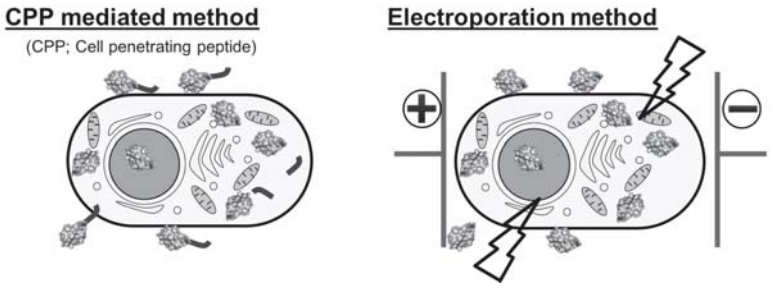


Fig.1; isotope enriched protein transduction techniques for in-cell NMR of mammalian cells

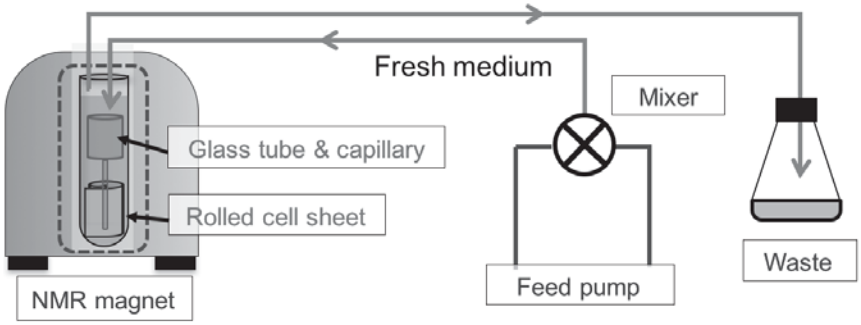


Fig.2; improved medium flow system for in-cell NMR of mammalian cells

References

(1) Inomata K, Ohno A, Tochio H, Isogai S, Tenno T, Nakase I, Takeuchi T, Futaki S, Ito Y, Hiroaki H, & Shirakawa M. (2009) High-resolution multi-dimensional NMR spectroscopy of proteins in human cells. *Nature 458*, 106–109.

(2) Lang L, Zetterström P, Brännström T, Marklund SL, Danielsson J, & Oliveberg M. (2015) SOD1 aggregation in ALS mice shows simplistic test tube behavior. *PNAS 112*, 9878-9883.

(3) Kubo S, Nishida N, Udagawa Y, Takarada O, Ogino S, & Shimada I. (2012) A gel-encapsulated bioreactor system for NMR studies of protein-protein interactions in living mammalian cells. *Angew Chem Int Ed Engl 52*, 1208-1211.

P84

グリーンレーザーを用いたアロディニア特異的な痛みに対する鎮痛薬評価に関するfMRI研究

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

An fMRI study for the evaluation system of analgesic agents on allodynia-specific pain using the green laser

○Naoya Yuzuriha[1], Sosuke Yoshinaga[1], Mitsuhiro Takeda[1], Hiroshi Sato[2] , Hiroaki Terasawa[1]
[1]*Department of Structural BioImaging, Faculty of Life Sciences, Kumamoto University*
[2]*Division of Pre-Clinical Imaging Application, Bruker Biospin K.K.*

Allodynia is a symptom with the sensation of pain caused by a stimulus that is normally not painful. Allodynia is thought to be developed by the potentiation of pain signals at the Aδ- and C-fibers, due to signal propagation from the Aβ-fibers, which transmit the tactile sensation, and ectopic firing of the Aδ- and C-fibers [1]. A 532 nm green laser can selectively activate the Aδ- and C-fibers through TRPV4 and TRPV1 without direct contact [2], and thus is ideal for allodynia studies. The aim of this study is to evaluate the effects of analgesic agents on an animal model of fibromyalgia, using the fMRI technique and green laser stimulation. Before and after the administration of analgesic agents, functional data were acquired with an EPI sequence, during which the green laser was used to irradiate the hind paws. As a result of the T2*-weighted signal intensity analysis, we successfully observed that the signal increases elicited by the laser stimulation were depressed by the analgesic agents.

【背景・目的】線維筋痛症などの慢性疼痛疾患において発症するアロディニアは通常では痛みを感じないような刺激を強い痛みとして感じられる症状である。アロディニアは痛みシグナルを伝える Aδ 線維や C 線維において、触覚を伝える Aβ 線維からの信号伝播や神経線維の異所発火などによる痛みシグナルの増強によって発症すると考えられている[1]。一方、532 nm のグリーンレーザー刺激は侵害受容器の TRPV1 や TRPV4 を活性化させることが知られている[2]。TRPV1 や TRPV4 は Aδ 線維や C 線維に多く発現しているため、グリーンレーザーはアロディニア研究に有用であると考える。また、脳機能を MRI で測定する方法の１つである Blood Oxygenation Level Dependent (BOLD)–fMRI 法は、反磁性の酸素結合型ヘモグロビン量と常磁性の酸素非結合型ヘモグロビン量の変化を利用した手法である[3]。非侵襲的に高空間分解能で脳内の活性化領域を捉えられることから、脳機能解析の有用な手法として広く使用されている。本研究は、アロディニアを発症する線維筋痛症モデルである Reserpine-Induced Myalgia (RIM) ラット[4]に対し、グリーンレーザー照射による痛み刺激を与え、アロディニア特異的な応答を BOLD-fMRI 法を用いて明らかにすることを目的とする。本発表では、線維筋痛症に対する鎮痛薬であるプレガバリンのアロディニア特異的な痛み応答に対する鎮痛作用を評価することを試みた。

BOLD、fMRI、アロディニア

○ゆずりはなおや、よしながそうすけ、たけだみつひろ、さとうひろし、てらさわひろあき

【方法】[4] の方法に基づいて作製した RIM ラットを対象とした。ウレタンの腹腔内投与による麻酔の後、筋弛緩剤であるガラミンの持続投与と人工呼吸を行い MRI 実験を行った。7.0 T MRI 装置と 4-channel phased array surface coil (共に Bruker Biospin) を用いた。生理食塩水投与３０分後に BOLD-fMRI 撮像実験を行った。１２分間の echo planar imaging 法による T_2* 強調画像の連続撮像中に、RIM ラット特異的に痛み応答が見られた条件のレーザー刺激 (350 mW、2 s) を２分間隔で５回、左後肢に照射した。その後、プレガバリンを投与し、３０分後に同様の BOLD-fMRI 実験を行った。撮像した画像に対して、信号強度変化の周波数が類似する領域を抽出する Independent Component Analysis (ICA) を行った。得られた結果に対し、レーザー刺激周期である 8.3 mHz の周波数を持つ成分を絞り込み、刺激に応じた活性化領域の特定を行った。

【結果】生理食塩水投与後の撮像データを ICA 解析した結果、２分間隔のレーザー刺激に相当する周波数が含まれていた成分において、一次体性感覚野、島皮質、視床の領域に活性化がみられた。これらの領域の信号強度推移を解析した結果、レーザー刺激に応じて信号強度の増大が見られた。プレガバリン投与後の撮像データに対して ICA 解析を行った結果、２分間隔のレーザー刺激に相当する周波数を含む成分が見られなかった。

【考察】プレガバリン非投与において活性化が観測された領域のうち、一次体性感覚野は痛みの認識、島皮質と視床は痛みによる不快な情動に関わる脳領域である[5]。そのため、アロディニア特異的に応答した領域は、痛み情報を処理する領域に対応することが考えられた。プレガバリン投与後において、レーザー刺激によって活性化した脳領域は見られなかった。プレガバリンは電位依存性 Ca^{2+} チャネルに結合し、神経伝達を抑制することで鎮痛作用を示す。プレガバリンによって上記３領域の信号強度変化が抑制されたことから、鎮痛効果を脳内において検出できたと考える。

【結論】BOLD 法とグリーンレーザー刺激を組み合わせることによって、アロディニア特異的な痛み応答が鎮痛薬投与により抑制されたことを確認することができた。532 nm の波長のグリーンレーザーは、水分子に対する透過性が高く出力の調整が容易であり、アロディニア研究における痛み刺激として理想的であると考えられる。本実験系を用いることで、アロディニアに対する鎮痛薬の評価、および創出に貢献できると考える。

【謝辞】本研究全般においてご指導、ご鞭撻頂きました本田宗吉博士、玉置啓祐博士、関澤俊洋博士、藤川昭彦博士、柿元周一郎博士（アステラス製薬株式会社）に深く感謝いたします。

【参考文献】

[1] Ueda H., *Pharmacol. Ther.*, **109**, 57–77 (2006).
[2] Wang L. *et al.*, *Cells*, **3**, 662–673 (2014).
[3] Ogawa S. *et al.*, *Proc. NatI. Acad. Sci. USA.*, **87**, 9868–9872 (1990).
[4] Nagakura Y. *et al.*, *PAIN*, **146**, 26–33 (2009).
[5] Moisset X. and Bouhassira D., *NeuroImage*, **37**, S80–88 (2007).

P85

細胞分散系のPFG-NMRと誘電分光による膜損傷に伴う水とイオンの運動性の変化

○青山剛志[1]，斉藤宏伸[2]，川口翼[2]，喜多理王[3]，新屋敷直木[3]，八木原晋[3]，福崎稔[4]，伊藤敦[5]，浅見耕司[6]
[1]東海大学大学院理学研究科
[2]東海大学大学院総合理工学研究科
[3]東海大学理学部
[4]東海大学熊本情報教育センター
[5]東海大学工学部
[6]京都大学化学研究所

The influence of water and ion dynamics in cell suspension induced by membrane lesion.

○Tsuyoshi Aoyama[1], Hironobu Saito[2], Tsubasa Kawaguchi[2], Rio Kita[3], Naoki Shinyashiki[3], Shin Yagihara[3], Minoru Fukuzaki[4], Atsushi Ito[5], Koji Asami[6]
[1] *Graduate School of Science, Tokai University*
[2] *Graduate School of Science and Technology, Tokai University*
[3] *School of Science, Department of Physics, Tokai University*
[4] *Liberal Arts Education Center, Kumamoto Campus, Tokai University*
[5] *School of Engineering Department of Nuclear Engineering, Tokai University*
[6] *Institute of Chemical Research, Kyoto University*

Water molecules and ions restricted in non-uniform matrices show characteristic behaviors of molecular dynamics. The dynamics characterized by “diffusion” and “relaxation” are obtained from PFG-NMR and Dielectric Relaxation Spectroscopy measurements, respectively. In this study, molecular dynamics such as translational and rotational diffusion of water molecules and ion reflecting the cell membrane structure and its damage were analyzed. In order to clarify the structure dependence, damaged cell membranes by heating, ultrasonication, and autolysis procedures were examined. Bimodal translational diffusion processes were observed by PFG-NMR for water protons in cell suspensions, however, the signal intensity of the slower process was decreased according to the heat treatment. In dielectric relaxation spectroscopy measurements, a dielectric relaxation process due to ion dynamics trapped on the cell membrane was observed between 100 k and 100 MHz. The relaxation strength indicating a tendency of decreasing by the heating treatment clearly suggests destructions of the cell membranes.

不均質な系で束縛された分子やイオンは、その構造を反映した特徴的なダイナミクスを示すことが知られている[1)]。並進拡散運動においては、Pulsed Field Gradient - Nuclear Magnetic Resonance (PFG-NMR)法で観測される制限拡散運動や、誘電分光法で観測される界面分極（Maxwell-Wagner分極）等が有名である[2)]。しかし、同じ系に対し水とイオンの双方からダイナミクスを複合的に解析した例は必ずしも多くない。そこで本研究では、細胞等の不均一な系の均一化に伴う水分子とイオンダイナミクスの変化をPFG-NMR法と誘電分光法を用いて複合的に解析する。

PFG-NMR、誘電分光、細胞

○あおやまつよし、さいとうひろのぶ、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、いとうあつし、あさみこうじ

本研究では、酵母細胞の野生株とその突然変異株および HeLa 細胞の懸濁液を用い、加熱処理・超音波処理・自己融解過程に伴う膜損傷過程における水分子やイオンの並進拡散や回転拡散の変化を観測し解析した。拡散係数測定では、BRUKER Ascend^{TM} 400WB NMR を用い、拡散時間を Δ＝5~1000ms として PFG-STE(PFG-Stimulated Echo)測定を行った。誘電緩和測定には Agilent Technologies 社の IA (Impedance Analyzer) を用いて、測定温度を 25℃、周波数範囲を 40~110MHz として複素誘電率を測定した。

Fig. 1 に Δ＝500ms として得られた突然変異株酵母細胞懸濁液中の水分子の並進拡散測定の結果を示す。熱処理を加える前に明確に観測された二つの大きな拡散成分のうちの一つ、2 成分目の消失が確認できた。そこで、multi-exponential 型の関数を用いた（1）式のカーブフィッティングから各種パラメータの値を求めた。

$$I(g)/I(0)=\sum_n a_i \cdot \exp(-B \cdot D_i) + y_0 \quad \cdots \quad (1)$$

ここではI(g)/I(0)をピークの積分強度比、a_iを拡散過程の強度、B を Stejskal-Tanner の式[3)]の拡散係数にかかる B-value、D を拡散係数、y_0をベースラインとし、n＝2,3 の二通りについて行った。Fig. 2 に n＝2 として得られた拡散係数の拡散時間依存性を示す。ここで最も速い拡散成分を Fast 成分、次に速い成分を Slow 成分と呼ぶ。Fig.2 では熱処理前後の拡散係数の拡散時間依存性は明らかに変化した。熱処理前に明らかに分離して見えた Fast と Slow 成分は、熱処理後には共に拡散時間の増大に伴う拡散係数の減少を示した。一方、熱処理によって Slow 成分の拡散係数は増大し、Fast 成分の値に近くなった。これは熱処理による細胞膜の損傷によって、細胞内外の水分子が出入りして系全体の水の拡散係数が平均化されたことを示す。従って Fast 成分は細胞外のバルクな水分子、Slow 成分は細胞内にトラップされた水分子の拡散係数を反映していることがわかる。

Fig. 3 に突然変異株の酵母細胞とそれに熱処理を加えた細胞懸濁液の誘電緩和曲線を示す。数 MHz に存在する緩和過程の緩和強度が、熱処理により顕著に減少している事が分かる。一般に、細胞等の誘電分光測定ではこの周波数域に界面分極が観測される事が知られており、熱処理により細胞膜が破壊されて界面分極が消失したと考えられる。発表では、突然変異株以外に野生株と HeLa 細胞の測定結果や、誘電緩和曲線のフィッティングによって得られた緩和パラメータを含めた詳細な議論を行い、不均質構造系が水分子のダイナミクスに与える影響について明らかにする。

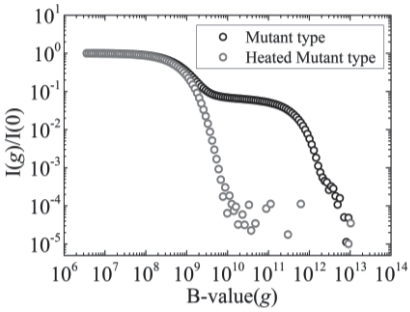


Fig.1. Double logarithmic Stejskal -Tanner plot for Mutant and Heated Mutant cell suspensions at 25℃.

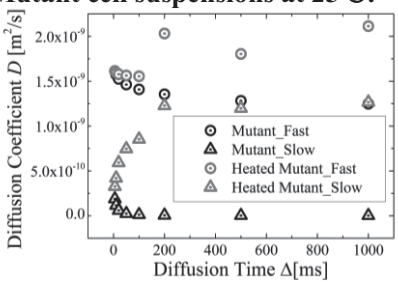


Fig.2. Diffusion time dependence of the diffusion coefficient.

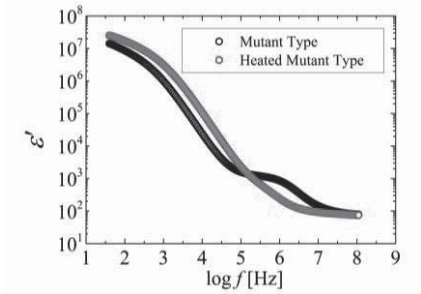


Fig.3. Dielectric relaxation curve for Mutant and Heated Mutant cell suspensions at 25℃.

Acknowledgment

本研究の一部はJSPS科研費15K13554の助成を受け実施された。

Reference

1) J. Kärger, *J. Adv. Colloid. Interfac*, **23**, 129-148, 1985.

2) K. Asami, *J. Non. Cryst. Solids.* **305**, 268–277, 2002.

3) E. O. Stejskal, and J. E. Tanner, *J. Chem. Phys.* **42**, 288-292, 1965.

P86

細胞内におけるALS関連タンパク質SOD1のフォールディングに関する動的構造解析

○岩川直都[1]，森本大智[1]，ヴァリンダエリック[2]，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
[2]京都大学大学院・医学研究科

Structural dynamic analysis of SOD1 in living cells

○Naoto Iwakawa[1], Daichi Morimoto[1], Erik Walinda[2], Kenji Sugase[1], Masahiro Shirakawa[1]
[1] *Department of Molecular Engineering, Graduate School of Engineering, Kyoto University*
[2] *Graduate School of Medicine, Kyoto University*

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a fatal neurodegenerative disease that leads to movement disorders. One of the causes of ALS is intracellular aggregation of Superoxide dismutase 1 (SOD1). Unfolded monomeric SOD1 is thought to be a precursor of aggregation; therefore, we focus on the folding equilibrium of monomeric SOD1. In many previous studies, this equilibrium has been investigated in diluted solution. By contrast, the aggregation occurs in highly crowded intracellular environment consisting of various biomacromolecules such as nucleic acids and proteins. In this study, we quantitatively analyzed the effects of crowded environment on folding of SOD1 by adding protein crowders using relaxation dispersion NMR spectroscopy. Our results show that the crowded environment thermodynamically destabilizes but kinetically stabilizes the folded state. Similarly to these results, the folding equilibrium of SOD1 would be affected by the crowded environment in living cells.

筋萎縮性側索硬化症 (ALS)とは，運動ニューロンが侵され，随意運動に障害が起きる難病である．進行性が高く，発症から3～5年で呼吸困難により死亡する．現在，発症原因の一つとして考えられているのは，Superoxide dismutase 1 (SOD1)というタンパク質の細胞内での凝集体形成である．通常，SOD1は二量体として機能し，細胞内の活性酸素を分解する．一方で，二量体が解離し，立体構造が折り畳まれたフォールド状態（F状態）は凝集体形成の前駆体となるアンフォールド状態（U状態）との平衡状態となる(Fig. 1)．家族性ALSにみられるSOD1遺伝子の変異は，SOD1の構造を不安定化し，U状態を占める割合を上昇させるために凝集体形成が促進すると報告されている．そこで本研究においては，このフォールディング平衡に着目した．

SOD1のフォールディングに関する研究はこれまでに数多く行われている．しかし，その多くが希釈溶液中での研究であり，細胞内という高濃度の生体高分子で混みあった環境における知見は乏しい．そこで，細胞内環境がSOD1のフォールディング平衡に与える影響を解析することを目的として研究を行った．

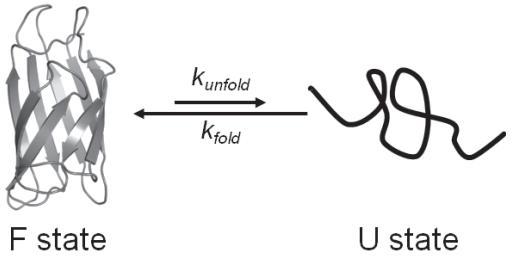


Fig. 1. Folding equilibrium of SOD1.
The SOD1 mutant used in this study shows a simple two-state folding equilibrium.

SOD1, folding, in-cell NMR

○いわかわなおと，もりもとだいち，ヴぁりんだえりっく，すがせけんじ，しらかわまさひろ

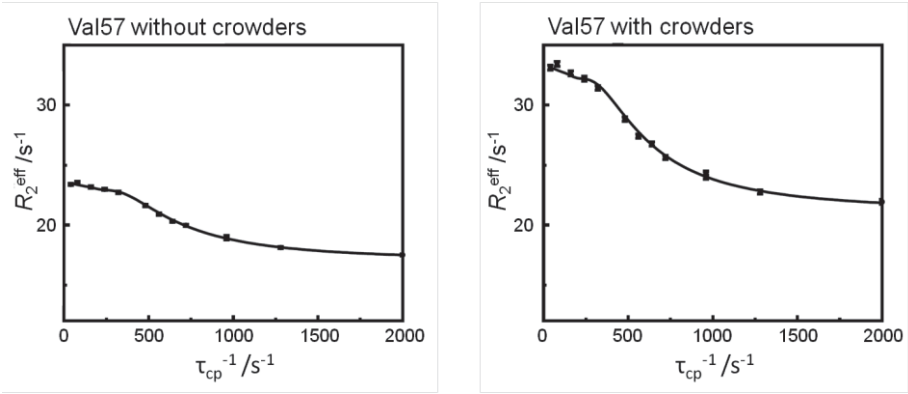


Fig. 2. ^{15}N R_2 relaxation dispersion profiles for Val57.
The relaxation dispersion profiles for Val57 without (left) and with (right) protein crowders at 310K. Obtained R_2^{eff} were plotted by the Carver and Richards equation(1).

細胞内の混みあった環境を模倣し，その影響を解析するために，*in vitro*において高濃度のタンパク質クラウダーを共存させた状態および，通常の希釈溶液中の二つの条件において，298Kから310Kの7点でNMR測定を行った．測定手法にはR_2 dispersion測定法を用いた．この手法は平衡状態にある構造変化を検出するものであり，平衡反応における各構造の存在比および交換速度を得ることができるため，熱力学的および速度論的な解析が可能である．

測定により得られた横緩和速度R_2^{eff}を二状態平衡モデルのCarver and Richards equation(1)に従ってフィッティングし (Fig. 2)，フィッティングパラメーターからU状態の存在比P_Uおよびアンフォールディング（F状態からU状態への変化）の速度定数k_{unfold}を算出した．その結果，クラウダーの添加によりP_Uは310Kにおいて1.0%から2.1%に増加していることが明らかとなった．また，k_{unfold}の温度依存性からArrheniusプロットを作成し (Fig. 3)，アンフォールディングの活性化エネルギーを見積もると，クラウダーの添加により52 kJ/molから59 kJ/molへと増加していることが明らかとなった．以上から，細胞内を模倣した混みあった環境においてSOD1は熱力学的には不安定化し，速度論的には安定化していることが示唆された．つまり，F状態およびフォールディング平衡における遷移状態はともに不安定化していると考えられる．

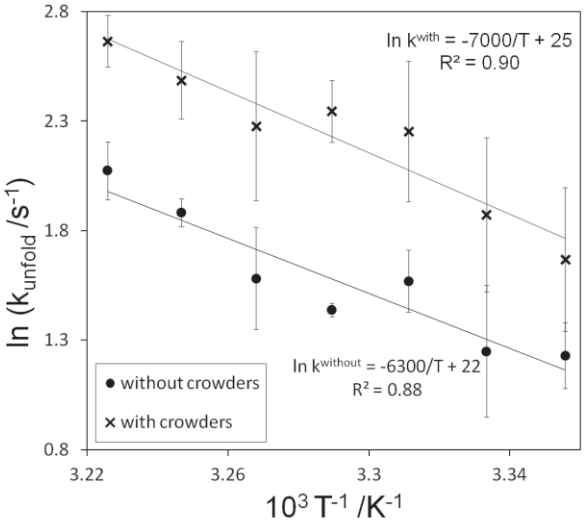


Fig. 3. Arrhenius plots for k_{unfold}.
The calculated rate constants, k_{unfold}, were plotted and fitted to the Arrhenius equation.

本研究において，細胞内の混みあった環境によるSOD1のフォールディングへの影響を定量的に解析した．しかし，実際の細胞内においては，混みあった高分子どうしが衝突し合うことによる物理的な力もはたらいていることが考えられる．そこで，今後は一方向に一定の外力を与えた条件下でNMR測定を行う手法であるRheo-NMR法を用い，物理的な力がSOD1の安定性に与える影響を評価していく予定である．また，生きた細胞内においてNMR測定を行う手法であるin-cell NMR法を用いることにより，実際の生細胞内におけるSOD1のフォールディングの実態を解明していく．

References

(1) Carver and Richards, J Magn Reson. 6. (1972)

P87

酸化ストレスに対するTrxの細胞内分子応答のin-cell NMR観測

○望月綾野[1]、佐宗新[1]、久保智史[1]、西田紀貴[1]、嶋田一夫[1]
[1]東京大学・大学院薬学系研究科

Real-time observation of intracellular oxidative stress response using in-cell NMR

○Ayano Mochizuki[1], Arata Saso[1], Satoshi Kubo[1], Noritaka Nishida[1], Ichio Shimada[1]
[1]*Graduate School of Pharmaceutical Sciences, the University of Tokyo, Japan*

Intracellular redox potential (E_h), which is determined by glutathione couples (GSH/GSSG), triggers various cellular responses upon addition of oxidative stresses. Thioredoxin (Trx) is a major redox sensing protein that mediates the reduction of substrate proteins or redox-dependent signal transductions. However, the redox profile of Trx measured *in vitro* is inconsistent with the role of Trx as a "redox sensor". In this study we performed in-cell NMR measurements of the redox status of Trx and the intracellular GSH/GSSG ratio. We found that the redox status of intracellular Trx was maintained as more reduced state than *in vitro*, which is appropriate for responding to the physiological oxidative stress.

細胞内の酸化還元電位(E_h)は、細胞内の還元型/酸化型グルタチオン(GSH/GSSG)の量比によって規定され、通常の生存状態では-240 mV 程度の還元的な状態に維持されている。しかし、酸化ストレスによって細胞内が酸化的となり E_h の値が増大すると、細胞増殖やアポトーシスなどの様々な細胞応答が誘起される(Fig. 1A)。Thioredoxin(Trx)は細胞内の酸化ストレス応答に重要な redox タンパク質であり、活性部位(C32,C35)の 2 つの Cys 残基間の S-S 結合形成を介して細胞内の基質タンパク質を還元する抗酸化タンパク質としての役割に加え、酸化ストレス依存的なシグナル伝達を誘起する redox センサーとしても機能する(Fig. 1B)。しかし、これまでに *in vitro* において計測された Trx の中間酸化還元電位は約-290mV と細胞内で生じる酸化還元電位の変化とは大きく異なっており、Trx の redox センサーとしての役割を説明できない。

本研究では、in-cell NMR 法を用いて細胞内のグルタチオンおよび Trx の酸化還元状態の変化を同時に観測することにより、細胞内の酸化還元電位の変化に対する Trx の応答を明らかにし、Trx が redox センサーとして働く機構を解明することを目的とした。

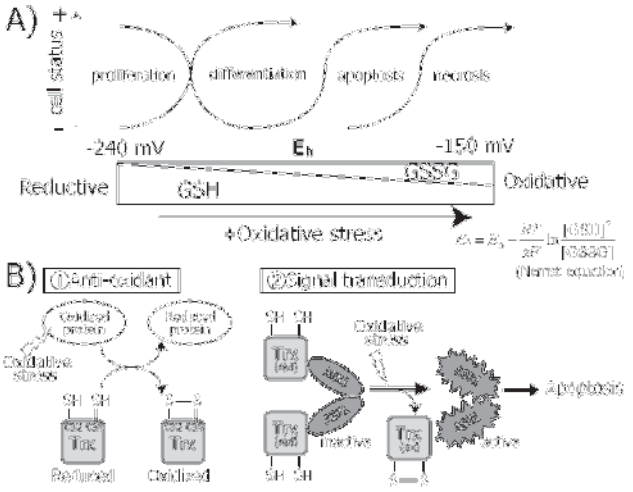


Fig. 1 (A) Intracellular redox potential and cellular responses. (B) The functions of thioredoxin.

---

in-cell NMR, 酸化ストレス

○もちづきあやの，さそうあらた，くぼさとし，にしだのりたか，しまだいちお

【方法】

Trx の酸化還元状態は、活性中心の S-S 結合形成に伴い顕著な化学シフト変化を示す Ala29 メチル基シグナルを指標として検出した。細胞内の Trx とグルタチオンの酸化還元状態の両方を in-cell NMR 観測するため、細胞膜に可逆的な孔を形成する Streptolysin O を用いたタンパク質導入法により Ala メチル基選択的 ^{1}H,^{13}C 標識 Trx を HeLa S3 細胞内に導入後、^{13}C 標識 Cys を含む培地中で一晩培養することで細胞内グルタチオンに ^{13}C 標識を施した(Fig. 2)。調製した細胞は、当研究室で開発したバイオリアクター装置を用いて、様々な濃度の酸化剤を含む培地を灌流しながら Trx とグルタチオンの in-cell NMR スペクトルを交互に測定した(Fig.3A)。

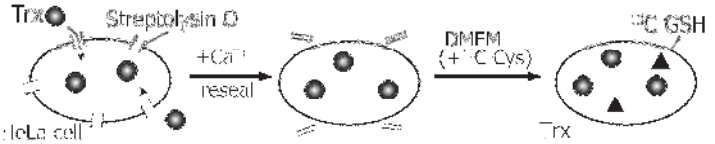
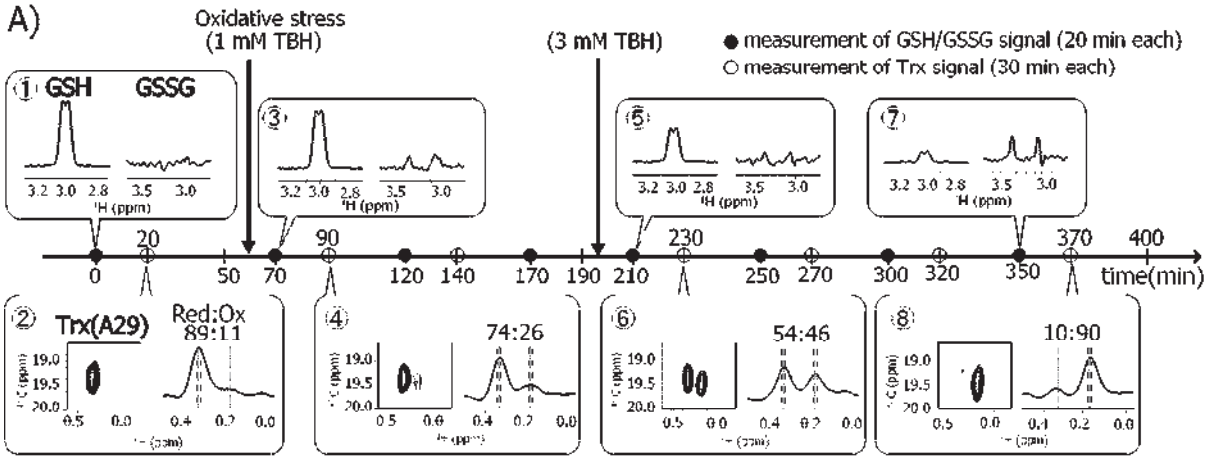


Fig. 2 Preparation of cells for dual in-cell NMR measurements of Trx and glutathione signals.

【結果】

まず酸化剤非存在下においてグルタチオンと Trx のスペクトルを取得した結果、両者ともほとんどが還元型として観測された(Fig.3 A ①②)。続いて酸化剤(*tert*-butyl hydroperoxide; TBH)を添加すると、時間および TBH 濃度依存的に GSSG シグナル強度の増大し(Fig. 3A ③⑤⑦)、それに伴い Trx のシグナルも酸化型へと移行した(Fig. 3A ④⑥⑧)。GSH,GSSG シグナル強度比に基づいて Nernst の式より細胞内 E_h を算出し、その際の酸化型 Trx の割合をプロットした(Fig. 3B)。また、溶液中の GSH/GSSG 濃度を調節して E_h を制御した条件下で測定した *in vitro* における Trx の酸化還元プロファイルと比較すると、細胞内では *in vitro* よりも酸化型 Trx の割合が顕著に低く保たれていることが明らかとなった（Fig. 3B）。この結果は、細胞内では Trx reductase 等の Trx を還元的に維持する機構が働いていることを示唆しており、この機構により Trx は実際の生体内で酸化ストレスによって生じる-250 mV から-200 mV 程度の E_h の変化に応答して酸化還元状態を変化させることで、redox センサーとしての役割を果たしていると結論した。



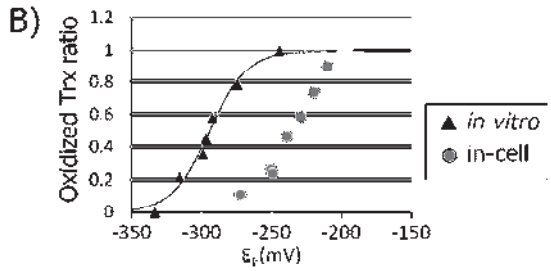


Fig. 3 (A) Real-time in-cell NMR observation of redox status of glutathione and Trx upon oxidative stresses. (B) The redox profile of Trx measured in cell (circle) or *in vitro*(triangle: experimental data, solid line: fitting curve).

P88

NQR用低インピーダンス送受信回路の開発

○大田垣祐衣，大平龍太郎，宮戸祐治，赤羽英夫
大阪大学・大学院・基礎工学研究科

Development of a low impedance transceiver circuit for NQR

○Yui Otagaki, Ryutaro Ohira, Yuji Miyato and Hideo Sato-Akaba
Department of Systems Innovation, Graduate School of Engineering Science, Osaka University

Nuclear quadrupole resonance (NQR) is one of magnetic resonance phenomena, which is caused by the irradiation of an external AC magnetic field at a particular resonance frequency against a target substance containing nuclei with the spin 1 or above. It allows the remote inspection of the target substance by detecting the magnetic resonance signal from the excited substance during its relaxation. The size of the substance inspection system based on a commercially available NQR spectrometer is probably an obstacle to bring to minefields. In this study, a portable NQR system was developed for the substance inspection. Our system was constructed from a low impedance transceiver circuit consisting of a class-D amplifier for transmission, a transimpedance amplifier (TIA) for reception and a transmit-receive (TR) switch circuit. NQR signals were successfully detected by the portable NQR system from ^{14}N in RDX, which is one of the landmine explosives.

【序論】

核四極共鳴（NQR）は、核スピン1以上の原子核を有する物質に対し物質固有の共鳴周波数の交流磁場を照射することにより生じる磁気共鳴現象の一種である。共鳴した物質から緩和過程に生じる磁気信号を検出することによって、物質の有無を調べることができる[1]。特に、爆発物や不正薬物の多くは、核スピン1の窒素原子核を含むため、NQRにより非接触探知が可能である。しかし、NQR装置は一般的に大型であるため移動させることが難しく、屋外での測定が難しかった。NQR装置を小型化することができれば、屋外での地雷、不正薬物探知等への応用が広がると期待される[2]。本装置は、低インピーダンスな送信用D級アンプおよび受信用トランスインピーダンスアンプから構成され、λ/4回路とは異なる送受信切替回路によって駆動することにより、入出力のインピーダンスを50Ω系よりも大幅に低くしている[3]。低インピーダンスの送信用アンプを使用することにより、受信回路の保護電圧を1/5倍にすることができた。また、従来の50Ω受信用アンプとトランスインピーダンスアンプのノイズ性能を比較した。さらに、本装置を用いて爆薬の一種である共鳴周波数3.4 MHzのRDXから^{14}N NQR信号の取得に成功した。

【装置の概要】

開発した可搬型NQR装置の構成をFig.1に示す。装置はNQR制御回路、送受信回路、アンテナからなる。制御回路は市販のFPGA (DE0-NANO, Terasic Technologies社製)をベースに作製し、後段アンプ、バンドパスフィルタ、AD変換回路、D級アンプから構成される。送受信回路は、送受信を切り替えるTRスイッチ、Q（quality factor）スイッチ、共振用コンデンサ、および受信用プリアンプによって構成されている[4]。

核四極共鳴，非接触検知，装置開発

○おおたがきゆい，おおひらりゅうたろう，みやとゆうじ，あかばひでお

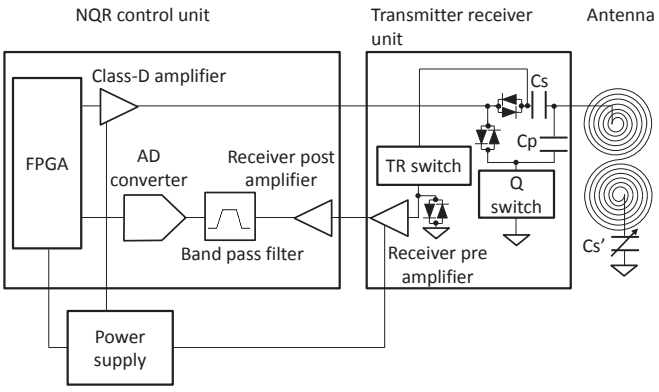


Fig.1. Schematic diagram of a portable NQR spectrometer.

【送信アンプの評価】

本実験では送信用アンプとして、出力が低インピーダンスなD級アンプを作製した。D級アンプの回路はFig. 2の構成である。通常のNQR装置は直列コンデンサと並列コンデンサによってインピーダンスを50 Ωに整合するため、励起パルス電流が分流される。しかし、可搬型装置は送受信切替回路によって送信時は直列共振回路、受信時は直列コンデンサと並列コンデンサからなる共振回路とみなせる。送信時は直列共振回路にすることにより、励起パルス電流が分流されず、アンテナに最大の電流を流すことができる。したがって、アンテナにかかる磁場が一定のとき、必要とされる送信アンプの出力電圧は可搬型装置の方が低い。

送信アンプを従来の50 Ωアンプ（N146-6034A, Thamway社製）と比較するため、同じアンテナ電圧を発生させる場合に必要な送信パルス電圧を計測した。実験はアンテナに設置した差動プローブ（GDP-100, Gwinstek社製）をオシロスコープ（GDS-3254, Gwinstek社製）から測定している。送信アンプの出力電圧は、3.4 MHzの共振周波数において、パルス照射時間50 μsecのときアンテナ電圧が1.25 kVppとなるように調整した。その結果、従来の系では送信アンプの出力が108 V、可搬型装置では19.5 Vとなった。このことから、可搬型装置では送信電圧を1/5倍程度に減らせることが分かった[Fig 3.]。さらに保護電圧も低くなるため、さらなる小型化が可能になる。パルス終了後のリンギング時間が両者において異なるのは、可搬型装置にQスイッチが含まれるからである。可搬型装置では、パルス終了後に上下のMOSFETが開放状態となり、共振器からの残留エネルギーは主にMOSFET間の抵抗25 Ωによって消費される。このQスイッチによりリンギング持続時間が短縮され、信号取得可能な時間を増やすことができる。

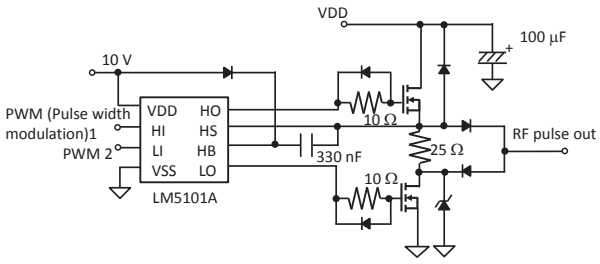


Fig. 2. A half bridge class-D amplifier.

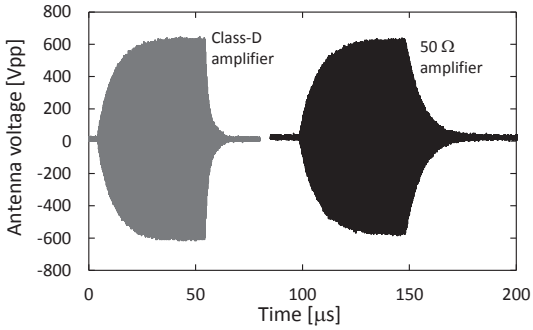


Fig. 3. Transmission waves generated with a commercially available amplifier and the developed class-D amplifier.

【受信用プリアンプのノイズ特性】

受信用プリアンプのノイズ特性を調べるため、ソレノイドコイルからなる共振器（3.4 MHzにおいて5.22 μH, 792 mΩ）に接続したトランスインピーダンスアンプの出力を、ベクトルシグナルアナライザ（8941A, Agilent社製）を用いて計測した。プリアンプの回路図をFig. 4に示す。実験に使用したオペアンプはLT6200-10（Linear Technology社製）およびCLC1001（CADEKA Microcircuits社製）である。実験ではファンクションジェネレータ（WF1973, nf社製）からの疑似信号をピックアップコイルを通して共振器に入力した。その後プリアンプによって増幅された信号をベクトルシグナルアナライザから計測した。共振周波数3.4 MHzにおいて疑似信号を入力した場合と入力しなかった場合のノイズスペクトル密

度の比をSN比と定義している。また、共振周波数を3.4 MHzに保つため、Cs＋Cp=494 pFの状態において実験を行った[Fig 1.]。共振器およびプリアンプはシールドルーム内に設置し、さらに共振器およびマッチング用コンデンサは金属製のシールドボックスに入れている。Fig. 5では2種類のトランスインピーダンスアンプのSN比をCsの関数としてプロットした。

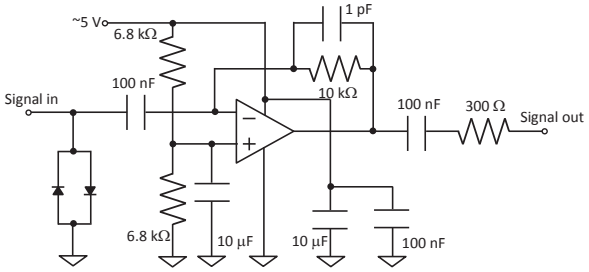


Fig.4. A transimpedance amplifier made from a single op-amp.

共振器から受信した信号は、CsとCpにより分流される。Csの容量が大きい場合、共振器のインピーダンスは低くなり、オペアンプの入力電圧ノイズが支配的になる。これは、オペアンプの電圧ノイズが共振器を通って電流ノイズに変換され、その後フィードバック抵抗10 kΩにより再度電圧に変換されて、出力にあらわれるためである。一方、Csの容量が小さい場合、オペアンプの入力電流ノイズが支配的になる。共振器のインピーダンスが高くなることにより、入力電圧ノイズから変換される電流ノイズは減少する。しかし、入力電流ノイズがフィードバック抵抗を流れる量は変化しないため、入力電流ノイズの割合が大きくなる。

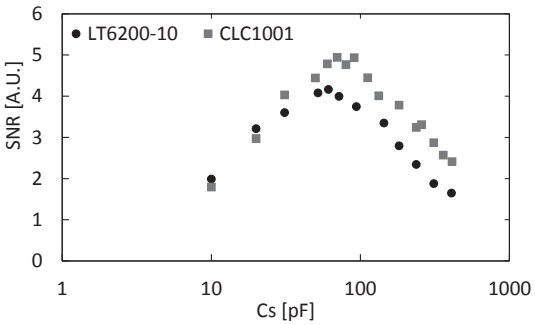


Fig.5. SNRs of the TIAs with the NQR antenna plotted as a function of Cs.

Fig. 5から、使用するオペアンプによって最適なCsとCpの値は異なることが分かる。LT6200-10ではCs61pF、Cp433pFにおいてSN比が最大となり、CLC1001はCs71pF、Cp423pFのときSN比が最大値をとった。実際にベクトルシグナルアナライザによって観測したノイズスペクトル密度をFig. 6に示す。また比較のため従来の50 Ωアンプ3種においても同様の実験を行った。アンプの仕様はTable. 1の通りである。それぞれのアンプは増幅率が異なるため、疑似信号の強度が等しくなるよう規格化した。図中のノイズスペクトル密度のピークは共振器の共振特性によるものである。特にCLC1001は共振周波数3.4 MHzにおいて、入力電圧ノイズが0.25 nV/√Hzの50 Ωアンプと比較してノイズの大きさがほぼ同じであった。この結果から、今回開発したトランスインピーダンスアンプは、共振周波数付近において従来の受信用アンプと同等の性能を有することが分かった。さらに、共振周波数周辺のノイズが1/2倍程度に減少しており、バンドパスサブサンプリングを行う際に発生する折り返しノイズの低減が期待できる。

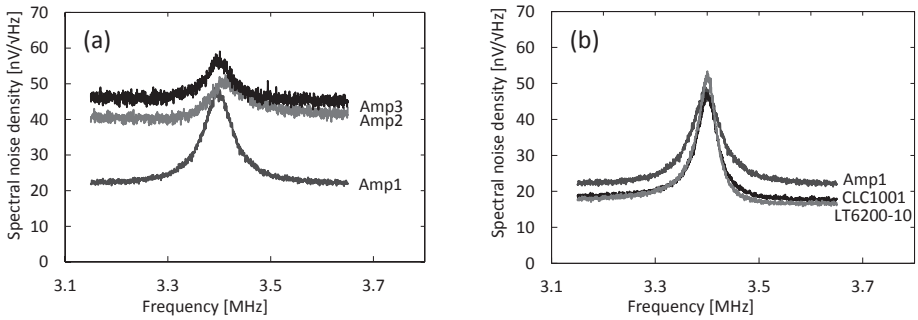


Fig. 6. The noise densities (Resolution bandwidth: 597 Hz) of (a) three commercial 50 Ω amplifiers connected with the NQR antenna, (b) compared with that of the TIA (CLC1001, LT6200-10).

Table. 1. Specifications for TIAs and 50 Ω low noise amplifiers provided by the manufucturer's datasheets.

TIA	GBW [GHz]	Voltage input noise [nV/√Hz]	Current imput noise [pA/√Hz]	NF [dB]
CLC1001	2.1	0.6	4.2	
LT6200-10	1.6	~1.1	3.5	
50 Ω LNA	**Frequency range [MHz]**	**Voltage input noise [nV/√Hz]**	**Current imput noise [pA/√Hz]**	**NF [dB]**
Amp1	0.001-100	~0.25	5.0	0.6
Amp2	1-500			1.0
Amp3	0.1-500			2.9

【NQR信号の計測】

開発した可搬型装置の性能を確認するため、RDX (cyclotrimethylenetrinitramine, 共振周波数：3.41 MHz)を対象物質として、据え置き型の市販装置 (Apollo, Tecmag 社製)と NQR 信号を比較した [5][Fig 7.]。測定条件は、FID (free induction decay)法、アンテナ電圧 1.4 kVpp、パルス照射時間 380 μsec、パルス間隔 40 msec、データ取得時間 1.024 msec、積算回数 500 回とし、1 回あたりのパルスシーケンスの計測時間は 20 sec である。測定した結果、可搬型装置を用いた場合の SN 比は 19、市販の装置を用いた場合は 13 であった。このように従来の構成と同程度の SN 比を得ることができており、持ち運びが容易な本装置で RDX タイプの地雷から NQR 信号を検出できることが期待される。

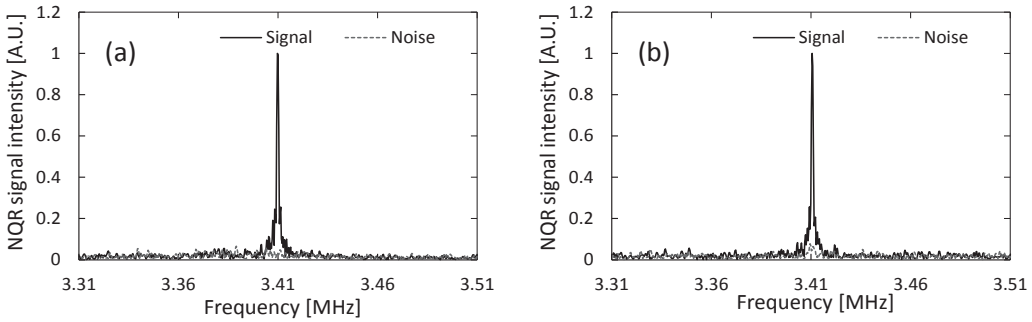


Fig.7. FID signals of RDX (100g) with (a) our developed potable NQR spectrometer and (b) a commercially available spectrometer.

【謝辞】本研究はJSPS科研費 JP26702007の助成を受けたものです。

References

(1) J.B. Miller, Nuclear Quadrupole Resonance Detection of Explosives, Counterterrorist Detection Techniques of Explosives, Elsevier, (2007).

(2) Xinwang Zhang, Nathan Schemm, Sina Balkır, and Michael W. Hoffman, (2014). *IEEE Sensors Journal* 14, 497-507.

(3) Hideo Sato-Akaba, (2014). *Solid State Nuclear Magnetic Resonance* 63-64, 30-36.

(4) Lorena Cardona, Yuji Miyato, Hideo Itozaki, Jovani Jime´nez, Nelson Vanegas and Hideo Sato-Akaba (2015). *Appl. Magn. Reson.* 46, 295-307.

(5) T. N. Rudakov, V. T. Mikhaltsevich and O. P. Selchikhin, (1997). *Appl. Phys.* 30, 1377–1382.

P89

新規ランタノイド結合タグを用いたヒト培養細胞内蛋白質の in-cell PCS 解析

彦根佑哉 [1,2], 平井　剛 [2,3], 三島正規 [1,4], 猪股晃介 [5,6], 池谷鉄兵 [1,4],
○新井崇一郎 [1], 白川昌宏 [3,7], 袖岡幹子 [2,3], 伊藤　隆 [1,4]
[1]首都大学東京大学院理工学研究科, [2]理化学研究所袖岡有機合成化学研究室,
[3]AMED-CREST, [4]CREST/JST, [5] 理化学研究所生命システム研究センター,
[6]PRESTO/JST, [7] 京都大学大学院工学研究科

A new carbamidemethyl-linked lanthanoid chelating tag for PCS NMR spectroscopy of proteins in living HeLa cells.

Yuya Hikone[1,2], Go Hirai[2,3], Masaki Mishima[1,4], Kohsuke Inomata[5,6], Teppei Ikeya[1,4], ○Souichiro Arai[1], Masahiro Shirakawa[3,7], Mikiko Sodeoka[2,3], and Yutaka Ito[1,4]
[1]Department of Chemistry, Tokyo Metropolitan University; [2]Synthetic Organic Chemistry Laboratory, RIKEN; [3]AMED-CREST; [4]CREST/JST; [5]Quantitative Biology Center, RIKEN; [6]PRESTO/JST; [7]Department of Molecular Engineering, Kyoto University

Structural analyses of proteins under macromolecular crowding inside human cultured cells by in-cell NMR spectroscopy are crucial not only for explicit understanding of their cellular functions but also for applications in medical and pharmaceutical sciences. In-cell NMR experiments using human cultured cells however suffer from low sensitivity, thus pseudocontact shifts from protein-tagged paramagnetic lanthanoid ions, analysed using sensitive heteronuclear two-dimensional correlation NMR spectra, offer huge potential advantage in obtaining structural information over conventional NOE-based approaches. We synthesised a new lanthanoid-chelating tag (M8-CAM-I), in which the eight-fold, stereospecifically methylated DOTA (M8) scaffold was retained, while a stable carbamidemethyl (CAM) group was introduced as the functional group connecting to proteins. M8-CAM-I successfully fulfilled the requirements for in-cell NMR: high-affinity to lanthanoid, low cytotoxicity and the stability under reducing condition inside cells. Large PCSs for backbone N-H resonances observed for M8-CAM-tagged human ubiquitin mutant proteins, which were introduced into HeLa cells by electroporation, demonstrated that this approach readily provides the useful information enabling the determination of protein structures, relative orientations of domains and protein complexes within human cultured cells.

細胞内の高密度で多様な分子の存在は，細胞内蛋白質の立体構造に複合的な影響を与えている．このような細胞内の構造生物学的情報は，当該蛋白質の活性発現の構造的基盤の理解のために極めて重要であるが，現在 *in situ* で詳細な構造生物学的解析が可能な手法は in-cell NMR のみである．

私たちのグループでは，大腸菌の系を用いて細胞内環境下での蛋白質の立体構造決定を行い[1]，さらに，Sf9/vaculovirus の系を用いて 3D NOESY 測定に基づく高次構造情報の取得が可能であることを示した[2]．しかし，ヒト培養細胞を用いた in-cell NMR 解析の場合，達成できる標的蛋白質の細胞内濃度が低いことから，3D NOESY を用いた高次構造取得は困難と考えられた．そこで，NOE 情報に代わる立体構造情報として，ランタノイド金属（Ln^{3+}）を用いた pseudocontact shift (PCS)の取得を試みる

In-cell NMR, PCS, DOTA

ひこねゆうや，ひらいごう，みしままさき，いのまたこうすけ，いけやてっぺい，○あらいそういちろう，しらかわまさひろ，そでおかみきこ，いとうゆたか

こととした．標的蛋白質自身が Ln^{3+}と強い親和性を持っている場合を除いて，蛋白質への Ln^{3+}導入は Ln^{3+} chelating tag (LCT)と総称されるプローブを用いた化学修飾によって行われることが多い．しかし，Ln^{3+}は細胞毒性が高いため，LCT には，Ln^{3+}に対する非常に高い親和性が要求される．また，細胞内は還元的条件であるため，LCT との結合に通常用いられる S-S 結合は不適である．そこで，Ln^{3+}と非常に高い親和性を持つ DOTA 骨格を持ち，還元条件で安定なプローブ[Ln（M8-CAM-I）]の合成を行った（**Fig.1**）．この化合物を用いて蛋白質を修飾し，電気穿孔法を用いて HeLa 細胞に導入して，実際に PCS を測定することに成功したので報告する[3]．

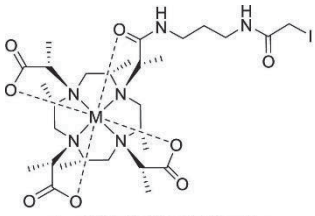


Fig. 1 Structure of [Ln(M8-CAM-I)].

[Ln(M8-CAM-I)]は $^{t}Bu_3$-M_4DOTMA-OH [4]を出発物質として合成し，反磁性の Lu^{3+}もしくは常磁性の Dy^{3+}を結合させた．HeLa 細胞中の in-cell NMR 測定のために導入した変異（L8A/I44A/V70A）と，M8-CAM-I との結合反応のために導入した 2 種の Cys 変異（K6C, S57C）を持つ ^{15}N 標識ヒト・ユビキチン蛋白質［Ub(3A+K6C)，Ub(3A+S57C)］を調製し，それぞれ[Lu(M8-CAM-I)]と[Dy(M8-CAM-I)]と反応させた．得られた Ln^{3+}標識蛋白質を電気穿孔法を用いて HeLa 細胞に導入し，^{1}H-^{15}N SOFAST-HMQC スペクトルを測定した結果，大きな PCS を観測することに成功した（**Fig.2**）．

本研究で確立した手法を用いることで，ヒト培養細胞内の蛋白質の立体構造解析が可能になる．また，マルチドメイン蛋白質の細胞環境下での各ドメインの相対配置の決定や，細胞環境下での蛋白質間相互作用の詳細な解析にも応用可能である．

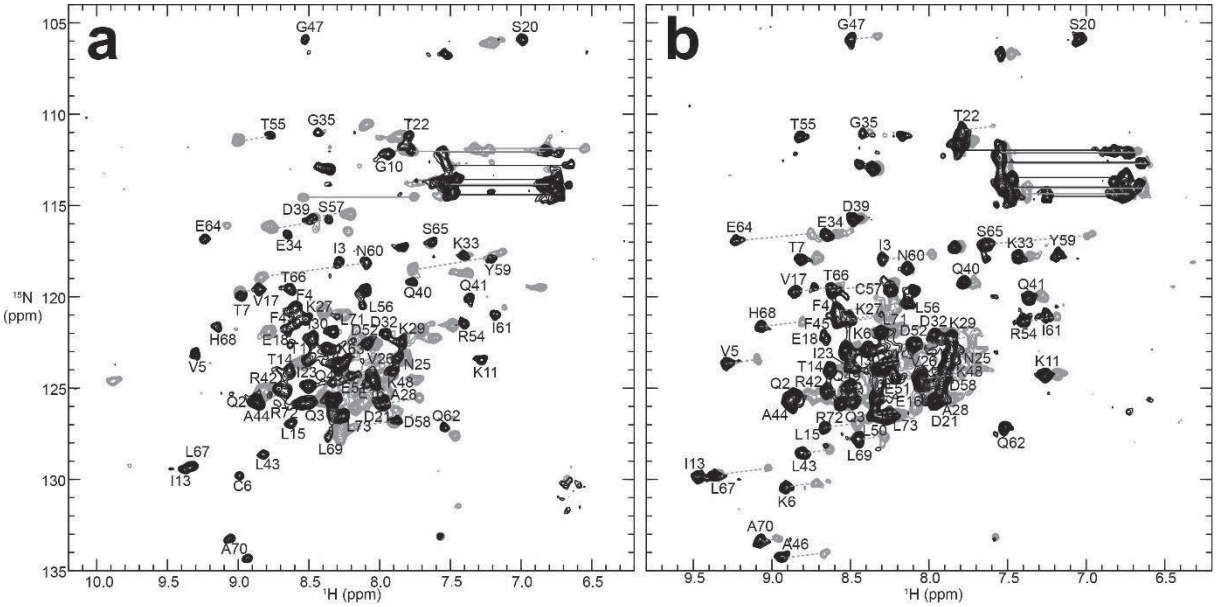


Fig. 2 ^{1}H-^{15}N SOFAST-HMQC spectra of (**a**) Ub(3A+K6C) and (**b**) Ub(3A+S57C) tagged with diamagnetic [Lu(M8-CAM)] (black) and paramagnetic [Dy(M8-CAM)] (grey) in living HeLa cells. The spectra were recorded at the probe temperature of 310 K and magnetic field strength of 21.2 T. Cross peaks are labelled with their corresponding backbone assignments.

References

[1] Sakakibara, D. et al. “Protein structure determination in living cells by in-cell NMR spectroscopy.” *Nature* **458**, 102-105 (2009); [2] Hamatsu, J. et al. “High-resolution heteronuclear multidimensional NMR of proteins in living insect cells using a baculovirus protein expression system.” *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 1688-1691 (2013); [3] Hikone, Y. et al. “A new carbamidemethyl-linked lanthanoid chelating tag for PCS NMR spectroscopy of proteins in living HeLa cells” *J. Biomol. NMR*, accepted (2016); [4] Häussinger, D. Huang, J.R. & Grzesiek, S. “DOTA-M8: An extremely rigid, high-affinity lanthanide chelating tag for PCS NMR spectroscopy.” *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 14761-14767 (2009).

P90

NMR-NQR二重共鳴法を用いたNQR信号高感度化

○大平龍太郎，大田垣祐衣，韓猛，宮戸祐治，赤羽英夫
大阪大学・大学院・基礎工学研究科

NMR-NQR double resonance technique for enhancement of NQR signals

○Ryutaro Ohira, Yui Otagaki, Meng Han, Yuji Miyato, Hideo Sato-Akaba
Department of Engineering Science, Osaka University

Nuclear quadrupole resonance (NQR) is a promising method for detection of the counterfeit medicines, since almost all of the pharmaceutical products contain nitrogen with the nuclear quadrupole spins, and their NQR frequencies are specific to the crystal structures. However, NQR signals are too weak to be measured within a reasonable detection time from a small amount of sample such as tablets. In order to increase the NQR signal intensity, we used NMR-NQR double resonance technique, which enhances the NQR signal intensities by transferring polarization from ^{1}H spin and ^{14}N spin systems via dipole-dipole interaction. A prototype of the experimental equipment to observe the effect of NMR-NQR double resonance was developed, and the signal enhancement factors were evaluated due to the cross polarization. Four of the tested five samples showed the signal enhancement and their enhancement factors were 1.7, 17, 9.1 and 7, for imidazole, metformin hydrochloride, diethylamine hydrochloride and acetaminophen, respectively.

[序論] 核四極共鳴(NQR)は、四極子核と電場勾配との電気的な相互作用によって核スピンのエネルギー準位が分裂することで生じる磁気共鳴現象である。また、NQR周波数は物質に固有であるため、物質同定法として有効である。そこで、多くの医薬品が四極子モーメントを持つ窒素原子核を含む点に着目し、近年世界的な脅威となっている偽造医薬品のNQR法を用いた摘発技術が期待されている[1)]。しかし、NQR信号は非常に信号強度が弱く、医薬品のような微量サンプルから短時間に十分な信号対ノイズ比を得ることは困難である。そこで、NQR信号の高感度化技術として、事前分極した水素原子核の磁化を窒素原子核に移動させる交差分極NMR-NQR二重共鳴法[2)]が報告されている。本研究では、NMR-NQR二重共鳴法を利用した実験装置を作製し、実際に5種類の医薬品もしくはその原料からNQR信号を取得することでNMR-NQR二重共鳴法の有用性を検討した。

[交差分極NMR-NQR二重共鳴法] 交差分極法とは、静磁場下で試料に含まれる水素原子核を事前に分極させ、水素原子核のスピン系が得た磁化を窒素原子核のスピン系に移すことによって、窒素原子核スピンの分布比を操作する手法である。つまり、磁化移動により励起可能な窒素原子核スピンの数が多くなり、NQR信号の高感度化が可能になる。

まず、熱平衡状態における水素原子核と窒素原子核のスピン系を考えると、エネルギー準位間におけるスピンの分布比は、両者ともにボルツマン分布に従う。ここで、水素原子核の2準位間の核スピンの分布比ΔN_{P}は、ゼーマンエネルギーE_{H}を用い(1)式のように書ける。

$$\Delta N_{\mathrm{P}} = exp(-E_{\mathrm{P}}/kT_{\mathrm{P}}) = exp(-h\nu_{\mathrm{P}}/kT_{\mathrm{P}}) \quad (1)$$

NQR，二重共鳴，偽造医薬品

○おおひらりゅうたろう，おおたがきゆい，かんもう，みやとゆうじ，あかばひでお

ただし、T_{P}を水素原子核のスピン温度、ν_{P}を水素原子核のNMR共鳴周波数とした。四極子モーメントを有する窒素原子核スピンの分布比ΔN_{Q}も同様にして、四極子核と電場勾配との相互作用によって分裂するエネルギー準位の大きさをE_{Q}とすると(2)式のように書ける。

$$\Delta N_{\mathrm{Q}} = exp\left(-E_{\mathrm{Q}}/kT_{\mathrm{Q}}\right) = exp\left(-h\nu_{\mathrm{Q}}/kT_{\mathrm{Q}}\right) \tag{2}$$

ただし、T_{Q}を窒素原子核のスピン温度、ν_{Q}を窒素原子核のNQR共鳴周波数とする。ここで、水素原子核の磁気回転比(Υ_{P})は窒素原子核のそれ(Υ_{Q})に比べて14倍である。つまり、$\Upsilon_{\mathrm{P}} > \Upsilon_{\mathrm{Q}}$となるため、高磁場下においては、水素原子核のNMR共鳴周波数は窒素原子核のNQR共鳴周波数よりも大きく、(1), (2)式より以下の関係が成り立つ。

$$\Delta N_{\mathrm{P}} > \Delta N_{\mathrm{Q}} \tag{3}$$

ここで、水素原子核の格子緩和時間より速く、外部磁場の印加を止めた場合において、スピン温度の観点から両者のスピン分布差について議論する。(1),(2),(3)式からわかるように、水素原子核のスピン系は冷たい熱浴、窒素原子核のスピン系は暖かい熱浴であると考えることができる。ここで、外部磁場の強度を(4)式の条件を満たすように調整することによって、両者のスピン系の熱的接触が実現される。

$$h\gamma_{\mathrm{P}}B/2\pi = h\nu_{\mathrm{P}} = h\nu_{\mathrm{Q}} \tag{4}$$

この状態において、それぞれの原子核スピンの分布差は、異種スピン間の磁気双極子相互作用を通じ、(5)式を達成するように拡散する。

$$\Delta N_{\mathrm{P}} = exp(-h\nu_{\mathrm{P}}/kT_{\mathrm{S}}) = exp\left(-h\nu_{\mathrm{Q}}/kT_{\mathrm{S}}\right) = \Delta N_{\mathrm{Q}} \tag{5}$$

ただし、T_{S}は熱的接触によって新たに達成される熱平衡状態にある両者共通のスピン温度である。以上の過程を模式的に示したものが、Fig.1であり、交差分極の前後でスピンの分布差が変化する。さらに、Fig.2に示すように、四極子モーメントに起因する窒素原子核スピンのエネルギー準位は3つ存在するので、交差分極の過程が3回起こる。その結果、窒素原子核スピンの分布差が拡大し、NQR信号増幅されることになる。

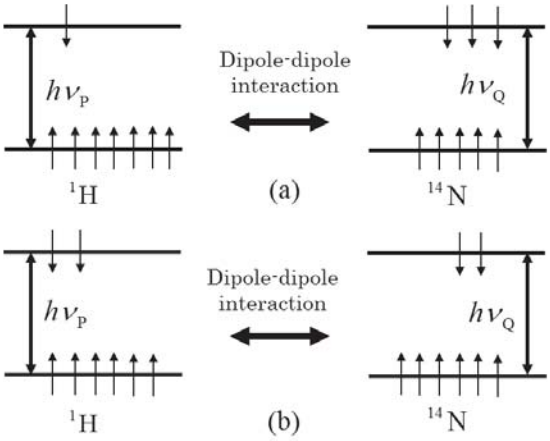


Fig.1 Schematic diagram of energy diagram (a) before and (b) after cross polarization. When ^{1}H NMR and ^{14}N NQR energy splittings become equal (level crossing), the relative spin population difference equalize via dipole-dipole interaction.

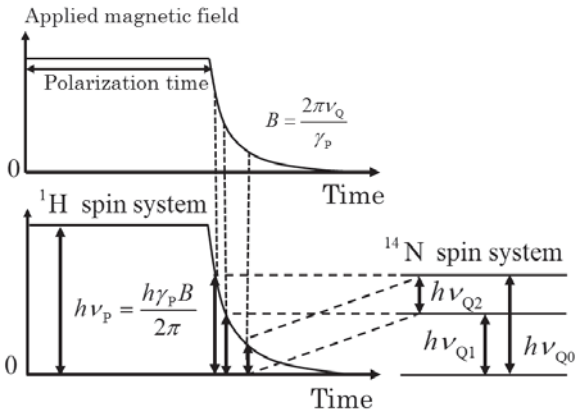


Fig.2 Schematic diagram of level crossings during the ^{1}H demagnetization process. ^{14}N has three different NQR frequencies, which means the level crossing occurs three times during the demagnetization process.

[実験方法] Fig.3 に示すような計測装置を構築した。まず、永久磁石からなる磁気回路を用いるこ

とで試料を静磁場下に一定時間置き、分極させる。その後、試料を試料移動機構を用いて、NQR検出用プローブの位置まで移動させる。その際、移動機構の制御回路は、NQR spectrometer (TECMAG 社, Apollo)から出力させるトリガー信号に同期させ、移動用コイルに流す電流を制御する。移動用コイルは左右 2 つあり、Fig.3 に示した場合には、左側の移動用コイルに発生させた磁場と反発することにより、移動用磁石が左から右へ移動し、右側の移動用コイルには、吸引するように磁場を発生させて、移動用磁石を停止させる。この時、移動用コイルに連結させたアクリルの棒の先にある試料が NQR プローブの中心に移動することになる。NQR 励起用パルスシーケンスは、試料が NQR プローブに到達すると同時に開始し、NQR 信号を取得できる仕組みとなっている。また、窒素原子核スピンも外部磁場とゼーマン相互作用が加わると、四極子エネルギーの分裂幅に分布が生じ、NQR 信号の取得が困難になる。そのため、NQR プローブ近傍の磁場を低減する必要がある。NQR プローブ近傍の磁場強度と NQR 信号強度の関係を調べた結果、NQR プローブ近傍磁場強度が 1 mT よりも小さければ、その影響をほぼ無視できることが分かった。そこで、NQR プローブを磁気シールドで覆うことにした。試料は、医薬品等の主成分であるイミダゾール、メトホルミン塩酸塩、ジエチルアミン塩酸塩、アセトアミノフェン、HMT の 5 種類を用いた。また、励起パルスシーケンスとして、高感度検出に有利な Spin-Locking Spin-Echo (SLSE)法を主に用い、格子緩和時間が短い HMT (hexamethylenetetramine)には Strong Off Resonance Comb (SORC)法を用いた。

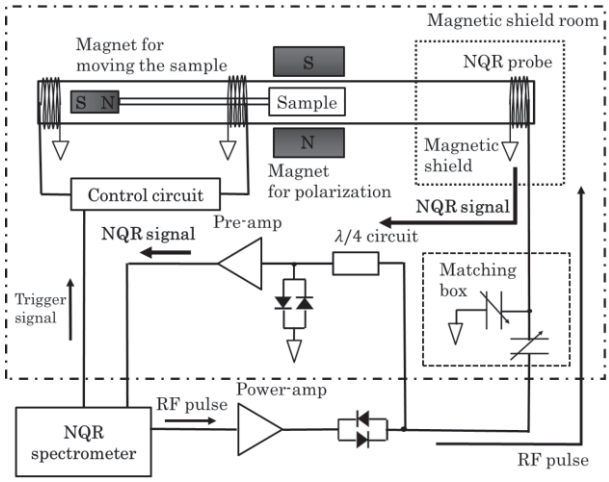


Fig.3 Schematic diagram of the NQR measurement system using cross polarization method.

[結果と考察] 試料それぞれのNQR周波数、および試料の質量、分極時間、スピン-格子緩和時間ならびに実験で得られた信号の増加率をTable. 1に記載する。また、Fig.4にはHMTを除いた4種類の物質の分極時間と信号強度の関係を調べた結果を示す。ここで増加率は、分極により飽和した信号強度を分極前の信号強度で割ることにより算出した。HMT以外の試料において信号の増強が確認された。一方、HMTでは、信号の増強が確認できなかった。その理由は、HMTにおいて^{14}Nのスピン-格子緩和時間が試料の移動時間(160 ms)に比べ20倍短いことから、信号計測時には、励起された分極が交差分極前の熱平衡状態に戻ってしまったためだと考えられる。次に、メトホルミン塩酸塩を試料

Table 1 NQR frequency, sample weight, polarization time, spin-lattice relaxation time and measured enhancement factor of each sample.

	Imidazole	Metformin hydrochloride	Diethylamine hydrochloride	Acetaminophen	HMT
NQR frequency	1.368 MHz	2.61 MHz	1.006 MHz	2.564 MHz	3.308 MHz
Sample weight	100 mg	66 mg	100 mg	200 mg	100 mg
Polarization time	5.5 s	30 s	10 s	99 s	5 s
T_1	1.2 s	11 s	1.1 s	11 s	8 ms
Enhancement factor	1.7 (730 mT)	17 (730 mT)	9.1 (800 mT)	7 (800 mT)	1 (800 mT)

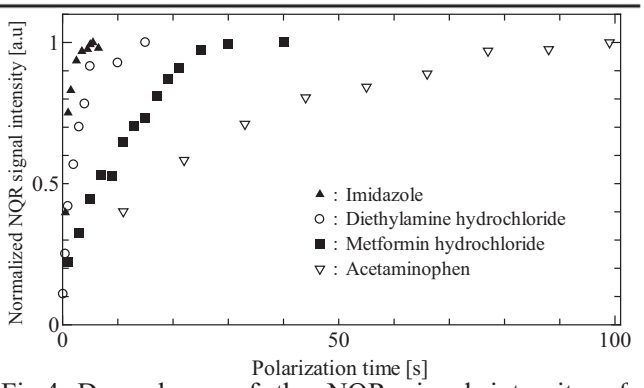


Fig.4 Dependence of the NQR signal intensity of imidazole, diethylamine hydrochloride, metformin hydrochloride and acetaminophen on polarization time.

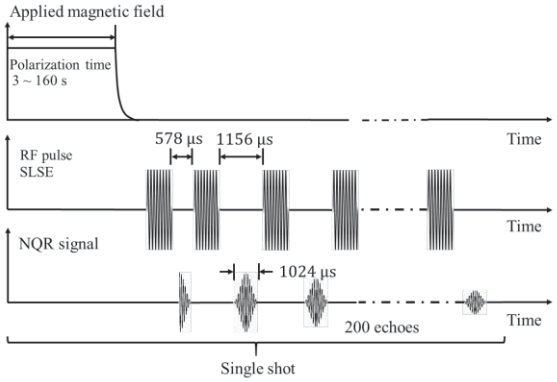


Fig.5 Schematic diagram of single measurement sequence for metformin hydrochloride.

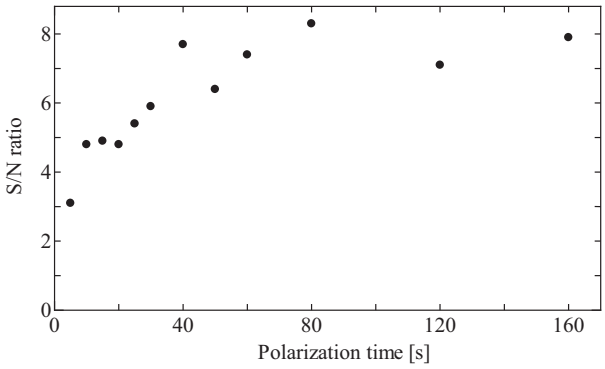


Fig.6 Dependence of signal-to-noise ratio on polarization time for metformin hydrochloride.

として積算回数1回の条件でNQR信号のS/N比と分極時間の関係を調べた。分極時間を、3 sから160 sの範囲に設定し、Fig.5に示すシーケンスを用いて計測を行った。その結果がFig.6であり、交差分極を用いることで信号強度が増強されており、100mg以下の試料であっても、積算1回でNQR信号を検出できることが示せた。

さらに、装置の再現性評価として、実際の医薬品タブレット(アセトアミノフェン)を用いて、NQR信号のばらつきを調べた。実験の条件として、分極時間 22 s、積算回数 16回、パルスシーケンスとしてSLSEを用いて、エコー信号の取得回数を500, 1000, 2000回とした3通りの場合に対し、NQR信号をそれぞれ10回測定した。得られた結果の平均値を1として規格化し、それぞれの場合に対し標準偏差を計算してみると、500回：0.014, 1000回：0.054, 2000回：0.034 という結果が得られた。本研究の目的は、偽造医薬品の摘発技術への応用であり、この結果から本装置は、十分実用に耐えうる精度を有していると考えられる。

以上の結果より、NMR-NQR二重共鳴法を用いることで、試料の移動時間よりもスピン-格子緩和時間が短いHMT除いた4種類の試料で信号強度の増強が確認できた。以上より、NMR-NQR二重共鳴法がNQR信号のS/N比の改善に非常に有効な手段であることが示せた。また、本研究で用いた装置系の評価も行い、その結果、一定の信頼性を保っていることを確認した。今後の展望としては、可搬型でより経済的な偽造医薬品検査装置の開発に取り組むことを考えている。

[謝辞] 本研究はJSPS科研費 JP26702007の助成を受けたものです。

[参考文献]

1)Jamie Barras, Darragh Murnane, Kaspar Althoefer, Sulaf Assi, Michael D. Rowe, Iain J. F. Poplett, Georgia Kyriakidou, John A. S. Smith, “Nitrogen-14 Nuclear Quadrupole Resonance Spectroscopy: A Promising Analytical Methodology for Medicines Authentication and Counterfeit Antimalarial Analysis”, Anal. Chem., 2013, 85 (5), pp 2746–2753

2) Janko Lužnik, Janez Pirnat, Vojko Jazbinšek, Tomaž Apih, Robert Blinc, Janez Seliger and Zvonko Trontelj, “Improved 14N nuclear quadrupole resonance detection of trinitrotoluene using polarization transfer from protons to 14N nuclei”, JOURNAL OF APPLIED PHYSICS 102, 084903 (2007)

P91

MRIを用いた小児骨年齢測定へのDeep Learningの応用

○皆川新[1]，寺田康彦[1]，巨瀬勝美[1]
[1]筑波大学・大学院・数理物質科学研究科

The application of deep learning to pediatric bone age measurements using MRI

○Shin Minagawa[1], Yasuhiko Terada[1], Katsumi Kose[1]
[1] *Graduate School of Pure and Applied Sciences, Tsukuba University*

Bone age is a biological measure of a child's growth, which is often manually assessed by rating the maturity of bones in a radiograph of the left hand. In a previous study, we showed the validity of assessing bone age using MRI [1] However, the acquired MR images are three-dimensional and the skeletal assessment is time-consuming. Recently, deep learning strategies for classification of big data have attracted considerable attention. In this study, we apply a deep learning framework with a convolutional neural network (CNN) to the bone age assessment.

近年，人工知能(AI)の研究ブームが再燃している．具体例として，Googleの猫認識(2012)やIBMのワトソン(2011)などが挙げられ, それらは今迄の人工知能に比べてはるかに高性能になっている．その要因は，計算機の能力の向上により，より深いdeep learning(深層学習)が可能になったことにある(2)．本研究では，当研究室で行っているMRIを用いた小児骨年齢測定に対し，deep learningを応用することを目的とした．小児骨年齢測定とは，左手の骨の画像を使って，骨の形状や大きさをもとに成長段階別に分類し, 各骨に与えられた点数(骨スコア)をもとに換算表を用いて骨年齢を求める方法である．通常，骨の点数付けは医師が行うが，本研究ではその代わりにdeep learningを用いて骨年齢の算出を行った．

骨年齢の算出には，女児の左手の骨の3次元MR画像データ(データ数40個，データサイズ512×128×32)から，骨年齢測定で評価する対象となる骨の一部を切り出したもの(データ数120個，データサイズ28×28×8)をデータセットとして用いた．対象とした骨は，proximal phalanx Ⅰ(PPⅠ)，PPⅢ，PPⅤの3つである(Fig. 1).

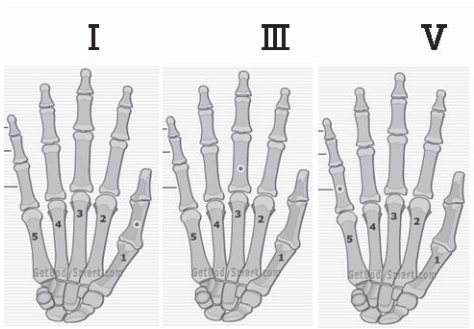


Fig. 1. proximal phalanx.

deep learningを行うには, データ数120個では不十分と考え，データセットの拡張を行った．それぞれのデータに対し，拡大・縮小，平行移動，コントラスト変化等の処理を行い，3000個のデータとなるように拡張を行った．

拡張を行ったデータセットは，医師の骨年齢判定により算出した骨年齢をもとにクラス分けを行った．クラス分けは，骨年齢を1歳刻みにした場合と，0.5歳刻みにした場合の2通りで行った．

Deep Learning，小児骨年齢測定

○みながわしん，てらだやすひこ，こせかつみ

本研究では，2層のconvolutional neural network(CNN)を用いた．入力画像に対して，畳み込みと最大値プールを行い，抽出した特徴量を3層のパーセプトロンへの入力層とした．3層のパーセプトロンの隠れ層への活性化関数には，正規化線形関数を用い，出力層とは全結合した．学習法には確率的勾配降下法を用い，学習率はAdam法で反復のたびに更新した．モデルの実装にはChainerと呼ばれるフレームワークを用いた[(3)].

各クラスで学習回数(epoch)を1000回にして学習した結果を示す(Fig. 2，Fig. 3)．どちらも学習回数800回ほどで，正答率0.98～1.00の間に収束した．

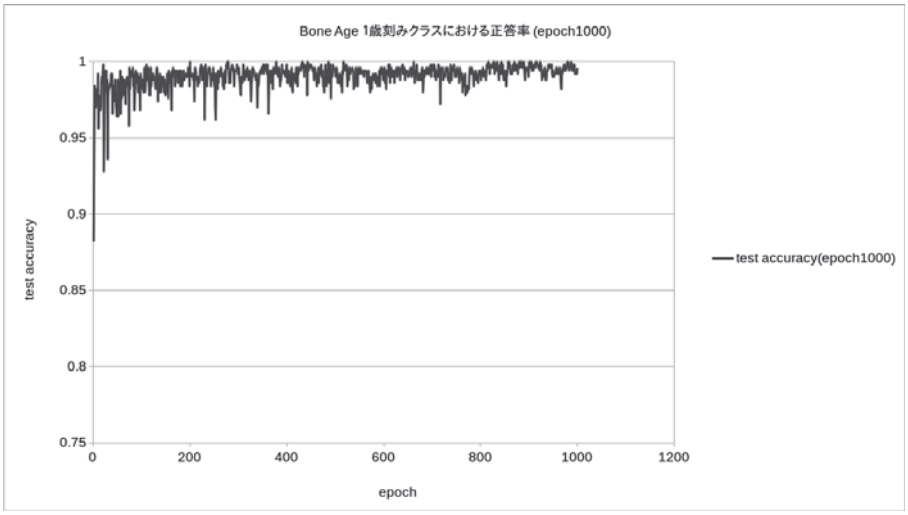


Fig. 2 Accuracy (1 year increment).

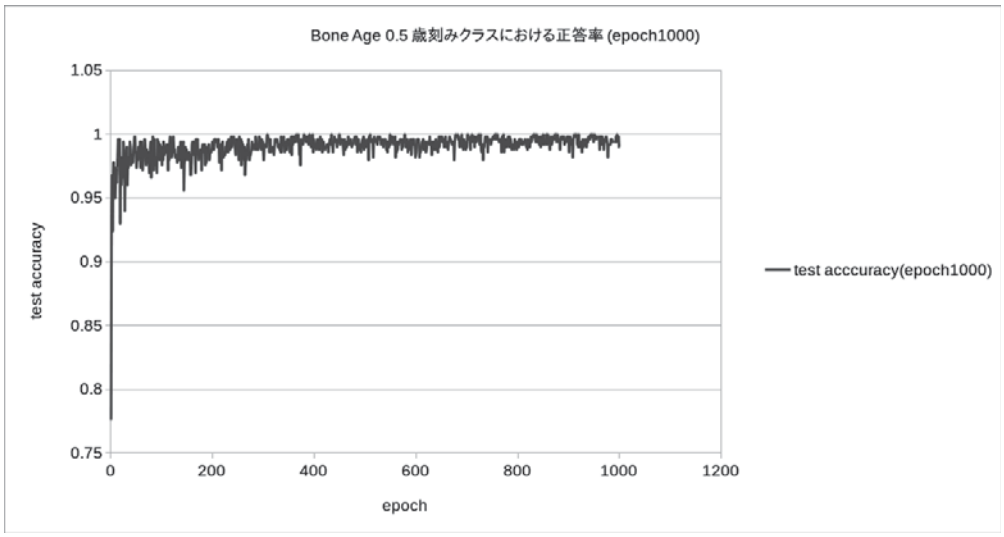


Fig. 3 Accuracy (0.5 year increment).

References

(1) Y. Terada et al., Skeletal age assessment in children using an open compact MRI system. Magn Reson Med 2013; 69:1697-1702.

(2)Quoc V. Le, Marc'Aurelio Ranzato, Building High-level Features Using Large Scale Unsupervised Learning(ICML 2012)

(3)http://docs.chainer.org/en/stable/

P92

理論化学シフト･スピン結合定数と構造相関モデル式を用いた代謝混合物同定法の構築

○尾渕由佳[1]，伊藤研悟[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

Development of assignment method of metabolic mixtures by using structural correlation analysis with theoretical chemical shifts and spin-spin coupling constants

○Yuka Obuchi [1], Kengo Ito [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.

In NMR analysis of metabolic mixtures, accurate assignment of signals of metabolites and identification of unknown metabolites from un-assigned signals are important issues. Quantum chemical calculation is enable to estimate NMR signals of metabolites, however, theoretical and experimental chemical shift do not necessarily coincide. So, we tried to construct the support protocol of signal assignment by using structural correlation analysis with theoretical calculation and machine learning. In this study, 16 metabolites were used for NMR measurements and theoretical calculation. Scaling factor was calculated by support vector machine as machine learning for correction of theoretical chemical shifts, corrected theoretical chemical shifts were close to experimental chemical shifts than uncorrected theoretical chemical shifts. Furthermore, by improving the model formula, accurate prediction of chemical shifts was considered to be possible.

【序論】

生体試料や食品等の代謝混合物のNMR解析において、正確な代謝物シグナルの帰属や未帰属シグナルからの未知物質同定は重要課題である。量子化学計算を用いた理論計算によりシグナル予測が可能であると考えられるが、実際には理論および実測化学シフト値との差が著しい。そのため、理論値に対して立体構造・化学シフト相関解析を基にしたスケーリングファクターにより再度補正する必要がある。ここでは16種の代謝物の溶液NMR測定と量子化学計算を用いて化学シフトを計算し、機械学習を用いて作られたモデル式による理論化学シフトの補正を試みた。本研究ではスケーリングファクター算出方法も含めたシグナル帰属支援プロトコルの確立を試みた。

【方法】

16種の化合物を各2mMになるようにKPi/D_2O中に混合し、^{1}H-NMR、^{13}C-NMR、^{1}H-^{13}C HSQC、^{1}H-^{13}C HSQC-TOCSYの計測を行った。溶液状態での化学シフトを当研究室で開発されたSpinAssignおよびBMRB、HMDBを用いて帰属し、その化学シフトを実測値とした。溶液状態における16種の化合物の理論値は、Gaussian09を用いて計算した。計算レベルSCRF/BY3LP/6-311++G(d,p)にて構造最適化後、GIAO法により理論化学シフト及びスピン結合定数を算出した。その後、化学シフトの理論値と実測値の誤差を目的変数、原子の周囲の環境と理論スピン結合定数を説明変数とし、機械学習を用いて理論値に対してのスケーリング値を求めた。本研究のストラテジーをFig. 1に示す。

機械学習、量子化学計算、スケーリングファクター

○おぶちゆか，いとうけんご，きくちじゅん

【結果および考察】

理論化学シフトを補正する前と補正した後、それぞれの実測値と比較した（Fig. 2）。補正後の理論値と実測値との誤差はδ^{13}Cで最大13.81 ppm、δ^{1}Hで0.76 ppmとなった。補正前と比較すると、実測値との誤差がδ^{13}Cで7.12 ppm、δ^{1}Hで0.02 ppm縮まった。また、平均二乗誤差（RMSD）で補正前と補正後を比較すると、補正前はδ^{13}Cが7.76 ppm、δ^{1}Hが0.29 ppmであったのに対し、補正後はδ^{13}Cが3.76 ppm、δ^{1}Hが0.24 ppmとなり、スケーリングファクターによって補正された理論化学シフトは補正される前の理論化学シフトよりも実測値に近い値になった。この結果からスケーリングによって補正された化学シフトはより精度よく予測できることが確認された。さらに精度を向上させるため、機械学習におけるパラメータのさらなる検討が必要であると考えられた。特に機械学習アルゴリズムの選択、説明変数の追加や変更、計算手法のチューニングが必要だと考えられた。正確に化学シフトを予測することができれば、NMR解析で困難な未知物質のシグナル帰属に役立てることが可能だと考えられた。

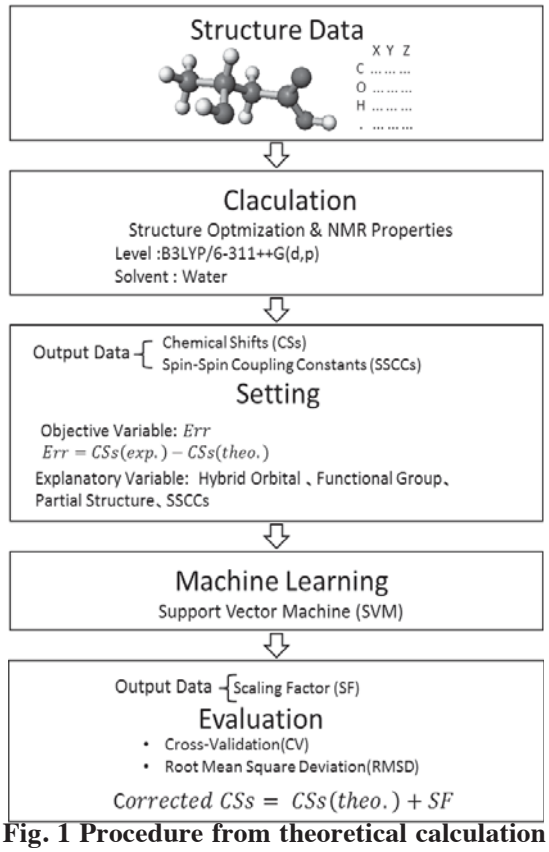


Fig. 1 Procedure from theoretical calculation to correction.

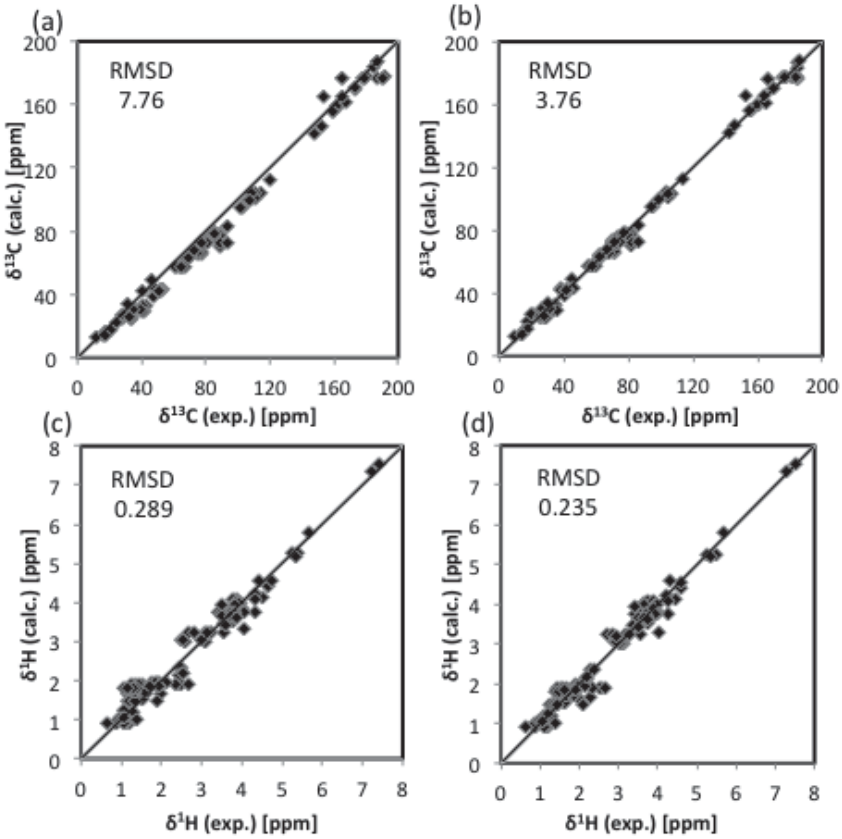


Fig.2 Experimental data compared with (a) theoretical δ^{13}C, (b) corrected δ^{13}C, (c) theoretical δ^{1}H, and (d) corrected δ^{1}H.

【参考文献】

1. Ito, K., Tsutsumi, Y., Date, Y. and Kikuchi, J., *ACS Chem. Biol.* **2016**, 11, 1030–1038.
2. Misawa, T., Komatsu, T., Date, Y. and Kikuchi, J., *Chem. Commun.* **2016**, 52, 2964–2967.
3. Komatsu, T., Ohishi, R., Shino, A. and Kikuchi, J., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, 55, 6000–6003.
4. Chikayama, E., Shimbo, Y., Komatsu, K. and Kikuchi, J., *J. Phys. Chem. B* **2016**, 120, 3479–3487.

P93

オーバーハウザー効果に現れる非線形性と非平衡熱力学的特徴

○戸田充[1,2]，藤井裕[1]，光藤誠太郎[1]，出原敏孝[1]
[1]福井大学・遠赤外領域開発研究センター
[2]（株）JEOL RESONANCE・技術部

Non-Linearity and non-equilibrium thermodynamical characteristics appearing in the Overhauser effect

○Mitsuru Toda[1,2], Yutaka Fujii[2], Seitaro Mitsudo[2], Toshitaka Idehara[2]
[1] *Research Center for Development of Far-Infrared Region, University of Fukui*
[2] *JEOL Resonance Inc., Engineering Division*

The mechanism of the Overhauser effect has been considered in view of the micro-wave power and change of the detailed valance. When the Overhauser effect occurs in the system, the fluctuation induced by the non-linear coupling between the electron spin system and the nuclear spin system developes in the high power electromagnetic wave irradiated state, which could have been ignored in the equilibrium state. While the non-linear fluctuation developes, the entropy flow from the nuclear spin system to the lattice appears at the certain threshold value of the micro-wave power, and also the dissipative structural magnetization arises in the nuclear spin system.

動的核偏極の物理的メカニズムは、現在に至るまで、約 60 年前のオーバーハウザーの理論[1]に基づいて説明される事が多いが、オーバーハウザーが最初に発表したときは、多くの深い懐疑的な態度をもって迎えられたらしい[2]。その後、実験検証が進んだことで、オーバーハウザーのアイディアは受け入れられたが、“熱力学第二法則に反するのではないか”という疑念についての議論はあまり語られない。図 1 に、オーバーハウザー効果が出現する際の、マイクロ波照射に依存した、共鳴現象の状態変化をまとめる。

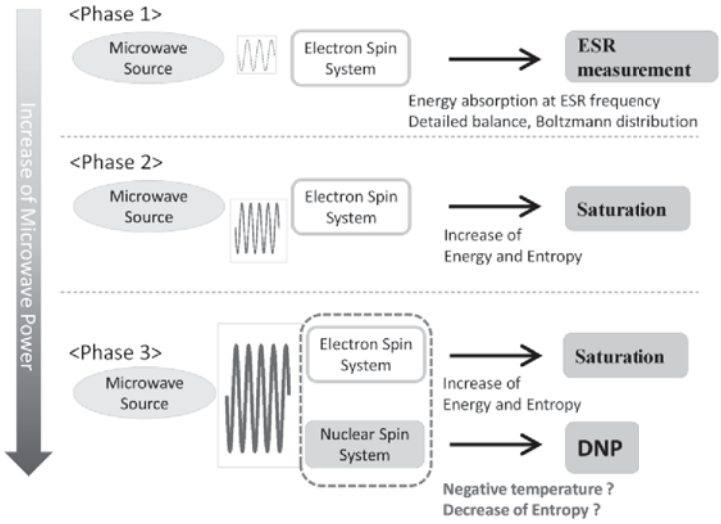


Fig. 1. Illustration of the irradiated microwave power effect on the magnetic resonance phenomena.

オーバーハウザー効果，詳細釣り合い，非平衡

○とだみつる，ふじいゆたか，みつどうせいたろう，いではらとしたか

点線で分けた上段を Phase1、中段を Phase2、下段を Phase3 と呼ぶと、最も劇的な共鳴現象の変化は、Phase2 から 3 に移行するときの、DNP の出現である。照射エネルギーの増大と共に電子スピン系が飽和しているのは Phase2 も 3 も変わらないが、Phase3 においては、エントロピーが減少しているので、孤立系に対して適用されるエントロピー増大の法則

$$\frac{dS}{dt} > 0 \qquad (1)$$

が成立していないように見える。この問題が、当初、オーバーハウザーの主張が懐疑的な態度で迎えられた理由の核心である。しかし、オーバーハウザーが議論した核スピン系は、式（2）に示すように、ともに量子数 1/2 の電子スピンSと核スピンIの電子－核スピン系において、外部磁場H_0の下で超微細相互作用Aで電子スピン系と結合した状態にある。

$$H = \gamma_e \hbar H_0 S_z - \gamma_n \hbar H_0 I_z + A\boldsymbol{I}\cdot\boldsymbol{S} \qquad (2)$$

超微細相互作用 A としては、オーバーハウザー効果が最初に観測された極低温下の金属をモデルとして、s 電子と核のフェルミ接触項を想定する。すなわち、核スピン系は、超微細相互作用 A を通じて外界とつながり、マイクロ波照射、エネルギー流の影響を受けていることから、孤立系でも熱平衡状態でもない。したがって、式(1)を核スピン系に当てはめようとするのは妥当ではない。

次に、d_iS/dt を系の内部エントロピーの時間変化とし、d_eS/dt を系に外から流れ込むエントロピー流速として、非平衡開放系でよく知られている以下の式

$$\frac{dS}{dt} = \frac{d_iS}{dt} + \frac{d_eS}{dt} \qquad (3)$$

を核スピン系に適用できるか検討する。d_iS/dt は正だが、d_eS/dt は正でも負でもよいというのが、非平衡熱力学の観点である。式(3)を Phase3 の核スピン系の状態に当てはめれば、以下の式が成り立つ条件が出現していると考えられる。

$$\left|\frac{d_iS}{dt}\right| < \left|\frac{d_eS}{dt}\right|, \qquad \frac{d_eS}{dt} < 0. \qquad (4)$$

マイクロ波が照射された時の電子スピン系のエントロピーは、時間と共に飽和に向かって単調増加すると期待できるが、核スピン系のエントロピーの時間変化はマイクロ波出力に依存する。

本研究においては、1)マイクロ波の照射強度と詳細釣合の変化、2)エントロピー、温度から見たオーバーハウザー効果の特殊性、3)散逸構造と核磁化、4)Wenckebach のカルノーサイクルによる議論[3]の検討、などから、動的核偏極の現象に見られる非線形性、非平衡熱力学的な特徴を明らかにする。微視的に言えば、非平衡状態で発達する核スピン－電子スピン結合系の存在と、その結合系と熱浴との間でやり取りされる非線形波の発達が、オーバーハウザー効果の特徴であると、確認することができた。また、そのような流体力学的な特徴がオーバーハウザー効果の出現の役割を担っていることから、オーバーハウザー効果によって出現する核磁化は、平衡状態で現れる核磁化と異なり、散逸構造的な特徴を有している。

References

(1) A. W. Overhauser, “Polarization of nuclei in metals”, Phys. Rev. **92**, 411-415 (1953)
(2) C.P. Slichter, “Principles of Magnetic Resonance, 3rd Edition”, p. 249, Springer-Verlag, 1989.
(3)W. Th. Wenckebach, “Thermodynamics of dynamic nuclear polarization”, Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A 356, 1-4 (1995)

P94

極低温下での動的核偏極のためのENDOR共振器の開発

○竹盛勝彦[1]，香川晃徳[1]，根来誠[1]，北川勝浩[1]
[1] 大阪大学大学院　基礎工学研究科

Development of an ENDOR resonator for dynamic nuclear polarization at very low temperature.

○Katsuhiko Takemori, Akinori Kagawa, Makoto Negoro, Masahiro Kitagawa
[1] *Department of Advanced Electronics and Optical Science, Graduate School of Engineering Science, Osaka University.*

Nuclear spins can be polarized more than a few tens of percent by Dynamic Nuclear Polarization (DNP) under high magnetic field and at very low temperature. Magnetic phase transitions of the highly polarized nuclear spins have been realized by adiabatic demagnetization in the rotating frame. Furthermore, it has been proposed that quantum simulation of magnetic phase transition can be demonstrated by irradiating a multipulse sequence to effectively transform the dipolar interaction. At very low temperature, the cooling power is not so high. Thus, it is necessary to develop an Electron Nuclear DOuble Resonance (ENDOR) resonator, which can efficiently manipulate the electron spins and the nuclear spins for the DNP experiments. In this work, we report the results of DNP experiments using our developed ENDOR cavity at very low temperature.

1. 緒言

高磁場、極低温下で動的核偏極を行うことで核スピン偏極は数十%以上に高偏極化できる。そのように高偏極化された核スピンに回転座標での断熱消磁を行うことで核スピンの磁気相転移が実現できる[1]。また高偏極核スピンに多重パルス列を照射し、ハミルトニアンを実効的に変化させることで量子多体問題である磁気相転移の量子シミュレーションが実現できることが提案されている[2]。

極低温下では冷却能力が小さいために小電力で電子、核を操作できるENDOR(electron nuclear double resonance)共振器[3]が必要となる。本研究では、我々が開発したENDOR共振器を用いた極低温下でのDNP実験の結果について報告する。

2. ENDOR共振器

本研究では極低温下でのDNPのためにFig. 1に示したENDOR共振器を作製した。ENDOR共振器は、ヘリックス型ソレノイドコイルに厚さ1 μmの銅箔を張り付けた水晶プランジャーを挿入することで、円筒型のESR用空洞共振器と、NMR共振回路のコイルとして機能する二重共振器である。空洞共振器内にはTE_{011}モードが立ち、共振周波数は以下の式で表される。

$$f_{011} = \frac{c}{2l\sqrt{\mu_r \varepsilon_r}} \sqrt{1 + \left(\frac{2l}{0.82a}\right)^2}$$

ここで$c, \mu_r, \varepsilon_r, l, a$はそれぞれ光速、空洞共振器中の透磁率、誘電率、プランジャー間の距離、コイルの直径である。プランジャー間の距離、コイルの直径を変えることで共振周波数の調整が

ENDOR共振器、動的核偏極、磁気相転移

○たけもりかつひこ，かがわあきのり，ねごろまこと，きたがわまさひろ

可能である。

本研究では厚さ0.2 mmの銅を用いてソレノイドコイルを作製した。ENDOR共振器のサイズは、コイルの直径a = 2.7 mm、長さl = 6.5 mm、Irisの直径は0.8 mmである。共振周波数は、それぞれ極低温下でESR用空洞共振器が138.67 GHz、NMR用共振回路が118.1 MHzである。

3. 実験・結果

作製したENDOR共振器を用いて、試料を希釈冷凍機により230mKの極低温に冷却し、DNP実験を行った。1K以下での冷凍能力は数mW以下である。CWのマイクロ波を照射し、DNPを行うことで核と電子の超微細相互作用を通して、高偏極化した電子スピンを核に移し、核偏極率を向上させた。

試料には不対電子を持つ2価のTmをドープしたCaF_2を用いた。静磁場の大きさは2.8827 Tである。本試料では固体効果によって核スピンは高偏極化される。照射するマイクロ波の出力を変えながら、DNPを行う時間に対する偏極率の変化をFig. 2に示す。照射するマイクロ波のパワーを小さくすることで、試料の温度が大きく上がらず、緩和時間を長くすることができ、得られる最大の偏極率は大きくなった（Table 1）。

さらに高い核スピン偏極を実現するには、半径aを大きくし、長さl を短く調整することでマイクロ波照射中の試料をより冷却し、緩和時間を長くする必要があると考えられる。また、不均一に広がっている電子スピンをマイクロ波周波数掃引により効率的にDNPに利用すれば、さらに高い核スピン偏極が期待できる。

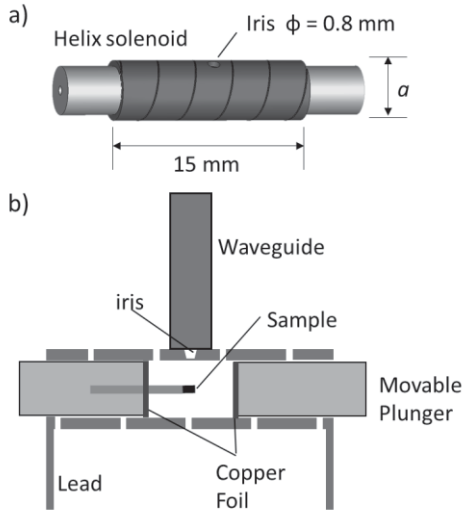


Fig. 1: a) Schematic diagram of the ENDOR resonator. b) Sectional view of the resonator

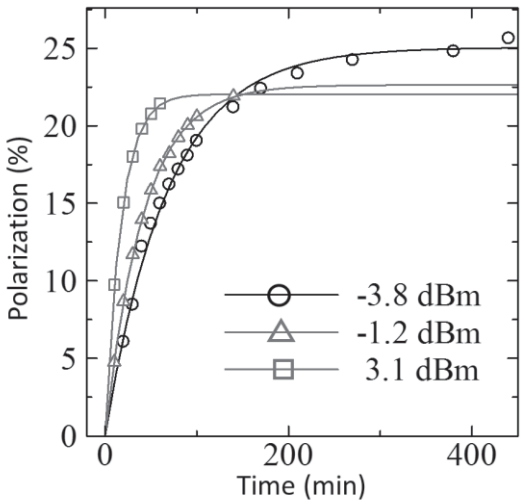


Fig. 2: Polarization buildup curves of ^{19}F spin

Table 1: Polarization of ^{19}F spins and time constant of the buildup curve for various microwave power levels

microwave power	3.1 dBm	-1.2 dBm	-3.8 dBm
Time constant (min)	17	41	68
Polarization (%)	22.0	22.6	25.5

参考文献

[1] M. Goldman. Physics Report 32, No. 1 1-67 (1977).

[2] G. Roumpos *et al*., Phys. Rev. B, 75, 094415 (2007).

[3] V. Weis *et. al*., J. Magn. Reson. 140, 293-299 (1999).

謝辞

本研究は2015年度住友財団基礎科学研究助成の支援によって行われた。

P95

円筒型マルチサーキュラーシムコイルを用いたダイナミックシミングシステムの開発

○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 dynamic shimming system using a cylindrical multi-circular shim coil

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

MRI requires a highly homogeneous magnetic field because the field inhomogeneity causes image artifacts such as distortion and signal loss. In recent years, a shimming method using a cylindrical multi-circular shim coil (MCSC) [1] has attracted considerable attention. An MCSC consists of localized circular coils, and provides the flexibility to design and produce linear and higher-order magnetic fields that compensate for a given B_0 inhomogeneity. It has been revealed that MCSC shimming outperforms conventional low-order spherical harmonics (SH) shimming both statically and dynamically, especially when used for dynamic shimming of brain imaging [2].

In this study, we designed and fabricated a cylindrical MCSC for a 1.5 T magnet system. The experimental and calculation results showed that the MCSC can largely improve the field homogeneity when combined with the second-order SH shim coils.

研究背景

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．特にマルチスライスecho planar imaging (EPI)などの磁場不均一性にきわめて敏感なシーケンスを用いる場合は、関心領域全体のシミングだけではなく，スライス面ごとにシムが最適化されるよう、シーケンス実行と同時にシムの制御を行うダイナミックシミングが求められる．

近年，マルチコイルシミング法に基づいたシミング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，2次シムコイルでは補正しきれない，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[1,2].

そこで本研究では，マルチコイルシミング法に必要なマルチサーキュラーシムコイル（以下MCSC）を設計し，ダイナミックシミングに対応した1つのシムシステムを製作することを最終的な目的として，まずはMCSCのシム装置としての妥当性を検証した．

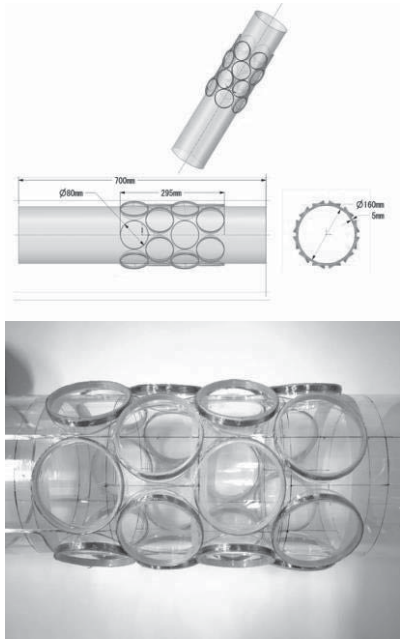


Fig.1: Designed and fabricated MCSC.

dynamic shimming, multi-coil, magnetic field

○やまだりょうた，てらだやすひこ，こせかつみ

製作した装置

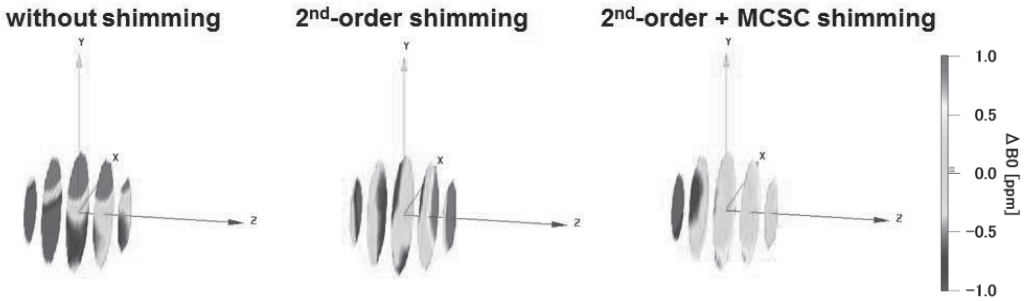
円筒型のアクリルパイプの円周上に1段6個，4段で計24個の円形コイルからなるMCSCを設計した (Fig.1)．円形パイプの直径は160 mm，各円形コイルの直径は80 mmであり，最密構造をとるように配置されている．導線の線径を0.5 mm，各円形コイルのターン数を30とした．円形コイルの半径や個数，ターン数は，あらかじめ数パターンの候補に対してシミュレーションを行って，評価領域でなるべく補正磁場が均一となるようなものを選んだ．

また，MCSC用に，24チャンネルの出力が可能な電源を設計し，製作した．単相100 Vで動作し，それぞれのチャンネルに対して±1 Aの出力が可能となるよう設計した．16-bitのDAコンバータを用いることで出力を制御できる．磁場評価領域 (ROI) は直径50 mm の球内とした．

結果

1.5T/280mm超伝導磁石MRIシステムを用いてシム性能の比較を行った．実験サンプルは硫酸銅水溶液とし，磁場評価領域 (ROI) は直径50 mmの球内とした．実験の結果をFig.2に示す．今回製作したMCSCを2次シムコイルと併用することにより，不均一性ΔB_0のroot mean square (RMS) 値は0.94から0.32 ppmへ，peak-to-peak (PP) 値は6.77から2.64 ppmへと減少し，不均一性が改善されていることがわかる．

このように，円筒型MCSCを2次シムコイルと組み合わせることで磁場不均一性が有効に改善可能であることが示された．また今回の結果は，2次元でのシム性能を考慮に入れれば，マルチスライスEPIに十分対応可能である．



	w/o	2nd-order	2nd-order + MCSC
RMS	0.94 ppm	0.48 ppm	0.32 ppm
PP	6.77 ppm	3.16 ppm	2.64 ppm

Fig.2: Magnetic field variation without and with shim coil.

XYZ = 50 mm x 50 mm x 50 mm

Color scale = -1.0 ppm ～ +1.0 ppm

結論・展望

本研究では24チャンネルの円筒型MCSCを製作し，2次シムコイルと併用することでマルチスライスEPIに十分対応可能なシミング性能があることを確認した．今後の展望として， シーケンスに連動して電流値を変化させることで，スライス面毎にシミングが可能なダイナミックシミングに対応した装置の開発を目指す．

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* 212 (2011) 280-288.
3) Terada, Y. et al., *Appl. Phys. Express* 6 (2013) 026701.

P96

NMR向け高温超電導バルク磁石の高磁場化への課題

○仲村髙志[1]，内海博明[2]，柳陽介[3]，伊藤佳孝[3]，内藤智之[4]，藤代博之[4]

[1]理化学研究所・環境資源科学研究センター・技術基盤部門・分子構造解析ユニット
[2]JEOL RESONANCE
[3]イムラ材料開発研究所
[4]岩手大学理工学部、物理・材料理工学科

Challenge to the higher magnetic field of the high temperature superconducting bulk magnet for NMR

○Takashi Nakamura[1], Hiroaki Utsumi[2], Yoshitaka Itoh[3], Yousuke Yanagi[3], Tomoyuki Naito[4], Hiroyuki Fujishiro[4]

[1] Molecular Structure Characterization Unit, Technology Platform Division, Center for Sustainable Resource Science, RIKEN, [2] JEOL RESONANCE Inc., [3] IMRA Material R&D Co., Ltd., [4] Department of Physical Science and Materials Engineering, Iwate University

We have succeeded in energizing a superconducting bulk magnet at 5.5 T for NMR and micro MRI. The magnet is a table-top cryogen free superconducting magnet which has a room temperature bore of 20 mm in diameter. Using this magnet, we observed ^{1}H NMR spectrum of doped H_2O at 234.17 MHz with about 1 ppm Full Width at Half Maximum (FWHM).

はじめに

近年、高温超電導体を用いた磁石が開発され[1]、金属超電導とのハイブリット型の磁石で世界最高の磁場24 T(^{1}H共鳴周波数1020 MHz)を達成した[2]。これは高温超電導線材を用いた技術で、今後のNMR磁石の強磁場化の感度向上技術として注目されている。一方、高温超電導体は、塊の状態でも磁場を捕捉でき、永久磁石を強力に代替する技術として開発されている。我々は、この超電導バルク体を超電導磁石として開発し、NMR観測[3]、MRI計測[4]に成功した。

本会でも、MRIを用いた室温ボア径23 mmの高温超電導バルク磁石の均一磁場空間の評価とシングルシムコイルによる観測例を報告した[5]。磁石(Fig.1)は、着磁用に用いているNMR用のワイドボア（内径89 mm）の超電導磁石(SCM)が形成する均一磁場を再現するために、上下端が外径60 mm, 内径28 mm, 高さ23 mm、中央部が外径60 mm, 内径36 mm, 高さ74 mmの全高120 mmのEu-Ba-Cu-O(Fig.1a)を用いており、空間分解能50μmのMRIと化学シフトが明瞭に分かるNMRスペクトルを報告している[6]。これまでの成果に基づいて、さらなる均一度向上で高分解能NMR測定を可能にするため、このバルク磁石の内部に円筒上の高温超電導体を配置した新規の超電導磁石を提案(Fig.1b)し、2次項までのシムコイルとサンプルスピニングモジュール(Fig.1c)の組み合わせで、半値幅2 Hzの分解能を持つ、*J*カップリングが観測できる高分解能NMRを報告した[7]。

バルク磁石として、高分解能NMR計測を達成したが、磁場強度は4.7 T(200 MHz)で、現在のNMR装置としては高くない。バルク磁石の最大捕捉磁場はDurrellらにより、17.6 Tが報告[8]されており、どこまでの強磁場化と磁場均一度の両立が可能かの検討を進める。

高温超電導磁石，バルク磁石、卓上型NMR

○なかむらたかし，うつみひろあき，やなぎようすけ，いとうよしたか，ないとうともゆき，ふじしろひろゆき

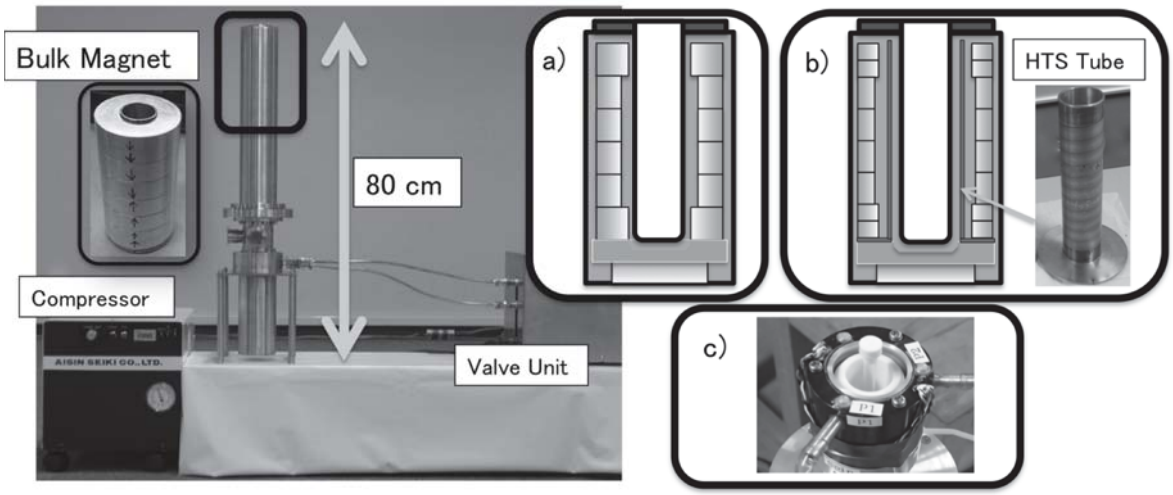


Fig. 1. Photo and Schematic View of Superconducting Bulk Magnet, a) Normal Cylindrical Magnet, b) New Design Magnet with HTS Tube, c) Sample Spinning Module

実験

捕捉磁場強度の上昇と均一磁場を確保するため、Fig.1a の磁石の内部に、外径 26.5 mm の銅ボビンにフジクラ製の幅 10 mm の Gd-Ba-Cu-O テープをスパイラルに 3 層、継ぎ目が重ならないよう巻いた円筒を挿入した。静磁場着磁法（FCM: Field Cooling Method）を用いて 5.5 T に着磁した。この際、4.7 T FCM では、0.3 A/min.で減磁が可能だが、5.5 T FCM では着磁用 SCM の He 蒸発量が大きく、そのまま減磁するとクエンチのおそれがあるので 5.5 T から 4.7 T までは 1.2 A/min.で減磁し、4.7 T に到達後 0.3 A/min.で着磁を実施した、着磁用 SCM からバルク磁石を取り出し時に経験のないカップリング（SCM がバルク磁石により再励磁されるため）を示した。着磁は成功し、バルク磁石は 5.5 T を保持し、磁場の減衰も観測されなかった。

まとめ

内挿円筒のため室温ボア径が23 mmから20 mmと狭くなり、4.7 Tで使用したシムコイルとスピナーでの検証ができなかったが、自作のRFプローブとMRI用の勾配磁場コイルで半値幅1 ppmの水の信号を観測(Fig.2)した。この結果、バルク磁石のさらなる強磁場化と高分解能が期待できる。

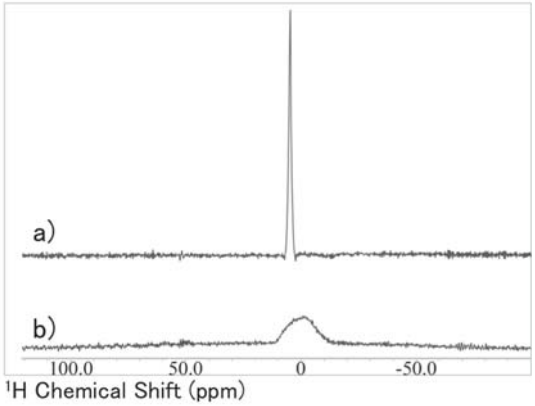


Fig. 2. ^{1}H NMR spectra of doped H_2O
Resonance Frequency 234.17 MHz (5.5 T)
Single Pulse Experiment: Pulse Width 13 us, Repetition Time 3 s, Single Acquisition
a) Shimming (X,Y,Z) Data: 1.06 ppm FWHM
b) Not Shimming Data: 15.68 ppm FWHM

References

[1] Maeda, H. and Yanagisawa, Y. (2014) *IEEE Transactions on Applied Superconductivity* **24**(3) 1-12.
[2] Hashi, K. et al. (2015) *J. Magn. Reson.* **256** 30-33.
[3] Nakamura, T. et al. (2007) *Concept in Magn. Res. B (MRE)* **31B** 65-70.
[4] Ogawa, et al. (2011) *Appl. Phys. Lett.* **98** 234101.
[5] 玉田大輝他（2014）*第 53 回 NMR 討論会* 52-53.
[6] Nakamura, T. et al. (2015) *J. Magn. Reson.* **259** 68-75.
[7] Nakamura, T et al. (2014) *Abstract of CSSJ Conference* **92** 48.
[8] Durrell, J.H. et al. (2014) *Supercond. Sci. Tech.* **27** 082001.

P97

広帯域—多核対応型クライオコイルMASプローブの開発

○水野敬[1]，戸田充[1]，中井利仁[1]，芦田淳[1]，根本貴宏[1]，藤岡耕治[2]，
最上祐貴[3]，清水禎[3]，竹腰清乃理[4]
[1](株)JEOL RESONANCE
[2](株)クライオウェア
[3]物質・材料研究機構
[4]京都大学大学院・理学研究科

Development of Broadband-Multinuclear Cryocoil MAS-NMR probe

○Takashi Mizuno[1], Mitsuru Toda[1], Toshihito Nakai[1], Jun Ashida[1], Takahiro Nemoto[1], Koji Fujioka[2], Yuuki Mogami[3], Tadashi Shimizu[3], and K. Takegoshi[4]
[1] *JEOL RESONANCE Inc.,*
[2] *Cryoware Inc.,*
[3] *National Institute for Materials Science*
[4] *Graduate school of Science, Kyoto University*

We developed a newly tunable system enabling a balanced circuit for the detection coil which is incorporated in the cryocoil MAS probe for sensitivity enhancement using a compatible cryogenic detection system and room temperature MAS system. The probe has a sensitivity enhancement ratio of 5.2 times between the room temperature and cryogenic temperature for the detection system, and a broadband tuning-range of 25 MHz to 100 MHz for lower frequency coil and that of 70 MHz to 200 MHz for higher frequency coil.

クライオコイルMASプローブ[1,2]は、室温下に試料を置きつつ、検出系の熱雑音を下げることによりNMRの感度向上効果を得る固体高分解能NMRプローブである。原理的に、熱雑音の強度は金属導体の実温度と高周波抵抗にのみ依存し、観測周波数に依らず一定であるという特徴を持つため、どんなNMR核種に対しても一定の感度向上効果が得られるという特徴を有している。相対感度が低い核種は無機化合物に多く、全般的に共鳴周波数70 MHz以下に集中している(Fig.1.)。そこで、我々は、多様な低周波

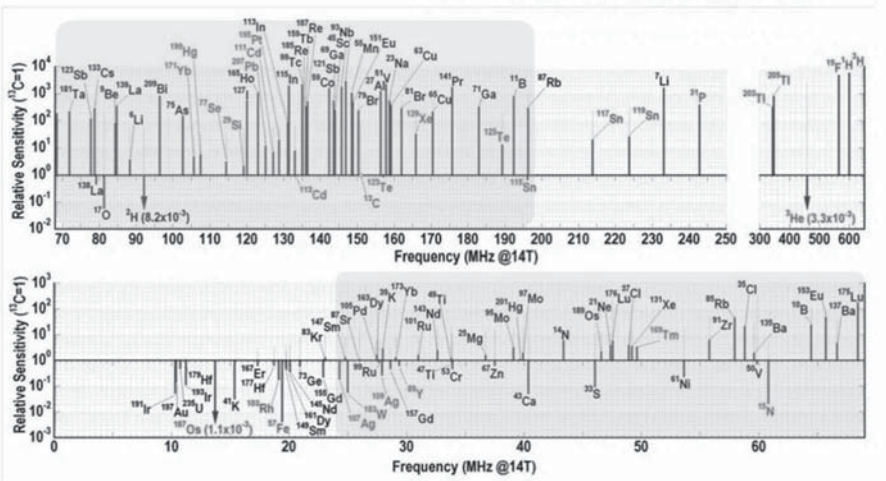


Fig. 1. NMR frequency vs. Relative Sensitivity (^{13}C=1) under 14 Tesla. The tuning range of the cryocoil MAS probe is shown as shadow square.

プローブ，感度向上，低温技術

○みずのたかし，とだみつる，なかいとしひと，あしだじゅん，ねもとたかひろ，ふじおかこうじ，もがみゆうき，しみずただし，たけごしきよのり

核種に対する高感度測定のニーズに応えるよう、25 MHz ~ 100 MHzの範囲で任意の核種に合わせてチューニングレンジを設定できる仕組みを備えたプローブを試作した(Fig. 2a)。このプローブは、検出コイル両端の容量を同時に変更可能な完全バランス回路を採用している。[3]また、インダクタンスの異なる検出コイルを用いることにより、70 MHz～200 MHzの範囲でチューニングレンジを設定することもでき、ほとんどの核種に対して適用可能である。

Fig. 2(b-e) にクライオコイルMASプローブによる低周波核種の感度向上の実験例を示す。同一試料を用いた^{85}Rb MAS（磁場：14.1 Tesla,　観測周波数:57.94 MHz）によって、クライオコイルMASプローブの室温時から低温時のS/Nを比較したところ、感度向上率は5.2 倍となった。低温時のS/Nは、試料管径が同等の通常プローブと比べた場合、4.0～4.5倍と推計される。

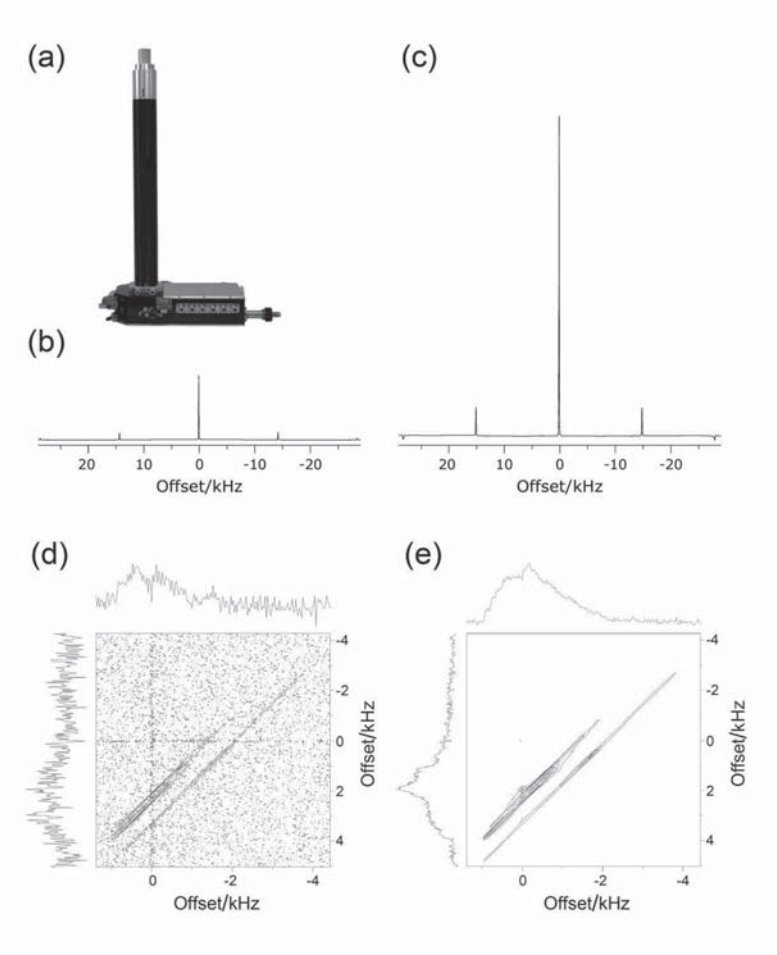


Fig. 2. (a) 4mm Cryocoil MAS probe and (b-e) its observed spectra for sensitivity comparison. (b, c) ^{85}Rb MAS spectra of RbCl with same experimental condition except the detection system operating at room temperature: S/N＝18195 (b) and cryogenic temperature: S/N=94062 (c). sample volume: 85.9 mg, spinning speed: 15 kHz, total experimental time: 3000 s. (d,e) ^{85}Rb MQMAS spectra of $RbNO_3$ with same experimental condition except the detection system operating at room temperature (d) and cryogenic temperature. sample volume: 90.5 mg, spinning speed: 15kHz, total experimental time: 20hrs.

クライオコイルMASプローブは、長時間実験が要求されるMQMAS法（複数サイトの四極子相互作用と化学シフト相互作用を分離して高分解能スペクトルを得るNMR法）などの2次元実験において顕著に有用である。同一試料でのクライオコイルMASプローブの室温時と低温時の^{85}Rb MQMAS法の2次元スペクトルを見れば、その差は歴然としている。

クライオコイルMASプローブは、特に低感度により測定が困難な無機物核種の測定を容易にし、この分野における固体NMRの適用性を拡大することが期待される。

[Reference]

1. T. Mizuno, K. Hioka, K. Fujioka, K.Takegoshi, *Rev. Sci. Instrum. 79*, 044706 (2008)
2. T. Mizuno, K. Takegoshi, *Rev. Sci. Instrum. 80*, 124702 (2009)
3. T. Mizuno, K. Fujioka, K.Takegoshi, JP2015-022651 B2 (2015)など

P98

大気非曝露型MASプローブの開発

○内林渓[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

Development of a MAS probe to prevent sample from exposure to the atmosphere

○Kei Uchibayashi[1], Yasuto Noda[1], Kiyonori Takegoshi[1]
[1] *Division of Chemistry, Graduate School of Science, Kyoto University*

We have developed a probe which allows us to perform MAS NMR experiments by rotating a sample tube up to 40 kHz of rotating frequency by given gases without exposure to the atmosphere.

The probe consists of two parts as a probe head and body. The probe head is equipped a 1.6 mm MAS module for high-resolution NMR and designed to be inserted and removed through the pass-box of a glove box in keeping air-tightness. The probe body, which is easily connected to the probe head, has seal-off valves to control the air-tightness of the probe head through tubes for MAS gas. Air-tightness of the probe was confirmed by testing leakage of helium gas.

The combination of this probe and a gas circulation system will enable high-resolution measurements of phenomena such as gas absorption/desorption without sample deteriorating by the atmosphere.

現在、安全でクリーンなエネルギーの供給がますます求められるようになっている。その需要を満たすためには燃料電池の部材のように気体分子との関わりが重要な新規材料の発展が不可欠である。固体高分解能 NMR 法はこれらの材料をミクロな視点で研究できる強力な手法である。通常、高分解能な測定に不可欠な MAS 法は、試料管を大気曝露下で MAS モジュールにセットし圧縮空気を吹き付けて行われる。目標の材料が変質等の理由により大気曝露させられない場合には、グローブボックス内で試料を調整し気密 MAS 試料管を使用する方法や、希望の気体と共にガラス管に封じた試料を大きな MAS 試料管に挿入して用いる方法を用いる。しかし両者とも、構造上高速回転させることは困難である。

そこで我々は、(Fig. 1)に示すようなシステムを構築し、望みのガス種を MAS 用ガスに用いることで大気曝露を防ぐ方法を目指す。そのために必要な、グローブボックスから測定までの間の気密性を保ち、かつ、測定時に望みのガスで MAS をかけることができるプローブを開発した。

Fig. 2 に今回作製したプローブの構造を示す。プローブ本体は Fig. 2a のようにアルミの外筒で覆われ、その下にガスが漏れないように NW フランジになっている MAS 用ガス配管の接続部分とシールオフバルブの取手が突き出している。アルミの外筒を外したのが Fig. 2b である。1.6 mm の MAS モジュールを備えたプローブヘッド部分（Fig. 2c）と MAS 用ガス配管が VCO 継手(Fig. 2d）により簡単に脱着できる。プローブヘッドの MAS 用ガス配管には 180°曲げられるフレキシブルチューブを用いることで、グローブボックスのパスボックスに入るようにした(Fig. 2e)。MAS モジュールから伸びる光ファイバと伝送線の開口部はエポキシ樹脂で封止した。配管の下部のシールオフバルブの取手を抜き差しすることにより、VCO 継手内部にシールオフバルブのコマを出し入れして気密性をコントロールできる。 コマを VCO 継手の中に残してプローブヘッド

固体高分解能NMR，大気非曝露型NMRプローブ，固体電解質

○うちばやしけい，のだやすと，たけごしきよのり

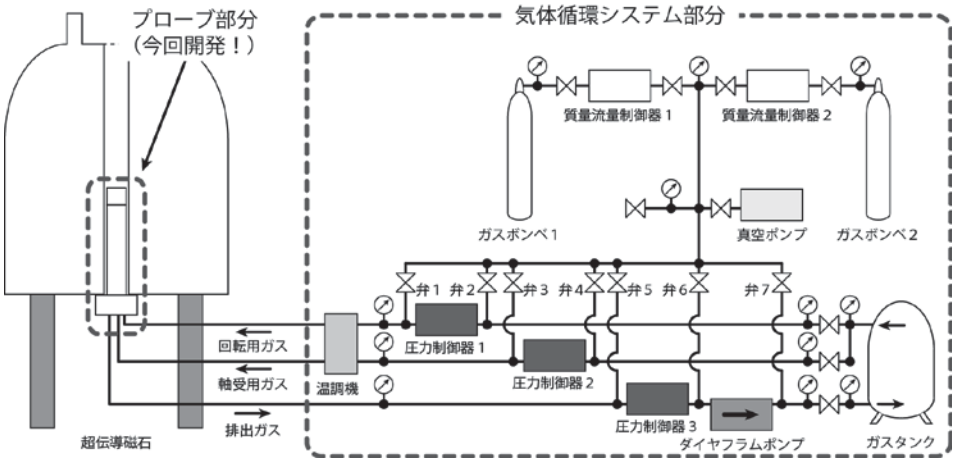


Fig. 1. Overall view of our installation

An air tightness probe (this work) and a gas circulation system.

部分を切り離すことによりプローブヘッドの気密性を保ったままグローブボックスのパスボックスに入れることができる。各シール部分は真空吹き付け式のヘリウムリークテストにより漏れがないことを確認した。また、プローブ気密部分はガスパージのための真空引きにも耐える構造となっているため、望みのガス種でのMASが行える。

当日は、作製したプローブを使用して測定した潮解性物質のスペクトルを交えて、プローブの気密性や有効性について議論する。

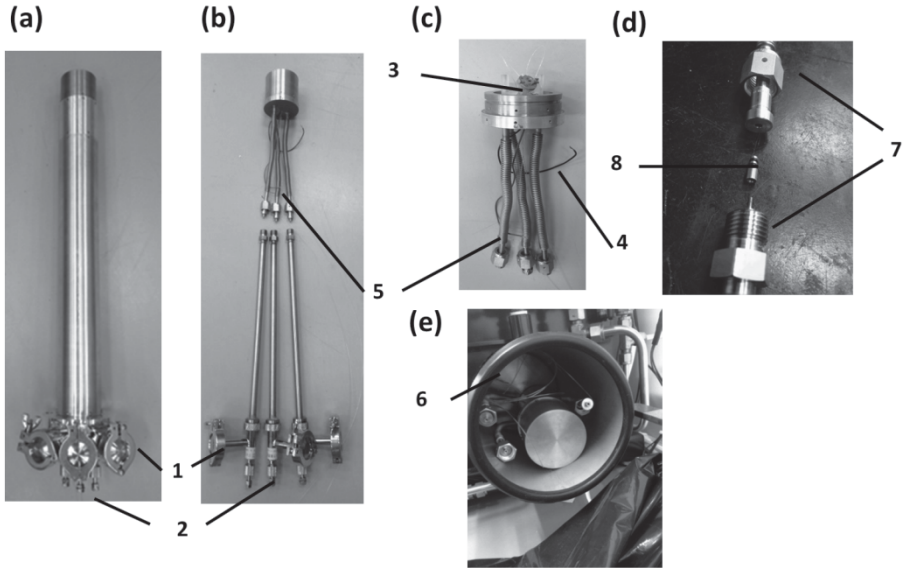


Fig. 2. Construction of our probe

(a) Overall view of our probe. (b) The pipe structure in our probe. (c) The probe head without the head cover. (d) A joint of the probe head and body. (e) The probe head in a pass box. 1. NW flanges connected to a gas circulation system, 2. handles for stoppers, 3. a 1.6mm MAS module, 4. wires and optical fibers connected to a coil, 5. flexible tubes for MAS gas, 6.a pass box of glove box, 7. a VCO joint, 8.a stopper with O-rings. All parts are non-magnetic.

P99

TD-NMRによる化粧品の評価

○原　英之
ブルカー・バイオスピン株式会社

Evaluation of cosmetics by TD-NMR

○Hideyuki HARA
Application Division, Bruker BioSpin K.K.

Time domain NMR (TD-NMR) spectroscopy can be evaluate physical property of material by contrast high-resolution NMR used for structural analysis. TD-NMR does not required preparation of sample but can be measured just insert sample to the sample tube. We measured various material used for cosmetic material and evaluated physical properties. Also we will introduce new method of droplet analysis for o/w and w/o emulsion.

【序論】

時間領域NMR(TD-NMR)は高分解能のNMRとは異なり、構造解析を行うのではなく主に、物性評価を行うことのできる磁気共鳴装置である。TD-NMRでは試料の前処理が必要ではなく、測定試料をそのまま測定することが可能であり、また、試料管内の試料全体の値を観測できるため他の分析法に比べ有利な点が多い。今回、TD-NMRを用いて、リップクリーム、ジェルネイル，乳液などの化粧品について緩和時間、拡散係数から物性の評価をおこなった。また化粧品の評価に有用と思われる各種測定法について紹介する

【装置および測定法】

実験は20MHzのパルスNMR（minispec mq20）を用いて行った。解析はTDNMR-Aソフトを用いて複数成分の緩和時間を求めた.

【結果および考察】

リップクリームにはパラフィンなどの油脂成分が含まれており、唇に塗布したときの塗り心地などに影響を与える。パラフィン単体の固体液体油脂比を温度を変えながら測定した結果を図１に示す。２段階を経て液体油脂に変わっていくことが観測された。さらに市販のリップクリームについて同様の実験を行った。30℃付近から徐々に液相成分が増加する傾向が観測された。液相油脂である流動パラフィンや固体油脂の配合による、使用温度（ひと肌温度）での固相液相比の違いなどを緩和時間測定からモニターすることが可能である。

また、化粧品には酸化チタンなどのナノ粒子などが含まれていることがある。このナノ粒子は日焼け止めの効果などがあることが知られており、その粒子径はその機能に大きく依存している。パルスNMRではこのようなナノ粒子の粒径や、基剤との比表面積の関係を求めることが可能である。粒子径が小さくなると単位重さ当たりのお比表面積は大きくなり、粒子と溶媒の親和面積

パルスNMR，拡散係数，緩和時間

○はら　ひでゆき

が大きくなり緩和時間が短く観測される。よって緩和時間を観測することで粒子径、あるいは粒子による溶媒との親和性を評価することが可能である。また、分散性についても、緩和時間の時間変化をモニターすることで、分散性を評価することが可能である。

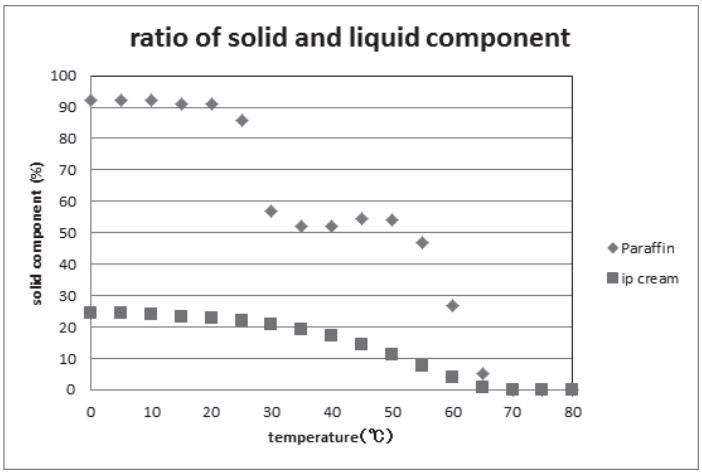


Fig.1 Solid and liquid element of paraffin and lip cream

また化粧品で使われる乳液などにはオイルの粒子が含まれており、この粒径は品質におおきな影響を及ぼす。TD-NMR では O/W あるいは W/O の粒径分布を求めることが可能である。粒径分布を求めるには、これまで磁場勾配パルスの幅を変えていき、信号の減衰度を観測していたが、パルス幅ではなく、パルス強度を変えることでより素早く粒径分布を求めることが可能である。ユニリーバとの共同研究で開発したこの G-var 粒径分布法についても紹介する。

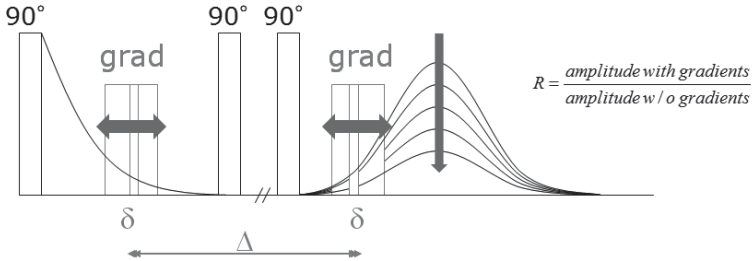


Fig.2 Pulse sequence of conventional droplet measurements

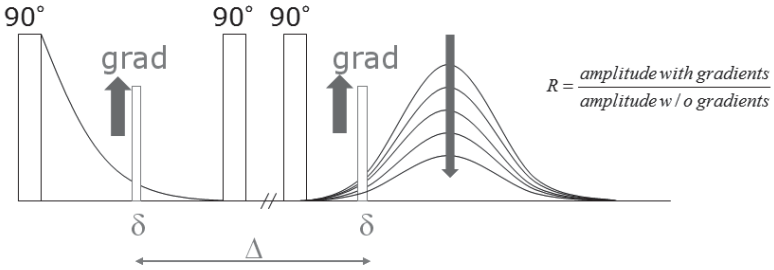


Fig.3 Pulse sequence of improved droplet measurements

P100

Nafionの水アルコール混合溶液中の分散状態の19Fのスピン緩和速度プロファイル測定による検討

○山口真[1]，松永拓郎[2]，雨宮一樹[3]，大平昭博[1,4]，長谷川直樹[2]，篠原和彦[1]
[1]技術研究組合FC-Cubic，[2]豊田中央研究所，[3]トヨタ自動車，[4]産総研

Dispersion of Nafion in water-alcohol mixtures studied by 19F spin-lattice relaxation rate profiles

○Makoto Yamaguchi[1], Takuro Matsunaga[2], Kazuki Amemiya[3], Akihiro Ohira[1,4] Naoki Hasegawa[2], Kazuhiko Shinohara[1]
[1] *Fuel Cell Cutting-Edge Research Center (FC-Cubic), Technology Research Association*
[2] *Toyota Cetntral R&D Laboratories, Inc.*
[3] *Toyota Motor Corporation*
[4] *National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)*

Spin-lattice relaxation rate profiles of Nafion dispersed in aqueous solutions were measured by the fast field cycling (FFC) method. Susceptibility master curves were obtained from relaxation dispersions at different temperatures by frequency-temperature superposition. At high frequency the curves showed almost the same susceptibility values obeying power law with index of 1/4, which can be explained by subdiffusion of segment reorientation along the polymer chain. At lower frequency the relaxation rates are frequency independent but dependent on the molecular weight. These results are consistent with the rodlike particle dispersion model derived from SAXS and indicate that FFC-NMR is a promising tool to provide information on dynamics of polymers in solutions that supplement static structural information by small-angle scattering methods.

固体高分子形燃料電池のプロトン伝導膜や膜電極複合体（Membrane Electrode Assembly : MEA）の電極などに用いられるナフィオンは，Fig.1に示す疎水性のPTFE骨格とスルホン酸末端の側鎖から構成されたアイオノマーであり，製膜時の原料となる水アルコール混合溶媒中では小角散乱やTEM観察から棒状粒子として分散していると考えられてきた。しかし近年，粒子形状が極性溶媒の種類によって従来考えられていたよりも大きく変化し[1]，製膜後の特性にも反映されることが指摘されている[2]。我々は水アルコール混合溶媒の組成のナフィオンの分散状態への影響を検討したが，溶媒組成でサイズは変化するものの棒状の粒子形状は維持されると結論した[3]。

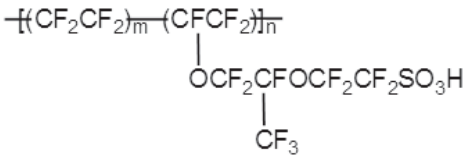


Fig. 1 Structural formula of Nafion

しかし，これらの測定は分子量分布が広い市販のナフィオン分散液を原料とした濃度一定の分散液で行われたことから，オートクレーブ処理により分散性が向上したナフィオン分散液を調製し，濃度を変えてSAXS測定を行い，分散状態の詳細な解析を行った。その結果，処理前のSAXSプロファイルは半径が約2nm、長さ数十nmのフレキシブル棒状粒子モデルでフィッティング可能であり，高濃度では前報のとおり２次元的な規則構造を形成したが，処理後は長さが15nm程度に

高速磁場サイクリングNMR，小角X線散乱，高分子鎖

○やまぐちまこと，まつながたくろう，あめみやかずき，おおひらあきひろ，はせがわなおき，しのはらかずひこ

短くなっており，高濃度では３次元的な規則構造をとることがわかった。

SAXSから得られる分散状態の静的な構造情報に対し，NMRは分子運動に関する動的な情報をもたらすと期待されるが, PFGNMRによる自己拡散係数測定は19FのT_1が短く粒子の異方性が大きいことから測定が難しい。そこで我々は19F核のスピン格子緩和速度の周波数依存性の高速磁場サイクリング（Fast Field Cycling : FFC）NMRによる測定の適用を試み，アルコール分率の影響については本討論会で発表したが[4]，プローブ材料中の19Fの影響が認められたことから，今回は19Fを含まないプローブで測定を行い、オートクレーブ処理による分散状態の変化の影響を検討した。

試料はナフィオン分散液（DE2020）を用い，アルコールを除去した後に水または1-プロパノールで希釈し濃度調整したものと，これを240℃でオートクレーブ処理したものを用いた。濃度は30g/Lである。測定にはStelar社SpinMaster2000を用いた。分極磁場（Larmor周波数27.5MHz）を印加して縦磁化を生成し、磁場強度を下げた緩和磁場に切り替えて縦緩和を起こした後、測定磁場（17.3MHz）でFIDを検出する。これを緩和磁場の印加時間を変えて繰り返し，指数関数でフィッティングしT_1を求める。さらに緩和磁場強度をLarmor周波数5kHz～40MHzまで変えて測定し，緩和速度プロファイルを30, 40, 50, 60℃で得た。

Rösslerら[5]に従い緩和速度を感受率形式$\omega R_1=3C\chi''(\omega)$で表し，周波数-温度重ねあわせでマスターカーブをFig.2に示すように得た。$\omega R_1>10^9$では$\omega R_1\sim\omega^{1/4}$，すなわち$R_1\sim\omega^{-3/4}$のべき乗則に従い，緩和速度は両試料でほぼ同じだが，これはセグメントの再配向の平均二乗変位が$t^{1/2}$に比例し高分子鎖上を拡散するとして説明され[6], 棒状粒子モデルと整合的である. 一方, $\omega R_1<10^9$ではωに比例し，R_1は周波数依存性に依存せず，分子量に比例する傾向を示している．定量的な解析は今後の課題だが，以上の結果はFFC-NMRが分散状態の高分子の運動性に関する情報を通じて粒子の構造や相互作用に関する知見をもたらす有用な手法であることを示すものと考えている.

本発表の一部は経済産業省資源エネルギー庁および国立研究開発法人新エネルギー・産業技術総合開発機構の固体高分子形燃料電池利用高度化技術開発事業による.

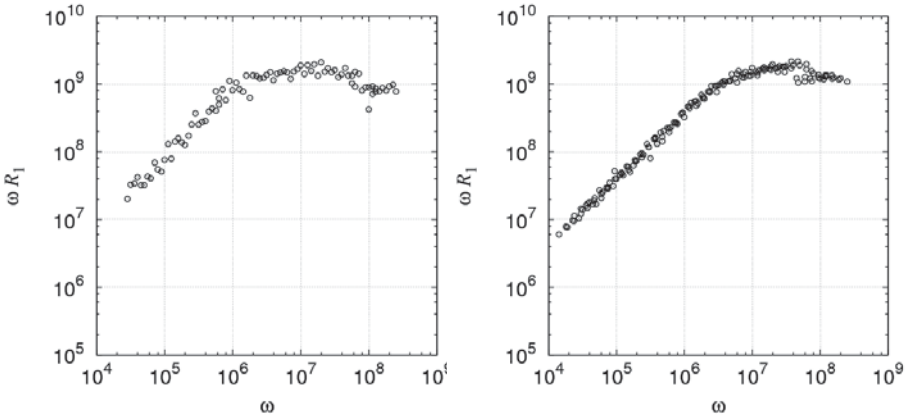


Fig. 2 Susceptibility master curves of Nafion in water.
(left) untreated (right) autoclaved

References (1) Welch, C., Labouriau, A., Hjelm, R., Orler, B., Johnston, C., and Kim, Y. S. (2012) Nafion in Dilute Solvent Systems: Dispersion or Solution? *ACS Macro Lett. 1*, 1403-1407. (2) Kim, Y. S., Welch, C. F., Hjelm, R. P., Mack, N. H., Labouriau, A., and Orler, E. B. (2015) Origin of Toughness in Dispersion-Cast Nafion Membranes. *Macromolecules 48*, 2161-2172. (3) Yamaguchi, M., Matsunaga, T., Amemiya, K., Ohira, A., Hasegawa, N., Shinohara, K., Ando, M., and Yoshida, T. (2014) Dispersion of Rod-like Particles of Nafion in Salt-Free Water/1-Propanol and Water/Ethanol Solutions. *J. Phys. Chem. B 118*, 14922-14928. (4) 山口真, 松永拓郎, 雨宮一樹, 大平昭博, 長谷川直樹, 篠原和彦, 安藤雅樹, 吉田利彦 (2014) Nafionの水アルコール混合溶媒中の分散状態解析への19F-NMRスペクトルおよび高速磁場サイクリングNMR測定の適用, 第53回NMR討論会, p36. (5) Kariyo, S., Brodin, A., Gainaru, C., Herrmann, A., Schick, H., Novikov, V.N., and Rössler, E. A. (2008) From Simple Liquid to Polymer Melt. Glassy and Polymer Dynamics Studied by Fast Field Cycling NMR Relaxometry: Low and High Molecular Weight Limit *Macromolecules 41*, 5313-5321. (6) Kimmich, R. (2012) *Principles of Soft-Matter Dynamics*, Springer.

P101

活性炭細孔径の^{129}Xe-NMRによる検討

○出田　圭子[1]，秦 弘一郎[2]，吉 鉉植[1]，中林 康治[1,2]，持田 勲[3]，
尹 聖昊[1,2]，宮脇 仁[1,2]
[1]九州大院総合理工学府，　[2]九州大先導物質化学研究所
[3]一般財団法人九州環境管理協会

Study of pore size distribution of Activated carbon using ^{129}Xe-NMR

○Keiko Ideta[1], Koichiro Hata[2],Hyun-sig Kil[1], Koji Nakabayashi[1, 2], Isao Mochida[3],
Seong-Ho Yoon[1, 2], Jin Miyawaki[1, 2]
[1] *Interdisciplinary Graduate School of Engineering Sciences, Kyushu Univ., Fukuoka, Japan*
[2] *Institute for Material Chemistry and Engineering, Kyushu Univ., Fukuoka, Japan.*
[3] *Kyushu Environmental Evaluation Association, Fukuoka, Japan.*

Pore width and its distribution of activated carbons (ACs) were investigated by 129Xe-NMR technique, which has been applied to an analysis of pore size for silica-based porous materials.
It was shown that there are a good correlation between chemical shift of 129Xe-NMR peak and the average pore width also for ACs , by using several ACs having different average pore widths　that it is　micro pore region. Furthermore, the correlation curve for ACs was found to be apparently different from that for silica-based porous materials.

【序論】

活性炭は古くから物質の貯蔵・分離・精製などに利用されてきた機能性炭素材の一種であるが、活性炭の調製は未だに経験に基づき行われる部分が多く、細孔の発達機構の解明や細孔構造の制御・解析は不十分である。

^{129}Xe-NMR はシリカ系多孔体においては細孔径と化学シフトに相関を持つことが知られているが、活性炭のような炭素多孔体の場合はシリカのような均一な構造をとっていないため、研究例は少ない。　我々はこれまでにミクロ孔もしくはメソ孔領域の細孔径、また表面官能基量を制御したモデル活性炭を調製し、^{129}Xe-NMR にて検討を行い、炭素系多孔体では、シリカ系多孔体に比べてミクロ孔領域での細孔径の違いに対して化学シフトが鋭敏に変化することを見出した。

本研究では、メソ孔を持つ炭素材料に対しても検討を行ったので報告する。

【実験】

用いた試料は、大きく分けて3種類。ミクロ孔を持つ炭素系多孔体。比較的大きな細孔径（メソ孔）を持つ活性炭。さらに、シリカ系多孔体である。ミクロ孔を持つ多孔体は、市販の活性炭素繊維（大阪ガス(株)）（ACF）、出発物質として球状フェノール樹脂を賦活処理して調整した試料（AC）およびその酸素官能基を除去した試料（AC-H）を用いた。またメソ孔を持つ多孔体は

---

^{129}Xe-NMR，同位体効果

○いでたけいこ，はたこういちろう，きるひゅんしぐ，なかばやしこうじ，もちだいさお，
ゆんそんほ，みやわきじん

アクリロニトリル樹脂を出発物質として調整した試料（meso-AC）およびそのミクロ孔のみを直鎖アルキル分子で埋める処理をした試料（N-meso-AC）を用いた。また数種類のシリカ系多孔体(silica)は文献との比較のために用いた。試料の平均細孔径は 77 K における窒素吸脱着等温線の α_s 解析結果を基に算出した。それぞれの試料は NMR 測定前に密封式 NMR チューブを用いて 150°C 真空前処理を行い、100 kPa で 3-10 分間 Xe ガスに暴露後封入して NMR 測定を行った。

【結果および考察】

Fig. 1 に各試料の平均細孔径と ^{129}Xe-NMR の化学シフトとの相関を示す。同じ試料系ではm小さい細孔ほど化学シフト値は大きい。

ACF, AC, H-AC はいずれも 0.6-1.7 nm のミクロ孔のみを持つ炭素系多孔体である。酸素含有量は ACF, AC は 6%程度、H-AC は 2%程度と大きく差があるが、これら 3 種の炭素系多孔体において官能基の影響は特に見受けられず、細孔径と化学シフトは非常によい相関を示した。

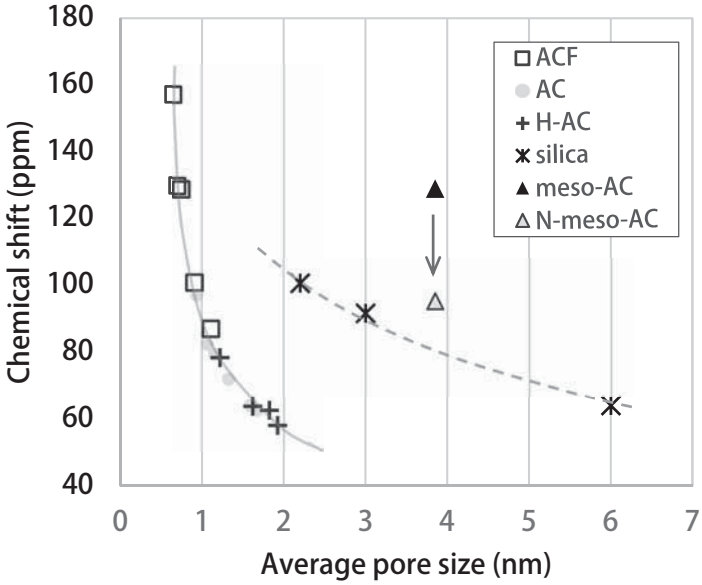


Fig. 1. Correlation between average pore size and chemical shift of 129Xe NMR peak for Xe adsorbed on various activated carbon (AC) and silica gel samples.

一方、シリカ系多孔体（Fig.1 中に破線で表示）は上記炭素系多孔体よりも大きいメソ孔領域の細孔径を持が、測定結果は既報 [1]と合致した。シリカ系多孔体の細孔径-化学シフト相関と、炭素系多孔体において得られた関係を比較すると、その相関関係が大きく異なっていることが確認された。このことを詳細に検討するために、3.8 nm のメソ孔を持つ活性炭について検討を行ったところ、どちらの曲線からも大きく外れたシフトを示した（Fig.1 中▲で表示）。この理由として、細孔径の分布の大きさが考えられる。活性炭は化学処理にて細孔を調整するため、平均細孔径が大きい活性炭の場合、大きい細孔から小さい細孔まで分布を持つ。ミクロ孔試料の結果から、ミクロ孔領域の細孔径が化学シフトに敏感であることが示された。このシフトが全体のシフトに影響を与えていると考えられる。そのため、ミクロ孔のみを埋める処理を行ったところ、silica の曲線に近いシフトを得た（Fig.1 中△で表示）。

これらの結果からミクロ孔とメソ孔を持つ活性炭の ^{129}Xe-NMR 化学シフトは異なる相関を持つことが示唆された。これらの理由についてもさらに検討を行ったので報告する。

【謝辞】

本研究の一部は、「附置研究所間アライアンスによるナノとマクロをつなぐ物質・デバイス・システム創製戦略プロジェクト」特別経費（文部科学省）および（独）新エネルギー・産業総合開発機構の助成を受けて行われた。

References

(1) Terskikh VV, Moudrakovski IL, Breeze SR, Lang S, Ratcliffe CI, Ripmeester JA, Sayari A. *Langmuir* 2002;18:5653-5656.

P102

Satellite transition selective {^{27}Al}/^{1}H *D*-HMQC experiment at very fast MAS for the determination of quadrupolar coupling constants

Nghia Tuan Duong[1], Manoj Kumar Pandey[1,2], and Yusuke Nishiyama[1,2].

[1] *RIKEN CLST-JEOL collaboration center, RIKEN, Yokohama, Kanagawa 230-0045, Japan*

[2] *JEOL RESONANCE Inc., Musashino, Akishima, Tokyo 196-8558, Japan*

Solid-state Nuclear Magnetic Resonance (ssNMR) spectroscopy is a powerful analytical technique to characterize the atomic-level structure and dynamics of materials. However, unlike spin I = ½, the applications of ssNMR to quadrupolar (I > ½)-containing materials are still limited owing to the large anisotropic interaction, arising from the interaction of electric quadrupolar moment and electric field gradient. This interaction, not completely averaged by magic-angle spinning (MAS), severely broadens the spectral lines, resulting in the low resolution and low sensitivity of acquired spectra, preventing the extraction of valuable structural information. Multiple Quantum MAS (MQMAS)[1] is a two dimensional (2D) sophisticated technique that enables the acquisition of high resolution spectra for half-integer nuclei, hence facilitate the structural investigations. From the spectra acquired, not only are the number of sites of nuclei of interest determined but also are their quadrupolar parameters (C_Q, η_Q) as well as the chemical shift information extracted. Despite being widely used for characterizing materials containing quadrupolar nuclei, the disadvantages of this technique lie on two points. The first point is the inefficiency in exciting sites experiencing large quadrupolar interaction since the excitation of forbidden triple quantum is required. The second point is the analytical fitting of MQMAS by SIMPSON simulation[2] is time consuming.

The proton-detected dipolar heteronuclear multi-quantum coherence (*D*-HMQC)[3,4] at very fast MAS is one of the alternatives to alleviate the problematic issues when studying quadrupolar nuclei. By utilizing this approach, the advantages are multifold, including the larger sensitivity as proton is detected; better resolved correlation peaks between ^{1}H and quadrupolar nuclei; and probe ringing avoidance. Furthermore, recent study has demonstrated the application of *D*-HMQC to probe ^{1}H/^{35}Cl on pharmaceutical compounds to determine quadrupolar coupling constant (C_Q) based on the relative shift difference between the ST and the central transition (CT) peaks.[5]

The applicability of this technique is further investigated on spin I = 5/2, namely ^{27}Al; and kaolin was used as the sample since it consists of one site, and this site does not experience large quadrupolar interaction.[6] However this is not a straightforward study owing to the intrinsic characteristics of ^{27}Al nucleus and the conventional *D*-HMQC, especially if the quadrupolar interaction is small like kaolin. For the first point, ^{27}Al consists of three transitions, namely CT and inner (ST1) and outer (ST2) ST, in which CT and ST1 are partially unresolved no matter how "soft" the radiofrequency (rf) pulse is. Regarding the conventional *D*-HMQC, the T_2' of ^{1}H detrimentally affect the resolution of ^{27}Al in the indirect dimension. In order to overcome these limitations for reliable C_Q achievement, we performed *constant time D*-HMQC[7], in which the time duration between two recoupling blocks is fixed. The advantage of this modified version compared

Keywords*: Constant time D*-HMQC at very fast MAS; 1D *satellite selective excitation* experiment; quadrupolar coupling constant (C_Q) determination for spin I = 5/2 nuclei (^{27}Al)

to conventional *D*-HMQC is that the broadening effect caused by T_2' of ^{1}H in the indirect dimension is alleviated, hence providing better resolution for ^{27}Al spectrum. Moreover, no peaks shift or splitting were observed unlike the conventional *D*-HMQC.

The CT shift was determined by the use of *constant time D*-HMQC without rotor-synchronization in the t_1 dimension. The unsynchronized indirect dimension prevents the overlap of spinning sidebands (ssb) to the center bands of STs, hence dramatically reduces the intensity for these transitions. As ^{27}Al CT is not affected by the first order quadrupolar interactions, under MAS condition this is the only detectable peak in the indirect dimension; hence this resonance is reliably assigned.

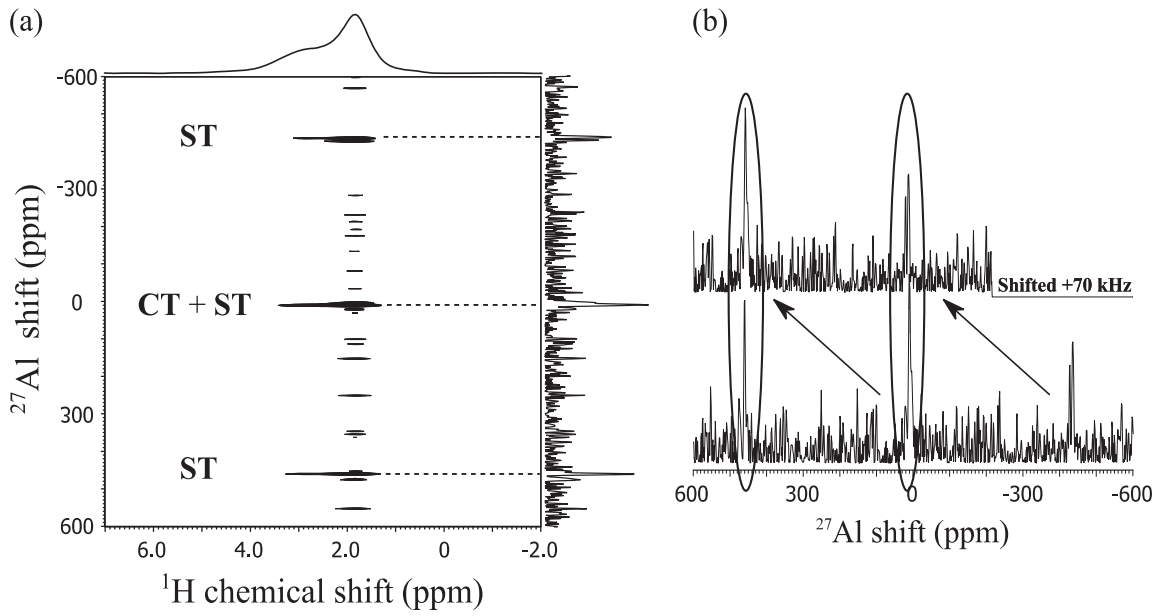


Figure 1. (a) The 2D ^{1}H-^{27}Al correlation spectra acquired by *constant time D*-HMQC at MAS frequency of 70 kHz, in which the indirect dimension was set to 210 kHz and (b) the projection of the indirect dimension was (up) and was not (bottom) shifted by the spinning frequency of 70 kHz. The arrows in (b) help visualization of the shift of identical resonances while the ellipses denote the shift differences between the ssb of STs with the CT and center band STs.

After the precise assignment of the CT resonance, the next step is the ST shifts determination. In this study, we performed *constant time D*-HMQC at very fast MAS (70 kHz) under rotor-synchronization with the indirect dimension equal to 210 kHz, three times the spinning frequency. As STs are affected by the first order quadrupolar coupling, this results in the occurrence of ssb in the spectrum. Hence, based on the shifts of spinning sidebands, we could identify the ST shifts as shown in Figure 1(a) and (b).

Knowing the shifts of CT and ST1 and assuming η_Q equal to 0.5, C_Q, is estimated to 3.5 MHz, which is in excellent agreement with literature.[6] Since the experiment with large indirect bandwidth is time-consuming, and low sensitivity was achieved, we further developed *selective sidebands excitation* approach for getting ST resonances. Instead of applying rf field at the center band resonance, it is applied to the first ssb, namely at 460 ppm for the sake of intensity. The aim of this experiment is to selectively excite the ssb of STs, not the center bands; and from the direct one-dimensional (1D) spectrum, the ST resonances would be precisely acquired. Numerical simulations were performed (not shown) so that the intensity of center band is negligible

compared to those of ssb STs. The experiment for numerical verification was demonstrated in Figure 2 below. Based on the ST resonances from this 1D experiment and the CT shift achieved above, C_Q is calculated to 3.3 MHz, still in good agreement with literature.[6] Further step was performed for higher resolution by the application of similar 1D *satellite selective* experimental conditions to the conventional *D*-HMQC, the shifts of STs were identified and C_Q was calculated to 3.3 MHz, which provided similar results as the 1D experiment aforementioned. The reason for similar result obtained could be explained owing to the utilization of conventional *D*-HMQC, leading to the broadening effect of ^{27}Al nucleus in the indirect dimension.

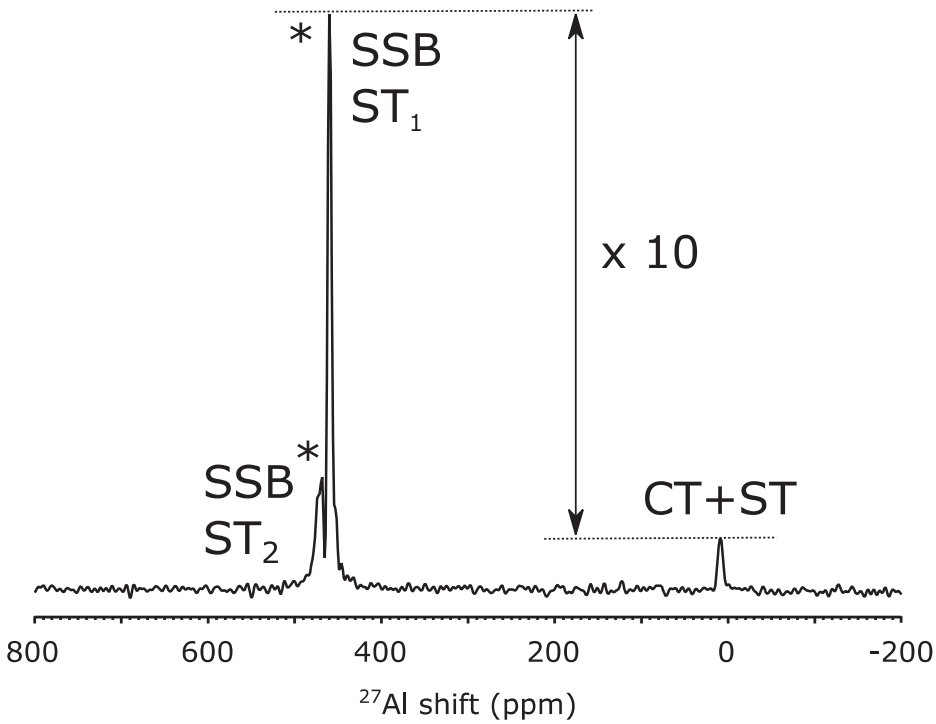


Figure 2. The one-dimensional ^{27}Al spectrum acquired by the application of rf field at the first ssb (460 ppm) instead of the center band at 10 ppm. At the optimized conditions, it is observed that the intensities of center band peaks are one tenth compared to that of the ssb of ST1, leading to no significant interference of center band resonance to the shifts of the ssb ST peaks. The asterisk denotes the spinning sidebands.

In short, this study provided the utilization of *constant time D*-HMQC for the precise determinations of CT and STs shifts, from which the C_Q of ^{27}Al (I = 5/2) could be derived, which is in excellent agreement with literature. The selective sidebands excitation method is another alternative approach for the STs measurements, providing a reliable C_Q value. For the perspective, we aim to apply these approaches for investigating of more complex systems where more than one sites are involved.

REFERENCES

1. Frydman, L. & Harwood, J. S. Isotropic Spectra of Half-Integer Quadrupolar Spins from Bidimensional Magic-Angle Spinning NMR. *J. Am. Chem. Soc.* **117,** 5367–5368 (1995).
2. Bak, M., Rasmussen, J. T. & Nielsen, N. C. SIMPSON: a general simulation program for solid-state NMR spectroscopy. *J. Magn. Reson.* **147,** 296–330 (2000).
3. Gan, Z. ^{13}C/^{14}N heteronuclear multiple-quantum correlation with rotary resonance and REDOR dipolar recoupling. *J. Magn. Reson.* **184,** 39–43 (2007).

4. Cavadini, S., Abraham, A. & Bodenhausen, G. Proton-detected nitrogen-14 NMR by recoupling of heteronuclear dipolar interactions using symmetry-based sequences. *Chem. Phys. Lett.* **445,** 1–5 (2007).
5. Pandey, M. K., Kato, H., Ishii, Y. & Nishiyama, Y. Two-dimensional proton-detected $^{35}Cl/^{1}H$ correlation solid-state NMR experiment under fast magic angle sample spinning: Application to pharmaceutical compounds. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **18,** 6209–6216 (2016).
6. Pike, K. J., Malde, R. P., Ashbrook, S. E., McManus, J. & Wimperis, S. Multiple-quantum MAS NMR of quadrupolar nuclei. Do five-, seven- and nine-quantum experiments yield higher resolution than the three-quantum experiment? *Solid State Nucl. Magn. Reson.* **16,** 203–215 (2000).
7. Rossini, A. J., Hanrahan, M. P. & Thuo, M. M. Rapid Acquisition of Wideline MAS Solid-state NMR Spectra with Fast MAS, Indirect Proton Detection, and Dipolar HMQC Pulse Sequences. *Phys. Chem. Chem. Phys.* (2016). doi:10.1039/C6CP04279A

P103

$^{14}N/^{14}N$ correlations at fast magic angle spinning (MAS) solid-state NMR to distinguish parallel and antiparallel beta-sheet forming alanine tripeptides

Manoj Kumar Pandey[1,2], Jean-Paul Amoureux[3,4], Tetsuo Asakura[5] and Yusuke Nishiyama[1,2]

[1]*JEOL RESONANCE Inc., Musashino, Akishima, Tokyo 196-8558, Japan.*

[2]*RIKEN CLST-JEOL NMR Collaboration Center, RIKEN, Yokohama, Kanagawa230-0045, Japan.*

[3]*Shanghai Key Laboratory of Magnetic Resonance, School of Physics and Materials Science, East China Normal University, Shanghai, 200062, China.*

[4]*UCCS (CNRS-8181), Lille University, Lille 59650, France.*

[5]*Department of Biotechnology, Tokyo University of Agriculture and Technology, 2-24- 16 Nakacho, Koganei, Tokyo 184-8588, Japan.*

Nitrogen-14 (I = 1) correlations are vital for structural characterizations of a variety of chemical, pharmaceutical and biological samples in solid state. While, high abundance of ^{14}N (>99%) makes it suitable nucleus for NMR observation in naturally abundant samples, the presence of strong quadrupolar couplings serves as an inherent challenge in studies relying on ^{14}N. Though magic angle spinning (MAS) averages out first-order quadrupolar broadening from the NMR allowed single quantum transitions with ^{14}N lineshapes now broadened by higher-order quadrupolar terms but only at the cost of numerous spinning sidebands. To alleviate this issue, proton-detected 2D $^{14}N/^{1}H$ HMQC experiments at fast MAS with rotor-synchronized acquisition in the indirect ^{14}N dimension are routinely performed to fold all the spinning sidebands on to the center band and hence, to accomplish $^{14}N/^{1}H$ correlations. Although there has been a substantial progress in the development of methods related to $^{14}N/^{1}H$ correlation measurements, nevertheless, methods to get $^{14}N/^{14}N$ correlations are still emerging. The major challenges being limited resolution and sensitivity due to low ^{14}N gyromagnetic ratio (γ), and the presence of strong quadrupolar broadening and weak $^{14}N/^{14}N$ dipolar couplings. In the present work we demonstrate a proton-detected 3D $^{14}N/^{14}N/^{1}H$ correlation method mediated through $^{1}H/^{1}H$ radio frequency driven recoupling (RFDR) to get $^{14}N/^{14}N$ correlations in biological solids at fast MAS rate (70 kHz). The role of RFDR is to accelerate spin diffusion process amongst protons that is otherwise suppressed by fast MAS. The basic 3D pulse sequence includes two consecutive HMQC blocks connected through a $^{1}H/^{1}H$ RFDR transfer (Pandey and Nishiyama, JMR 258 (2015) 96-101, Pandey et al. PCCP 18 (2016) 22583-22589). Sensitivity enhancement by through space or dipolar-based (D) in comparison to through-bond (J) + residual dipolar splitting (RDS) ^{14}N-^{1}H heteronuclear mode of magnetization transfers are discussed. Moreover, the use of long selective ^{14}N pulses over hard ones are shown to further improve the sensitivity and hence, paving a path to get longer range $^{14}N/^{14}N$ correlations. On the basis of intermolecular NH/NH distances and ^{14}N quadrupolar tensor orientations, inter beta-sheet $^{14}N/^{14}N$ correlations are shown to differentiate between the parallel and antiparallel arrangements of alanine tripeptides (Pandey et al. PCCP 18 (2016) 22583-22589).

Solid-state NMR, ^{14}N nuclei, HMQC

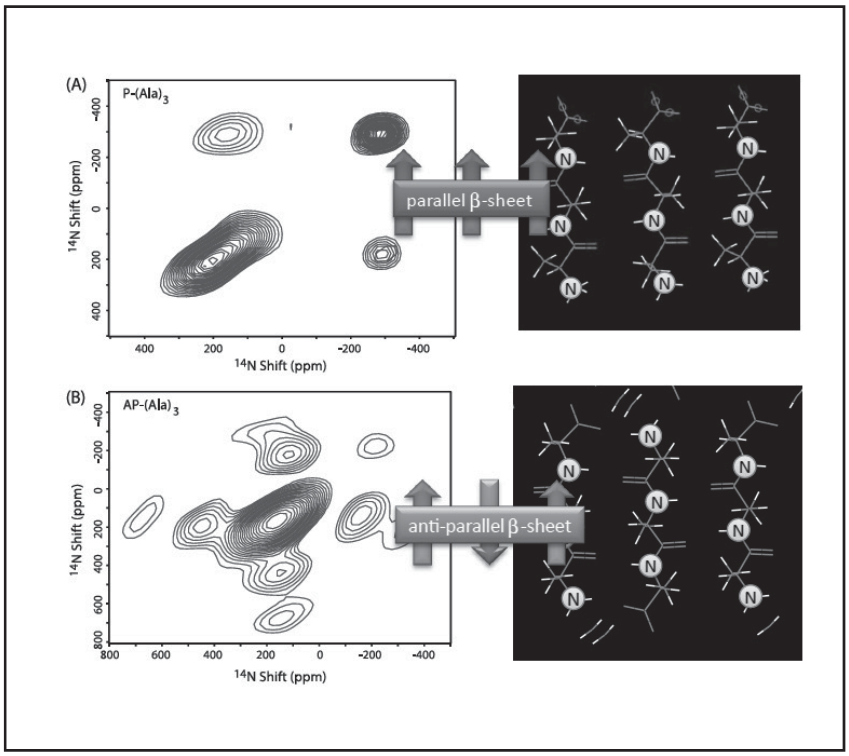


Figure 1. $^{14}N/^{14}N$ 2D planes extracted from 3D $^{14}N/^{14}N/^{1}H$ correlation spectra of alanine tripeptides with parallel P-$(Ala)_3$ (A) and anti-parallel AP-$(Ala)_3$ (B) arrangements.

P104

Simultaneous observation of ^{1}H detected ^{13}C/^{1}H and ^{15}N/1H 2D correlation solid-state NMR spectra in natural abundance at very fast MAS > 60 kHz

You-lee Hong[1] and Yusuke Nishiyama [1,2]
[1]*RIKEN* Center for Life Science Technologies, JEOL Collaboration Center, Yokohama, Japan.
[2]*JEOL* RESONANCE Inc., Japan.

Heteronuclear correlation experiment is useful to investigate molecular structure and dynamics of naturally abundance samples by NMR. However, the low natural abundance of ^{13}C and ^{15}N together with intrinsic low sensitivity of NMR is challenge in NMR measurements and analyses. 1H-detection alleviates these issues due to the high gyromagnetic ratio and natural abundance of proton and is optimal choice for solution NMR. On the other hand, ^{13}C and ^{15}N direct detections are much common in solid-state (ss-) NMR due to broad ^{1}H resonances of rigid solid. Recently, the developed very fast magic-angle spinning (MAS) > 60 kHz reduces severe line-broadening of ^{1}H resonances, making ^{1}H-detection of heteronuclear correlation experiments in ss-NMR routinely applied and enhancing the sensitivity in ^{13}C/^{1}H and ^{15}N/^{1}H experiments of natural abundance samples.[1-3] However, the each measurement of multidimensional spectra requires long times, especially in using naturally abundant materials. Thus, parallel acquisition of ^{13}C and ^{15}N signals are proposed to measure two distinct spectra simultaneously. This gives maximum 2 fold reduction in measurement time and extensively demonstrated both in solid and solution NMR. However, the requirements of additional equipment like parallel receivers hinder common usages.[4] The ^{1}H detection with parallel acquisition, also proposed to improve the sensitivity in the solid, cannot combine the different magnetization transfer for ^{13}C and ^{15}N because ^{13}C and ^{15}N magnetizations are transferred to ^{1}H simultaneously by the second cross polarization (CP). Moreover, the ^{1}H/^{13}C and ^{1}H/^{15}N correlation spectra are obtained by subtracting or adding the two spectra can induce additional t1 noise in the resultant spectra.[5-6]

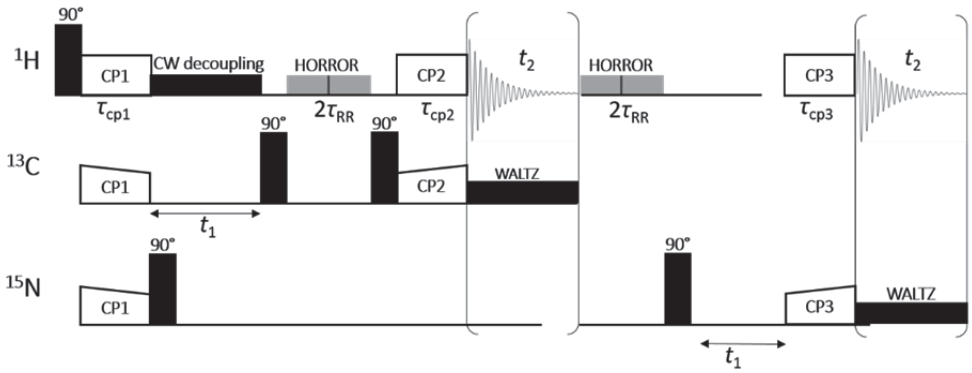


Figure 1. Pulse sequence of dual CP-based HSQC for ^{1}H detection in ss-NMR with 80 kHz MAS.

Here, we present a novel approach of parallel acquisition for multidimensional ss-NMR data experiments. Analogous to the previous parallel CP sequence, we utilize simultaneous CP to polarize ^{1}H to both ^{13}C and ^{15}N nuclei and then ^{13}C magnetizations are evolved, while ^{15}N magnetization is kept along the z axis. The resultant ^{13}C magnetizations are transferred to ^{1}H followed by ^{1}H detection. Finally, ^{15}N magnetizations are

Fast MAS, Dual cross polarization

brought to the transversal plane for time evolution and transferred to ^{1}H for detection. This sequence has several benefits which overcome the drawback of other dual CP sequences. 1) The parallel CP is able to reduce the measurement time to obtain two spectra with a maximum reduction factor of 2. 2) The separate transfer to ^{1}H for each nucleus allows different magnetization transfer schemes to be applied. It was demonstrated with a combination of J-coupling based ^{1}H/^{13}C and dipolar-based ^{1}H/^{15}N correlations, which requires similar measurement time, maximizing the time saving factor. 3) The additional t_1 noise which could come from addition or subtraction of spectra can be avoided, since the resultant ^{1}H/^{13}C and ^{1}H/^{15}N spectra are observed separately. 4) The two separated spectrum can be measured without any special hardware, since all the signals are observed by ^{1}H. 5) Since both the ^{13}C and ^{15}N are rare nuclei in natural abundance, there are no interference between ^{1}H-^{13}C and ^{1}H-^{15}N during dual CP. Unlike uniformly ^{13}C, ^{15}N labeled samples, no signal loss is expected. The developed dual sequence based on the heteronuclear single quantum coherence (HSQC) was demonstrated by 2D ^{15}N/^{1}H and ^{13}C/^{1}H correlation spectra of naturally abundant N-formyl-L-methionyl-L-leucyl-L-phenylalanine (f-MLF-OH) at the fast MAS (80 kHz) as shown in Figure 2.

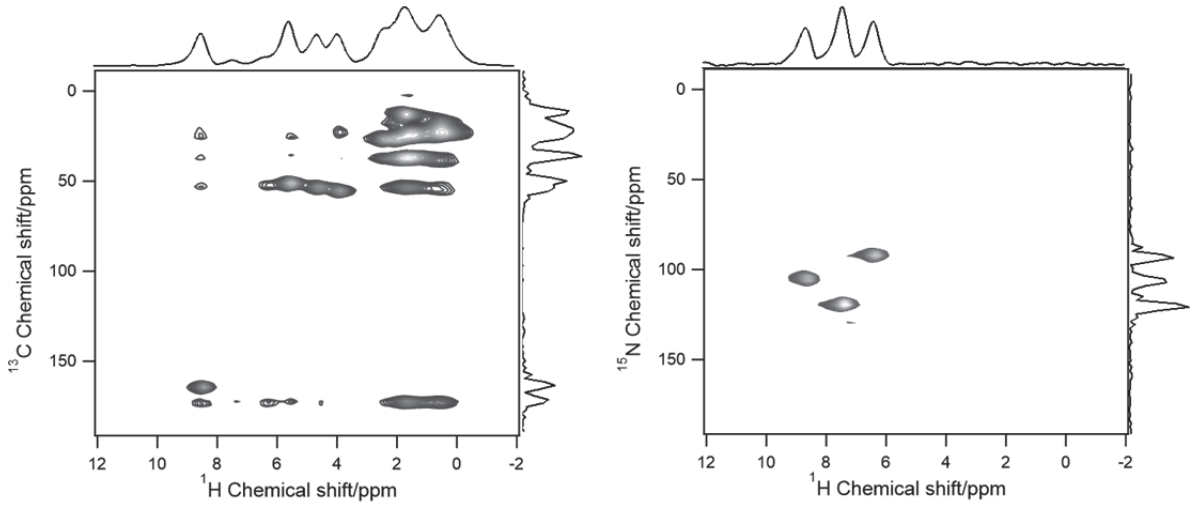


Figure 2. 2D ^{1}H/^{13}C and ^{1}H/^{15}N correlation spectra of f-MLF-OH obtained by dual CP-based HSQC. The ^{1}H/^{13}C and ^{1}H/^{15}N spectra is right and left. The 2D spectra were acquired with a total number of 1200 scans, relaxation delay is 3s, and total time of measurement is 1day 20hr for both experiment. ν_R=80 kHz τ_{CP1}=2ms, τ_{CP2}=2ms, and τ_{CP3}=0.4ms.

Reference

1. Nishiyama, Y.; Endo, Y.; Nemoto, T.; Utsumi, H.; Yamauchi, K.; Hioka, K.; Asakura, T. *J. Magn. Reson.* **2011,** *208*, 44-48.
2. Du, L.-S.; Samoson, A.; Tuherm, T.; Grey, C. P. *Chem. Mater.* **2000,** *12*, 3611-3616.
3. Agarwal, V.; Tuherm, T.; Reinhold, A.; Past, J.; Samoson, A.; Ernst, M.; Meier, B. H. *Chem. Phys. Lett.* **2013,** *583*, 1-7.
4. Kupče, Ē.; Freeman, R.; John, B. K., *J. Am. Chem. Soc.* **2006,** *128*, 9606-9607.
5. Das, B. B.; Opella, S. J. *J. Magn. Reson.* **2016,** *262*, 20-26.
6. Gopinath, T.; Veglia, G. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012,** *51*, 2731-2735.

P105

赤潮発生予測の精度向上を図る環境評価技術の構築

○大島嵩裕[1]、内宮万里央[2]、松本朋子[2]、朝倉大河[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

Integrative environmental profiling for a better prediction of red-tide outbreaks

○Takahiro Oshima[1], Uchimiya Mario[2], Matsumoto Tomoko[2], Asakura Taiga[1,2], Yasuhiro Date[1,2], Jun Kikuchi[1,2,3]
Grad. Sch. Med. Life Sci., Yokohama City. Univ., Japan, [2]RIKEN CSRS, Japan, [3]Grad. Sch. Bioagri. Sci., Nagoya Univ., Japan.

Red tide causes severe influences on coastal marine environment and fisheries. However, red tide tends to occur abruptly and locally, hampering our better prediction and understandings of the mechanisms of its outbreaks. To fill this gap, this study conducted temporally high-resolution observation and constructed integrative environmental profiling that would contribute to improve the accuracy of red-tide forecast. Our results indicated that NMR-based metabolomics extracted several organic compounds that were presumably co-occurred with enhanced phytoplankton production, implying the capability of our approach to predict red-tide outbreaks at finer temporal and spatial resolution. In the presentation, we will discuss the obtained data combined with the information of the occurrence of red-tide-forming phytoplankton species and hydrographical and chemical properties.

＜背景・目的＞

赤潮は、植物プランクトンの異常増殖により海や川、湖沼等が変色する現象であり、沿岸環境および養殖業へ多大な損害を与えている。しかしながら、赤潮の発生は突発的かつ局所的という特徴があり、その発生予測は極めて困難である。このため、赤潮予測の精度向上につながる環境評価技術を構築することが大きな課題となっている。本研究では、赤潮が頻発する春から夏をターゲットとした高頻度観測を実施し、赤潮予測の精度向上に繋がる環境評価系の構築を目的とした(Fig.1)。

＜方法＞

東京湾の鶴見川河口域に、比較対照点として２つの定点を設置した（赤潮の発生頻度が高い「海水域」の観測点、および発生頻度が低い「汽水域」の観測点）。突発的に発生する赤潮を捉えるために、５月から９月までの間、２～３日間隔で高頻度に観測を行った。採取した水試料をフィルター（孔径0.２ μm）で濾過し、そのフィルターを−80℃で冷凍保管し

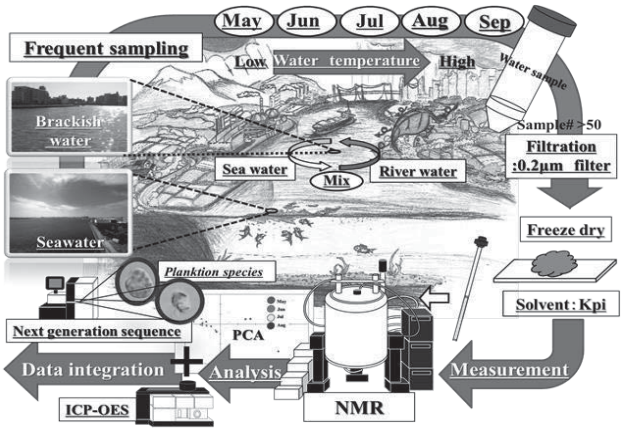


Fig1. conceptual diagram of this study

ＮＭＲメタボロミクス、環境評価技術、赤潮発生予測

○おおしまたかひろ、うちみやまりおう、まつもとともこ、あさくらたいが、だてやすひろ、きくちじゅん

た。その後、フィルターに捕捉された有機物を回収し、重水素化水系溶媒を用いてNMRの測定を行った(Bruker 700MHz; 1D-^{1}H、2D-*J*res、^{1}H-^{13}C HSQCの各パルスプログラムを使用)。得られたデータは、TopSpin(Bruker)およびMnova NMR(Mestrelab Research)を用いてプロセシングをしたのち、ソフトウェアRを用いて多変量解析に供した。有機化合物の帰属は、SpinAssign(http://prime.psc.riken.jp/)およびSpinCouple(http://emar.riken.jp/spincpl/)を用いて行った。

＜結果および考察＞

ＮＭＲスペクトルの主成分分析の結果、その時間変動の様子が、２つの測点間で大きく異なることが明らかとなった（図２左)。赤潮の発生頻度が低い「汽水」の観測点では、５月の１観測回を除き、ＮＭＲスペクトルの変動が小さく、観測期間を通じて有機物の組成が類似していたことが示唆された。一方、赤潮の発生頻度が高い「海水」の観測点では、５月から６月の間は有機物組成の変動が小さかったのに対し、７月から８月にかけてその変動が著しく大きくなるという対照的な結果が得られた(図２左)。各ケミカルシフトの因子負荷量を確認したところ(図２右)、「海水」観測点の７−８月の変動に寄与しているNMRシグナルが抽出され、その帰属の結果、D-グルコース、ベタイン、およびL-アルギニンであると特定された。これらの有機化合物は、植物プランクトンが生産する代表的な化合物であり、また、7−8月は水温の上昇によって植物プランクトンが増殖する時期に対応していることから、本研究で得られた結果は、植物プランクトンの増殖と同調する因子を的確に捉えている可能性が示唆された。これらのことから、今回得られた結果を、赤潮種の存在量や環境情報と合わせて解析することで、赤潮予測に繋がる環境評価技術を構築できる可能性が強く示唆された。以上を踏まえ本講演では、次世代シークエンサーを用いた赤潮種の特定およびICP-OESを用いた水質情報を加えた統合解析の結果を詳細に発表する。

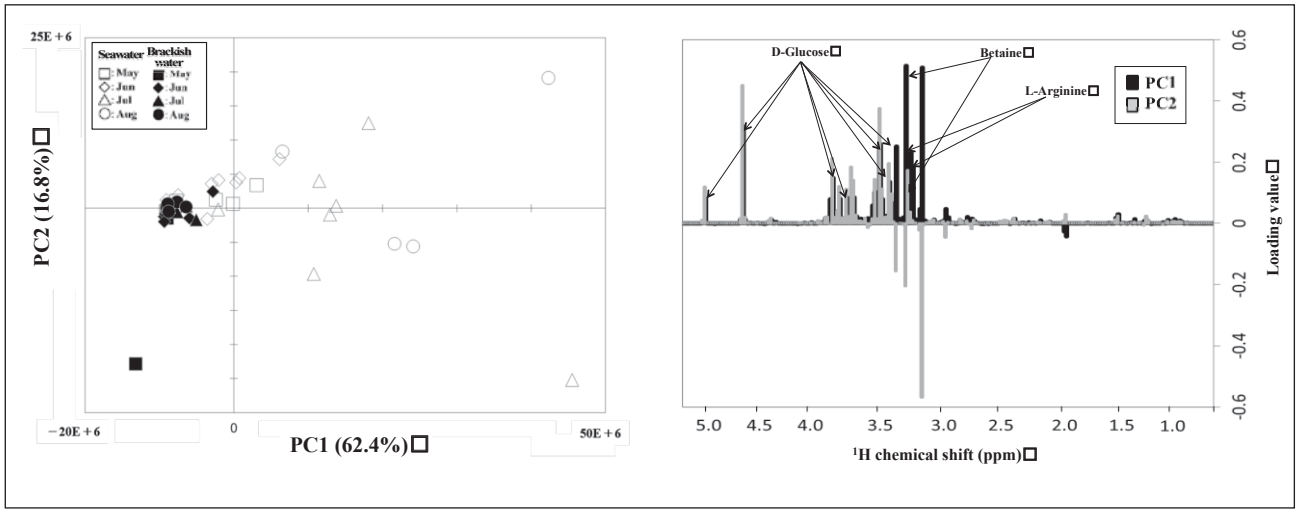


Fig.2: (Left) Principal component analysis (PCA) scores plot based on sky line projection of 2D-*J*res NMR spectra. (Right) PCA loadings plot based on sky line projection of 2D-*J*res NMR spectra.

Black and grey color on the loadings plot indicates PC1 and PC2, respectively.

謝辞：本研究の遂行にあたっては、理化学研究所CSRS 坪井裕理氏に多大なご協力を頂きました。

P106

パルスODMRを用いた磁気センシング

○田辺竜太郎[1]，五十嵐龍治[1]，白川昌宏[1]
[1]京都大学大学院　工学研究科

Magnetic field sensing using Pulsed ODMR

○Ryotaro Tanabe[1], Ryuji Igarashi[1], Masahiro Shirakawa[1]
[1] *Graduate School of Engineering, Kyoto University*

It is significant to analyze neural network quantitatively for gaining insight to information processing and mechanism of memory. In this work, I focused optically detected magnetic resonance (ODMR) using fluorescent nanodiamonds as a method for imaging neuronal network, and I developed a device for magnetic imaging. Consequently, I got an ODMR spectrum influenced by a magnetic field while real time fluorescent imaging.

神経細胞のネットワークを定量的に解析することは、脳内での情報処理や記憶のメカニズムを解き明かすのに大変重要である。しかし、高い時間分解能を持ちながら多くの神経細胞を同時に観測できるプローブは未だ存在せず、広い視野の神経ネットワークの活性化を視覚的に解析できる技術が求められている。

これを解決する手段として、蛍光性ナノダイヤモンドが期待されている。ダイヤモンドに不純物として含まれる窒素原子と、格子欠陥が隣り合ったNVC (Nitorogen-vacancy center)は安定な蛍光を発することから、ナノダイヤモンドは優れた蛍光プローブとしての活用を期待されている。さらに、NVCの発する蛍光は、励起電子のスピン状態を反映するため、磁気共鳴技術と組み合わせることにより、蛍光観察による磁気共鳴スペクトルの取得が可能である(光検出磁気共鳴:ODMR)。ODMRスペクトルは、NVCの電子スピンが外部から受ける磁気的相互作用によって変化するので、ナノダイヤ周辺の微小空間での磁場情報の獲得に利用できる。これを用いれば、神経伝達における電気シグナルを微弱な磁場変動として観測できると考えられる。

本研究では，ナノダイヤモンドの持つ高い磁気感受性を利用し、神経細胞の磁気イメージングを目的としたパルスODMR装置の開発を行った。

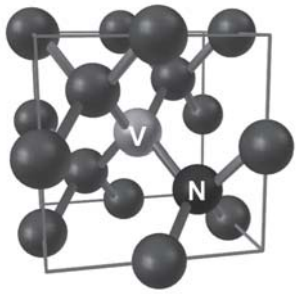


Fig. 1. NV center in diamond lattice.

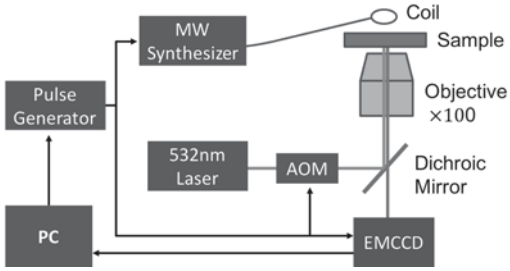


Fig. 2. Equipment set up for ODMR

光検出磁気共鳴，磁場センシング

○たなべりょうたろう，いがらしりゅうじ、しらかわまさひろ

まず、ハードウェアとして、レーザーパルスによる励起系とマイクロ波照射系、EMCCD による検出系から構成されるFig.2に示すような装置を構築した。この装置を用いて、蛍光ナノダイヤモンド(Adamas ND-NV-100nm)のODMRスペクトルを測定したところ、外部磁場の印加によりスペクトルが分裂することを観測した(Fig.3(a))。これはNVC電子スピンの縮退した軌道のゼーマン分裂によるものであり、磁場測定が可能であることを示している。

次にパルスODMR実験を行った。最初の実験として、ラビ振動の観測を試みた。ラビ振動とは、NVCに共鳴マイクロ波パルスを照射すると、そのパルス幅に応じて電子スピン状態が二準位間を交代する現象の名前であり、90°パルスや180°パルスを決めるのに必要な実験である。Fig.3(a)のものと同じナノダイヤモンドサンプルを用いて、Fig.3(b)に示すパルス系列を用いて、蛍光を観察したところ、τの長さに応じて蛍光強度が正弦的に変化するのを観測した(Fig3(c))。この周期から、180°パルスは513±13 nsと求められた。今後は、今回決定した180°パルスと90°パルスを用いて、ラムゼーフリンジ実験を行い、微小な磁場変動の観察を目指す予定である。

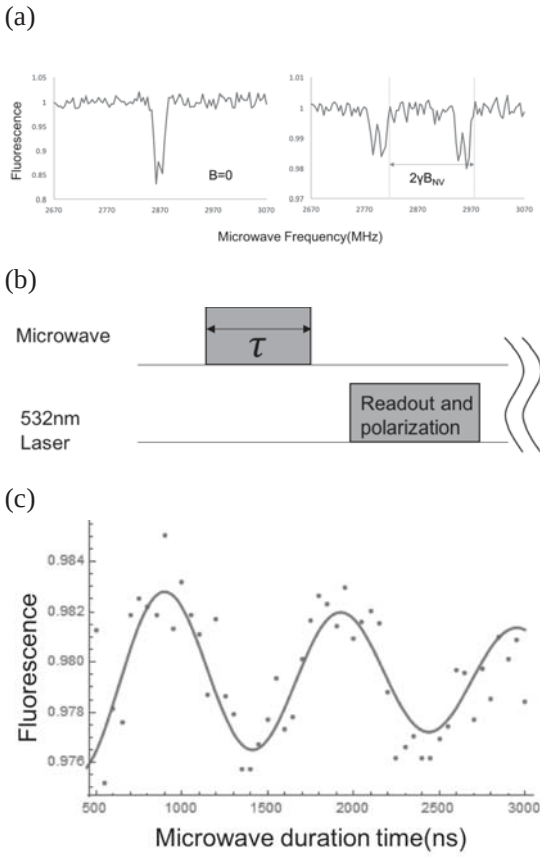


Fig. 3. (a)ODMR spectra of nanodiamonds applying external magnetic field. (b)Rabi pulse sequence(c)Rabi oscillation of NV electron spin.

P107

ナノダイヤモンドによる分子標識技術

○寺田大紀[1]，外間進悟[1,2]，五十嵐龍治[1]，白川昌宏[1]
[1]京都大学工学研究科
[2]中央研究院原子分子科学研究所

Establishment of selective molecular labeling system by nanodiamond

○Daiki Terada[1], Shingo Sotoma[1], Ryuji Igarashi[1], Masahiro Shirakawa[1]
[1] *Graduate School of Engineering, Kyoto University*
[2] *Institute of Atomic and Molecular Science, Academia Sinica*

In recent years, triplet electron spin with nitrogen-vacancy center (NVC) in nanodiamond (ND) crystal was found to be capable of detecting a spin state at single spin sensitivity by optically detected magnetic resonance (ODMR) in room temperature and atmospheric pressure. With rapid advance in optical techniques last decade, techniques of using NVC as a magnetic sensor or spin detector have established. Therefore ND has hope to apply to bio-imaging. However, chemical modification to apply to bio-imaging has not been established because of its short history as an imaging probe. In this study, we developed chemical modification to reduce nonspecific adsorption of bio-molecules and selective molecular labeling system of target molecules on ND surface.

核磁気共鳴（NMR）法は、10^{-6}～10^{-5}eVというきわめて小さなエネルギー準位間の「スピン遷移」を扱うため、原理的に低感度である。そのため、NMRで分子の構造情報を得ようとしたとき、サンプル濃度をμM～mM程度まで濃縮することが求められる。また、in-cell NMRで細胞内の情報を得ようとすれば10^7 個オーダーの均一な細胞を用意しなければならない。加えて、このようにして得られた情報は、分子の平均値にすぎず、分子1つ1つのパラメータの不均一性(static disorder)および、時間とともに観測されるパラメータの変化(dynamic disorder)を無視したものである。よって、「細胞イメージング」や「一分子計測」に最も馴染まない技術の1つと考えられていた。

しかし、近年、ダイヤモンド結晶中に存在する窒素-空孔中心（nitrogen-vacancy center；NVC）が持つ三重項電子スピンは、常温・常圧下でも光検出磁気共鳴（optically detected magnetic resonance；ODMR）によってシングルスピン感度でスピン状態を検出可能であることが明らかになった。つまり、磁気共鳴を光（蛍光）で計測することが可能とういうことである。蛍光は、エネルギーが1～10eV程度の「電子遷移」を伴う現象である。基底状態と励起状態との間の偏極がボルツマン分布に従うとすれば、磁気共鳴のスピン状態は基底状態にわずか10万～1万分の1だけ偏っているにすぎないのに対し，蛍光の電子状態は基底状態に100%偏極している。この偏極率の高さが蛍光計測の高感度に起因する。そのため、偏極率の低い古典的な磁気共鳴法では不可能である「細胞イメージング」や「一分子NMR」への応用が期待されている。

ナノサイズのダイヤモンド、ナノダイヤモンド(ND)をイメージングプローブとして用い、細胞内でODMR計測を行うことにより、細胞内の様々な情報を取得することが可能である。例えば、シュタルク効果やゼーマン効果を計測することにより、電場や磁場の大きさを知ることが可能である。そのため、NDを細胞膜に埋め込んで膜電位計測をすることができるだろう。また、細胞内の

nanodiamond、nitrogen-vacancy center、optically detected magnetic resonance

○てらだだいき、そとましんご、いがらしりゅうじ、しらかわまさひろ

微小空間の温度変化も計測可能となっており、44 mKというわずかな温度変化を読み取ることにも成功している。さらに、ゼーマン相互作用の角度依存性を利用し、生体分子の動的構造情報を取得することも可能である。そのため、私は、これらのナノ空間の物理パラメータの取得・可視化を可能にするイメージングプローブとして、NDによる分子標的技術の研究・開発を進めてきた。[1]

本研究では、ND-COOHをカルボキシ化ポリグリセロールで表面修飾する方法（ND-HPGCOOH）[2]に着目し、非特異的なタンパク質の吸着を起こさずに選択的に標的分子のみをNDで標識するシステムの開発を行った。その結果、（1）短時間かつ有機溶剤を使用しないND-HPGCOOHワンポット合成法と、（2）ND-HPCOOHを用い、ビオチン-アビジンの系に応用することで、非特異的なタンパク質の吸着がない選択的分子標識システムを確立した。

(1)ND-HPGCOOH のワンポット合成法の確立

合成は Fig. 1 に示すスキームに従って行った。本合成法は短時間かつ有機溶剤を使用しないため、簡便に ND-HPGCOOH を合成することができることが特徴である。合成の確認は、フーリエ変換赤外分光法、熱重量測定を用いて、分散性については、動的光散乱法を用いて解析を行った。その結果から表面修飾されている官能基及び、HPGCOOH の坦持量を確認した。また、HPGCOOH は、生理活性溶液（PBS）中で、高い分散性を示すことが確認された。

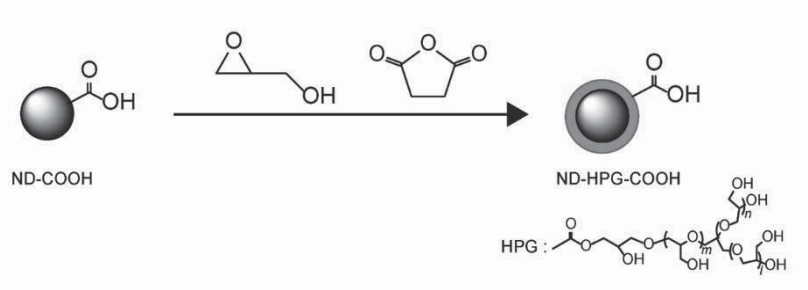


Fig. 1 One-pot synthesis of ND-HPGCOOH from ND-COOH.

(2)ビオチン-アビジンを用いた選択的分子標識システムの開発

ND-HPGCOOH をビオチン化（ND-HPG-biotin）し、ビオチンとアビジンの特異的な結合を利用して、アビジン化した標的分子を標識した。標識の確認は、アビジン化したフルオレセイン（蛍光分子）を ND-HPG-biotin と反応させ、フルオレセインの蛍光を測定することで行った。また、同様の方法で HPG 修飾を行っていない ND と比較することにより、特異的なタンパク質の吸着の有無を確認した。

以上の結果から非特異的なタンパク質の吸着なしに標的分子を ND で標識するシステムの開発に成功した(Fig. 2)。

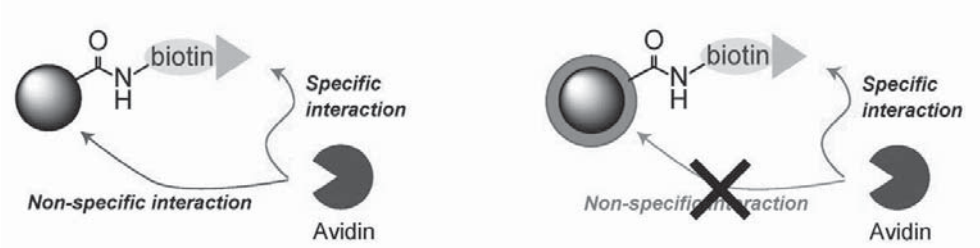


Fig. 2 Specific labeling of target proteins.

References

[1] Schirhagl, R., et al. Annu. Rev. Phys. Chem., 65, 83-105, (2014) [2] Boudou, Jean-Paul, et al., Diamond and Related Materials., 38, 131-138, (2013)

キーワード検索
著者検索

Keyword Index
Author Index

キーワード検索

数字

^{129}Xe …… P81
^{129}Xe 2D-EXSY …… L1-6
^{129}Xe-NMR …… P101
^{129}XeNMR測定 …… P46
^{13}C …… P81
^{13}C isotope labeling …… IL1
^{14}N nuclei …… P103
^{19}F-NMR …… P1
^{2}H NMR …… P66, P73
2次元交換NMR …… L1-4
^{31}P固体NMR …… P78
70kDa Heat Shock Protein（HSP70） …… P6
^{77}Se-HMBC and 3D structure …… P35

アルファベット

A

artificial interigence programming …… P34

B

Bcl-x_L …… P18
BOLD …… P84
Broad-Band-WET …… P4
B型肝炎ウイルスX蛋白質 …… P18

C

C99 …… P14
Ca NMR …… P70
Chain trajectory …… IL1
Chemical reaction …… IL1
chromatography …… P48
Constant time D-HMQC at very fast MAS;
1D *satellite selective excitation* experiment
quadrupolar coupling constant (C_Q)
determination for spin I = 5/2 nuclei (^{27}Al) …… P102

D

data science …… P34
Deep Learning …… P91
Determination of α, β connectivity …… P35
direction …… P3
DNA …… IL2
DNA結合タンパク質 …… P15
DNP効率 …… L1-5
DNT計算 …… P64
DOTA …… P89
Drug Discovery …… IL4
drug resistant mutant …… SL6
Dual cross polarization …… P104
Dynamic Nuclear Polarization …… L1-5
dynamic shimming …… P95
Dynamics …… L2-2

E

electron diffraction …… L2-7
ENDOR共振器 …… P94

F

F_2-selective TOCSY …… P43
Fast MAS …… P104
Flip-Back-Broad Band WET …… P4
Flow …… P82
fMRI …… P84
folding …… P86

G

G-quadruplex …… IL2
Gタンパク質共役型受容体 …… SL1

H

Health …… IL4
HMQC …… P103

I

in situ 光照射固体NMR …… P56
in-cell NMR …… IL2, L1-9, L3-3, P83, P86, P87, P89
In-cell固体NMR …… L1-8
inhibitor …… SL6
interaction …… P24

L

laminate …… L1-2
Lithium …… L1-2

M

magnetic field …… P95
membrane capacitor …… L2-4
membrane interaction …… SL4
membrane protein …… P14
metabolic profiling …… P34
Metabolomics …… IL4
model-free解析 …… P13
MRI …… L1-2, L3-2
mRNA …… P25
multi-coil …… P95
Multidrug Resistance …… L2-2

N

nanodiamond …… P107
nitrogen-vacancy center …… P107
NLP …… P14
NMR …… IL4
NMR相互作用解析 …… P18
NMRバイオリアクター …… P83
NMRメタボロミクス …… P105
NQR …… P90
N型糖鎖合成 …… SL2

O

Oncogene …… SL4
optically detected magnetic resonance …… P107
opto-electro-mechanical coupling …… L2-4
optomechanics …… L2-4

Outdoor MRI system …… P82
overlapping …… P48
P
paramagnetic relaxation …… SL4
paramagnetism labeling …… P23
PCS …… P89
PFG-NMR …… P85
PGSE-NMR …… P49
Plant imaging …… P82
Polymer …… IL1
polymorphism …… IL2
Protein ligand interaction …… P3
Pseudocontact shifts（PCS） …… SL5
Q
quantitative NMR …… P48
R
receptor tyrosine kinase …… P23
reverse transcriptase …… P24
RNA …… P24
S
SAIL法 …… L2-1
SAXS …… P22
Seleno-carbohydrates …… P35
site-specific labeling …… P25
small GTPase …… SL4
SOD1 …… P86
Solid-State NMR …… IL1, L2-7, P103
Spermidine …… P25
SRC1 …… P27
STD …… P37
T
T1強調画像 …… L3-2
Technology …… IL4
TEM …… L2-7
TraB …… P15
Transcriptional regulation …… L2-2
transphosphorylation …… P23
tyrosine kinase …… SL6
W
WET …… P4
五十音順
あ
アイオノマー …… P60
赤潮発生予測 …… P105
汗 …… P29
アゾベンゼン …… L1-11
アミノ酸選択的安定同位体標識法 …… L3-3
アミロイド線維 …… P53
アミロイドβ …… P21
アロディニア …… P84
安息香酸 …… P50
安定同位体標識 …… P1, P19
安定同位体ラベル …… P17
アンフォテリシンB …… P58
い
イオン液体 …… P45
イオン伝導体 …… L1-1
イオンポンプ …… P54
異性体 …… P65
イミダゾール …… P72, P73
引張試験 …… P59
え
エアロゲル …… P63
液晶性ポリエステル …… P77
お
オートファジー …… SL7
オーバーハウザー効果 …… P93
オリゴ糖鎖化学構造決定 …… SL2
オリゴ糖転移酵素 …… SL2
か
カーボンナノチューブ …… L1-6
外部標準法 …… P36
界面活性剤 …… P63
海洋天然物 …… P39
化学シフト …… P47
化学シフト異方性 …… P58
化学修飾 …… P1
化学物質 …… L3-1
拡散係数 …… P99
核磁気緩和解析 …… P59
核四極共鳴 …… P88
環境評価技術 …… P105
感度向上 …… L2-3, P97
緩和解析 …… P13
緩和機構 …… L1-1
緩和時間 …… P31, P99
緩和時間測定 …… L1-3, P71
き
機械学習 …… P92
基質結合ドメイン（SBD） …… P6
偽造医薬品 …… P90
気体拡散係数 …… P42
気体拡散性 …… P46, P77
気体分子 …… P74
気体分離膜 …… P42
絹 …… L1-3
機能性核酸 …… P11
魚類多様性 …… P31
く
クモ糸 …… P71
クライオコイルMASプローブ …… P70
グルカゴン …… P53

け
結晶相……P60
ケモカイン……P5
原材料純度測定……P2
原子核間距離……L1-4
こ
高温超電導磁石……P96
抗菌ペプチド……P78
抗原認識機構……P20
交差緩和……P45
構造解析……L1-12, P39
構造相関NMR……L1-11
構造揺らぎ……P20
高速磁場サイクリングNMR……P100
抗体……P20
勾配磁場コイル……P79, P80
高分子鎖……P100
高分子量蛋白質……L2-1
酵母発現系……P16
固体^{1}H NMR……P69
固体NMR……L1-3, L2-3, L2-5, L2-6, P52, P53, P55, P57, P60～P62, P64, P65, P71, P76
固体高分解能NMR……P67, P98
固体電解質……P49, P67, P98
固体プロトン伝導体……P73
さ
サーマルミキシング……P81
細胞……P85
酸化ストレス……P87
三重鎖核酸……P28
三量体構造……L1-10
し
シアル酸糖鎖……P10
磁気相転移……P94
四極子結合テンソル……P75
四極子相互作用……P51
シグナル伝達……SL1
ジグライム……P66
肢再生……L2-5
脂質アンカー型タンパク質……L2-5
脂質二重膜……P19
四重鎖DNA……P11
自動帰属……L3-4
自動構造決定……P9
磁場勾配NMR……P44
磁場センシング……P106
磁場掃引NMR……P51
磁場配向……P75, P77
四ヘムシトクロムc……SL3
シミュレーション……L1-5
重金属……P47
腫瘍壊死因子受容体関連因子-6（TRAF6）……P12
小角X線散乱……P100
詳細釣り合い……P93
小児骨年齢計測……P80
小児骨年齢測定……P91
小動物イメージング……P79
食用油……P38
シランカップリング剤……P63
人工塩基……P28
シンジオタクチックポリスチレン……P76
深層学習……L3-4
す
水素結合……P62, P68
スケーリングファクター……P92
スピン間距離……P45
スピン分極……P47
せ
制御化合物……P5
石炭……P69
接合伝達……P15
セルロース……P41
そ
装置開発……P88
創薬……P5
た
大気非曝露型NMRプローブ……P98
代謝プロファイリング……P31, P33
ダイナミクス……L1-1, P40
卓上型NMR……P96
多孔質……P81
多孔性配位高分子……P74
多重リン酸化……P32
多変量解析……P38
単結晶法……P75
炭素13ラベル試料……L1-4
タンパク質……P17
タンパク質-核酸相互作用……P26
タンパク質二次構造……L1-8
タンパク質フォールディング……L1-11
ち
置換状態……P41
超高感度応答性……P32
超高速MAS……P69
超電導磁石MRIシステム……P79
腸内フローラ……P33
超分子構造……L1-9
超偏極……P81
超偏極キセノン……L1-6
て
低温技術……P97
低分子液体……P44

定量NMR …… P2, P36
定量測定…… L3-1
低存在率構造…… P27
データベース …… L1-12
データマイニング ……P29, P33
天然変性タンパク質 …… P26
天然変性領域（IDR） …… P7, P27, P30, P32
天然有機化合物…… L1-12

と

同位体効果…… P101
透過型電子顕微鏡…… P21
糖鎖認識…… L1-10
動的核分極（DNP） …… L2-3
動的核偏極……P50, P94
特異値分解法…… P80
特異点…… P51
ドメイン間ダイナミクス …… P30

な

内部標準法…… P36
ナトリウムイオン電池 …… P66
ナノ粒子…… P37

に

二次電池負極…… P64
二重共鳴…… P90
二重試料管…… P2
二量体形成…… P12

ね

熱劣化…… P38

は

配向解析…… P58
バクテリオロドプシン …… P57
バルク磁石…… P96
パルスNMR …… P99
半芳香族ポリアミド …… P62

ひ

光駆動型ナトリウムイオンポンプ …… P52
光検出磁気共鳴…… P106
光励起三重項状態…… P50
非コードRNA …… P26
微生物型ロドプシン …… P54
微生物産生高分子…… P61
非接触検知…… P88
ヒト脳…… L3-1
非平衡…… P93

ふ

符号化標識法…… L3-3
物理特性…… P31
フライアッシュ …… L2-6
フリッピング運動 …… P65
プローブ…… P97
プロトン伝導……P68, P72
プロリン異性化酵素…… P7
分子運動性…… P76
分子および個別ヘムの酸化還元電位 …… SL3
分子混雑環境…… P13
分子進化工学…… P10
分子数定量…… L1-8
分子配向…… L1-7

へ

並進拡散…… P40
ヘム…… P11

ほ

ホウ素…… L2-6
ポリ（γ-グルタミン酸）…… P61
ポリマーブレンド …… P59

ま

膜タンパク質 …… P16, P19, P52, P54～P57, SL1
膜タンパク質結晶 …… SL2
マルチドメインタンパク質 …… P8, P22, P30

み

ミセル形成…… P17

む

無機固体酸塩…… P68
無機材料結合ペプチド …… P37

め

メタボノミクス …… P29
メチル基選択的軽水素標識…… P9

も

モノマー組成 …… P41

ゆ

誘電分光…… P85
誘電分光法…… P44
ユビキチン様結合反応 …… SL7

よ

溶液NMR …… P21

ら

ライゲーション …… P8
ランタノイド金属 …… SL5

り

リアルタイムモニタリング …… L1-9
リチウムイオン伝導機構 …… P67
立体構造解析…… L2-1
立体構造…… P28
リッド…… P6
リポソーム …… P40
量子化学計算…… P92
リンカーヘリックス …… P12

れ

レオロジー …… L1-7
レクチン ……L1-10, P10
レチナール …… P56
レチナール結合ポケット …… P55

著者検索

アルファベット

A

Abe Mitsushi …… P80
Abiko Daisuke …… P63
Aihara Yuichi …… L1-2
Aizawa Tomoyasu …… P54
Akaba Hideo …… P88, P90
Akagi Ken-ichi …… P21
Akahoshi Aki …… P23
Akutsu Hideo …… SL3
Amemiya Kazuki …… P100
Amemiya Shun …… P23
Amoureux Jean-Paul …… P103
Ando Hiromune …… P35
Aoki Daisuke …… P32
Aoyama Tsuyoshi …… P85
Arai Souichirou …… P89
Asakura Taiga …… P31, P33, P105
Asakura Tetsuo …… L1-3, P37, P71, P103
Asami Koji …… P85
Asano Atsushi …… P60
Ashida Jun …… P97

C

Chiba Yasunori …… L1-10

D

Date Yasuhiro …… P29, P31, P33, P34, P105
Deguchi Kenzo …… P64, P75
Demura Makoto …… P54
Duong Nghia Tuan …… P102

E

Egawa Ayako …… L1-8, P54
Endo Takeshi …… P63
Ezaki Soichiro …… P5

F

Feig Michael …… P13
Feng Zhenhao …… SL4
Fujii Mikiko …… P61
Fujii Moe …… P14, P16
Fujii Yutaka …… P93
Fujiki Satoshi …… L1-2
Fujioka Koji …… P97
Fujishiro Hiroyuki …… P96
Fujita Sayaka …… P41
Fujito Teruaki …… P75
Fujiwara Hideaki …… L1-6
Fujiwara Toshimichi …… L1-5, L1-8, L2-3, L3-4, P1, P9, P54
Fukazawa Jun …… L1-5
Fukuchi Minoru …… P31
Fukuda Kenji …… P82
Fukui Shigeo …… L2-3
Fukunishi Mika …… P64
Fukuzaki Minoru …… P40, P44, P85
Furihata Kazuo …… P4
Furukawa Atsushi …… P17
Fuwa Hiroki …… P73

G

Gebregiworgis Teklab …… SL4
Gotoh Kazuma …… P64, P66

H

Hagihara Masaki …… P11
Haishi Tomoyuki …… L1-2
Hamaguchi Isao …… P18
Han Meng …… P90
Hanasaka Akira …… P47
Hanashima Shinya …… P58
Hara Hideyuki …… P99
Harada Erisa …… L2-5
Hasegawa Naoki …… P100
Hashimoto Hisaho …… P41
Hashimoto Yasuhiro …… P49
Hata Koichiro …… P101
Hattori Mineyuki …… P65, P81
Hattori Yoshikazu …… L3-4, P1
Haya Kazumi …… P53
Hayakawa Hiroko …… P38
Hayakawa Yoshio …… P59
Hayashi Fumio …… L2-5
Hayashi Shigenobu …… P65, P68
Hayashi Shun-ichi …… L2-6
Hayashida Hiroki …… P23
Heidenreich David …… P1
Hemmi Hikaru …… P10, P11
Higuchi Kae …… L3-3
Hihara Takehiko …… P67
Hikone Yuya …… P89
Himeno Rika …… P23
Hirabayashi Jun …… P10
Hirai Go …… P89
Hirao Yuuka …… P3
Hiraoki Toshifumi …… L1-3
Hirata Shingo …… P38
Hong You-lee …… P104
Hori Yuki …… P44
Hoshikawa Miho …… P6
Hosoda Kazuo …… P18

I

Ichijo Naoki …… P51
Ida Tomonori …… P72, P73
Idehara Toshitaka …… L2-3, P93
Ideta Keiko …… L1-6, P101

Igarashi Kazuei ····· P25
Igarashi Ryuji ····· P106, P107
Ihara Toshihide ····· P48
Ikeda Motoi ····· L1-6
Ikeya Teppei ····· P89
Ikura Mitsuhiko ····· SL4
Imai Hirohiko ····· L1-6
Imai Misaki ····· L2-2
Inagaki Fuyuhiko ····· SL6, SL7
Inomata Kohsuke ····· L3-3, P83, P89
Inoue Keiichi ····· P52
Inoue Masayuki ····· SL1
Inoue Ryohei ····· P7
Inukai Munehiro ····· P74
Ishida Hiroyuki ····· P64, P66
Ishida Norihito ····· P5
Ishigami Ryota ····· P77
Ishiguro Naotaka ····· P20
Ishikawa Tomoki ····· P49
Ito Atsushi ····· P85
Ito Masahiro ····· P13
Ito Mika ····· P76
Ito Shota ····· P52
Ito Yoshiaki ····· P59
Ito Yutaka ····· P8, P15, P22, P83, P89
Itoh Yoshitaka ····· P96
Itou Kengo ····· P92
Itou Shinichirou ····· P27
Iwakawa Naoto ····· P86
Iwashita Takashi ····· HL1, P39

J

Jimura Keiko ····· P65, P68

K

Kagawa Akinori ····· P50, P94
Kainosho Masatsune ····· L2-1
Kajikawa Masaki ····· P24
Kakishita Takafumi ····· P61
Kamatari Yuji ····· P20
Kametani Shunsuke ····· P71
Kamo Naoki ····· P56
Kanaba Teppei ····· P8, P15
Kandori Hideki ····· P52
Kaneda Shiho ····· P78
Kanehashi Koji ····· L1-6, L2-6, P69
Kano Fumi ····· L1-9
Kasai Takuma ····· L3-3
Kashiwagi Keiko ····· P25
Katahira Masato ····· L1-9, P26, P28
Katahira Ritsuko ····· P36
Kataoka Masakazu ····· P15
Kataoka Naomi ····· L1-3
Kawaguchi Tsubasa ····· P40, P44, P85
Kawai Gota ····· P24, P25
Kawamura Izuru ····· P52, P53, P55～P57, P78
Kawasaki Ryosuke ····· P7, P30
Kidou Akihiro ····· P8
Kigawa Takanori ····· L3-3, P13, P83
Kikuchi Jun ····· P29, P31, P33, P34, P92, P105
Kikukawa Takashi ····· P54
Kil Hyun-Sig ····· L1-6, P101
Kimura Atsuomi ····· L1-6
Kimura Fumiko ····· L2-7, P75
Kimura Hirokazu ····· P18
Kimura Tsunehisa ····· L2-7, P75
Kiso Makoto ····· P35
Kita Rio ····· P40, P44, P85
Kitagawa Masahiro ····· P50, P94
Kitahashi Yuki ····· P78
Kitamaki Yuko ····· P48
Kiyoishi Ayaka ····· L1-9
Kobashigawa Yoshihiro ····· P23, SL6
Kobayashi Ayaho ····· P22
Kobayashi Naohiro ····· L3-4, P9
Kobayashi Ryoma ····· L3-2
Kobayashi Yuta ····· P79
Kodama Takashi ····· P21
Kofuku Yutaka ····· P19, SL1
Kohda Daisuke ····· SL2
Kohno Toshiyuki ····· P18
Koichi Shungo ····· L1-12
Kojima Chojiro ····· L3-4, P1, P9
Komaba Shinichi ····· P64
Kondo Keiko ····· P26
Kondo Keita ····· P19, SL1
Kono Hiroyuki ····· P41
Kose Katsumi ····· P79, P80, P82, P91, P95
Koshino Hiroyuki ····· L1-12
Kubo Satoshi ····· P87
Kubota Kei ····· P64
Kuno Atsushi ····· P10
Kuranaga Takefumi ····· SL1
Kurihara Dai ····· P67
Kurima Akihiro ····· P49
Kurita Jun-ichi ····· P3
Kurokawa Riki ····· P26
Kusaka Yasunari ····· P63
Kusumi Ryosuke ····· L2-7, P75
Kusunoki Hideki ····· P18
Kuwahara Daisuke ····· P45, P47

L

Lee Ki-Young ····· SL4
Lukas Trantirek ····· IL2

M

Maeda Masahiro ····· SL1
Maeda Mitsuru ····· P39
Maeda Shiro ····· P61
Maenaka Katsumi ····· P17
Maesaki Ryoko ····· P15
Makino Yoshiteru ····· P55～P57
Marshall Christopher B. ····· SL4
Maruyama Hisashi ····· P66
Mashima Takehiro ····· P14
Mashima Tsukasa ····· P26, P28
Matsubara Koshi ····· P43
Matsuda Hironori ····· L1-3
Matsukawa Takayuki ····· P60
Matsuki Yoh ····· L1-5, L2-3
Matsumori Nobuaki ····· P58
Matsumoto Tomoko ····· P105
Matsunaga Takuro ····· P100
Matsuoka Naoki ····· P49
Matsushima Kouji ····· P5
Matsuzawa Koki ····· P80
Mazhab-Jafari Mohammad ····· SL4
Minagawa Shin ····· P91
Mio Kazuhiro ····· P14
Mishima Masaki ····· P8, P15, P22, P89
Mitsudo Seitaro ····· P93
Mitsumori Fumiyuki ····· L3-1
Miyanoiri Yohei ····· L2-1
Miyasa Ryota ····· P57
Miyashiro Asami ····· P42
Miyato Yuji ····· P88, P90
Miyatou Tatsuya ····· P66
Miyawaki Jin ····· L1-6, P101
Miyazaki Reona ····· P67
Miyoshi Toshikazu ····· IL1
Mizumura Takuya ····· P19, SL1
Mizuno Motohiro ····· L1-4, P66, P72, P73
Mizuno Takashi ····· P70, P97
Mochida Isao ····· P101
Mochida Tomoyuki ····· P45
Mochizuki Ayano ····· P87
Mochizuki Tadashi ····· P36
Mogami Yuuki ····· P70, P97
Monobe Yoko ····· P21
Mori Masaki ····· P16
Mori Shoko ····· P39
Mori Yoshifumi ····· P38
Morigaki Kenichi ····· L2-5
Morimoto Daichi ····· L1-7, P86
Morioka Hiroshi ····· P23
Morita Ryohei ····· P64, P66
Morita Yoshiyuki ····· L1-1
Murakami Miwa ····· L1-1
Murata Masayuki ····· L1-9
Murata Michio ····· P58

N

Nagai Kan ····· P22
Nagasaka Kentaro ····· L2-4
Nagasaka Tetsuya ····· L2-6
Nagashima Izuru ····· L1-10
Nagashima Toshio ····· L1-11
Nagata Akiyoshi ····· P82
Nagata Kazuma ····· L1-9
Nagata Takashi ····· L1-9, L3-4, P26
Naito Akira ····· HL2, P53, P56, P57, P78
Naitou Tomoyuki ····· P96
Nakabayashi Koji ····· P101
Nakagawa Naoya ····· P47
Nakai Toshihito ····· P97
Nakamura Koichi ····· P74
Nakamura Shinji ····· L2-3
Nakamura Takashi ····· P96
Nakashima Naohiro ····· P27
Nakazawa Chikako ····· P60
Narita Takamitsu ····· P72
Natsume Mei ····· SL1
Natsume Yutaka ····· P49
Negoro Makoto ····· P50, P94
Nemoto Takahiro ····· P97
Nishida Masahiro ····· P59
Nishida Masakazu ····· P59
Nishida Noritaka ····· P87
Nishiguchi Eriko ····· P46
Nishihara Hiroshi ····· P65
Nishimura Chiaki ····· L1-11
Nishimura Hiroshi ····· L1-9
Nishimura Naoto ····· P64
Nishimura Yoshifumi ····· P3
Nishiyama Yusuke ····· P102～P104, L2-7
Nishizaki Yuzo ····· P48
Nishizawa Mayu ····· L1-7
Nobuyama Naoyuki ····· SL1
Noda Nobuo ····· SL7
Noda Yasuto ····· P67, P98
Nomura Kaoru ····· L2-5
Noritake Tomoya ····· P38

O

Obuchi Yuka ····· P92
Ochi Kentaro ····· P11
Oda Masayuki ····· P20
Ohashi Ryutaro ····· L1-4, P72, P73
Ohira Akihiro ····· P100

Ohira Ryutaro ····· P88, P90
Ohki Shinobu ····· P64, P75
Ohkubo Takahiro ····· L1-3
Ohta Yousuke ····· P38
Ohta Yukari ····· L1-9
Oikawa Tetsuo ····· L2-7
Okada Akiko ····· P38
Okamura Hidenori ····· P28
Okamura Hideyasu ····· P13
Okitsu Takashi ····· P52, P55～P57
Okude Junya ····· P19, SL1
Okumura Manabu ····· L2-7, P75
Omoto Kenichiro ····· P65
Onishi Kento ····· SL1
Ooki Chikako ····· P2
Oomuro Kikuko ····· P36
Oowashi Keigo ····· P63
Osawa Hiroyuki ····· P36
Oshima Kazuhiro ····· P41
Oshima Takahiro ····· P105
Otagaki Yui ····· P88, P90
Otani Yuto ····· P57
Otsu Maina ····· P24
Otsuka Satoko ····· P48
Oyoshi Takanori ····· P26

P

Pandey Manoj Kumar ····· L2-7, P102, P103

S

Sahara Junpei ····· P25
Saito Hilonobu ····· P85
Saito Koji ····· L1-6
Saito Naoki ····· P48
Saito Takashi ····· P17
Saito Yuta ····· P54
Sakai Hideki ····· P63
Sakakura Masayoshi ····· P14, P16
Sakasegawa Chika ····· P23
Sakata Kenji ····· P31, P33
Sakuma Chiseko ····· P4
Sanders Charles R. ····· IL3, P14
Sasaki Shigeki ····· P28
Saso Arata ····· P87
Sato Hiroshi ····· P84
Sato Motohiko ····· SL1
Sato Takashi ····· P23
Sato Yuho ····· P33
Satoh Hiroko ····· L1-12
Satoh Rhosuke ····· P22
Scheler Ulrich ····· L1-7
Seki Hayato ····· P55
Shibata Tomokazu ····· P11
Shigeta Arisu ····· P52, P55, P57
Shimada Haruo ····· P2
Shimada Ichio ····· L2-2, P19, P87, SL1
Shimada Masaki ····· P65
Shimamoto Keiko ····· L2-5
Shimizu Akira ····· L1-10
Shimizu Hiroki ····· L1-10
shimizu tadashi ····· P64, P70, P75, P97
Shimizu Yuuichi ····· P41
Shindo Heisaburo ····· P37
Shinohara Kazuhiko ····· P100
Shinya Shoko ····· P9
Shinyashiki Naoki ····· P40, P44, P85
Shionari sayuri ····· P38
Shionoya Mitsuhiko ····· P65
Shiraishi Yutaro ····· SL1, P19
Shirakawa Masahiro ····· L1-7, P83, P86, P89, P106, P107
Shuchi Yusuke ····· P17
Sirigiri Jagadishwar ····· L2-3
Smith Mathew J. ····· SL4
Sodeoka Mikiko ····· P89
Sotoma Shingo ····· P107
Sudo Yuki ····· P55, P56
Suematsu Hiroto ····· L2-3
Sugahara Kohtaro ····· P39
Sugase Kenji ····· L1-7, P86
Sugimoto Naoki ····· P48
Sugita Yuji ····· P13
Sugiura Reiko ····· P22
Sugiyama Syusei ····· P13
Suzuki Ei-ichiro ····· P1
Suzuki Rika ····· P16
Suzuki Shiho ····· P19
Suzuki Tatsuya ····· P35
Suzuki Yu ····· P37

T

Takahashi Hideo ····· P14, P16
Takahashi Takafumi ····· L2-6
Takai Tomoyo ····· P21
Takaya Nobuhiro ····· L3-1
Takeda Kazuyuki ····· L2-4, P51
Takeda Mitsuhiro ····· L2-1, P5, P84
Takegoshi Kiyonori ····· P51, P67, P70, P97, P98
Takemori Katsuhiko ····· P94
Takeuchi Kikuko ····· P21
Takeuchi Koh ····· L2-2
Takeuchi Masao ····· P21
Tamaki Hajime ····· P54
Tamura Masanori ····· P74
Tanabe Ryotaro ····· P106

Tanaka Hiroshi ····· P35
Tanaka Tomoko ····· P59
Tanaka Toshiyuki ····· P18
Tanaka Yoshiki ····· P50
Tanaka Yoshiyuki ····· P1
Tanaka Yuuya ····· P62
Taniguchi Yosuke ····· P28
Tanimoto Yasushi ····· L2-5
Tasei Yugo ····· L1-3, P71
Tashiro Mituru ····· P4
Tashiro Shohei ····· P65
Tate Shin-ichi ····· P6, P7, P12, P27, P30, P32
Tateno Hiroaki ····· L1-10
Tei ChiKai ····· P45
Terada Daiki ····· P107
Terada Yasuhiko ····· P79, P80, P82, P91, P95
Terasawa Hiroaki ····· P5, P84
Terashima Yuya ····· P5
Terauchi Tsutomu ····· L2-1
Terui Yusuke ····· P25
Tin Tin Win Shwe ····· L3-1
Tochio Hidehito ····· P83
Tochio Naoya ····· P6, P7, P12, P13, P27, P30, P32
Toda Etsuko ····· P5
Toda Mitsuru ····· P93, P97
Tsuchikawa Hiroshi ····· P58
Tsujishita Hideki ····· SL1
Tsutsui Satoshi ····· P29
Tuzi Satoru ····· P57

U

Uchibayashi Kei ····· P67, P98
Uchimiya Mario ····· P105
Ueda Kazuya ····· P12
Ueda Kazuyoshi ····· P56
Ueda Keisuke ····· L1-11
Ueda Takumi ····· P19, SL1
Uehara Hiroki ····· P62
Ueno Hirotaka ····· P15
Uewaki Jun-ichi ····· P32
Umegawa Yuichi ····· P58
Umehara Kohei ····· P6
Une Ryota ····· P73
Urita Koki ····· P66
Usami Koji ····· L2-4
Usui Daiki ····· P20
Utsumi Hideo ····· L3-2
Utsumi Hiroaki ····· P96
Uzawa Jun ····· P35

W

Wada Akimori ····· P52, P55～P57
Wakamatsu Kaori ····· P18
Walinda Erik ····· L1-7, P86
Wang Lei ····· P28
Wang Po-Hung ····· P13
Watanabe Hidehiro ····· L3-1
Watanabe Satoru ····· P13
Watanabe Takashi ····· L1-9
Wei Feifei ····· P31
Wishart David S. ····· IL4

X

Xiao-Yuan ····· L2-5

Y

Yagi Hiromasa ····· SL5
Yagihara Shin ····· P40, P44, P85
Yamada Kazuhiko ····· P51
Yamada Kazuya ····· L1-8
Yamada Ryota ····· P95
Yamagaki Tohru ····· P39
Yamagami Masaki ····· P58
Yamaguchi Makoto ····· P100
Yamaguchi Ritsuko ····· P21
Yamaguchi Yoshiki ····· P35
Yamamoto Akihiko ····· L1-7
Yamamoto Tomoya ····· P58
Yamamoto Yasuhiko ····· P11
Yamanobe Takeshi ····· P62
Yamanoi Yoshinori ····· P65
Yamaoki Yudai ····· L1-9
Yamasaki Kazuhiko ····· L1-10
Yamasaki Tomoko ····· L1-10
Yamazaki Toshio ····· L1-11
Yanagi Yousuke ····· P96
Yano Junya ····· P79
Yasuda Kouhei ····· P59
Yokoyama Kei-ichi ····· P1
Yokoyama Takumi ····· P47
Yoneda Ryoma ····· P26
Yoneyama Masaru ····· P62
Yoon Seong-Ho ····· L1-6, P101
Yoshimizu Hiroaki ····· P42, P46, P76, P77
Yoshinaga Sosuke ····· P5, P84
Yoshino Akira ····· P49
Yoza Kaito ····· P23
Yu Isseki ····· P13
Yumura Takashi ····· P64
Yunoki Kaori ····· P5
Yuzuriha Naoya ····· P84

Z

Zheng Le ····· SL4

五十音順

あ

相沢　智康……P54
相原　雄一……L1-2
青木　大将……P32
青山　剛志……P85
赤木　謙一……P21
赤羽　英夫……P88, P90
赤星　璃……P23
阿久津　秀雄……SL3
朝倉　大河……P31, P33, P105
朝倉　哲郎……L1-3, P37, P71, P103
浅野　敦志……P60
浅見　耕司……P85
芦田　淳……P97
安孫子　大祐……P63
阿部　充志……P80
アムルー　ジャン　ポール……P103
雨宮　一樹……P100
雨宮　舜……P23
新井　崇一郎……P89
安藤　弘宗……P35

い

五十嵐　一衛……P25
五十嵐　龍治……P106, P107
伊倉　光彦……SL4
池田　基……L1-6
池谷　鉄兵……P89
石神　稜大……P77
石川　朋希……P49
石黒　直隆……P20
石田　規人……P5
石田　祐之……P64, P66
井田　朋智……P72, P73
一条　直規……P51
出田　圭子……L1-6, P101
出原　敏孝……L2-3, P93
伊藤　敦……P85
伊藤　研悟……P92
伊藤　奨太……P52
伊藤　慎一郎……P27
伊東　優拡……P13
伊藤　美翔……P76
伊藤　隆……P8, P15, P22, P83, P89
伊藤　嘉晃……P59
伊藤　佳孝……P96
稲垣　冬彦……SL6, SL7
犬飼　宗弘……P74
井上　圭一……P52
井上　将行……SL1
井上　涼平……P7
猪股　晃介……L3-3, P83, P89
井原　俊英……P48
今井　宏彦……L1-6
今井　美咲……L2-2
岩川　直都……P86
岩下　孝……HL1, P39

う

ヴァリンダ　エリック……L1-7, P86
ウィシャート　デイビッド　S.……IL4
魏　菲菲……P31
上田　和也……P12
上田　一義……P56
植田　啓介……L1-11
上田　卓見……P19, SL1
上埜　大空……P15
上原　宏樹……P62
上脇　準一……P32
宇佐見　康二……L2-4
鵜澤　洵……P35
臼井　大樹……P20
内林　渓……P67, P98
内宮　万里央……P105
内海　英雄……L3-2
内海　博明……P96
畝　亮太……P73
梅川　雄一……P58
梅原　康平……P6
瓜田　幸幾……P66

え

江川　文子……L1-8, P54
江崎　宗一郎……P5
遠藤　健司……P63

お

オイカワ　テツオ……L2-7
大木　忍……P64, P75
大木　慈子……P2
大窪　貴洋……L1-3
大澤　弘幸……P36
大島　和浩……P41
大島　嵩裕……P105
大田　ゆかり……L1-9
大田　陽介……P38
大田垣　祐衣……P88, P90
大谷　優人……P57
大津　舞菜……P24
大塚　聡子……P48
大西　健人……SL1
大橋　竜太郎……L1-4, P72, P73
大平　昭博……P100
大平　龍太郎……P88, P90
大室　喜久子……P36

大吉　崇文……P26
大鷲　圭吾……P63
岡田　明子……P38
岡村　秀紀……P28
岡村　英保……P13
沖津　貴志……P52, P55～P57
奥出　順也……P19, SL1
奥村　学……L2-7, P75
織田　昌幸……P20
越智　健太郎……P11
尾渕　由佳……P92
尾本　賢一郎……P65

か

甲斐荘　正恒……L2-1
香川　晃徳……P50, P94
柿下　拓史……P61
葛西　卓磨……L3-3
梶川　正樹……P24
柏木　敬子……P25
片岡　奈緒美……L1-3
片岡　正和……P15
片平　正人……L1-9, P26, P28
片平　律子……P36
金場　哲平……P8, P15
金田　志穂……P78
金橋　康二……L1-6, L2-6, P69
加納　ふみ……L1-9
鎌足　雄司……P20
亀谷　俊輔……P71
加茂　直樹……P56
河合　剛太……P24, P25
川口　翼……P40, P44, P85
川嵜　亮祐……P7, P30
川村　出……P52, P53, P55～P57, P78
韓　猛……P90
神取　秀樹……P52

き

木川　隆則……L3-3, P13, P83
菊川　峰志……P54
菊地　淳……P29, P31, P33, P34, P92, P105
木曽　真……P35
喜多　理王……P40, P44, P85
北川　勝浩……P50, P94
北橋　由貴……P78
北牧　祐子……P48
貴堂　晃弘……P8
木村　敦臣……L1-6
木村　恒久……L2-7, P75
木村　博一……P18
木村　史子……L2-7, P75
清石　彩華……L1-9
吉　鉉植……L1-6, P101

く

日下　康成……P63
楠　英樹……P18
久住　亮介……L2-7, P75
久野　敦……P10
久保　智史……P87
久保田　圭……P64
倉永　健史……SL1
栗田　順一……P3
栗原　大……P67
栗間　昭宏……P49
黒川　理樹……P26
桑原　大介……P45, P47

こ

小市　俊後……L1-12
神田　大輔……SL2
河野　俊之……P18
甲野　裕之……P41
幸福　裕……P19, SL1
越野　広雪……L1-12
児嶋　長次郎……L3-4, P1, P9
巨瀬　勝美……P79, P80, P82, P91, P95
児玉　高志……P21
後藤　和馬……P64, P66
小橋川　敬博……P23, SL6
小林　彩保……P22
小林　直宏……L3-4, P9
小林　優太……P79
小林　竜馬……L3-2
駒場　慎一……P64
近藤　敬子……P26
近藤　啓太……P19, SL1

さ

齋藤　公児……L1-6
齊藤　貴士……P17
斎藤　直樹……P48
斉藤　宏信……P85
斉藤　優太……P54
酒井　秀樹……P63
坂倉　正義……P14, P16
逆瀬川　知香……P23
坂田　研二……P31, P33
佐久間　千勢子……P4
佐々木　茂貴……P28
佐宗　新……P87
佐藤　卓史……P23
佐藤　寛子……L1-12
佐藤　博司……P84
佐藤　元彦……SL1
佐藤　有穂……P33

佐藤　亮介……P22
佐原　潤平……P25
サンダース　チャールズ　R. ……IL3, P14

し

シェラー　ウルリッヒ ……L1-7
塩成　さゆり……P38
塩谷　光彦……P65
重田　安里寿……P52, P55, P57
篠原　和彦……P100
柴田　友和……P11
嶋田　一夫……L2-2, P19, P87, SL1
島田　治男……P2
島田　真樹……P65
島本　啓子……L2-5
清水　明……L1-10
清水　禎……P64, P70, P75, P97
清水　弘樹……L1-10
清水　祐一……P41
治村　圭子……P65, P68
須知　佑介……P17
白石　勇太郎……SL1, P19
白川　昌宏……L1-7, P83, P86, P89, P106, P107
シリギリ　ジャガディシュワー ……L2-3
神藤　平三郎……P37
新家　粧子……P9
新屋敷　直木……P40, P44, P85

す

末松　浩人……L2-3
菅瀬　謙治……L1-7, P86
菅原　孝太郎……P39
杉浦　麗子……P22
杉田　有治……P13
杉本　直樹……P48
杉山　修世……P13
鈴木　榮一郎……P1
鈴木　志歩……P19
鈴木　達哉……P35
鈴木　悠……P37
鈴木　里佳……P16
須藤　雄気……P55, P56
スミス　マシュー　J. ……SL4

せ

関　隼斗……P55

そ

袖岡　幹子……P89
外間　進悟……P107

た

髙井　朋代……P21
高橋　貴文……L2-6
高橋　栄夫……P14, P16
高屋　展宏……L3-1
竹内　喜久子……P21
竹内　恒……L2-2
竹内　昌男……P21
竹腰　清乃理……P51, P67, P70, P97, P98
武田　和行……L2-4, P51
武田　光広……L2-1, P5, P84
竹盛　勝彦……P94
田代　省平……P65
田代　充……P4
田制　侑悟……L1-3, P71
楯　真一……P6, P7, P12, P27, P30, P32
伊達　康博……P29, P31, P33, P34, P105
舘野　浩章……L1-10
田中　俊之……P18
田中　智子……P59
田中　浩士……P35
田中　佑弥……P62
田中　良樹……P50
田中　好幸……P1
田辺　竜太郎……P106
谷口　陽祐……P28
谷本　泰士……L2-5
田巻　初……P54
田村　優実……P74
単　小遠……L2-5

ち

千葉　靖典……L1-10

つ

辻　暁……P57
辻下　英樹……SL1
土川　博史……P58
筒井　聡志……P29

て

鄭　智海……P45
ティンティンウィンシュイ ……L3-1
出口　健三……P64, P75
出村　誠……P54
寺内　勉……L2-1
寺沢　宏明……P5, P84
寺島　裕也……P5
寺田　大紀……P107
寺田　康彦……P79, P80, P82, P91, P95
照井　祐介……P25

と

ドゥオング　ギア　トゥアン ……P102
遠田　悦子……P5
戸田　充……P93, P97
栃尾　尚哉……P6, P7, P12, P13, P27, P30, P32
栃尾　豪人……P83

な

内藤　晶…… HL2, P53, P56, P57, P78
内藤　智之…… P96
永井　敢…… P22
中井　利仁…… P97
中川　直哉…… P47
長坂　健太郎…… L2-4
長坂　徹也…… L2-6
中澤　千香子…… P60
長島　生…… L1-10
長島　敏雄…… L1-11
中嶋　直大…… P27
長田　晃佳…… P82
永田　一真…… L1-9
永田　崇…… L1-9, L3-4, P26
中林　康治…… P101
中村　浩一…… P74
中村　新治…… L2-3
仲村　高志…… P96
夏目　穣…… P49
夏目　芽依…… SL1
成田　貴光…… P72

に

西口　枝里子…… P46
西﨑　雄三…… P48
西澤　茉由…… L1-7
西田　紀貴…… P87
西田　雅一…… P59
西田　政弘…… P59
西原　寛…… P65
西村　千秋…… L1-11
西村　直人…… P64
西村　裕志…… L1-9
西村　善文…… P3
西山　裕介…… P102～P104, L2-7

ね

根来　誠…… P50, P94
根本　貴宏…… P97

の

野田　展生…… SL7
野田　泰斗…… P67, P98
延山　尚幸…… SL1
野村　薫…… L2-5
則武　智哉…… P38

は

拝師　智之…… L1-2
ハイデンライヒ　ダービット …… P1
萩原　正規…… P11
橋本　久穂…… P41
橋本　康博…… P49
長谷川　直樹…… P100
秦　弘一郎…… P101
服部　峰之…… P65, P81
服部　良一…… L3-4, P1
花坂　明…… P47
花島　慎弥…… P58
浜口　功…… P18
羽矢　和未…… P53
早河　裕子…… P38
早川　由夫…… P59
林　繁信…… P65, P68
林　俊一…… L2-6
林　文夫…… L2-5
林田　大輝…… P23
原　英之…… P99
原田　英里砂…… L2-5
パンディ　マノジ　クマル …… L2-7, P102, P103

ひ

樋口　佳恵…… L3-3
彦根　佑哉…… P89
日原　岳彦…… P67
姫野　梨花…… P23
平井　剛…… P89
平尾　優佳…… P3
平沖　敏文…… L1-3
平田　真吾…… P38
平林　淳…… P10

ふ

フェイグ　マイケル …… P13
深澤　隼…… L1-5
福居　滋夫…… L2-3
福崎　稔…… P40, P44, P85
福田　健二…… P82
福地　実…… P31
福西　美香…… P64
藤井　美暉子…… P61
藤井　萌…… P14, P16
藤井　裕…… P93
藤岡　耕治…… P97
藤木　聡…… L1-2
藤代　博之…… P96
藤田　彩華…… P41
藤戸　輝昭…… P75
藤原　敏道…… L1-5, L1-8, L2-3, L3-4, P1, P9, P54
藤原　英明…… L1-6
降旗　一夫…… P4
古川　敦…… P17
不破　寛規…… P73

へ

逸見　光…… P10, P11

ほ

星川　美穂…… P6

細田　和男……P18
堀　雄貴……P44
ホン　ヨウリー……P104

ま

マーシャル　クリストファー　B.……SL4
前崎　綾子……P15
前田　史郎……P61
前田　正洋……SL1
前田　満……P39
前仲　勝実……P17
槇野　義輝……P55, P56, P57
真嶋　健大……P14
真嶋　司……P26, P28
松岡　直樹……P49
松川　隆幸……P60
松木　陽……L1-5, L2-3
松澤　晃樹……P80
松島　綱治……P5
松田　裕生……L1-3
松永　拓郎……P100
松原　康史……P43
松本　朋子……P105
松森　信明……P58
丸山　寿史……P66

み

三尾　和弘……P14
三島　正規……P8, P15, P22, P89
水野　敬……P70, P97
水野　元博……L1-4, P66, P72, P73
水村　拓也……P19, SL1
光藤　誠太郎……P93
三森　文行……L3-1
皆川　新……P91
宮佐　亮太……P57
宮崎　怜雄奈……P67
宮代　亜紗美……P42
宮戸　祐治……P88, P90
宮東　達也……P66
宮ノ入　洋平……L2-1
宮脇　仁……L1-6, P101
ミヨシ　トシカズ……IL1

む

村上　美和……L1-1
村田　昌之……L1-9
村田　道雄……P58

も

最上　祐貴……P70, P97
持田　勲……P101
持田　智行……P45
望月　綾野……P87
望月　正……P36
物部　容子……P21
森　祥子……P39
森　雅樹……P16
森　美詞……P38
森岡　弘志……P23
森垣　憲一……L2-5
森田　善幸……L1-1
森田　凌平……P64, P66
森本　大智……L1-7, P86

や

八木　宏昌……SL5
八木原　晋……P40, P44, P85
安田　洸平……P59
柳　陽介……P96
矢野　順也……P79
山置　佑大……L1-9
山垣　亮……P39
山上　正輝……P58
山口　真……P100
山口　芳樹……P35
山口　りつ子……P21
山崎　和彦……L1-10
山崎　俊夫……L1-11
山崎　智子……L1-10
山田　和彦……P51
山田　和哉……L1-8
山田　諒太……P95
山野井　慶徳……P65
山延　健……P62
山本　昭彦……L1-7
山本　智也……P58
山本　泰彦……P11

ゆ

優　乙石……P13
杠　直哉……P84
柚木　芳……P5
湯村　尚史……P64
尹　聖昊……L1-6, P101

よ

横山　敬一……P1
横山　拓海……P47
与座　魁斗……P23
吉永　壮佐……P5, P84
吉野　彰……P49
吉水　広明……P42, P46, P76, P77
米田　竜馬……P26
米山　賢……P62

り

リ　ギヨン……SL4

わ

若松　馨……P18

和田　昭盛……P52, P55～P57
渡部　暁……P13
渡辺　隆司……L1-9
渡邉　英宏……L3-1
ワン　ポーハン……P13
王　磊……P28

（無断で複製・転載を禁じます）
Copyright © 2016 The Nuclear Magnetic Resonance Society of Japan

2016年11月16日発行
Published on November 16, 2016

第55回NMR討論会（2016）

会　期：2016年11月16日（水）、17日（木）、18日（金）
November 16（Wed）-18（Fri）, 2016
会　場：広島国際会議場
International Conference Center Hiroshima
〒730-0811　広島県広島市中区中島町1-5

編集・発行：55th 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：nmr55@kuba.jp

協賛企業（五十音順）

アルファバイオ株式会社

SIサイエンス株式会社

株式会社エムアールテクノロジー

株式会社エルエイシステムズ

大塚器械株式会社　西条支店

ジーンフロンティア株式会社

株式会社シゲミ

株式会社システムプラス / Mestrelab Research, S.L.

株式会社JEOL RESONANCE

セティ株式会社

株式会社セルフリーサイエンス

大陽日酸株式会社

中国ケミー株式会社

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

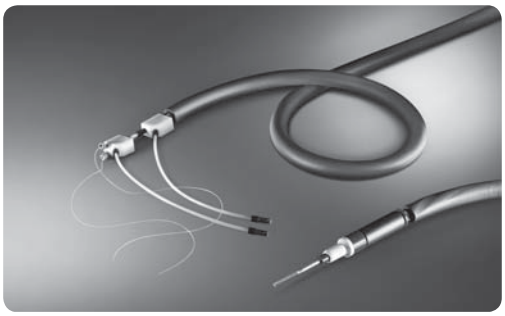
広島和光株式会社

ブルカー・バイオスピン株式会社

山本薬品株式会社

幅広いアプリケーションに対応する Bruker BioSpinの新製品

InsightMR　反応モニタリング



InsightMRはBrukerのNMRシステムにマッチしたフローセルと専用のソフトウェアを組み合わせることでNMRをつかった反応モニタリングを簡便に再現性高くおこなえるようにします。InsightMRでは従来の試料管の中で直接反応液を調整する手法とは異なり、マグネットの外にある反応容器からプローブへ反応液を還流させることで、より自由度の高い実験がおこなえます。また専用の反応モニタリングソフトウェアと使うことで経時変化データを全自動で測定すると同時にオンザフライにデータ処理をおこない、より視覚的に反応をとらえることができます。

主な仕様

- 任意のBruker製5mmΦプローブと組み合わせて使用可能
- チラーを使用して温度調整可能
- 専用ソフトウェアでの全自動測定・解析
- 自動溶媒消去

0.7mm　超高速MASプローブ

0.7 mm超高速MASプローブは最高速度111 kHzで試料を回転することで固体NMRの新しいアプリケーションを開きます。特に^{1}H観測の実験や常磁性核を含んだサンプルへの適用、より複雑なコヒーレンス移動を含んだパルスシーケンスへの応用などが期待されます。

主な仕様

- コイル構成：HXもしくはHCN
- 最高回転数 ：111 kHz
- 試料容量：300 nl

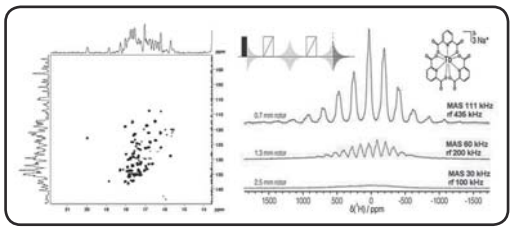
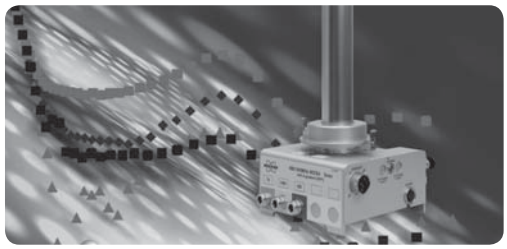


Fig. 1 0.7 mm超高速MASプローブでの測定例。（左）大腸菌由来のDNA結合蛋白質の^{1}H観測 ^{1}H-^{15}N相関スペクトル(^{1}Hおよび^{15}Nラベル試料300nl, 1Ghz, 111kHz MAS）（右）$NaTb_3(DPA)$の^{1}H観測スペクトル。超高速MASにより、良好に信号が分離しているのが分かる。

DiffBB ブロードバンド高磁場勾配プローブ



オートチューンを搭載した新しい5mm DiffBB ブロードバンド高磁場勾配プローブは様々な材料を対象とした拡散係数測定実験を可能にします。また、ブロードバンドでオートチューン搭載して簡便な使い勝手を持ちながらも、GREAT10もしくはGREAT60グラジェントアンプと組み合わせることで最大17　T/mもの磁場勾配を作り出すことができ、通常の溶液プローブで測定できない運動性の低い材料への適用もできます。また多核観測（BBO）とインバース（BBI）どちらのコイル構成も選択可能です。

主な仕様

- BBチューニング範囲：^{31}P - ^{15}N
  ^{2}Hロック
  コイル構成はBBOもしくはBBI
- 磁場勾配：最大17 T/m (GREAT60使用時)
- 温度可変範囲：-40～150 ℃
- グラジェント立ち上がり時間：300 us以下

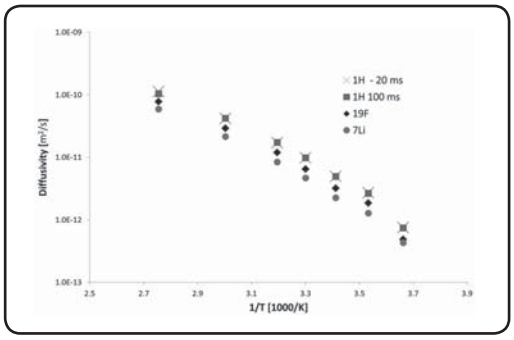


Fig. 2 DiffBBプローブを使った電解質中の1H、19F、7Liの温度変化拡散係数測定。試料は0.5M Lithium bis-Trifluoromethane-sulfonimide (LiTFSi)。温度変化は0～100℃の範囲でおこなわれた。

最高のNMRのための
世界最高性能の磁石

He再凝縮機能付きAeon 1 GHz磁石

ブルカー・バイオスピンでは、超伝導技術の進歩と冷凍技術の発達により、まったく新しい形の超高磁場磁石を完成させることができました。この新しい磁石はいままでのものとは異なり、小型で、設置しやすく、冷媒の充填が不要となりました。初めてのAeon 950 MHzシステムはイギリスのリーズ大学でインストールされ、初めてのAeon 1 GHzシステムもすでにドイツのバイロイト大学にインストールされています。これらのシステムで得られる結果がこの革新的なAeon超高磁場磁石の性能と可能性を示していくことでしょう。

アクティブシールディング技術の進歩

- 漏えい磁場を最小に抑え、5　Gラインの範囲をノンシールド磁石に比べて97%削減。
- 外部摂動に対する抑制機能を内蔵
- 磁場の安定性を確保するためにドリフトを最小限にする設計

Aeon冷却技術

- 液体窒素不要
- 2ステージのパルスチューブ冷凍機を使ったHe再液化機構を搭載
- 通常運用時はほぼ冷媒損失がない
- ユーザによる冷媒充填は不要。冷媒充填による時間のロスを抑え、より効率の良い運用を実現。

UltraStabilized™ 過冷却技術

- 過冷却による低温稼働で超高磁場でも長期間の安定性を達成
- ジュール・トムソン効果を使った過冷却でコイルを大気圧下において運用
- 世界中で230台以上の同型磁石を納入した経験と実績に基づいた品質

設置要領

- 5G ライン: 半径方向 3.6 m / 軸方向 4.9 m
- 最低天井高: 4.9 m
- 重量: 8000 kg

Ascend Aeon 950 MHz磁石
He再凝縮機能付き小型超高磁場磁石

新しいAscend Aeon 950 MHzは以前の950 MHz磁石とは異なり、コンパクトサイズと低重量、小さな漏えい磁場により、さまざま環境でインストールすることができます。それに加え、液体窒素を使わず通常運用時の液体ヘリウムの消費もほとんどないため、ユーザによる冷媒の充填も必要ありません。

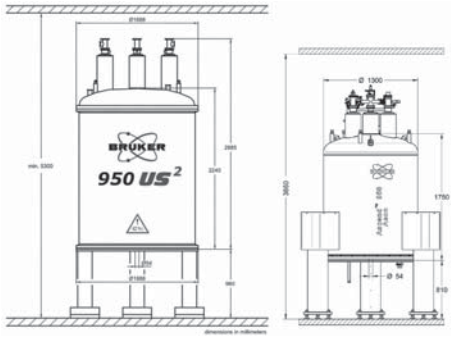


Fig. 2 左（旧型）: 7,200 kg, Heホールド: 60日, 5 Gライン 半径方向 3.3 m
右（新型）: 5,000 kg, He再凝縮, 5 Gライン半径方向 2.8 m

Fig. 1 バイロイト大学（ドイツ）にインストールされたAeon 1GHz。
ドリフトレート ~ 1 Hz/hr（実績値）。 写真は Prof. P. Röschより提供。

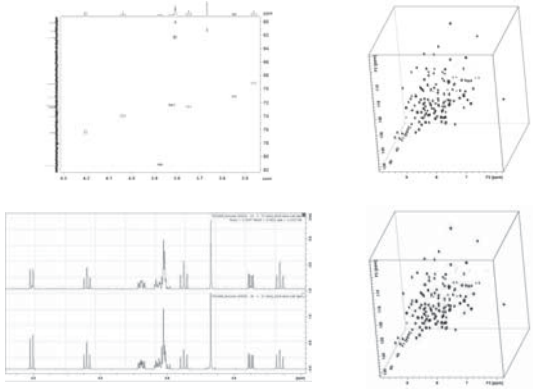


Fig. 3 バイロイト大学（ドイツ）の1 GHz NMR データ

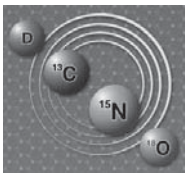
Fig. 4 Aリーズ大学（イギリス）にインストールされた
Ascend Aeon 950。ドリフトレート~ 1Hz/hr（実績値）。
写真はProf. A. Breezeより提供

ブルカー・バイオスピン株式会社

横浜事務所
神奈川県横浜市神奈川区守屋町3-9
電話 : 045-444-1390
電子メール：info.bbio.jp@bruker.com

大阪事務所
大阪府大阪市淀川区西宮原1-8-29
電話 : 06-6394-8989

電子メール：info.bbio.jp@bruker.com
ウェブサイト：www.bruker.com

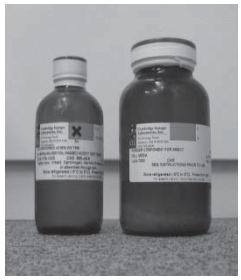


安定同位体標識試薬

(^{13}C ^{15}N D ^{17}･^{18}O)

Cambridge Isotope Laboratories.Inc(C.I.L)

- **NMR用**
  アミノ酸　糖　塩安　CHL培地　NMR溶媒　ユビキチン
- **トレーサー試験用**
  硫安　硝酸塩　尿素　被覆肥料　$^{13}CO_2$　$NaHCO_3$　他
- **メタルアイソトープ各種**
  Fe　Cu　Ni Cr　Cd　Ca　Na　K 他
- **希ガス 及び混合ガス**
  He　Ne　Ar　Kr　Xe他



＜その他、下記メーカー品の販売代理店もしております。＞
クロレラ工業㈱（日本）、ISOFLEX社（ロシア）、ICON社(米国）、OMICRON社(米国）

安定同位体受託分析

安定同位体比質量分析計（IR-MS）を導入し、安定同位体（^{13}C　^{15}N　D　^{18}O　^{34}S）の受託分析を行っています。

- **測定項目**
  ^{13}C　^{15}N　D　^{18}O　^{34}S の Natural 及び Tracer
- **測定機器**
  サーモ フィッシャー サイエンティフィック㈱製
  DELTA ^{plus} XL　DELTA ^{plus} Advantage
  DELTA V Plus、DELTA V Advantage　他

SHOKO SCIENCE

昭光サイエンス 株式会社
（旧SIサイエンス㈱）

〒105--8432 東京都港区芝公園2-4-1
TEL:03-3459-5104　FAX:03-3459-5081
E-mail:isotope@si-science.co.jp
URL:http//www.si-science.co.jp/

Ver20160706

購入単位は**２００本**以上のご購入で

5mmNMR サンプルチューブがなんと**１本２２０円**です。

型式 EC-57（全長 180mm）２００本×２２０円＝**４４，０００円**

２万円以上ご購入の場合送料は無料、しかも**キャップ付**きです！！

型式	寸法(mm)			真直度(μm)	単価(1 本の価格)			1 箱入数
	全長	外径	内径		1 箱購入時	2～7 箱購入時	8 箱以上以上購入時	
EC-57	180	4.965 +0.005 -0.010	4.220 ±0.10	30	320 円	280 円	220 円	25 本

材料は最高級品質のドイツ　ショット社（ほう珪酸ガラスを発明したフリードリッヒ・オットー・ショットさんの会社です。）の DURAN を使用しています。安価なものにはクラス B(JR-2)を使用しているものがほとんどです。当社の製品はすべて、クラス A(JR-1)を使用しております。

材質による違いの違い

１．熱膨張係数が違うので class B は温度可変に実験ができない。

２．class B はアルカリ溶出量が２倍も大きい。

３．サンプル管上部を口焼きしているため、非常に丈夫。

■表１　JIS R-3503 化学分析用ガラス器具 抜粋

等　級	ホウケイ酸ガラス class A	ホウケイ酸ガラス class B
記号	ＪＲ-1	ＪＲ-2
熱膨張係数 ×10^{-7}／℃	35 以下	55 以下
アルカリ溶出量（ｍｌ／ｇ）（μｇ／ｇ）	0.10 以下 31 以下	0.20 以下 62 以下

☆外径はセンタレス研磨により 4.965+0.005-0.010 と超高精密に研磨されておりスピナータービンに常に真っ直ぐ、きちっと収まります。

☆真直度は 30um でスピニングサイドバンドが出る心配はありません。

ご注文、ご質問は電話 042-624-2207(受付時間９時～１６時), FAX 042-622-0937 メール shigemi-corp@nifty.com あるいは　mitsuo.seki@shigemi.co.jp　Home page は http://www.shigemi.co.jp

☎ 042-624-2207(9 時～16 時)
FAX 042-622-0937
株式会社　シ ゲ ミ　http://www.shigemi.co.jp

Solutions for Innovation

原子、それはこの宇宙に存在する全ての物質、生命を形造っています。
これまで、118 種類の元素とその組み合わせを発見することが、わたしたちの生活を豊かにしてきました。
日本電子は、より多くの原子の観察と分子レベルでの構造情報の解析、そして新たな発見を求め
電子顕微鏡や核磁気共鳴装置など、様々な最先端理科学機器を開発し続けます。

観察するチカラ、解析するチカラ、
新たな物質の創造と機能の発見へと繋がる、それが JEOL のチカラ

JNM-ECZR シリーズ
JNM-ECZR シリーズは、最新のデジタル技術と高周波技術を駆使して開発された FT NMR システムです。回路の高集積化により信頼性の向上と筐体の小型化を実現しました。

JEM-ARM300F
JEM-ARM300F は自社開発の収差補正装置を組み込んだ最高加速電圧 300kV の原子分解能電子顕微鏡です。商用機として世界最高レベルの STEM−HAADF 保証分解能 63pm を実現しました。

JEOL 日本電子株式会社

本社・昭島製作所
〒196-8558　東京都昭島市武蔵野3−1−2　TEL：(042) 543−1111(大代表)　FAX：(042) 546−3353
www.jeol.co.jp　ISO 9001・ISO 14001　認証取得
JEOL グループは、「理科学・計測機器」「産業機器」「医用機器」の 3 つの事業ドメインにより事業を行っております。
「理科学・計測機器事業」電子光学機器・分析機器・計測検査機器　「産業機器事業」半導体関連装置・産業機器
「医用機器事業」医用機器

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…)
- ✓ ***Products for Proteomics and Metabolomics***
  (SILAC / SILAM / Mouse Diet / Mouse Tissue / Fish Diet etc…)
- ✓ ***Standards for Environmental Analysis***
- ✓ ***Isotopic Gases and Metals***
- ✓ ***Custom Synthesis Request****

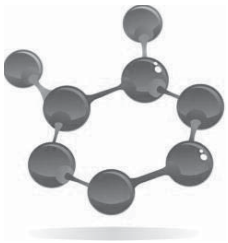
**＊カタログ製品以外にも、お客様ご希望の特別合成サービスも行っておりますので、 是非一度ご相談下さい。
http://www.sceti.co.jp/research_menu/synthesis/**

主要取扱メーカー

euriso-top®
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

研究試薬部　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

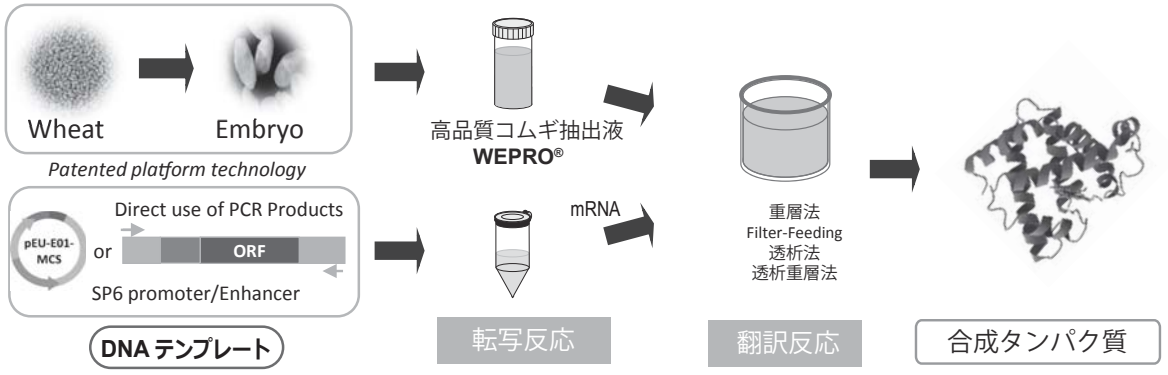
Protein Synthesis Solution

高品質コムギ無細胞タンパク質合成システム

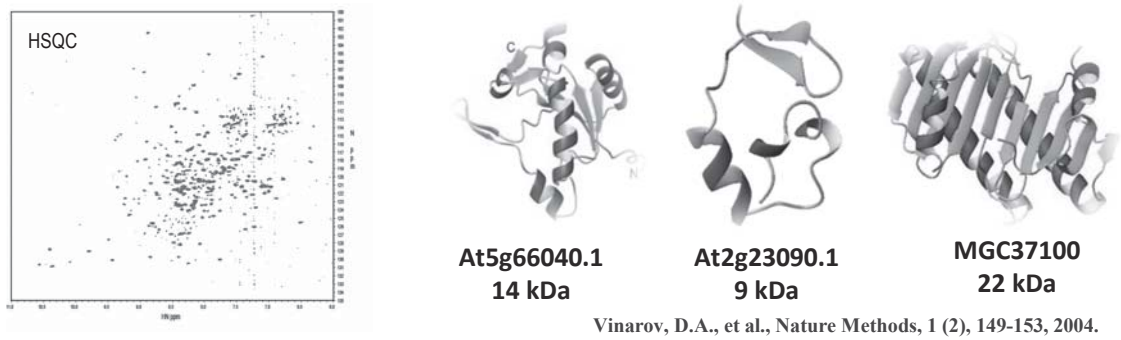
Study for Protein Science with NMR

- 生理的に毒性を有して細胞系では発現困難なターゲットも合成可能
- 真核生物由来なので、各種生物由来のターゲットを合成可能
- 難合成の膜タンパク質をproteoliposomeとして合成可能

Technology



NMR による解析例



Vinarov, D.A., et al., Nature Methods, 1 (2), 149-153, 2004.

コムギ無細胞タンパク質合成用試薬&キット

- WEPRO® 8240シリーズ
- WEPRO® 8240 (^{15}N) Expression Kit
- WEPRO® 8240 (^{13}C, ^{15}N) Expression Kit

高品質コムギ抽出液
WEPRO®

受託合成サービス

- コムギ無細胞タンパク質合成システム用発現用鋳型構築
- 発現確認・可溶性テスト・精製テスト
- スケールアップ合成
- 各種オプション : 共発現, proteoliposome合成, 大量合成, 各種ラベル化タンパク質合成.....等

CFS CellFree Sciences

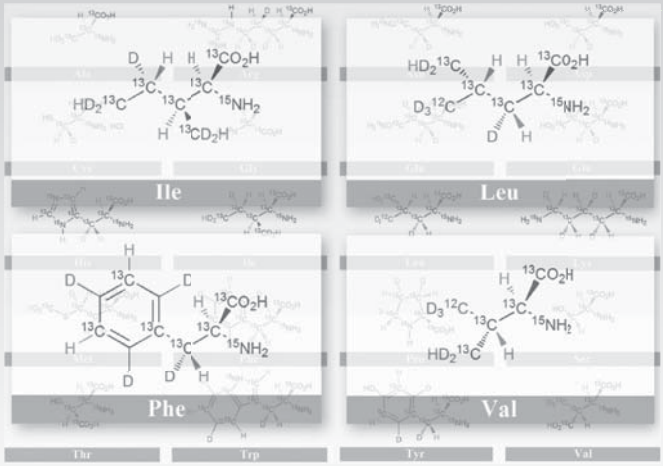
株式会社セルフリーサイエンス

〒230-0046 横浜市鶴見区小野町75-1 リーディングベンチャープラザ201
TEL : 045-500-2119 / FAX : 045-500-2117
EMail: tech-sales-JP@cfsciences.com http://www.cfsciences.com

SAIL Amino Acids × Cell-Free Protein Expression Kit

SAIL Amino Acids Mixture

Quantity	1 mL
Price	¥220,000



Custom
(Selective Methyl and/or Aromatic Ring Labeling)

Example :	Leu (L019) + Val (V007) + 18-Deuterated Amino Acids
Quantity	1 mL
Price	¥120,000

Cell-Free Protein Expression Kit SI SS

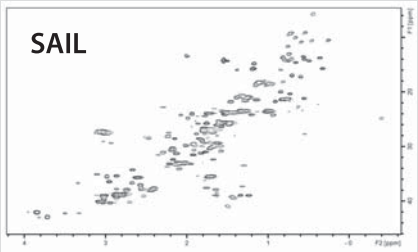
Product No.	A89-0126
Quantity	1 kit
Storage Temperature	-80 ℃
Price	¥65,000

Cell-Free Protein Expression Kit SI

Product No.	A29-0059
Quantity	1 kit
Storage Temperature	-80 ℃
Price	¥55,000

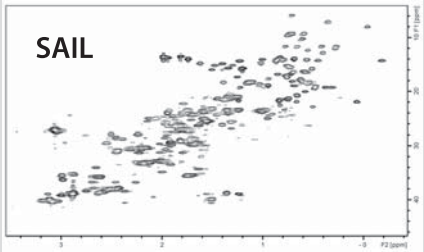
Cell-Free Protein Expression Kit is developed under license from RIKEN.

Ubiquitin (8.5 kDa)



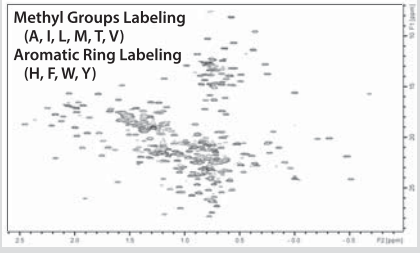
^{1}H-^{13}C ct-HSQC spectrum (400 MHz)

RAS (22 kDa)



^{1}H-^{13}C ct-HSQC spectrum (400 MHz)

MSG (82 kDa)



^{1}H-^{13}C HMQC spectrum (900 MHz)

Sample Prepared by 1 Cell-Free kit

TAIYO NIPPON SANSO
The Gas Professionals
Phone: +81(3)5788-8550
E-mail: Isotope.TNS@tn-sanso.co.jp

ISOTEC™
A MEMBER OF THE SIGMA-ALDRICH FAMILY

SAIL TECHNOLOGIES

- Prices are excluding tax.
- Please contact ISOTEC for international sales.

アルファバイオ株式会社

アルファバイオ株式会社は、理化学機器、研究用試薬、バイオテクノロジー関連機器の
販売を通じて、研究者の皆様のお手伝いをさせていただきます。

取扱メーカーは多数ございます。どのような事でもお気軽にお問い合わせください。

http://www.alpha-bio.jp/

本社（広島）　〒734-0015 広島市南区宇品御幸3丁目2-1
TEL 082-569-7117　FAX 082-569-7118

岡山営業所　〒700-0952 岡山市北区平田163-107
TEL 086-250-8816　FAX 086-250-8817

お客様と明日の
「ワクワク」を共感するため・・・

試薬・消耗品・理化学機器販売及び修理

広島和光株式会社

Mail:e-hiroshima@hiroshima-wako.co.jp
TEL:082-431-3511　FAX:082-431-3515

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賞と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。また、今年度より、SIサイエンス株式会社よりSIサイエンス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。