第56回 NMR討論会（2017）

The 56th Annual Meeting of the Nuclear Magnetic Resonance Society of Japan (2017)

講演要旨集

Abstracts

会　期：**2017年11月14日（火）～16日（木）**
14–16 November 2017

会　場：**首都大学東京・南大沢キャンパス**
Tokyo Metropolitan University, Minami-Osawa Campus
〒192-0397　東京都八王子市南大沢1-1

主　催：日本核磁気共鳴学会

共催・協賛・後援：高分子学会，日本生物物理学会，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，日本分子生物学会

第56回NMR討論会　プログラム委員会

伊藤　　隆（首都大学東京）［委員長］

浅野　敦志（防衛大学校）

川村　　出（横浜国立大学）

佐藤　　一（ブルカーバイオスピン）

西村　千秋（帝京平成大学）

西山　裕介（JEOL RESONANCE）

山口　芳樹（理化学研究所）

渡邉　英宏（国立環境研究所）

三島　正規（首都大学東京）

池谷　鉄兵（首都大学東京）※チュートリアル担当

会場（首都大学東京・南大沢キャンパス）への交通案内

首都大学東京・南大沢キャンパス　〒192-0397　東京都八王子市南大沢1-1

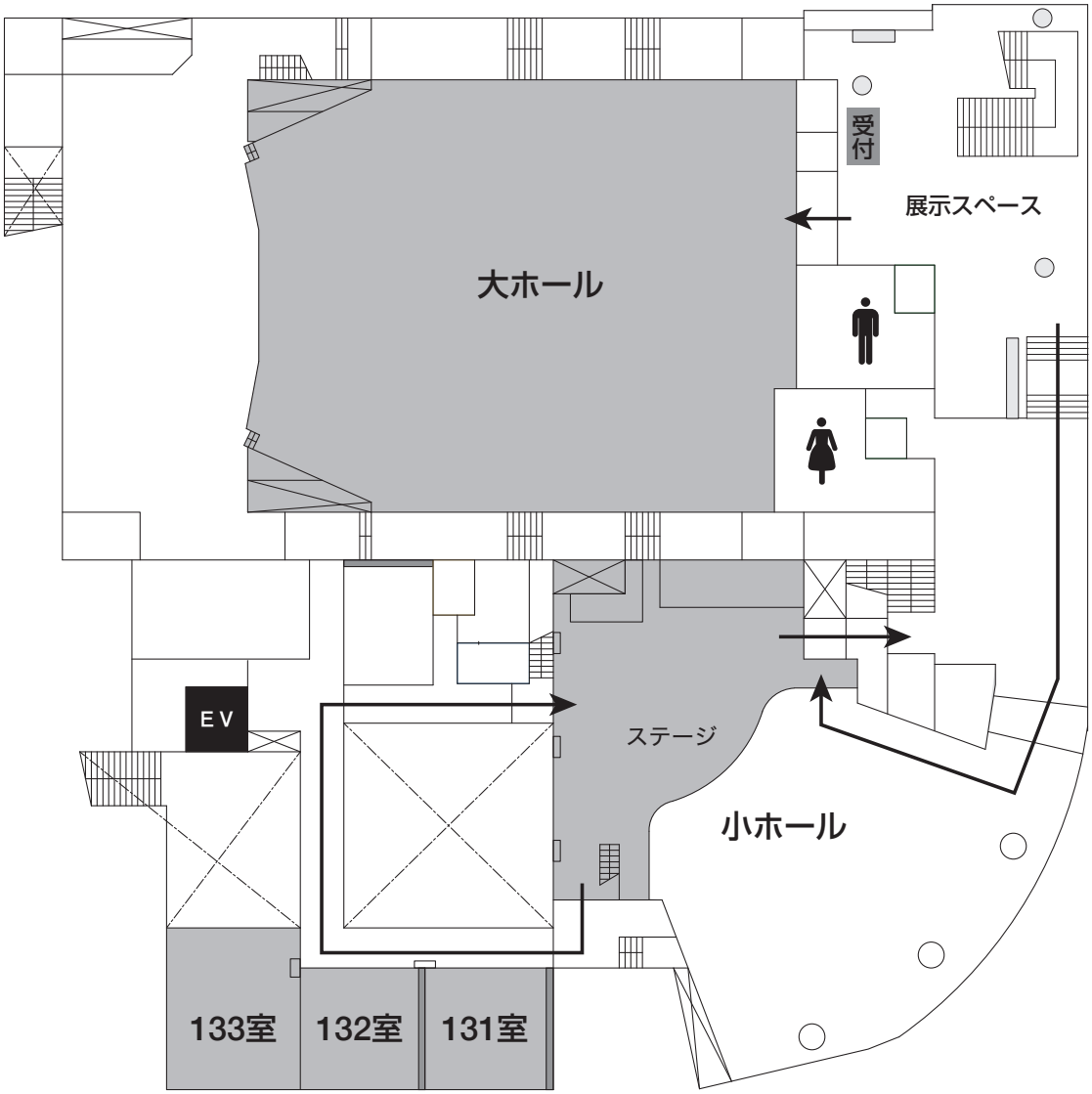
京王電鉄相模原線　「南大沢」駅　改札口から徒歩約5分
（京王線新宿駅から特急で最短約35分）

＊詳細は会場ホームページをご覧ください
http://www.tmu.ac.jp/university/campus_guide/access.html

会場の案内図

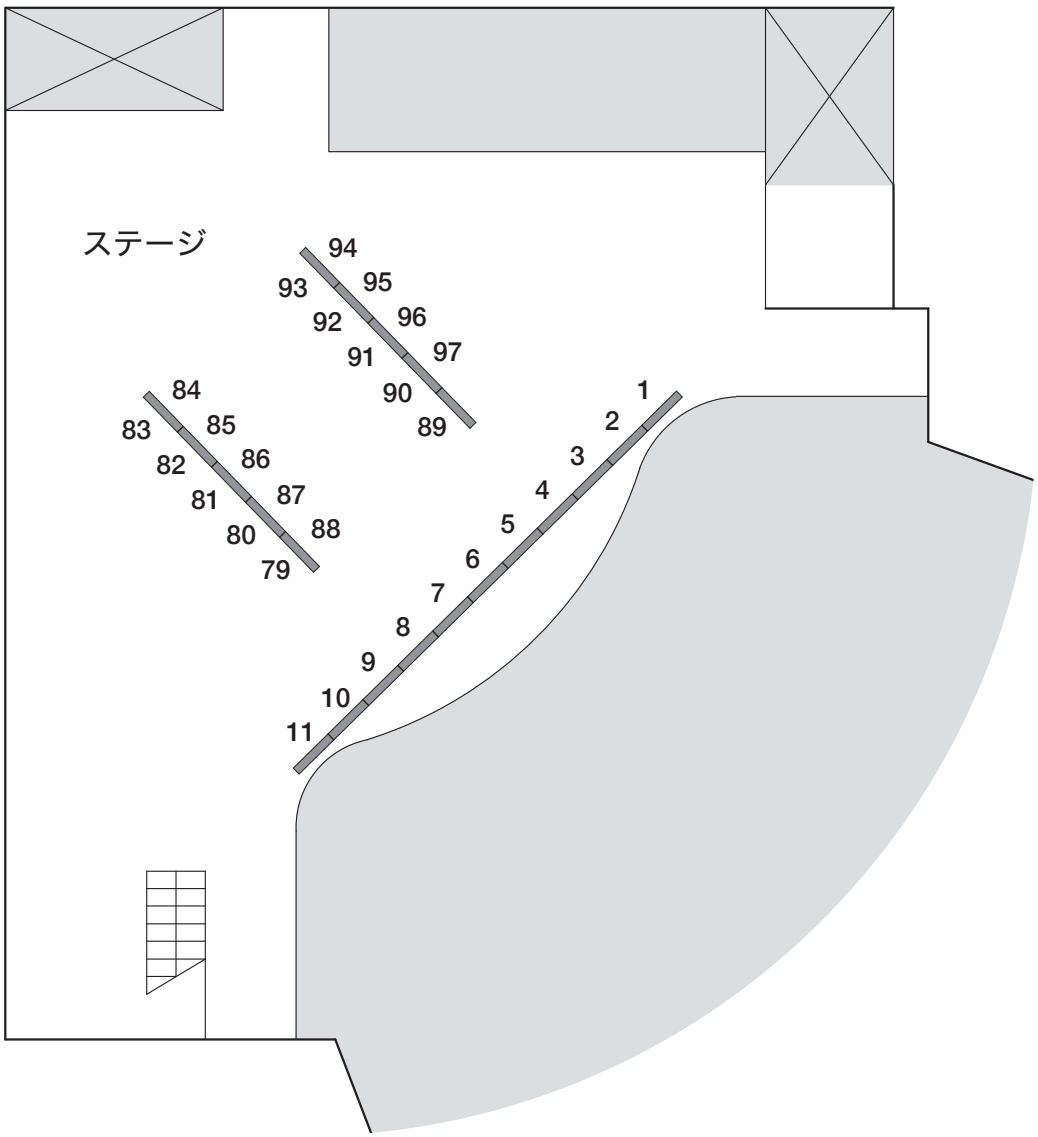
講堂　1F

［大ホール］講演会場
［小ホール, 131, 132, 133 室］ポスター発表会場

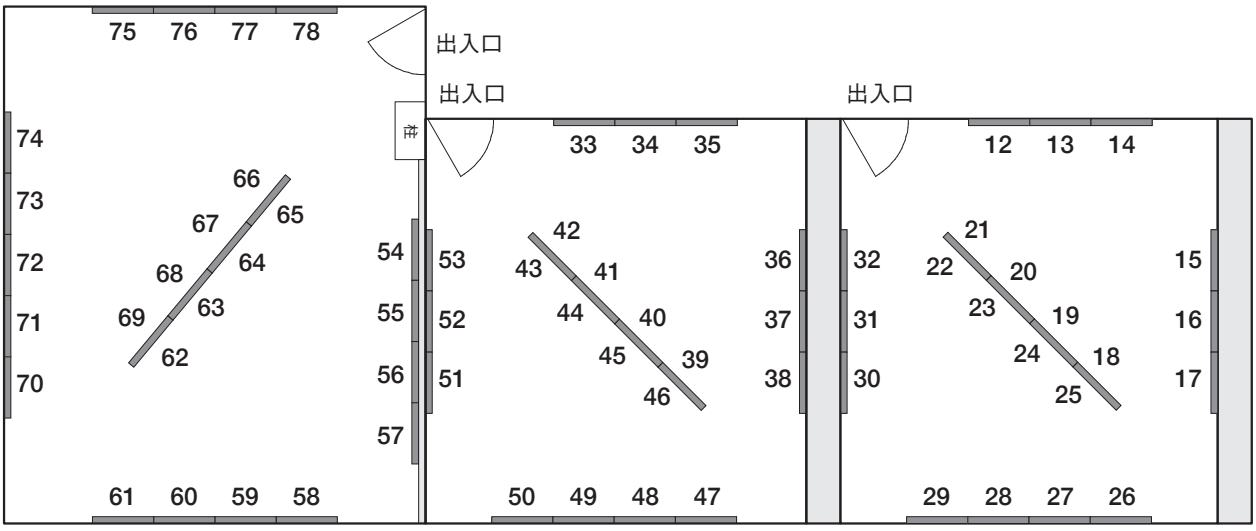


ポスター会場詳細図

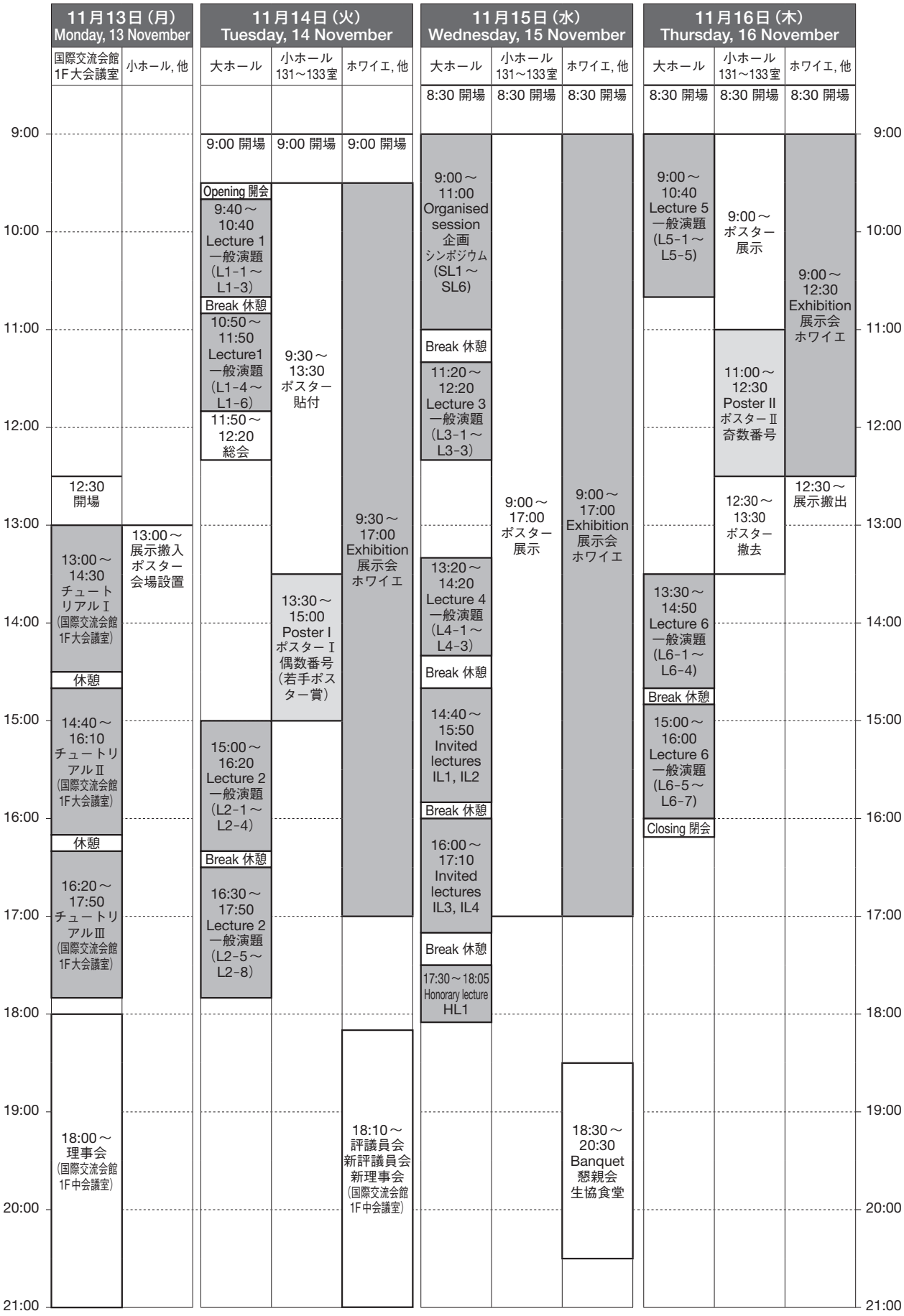
小ホール



133室　132室　131室



討論会日程表


11月13日（月）
Monday, 13 November
国際交流会館1F大会議室
小ホール, 他
12:30 開場
13:00～14:30 チュートリアルⅠ（国際交流会館1F大会議室）
休憩
14:40～16:10 チュートリアルⅡ（国際交流会館1F大会議室）
休憩
16:20～17:50 チュートリアルⅢ（国際交流会館1F大会議室）
18:00～ 理事会（国際交流会館1F中会議室）
13:00～ 展示搬入 ポスター 会場設置
11月14日（火）
Tuesday, 14 November
大ホール
小ホール 131～133室
ホワイエ, 他
9:00 開場
Opening 開会
9:40～10:40 Lecture 1 一般演題（L1-1～L1-3）
Break 休憩
10:50～11:50 Lecture1 一般演題（L1-4～L1-6）
11:50～12:20 総会
15:00～16:20 Lecture 2 一般演題（L2-1～L2-4）
Break 休憩
16:30～17:50 Lecture 2 一般演題（L2-5～L2-8）
9:30～13:30 ポスター貼付
13:30～15:00 Poster Ⅰ ポスターⅠ 偶数番号（若手ポスター賞）
9:30～17:00 Exhibition 展示会 ホワイエ
18:10～ 評議員会 新評議員会 新理事会（国際交流会館1F中会議室）
11月15日（水）
Wednesday, 15 November
大ホール
小ホール 131～133室
ホワイエ, 他
8:30 開場
9:00～11:00 Organised session 企画 シンポジウム（SL1～SL6）
Break 休憩
11:20～12:20 Lecture 3 一般演題（L3-1～L3-3）
13:20～14:20 Lecture 4 一般演題（L4-1～L4-3）
Break 休憩
14:40～15:50 Invited lectures IL1, IL2
Break 休憩
16:00～17:10 Invited lectures IL3, IL4
Break 休憩
17:30～18:05 Honorary lecture HL1
9:00～17:00 ポスター展示
9:00～17:00 Exhibition 展示会 ホワイエ
18:30～20:30 Banquet 懇親会 生協食堂
11月16日（木）
Thursday, 16 November
大ホール
小ホール 131～133室
ホワイエ, 他
8:30 開場
9:00～10:40 Lecture 5 一般演題（L5-1～L5-5）
13:30～14:50 Lecture 6 一般演題（L6-1～L6-4）
Break 休憩
15:00～16:00 Lecture 6 一般演題（L6-5～L6-7）
Closing 閉会
9:00～ ポスター展示
11:00～12:30 Poster Ⅱ ポスターⅡ 奇数番号
12:30～13:30 ポスター撤去
9:00～12:30 Exhibition 展示会 ホワイエ
12:30～ 展示搬出
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

参加者へのご案内

1. 受付と参加登録

◇ **受付**

受付は講堂ホワイエ内に設けます.

受付時間：11月14日（火）　9:00～18:00
　　11月15日（水）　8:30～18:00
　　11月16日（木）　8:30～16:30

・事前登録された方で，参加費を支払済みの方は，受付デスクで手続きを行う必要はありません．本要旨集と一緒に送付した参加証を提示していただくだけでご入場できます.
・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，当日参加登録扱いになります.
（事前登録された方で，参加証送付後に振込みをされた方は，受付デスクでお申し出ください.）
・当日参加の方は，受付前に置かれた当日参加用紙にご記入の上，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
討論会参加費	￥4,000	￥2,000	￥13,000	￥7,000
懇親会	￥6,000	￥4,000	￥6,000	￥4,000

◇ **参加証（名札）**

参加証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．参加証のない方の入場は固くお断りします.

◇ **領収書の発行**

参加証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，参加証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56回NMR討論会ホームページ（http://www.nmrj.jp/NMR2017/）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，講堂ホワイエ内に設置する日本核磁気共鳴学会の受付でお支払いください．また，日本核磁気共鳴学会への入会も受け付けます.

2. 会場内のサービス・施設

◇ クローク

講堂内にクロークを設置しています．ただし，破損・紛失などの責任は負いかねますので，貴重品やコンピュータなどについては，各自でお持ちください．懇親会の際には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14日（火）　8:30～18:00
　　11月15日（水）　8:30～18:30
　　11月16日（木）　8:30～16:30

◇ インターネット

講堂に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

◇ 飲食・喫煙

展示会場・ポスター会場付近に飲食可能なスペースを設置いたしますが，広さに限りがあります．キャンパス内講堂付近の飲食可能な場所については受付にてご案内いたします．
キャンパス内は一部の指定区域を除いて禁煙になっています．喫煙場所についても受付にてご案内いたします．

◇ 携帯電話

口頭発表会場（大ホール）内での携帯電話による通話を禁止します．口頭発表会場内では，電源をオフにするかマナーモードに設定して，呼び出し音がならないようにお願いいたします．

4. 第56回NMR討論会についてのお問い合わせ

◇ 会期中

総合受付
〒192-0397　東京都八王子市南大沢1-1
首都大学東京・南大沢キャンパス　講堂ホワイエ

◇ 会期外

第56回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：nmr56@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，講堂大ホール内の「座長席」(休憩を挟まない場合は「次座長席」) までお越しください.

進行：進行は座長に一任いたします．例年，終了時間が延びる傾向にあり，セッション終了後に予定されている会議や懇親会の開催に影響が出ることが懸念されます．討論会日程の円滑な進行のために，ご担当されるセッションの予定通りの終了にご協力いただきますようお願いいたします.

◇ **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ください．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ください．プロジェクターとの接続はD-subコネクターのみになっております．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になりますので，必ず持参してください．バックアップ用として，発表データをUSBメモリもしくはCD-ROM等で持参してください.

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ください．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ください．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PC受付までお越しください.

講演時間：持ち時間は，特別講演35分，招待講演35分，一般講演20分です．時間経過はベルでお知らせしますが，そのタイミングは以下の通りです．持ち時間内での終了にご協力いただきますようお願いいたします.

	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，日本語で作成された場合には，図の説明文には英語を用い，タイトル・名前・所属については英語も併記してください．また，発表者の氏名は，左に○印を付けるなどして明示してください．文字や図の大きさ，行間については，やや離れた距離からでも判別できるように配慮をお願いいたします.

ポスターを貼付するスペースのサイズは，1件あたり，縦210cm×横90cmとなっており，このサイズの範囲で自由に作成していただいて結構です．ただし，貼付の際には，（見やすさのために）床から30cm程度のスペースの確保を心掛けていただくようにお願いします．左上隅の約20cm四方のスペースに演題番号を表示してあります．画鋲は各ポスターパネルに用意します.

展示場所：ポスター会場は全て講堂内にありますが，(1) 小ホールステージ上，(2) 131室，(3) 132室，(4) 133室の4か所に分かれています．パネル左上隅に表示された演題番号をご確認の上，貼付・展示をお願いいたします.

掲示期間：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14日（火）9：30～13：30の間に掲示し，11月16日（木）12：30～13：30の間に取り外してください．ポスター撤去

時刻を過ぎても取り外されないポスターは事務局で撤去します.

ポスター発表時間：ポスター番号が偶数番号（P2, P4, …）の方は，11月14日（火）13:30～15:00の間にポスター討論を行ってください（若手ポスター賞登録者のポスターには全て偶数番号が割りあてられています）．奇数番号（P1, P3 …）の方は，11月16日（木）11:00～12:30にポスター討論を行ってください．また，発表者はポスターボードに備え付けられたリボンを付けて発表して下さるようにお願いします.

6. 2017年度日本核磁気共鳴学会通常総会開催通知

日　時：2017年11月14日（火）　11:50～12:20
場　所：講堂大ホール

日本核磁気共鳴学会通常総会を開催しますので必ずご出席ください．やむをえず欠席される方は事前に委任状の提出をお願いいたします．委任状はNMRニュースレターで電子メール送付されます．委任状にご記入の上，指定の提出先にメールで送信をお願いいたします.
（委任状は討論会受付デスクにも印刷したものを用意しておきますので，総会開始までに紙媒体で受付にご提出いただいても構いません）
なお，委任状の提出は，総会を欠席する一般会員だけが必要であり，学生会員，賛助会員は必要ございません.

7. 理事会・評議員会の案内

理事会	11月13日（月）18:00より	国際交流会館1F中会議室
評議員会	11月14日（火）18:10より　※	国際交流会館1F中会議室
新評議員会		
新理事会		

※通常総会で承認された新評議員も出席の必要があります．また，新理事会は新評議員会が終わりしだい開催します.
なお，今回から理事会・評議員会での食事の用意がなくなりました．どうぞよろしくお願いいたします.

チュートリアルコース

日　時：11月13日（月）／ Tuesday 13 November 2017　13：00～17：50（受付12：30～）
会　場：国際交流会館1F大会議室（受付　大会議室入口前）

13:00～14:30

「最適な測定を考える」

八木　宏昌　先生（理化学研究所）

溶液NMRの方法論は成熟期を向かえ，今やほとんどの測定は予め用意されたパラメータを読み込んでルーチンでおこなえるようになった．しかし，ふと立ち止まってみると，例えばHSQCを測定しようと思い標準測定法を呼び出してみると，同じHSQCなのに幾つもの測定法があるのに気づく．いったい何が違うのだろうかと考えてみたことはないだろうか？ 今回のチュートリアルコースでは，これらの基本的な違いを原理に基づき解説し，どういったときにどのような測定を行うのが最適なのかを，タンパク質の解析を例にとって，自らの経験を踏まえて紹介したい．NMR業界の現状を見渡すと必ずしも測定時間がふんだんに確保できるとは限らない．限られた時間内でベストな測定をするには何に着目したら良いか？ もしかしたら今より効率の良い測定法があるかもしれない．この機会に自分のルーチンを少し振り返ってみてはいかがでしょうか．

14:40～16:10

「固体NMRにおける ^{13}C–^{13}C 間の偏極移動」

大橋　龍太郎　先生（金沢大学）

固体NMRは，X線回折や溶液NMRなどの測定法では構造解析が困難な試料にも適用できる測定法として期待されており，近年では膜タンパク質などの構造も解析できるようになっている．NMRでは，溶液NMRの ^{1}H-^{1}H NOESY法に代表されるように，原子核間の距離情報から分子構造が解析される．固体NMRの場合は ^{1}H よりも ^{13}C の方が高分解能で測定が可能であるため，^{13}C-^{13}C 間の距離情報を得るための測定法が盛んに研究されてきた．約10年前までは ^{13}C–^{13}C 間の距離は2つの炭素原子のみに限定した手法では ^{13}C–^{13}C 間の距離を正確に求められるが，3スピン以上の ^{13}C 同士の距離を求めるためのブロードバンドな手法ではおおまかな距離しか求められなかった．しかし最近では，天然存在比の試料を用いて0.1Å以下の精度で ^{13}C-^{13}C 間の距離を決定したという報告例のようにブロードバンドな手法で求められる ^{13}C-^{13}C 間の距離の精度が上がってきており，固体NMRによる ^{13}C–^{13}C 間距離の測定法を用いた構造解析が今後より発展していくことが期待される．本講演では，ブロードバンドな測定法の中でも広く用いられているPDSD, DARRなどの ^{1}H-^{13}C 間の双極子相互作用を用いた ^{13}C–^{13}C 間の偏極移動について，偏極移動の基礎的な概念や偏極移動速度導出の概要などについて説明する．

16:20～17:50

「NMRを創った人たち：第1話　夜明け前
2. Rabiの分子線NMRの成功とGorterの凝縮系NMRの失敗」

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て，学問が創られた背景にある含蓄に富んだ話はすっかり削ぎ落とされている．しかし，先人たちが歴史的な研究に取り掛かったきっかけ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，我々にとって間違いなく貴重な財産になるであろう．そのためには，研究を行なった本人の経歴や人物像，研究が行なわれた時代背景，研究環境，周辺の人々の関わりや反応など，学問が創られるに至った状況を様々な角度から知ることも極めて重要である．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て，できる限りその研究が成功するに至った道のりや，研究が行われた現場を，様々な文脈において多面的に蘇らせる．うまくいけば，おそらくはその人物の人間性や生き方に根ざしているであろう，研究に対する姿勢やものの考え方，奥深い想いが浮かび上がってくるかも知れない．その試みを通して，研究者として歩み出した若い人たちに，“科学する”とはどういうことなのかを物語全体から感じ取ってもらえれることを願っている．今回は，BlochとPurcellに先立ってNMRを試みたRabiとGorterについて話す．

第56回 NMR討論会(2017)

The 56th Annual Meeting of the Nuclear Magnetic Resonance Society of Japan (2017)

会　期：　2017年11月14日(火)～16日(木)
14-16 November 2017

会　場：　首都大学東京・南大沢キャンパス
Tokyo Metropolitan University, Minami-Osawa Campus
〒192-0397　東京都八王子市南大沢1-1

第1日目　11月14日(火)／Day 1 (Tue. 14 Nov.)

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(日本核磁気共鳴学会会長)
Opening remarks: Kiyonori Takegoshi
(President of the Nuclear Magnetic Resonance Society of Japan)

一般演題1　　[会場:大ホール]

9:40～11:50　座長：浅野敦志(L1-1～L1-3)，武田和行(L1-4～L1-6)

9:40～10:00

L1-1　事前知識を用いた多次元MAS固体NMRスペクトルの高速測定
○田巻初，藤原敏道(大阪大学 蛋白質研究所)

10:00～10:20

L1-2　Using constant-time acquisition for resolution enhancement in proton double quantum magic-angle spinning spectra
○Henri Colaux[1], Yusuke Nishiyama[1,2] ([1]RIKEN CLST-JEOL Collaboration Center, RIKEN, [2]JEOL RESONANCE Inc.)

10:20～10:40

L1-3　リコンビナントクモ糸の超収縮ならびにポリアラニン部位に関する固体NMR研究
○田制侑悟[1]，亀谷俊輔[1,2]，佐藤健大[3]，菅原潤一[3]，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，[3](株) Spiber)

10:40～10:50　休憩

10:50～11:10

L1-4　$^{19}F/^{13}C$固体高分解能NMRを用いたフッ素－黒鉛層間化合物の構造解析
○村上美和[1]，松本一彦[2]，萩原理加[2]，松尾吉晃[3] ([1]京都大学 産官学連携本部，[2]京都大学大学院 エネルギー科学研究科，[3]兵庫県立大学大学院 工学研究科)

11:10～11:30

L1-5　13C-CSAとNCS解析によるオレフィンメタセシス触媒の反応性に関する研究
○山元啓司[1]，Gordon Christopher[1]，Liao Wei-Chih[1]，Christophe Copéret[1]，Christophe Raynaud[2]，Odile Eisenstein[2,3]，Richard Andersen[4] ([1]Department of Chemistry and Applied Biosciences, ETH Zürich, Switzerland，[2]Institut Charles Gerhardt, UMR 5253 CNRS, Universitat de Montpellier, France，[3]CTCC, Department of Chemistry, University of Oslo, Sweden，[4]Department of Chemistry, University of California, USA)

11:30～11:50

L1-6　固体NMRでみる角層の保湿メカニズム
○畑中稔[1]，蘇木佳彦[2]，片山靖[2] ([1]ブルカー・バイオスピン株式会社，[2]花王株式会社)

11:50～12:20　日本核磁気共鳴学会総会 / Meeting of the NMR Society of Japan [会場：大ホール]

12:20～13:30　**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 I (even numbers) including poster presentations for Young Scientists Poster Awards

ポスターセッション　［会場:小ホール他］

一般演題2　［会場:大ホール］

15:00～17:50　**座長：佐藤一（L2-1～L2-4），池上貴久（L2-5～L2-8）**

15:00～15:20

L2-1　**磁場配向NMRにおける配向力，温度安定性，表面改質容易性を兼ね備えた新規配向剤**
○内田紀之[1]，山口芳樹[1]，海老名保男[2]，佐々木高義[2]，石田康博[1]，相田卓三[1,3]（[1]理化学研究所 創発物性科学研究センター，[2]物質・材料研究機構，[3]東京大学・工学系研究科）

15:20～15:40

L2-2　**CAST/CNMRシステムを用いたClerodane型ジテルペンの^{13}C NMRの帰属と構造の評価**
○越野広雪[1]，栗澤尚暎[2]，木村賢一[2]，小市俊悟[3]，佐藤寛子[4,5]（[1]理化学研究所 環境資源科学研究センター，[2]岩手大学大学院 応用生物化学コース，[3]南山大学 理工学部 システム数理学科，[4]情報・システム研究機構，[5]チューリッヒ大学 化学科）

15:40～16:00

L2-3　**新規混合マイクロチップによる高速リアルタイムNMR**
○山崎和彦[1]，山崎智子[1]，奥山千枝子[2]，高橋正春[3]，田中良二[4]，末松浩人[4]（[1]産業技術総合研究所 バイオメディカル研究部門，[2]産業技術総合研究所 集積マイクロシステム研究センター，[3]産業技術総合研究所 企画本部，[4]JEOL RESONANCE）

16:00～16:20

L2-4　**深層学習により強化されたNMR立体構造解析**
○小林直宏[1]，永田崇[2]，服部良一[3]，新家粧子[1]，Julia M. Wurz[5]，Peter Güntert[4,5]，児嶋長次郎[6]，藤原敏道[1]（[1]大阪大学・蛋白質研究所，[2]京都大学・エネルギー理工学研究所，[3]徳島文理大学・薬学部，[4]Institute of Biophysical Chemistry, University Frankfurt, Germany，[5]首都大学東京・理工学部，[6]横浜国立大学・理工学部）

16:20～16:30　休憩

16:30～16:50

L2-5　**液系ラミネートLi-ion電池のin-situ NMR/MRI観察**
○拝師智之[1]，藤木聡[2]，相原雄一[2]（[1]（株）エム・アール・テクノロジー（つくば市），[2]（株）サムスン日本研究所）

16:50～17:10

L2-6　**SWIFT画像法におけるT_2情報の復活**
○三森文行[1]，小林尚玄[2]，Garwood Michael[2]（[1]国立環境研究所，[2]University of Minnesota, USA）

17:10～17:30

L2-7　**リン酸化ユビキチンの2つのコンフォメーションの立体構造決定と圧力効果**
○北沢創一郎[1]，青島佑[2]，伊賀惇記[1]，池谷鉄兵[3]，北原亮[1,4]（[1]立命館大学 薬学部，[2]立命館大学 生命科学研究科，[3]首都大学東京 都市教養学部，[4]大阪大学 蛋白質研究所）

17:30～17:50

L2-8　**光検出磁気共鳴法による生細胞における1分子運動の計測**
○白川昌宏[1]，五十嵐龍治[2]，源城拓哉[1]，外間進悟[1]，藤咲貴大[1]，寺田大紀[1]，田辺竜太郎[1]，大木出[1]，吉成洋祐[3]，杤尾豪人[4]（[1]京都大学・大学院工学研究科，[2]科学技術振興機構，[3]日本電子株式会社，[4]京都大学・大学院理学研究科）

18:10～21:00　**日本核磁気共鳴学会評議員会・新評議員会・新理事会［会場：国際交流会館1F中会議室］**
（総会で承認された新評議員も出席の必要があります．また，新理事会は新評議員会が終わり次第開催します）

第2日目　11月15日(水)／Day 2 (Wed. 15 Nov.)

9:00～17:00　**Exhibition**

Organised session on "isotope-aided methods in biological NMR" [Main Lecture Hall]

9:00～11:00　**Chairperson: Masatsune Kainosho**

9:00～9:30

SL1　Overview of Isotope Labeling Methods for Protein NMR
○John L. Markley (Biochemistry Department, University of Wisconsin-Madison, USA)

9:30～10:00

SL2　Isotope Labeling Approaches for Carbohydrates and Glycoproteins
○Koichi Kato[1,2] ([1]Okazaki Institute for Integrative Bioscience and Institute for Molecular Science, National Institutes of Natural Sciences, [2]Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University)

10:00～10:15

SL3　Mechanism of multidrug resistance transcriptional regulation revealed by quantitative dynamic analysis using site-specific isotope labeling
○Koh Takeuchi[1], Ichio Shimada[2] ([1]Molecular Profiling Research Center for Drug Discovery, National Institute of Advanced Science and Industrial Technology, [2]Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo)

10:15～10:30

SL4　Relaxation optimization using isotope labeling for studying larger proteins by NMR
○Yohei Miyanoiri[1,2], Mitsuhiro Takeda[2,3], Tsutomu Terauchi[4,5], Masatsune Kainosho[2,4] ([1]Institute for Protein Research, Osaka University, [2]Structural Biology Research Center, Graduate School of Science, Nagoya University, [3]Faculty of Life Science, Kumamoto University, [4]Graduate School of Science and Engineering, Tokyo Metropolitan University, [5]SAIL Technologies, Inc.)

10:30～10:45

SL5　Application of Isotope-Labeling Methods for Studying Protein Dynamics
○Takumi Ueda, Ichio Shimada (Division of Physical Chemistry, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo)

10:45～11:00

SL6　Concluding Remarks: Isotope-Labeling Methods-*past and future*
○Masatsune Kainosho[1,2] ([1]Graduate School of Science and Technology, Tokyo Metropolitan University, [2]Structural Biology Research Center, Nagoya University)

11:00～11:20　Break

Lecture session 3 [Main Lecture Hall]

11:20～12:20　**Chairperson: Izuru Kawamura**

11:20～11:40

L3-1　Sulfur-33 NMR of Organic Solids II
○Kazuhiko Yamada (Interdisciplinary Science Unit, Multidisciplinary Sciences Cluster, Research and Education Faculty, Kochi University)

11:40～12:00

L3-2　Over 1000-Times More Sensitive MAS NMR –DNP at 16.4 T and 30K –
○Yoh Matsuki[1], Shinji Nakamura[2], Shigeo Fukui[3], Toshitaka Idehara[4], Taiji Kanda[1], Jagadishwar Sirigiri[5], Hiroto Suematsu[2], Toshimichi Fujiwara[1] ([1]Institute for Protein Research, Osaka University, [2]JEOL RESONANCE Inc., [3]Cryovac Corp., [4]Research Center for Development of Far-Infrared Region, University of Fukui, [5]Bridge12 Technologies Inc., USA)

12:00～12:20

L3-3 Exploring the salt-cocrystal continuum with solid-state NMR using natural abundance samples: implications for crystal engineering [1]

Lalit Rajput[1], Manas Banik[1], Jayasubba Reddy Yarava[2], Sumy Joseph[1], Manoj Kumar Pandey[2,3,4], ○Yusuke Nishiyama[2,3], Gautam R. Desiraju[1] ([1]Solid State and Structural Chemistry Unit, Indian Institute of Science, [2]RIKEN CLST-JEOL Collaboration Center, RIKEN, [3]JEOL RESONANCE Inc., [4]Department of Chemistry, Indian Institute of Technology Ropar, Rupnagar, India.)

12:20～13:20 Lunch

Lecture session 4 [Main Lecture Hall]

13:20～14:20 **Chairperson: Yusuke Nishiyama**

13:20～13:40

L4-1 Structural change of Na^+ pumping Krokinobacter rhodopsin 2 induced by pH and alkali metal ions by solid-state NMR

○Arisu Shigeta[1], Rina Kaneko[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)

13:40～14:00

L4-2 Cooling-free dissolution DNP with an enhancement factor of above 660

○Makoto Negoro[1,2], Akinori Kagawa[1], Kenichiro Tateishi[3], Yoshiki Tanaka[1], Tomohiro Yuasa[1], Keigo Takahashi[1], and Masahiro Kitagawa[1] ([1]Graduate School of Engineering Science, Osaka University, [2]JST PRESTO [3]RIKEN Nishina Center for Accelerator-Based Science)

14:00～14:20

L4-3 ^{17}O MAS NMR of surface Si-OH groups of silica-alumina materials

○Toshikazu Takahashi[1], Juliette Blanrchard[2], Yanick Millot[2], YoshimichKiyozumi[3]
[1]Interdisciplinary research center for catalytic chemistry, AIST, [2]Laboratoire de Reactivite de Sruface, CNRS, [3]Tohoku Center, AIST

14:20～14:40 Break

Invited Lectures

14:40～15:15 **Chairperson: Atsushi Asano**

IL1 Applications of dynamic nuclear polarization (DNP)-enhanced solid-state NMR to materials science

○Takeshi Kobayashi (U.S. Department of Energy, U.S.A.)

15:15～15:50 **Chairperson: Izuru Kawamura**

IL2 NMR on membrane proteins – The use of magic angle sample spinning and dynamic nuclear polarization for the investigation of ABC transporters, GPCRs and Photoreceptors

○Clemens Glaubitz (Goethe University Frankfurt, Centre for Biomolecular Magnetic Resonance, Germany)

15:50～16:00 Break

16:00～16:35 **Chairperson: Masaki Mishima**

IL3 Chaperone – client-interactions: From basic principles to roles in health and disease

○S. Hiller[1], B. M. Burmann[1], L. He[1], R. Riek[2], J. A. Gerez[2], S. G. Rüdiger[3] ([1]Biozentrum, University of Basel, Switzerland, [2]Laboratory of Physical Chemistry, ETH Zurich, Switzerland, [3]Bijvoet Center for Biomolecular Research, Utrecht University, The Netherlands)

316:35～17:10 **Chairperson: Shigeyuki Yokoyama**

IL4 Single cell Hi-C and single molecule imaging to study nuclear architecture

Tim J. Stevens[1, 2], David Lando[1], Srinjan Basu[1], Yang Cao[1], Lisa-Maria Needham[3], Devina Shah[1], Kai J. Wohlfahrt[1], Wayne Boucher[1], Steven F. Lee[3], Brian Hendrich[4], Dave Klenerman[3], ○Ernest D. Laue[1]
([1]Department of Biochemistry, University of Cambridge, United Kingdom, [2]MRC Laboratory of Molecular Biology, United Kingdom, [3]Department of Chemistry, University of Cambridge, United Kingdom, [4]Wellcome Trust-MRC Stem Cell Institute, University of Cambridge, United Kingdom)

17:10～17:30 Break

Honorary Lecture

17:30～18:05 **Chairperson: Gota Kawai**

HL1 Small Volume. Why not?

○Seizo Takahashi (Prev. Japan Women's Univ.)

18:30～20:30 **Banquet**

第3日目　11月16日(木)／Day 3 (Thu. 16 Nov.)

9:00～12:30　**展示会**

一般演題5　　[会場:大ホール]

9:00～10:40　**座長：池谷鉄兵 (L5-1～L5-2)，児嶋長次郎 (L5-3～L5-5)**

9:00～9:20

L5-1　2次の非線形帯磁率によるオーバーハウザー効果の検討

○戸田充[1,2]，藤井裕[2] ([1](株) JEOL RESONANCE 技術部，[2]福井大学 遠赤外領域開発研究センター)

9:20～9:40

L5-2　フラーレン空間内部において静電的摂動を受けた孤立水分子の運動性評価

○橋川祥史，村田理尚，若宮淳志，村田靖次郎 (京都大学化学研究所)

9:40～10:00

L5-3　セレン含有糖鎖のNMRによる解析

○鵜澤洵[1]，島袋隼平[2]，鈴木達哉[2]，安藤弘宗[2,3]，山口芳樹[1] ([1]理化学研究所 糖鎖構造，[2]岐阜大 応用生物科学部，[3]岐阜大 生命の鎖統合研究センター)

10:00～10:20

L5-4　ベンチトップNMR実現に向けた超電導バルク磁石の開発

○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)

10:20～10:40

L5-5　非コードRNAとTLS/FUSタンパク質の相互作用様式と結合に伴うTLS/FUSの大きな構造変化

真嶋司[1,2]，ハマッド ネスリン[2]，小澤駿介[2]，渡辺大輝[3]，内橋貴之[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]京都大学大学院エネルギー科学研究科，[3]名古屋大学大学院理学研究科，[4]埼玉医科大学ゲノム医学研究センター)

10:40～11:00　休憩

11:00～12:30　**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:小ホール他]

12:30～13:30　昼食 / Lunch

一般演題 6[会場:大ホール]

13:30～16:00　**座長：西村千秋 (L6-1～L6-4)，伊藤隆 (L6-5～L6-7)**

13:30～13:50

L6-1　緩和速度の磁場依存性解析によるGタンパク質へのGDP結合の動的制御機構の解明

○外山侑樹[1,2]，加納花穂[1]，間瀬瑶子[1]，横川真梨子[1]，大澤匡範[1]，嶋田一夫[1] ([1]東京大学大学院 薬学系研究科，[2]日本バイオ産業情報化コンソーシアム)

13:50～14:10

L6-2　アゾベンゼン結合タンパク質の光異性化反応による変性メカニズム

○長島敏雄，植田啓介，山崎俊夫 (理化学研究所 ライフサイエンス技術基盤研究センター)

14:10～14:30

L6-3　藍色細菌由来の低分子量熱ショックタンパク質Orf7.5の構造機能相関

○森田勇人[1]，大宮永行[1]，石川南都子[2]，田中直樹[2]，林秀則[3,4]，仲本準[2] ([1]城西大学・理学部化学科，[2]埼玉大学・理工学研究科，[3]愛媛大学・プロテオサイエンスセンター，[4]愛媛大学・理工学研究科)

14:30～14:50

L6-4　**In-cell NMR実験の質や再現性を直接左右する最もcriticalな実験パラメータの同定**

○杉木俊彦[1]，山口良弘[2,3]，藤原敏道[1]，井上正順[3]，伊藤隆[4]，児嶋長次郎[1,5]（[1]大阪大学・蛋白質研究所，[2]大阪市立大学大学院・複合先端研究機構，[3]ラトガース大学，[4]首都大学東京大学院・理学研究科，[5]横浜国立大学大学院・工学研究科）

14:50～15:00　休憩

15:00～15:20

L6-5　**長鎖機能性ノンコーディングRNA, SINEUPの構造解析**

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

15:20～15:40

L6-6　**トリガーファクターシャペロン二量体のNMR立体構造解析**

○斉尾智英[1,2,3]，川越総一郎[2]，久米田博之[4,5]，石森浩一郎[1,2]，Charalampos G. Kalodimos[6]（[1]北海道大学 大学院理学研究院，[2]北海道大学 大学院総合化学研究院，[3]JST・さきがけ，[4]北海道大学大学院 先端生命科学研究院，[5]北海道大学 国際連携研究教育局 ソフトマターグローバルステーション，[6]Department of Structural Biology, St. Jude Children's Research Hospital, USA）

15:40～16:00

L6-7　F_1F_2-selective NMR spectroscopy

Erik Walinda[1]，森本大智[2]，白川昌宏[2]，○菅瀬謙治[2]
（[1]京都大学大学院 医学研究科，[2]京都大学大学院 工学研究科）

16:00～16:10　**閉会の挨拶（世話人）**

一般ポスター発表／Poster presentation［小ホール他］

偶数番号：1日目（2017/11/14），奇数番号：3日目（2017/11/16）
Y：若手ポスター賞

P01 **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，平尾優佳，西村善文（横浜市立大学・生命医科学研究科）

P02 **COSY法の新しい応用測定 − MDEC-J-resolved COSY法について**
○降旗一夫[1]，田代充[2]（[1]東大院農・応生化，[2]明星大・理工）

P03 **生体系の溶液NMRにおける超偏極技術の新たな展開**
○大木出[1]，藤咲貴大[1]，池上貴久[2]，白川昌宏[1]（[1]京都大学大学院・工学研究科，[2]横浜市立大学 生命医科学研究科）

P04 Y **定量NMRと高速液体クロマトグラフィーを組み合わせたハロ酢酸混合標準液の濃度測定**
○山﨑太一[1]，中村哲枝[1]，沼田雅彦[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，[2]国立医薬品食品衛生研究所）

P05 **マルチサイトの選択励起パルスを用いた二次元NMR測定の分解能の向上**
○金場哲平[1,2]，堤遊[1]（[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）

P06 **緩和分散CPMG法におけるスピン状態に依存したアーティファクト削減の解析**
長土居有隆[1]，○池上貴久[2]（[1]技術サービス・ブルカーバイオスピン株式会社，[2]横浜市立大学・生命医科学研究科）

P07 **溶液NMR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]，工藤工[1]，金場哲平[1,2]，伊藤隆[1]，三島正規[1]（[1]首都大学東京理工学研究科，[2]ブルカー・バイオスピン株式会社）

P08 **ガス圧NMR法によるタンパク質における酸素結合部位の決定**
○北原亮[1]，桜庭俊[2]，亀田倫史[3]，奥田三四郎[4]，Xue Mengjun[5]，Frans AA Mulder[5]（[1]立命館大学・薬学部，[2]東京大学大学院・新領域創成科学研究科，[3]産業技術総合研究所人工知能研究センター，[4]立命館大学・生命科学研究科，[5]オーフス大学iNANO研究所）

P09 **レオロジーNMRを用いたタンパク質線維形成機構の解明**
○森本大智[1]，ヴァリンダ エリック[2]，岩川直都[1]，シェラー ウルリッヒ[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）

P10 Y **^{13}C検出法によるアルギニン側鎖のNMR信号検出およびイオン化状態の同定**
○吉村優一[1]，Oktaviani Nur Alia[2]，米澤健人[3]，上久保裕生[3]，Mulder Frans[1,2]（[1]オーフス大学 Interdisciplinary Nanoscience Center（iNANO）and Department of Chemistry，[2]フローニンゲン大学 Groningen Biomolecular Sciences and Biotechnology Institute，[3]奈良先端科学技術大学院大学 物質創成科学研究科）

P11 **溶液NMRを用いたリン酸化タンパク質とマルチドメインタンパク質の複合体の構造解析**
○工藤工，伊藤隆，三島正規（首都大学東京 理工学研究科）

P12 Y **RNA結合タンパク質Musashi-1のRBD2:r（GUAGU）複合体溶液構造決定と標的RNA選択メカニズムの解明**
○岩岡諒[1,2]，永田崇[1,2]，津田健吾[3]，今井貴雄[4,5]，岡野栄之[4]，小林直宏[6]，片平正人[1,2]（[1]京都大学大学院・エネルギー科学研究科，[2]京都大学・エネルギー理工学研究所，[3]理研・CLST，[4]慶應義塾大学・医学部・生理学教室，[5]慶應義塾大学・医学部・化学教室，[6]大阪大学・蛋白質研究所）

P13 **常磁性効果を用いた溶液NMR法による蛋白質の立体構造解析**
○岡田真由[1]，池谷鉄兵[1]，Rajesh Sundaresan[1]，野尻英里[1]，美川務[2]，伊藤隆[1]（[1]首都大学東京大学院 理工学研究科，[2]理化学研究所 生命システム研究センター）

P14 **ヘム軸配位子ヒスチジンの電子構造における共鳴がミオグロビンの外部配位子識別に与える影響**
○山本泰彦[1]，田口耕太朗[1]，鳥澤真鈴[1]，渡邉美帆[1]，西村龍[1]，柴田友和[1]，鈴木秋弘[2]，根矢三郎[3]，逸見光[4]（[1]筑波大院・数理物理，[2]長岡高専・物質工，[3]千葉大院・薬，[4]農研機構・食品部門）

P15　^{19}F含有化合物を用いた蛋白質と薬剤との相互作用解析法の開発
○新家粧子[1]，小橋川敬博[2]，滝沢剛[3]，半沢宏之[3]，藤原敏道[1]，児嶋長次郎[1,4]（[1]大阪大学・蛋白質研究所，[2]熊本大学・大学院生命科学研究部，[3]第一三共RDノバーレ株式会社・合成化学研究部，[4]横浜国立大学・大学院工学府）

P16 Y　哺乳類においてイントロン中で保存されている領域から発現している低分子non-coding RNAの二次構造解析
○鈴村拓馬[1]，清澤秀孔[2]，河合剛太[1,2]（[1]千葉工業大学大学院工学研究科，[2]千葉工業大学先進工学部）

P17　新規Rheo-NMR法を用いたALS関連タンパク質SOD1線維形成機構の解明
○岩川直都[1]，森本大智[1]，Walinda Erik[2]，菅瀬謙治[1]，白川昌宏[1]（[1]京都大学大学院 工学研究科，[2]京都大学大学院 医学研究科）

P18 Y　高圧力NMR法によるユビキチンの局所変性状態の立体構造決定
○若本拓朗[1]，北沢創一郎[2]，池谷鉄兵[3]，亀田倫史[4]，Roumestand Christian[5]，Baxter Nichola[6]，Williamson Mike[6]，北原亮[2]（[1]立命館大学大学院 生命科学研究科，[2]立命館大学 薬学部，[3]首都大学東京 理工学研究科，[4]産総研 創薬基盤研究部門，[5]モンペリエ大学，[6]シェフィールド大学）

P19　翻訳開始前複合体において形成される翻訳開始因子間の結合ネットワークの役割
○永田崇[1,2]，吉田尚史[3]，雲財悟[4]，浦野健[5]，浅野桂[6]，尾林栄治[5]（[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]神奈川科学技術アカデミー・創薬グループ，[4]法政大学・生命機能学科，[5]島根大学・医学部，[6]カンザス大学・生物学科）

P20 Y　ダイユビキチンの結合様式特異的な動的構造の解明
○高嶋真吾[1]，ヴァリンダ エリック[2]，森本大智[1]，菅瀬謙治[1]，白川昌宏[1]（[1]京都大学大学院・工学研究科，[2]京都大学大学院・医学研究科）

P21　タウ凝集化を阻害するプロリン異性化酵素Pin1の異性化活性メカニズム
○栃尾尚哉[1]，Jing Wang[2]，楯真一[2]，楯直子[1]（[1]帝京大学薬学部，[2]広島大学大学院理学研究科）

P22 Y　酵母*Pichia pastoris*発現系を用いたメチル基選択的^{13}C標識タンパク質試料の調製とNMR解析
○鈴木里佳，坂倉正義，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）

P23　酸化ストレス応答におけるKeap1の構造・相互作用解析
○井上仁[1]，村松亜紀[2]，鈴木隆史[2]，磯達朗[2]，小柴生造[1]，山本雅之[1,2]（[1]東北大学 東北メディカル・メガバンク機構，[2]東北大学大学院 医学系研究科）

P24 Y　Conformation and dynamics of soluble repetitive domain of spider dragline silk protein rationalizes an initiation step of β-sheet formation
○Nur Alia Oktaviani, Keiji Numata（Enzyme Research Team, RIKEN Center for Sustainable Resource Sciences）

P25　NMRを用いた血清中での抗体の相互作用解析
○谷中冴子[1,2]，山崎俊夫[3]，與語理那[1,2]，矢木宏和[2]，加藤晃一[1,2]（[1]自然科学研究機構 分子科学研究所，[2]名古屋市立大学 大学院薬学研究科，[3]理化学研究所 ライフサイエンス技術基盤研究センター）

P26 Y　GPCRモジュレーターspinophilinとアドレナリン受容体細胞内ループとの相互作用：NMR情報を基にした相互作用部位の絞り込み
○浦野智子，島崎安希子，宮下祐美，細田和夫，寺脇慎一，若松馨（群馬大学大学院理工学府）

P27　MAPK p38αによるストレス刺激に適合した基質選別機構の解明
○徳永裕二[1,2]，竹内恒[1]，高橋栄夫[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]バイオ産業情報化コンソーシアム，[3]横浜市立大学 生命医科学研究科，[4]東京大学大学院 薬学系研究科）

P28 Y　マルチドメインタンパク質における構造アンサンブルと各構造の存在比の解析
○瀧下俊平[1]，齋尾智英[1,2,3]，平松蒼野[1]，久米田博之[4,5]，清水和美[6]，石森浩一郎[1,2]（[1]北海道大学大学院 総合化学研究院，[2]北海道大学大学院 理学研究院，[3]JST・さきがけ，[4]北海道大学大学院 先端生命科学研究院，[5]北海道大学 国際連携研究教育局 ソフトマターグローバルステーション，[6]早稲田大学大学院 教育・総合科学学術院）

P29　HP1αのN末端天然変性領域のリン酸化によるヘテロクロマチン形成機構の解析
○古川亜矢子[1]，栗田順一[1]，下條秀朗[1]，中山潤一[2]，西村善文[1]（[1]横浜市立大学生命医科学研究科，[2]基礎生物学研究所）

P30 Y **マルチドメインタンパク質のドメインダイナミクスが持つ機能上の役割の解明 － SAXSとNMR（RDC/PRE/CSP）による統合的アンサンブル構造解析 －**
○川嵜亮祐[1]，Jie-rong Huang[2]，Yun-Tzai Cloud Lee[3]，栃尾尚哉[4]，Shang-Te Danny Hsu[3]，楯真一[1,4]
（[1]広島大学・理学研究科・数理分子生命理学専攻，[2]台湾國立陽明大學・生化暨分子生物學研究所，[3]中央研究院・生物化学研究所，[4]広島大学・クロマチン動態数理研究拠点（RcMcD））

P31 **レアアースイオン鉱物化ペプチドアプタマーのNMR解析**
○松上明正[1]，畠中孝彰[2]，石田亘広[2]，林文晶[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]豊田中央研究所 戦略研究部門）

P32 **アポミオグロビンの折り畳み中間体の解析**
○西村千秋（帝京平成大学薬学部薬学科）

P33 **H2A-H2B dimerとヌクレオソーム中のH2A-H2BのNMR研究**
○大友秀明[1]，山根努[1]，池口満徳[1]，森脇義仁[1]，栗田順一[1]，有村泰宏[2]，胡桃坂仁志[2]，西村善文[1]
（[1]横浜市立大学生命医科学研究科，[2]早稲田大学大学院先進理工学研究科）

P34 **タンパク－タンパク相互作用ネットワークにおけるハブタンパクの結合様式の解明**
○奥田昌彦，西村善文（横浜市立大学大学院・生命医科学研究科）

P35 **溶液NMRを用いたlncRNA結合タンパク質SHARPの構造解析**
○永井敢，小林彩保，伊藤隆，三島正規（首都大学東京大学院 理工学研究科）

P36 Y **藍色細菌*Anabaena variabilis*由来RNA結合タンパク質RbpDの構造機能相関解析**
○田中邑樹[1]，佐藤直樹[2]，林秀則[3,4]，森田勇人[1]（[1]城西大学大学院 理学研究科，[2]東京大学大学院 総合文化研究科，[3]愛媛大学 プロテオサイエンスセンター，[4]愛媛大学大学院 理工学研究科）

P37 **細胞接着に関わるマルチドメインタンパク質vinculinの溶液NMR法による構造解析**
○会津貴大，永井敢，伊藤隆，三島正規（首都大学東京 理工学研究科）

P38 Y **ヤエヤマサソリ由来毒素LaIT2の構造機能相関解析**
○田村真生[1]，十一浩典[2]，宮下正弘[2]，宮川恒[2]，森田勇人[1]（[1]城西大学・大学院理学研究科，[2]京都大学・大学院農学研究科）

P39 **アンサンブル学習を応用した水産物評価技術の開発**
○朝倉大河[1]，伊達康博[1,2]，菊地淳[1,2,3]（[1]特定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）

P40 Y **NMRメタボロミクスに適した生体試料調製法の検討**
○山野めぐみ[1]，稲村勇雅[1]，北田直也[1]，清水由宇[1]，久米田博之[2,3]，熊木康裕[4]，菊川峰志[1,2,3]，
塚本卓[1,2,3]，出村誠[1,2,3]，中村公則[1,3]，綾部時芳[1,3]，相沢智康[1,2,3]（[1]北海道大学大学院生命科学院，[2]北海道大学GI-CoREソフトマターGS，[3]北海道大学大学院先端生命科学研究院，[4]北海道大学大学院理学研究院）

P41 **抗菌ペプチドnukacin ISK-1の溶液構造決定**
○藤浪大輔[1]，Abdullah-Al-Mahin[2]，Khaled M Elsayed[2]，永尾潤一[4]，善藤威史[2]，園元謙二[2,3]，神田大輔[1]
（[1]九州大学・生体防御医学研究所，[2]九州大学・農学研究院，[3]九州大学・バイオアーキテクチャーセンター，[4]福岡歯科大学・機能生物化学講座）

P42 Y **NMRメタボローム解析を用いたルーメン内繊維分解細菌間相互作用に関する研究**
○稲村勇雅[1]，山野めぐみ[1]，北田直也[1]，久米田博之[2,3]，熊木康裕[2]，大西裕季[2]，塚本卓[1,2,3]，菊川峰志[1,2,3]，
出村誠[1,2,3]，福間 直希[4]，村住侑毅[4]，小池聡[4]，小林康男[4]，相沢智康[1,2,3]（[1]北海道大学大学院生命科学院，[2]北海道大学大学院先端生命科学研究院，[3]海道大学GI-CoREソフトマターGS，[4]北海道大学大学院農学研究院）

P43 **凝集構造を様々に変化させたPMMAの気体輸送特性**
○西口枝里子，吉水広明（名古屋工業大学大学院 工学研究科）

P44 **溶液NMR法によるtau凝集体と低分子化合物の相互作用解析**
○山口芳樹[1]，松本加奈[1]，佐原成彦[2]（[1]理化学研究所・糖鎖構造生物学研究チーム，[2]量子科学技術研究開発機構放射線医学総合研究所）

P45 **セルロース誘導体を構成するモノマー組成の決定**
○甲野裕之（苫小牧高専・応用化学・生物系）

P46 ^{2}H NMRを用いたオルガノソルブリグニンの溶媒との反応性評価
○熊谷洸[1]，宮川利文[1]，小山啓人[1]，川又勇来[2]，吉川琢也[2]，中坂佑太[2]，増田隆夫[2]（[1]出光興産株式会社，[2]北大院工）

P47 高速磁場サイクリングNMRによるフッ素化スルホン酸アイオノマー水溶液の19Fのスピン格子緩和速度の測定
○山口真（技術研究組合FC-Cubic）

P48 Y エチレンビニルアルコール共重合体中の含水状態における気体の拡散特性
○松下晴香，吉水広明（名古屋工業大学大学院 工学研究科）

P49 NMR測定でわかるゴム状高分子に収着した気体の拡散性
○宮代亜紗美，吉水広明（名古屋工業大学・大学院工学研究科）

P50 Y 揮発性有機化合物（クロロエチレン）標準液の定量NMR法による精確な濃度校正法の検討
○斎藤直樹，井原俊英（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）

P51 ^{19}Fと^{1}H間NOE効果及びNMR緩和速度測定によるルテニウムを含む新規有機金属イオン液体の構成と動態の研究
○鄭智海[1]，桑原大介[2]，持田智行[3]（[1]電通大 情報理工学研究科，[2]電通大 研究設備センター，[3]神戸大 大学院理学研究科）

P52 Y 拡散NMRと誘電分光法を用いたマウス臓器の水分子ダイナミクス解析
○川口翼[1]，青山剛志[2]，齋藤徹哉[2]，喜多理王[2]，新屋敷直木[2]，八木原晋[2]，福崎稔[3]，増田治史[4]（[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，[4]東海大学医学部生体構造機能学）

P53 PFG-NMRによる木材中における水分子の異方的な動的挙動の解析
○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]，須藤誠一[5]，鈴木養樹[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]東海大学理学部物理学科，[4]東海大学熊本教養教育センター，[5]東京都市大学共通教育部，[6]森林総合研究所）

P54 LIB用多層膜セパレータのイオン拡散挙動
○堀池則子，栗間昭宏，橋本康博（旭化成株式会社 研究・開発本部 基盤技術研究所）

P55 水溶液中の重原子イオンと重原子に結合した炭素のスピン分極シフト
○横山拓海，岡田瞭英，高橋直哉，中川直哉，桑原大介（電気通信大学・大学院・情報理工学研究科）

P56 Y 高磁場極低温下のMAS-DNP固体NMRにより誘起された超偏極核磁化のスピン相関項成分の観測
○杉下友晃，深澤隼，松木陽，藤原敏道（大阪大学・蛋白質研究所）

P57 高温DNPを指向した新規ガラスマトリックスの探索
○山田和哉，藤原敏道，松木陽（大阪大学 蛋白質研究所）

P58 センサリーロドプシンのレチナール構造変化に対する^{13}C NMR化学シフト値計算
○槇野義輝[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）

P59 Pradimicin A/Mannotriose複合体の固体相関NMR
○須藤亜紀乃[1]，中川優[2,3]，渡邉泰典[2]，野田泰斗[1]，竹腰清乃理[1]（[1]京都大学大学院 理学研究科，[2]名古屋大学大学院 生命農学研究科，[3]理化学研究所）

P60 抗菌ペプチドHylin b1のpH変化に対する運動性の違い
○川村出[1]，廣重玲奈[1]，Batsaikhan Mijiddorj[1,2]，松尾雄大[1]，上田一義[1]（[1]横浜国立大学・大学院工学府，[2]National University of Mongolia）

P61 固体NMRを用いた木質素材の樹脂含浸及び熱処理過程の解析
○西田雅一[1]，田中智子[1]，三木恒久[1]，早川由夫[1]，金山公三[2]（[1]産業技術総合研究所，[2]京都大学・生存圏研究所）

P62 Y 固体NMRによるPhe-Pheモチーフをもつペプチドの自己組織化集合体の分子構造の解析
○尾澤夢実[1]，Batsaikhan Mijiddorj[1]，佐藤久子[2]，内藤晶[1]，川村出[1]（[1]横浜国立大学大学院 工学府，[2]愛媛大学 理工学研究科）

P63　アンモニウムイオンで部分置換した$Cs_2(HSO_4)(H_2PO_4)$におけるスピン拡散とスピン－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）

P64 Y　野蚕絹繊維に特徴的な分子間精密構造の決定とその繊維化過程に関するNMR構造解析
○西村明生，朝倉哲郎（東京農工大学大学院 工学部 生命工学科）

P65　吸着式ヒートポンプ用活性炭へのエタノール吸着における表面官能基の影響
○出田圭子[1]，吉鉉植[1]，秦弘一郎[2]，尹聖昊[1,2]，宮脇仁[1,2]（[1]九州大学先導物質化学研究所，[2]九州大学総合理工学研究院）

P66 Y　励起三重項電子を用いたDNP法によるMOF骨格^{1}Hの高偏極化
○藤原才也[1]，細山田将士[1]，楊井伸浩[1,2,3]，立石健一郎[4]，上坂友洋[4]，君塚信夫[1,2]（[1]九大院・工，[2]九大・CMS，[3]JST-さきがけ，[4]理研・仁科セ）

P67　クライオコイルMASプローブを用いた天然存在比の^{43}Ca測定
○最上祐貴[1]，清水禎[1]，水野敬[2]，戸田充[2]，根本貴宏[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 理学研究科）

P68　カルシウムアルミノシリケートガラスの連鎖構造
○金橋康二（新日鐵住金（株）先端技術研究所）

P69　水陸バイオマス混合物の多面的計測ビッグデータの統合解析
○今榮康文[1,2]，坪井裕理[2]，菊地淳[2,3,4]（[1]株式会社住化分析センター，[2]理研CSRS，[3]横市院・生命医，[4]名大院・生命農）

P70　温度可変NMRで見る$La_{2-x}Sr_xLiH_{1+x}O_{3-x}$における$H^-$のダイナミクス
○野田泰斗[1]，栗原拓也[1]，竹腰清乃理[1]，及川格[2]，高村仁[2]，小林玄器[3]（[1]京都大学大学院・理学研究科，[2]東北大学大学院・工学研究科，[3]分子科学研究所・協奏分子システム研究センター）

P71　固体NMRによるセメント関連材料の構造解析
○高橋貴文，金橋康二（新日鐵住金株式会社 先端技術研究所）

P72 Y　双極子および*J*相互作用を利用した固体NMRによるCdSeクラスターのリガンド－表面結合の定量測定法
○栗原拓也，野田泰斗，竹腰清乃理（京都大学大学院 理学研究科）

P73　固体NMRによるデシルジホスホン酸イミダゾリウム結晶（Im_2DDPAとImDDPA）の構造解析
○畝亮太[1]，不破寛規[2]，雨森翔悟[3]，井田朋智[1]，水野元博[1,3]（[1]金沢大学大学院自然科学研究科，[2]金沢大学理工学域物質化学類，[3]金沢大学新学術創成研究機構）

P74　CP-VC法によるアミノ酸，ポリペプチドのC-H, N-H距離の検討
○木村英昭[1]，堤遊[1]，荘司顯[2]（[1]ブルカー・バイオスピン（株），[2]群馬大学名誉教授）

P75　マイクロ波照射NMR分光法による液晶分子のマイクロ波加熱分子機構の解明
○内藤晶[1]，田制侑悟[1,2]，槙野義輝[1]，藤戸輝昭[3]，川村出[1]（[1]横浜国立大学大学院工学研究院，[2]東京農工大学生命工学科，[3]プローブ工房）

P76 Y　NMRを用いたポリ4-メチルペンテン1のXe収着特性評価
○野村優友，吉水広明（名古屋工業大学大学院 工学研究科）

P77　NMRを用いたシンジオタクチックポリスチレンの結晶構造解析
○伊藤美翔，吉水広明（名古屋工業大学大学院 工学研究科）

P78 Y　in-cell NMRなど困難な実験系を対象としたアミノ酸選択的安定同位体標識法
○葛西卓磨[1,2]，樋口佳恵[1]，猪股晃介[1]，木川隆則[1,3]（[1]理化学研究所 生命システム研究センター，[2]JST さきがけ，[3]東京工業大学 情報理工学院）

P79　NMRによるマルチドメイン蛋白質Drkの動態解析
○末元雄介[1]，井上仁[1]，鴨志田一[1]，三島正規[1]，猪股晃介[2]，葛西卓磨[2]，木川隆則[2]，池谷鉄兵[1]，伊藤隆[1,2]（[1]首都大学東京大学院 理工学研究科，[2]理化学研究所 生命システム研究センター）

P80 Y　ヒト培養細胞中の蛋白質の3D三重共鳴NMR測定
○鴨志田一[1,2]，池谷鉄兵[1,2]，三島正規[1,2]，伊藤隆[1,2]（[1]首都大学東京 理工学研究科，[2]CREST/JST）

P81　動物細胞の健全性が細胞内タンパク質のフォールディング状態に与える影響
○猪股晃介[1]，鴨志田一[2]，伊藤隆[2]，木川隆則[1,3]（[1]理化学研究所・生命システム研究センター，[2]首都大学東京・理工学研究科，[3]東京工業大学・情報理工学研究院）

P82 Y　In-cell NMR法によるヒト細胞内DNAおよびRNAの観測
○山置佑大[1]，清石彩華[2]，三宅雅之[2]，加納ふみ[3]，村田昌之[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]京都大学大学院・エネルギー科学研究科，[3]東京工業大学大学院・科学技術創成研究院，[4]東京大学大学院・総合文化研究科）

P83　可搬型NQR装置の高出力化
大田垣祐衣，○須崎滉平，宮戸祐治，赤羽英夫（大阪大学大学院 基礎工学研究科）

P84 Y　in-cell NMR法を用いたライソゾーム病関連酵素Cathepsin Dの構造解析
○市村克也，森本大智，白川昌宏，菅瀬謙治（京都大学・大学院工学研究科・分子工学専攻）

P85　二重共鳴NQRによる四極子核-四極子核間の距離および角度相関
○日部雄太，武田和行，竹腰清乃理（京都大学大学院 理学研究科 化学専攻）

P86　高速定量的シミュレーションによる，分極剤分子間スピン相互作用が高磁場DNP核磁化増大に与える影響の評価
○深澤隼，藤原敏道，松木陽（大阪大学蛋白質研究所）

P87　深層学習を用いた$_{19}$F-NMRの化学シフト予測
○滝沢剛，半沢宏之（第一三共RDノバーレ株式会社 合成化学研究部）

P88 Y　量子化学計算と機械学習を用いた化学シフト予測法の高度化
○伊藤研悟[1,2]，尾渕由佳[2]，近山英輔[1,3]，伊達康博[1,2]，菊地淳[1,2,4]（[1]理化学研究所 環境資源科学研究センター，[2]横浜市立大学大学院 生命医科学研究科，[3]新潟国際情報大学 情報システム学科，[4]名古屋大学大学院 生命農学研究科）

P89　統合ウェブツールInterSpinの開発に基づく混合物の高・低磁場NMRスペクトル解析
○山田隼嗣[1,2]，伊藤研悟[2,3]，黒谷篤之[2]，山田豊[2]，近山英輔[4]，菊地淳[1,2,3]（[1]名古屋大学大学院 生命農学研究科，[2]理化学研究所 環境資源科学研究センター，[3]横浜市立大学大学院 生命医科学研究科，[4]新潟国際情報大学 情報文化学部）

P90 Y　生体分子複雑系を対象とした機械学習によるデータ駆動モデリング
○伊達康博[1,2]，魏菲菲[1]，坂田研二[1]，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）

P91　超偏極Xe生成用光ポンピングセル調整方法の研究
○服部峰之[1]，平賀隆[1]，柳町真也[1]，高見澤昭文[1]，池上健[1]，上原大[2]，鈴木孝昭[2]（[1]産業技術総合研究所 計量標準総合センター，[2]株式会社ミトリカ）

P92 Y　フラッシュランプを用いたコンパクトtriplet-DNP装置の開発
○高橋慶伍[1]，根来誠[1,2]，鷹峰洸太[1]，一条直規[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，[2]JST・さきがけ）

P93　超音波モーターを用いた新たなMATプローブの開発
○松永達弥[1]，竹腰清乃理[2]，神田岳文[3]，矢野貴博[3]（[1]理化学研究所・ライフサイエンス基盤研究センター，[2]京都大学大学院・理学研究科，[3]岡山大学大学院・自然科学研究科）

P94 Y　オプトメカニクスを用いたNMR信号の光変換実験の最適化
○冨永雄介[1]，長坂健太郎[2]，宇佐見康二[2]，竹腰清乃理[1]，武田和行[1]（[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）

P95　TD-NMRによる冷凍野菜の障壁の評価
○原英之（ブルカー・バイオスピン株式会社 アプリケーション部）

P96　光検出磁気共鳴に基づく超解像イメージング技術
○寺田大紀[1]，外間進吾[2]，五十嵐龍治[1]，原田慶恵[3]，白川昌宏[1]（[1]京都大学大学院 工学研究科，[2]中央研究院 原子分子科学研究所，[3]大阪大学大学院 理学研究科）

P97　The indirect detection of ^{10}B (I=3) overtone NMR at very fast Magic Angle Spinning
○Nghia Tuan Duong[1], Ilya Kuprov[2], and Yusuke Nishiyama[1,3]（[1]RIKEN CLST-JEOL Collaboration center, RIKEN, [2]Department of Chemistry, University of Southampton, United Kingdom, [3]JEOL RESONANCE Inc.）

第1日目
11月14日（火）
日本語セッション

Day 1 (Tuesday, 14 November)
(Japanese Sessions)

L1-1

事前知識を用いた多次元MAS固体NMRスペクトルの高速測定

○田巻初[1]，藤原敏道[2]
[1]大阪大学・蛋白質研究所

Rapid multi-dimensional MAS solid-state NMR measurements using prior information

○Hajime Tamaki[1], Toshimichi Fujiwara[1]
[1] *Institute for Protein Research, Osaka University*

Magic angle spinning (MAS) solid-state NMR can exhibit tremendous power for large and/or insoluble proteins e.g. membrane proteins, amyloid fibrils and protein-antibody complexes. Recently, many informative spectra have been obtained from the challenging targets. However, signal assignment prevented by signal overlapping in 3D spectra is one major bottleneck of the analysis. A promising way to solve this problem is measuring 4D spectra. To record 4D spectra in sufficient digital resolution in practical time, fast sampling methods is required. We developed a rapid compressed sensing technique that can utilize a lower dimensional spectrum as prior information. Our method can process under-sampling data 10 times faster than conventional iterative soft-thresholding method. We will present detail of the method and application to *de novo* backbone assignment of GB1.

MAS固体NMR法は、膜タンパク質やアミロイド線維等の不溶性分子や蛋白質-抗体複合体等の巨大分子の原子分解能の構造・ダイナミクス解析を行える非常に強力な手法である。近年では、微生物ロドプシンやアミロイドベータなど、困難だが重要なターゲットから溶液NMRと見紛う高分解能スペクトルが得られるようになり、立体構造決定などの成果が多く報告されている。しかし、実際に信号帰属しようとすると簡単ではないことに気づく。その原因は次の通りである。主鎖化学シフト帰属には複数の三次元スペクトル、特にCANCO, NCACX, NCOCXを用いた連鎖帰属が広く用いられている。CANCOはピーク分離がよく、NCACX/NCOCXのピークを検出する際のガイドとして使われる。ここで問題になるのが、CANCOでシグナルが分離していても、NCAもしくはNCO平面プロジェクション上で重なる場合である。このときNCACX/NCOCXのストリップを切り出すと複数残基の相関が同時に現われることである。その場合、CANCOからNCACX/NCOCXへ相関を連結する際に様々な組み合わせを考慮する必要があり、帰属候補を増大させてしまう。この問題を解決する最も簡単な方法は、CANCO相関を拡張した4次元スペクトルCANCOCAやCONCACOを測定することである。実用的なデジタル分解能で4次元データを得るには、非現実的な測定時間が必要になるため、高速測定法の利用が不可欠である。

圧縮センシングは、データにゼロ成分が多いという仮定のもと、不完全にサンプリングされたデータを復元する手法である。NMRでは多次元スペクトルの高速測定に広く用いられている。我々は、低次元スペクトルの情報を利用することにより、固体NMRスペクトル処理の高速化に成功した。本年の討論会では手法の詳細とProtein G B1ドメイン(GB1)の主鎖帰属への応用について報告する。

固体NMR，多次元測定，圧縮センシング

○たまきはじめ，ふじわらとしみち

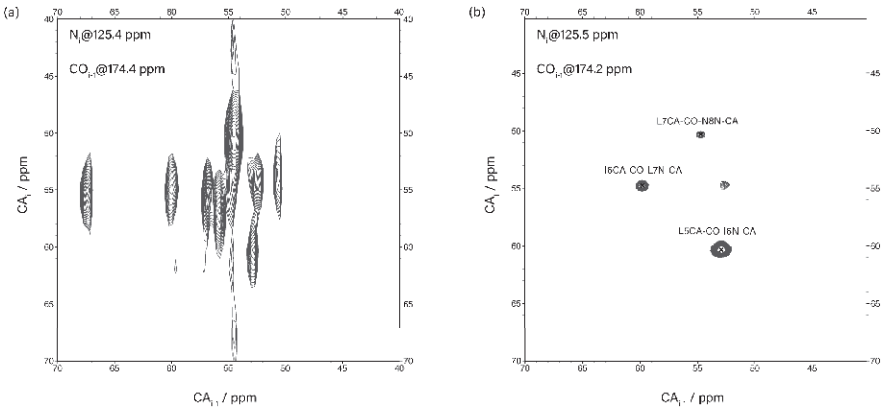


Figure. 1
4D-CANCOCA spectra of GB1 (a) before and (b) after signal reconstruction by L_1-norm minimization.

手法

例えば4次元CANCOCAは、3次元CANCOのパルスシーケンスに^{13}C-^{13}Cミキシングを連結することで測定できる。そのため4次元CANCOCAの間接観測軸CA, N, COで構成される空間に含まれる周波数成分は、3次元CANCO測定に含まれるものと同じか少ない。つまり、CANCOで信号がない領域に対応するCANCOCAの領域も、同様に信号はなく、その部分はゼロ埋めしてよいと考えられる。フーリエ変換は行列による線形変換として記述でき、多次元FIDとスペクトルについても、データを列ベクトルにフラット化することで行列による線形変換として記述できる。上のゼロ埋めは変換行列の列ベクトルを取り除くことに対応する。計算量は行列の要素数に依存するため、ゼロ埋めにより計算が高速化される。そこで、この高速化法をL_1ノルム(周波数成分の絶対値和)の最小化による信号復元に組み込んだ。復元処理はPythonとそのライブラリであるnmrglueとScikit-learnを用いて実装した。

提案法によって信号復元が可能であることを確認するために、GB1微結晶試料のCANCOCA, CONCACOスペクトルを、CA, N, COの最大展開時間をそれぞれ1.6, 2.8, 2.8 msecに設定し、各軸を10ポイントずつ線形サンプリングで測定した。CANCOCAとCONCACO、その復元の事前知識として用いるCANCOとCONCAの測定には合計で7日弱を要した。装置はVarian T3-HXY 3.2mmプローブを装備したJEOL RESONANCE ECA-II 700MHzを用いた。

結果

GB1のCANCOCAスペクトルを、間接観測軸を短い展開時間で打ち切ることによって短時間で測定し、提案法で信号を復元した。図1は処理前後のスペクトルを示している。復元前はデジタル分解能が悪く、4次元データにもかかわらずピークの分離が非常に悪い。復元処理により、データの分解能が著しく改善されたことがわかる。処理に要した時間はノートパソコン(CPU: Intel Core i7-5557U 3.1 GHz, RAM: 16GB)で約4分であった。一方、広く用いられている信号復元法 Iterative soft-thresholdingにより処理したところ約43分を要した。このように低次元スペクトルを事前知識として用いることで10倍以上の高速化に成功した。信号復元にはパラメータ調整が必要であることも多いため、高速化の恩恵は非常に大きい。CONCACOスペクトルについても同様のデータ処理によって分解能が改善された。

次に、スペクトルが正しく復元されたか確認するために自動帰属プログラムFLYAによる主鎖帰属を行なった。この際、アミノ酸タイプの情報を与えるためにNCACXスペクトルのピークリストも同時に入力した。4次元スペクトルにおいて、CONCACOのシグナル1つを除き全てのシグナルが観測され、*de novo*で帰属できた。この結果は、提案法で得られるスペクトルが自動主鎖帰属に利用可能であり、解析を効率化できることを示している。

L1-2

Using constant-time acquisition for resolution enhancement in proton double quantum magic-angle spinning spectra

Henri Colaux[1], Yusuke Nishiyama[1,2]

[1] *RIKEN CLST-JEOL Collaboration Center, RIKEN, Yokohama, Kanagawa 230-0045, Japan.*

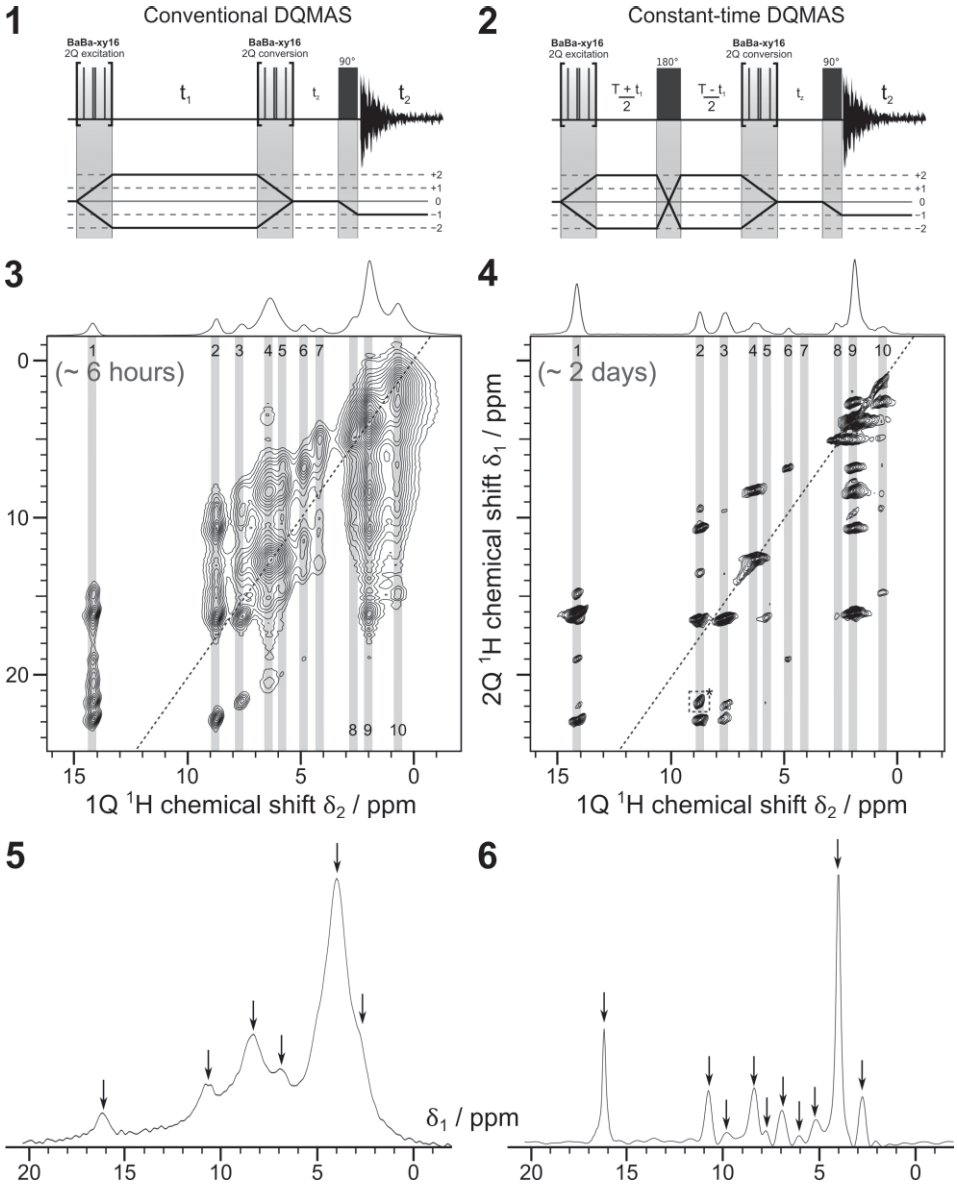
[2] *JEOL RESONANCE Inc., Musashino, Akishima, Tokyo 196-8558, Japan*

X-ray diffraction is a spectroscopy technique that has poor sensitivity for the detection of hydrogen atoms, and thus probing the proton network often relies on other techniques such as NMR spectroscopy. ^{1}H NMR lineshapes in the solid state are extremely broad and the investigation of ^{1}H-^{1}H connectivities for complicated molecules requires very fast MAS rates (e.g. > 60 kHz) in order to obtain a sufficient resolution for peak assignment. Indeed, not only faster MAS improves the resolution by increasing the spacing between spinning sidebands, but it also reduces the width of the resonances affected by homonuclear (e.g., ^{1}H-^{1}H) dipole interaction. This drives new developments of faster MAS probes, which can now reach rates exceeding 100 kHz.

Combined with fast MAS, the double-quantum magic-angle spinning (DQMAS) experiment, shown in Figure 1, is widely used to probe close proximity, as correlation peaks indicates connectivities and their intensities are linked to interatomic distances. However, the ^{1}H resolution is still limiting factor in DQMAS experiments, since the homogeneous contributions of the ^{1}H-^{1}H dipolar interactions give sizable broadening in 1H NMR of rigid-solid samples, even at the maximum attainable MAS rate. Here we demonstrate that the combination of the DQMAS experiment with the constant-time (CT) approach permits a higher resolution and an increased peak-separation power to be obtained in the double-quantum dimension, at the expense of sensitivity. The pulse sequence for this experiment is shown in Figure 2. In CT-DQMAS experiments, a π pulse is placed at $T - t_1/2$ during the DQ evolution time so to keep it constant. Since the π pulse does not refocus the homogeneous broadening, its effect are removed from the relaxation in the DQ dimension, leaving only the effect of the inhomogeneous broadening

To prove the validity of this method, conventional and CT ^{1}H DQMAS spectra were recorded for two model biological samples: L-histidine HCl H_2O, and N-formyl-L-methionyl-L-leucyl-L-phenylalanine (MLF). The conventional and CT spectra for the latter being shown in Figures 3 and 4, respectively. The resolution in the conventional and constant-time DQMAS spectra has been compared, revealing that linewidths decreased to an overall one half between the histidine spectra, and one third between the MLF spectra. In particular, it was shown that the increase in resolution of the constant-time DQMAS spectrum of MLF permitted the splitting of peak 9 and the identification of many correlation peaks, whereas all those peaks remain too broad for complete assignment in the conventional spectrum, as can be seen when comparing Figures 5 and 6. The sensitivity decrease of the constant-time experiments is significant, but the high

sensitivity of proton allows sufficient signal to be easily recorded with reasonable signal. Constant-time DQMAS was demonstrated to be an appreciable addition to the battery of solid-state NMR methods aimed at biological samples, which can be used when the peak separation power of the conventional DQMAS experiment is not sufficient for assignment.



Pulse sequences and coherence transfer pathways for conventional (1) and CT-DQMAS (2) experiments. Conventional (3) and CT (4) ^{1}H DQMAS spectra of MLF. (5,6): Slices of peak 9 of the 2Q dimension of (3) and (4), respectively.

Fast MAS, DQMAS, constant-time acquisition, homonuclear correlation.

L1-3

リコンビナントクモ糸の超収縮ならびにポリアラニン部位に関する固体NMR研究

○田制侑悟[1]，亀谷俊輔[1,2]，佐藤健大[3]，菅原潤一[3]，朝倉哲郎[1]
[1] 東京農工大学大学院 工学研究科
[2] （株）三井化学分析センター
[3] （株）スパイバー

Supercontraction and Heterogeneous Poly-Alanine region of Recombinant Spider Silk Studied by ^{13}C solid state NMR

○Yugo Tasei[1], Shunsuke Kametani[1,2] Takehiro K. Sato[3], Junichi Sugahara[3] 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*
[3] *Spider Inc., Tsuruoka, Yamagata, 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 “supercontraction”. In this study, several ^{13}C solid state NMR spectra of recombinant spider silk protein (RSP) fiber were observed in the dry and hydrated states to clarify the supercontraction phenomenon and the packing structure of the polyalanine (PLA) regions. The change in the structure and dynamics of RSP fiber by the hydration could be observed and discussed in conjunction with the supercontraction. In addition, the mixture of the rectangular and staggered structures was observed in the PLA region as the packing structure of RSP fiber. The transition from the rectangular to the staggered structures were monitored for $(Ala)_6$ used as the model of the crystalline domain by heat treatment using ^{13}C CP/MAS NMR and MD simulations.

＜緒言＞クモがぶら下がるために産出される牽引糸は、高強力・高弾性であり、天然で最も強い繊維と言われてきたが、さらに、水にぬれる長さが半分になる“超収縮”という興味深い現象を示し、基礎と応用の両面から多くの研究者の興味を引いてきた。その牽引糸の一次構造は、ポリアラニン(PLA)とグリシンリッチ(Gly-rich)領域のタンデム構造であり、結晶部の PLA は逆平行 β シートを形成している。本研究は、オニグモ牽引糸の連鎖構造を有するリコンビナントクモ糸タンパク質（RSP）を作製し、超収縮挙動と関連した水和構造を解析するとともに、PLA 結晶領域に着目、そのモデル系として$(Ala)_6$をともに用いて、不均一なパッキング構造を検討した。

＜実験＞RSPは、[3-^{13}C] Alaラベル化試料も併せて作製し、HFIPに溶解後、MeOHで凝固させることでPLAのβ化を行った。$(Ala)_6$はBachem AG社から購入、高温処理（200 ◦C, 4時間）試料も併せて作製した。NMR測定はBruker Avance400を用い、乾燥ならびに含水試料について、各種^{13}C 固体NMRスペクトルの測定ならび^{13}C 固体スピン-格子緩和時間(T_1)測定を行った。また、$(Ala)_6$のパッキング構造の変化に関するMD計算も併せて行った。

クモ糸，ポリアラニン，固体NMR

○たせいゆうご，かめたにしゅんすけ、さとうたけひろ、すがわらじゅんいち、あさくらてつお

＜結果＞[3-^{13}C] Ala 標識RSP繊維の高磁場域の^{13}C 固体NMRスペクトルをFig. 1に示した。乾燥状態の^{13}CCP/MASスペクトル(a)は、結晶部PLAのAlaCβが主ピーク、他のピークはブロードとなる。一方、含水状態の^{13}C CP/MASスペクトル(b)では、Ala Cβ以外のピークは、殆ど観測されなくなる。これは、含水させることによって、含水の影響を受けないβシート構造のAla Cβ以外のアミノ酸残基の運動性が上昇、そのCP 効率が極度に低下したことに起因する。実際、広い運動範囲を観測できる^{13}C DD/MASスペクトル(Fig. 2 b)では、殆ど消失していたAla Cβ以外のピークが、出現してくる。一方、βシート構造に関わらないAl aCβのランダムコイルピークも観測され、その割合は20%であり、一次構造から予想される割合より少し多い。さらに、運動性の高い成分を選択的に観測するr-INEPTスペクトル(d)では、βシート構造のAla Cβは消失、Gly-rich領域のアミノ酸残基のランダムコイルピークのみが観測される。

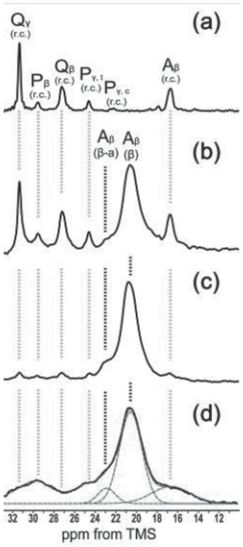


Figure 1 ^{13}C solid-state NMR spectra of [3-^{13}C] Ala labeled RSP powder with methanol treatments. (a) ^{13}C refocused INEPT, (b) ^{13}C DD/MAS, (c) ^{13}C CP/MAS NMR spectra in the hydrated state, and (d) ^{13}C CP/MAS spectra in the dry state.

以上のように、含水に伴うRSP繊維の運動状態の変化が各種^{13}C 固体NMRを併用して明確にでき、超収縮の様子がダイナミクスと構造の観点から詳細に検討できることを示した。

さらに、(b)のスペクトルでは、含水により22.9 ppm のAla Cβピークが新たに観測されてきた。[2] これは、結論として、$(Ala)_6$からなる結晶部の不均一なパッキング構造を反映しており、β-sheet鎖が、そのまま重なるように分子間配置されるRectangular構造以外に、22.9 ppm にもピークを持つStaggered 構造（β-sheet鎖が交互に重なるように分子間配置）が混在していることを示している。

この点を詳細に検討するために、$(Ala)_6$の[1]高温加熱処理前後の試料について^{13}C CP/MAS測定を行った。高温加熱前(Fig. 2a)では20.6 ppmにシングルピークが観測されたが、高温加熱処理後(Fig. 2b)では低磁場方向にブロードな信号が現れる。また、Rectangular 構造の$(Ala)_6$ (Fig. 2c) [1]から出発、200°C でMDシミュレーションを行うと、短時間でStaggered構造 (Fig. 2 d)に変化する様子が見られた[2]。Rectangular からStaggered に変化し、安定になる様子が、詳細な分子間構造の変化（I,II,III間の距離）からわかる[3]。

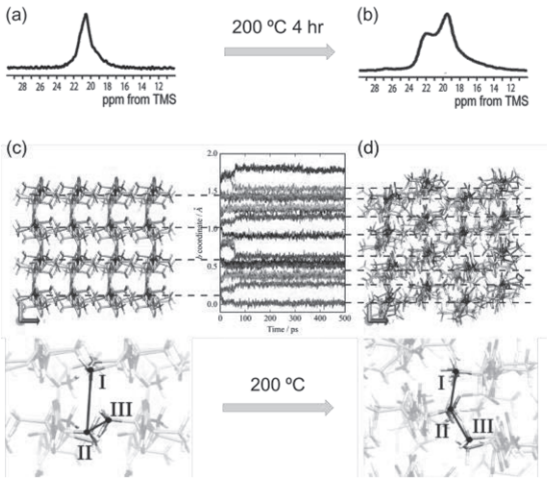


Figure 2 ^{13}C CP/MAS NMR spectra (a) Ala_6, (b) Ala_6 with high temperature treatment (200◦C, 4hr), and model of the crystalline structure of anti-parallel β-sheet Ala_6 (c) rectangular arrangement before MD simulation, (d) after 500 psec of the MD simulation at 200 °C.

以上の結果からRSPのPLA(β-sheet)には2つのパッキング様式が混在していることが示された。また一連のAla連鎖においては、Staggered構造の22.9 ppmのピークのT_1が他の成分に比べて長い[1]が、RSPに関しても同様に長い緩和時間が得られている。この結果はStaggered構造の存在をさらに裏付けるものである。

＜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。

[1] T. Asakura et. al. *Angew Chem Int Ed Engl* **2012**, *51*, 1212–1215.
[2] S. Kametani et. al. *PCCP,* **2017**, *19*, 20829-20838.
[3] Y. Tasei et. al., **2017**, submitted..

L1-4

$^{19}F/^{13}C$固体高分解能NMRを用いたフッ素－黒鉛層間化合物の構造解析

○村上美和[1]，松本一彦[2]，萩原 理加[2]，松尾吉晃[3]
1京都大学・産官学連携本部
2京都大学大学院・エネルギー科学研究科
3兵庫県立大学大学院・工学研究科

Structure of fluorine–graphite intercalation compounds as studied by $^{19}F/^{13}C$ Solid-State NMR

○Miwa Murakami[1], Kazuhiko Matsumoto[2], Rika hagiwara[2], Yoshiaki Matsuo[3]
[1] *Office of Society-Academia Collaboration for Innovation, Kyoto University*
[2] *Graduate school of Energy Science, Kyoto University*
[3] *Graduate school of Engineering, University of Hyogo*

As an electrode material of fluoride shuttle battery, fluorine-graphite intercalation compound, C_xF is promising because it shows fluoride ion conductivity and also shows high theoretical capacity of 865 mAh/g at x = 1. In this work, we applied high-resolution solid-state NMR for ^{19}F and ^{13}C to examine structure of $C_{2.8}F$. In particular, the so-called semi-covalent C–F bond in C_xF, whose bond length (about 0.140 nm) is slightly longer than that in $(CF)_n$ and $(C_2F)_n$ (0.136 nm), is of interest. We obtained the spin-spin coupling constant (J_{CF}) of the C-F bond in solids to appreciate the σ-covalency of the F-C bond. The J_{CF} value obtained is 202 Hz, which indicates that the F-C bond is the covalent bond. We also applied the hetero- and homonuclear dipolar-based experiment to examine relations among observed C and F signals.

緒言

近年、リチウム以外のイオンを正負極間でシャトルさせることによって作動する高エネルギー密度の二次電池が種々検討されており、そのひとつとして、フッ化物イオンを用いた電池が着目されている[1]。フッ素－黒鉛層間化合物 C_xF はフッ化物イオン伝導性を有することが報告されており[2]、また、フッ素濃度は最大x=1.2 にまで達することから[3]、フッ化物イオンシャトル電池の高容量な正極として期待されている。中性子回折[4]の結果から、C_xF(x<3)の構造にはグラファイト型のsp^2炭素領域とFと共有結合したsp^3炭素からなる領域が混在したFig.1のようなモデルが提案されているが、そのC-F結合は以前は半イオンもしくは半共有結合（semi-ionic or semi-covalent bond）とも呼ばれており[5]、双極子相互作用を用いたNMR解析[6]でもこの帰属を踏襲していた。本研究では、このC_xF（x=2.8）に固体高分解能NMRを適用し、異種/同種核間の双極子相互作用測定に加えて、C-F結合の σ 共有結合性を$J_{F\text{-}C}$結合定数で評価することを試みた。

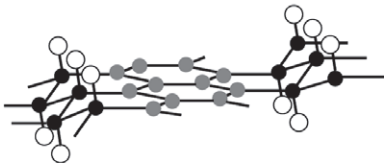


Fig. 1. Structual model of C_xF. sp^3 carbon shown as black; sp^2 carbon as grey and fluorine as white.

フッ素－黒鉛層間化合物，*J*結合定数，固体NMR

○むらかみみわ，まつもとかずひこ，はぎわらりか，まつおよしあき

実験

$C_{2.8}F$試料は、グラファイトを無水フッ化水素中でフッ素ガスと反応することで 調製した。 NMR測定にはJEOL社製ECA600およびAgilent社製DD2 600 分光計(^{13}C, ^{19}Fの共鳴周波数は150, 564 MHz)を用いた。

結果および考察

Fig.2に^{13}Cおよび^{19}FのMAS NMRスペクトルを示す。これまでの報告から、^{13}C測定で観測されたC1はsp^2炭素、C2はsp^3炭素と帰属した[6]。^{19}Fスペクトルでは、Cにsemi-covalent結合したF2とF^-とされるF4以外に[6]、これまで報告されていないF1、F3の信号が観測された。これらのF信号の情報を得るために^{19}F-^{19}F距離相関測定を行った結果、F2とF3やF1には相関が見られたが、F4は他のFとの間に相関がなく、孤立した環境にあることが分かった。また、^{19}F-^{13}C CP-HETCOR測定を行ったところ、F2はC1、C2の両方にクロスピークを観測したほか、C2との間にクロスピークが観測されるF5があることが分かった（Fig.3）。さらに、Hahn Echoを用いたJ変調測定を行い、C2-F2のスピン結合定数$|J_{FC}|$として202 ±6 kHzを得た。大きなJ相互作用があることから、C2-F2は共有結合であり、また、得られたJの絶対値は１フッ化ベンゼンの$J_{(CF)1}$ = -245.3 Hz、n-Hexylfluorideの$J_{(CF)1}$ = -166.6 Hz[7]の間であることから、C2は純粋なsp^3ではなく隣接するsp^2炭素と超共役しているのではないかと考えている。この結果は、Fig.1に示したsp^2炭素とsp^3炭素が隣接して存在するモデルともあっている。

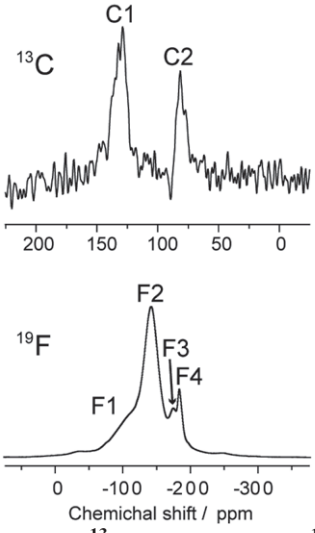


Fig. 2. ^{13}C (top) and ^{19}F (bottom) NMR spectra of $C_{2.8}F$.

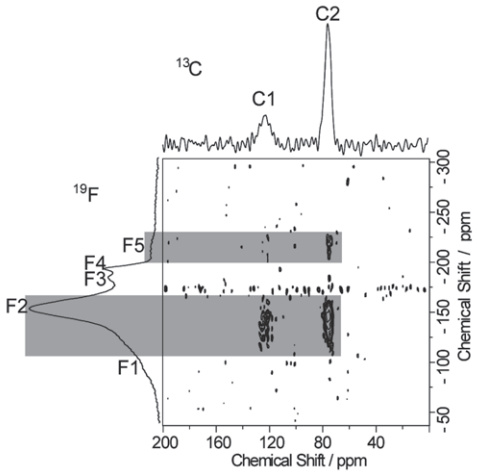


Fig. 3. ^{19}F-^{13}C CP-HETCOR spectrum of $C_{2.8}F$.

F2 以外の ^{19}F 信号の帰属については検討中であるが、この中にイオン伝導性に寄与する F があると考えられ、x の異なる試料を比較することによって、物性と関連づけられる情報が得られると考えている。当日は、^{19}F の線形と T_1 の温度依存性からダイナミクスを検討した結果も併せて報告する。

References

(1) M. A. Reddy, et al., *J. Mater. Chem*., **21**, 17059-17062 (2011).

(2) S. Suganuma, et al., *Tanso*, **160**, 266-271 (1993).

(3) 中島剛, *炭素*, **215**, 265-273 (2004).

(4) Y.Sato et al., *Carbon*, **42**, 3243–3249 (2004)

(5) T. Nakajima et al., *Carbon*, **29**, 429-437 (1991).

(6) J. Giraudet et al., *J. Phys. Chem. B*, **111**, 14143-14151 (2007).

(7) F.J. Weigert and J.D. Roberts, *J. Am. Chem. Soc*., **93**, 2361-2369 (1971).

謝辞：この成果は国立研究開発法人新エネルギー・産業技術総合開発機構（NEDO）の革新型蓄電池実用化促進基盤技術開発(RISING2)の結果得られたものです。

L1-5

13C-CSAとNCS解析による
オレフィンメタセシス触媒の反応性に関する研究

○山元啓司[1], Christopher Gordon[1], Liao Wei-Chih[1], Christophe Copéret[1],
Christophe Raynaud[2], Odile Eisenstein[2, 3], Richard Anderson[4]
1 *Department of Chemistry and Applied Biosciences, ETH Zürich*
2 *Institut Charles Gerhardt, UMR 5253 CNRS, cc 1501 Universitat de Montpellier*
3 *CTCC, Department of Chemistry, University of Oslo*
4 *Department of Chemistry, University of California*

Study on Reactivity of Olefin Metathesis Catalysts by 13C-CSA and NCS Analysis

○Keishi Yamamoto[1], Christopher Gordon[1], Liao Wei-Chih[1], Christophe Copéret[1], Christophe Raynaud[2], Odile Eisenstein[2,3], Richard Anderson[4],
[1] *Department of Chemistry and Applied Biosciences, ETH Zürich*
[2] *Institut Charles Gerhardt, UMR 5253 CNRS, cc 1501 Universitat de Montpellier*
[3] *CTCC, Department of Chemistry, University of Oslo*
[4] *Department of Chemistry, University of California*

Olefin metathesis is a reaction of redistribution of alkylidene fragments catalyzed by organometallic complexes. Metal alkylidenes and metallacyclobutanes are involved in the catalytic cycle. Metathesis active metallacyclobutanes have ^{13}C isotoropic chemical shift of the α-carbon appearing at ca. 100 ppm; on the other hand, metallacyclobutanes that do not have metathesis activity show ^{13}C isotoropic chemical shift of the α-carbon below 40 ppm. Measurements of the chemical shift tensor by solid-state NMR combined with an orbital (natural chemical shift, NCS) analysis of its principal components ($\delta_{11} \geq \delta_{22} \geq \delta_{33}$) with DFT calculations show that the specific chemical shift of metathesis active metallacyclobutanes originates from a low-lying empty orbital lying in the plane of the metallacyclobutanes with local π*(M−Cα/α') character. Thus, in the metathesis active metallacyclobutanes, the α-carbons retain some residual alkylidene character.

オレフィンメタセシス反応は遷移金属触媒による炭素炭素二重結合の組み換え反応であり、産業的にも広く利用されている。オレフィンメタセシス反応の反応機構は the Chauvin mechanism で説明され、金属アルキリデンとオレフィンの環化付加によりメタラシクロブタンが生成し、続いてメタラシクロブタンの逆環化により新たなオレフィンと金属アルキリデンが生成する (Fig. 1)。

メタラシクロブタン錯体にはオレフィンメタセシス活性なものと非活性なものが存在する (Fig. 2)。我々は、触媒活性を示すメタラシクロブタン錯体はメタラシクロブタン環の α 炭素の ^{13}C ケミカルシフトが 100 ppm 付近と低磁場に観測されるのに対して、活性が無い錯体の場合は 40 ppm

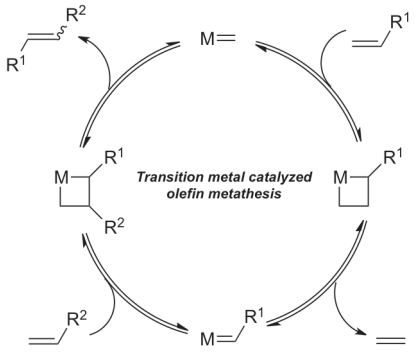


Fig. 1. The Chauvin mechanism

CSA, NCS analysis, Olefin metathesis

○やまもとけいし、クリストファーゴードン、リャオウェイチー、クリストフコペレット、クリストフレイナウド、オディールアイゼンシュタイン、リチャードアンダーソン

以下と高磁場に観測されることを見出した。

続いて、我々は ^{13}C ケミカルシフト主成分 (δ_{11}, δ_{22}, δ_{33}) ならびにケミカルシフト異方性を固体 ^{13}C NMR 測定により求め、それらと触媒活性の相関を確かめた。その結果、触媒活性を有するメタラシクロブタン錯体は α 炭素が大きなケミカルシフト異方性を有しており、特に δ_{11} 成分が大きく反遮蔽化されていることを見出した (Fig. 3)。また注目すべきことに、3 つの主成分は、メタラシクロブタン錯体の逆環化反応により生じるオレフィンとアルリキデン錯体の主成分と同様の方向性を有していた。このことは、触媒活性を有するメタラシクロブタン錯体の α 炭素にはアルキリデン炭素の性質が内在していることを意味している。一方で、触媒活性を持たないメタラシクロブタン錯体では、α 炭素のケミカルシフト異方性は小さい結果であった。

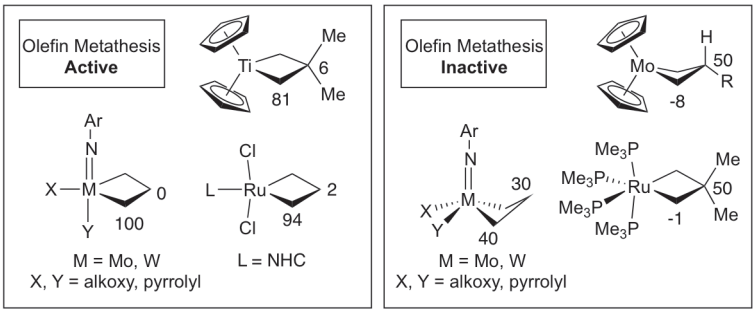


Fig. 2. Structures and ^{13}C isotropic chemical shifts of olefin metathesis active and inactive metallacyclobutane complexes.

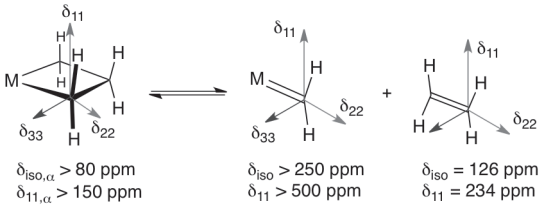


Fig. 3. Principal components of olefin metathesis-related compounds.

ケミカルシフト δ は核周りの局所的な遮蔽 σ の大きさで決定され (式 1)、σ は常磁性項、反磁性項、スピンオービタル項に分解される (式 2)。 DFT 計算から、メタラシクロブタン環の炭素に関しては常磁性項が σ に対して支配的であることを見出した。常磁性項の大きさは Lamsey 式 (式 3) により説明され、この式は占有軌道と非占有軌道が角運動量オペレーターを介してカップリングし、これら二つの軌道のエネルギー差が小さいほど反遮蔽化が大きくなることを示している。すなわち、フロンティアオービタルの波動関数とその固有エネルギーが反遮蔽化に最も関与していることを表す。フロンティアオービタルは化学反応に関与する軌道であることから、^{13}C ケミカルシフトとオレフィンメタセシス反応の間に相関があることは合理的であると考えられる。

$$\delta_{ii} = \sigma_{\mathrm{iso}}^{\mathrm{ref}} - \sigma_{ii} \quad (i = 1, 2, 3) \tag{1}$$

$$\sigma = \sigma_{\mathrm{dia}} + \sigma_{\mathrm{para+SO}} \tag{2}$$

$$\sigma_{ii,\mathrm{para}} \propto \frac{\langle \Psi_{\mathrm{vac}} | \hat{L}_i | \Psi_{\mathrm{occ}} \rangle \langle \Psi_{\mathrm{vac}} | \hat{L}_i / r^3 | \Psi_{\mathrm{occ}} \rangle}{\Delta E_{\mathrm{vac-occ}}} \tag{3}$$

DFT 計算による分子軌道の解析と NCS (Natural Chemical Shift) 解析により、メタラシクロブタン錯体の σ(M–Cα) – σ(M–Cα) 軌道と π*(M–Cα) + π*(M–Cα) の角運動量オペレーターを介したカップリングが δ_{11} 成分の反遮蔽化に最も寄与していることが分かった (Fig. 4)。オレフィンメタセシス活性を有するメタラシクロブタン錯体は π*(M–Cα) + π*(M–Cα) 軌道が非占有であるため α 炭素が反遮蔽化される。一方、オレフィンメタセシス活性を有さないメタラシクロブタン錯体は π*(M–Cα) + π*(M–Cα) 軌道が d 電子により占有されているため上述のカップリングがクエンチされている、もしくはメタラシクロブタン骨格が平面的でないため、角運動量オペレーターを介したカップリングが有為に働かないことが明らかとなった。

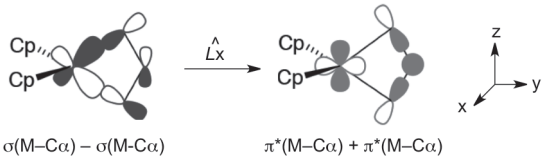


Fig. 4. The coupling of occupied and unoccupied orbitals through angular momentum operator, which significantly contributes to σ_{11}.

References
(1) Halbert, S.; Copéret, C.; Raynaud, C.; Eisenstein, O. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 2261. (2) Yamamoto, K.; Gordon, C. P.; Liao, W.-C.; Copéret, C.; Raynaud, C.; Eisenstein, O. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 10127. (3) Gordon, C. P.; Yamamoto, K.; Liao, W.-C.; Allouche, F.; Andersen, R. A.; Copéret, C.; Raynaud, C.; Eisenstein, O. *ACS Cent. Sci.* **2017**, *3*, 759.

L1-6

固体NMRでみる角層の保湿メカニズム

○畑中 稔[1]，蘇木佳彦[2]，片山 靖[2]
1ブルカー・バイオスピン株式会社
2花王株式会社

Hydration mechanism on Stratum Corneum of Intact Human Skin revealed by Solid-State NMR Spectroscopy

○Minoru Hatanaka[1], Yoshihiko Sonoki[2], Yasushi Katayama[2]
[1] *Bruker BioSpin K.K.*
[2] *Kao corporation*

Stratum Corneum (SC) is the most outer layer of human body and one of the most important organs because it prevents water from evaporating out of the body and shuts out stimuli such as chemicals from outside. Until now, the structure and functions of the SC has been investigated by various methods, but details at the molecular level have remained unclear. In this research, we have applied a solid-state NMR to study intact human SC. In particular, we have interest in the hydration mechanism of the SC. The hydration of SC is known to be strongly related to the function of keeping moisture in the human skin. ^{1}H-T_2 measurement showed that water molecules and amide proton have shorter T_2 than other protons in the SC, which implied the possibility of ^{1}H exchange or hydrogen-binding between them. We have also carried out ^{1}H 2D RFDR measurement to investigate the possibility of water-protein interaction and the result obtained showed that there are cross peaks observed in hydrated SC. Solid-state NMR directly showed that the hydration of the SC make the binding or chemical exchange between water and amide groups of keratin proteins, and its binding is relatively strong.

【 背景 】肌の潤い、薬の経皮吸収等のメカニズムを知るためには、分子レベルで皮膚の構造を調べる必要がある。皮膚の構造は複雑であるが、中でも角層は皮膚の最も外側に存在し、その食品用ラップ程度の薄さ(0.02 mm)にもかかわらず、体外からの異物の混入、体内からの水の蒸発を防ぐなどの非常に重要な役割を果たす。この角層なくして我々は一日として生きることはできない。その構造は大きくケラチン線維を主成分とする角層細胞と、角層細胞間を充填するために存在する角層細胞間脂質からなる(Fig. 1.)。本研究では、肌の保湿に不可欠である水分子がどのようにして角層内に存在し、角層内分子とどのように相互作用しているか固体NMR を用いて調べた。

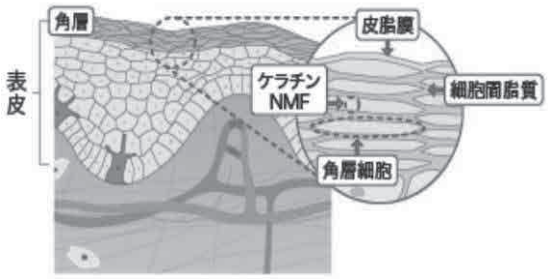


Fig. 1. Image of the cross section of skin

【 実験 】Bruker Avance III HD 400WB 分光器にて 4mm Double Resonance プローブを用いて実験を行った。ヒト皮膚 (5cm x 5cm 角層シート)を 4mm ジルコニアローターに詰め室温にて ^{13}C-CPMAS、^{13}C-

固体 NMR、角層、RFDF

○はたなか みのる、そのき よしひこ、かたやま やすし

DDMAS、^{13}C-INEPT、^{1}H-MAS、^{1}H-T_2、^{1}H-2D-RFDR 測定を行った。水による湿潤角層は角層シートを蒸留水中に 1 日間浸し、取り出したシートを過飽和 NaCl 水溶液の存在下でデシケーター中で 25℃、相対湿度 40、80、100％にて調湿を行った。調湿後、角層を 4mm ジルコニアローターに詰め、測定中の水分の蒸発を防ぐためジルコニアローター内にはテフロンスペーサーを用いた。測定は 25℃にて行った。

【 結果と考察 】これまで、角層の研究は入手しやすさと、実験上の取り扱いやすさから、専らブタ角層が用いられ、ヒト角層による NMR データはブタ角層と比較して報告例が極めて少ない。そこで、ブタとヒトの単純な比較のため、^{13}C-CPMAS、^{13}C-DDMAS、^{13}C-INEPT スペクトルの比較を行った。その結果、予想されたことではあるが、両者では同じ傾向を示した（本討論会で報告予定)。これまでは ^{13}C スペクトルを観測することで、間接的に水分子がタンパク質と相互作用していることが議論されてきた。しかし、本研究では新たな観点として、^{1}H スペクトルを観測することで角層の保湿機構の解明に繋がる興味深い知見を得た。

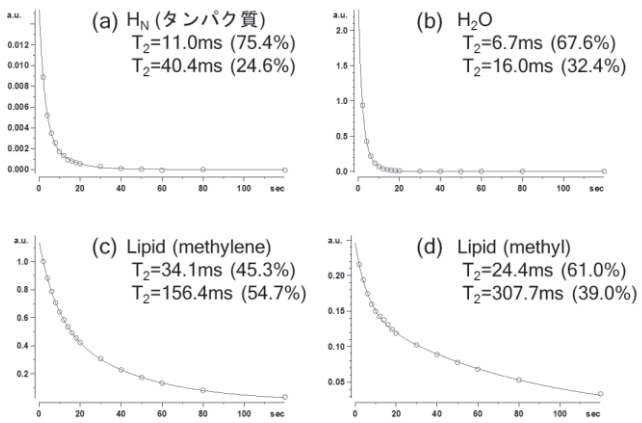


Fig. 2. ^{1}H-T_2 relaxation time of hydrated human SC

まず最初に、湿潤ヒト角層（相対湿度 80%）の運動性を調べるため ^{1}H-T_2 測定を行った (Fig. 2.)。全てのピークは single exponential で fitting が出来なかったため、double exponential で fitting を行い、Fig.2.中の結果を得た。着目すべきは、水分子の T_2 で、6.7ms の短い値が得られたことである。バルク中の水分子の T_2 が 400ms 程度であることを考えると、角層中に取り込まれた水分子はかなり運動が制限されていると考えられる。また、湿潤により ^{1}H、^{13}C スペクトルにタンパク質のピークが強く現われたことを併せて考えると、水と相互作用している対象はタンパク質と考えられる。そこでアミドプロトン(H_N)と思われる 8.2ppmのピークの T_2も調べたところ、その値は水分子とかなり近い値となっていた。このことは湿潤により加えられた水分子がタンパク質との水素結合で束縛され、アミドプロトンとの化学交換が行われていることで、両者の T_2 が同じような値になったと思われる。

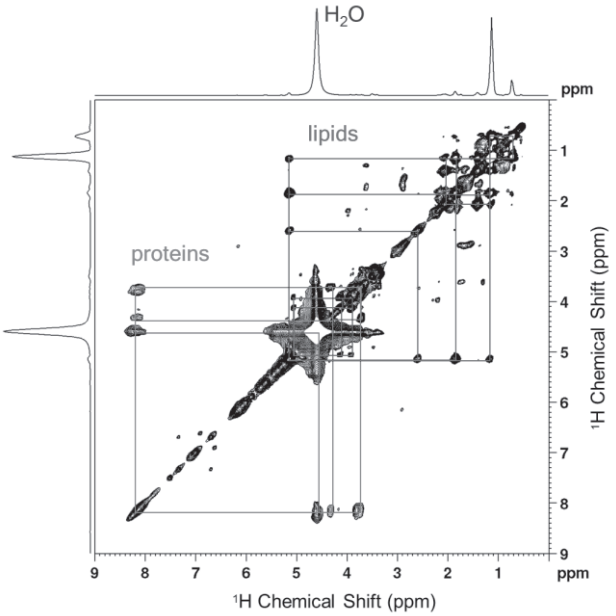


Fig. 3. ^{1}H-2D RFDR spectrum of hydrated human SC (RH80%). Mixing time = 50ms, MAS frequency = 8kHz

そこで、両者の相互作用を直接観測するため、^{1}H-2D-RFDR 測定を行った。得られたスペクトル (Fig. 3.)は角層という複雑系からは予想されなかったほど、単純でクリアなスペクトルが観測された。脂質の相関シグナルは分子内に限定され、4.7ppm にみられる水分子との相関は観測されていない。つまり、T_2 が水分子と大きく異なることも考慮すると、脂質と水分子の直接的な相互作用は弱いと考えられる。それに対してアミドプロトンは水分子との相関ピークを持っており、水分子がタンパク質周りに結合していることが示唆された。

【参考文献】S. Björklund, A. Nowacka, J. A. Bouwstra, E. Sparr, D. Topgaard, *POLOS ONE* **197**, 770 (2013).

L2-1

磁場配向NMRにおける配向力、温度安定性、表面改質容易性を兼ね備えた新規配向剤

○内田紀之[1]，山口芳樹[1]，海老名保男[2]，佐々木高義[2]，石田康博[1]，相田卓三[1,3]

1理化学研究所 創発物性科学研究センター
2物質・材料研究機構
3東京大学・工学系研究科

Ultimate aligner using titanium oxide nanosheet for magnetic-field oriented NMR

○Noriyuki Uchida[1], Yoshiki Yamaguchi[1], Yasuo Ebina[2], Takayoshi Sasaki[2], Yasuhiro Ishida[1], Takuzo Aida[1,3]

[1]*RIKEN*
[2]*NIMS*
[3]*Department of Chemistry and Biotechnology, School of Engineering, The University of Tokyo*

NMR analysis in the presence of aligner which can anisotropically align under magnetic field (magnetic-field oriented NMR), has draw particular attentions because it gives angle-dependent information together with typical distance-dependent information. However, existing aligners for magnetic-field oriented NMR of biomacromolecules such as proteins are insufficient in terms of orientability and stability, which has largely hampered a wide application of magnetic-field oriented NMR. We will report ultimate aligner composed of magnetically-alignable titanium oxide nanosheet with high orientability, stability and which outperforms previous aligners.

磁場下で配向する配向剤の存在下でのNMR解析(磁場配向NMR)は従来の原子間の距離情報だけでなく、結合の相対角に関する情報を与えるため、近年注目を集めている解析法である[1]。現在まで、タンパク質などの生体分子における磁場配向NMRにおいて、ディスク状リン脂質二分子膜のバイセルや繊維状ウィルスのバクテリオファージといった生体分子の自己集合体が現在まで配向剤として利用されてきた。しかし、これらの配向剤は配向力の低さや安定性が不十分であることに加え、しばしば標的分子と望まない吸着を起こす。今回我々は、磁場配向性の無機ナノシートである、酸化チタンナノシート(TiNS, Fig. 1)を用いることで、配向力、温度安定性、表面改質容易性、調整簡便性、サンプル回収容易性などの点で、既存のものを大きく上回る配向剤を開発したので報告する。

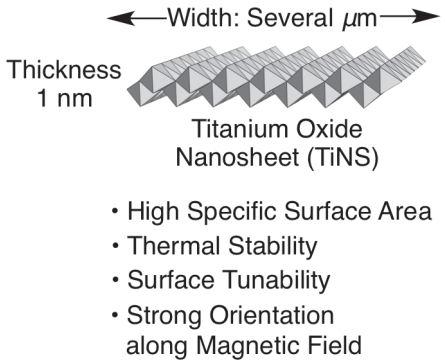


Fig. 1. Titanium oxide nanosheet (TiNS) Aligner of TiNS with high specific surface area, high stability, surface tunability, and alignment along magnetic field.

TiNSの配向剤としての性能を調べるため、TiNSの分散液における重水分子の配向を^{2}H 四極子カップリングより評価したところ、過去の配向剤の例の中で最高の分裂幅を示し、さらにその分裂幅は0℃～90℃という広い温度範囲で維持された (Fig. 2左)。比較例として汎用的に用いられる

磁場配向NMR，残余双極子相互作用，配向剤

○内田紀之，山口芳樹、海老名保男、佐々木高義、石田康博、相田卓三

バイセルを用いて同様の実験を行ったところ、40℃近辺でのみ、低い強度で水分子の配向が観察された(Fig. 2右)。さらに、このTiNS配向剤を用いて^{15}Nラベルされたプロテイン G β-1ドメイン(^{15}N-GB1)の温度可変RDC測定を行うことで、現在まで知られていなかったGB1の立体構造の動的挙動を明らかにした。20℃、35℃、50℃、65℃における^{15}N-GB1のRDC測定からアミノ酸における^{1}H-^{15}N結合の角度情報を求め、既報のGB1の立体構造と比較したところ、35℃および50℃における測定データは既報のGB1と高い一致を示し、構造が保持されていることが示唆された。しかし、20℃における測定データと65℃における測定データを既報の構造と比較したところ、20℃においては内部のβシート領域において、65℃においては外部のβシート領域およびαヘリックス領域において構造の変化が起こっていることが明らかになった。GB1は免疫グロブリンに強く結合する性質があり、免疫グロブリンの精製･固定･検出において有用なタンパク質であるため、今回得られたGB1の立体構造の知見は抗体工学や創薬に貢献しうる。

References

(1) Prestegard, J. H., Bougault, C. M. & Kishore, A. I. Residual dipolar couplings in structure determination of biomolecules. *Chem. Rev. 104*, 3519-3540 (2004).

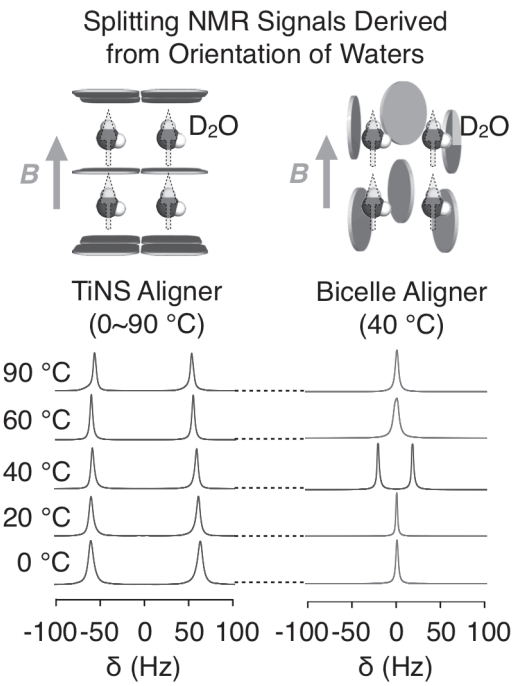


Fig. 2. ^{2}H quadrupole splitting of $^{2}H_2O$ with aligners of TiNS and bicelle.

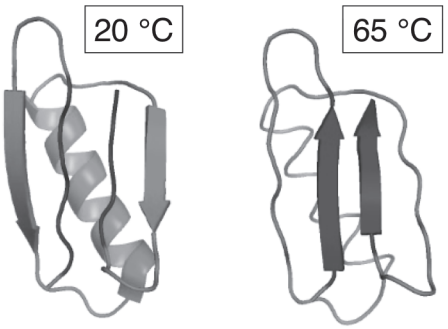


Fig. 3. Structural change of ^{15}N-GB1 upon cooling and heating.

L2-2

CAST/CNMRシステムを用いたClerodane型ジテルペンの ^{13}C NMRの帰属と構造の評価

○越野広雪[1]，栗澤尚瑛[2]，木村賢一[2]，小市俊悟[3]，佐藤寛子[4,5]
[1]理化学研究所 環境資源科学研究センター
[2]岩手大学大学院 応用生物化学
[3]南山大学 理工学部システム数理学科
[4]情報・システム研究機構
[5]チューリッヒ大学 化学科

Evaluation of ^{13}C NMR Assignments and Structures of Clerodane Diterpenoids by Using CAST/CNMR System

○Hiroyuki Koshino[1], Naoaki Kurisawa[2], Ken-ichi Kimura[2], Shungo Koichi[3], Hiroko Satoh[4,5]
[1] *RIKEN Center for Sustainable Resource Science*
[2] *Graduate Course in Biological Chemistry and Food Science, Iwate University*
[3] *Department of Systems and Mathematical Science, Nanzan University*
[4] *Research Organization of Information and Systems*
[5] *Department of Chemistry, University of Zurich, Switzerland*

The CAST/CNMR system is composed of two functions CAST/CNMR Shift Predictor and CAST/CNMR Structure Elucidator. These functions work using a database consisting of reported/observed ^{13}C NMR chemical shift values associated chemical structures described by CAST (CAnonical-representation of STereochemistry) coding method. In the course of database development, we add reported data of ^{13}C NMR and chemical structures 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 and re-assignments of ^{13}C NMR for some clerodane diterpenoids by using the CAST/CNMR system together with NMR analysis of isolated authentic samples as reliable NMR data for comparison.

CAST/CNMR システムは独自に構築したデータベースに基づき、立体化学や環構造の情報を考慮して化学構造式のクエリーに対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を検索し、部分構造から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。これまでに CAST/CNMR システムの応用研究としてテルペノイドやアセトゲニン類などの構造訂正研究を行ってきた。[5-7]CAST/CNMR システムの適用範囲を拡げるため最近の文献値を中心にデータ登録を継続しているが、予測精度はデータベースの質に影響を受けてしまうため、登録するデータの評価も慎重に行っている。CAST/CNMR Structure Elucidator の検索によって ^{13}C NMR データが一致するがその構造式が異なる事例は少なくない。^{13}C NMR データの良い一致は、化学構造が同じである可能性を示唆するが、異なる構造でNMRデータが一致する場合には少なくとも一方の構造の構造訂

構造訂正, 立体化学, データベース

○こしのひろゆき，くりさわなおあき，きむらけんいち，こいちしゅんご，さとうひろこ

正が必要であることを示唆している。今回はclerodane型ジテルペンを対象に立体化学に関する構造訂正と^{13}C NMRの帰属に関して評価を行なった.

Clerodane(**1**)型ジテルペンは主に植物由来のジテルペンでlabdane骨格から二つのメチル基が転移して生成する。２環性のデカリン部分は5位と10位の*cis*型、*trans*型の両方が数多く存在し、様々な酸化修飾やエステル化された化合物が報告されている。最近セイタカアワダチソウから単離した化合物の一つ,6-tigloyloxy-3,13-clerodadien-15-oic acidをCAST/CNMR Structure Elucidatorで検索した結果、*trans*型の6β-tigloyloxykolavenic acid(**2**)[8], および13位の二重結合が*Z*型のsolidagocanin A(**3**)[9]が^{13}C NMRデータの良い一致を示す化合物として見出された。しかし単離した化合物は詳細にNMR解析を行なった結果、*cis*型のclerodaneであることが判明し矛盾していた。そこで、関連するclerodane化合物をデータベースに登録してCAST/CNMRを用いて構造および^{13}C NMRの帰属の評価を行なった結果、化合物**2**も**3**も構造訂正が必要であることが明らかになった。13位の幾何異性に関する同様の間違いや、デカリン環部分の立体化学に関する間違いも幾つか見出されたのでその詳細について報告する。

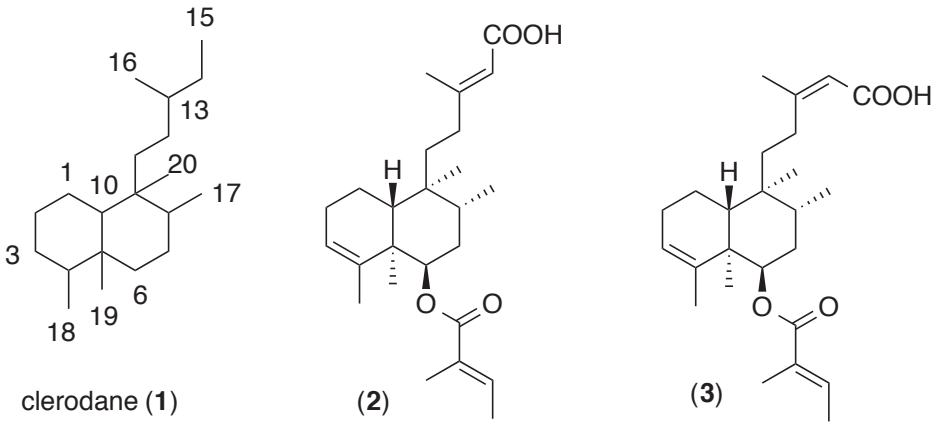


Figure 1. Clerodane carbon skeleton (**1**) with numbering and structures of 6β-tigloyloxykolavenic acid (**2**) and solidagocanin A (**3**).

References

1. H. Satoh, H. Koshino, J. Uzawa, and T. Nakata, *Tetrahedron*, **2003**, *59*, 4539-4547.
2. H. Satoh, H. Koshino, T. Uno, S. Koichi, S. Iwata, and T. Nakata, *Tetrahedron*, **2005**, *61*, 7431-7437.
3. S. Koichi, S. Iwata, T. Uno, H. Koshino, and H. Satoh, *J. Chem. Inf. Model.* **2007**, *47*, 1734-1746.
4. S. Koichi, M. Arisaka, H. Koshino, A. Aoki, S. Iwata, T, Uno, and H. Satoh, *J. Chem. Inf. Model.* **2014**, *54*, 1027-1035.
5. S. Takahashi, M. Yasuda, T. Nakamura, K. Hatano, K. Matsuoka, and H. Koshino, *J. Org. Chem*., **2014**, *79*, 9373-9380.
6. S. Takahashi, D. Satoh, M. Hayashi, K. Takahashi, K. Yamaguchi, T. Nakamura, and H. Koshino, *J. Org. Chem*., **2016**, *81,* 11222-11234.
7. 越野広雪、小市俊悟、佐藤寛子、第 55 回 NMR 討論会 講演要旨集 pp54-55 (2016).
8. T. Lu, M. A. Menelaou, D. Vargas, F. R. Fronczek, and N. H. Fischer, *Phytochemistry*, **1993**, *32*, 1483-1488.
9. Z.-X. Zeng, W.-H. Ma, Y.-L. Li, T. Han, C.-J. Zheng, and L.P. Qin, *Helv. Chim. Acta,* **2012**, *95*, 1121-1125.

L2-3

新規混合マイクロチップによる高速リアルタイム NMR

○山崎 和彦[1]、山崎 智子[1]、奥山 千枝子[2]、高橋 正春[3]、田中 良二[4]、
末松 浩人[4]
産業技術総合研究所・[1]バイオメディカル研究部門、[2]集積マイクロシステム研究センター、[3]企画本部、[4]JEOL RESONANCE

A fast real-time NMR enabled by a newly developed mixing microchip

○Kazuhiko Yamasaki[1], Tomoko Yamasaki[1], Chieko Okuyama[2], Masaharu Takahashi[3], Ryoji Tanaka[4], and Hiroto Suematsu[4]
[1]Biomedical Research Institute, [2]Research Center for Ubiquitous MEMS and Micro Engineering, and [3]Planning Headquarters, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Tsukuba, Ibaraki, Japan. [4]JEOL RESONANCE Inc., Akishima, Tokyo, Japan.

We developed a mixing microchip enabling a real-time monitor of reactions on the order of seconds, which are induced by mixing solutions inside the microchip. By incorporating a split-and-recombine-type mixer in the fluid lines, monitoring of reactions involving biomacromolecules with low diffusion rates or viscous solutions became enabled. From a syringe pump, a solution of denaturant-unfolded ribonuclease A was injected into the microchip inserted in the normal NMR tube and diluted by a buffer to initiate the refolding reaction. Immediately after the mixing, the reaction was detected by a series of NMR measurements that were synchronized with the control of the pump. The processes were repeated eight times and the spectra were accumulated. By analyzing the exponential change of the spectra with a factor-analysis treatment, a kinetic constant was obtained.

【序論】NMR は最も情報量の多いスペクトル分光法であり、生体高分子の立体構造変化を検知し、詳細な情報を得ることができる。特に、溶液の混合などによって誘起される反応過程における構造変化など、非平衡状態をリアルタイムで観察できる点に、大きな特長を示す。溶液混合によるリアルタイム NMR 実験は、通常の装置を用いて行うことも可能である。しかし、混合による反応誘導から測定スタートまで、迅速に作業を行っても 5 分程度は要するため、秒以下のオーダーの反応を追うことは困難である。日本電子 MICCS (MIcro Channeled Cell for Synthesis monitoring)システムは、主として化学反応のモニタリングのために開発された NMR 用混合マイクロチップである（文献 1)。NMR 試料管内に設置し、ガラスマイクロチップ内に刻まれた流路の合流により混合を行って、直後に測定することを可能とし、少なくとも分のオーダーの化学反応をモニターできる。ただし、このマイクロチップにおける溶液混合は、単純な流路合流によるものであり、拡散係数の小さい生体高分子や粘度の高い溶液には適さない。そこで、本研究では、混合を促進するための流路形成を行った新規マイクロチップを作成し、生体高分子に関する反応について、秒のスケールでのリアルタイム NMR を可能とすることを目的とした開発を行った。実際に、タンパク質の変性・巻き戻り反応の観察に適用し、速度定数を評価することに成功した。

溶液混合、反応、構造変換

○やまさきかずひこ、やまさきともこ、おくむらちえこ、たかはしまさはる、たなかりょうじ、すえまつひろと

【方法】ガラスマイクロチップ上の流路において、split-and-recombine 式の混合部を組み入れた（図 1)。ガラス状カーボン製の型をレーザー加工により作成し（東成エレクトロビーム、東京)、産総研開発のホットエンボス装置（文献 2）を用い、加温（745 °C)・加圧（1800–2000 N）によって、3 枚のガラス板上に、流路形成した。これらを再び加温（650 °C)・加圧（630–700 N）によって張り合わせて層を形成することにより、マイクロチップを完成させた。これを通常の NMR 試料管に挿入し、シリンジポンプに接続した（図 1)。Ribonuclease A（Sigma-Aldrich）を 4 M のグアニジン塩酸（変性剤）を含む緩衝液（10 mM重水素化酢酸緩衝液、pD_{read} 3.1）に 1 mM の濃度で溶解した溶液と、グアニジン塩酸を含まない緩衝液を等量混合する実験を行った。Bruker Avance III HD 900 の装置を用い、25 ℃で測定を行った。

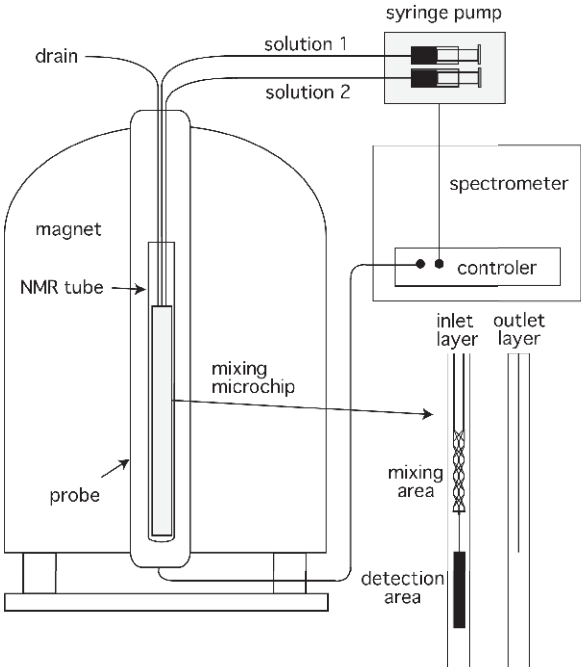


Fig. 1: Configuration of equipments and design of the mixing microchip

【結果および考察】シリンジポンプのON/OFF動作とパルスの発生・信号取り込みを同期させ、混合後、直ちに間隔2秒の連続測定を100回以上行うことを、8回繰り返した。それぞれの測定開始時間毎に8回積算したものとして扱い、スペクトルを重ねると、図2Aに示すように、時間に依存した変化を観測することができた。これに、因子分析法計算を用いた解析（文献3）を適用し、スペクトル成分に相当するローディングベクター（図2B）と時間依存性に相当するスコアベクター（図2C）と、に分解して解析した結果、0.01 s^{-1}の反応速度定数を得た。2 Mの変性剤濃度という条件下では、このように巻き戻り反応が比較的遅いが、それでも通常の方法では解析不能な高速リアルタイムNMRを実現できた。また、混合比率を変えて、より低い変性剤濃度にすれば、さらに速い反応となると考えられる。測定間隔も1秒程度に短くすることもでき、今回の数十倍速い反応にも十分に対応可能である。

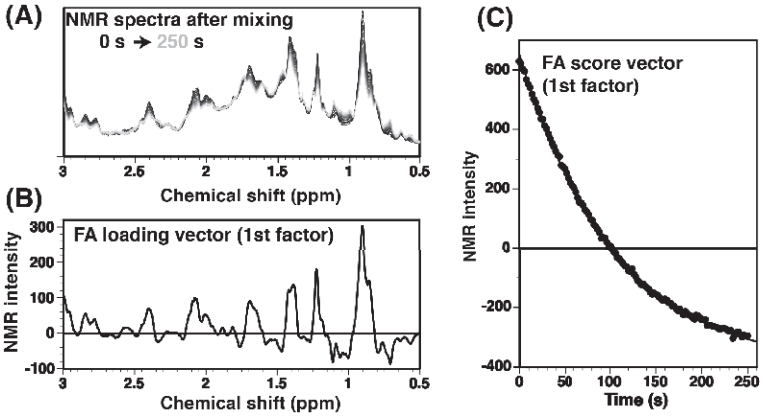


Fig. 2: Change in the spectra along with the protein refolding (A) as analyzed by factor analysis (B, C).

【謝辞】Avance III HD 900分光計（理研NMR施設）の利用にあたっては、文科省NMR共用プラットフォーム事業より、平成26年度特定課題として、支援を受けた。

【引用文献】

1) Takahashi, Y., Nakakoshi, M., Sakurai, S., Akiyama, Y., Suematsu, H. *et al*., *Anal. Sci.* **23**, 395, 2007.
2) 高橋正春ら。2005年度精密工学会春季大会学術講演会講演論文集 p.85
3) Yamasaki, K., Obara, Y., Hasegara, M. *et al*., *Anal. Chem.* **85**, 9349, 2013.

L2-4

深層学習により強化されたNMR立体構造解析

○小林直宏[1]、永田崇[2]、服部良一[3]、新家粧子[1]、Julia M. Würz[4], Peter Güntert[4,5]、児嶋長次郎[6]、藤原敏道[1]
1大阪大学・蛋白質研究所
2京都大学・エネルギー理工学研究所
3徳島文理大学・薬学部
4Institute of Biophysical Chemistry, Goethe-University Frankfurt, Germany
5首都大学東京・理工学部
6横浜国立大学・理工学部

A robust approach for highly automated NMR structure analysis assisted by deep neural networks.

○Naohiro Kobayashi[1], Takashi Nagata[2], Yoshikazu Hattori[3], Shoko Shinya[1], Julia M. Würz[4], Peter Güntert[4,5], Chojiro Kojima[6], Toshimichi Fujiwara[1]

[1]*Institute for Protein Research, Osaka University*
[2]*Institute of Advanced Energy, Kyoto University*
[3]*Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokushima Bunri University*
[4]*Institute of Biophysical Chemistry, Goethe-University Frankfurt, Germany*
[5]*Department of Chemistry, Graduate School of Science and Engineering, Tokyo Metropolitan University, Japan*
[6]*College of Engineering Science, Yokohama National University*

The recent NMR structure analysis for protein in solution has been well established and there are many programs which can automate signal assignments and structure determination. These tools generally require peak lists derived from multi-dimensional and hetero- or homo-nuclear NMR spectrum datasets, however, still many users have to identify NMR signals manually. We have developed noise/signal recognition system working with Deep Neural Networks which can discriminate noise and artifacts effectively. In combination with FLYA and CYANA, the new system can be applied to NMR structure modeling using a limited number of NMR datasets and very little manual operations.

タンパク質などの生体高分子を観測対象とするNMR法では分子量サイズが小さければサンプルの安定性、装置の感度など多くの要因があるものの完全に近い自動シグナル帰属、構造解析はほぼ確立されたと言える。通常の$^{13}C/^{15}N$安定同位体標識法で得られたサンプルの場合、早ければ数日で高精度なモデルを得る事もめずらしくはない。しかしながら、近年のNMR解析では装置の高感度化、高安定化や自動解析方法が進歩する一方、より低濃度での測定、高分子量のタンパクへの応用に対する要請は強く、加えて1サンプルに対する解析時間の短縮化や初学者でも

自動帰属、深層学習

○こばやしなおひろ、ながたたかし、はっとりよしかず、しんやしょうこ、うるつじゅりあ、ぎゅんたーとぺーたー、こじまちょうじろう、ふじわらとしみち

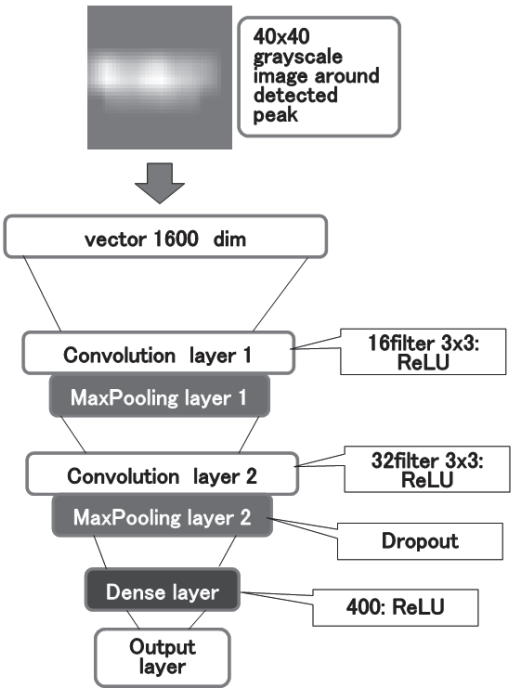


Fig. 1. Network structure of narrow image noise/signal recognition.

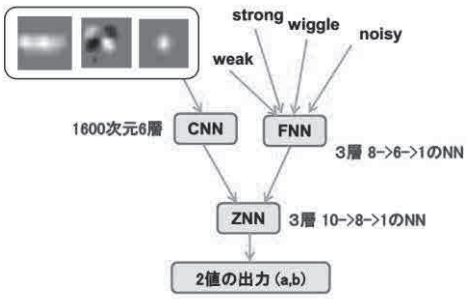
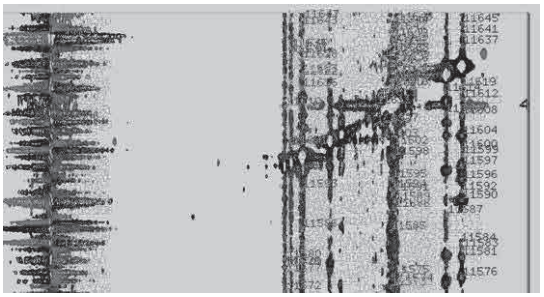


Fig. 2. All network structure of noise/signal recognition system.

取り組める高度な自動化への要望は高い。高精度なNMRシグナル帰属と立体構造解析を実現するツールとしてGüntertらのグループが開発したFLYA[1]はCASD-NMR [2]コンテストにおいて最上位の成績を示した世界最高性能を誇るプログラムとして有名である。一方自動解析プログラムでは基本的に解析者が丁寧にスペクトルから検出されたピークリストを用意する事が推奨され、多数のスペクトル由来の膨大な数のピーク群を相手に貴重な時間を費やす事が問題となる。現在も目視確認によるピーク検出の実行が主流であり、この工程をいかに効率よくかつ正確に自動化する事は長らく議論されてきた。NMRスペクトルにおけるノイズあるいはアーティファクトは様々な原因で発生するが、ルーチン化された溶液構造解析系のスペクトルでは典型的なノイズパターンが見受けられる。NMRシグナル形状を吸収型ローレンツあるいはガウス関数型線形を期待した場合、データグリッドの頂点検索法は高速であり、2次関数補完により比較的良好なピーク位置と強度を得る事ができる。昨年度におけるNMR討論会において我々のグループはノイズのパターンを学習させ、ノイズ・シグナル判定器を開発し、高速な主鎖構造解析への応用例を示した。ノイズのパターンとして、ウイグル型のノイズ、テール状のノイズ、サテライト型のノイズ、水シグナル由来のノイズを検出点を中心とした狭いスペクトル領域について切り出し、中心位置の強度を最大値とする規格化 (正負を含め0-255段階のグレースケールへ変換)を行い、これらをノイズ、シグナルそれぞれ2,000個のイメージを収集した (児嶋、服部らによる$^{13}C/^{15}N$ラベル化Ubiquitinによる主鎖帰属系3Dスペクトルを用いた)。これらイメージデータを回転、鏡像反転、符号反転させてデータ数を拡張し、32,000個の訓練およびテストデータとして深層学習の一種である畳込みニューラルネット(CNN)[3-5]による学習を行った。学習にはnVIDIA製GPU (GTX980) を用い、MicroSoft製 CNTK ver.2.0 [6] を用いた。本研究では更に訓練データを追加し、CNNの構造にも改善を加えた(Fig.1)。CNNのみによるノイズ判別性能は昨年度よりも若干向上し、3D-NOESY系への適用が可能なレベルとなったが、偽陽性89%, 偽陰性95% 程度であり、肝心の真のシグナルを逃してしまう。これを避けるために昨年同様、補助的な情報を与える浅いニューラルネットワーク(FNN) を作成し、ピークの統計的な強度情報、x,y,z軸方向でのシグナル密集度、CNNの範囲外に存在するウイグルピーク様シグナル情報などを最終段の浅いニューラルネットに伝えて最終判断させるシステムとして構築した(Fig. 2)。

このシステムにより偽陽性92%, 偽陰性98%程度に性能向上させることが可能になった。このノイズ・シグナル判別システムとFLYAによる完全に近い自動構造解析を小さなタンパク質であるFKBP (側鎖Lysメチル化) $^{13}C/^{15}N$ラベル体による応用を試みた。Fig.3 に児嶋、服部らによって測定された3D ^{13}C-edited NOESYを示す。本研究では意図的に測定条件の悪いデータをシステム性能の検証として利用したため、前述のピーク検出方法では実に32,000個ものノイズが検出されている。CNNを用いたノイズ検出器を用いる事によってFig. 3のように多数のピークが自動的に除去されている事が分る。



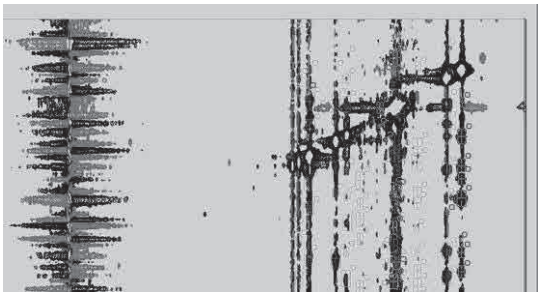


Fig. 3. ^{13}C-edited NOESY for aliphatic.
(left) Because of the bad machine condition, a number of noise peaks are detected.
(right) CNN noise filter system effectively eliminated a large number of noise peaks.

本研究において開発されたFLYAとの連携解析システムのワークフローをFig.4 に示す。解析には2Dスペクトルとして ^{1}H-^{15}N HSQC, ^{1}H-^{13}C CT-HSQC for aliphatic/aromatic, 3D HNCO, HNCACB, CBCA(CO)NH, HCCH-TOCSY for aliphatic/aromatic, ^{15}N-edited NOESY, ^{13}C-edited NOESY for aliphatic/aromatic を用いた。大阪大学蛋白研小林らにより開発されたMagROによりこれらのワークフローは管理され、自動的なスペクトルの閾値決定、高速ピーク検出、HSQCスペクトルピークをマスク情報とする簡易フィルターを実行する。^{13}C-edited NOESY for aliphaticスペクトルは水由来のノイズ、微量の混入物と思われるシグナルからのノイズ、メチルシグナルからのノイズがNOE検出に重要な間接^{1}H軸に多数存在し、簡易フィルター後も実に13,600個ものピークが含まれる。これについてCNNによるノイズフィルター処理を実行すると3,000個程度まで減らす事が出来たが、いくつかの肩ピークと思われるシグナルは検出できない状態である。この段階でFLYAを実行し、立体構造を計算させながらシグナル帰属を実行させる。続いてFLYAにより帰属された信頼性の高いデータをMagROにインポートし、主鎖シグナルの帰属の確認を行う。

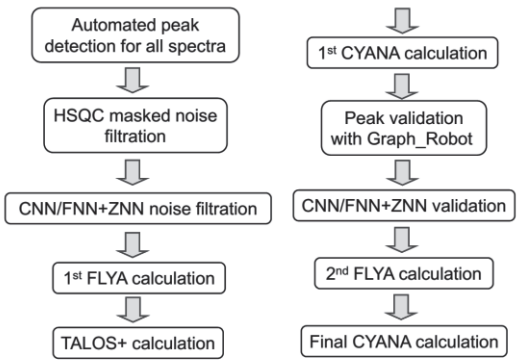


Fig. 4. Work flow for the fully-automated structure analysis using deep neural networks.

ここで特に問題が無ければTALOS+計算を行う。得られたTALOS+の結果を自動的に2面角制限ファイルに変換し、FLYA計算で用いたNOEテーブルとFLYAにより帰属された化学シフトテーブルを用いてCYANA計算を実行する。続いて、同じく蛋白研小林らによって開発されたGraph_Robotを用いて、CYANAの構造から推定されるNOEパターンも含め全てのスペクトルのピーク出現パターンの計算を行い、ピークリストに追加すべきかどうかを自動判定させる。自動判定には既存のピーク位置、スペクトル上での強

度などを考慮し、ピークリストに追加後、更にCNNによるノイズ判定で真偽性を判断させて最終ピークリストとして完成させる。この段階における初期ピーク検出時に存在したノイズはほぼ完全に除去できる状態になり、その除去効率はおよそ99.5%に達した。本研究においてもっとも効果が見られた工程はこの部分であり、多くの分離困難な肩ピークが無理なく追加された。再度FLYA計算を実行し、残された10%程度のシグナルが帰属され、引き続きMagROにFLYAの帰属情報をロードさせて準備させた最終CYANA計算により立体構造、および帰属の達成度も深層学習と2段階のFLYAを実行しない従来法に比べ大きく改善した。最終構造と手動で解析された平均構造との重ね合わせをFig.5 に示す。おおむね良い構造に収斂し、正解構造との主鎖RMSDも0.95Åとなった。スペクトルの種類を減らす、ノイズの多いスペクトルを含むデータセットでの検証であり、このサイズのタンパク質でもかなり難度が高い課題であると考えられる。今後、複数のサンプルでの検証を行い、本システムをデモ公開配布する予定である。

[従来法]

合計シグナル数: 1285 帰属されたシグナル数: 987 達成度: 76.8% 正解率: 93.1%

構造収斂度： RMSD(CO,N,Cα) 0.7Å　正解構造とのRMSD： 1.52Å

[深層学習によりにより強化された方法]

合計シグナル数: 1285 帰属されたシグナル数: 1142 達成度: 88.8% 正解率: 95.7%

構造収斂度： RMSD(CO,N,Cα) 0.2Å　正解構造とのRMSD： 0.95Å

Fig. 5. Final structure of FKBP determined by fully-automated analysis.

Overlaid mean structures of FKBP: determined by manual (blue) and fully-automated manner (red)

References

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

(2) Rosato et al., (2010) CASD-NMR:Critical assessment of automated structure determination by NMR *Nat. Methods*, 6,625-626.

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

(4) LeCun, Y., Bottou, L., Bengio, Y., and Haffner, P. (1998) Gradient-based learning applied to document recognition. *Proceedings of the IEEE*, 86, 2278–2324.

(5) Krizhevsky, A., Sutskever, I., and Hinton, G.E. (2012) ImageNet classification with deep convolutional neural networks. Advances in Neural Information Processing Systems 25. Montré-al, Canada.

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

L2-5

液系ラミネートLi-ion電池のin-situ NMR/MRI観察

○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

in-situ ^{7}Li-NMR/MRI for aluminum-laminated 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

Synopsis: A feasibility of *in-situ* ^{7}Li-NMR/MRI for aluminum-laminated rechargeable lithium batteries has investigated. The NMR/MRI measurement of aluminum-laminated samples had been believed impossible because the aluminum-lamination around any Li-ion batteries prevents to penetrate very high radio frequency waves of usual NMR excitation and detection to/from a measurement ^{1}H/^{7}Li subject inside. However, we 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 with a 200 μm sealing gap. A free-discharge of Li-ion battery was measured with *in-situ* NMR spectrum in one-minute resolution.

緒言：NMR/MRIによるリチウムイオン電池の計測は，^{1}H，^{7}Li，および^{19}Fを直接的に観測できることから，電池の研究開発に有用な手法となっている。一方で，NMR/MRI計測と電池構成との相性の問題で，先行研究の内容は先駆的ではあるが，試料形状は限定的なものとなっていた(Ref.1-2。例えば縦型NMR磁石を用いるNMR/ MRI装置は，試験管状の細長い試料形状を要求し，高周波信号の送受信が必要なために電池のパッケージは非金属が前提と考えられてきた。以上のような状況で，筆者らは本学会(Ref.3にて一般的なアルミラミネート型のリチウム二次電池について，均一かつ明瞭なLi-MRI画像を示すことで^{7}Li-NMR/MRIが実現可能であることを示した。本研究では測定法を発展させ，放電させながらのin-site計測の検討を行った。

NMR/MRI system and Li battery samples:

A 9.4-Tesla wide-bore NMR magnet, digital NMR/MRI console (DTRX6/ S7D/ iPlus, MRTe, Japan), a home-built 3-axis gradient coil, and rectangle solenoid rf coil were employed. Fig.1 shows two orientations of the rf coil' slot and in-parallel-to-B_0 position (right hand side) was used for experiments. The TX power for the B_1 excitation was less than 50 W for 120 μs pulse width. The aluminum-laminated film of 110 μm was consisted by Al-foil of 30 μm thickness, PET (polyethylene terephthalate), and Nylon. Two laminate films of $(28\ mm)^2$ square with tab thickness of 200 μm and 3 mm sealing width were used to enclose a battery stack. Measurement homogeneity for space of $(20\ mm)^2$ in the laminated sample was confirmed by MRI of an all-solid-state electrolyte package. A whole battery package (500 μm thickness) with the lamination was $(29\ mm)^2$ square with Al/Cu current collectors.

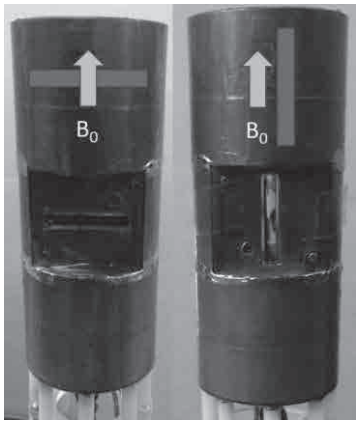


Fig.1. rf probe with gradient coil: B_0 is in perpendicular, or parallel to the rf slot's plane.

laminate, MRI, Lithium
○はいしともゆき，ふじきさとし，あいはらゆういち

NMR *in-situ* experiments and results:

The aluminum-laminated Li-ion rechargeable batteries (LCO/ liquid-electrolyte/ Graphite, N/P = 1.2/1.0) were prepared for *in-situ* NMR experiments. Fig.2 shows one of the rechargeable batteries with a 1 kΩ resistor. For the measurement of ^{7}Li-NMR spectrum of the batteries at 3V / 4V just after the initial charge, a FID pulse sequence (TR = 50 ms, width = 50 μs, sampling rate =1 μs, deadtime delay = 200 μs, 2048 points, T_{acq} = 51 sec) was prepared. A free-discharge experiment (26 hours) shown in fig.3 was performed with the fully-charged battery with a 1 kΩ resistor from 3.89 volts (open) to 0 volts (with the load).

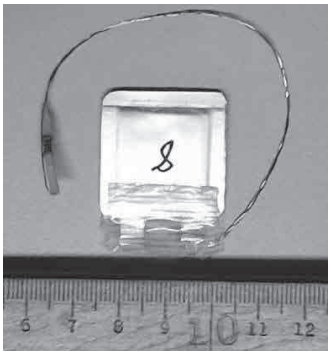


Fig.2. Li-ion B. with 1kΩ.

Discussion:

In the reference studies for Li-ion batteries, unique batteries were always designed for each experiment. In this study, the common planar thin parts such as a LCO, graphite, and Li-foil for rechargeable Li-ion battery were measured as a NMR / MRI compatible subjects with a proper orientation between B_1 and the lamination packages.

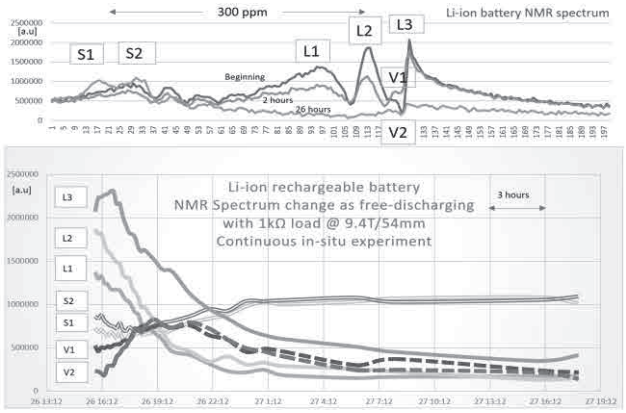


Fig.3. ^{7}Li-NMR *in-situ* spectrum as free-discharging.

Conclusion:

^{7}Li NMR/MRI of aluminum-laminated Li battery samples were successfully done at 156MHz. It was confirmed by the standard NMR imaging that the rf pulse / signal distribution in the thin laminate package was very uniform so that the rf passageway was in-parallel to the laminate's planes. We conclude that the proper aluminum lamination makes us possible to proceed stable *in-situ* and longitudinal NMR/MRI of rechargeable Li-batteries beyond delicate plastic packages.

参考文献

1) 「NMRイメージング法を用いたLiイオン電池の内部構造の可視化」:大野大生ら，日本物理学会大会65(1-4)，780，2010-03-01
2) ^{7}Li MRI of Li batteries reveals location of microstructural lithium: S. Chandrashekar、Nicole M. Trease，Hee Jung Chang，Lin-Shu Du，Clare P. Grey，and Alexej Jerschow1，NATURE MATERIALS，VOL 11，APRIL 2012
3) 「アルミラミネート型全固体リチウム二次電池の7Li-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，藤木聡，相原雄一，第55回NMR討論会予稿集(広島)，2016

L2-6

SWIFT 画像法における T_2 情報の復活

○三森文行[1], 小林尚玄[2], Michael Garwood[2]
(国立環境研[1], Univ. Minnesota[2])

Recovery of T_2 information at imaging with a SWIFT method

F.Mitsumori[1], N.Kobayashi[2], M.Garwood[2]
(Natl. Inst. for Environmental Studies[1], Univ. Minnesota[2],)

SWIFT is a unique imaging method which combines a frequency swept RF pulse and systematic stepping of the field gradient. Simultaneous acquisition of signal with excitation allows imaging for objects with short T_2, but the obtained image loses T_2 contrast. In the present work, we attempted a recovery of T_2 information by adding CPMG preparation pulses in advance of the SWIFT sequence. Usefulness and limitation of the method are discussed, especially focusing on the quantitation of short T_2.

【はじめに】SWIFT (SWeep Imaging with Fourier Transformation)画像法は広帯域周波数掃引パルスと系統的な磁場勾配ステッピングを組み合わせたユニークな画像法である。磁化の励起とほぼ同時に信号取得を行うため、これまでの画像法では対応できない骨など T_2 緩和時間が短い対象においても効率的に画像を測定することができる (1,2)。しかし、上記の理由により、画像上の T_2 情報は失われる。本発表では、SWIFT に先だって CPMG パルス列を付加することにより、SWIFT 測定法における T_2 情報の復活を試みた。

【方　法】SWIFT 画像法では広帯域の hyperbolic secant パルス(本測定では掃引帯域 156.25kHz)出力中に 128 個の受信用ギャップを開けて、励起後数マイクロ秒で信号取得を行う。RF パルスと同時に定常磁場勾配が付加されているので、１パルス測定で磁場勾配の軸に沿った 128 点＋α の投影データ (view と呼ぶ) が得られる。磁場勾配の軸を３次元で系統的に変えながら 2k～256k view の測定を繰り返すと、３次元の k 空間を埋める球状の空間情報が得られる。T_2 情報を復活するためには、SWIFT に先だって CPMG パルス列を付加し、T_2 減衰した横磁化を縦磁化に戻して SWIFT 測定する方法を用いることとした。テフロン材を基盤とした Alderman-Grant 型のインダクティブマッチング方式の RF 信号検出器を作製し(3)、Agilent 社 16.4T 動物用分光計を用いて測定を行った。無セルロプラスミン血症患者脳より得たホルマリン固定試料を測定に用いた(4)。

T_2 定量化の検討には実測とシミュレーションを併用した。実測用ゲル試料は T_1 の(a)短い、(b)中程度、(c)長い下記の３種のゲル試料を内径 1.3mm のキャピラリにつめたものを用いた。

(a) 1% CuSO4･5H2O, 2% アガロース (T_1=24.4±0.1ms, T_2=17.6±1.2ms)
(b) 0.1% CuSO4･5H2O, 2% アガロース (T_1=224±0.7ms, T_2=50.8±1.1ms)
(c) 1mg/ml ferritin Fe, 10% gelatin (T_1=1059±4.4ms, T_2=7.8±0.2ms)

上に表示した T_1, T_2 はそれぞれ反転回復法、CPMG 法により測定した値である。

CPMG で準備された磁化シミュレーションのために、SWIFT 測定の n 回目のパルス直前の縦磁化 M_n を次の逐次式で計算した (熱平衡磁化を 1 とする)。

$$M_n = 1 - \{1 - M_{n-1}*\cos FA\}*\exp(-TR/T_1) \quad [1]$$

$$M_1 = \exp(-TE/T_2) \quad [2]$$

FA は SWIFT 測定のフリップ角、TR, TE はそれぞれ、SWIFT のパルス繰り返し時間、CPMG 準備パルスのエコー時間である。CPMG 準備パルス後の view 測定数(MP)が k のときの磁化の大きさは n=1～k までの磁化の平均値となるとして、各 TE における磁化を単一指数フィッティン

キーワード：SWIFT 画像法、T_2 コントラスト、ヒト脳組織
○みつもりふみゆき、こばやしなおはる、まいけるがーうっど

グにより T_2 を算出した。

【結果と考察】Fig.1a に鉄を蓄積した無セルロプラスミン血症の患者脳より得た、短い T_2 を有する組織の通常 SWIFT 画像をあげる。粒子状の鉄の沈着が黒点として認められる。しかし、組織の違いや、拡散的に存在する鉄による T_2 コントラストは失われている。Fig.1b に CPMG 準備パルスを併用した SWIFT 画像を示す。T_2 の異なる灰白質と白質のコントラストが復活していることが見て取れる。

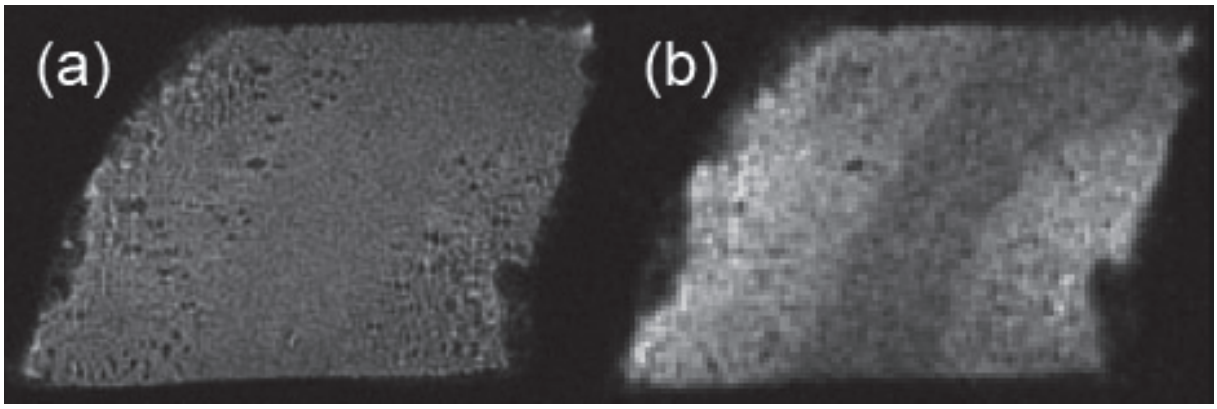


Fig.1(a)Conventional, and (b)CPMG-prepared SWIFT images of a brain tissue obtained from occipital lobe of an aceruloplasmia patient. Spatial resolution is 36 x 36 x 36 μm for (a), and 52 x 52 x 52 μm for (b), respectively. TE=3ms for (b).

CPMG 準備パルスにより T_2 減衰の度合いの異なる磁化でいくつかの測定を行い、ピクセル毎に指数関数フィットを行えば、定性的なコントラストだけでなく、T_2 値の定量が可能になる。しかし、準備パルスの後で磁化は縦磁化にフリップバックされているので、この時点以降では T_1 緩和が進行するため、準備パルス後の経過時間によっては結果に T_1 緩和が混入することになる。準備パルス後に１パルス（1 view）の測定のみを行えば、T_1 緩和が起こりえる時間はほとんど問題にならない。しかし、これでは測定に長時間を要し効率的でないため、実際には複数 view の測定を行う。この場合、T_2 の定量化にどの程度 T_1 緩和の影響が及ぶのか、ゲル試料の実測とシミュレーションにより、測定条件の検討を行った。

Fig.2 に[1]、[2]を用いて計算した CPMG 準備パルス後の SWIFT 測定中の磁化の動きを示す。(a), (b), (c)はそれぞれ、実測ゲル試料の T_1, T_2 値を用い、フリップ角 FA=2°, TR=1.9384ms として計算した。T_1 の短い(a)の場合、TE=0 ～ 4ms で T_2 エンコードされた磁化は測定を繰り返すと異なる速度で定常磁化 0.9927 に近づいて行くので、準備パルス後に多数の測定をすると T_1 の影響が大きくなることが予想される。これに対し、T_1 の長い(3)では準備パルス後に多数の測定を繰り返しても T_1 の影響は比較的小さいと思われる。

表１に実測とシミュレーションによる T_2 の値をまとめた。実測では、MP を大きくする程誤差が大きくなり、その程度は T_1 が短い場合ほど大きい。T_1=24.4ms の例では MP が 4 以上になると誤差が大きくなることがわかる。これに対し、T_1=224ms では MP 16、T_1=1059ms では MP 64 程度までは許容できると思われる。シミュレーションの結果は実測値の変動を良く説明している。Fig.1 に示した後頭葉組織の T_1 値は 300～400ms であるので、MP=16、TE=0.5～4ms で測定を行い、灰白質、白質の T_2 値をそれぞれ、7ms、5ms と得た。

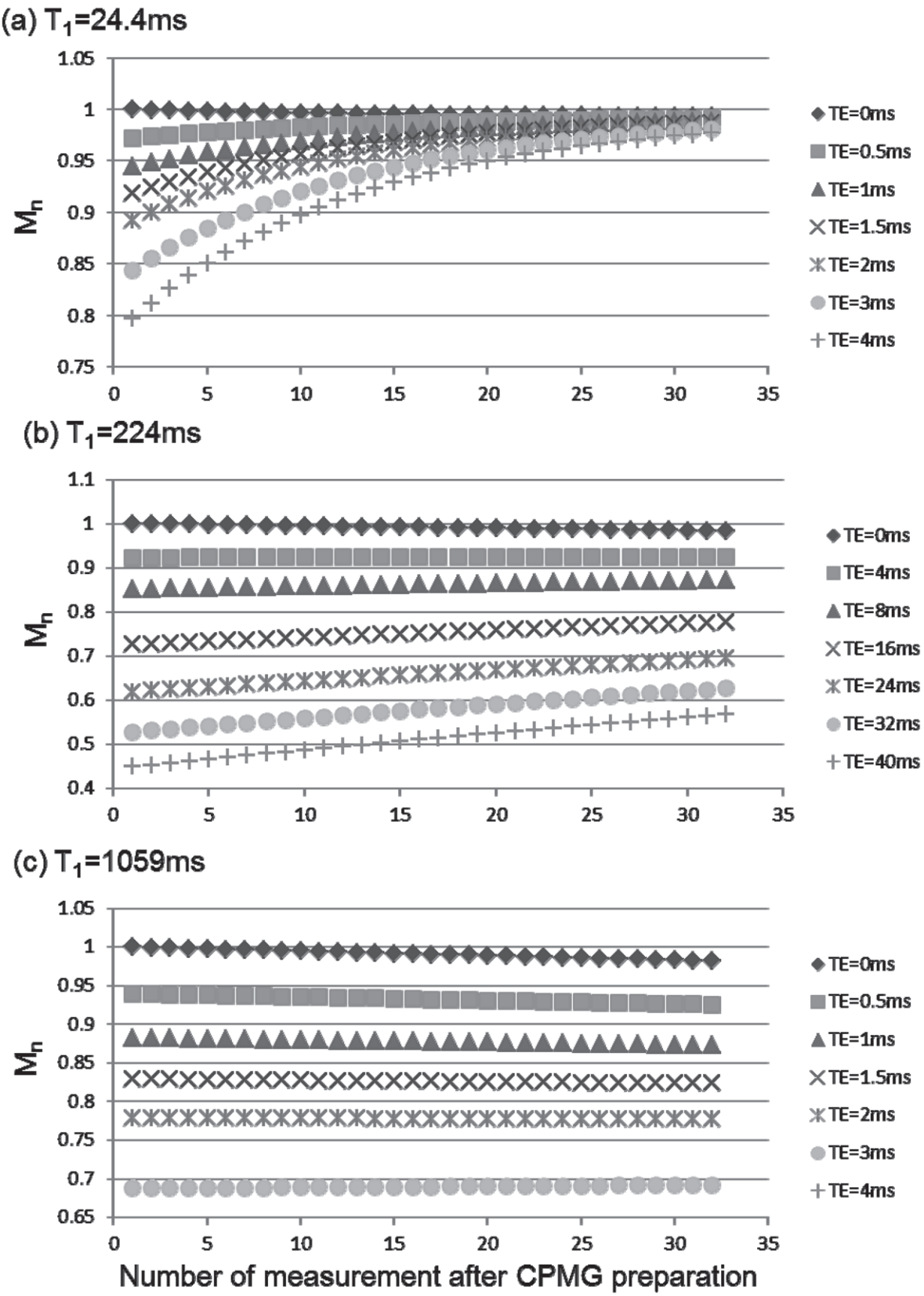


Fig. 2 Simulated longitudinal magnetization (Mn) with the progress of SWIFT measurement after CPMG preparation using equations [1] and [2] in three cases of T_1 values. TR=1.9384ms, FA=2°

Table 1. Measured and simulated T_2 values with three gel samples obtained at various MP values

(1)T_1=24.4ms T_2=17.6ms	measured T_2 ms	simulated T_2 ms
MP=1 te=0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6ms	17.6±0.3	17.6
MP=2 te=0.5, 1, 2ms	17.3±0.9	18.3
MP=4 te=0.5, 1, 1.5, 2ms	17.9±0.8	19.9
mpblock=8 te=0.5, 1, 1.5, 2ms	18.5±0.7	20.8
(2)T_1=224ms T_2=50.8ms		
MP=8 te=4, 8, 16, 24, 32ms	50.0±0.9	52.1
MP=16 te=4, 8, 16, 24, 32ms	52.9±1.5	54.6
MP=32 te=4, 8, 16, 24, 32ms	56.8±2.3	59.8
MP=64 te=4, 8, 16, 24, 32ms	67.0±2.8	70.9
(3)T_1=1059ms T_2=7.8ms		
MP=16 te=0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3ms	7.1±0.1	8.1
MP=64 te=0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3ms	7.2±0.2	8.6

【文　献】

(1) Idiyatullin D et al: J Magn Reson, 181, 342-349 (2006).
(2) Idiyatullin D et al: J Magn Reson, 251, 19 (2015).
(3) Alderman DW, Grant DM: J. Magn. Reson., 36, 447 (1979).
(4)三森文行、Garwood M、宮嶋裕明、坂尾万幾子、瀬山晴彦: 第 54 回 NMR 討論会要旨 L1-4.

L2-7

リン酸化ユビキチンの２つのコンフォメーションの立体構造決定と圧力効果

○北沢　創一郎[1]，青島　佑[2], 伊賀　惇記[1], 池谷　鉄兵[3]，北原　亮[1, 4]

1 立命館大学　薬学部

2 立命館大学　生命科学研究科

3 首都大学東京 都市教養学部

4 大阪大学　蛋白質研究所

Structure determination and pressure effects of major and minor conformations of phosphorylated ubiquitin

○ Soichiro Kitazawa[1], Yu Aoshima[2], Junki Iga[1] , Teppei Ikeya[3] , Ryo Kitahara[1,4]

[1] College of Pharmaceutical Sciences, Ritsumeikan University

[2] Graduate School of Life Sciences, Ritsumeikan University

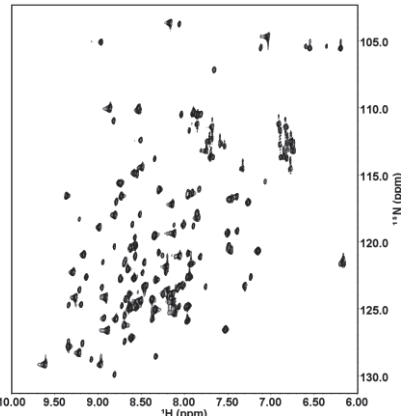
[3] Graduate School of Science and Engineering, Tokyo Metropolitan University

[4] Institute of Protein Research, Osaka University

Ubiquitin phosphorylated at Ser65 (pUb) is Parkin activator[1]. Interestingly, two sets of NMR signals were observed in ^{1}H-^{15}N HSQC spectrum of pUb. The major form has a closely similar conformation to the non-phosphorylated ubiquitin. On the other hand, the minor form has entirely different hydrogen bonding patterns at β-sheet region, in which β_5-strand has retracted into the ubiquitin core region by two amino acid residues[2,3]. The retracted minor conformation provides different interaction surface on the ubiquitin hydrophobic patch from that of the major one. Here, we report the analysis of conformational fluctuation of pUb using high-pressure NMR spectroscopy. Our results indicate that the retracted conformation is not significantly stabilized in pUb and phospho-mimic mutants. However, pressure-induced chemical shifts were markedly different at the β-sheet and 3_{10}-helix regions between the major and minor ones, indicating that pressure-induced changes in hydrogen bond length and torsion angles are different at the β-sheet region.

【研究の背景と目的】

Ser65 がリン酸化されたユビキチン(pUb)は Parkin の活性化因子であり、ミトコンドリアの品質管理に関与している [1]。pUb は水溶液中で 2 つの NMR 信号を与え、NMR 的に遅い交換による二状態の平衡状態にある(Figure 1)。pUb の Major 状態の立体構造及び pUb の結晶構造は、非リン酸化ユビキチン(Ub)の立体構造と概ね一致している [2,3]。一方、pUb の Minor 状態は、β_5–strand が二残基分スライドし、β_5-strand の N 末端側に存在する 3_{10}-helix が伸長する。それに伴いβ–sheet 領域の構造が変化している [3]。リン酸化により一部のリガンドとの相互作用能が喪失



Figur e 1. ^{1}H-^{15}N HSQC spectra of phosphorylated Ub at 298 K.

高圧力NMR、リン酸化ユビキチン

○きたざわ そういちろう, あおしま ゆう, いが じゅんき, いけや てっぺい, きたはら りょう

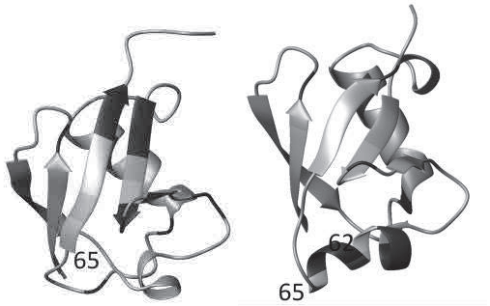
するとの報告もあり[2]、pUbと様々なリガンドとの相互作用とMajor-Minor間の構造揺らぎの関係は興味深い。しかし、これまでにpUbの構造揺らぎについての十分な知見はない。本研究では構造変化に敏感な高圧力NMR法を用いたpUbの構造揺らぎ研究について報告をする。

【方法】

$^{15}N/^{13}C$標識されたpUbを作成し、^{1}H 950 MHz-NMR装置（大阪大学蛋白質研究所）を用いた三重共鳴実験によりMajor状態, Minor状態の信号を帰属した。^{15}N edited NOESY-HSQC, ^{13}C edited NOESY-HSQCによる距離制限及びTALOS+による二面角角度制限、水素結合情報をもとにMajor状態とMinor状態の立体構造解析を行った。pUbの^{1}H-^{15}N HSQCスペクトルを1気圧から2500気圧の範囲で測定した。

【結果と考察】

pUbの^{1}H-^{15}N HSQCスペクトルを298 K, pH 7.2, 1 barで測定した。各残基のMajor状態とMinor状態の信号強度比からMinor状態の存在比を計算すると1気圧でおよそ20%であった。1気圧から2500気圧までの範囲で存在率に変化はほとんどなかった。この結果は、Major状態とMinor状態間の立体構造が大きく違うにも関わらず、二状態間の部分モル体積差(ΔV)は、非常に小さいことを示す。



Figur e 2. Pressure-induced chemical shift changes of major (left) and minor forms (right). Backbone amide groups showing chemical shift changes of more than 0.25 ppm are colored by dark gray.

次に各状態の圧力応答について着目する。Major状態の化学シフトの圧力応答は、Ubのそれと類似していた。Major状態とUbの1気圧と2500気圧の化学シフト差の相関をとると、その決定係数 R^2は0.798(^{1}H), 0.958(^{15}N)と相関がみられた。また、化学シフトの圧力応答から天然状態(N_1)と準安定状態(N_2)間のギブス自由エネルギー差(ΔG^0)とΔV^0は4.1 ± 0.1 kJ/mol, –23 ± 1 ml/molと見積もられ、同条件でのUbのΔG^0, ΔV^0は 3.4 kJ/mol ± 0.1 kJ/mol , –24.7 ± 0.8 ml/molに非常に近い。これらUbとMajor状態の結果の類似性からUbで観測されるN_1-N_2の状態転移がMajor状態でも存在することが示された。

一方、Minor状態とUbの化学シフトの圧力応答は大きく異なった（Figure 2）。両者の1気圧と2500気圧の化学シフト差の相関は、R^2が0.172 (^{1}H), 0.162 (^{15}N)と低く、相関がみられなかった。Minor状態で3_{10}-helixが伸長形成した62-65アミノ酸残基で大きな化学シフトの圧力応答と信号の減弱が観測された。これらのことからMinor状態ではUbにみられる状態転移は存在しないが、新たに形成された3_{10}-helixにおいて局所的な構造変化が生じていることが示唆される。

References

(1) Koyano F, Okatsu K, Kosako H, Tamura Y, Go E, Kimura M, Kimura Y, Tsuchiya H, Yoshihara H, Hirokawa T, Endo T, Fon EA, Trempe JF, Saeki Y, Tanaka K, Matsuda N. (2014) Ubiquitin is phosphorylated by PINK1 to activate parkin. *Nature, 510*,162-166.
(2) Wauer T, Swatek KN, Wagstaff JL, Gladkova C, Pruneda JN, Michel MA, Gersch M, Johnson CM, Freund SM, Komander D. (2015) Ubiquitin Ser65 phosphorylation affects ubiquitin structure, chain assembly and hydrolysis. *EMBO J. 34,* 307-325
(3) Dong X, Gong Z, Lu YB, Liu K, Qin LY, Ran ML, Zhang CL, Liu Z, Zhang WP, Tang C. (2017) Ubiquitin S65 phosphorylation engenders a pH-sensitive conformational switch. *Proc Natl Acad Sci, 114,* 6770-6775

L2-8

光検出磁気共鳴法による生細胞における1分子運動の計測

○白川昌宏[1]，五十嵐龍治[1,2]，源城拓哉[1]，外間進悟[1]，藤咲貴大[1]，
寺田大紀[1]，田辺竜太郎[1]，大木出[1]，吉成洋祐[3]，杤尾豪人[4]
1京都大学・大学院工学研究科
2科学技術振興機構
3日本電子株式会社
4京都大学・大学院理学研究科

Cell biology using nanogyroscope by optically detected magnetic resonance (ODMR) spectroscopy

○Masahiro Shirakawa[1], Ryuji Igarashi[1,2], Takuya Genjo[1], Singo Sotoma [1], Takahiro Fujisaku [1], Daiki Terada[1], Ryotaro Tanabe[1], Izuru Ohki[1], Yosuke Yoshinari [3], Hidehito Tochio [4]
[1] *Graduate School of Engineering, Kyoto University*
[2] *Japan Science and Technology Agency*
[3] *JEOL Ltd.*
[4] *Graduate School of Science, Kyoto University*

The conformational changes and dynamic properties of macromolecules/molecular assemblies, such as plasma membranes, cytoskeletons and organelle are coupled with and important for various cellular functions, such as cellular responses to external signals. However, the conformational changes of molecules and molecular assemblies often take place as rotational movements of lobs, domains or subunits of molecules relative to the other parts. These structural changes alter rather little lateral distances between sites of molecules and their assemblies, but are associated with rather large orientation changes. Thus, to analyze dynamic properties of cellular components, tracking their orientations is often useful. We have constructed microscopes which enable us to observe optically detected magnetic resonance (ODMR) spectroscopy. Then, by combining the ODMR microscope with an assembles of pulsed-magnetic field generator, we could determine the orientations of diamond particles. I will introduce several cell-biological applications in which electros inside nanodiamonds are used as quantum probes.

ダイアモンドの持つNVC（窒素ー空孔中心）は、スピン三重項状態を取る電子ペアを持ちうる。このスピンペアの磁気共鳴シグナルは光検出により、１電子ペアの感度で測定できる。本講演ではこのＮＶＣによる磁気共鳴測定を細胞生物学に適用した例を紹介する。

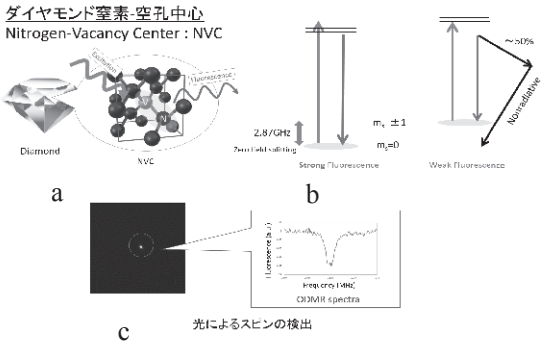


Fig.1

電子スピン，光検出，細胞生物学

○しらかわまさひろ，いがらしりゅうじ，げんじょうたくや，そとましんご，ふじさくたかひろ，てらだだいき，たなべりょうたろう，おおきいずる，よしなりようすけ，とちおひでひと

ダイアモンド結晶中に存在する窒素ー空孔中心センター（NVC:窒素原子と隣り合った結晶空孔）は一電子荷電した状態では(NVC-)、三重項状態（I=1）を取る電子ペアを持つ（Fig.1a）。この三重項スピン状態は、外部磁場が無いときは縮退した m_s=±1 と m_s=0 の間に 2.87 GHz のゼロ磁場分裂を持つ。従って、2.87 GHz のマイクロ波の照射でスピン状態は変化する。この電子ペアは、緑色レーザー光により、電子励起（遷移）され、蛍光を伴って基底状態に戻るが、m_s=±1 と m_s=0 のスピン状態では、励起後の減衰過程の経路が部分的に異なり、発する蛍光強度が異なる。この蛍光強度差から、照射するマイクロ波を掃引することでスピン状態 m_s=±1 と m_s=0 間のスピン遷移に伴う磁気共鳴シグナルが測定される。また、励起された m_s=0 の電子スピンの全てが緩和すると m_s=0 に戻るのに対して、m_s=±1 の電子スピンの約 50%が緩和すると m_s=0 にと変化する（Fig.1b）。従って、電子励起-減衰を数回繰り返すように数μｓのレーザー照射をすると、三重項電子ペアは室温で Boltzmann 分布よりずっと大きく m_s=0 に偏分極する。この偏分極と可視光検出により、NVC-の ODMR は通常の ESR 測定よりも､大幅な感度上昇が期待でき、ナノダイアモンド粒子のもつ一つの NVC-と思われる ODMR スペクトルも測定できた(Fig.1c）。

さて、NVC-の発する蛍光強度がマイクロ波照射に依存することから、バックグラウンドフリーに選択的に、NVC-の蛍光を測定しうる。これと Fluorescence Imaging with One-Nanometer Accuracy (FIONA)の手法を結びつけて、超高分解能の蛍光顕微鏡像が観察できる。一般の顕微鏡では、光の干渉効果から 100 μｍオーダーが分解能限界であるが、上記 NVC-/FIONA 法では推定 10-20 nm の水平分解能の撮像が可能であった。

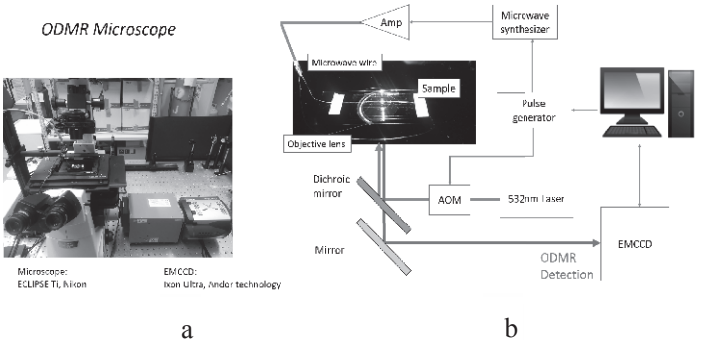


Fig.2

ナノダイアモンド粒子の NVC の ODMR 測定で､さらに面白いのが、方向（角度・回転）計測が可能である点である。ナノダイアモンド粒子に微弱な外部磁場をかけると、共鳴線が分裂する。その分裂幅は、外部磁場ベクトルのゼロ磁場ベクトル方向の射影である(Fig.2)。従って、強度と方向が既知な 4 つの異なる外部磁場をかけたときのピークの分裂幅を測定すると、NVC-のゼロ磁場ベクトル（スピンのｚ軸）の方向を実験室系で完全に決定できるし(Fig.3)、その時間に伴う変化（回転）も正確に観察しうる。即ち分子ジャイロスコープとして利用できる。

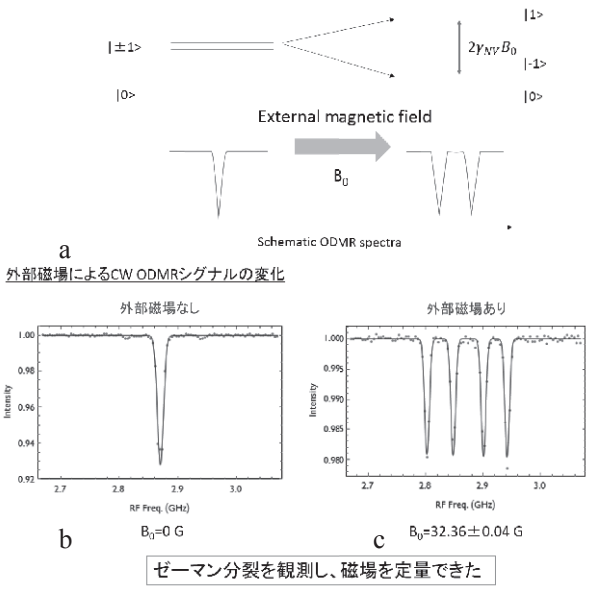


Fig.3

我々は、ナノダイアモンド粒子のプローブとして、生体分子複合体や、それらの細胞内の動きや運動性を計測する手法を開発した。今回はそれらについて講演する予定である。

第2日目
11月15日（水）
英語セッション

Day 2 (Wednesday, 15 November)
(English Sessions)

SL1

Overview of Isotope Labeling Methods for Protein NMR

John L. Markley

Biochemistry Department, University of Wisconsin-Madison, 433 Babcock Drive, Madison, Wisconsin 53706, USA

The most important isotopes in biomolecular NMR are deuterium (^{2}H), ^{13}C, and ^{15}N. Deuterium is a spin S = 1 nucleus, and its major use is in simplifying spectra through removal of ^{1}H signals and sharpening signals by minimizing relaxation and spin diffusion. ^{13}C and ^{15}N are spin S = 1/2 nuclei and are incorporated to provide additional correlation pathways for two- and higher-dimensional data collection. The initial, rather crude, NMR investigations of proteins labeled with these isotopes, demonstrated the power of this approach. Since then, strategies for producing isotopically labeled proteins have evolved in concert with advances in NMR data collection and analysis. The commercial availability of labeled precursor molecules at reasonable cost has been essential for the continued development of isotope-assisted NMR studies. I will survey the various protein production and labeling strategies in current use along with the NMR experiments that exploit these labeling patterns. The choice of a labeling pattern depends on the size of the protein, its oligomeric state, and its dynamic properties. I will also describe software packages that we have been developing designed to streamline assignments and structure determinations of proteins labeled with ^{13}C and ^{15}N.

Stable isotopes, History of isotopes in biomolecular NMR, Labeling strategies, Software for automation

SL2

Isotope Labeling Approaches for Carbohydrates and Glycoprotein

Koichi Kato[1, 2],
[1]*Okazaki Institute for Integrative Bioscience and Institute for Molecular Science, National Institutes of Natural Sciences*
[2]*Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University*

More than half of proteins in nature are modified with carbohydrates, which not only affect the physicochemical properties of proteins, but also govern their biological functions and even their fates. Hence, protein glycosylation is now considered to be one of the most crucial factors in the design and development of biopharmaceuticals currently typified by therapeutic antibodies. Nevertheless, the structural analysis of glycoproteins has been eschewed until recently because of the complexity, heterogeneity, and flexibility of their carbohydrate chains[1]. This aversion may have branded structural biologists as *glycophobics*. In view of this situation, we have been developing a systematic methodology to deal with glycoproteins as targets of structural biology[2].

To reap maximum benefit of NMR approach, we developed stable isotope labeling techniques using the Fc region of immunoglobulin G (IgG-Fc) as model glycoprotein by employing a variety of eukaryotic expression systems, including mammalian cells, transgenic tobacco, and living silkworm (Figure 1)[3-5]. Using uniformly $^{13}C/^{15}N$-labeled IgG-Fc glycoproteins, we established their NMR spectral assignments and probed their glycoform-dependent conformational changes affecting the Fcγ receptor-mediated effector functions.

We also investigated conformational dynamics of a series of tri-antennary high-mannose-type oligosaccharides, which display the glycoprotein-fate determinants recognized by molecular chaperones, cargo receptors, and degradation mediators in cells[6]. We established genetically engineered yeast strains for overexpressing structurally homogeneous high-mannose-type oligosaccharides with metabolic ^{13}C labeling. The isotope-labeled oligosaccharides were chemically tagged with paramagnetic probes as sources of conformational information. We demonstrate that lanthanide-tagging offers a useful tool for experimental validation of dynamic conformational ensembles of oligosaccharides derived from molecular dynamics simulations.

In this presentation, I will outline our stable-isotope-assisted approaches for the structural studies of oligosaccharides and glycoproteins using NMR spectroscopy in conjunction with other biophysical and biochemical techniques.

Oligosaccharide, Stable isotope labeling, Eukaryotic cell

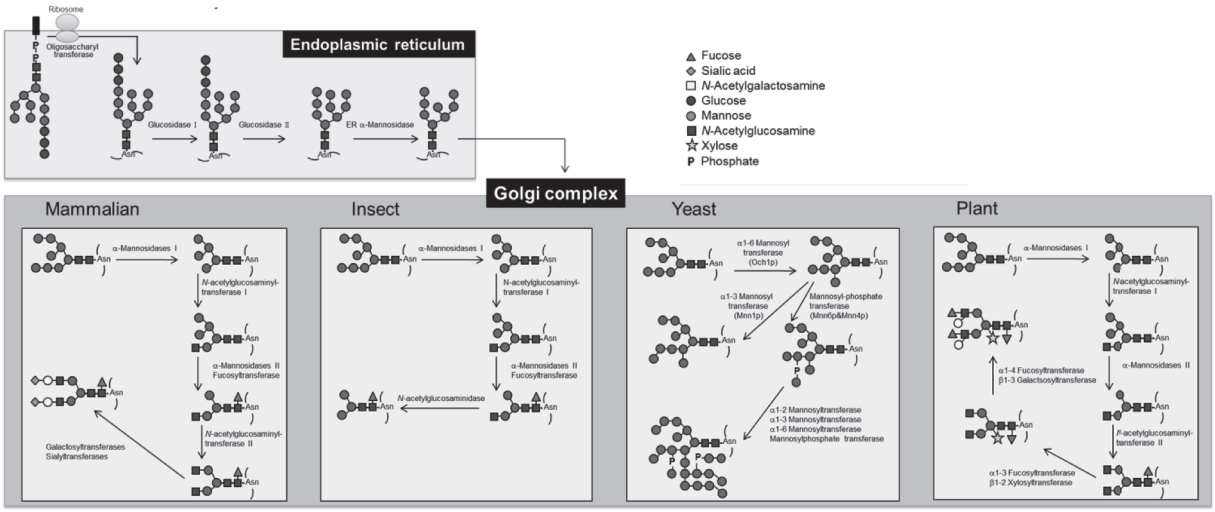


Figure 1 *N*-glycan processing pathways as the basis of glycoform-engineering strategies. Schematic drawing of the *N*-glycan processing pathway in the ER common to mammalian cells, insect, yeast, and plant, and the distinct pathways in the Golgi complex[2].

References

1. Kamiya, Y., Satoh, T. and Kato, K. Recent advances in glycoprotein production for structural biology: toward tailored design of glycoforms, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **26,** 44-53 (2014)
2. Kato, K., Yanaka S. and Yagi, H. Technical Basis for Nuclear Magnetic Resonance Approach for Glycoproteins, *Experimental Approaches of NMR Spectroscopy* (A.Naito, T.Asakura, I.Shimada, K.Tahegoshi and Y.Yamamoto ed.), Springer, in press (2017)
3. Kato, K., Yamaguchi, Y. and Arata, Y. Stable-isotope-assisted NMR approaches to glycoproteins using immunoglobulin G as a model system, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.,* **56,** 346-359 (2010)
4. Kato, K. and Yamaguchi, Y. Glycoproteins and antibodies: Solution NMR studies, *Encyclopedia of Magnetic Resonance* (R.K.Harris and R.E.Wasylishen), John Wiley, **vol .3,** pp.1779-1790 (2012)
5. Yamaguchi, Y., Yagi, H. and Kato, K. Stable isotope labeling of glycoproteins for NMR study, *NMR in Glycoscience and Glycotechnology* (K.Kato and T.Peters ed.), RSC Publishing, pp.194-207 (2017)
6. Kato, K., Yagi, H. and Yamaguchi, T. NMR characterization of the dynamic conformations of oligosaccharides, *Modern Magnetic Resonance*, 2nd Edition, (G.A.Webb *ed.*), Springer, in press (2018)

SL3

安定同位体標識をもちいた定量的運動性解析による多剤耐性転写制御機構の解明

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

Mechanism of multidrug resistance transcriptional regulation revealed by quantitative dynamic analysis using site-specific isotope labeling

○Koh Takeuchi[1] and Ichio Shimada[2]
[1] *Molecular Profiling Research Center for Drug Discovery, National Institute of Advanced Science and Industrial Technology, Tokyo, Japan*
[2] *Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo, Tokyo, Japan*

Multidrug transcriptional repressors (MDTRs) serve as high affinity sensors of multidrug resistance systems, which control the expression of multidrug resistance (MDR) genes, such as transporters. However, the molecular mechanism by which MDTRs concomitantly achieve promiscuous yet high affinity compound binding to regulate the MDR system remains largely unknown. Here, we structurally and dynamically characterized a MDTR, LmrR, by solution NMR. We found that the compound ligation shifts the preexisting and energetically degenerated conformational equilibrium to varying extents to achieve multidrug recognition. Meanwhile, the compound binding enhances ps–ns dynamics in allosteric sites, which entropically contribute for the high-affinity binding. These quantitative dynamic analysis using site-specific isotope labeling revealed that dynamics is the key structural feature for MDTRs to express their function.

The acquisition of multidrug resistance (MDR) by pathogenic bacteria is a major threat in the treatment of infectious diseases. Up-regulation of the expression of multidrug transporters that expel toxic compounds from cells is a commonly-employed strategy by bacteria with MDR ability. The expression of multidrug transporters is regulated by multidrug transcriptional repressors (MDTRs), which promisciously bind multiple toxic compounds. The MDTRs and the transporters often bind to the same drugs, thus, a MDR system can efficiently upregulates the expression of the required multidrug transporters in response to toxic compounds. Similar systems are also well-documented in eukaryotes, especially in human cancers.

In a Gram-positive bacterium, *Lactococcus lactis*, an MDR phenotype is induced by the overexpression of a heterodimeric multidrug transporter, LmrCD. The expression of LmrCD is regulated by MDTR, LmrR. LmrR is a homodimeric protein that belongs to a PadR-like family of MDTRs. LmrR has been shown to bind toxic compounds such as Hoechst 33342 (H33342), daunomycin, ethidium, and rhodamine 6G (Rho6G) with relatively high affinities, playing a major sensory role in thes multidrug resistance system in *L. lactis*.

Our structural and dynamical analyses of LmrR in the *apo* state revealed intensive ps–μs dynamics in the compound-binding site, but not in the hydrophobic core between compound and DNA bidning domains. LmrR adopts multiple α4 helix orientations, which are largely classified into the upper and lower conformations, and each of these conformations should have certain variations in their tilt angles (Fig.1). The upper and lower conformations are associated with *gauche–* and *trans* rotamers in Ile-62 χ2 angle,

Stable isotope labeling, Transcriptional regulator, Dynamics

○たけうち　こう、しまだ　いちお

respectively and the average population and rate of exchange between the upper and lower conformationsshould be quantitatively reflected in the ^{13}C chemical shift and line shape of the Ile-62 δ1 resonance.

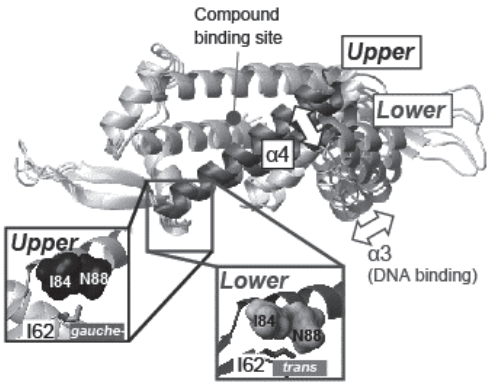


Fig. 1. Different orientations of the α4 helix and the rotameric state of Ile-62 sidechain.

In the *apo* state, the upper and lower conformations are almost equally distributed, indicating that those conformers on average are energetically degenerate. Since an energetically degenerate system is the most sensitive to a perturbation that shifts the conformational equilibrium, *apo* LmrR appears to be optimally suited for sensing and responding to a variety of compounds. Judging from a broader ^{13}C line width in the Ile-62 δ1 signal, there should be a small but appreciable barrier between the upper and lower α4 helix conformations. Considering the facts that ^{15}N R_2 was insensitive in CPMG experiments up to 1 kHz and that the Ile-62 δ1 gives a single line of resonance, the exchange rate between the conformations should be faster than 10^3 s^{-1} and the apparent activation energy would be smaller than 13 kcal mol^{-1}.

The compound binding shifts the conformational ensemble of the α4 helix observed in *apo* LmrR to a higher proportion of the upper conformers, but to a different extent for each compound. The ps–μs dynamics in the LmrR compound-binding site is not fully suppressed upon compound binding. Thus, the loss of protein conformational entropy at the binding interface, which typically accompanies complex formation, was limited in the LmrR-compound interactions.

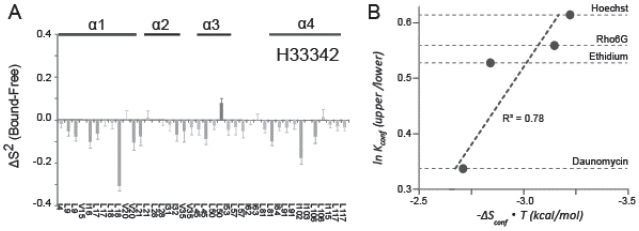


Fig. 2. (A) Enhancement of ps-ns dynamics upon H33342 binding. (B) Correlation between changes in the α4 helix conformational equilibrium and the ps–ns dynamics.

Interestingly, the compound binding enhanced the ps–ns dynamics in the sites that are allosteric to the compound-binding interface (Fig. 2A). The redistribution of the ps–ns dynamics would entropically favor the interactions between LmrR and the compounds by −0.5 to −1.5 kcal/mol, which increases the binding affinity by 2- to 13-fold. The change in the degree of the changes in conformational equiliblium correlated with enhancement of the ps–ns dynamics in the allosteric site (Fig. 2B). This might be due to the non-ideal packing between the α4 helix and the DNA binding domains. Since LmrR is a sensory molecule that detects various toxic compounds, the high affinities toward the compounds are prerequisite to its function. In this sense, LmrR represents an elaborate system that is compatible with both high-affinity binding and multidrug recognition, via the redistribution of the ps−ns motions upon compound ligation.

References

(1) Takeuchi K, Tokunaga Y, Imai M, Takahashi H, Shimada I. Dynamic multidrug recognition by multidrug transcriptional repressor LmrR. *Sci Rep*, **4**, 6922, (2014).

(2) Takeuchi K, Imai M, Shimada I. Dynamic equilibrium on DNA defines transcriptional regulation of a multidrug binding transcriptional repressor, LmrR. *Sci Rep*. **7**, 267, (2017).

SL4

Relaxation optimization using isotope labeling for studying larger proteins by NMR

○Yohei Miyanoiri[1,2], Mitsuhiro Takeda[2,3], Tsutomu Terauchi[4,5], Masatsune Kainosho[2,4]

1: *Institute for Protein Research, Osaka University*, 2: *Structural Biology Research Center, Graduate School of Science, Nagoya University,* 3: *Faculty of Life Science, Kumamoto University,* 4: *Graduate School of Science and Engineering, Tokyo Metropolitan University*, 5: *SAIL Technologies, Inc*

Through continued efforts to improve the SAIL method for obtaining detailed structural and dynamic information of larger proteins and protein complexes by NMR spectroscopy, we have succeeded in observing virtually any type of ^{13}CH side-chain moiety by using proteins labeled with SAIL amino acid(s), possessing improved transverse relaxation optimized isotope-labeling patterns. The relaxation optimized SAIL method was successfully applied to the 82 kDa malate synthase G (MSG) to observe the ^{13}CHs of aromatic rings and aliphatic methylene groups. We also developed cost effective *E. coli* cellular expression systems, which are especially useful for the residue- and stereo-specific methyl labeling of Ile, Leu and Val residues, using stereo-specifically methyl labeled amino acids, thus allowing us to obtain unambiguous intra- and inter-residue NOE signals with the highest sensitivities. Further applications of the RO-SAIL method for extremely large protein complexes, such as GroEL-GroES (~900 kDa), will be discussed.

Over the past several years, we have been trying to improve the SAIL method for large proteins to observe the ^{13}CH signals of aromatic amino acid residues; *i.e.*, Trp, Phe, Tyr and His, which are often found in the hydrophobic cores and/or ligand recognition sites of proteins. Therefore, these NMR signals would provide crucial structural and dynamic information for the protein-protein and protein-ligand interactions. Initially, we used the original type of SAIL aromatic amino acids and succeeded in obtaining biologically relevant structural information of proteins with molecular weights up to 40 kDa [1-4]. For example, we could quantitatively analyze the aromatic ring flipping motions for the FKBP12-drug complexes, leading to new insights into the large-amplitude dynamics in protein-ligand interaction surfaces [5]. Although the original SAIL amino acids are quite useful for medium size proteins, further optimization was needed to obtain the desired structural information of larger proteins and their complexes. To this goal, we introduced transverse relaxation optimized SAIL (RO-SAIL) amino acids with improved isotope labeling patterns, to remove the ^{13}C-^{13}C scalar and dipole couplings and reduce the remote dipolar interactions between ^{1}H and ^{13}C in the original SAIL amino acids. As illustrated in Fig. 1, using fully deuterated malate synthase G (MSG) labeled with the RO-SAIL Trp (Fig. 1a), we could observe extremely narrow aromatic ring ^{13}CH cross peaks for all of the 12 Trp residues in MSG by 2D TROSY HSQC (Fig. 1b). We could also observe the $^{13}C_{\beta}H_{\beta2}$ signals by 2D HSQC, since the transverse relaxation times of $^{13}C_{\beta}$ and $^{1}H_{\beta2}$ are substantially extended, as compared with those of the original SAIL Trp (Fig. 1c). All of the aromatic ^{13}CH signals were unambiguously assigned, mostly by extensive site-directed mutagenesis. The observed aliphatic $^{13}C_{\beta}$ chemical shifts completely agreed with the values reported by Tugarinov *et al.*[6], therefore, the sequence-specific and stereo-specific assignments of the H_{β} signals are also established, even

SAIL法，高分子量蛋白質，超高磁場NMR装置

○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

for this large protein. Furthermore, the combination of RO-SAIL and differential methyl labeling methods [7,8] allows unambiguous assignments for the inter-residue NOEs among the methyl, methylene and aromatic groups, thus providing unprecedented opportunities for the precise structure determinations of large proteins. Using the unmatched high signal sensitivity of the aromatic and aliphatic ^{13}CH signals achieved by the RO-SAIL methods, we are expecting to obtain precise structural and dynamic information to clarify the structure-function relationships of biologically important proteins.

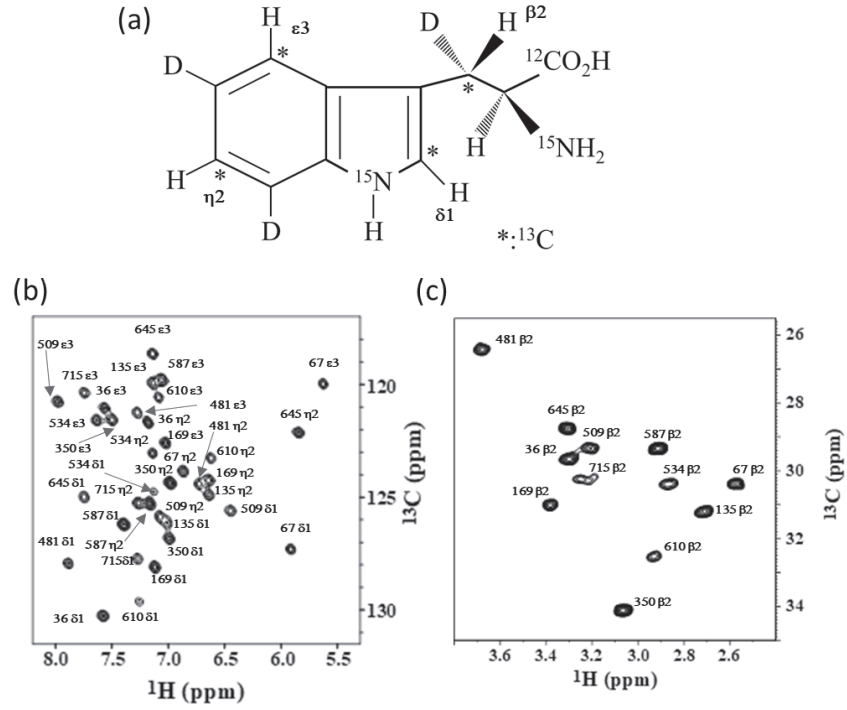


Figure 1. Application of relaxation optimized SAIL aromatic amino acids as illustrated for the 12 Trp residues in the 82kDa MSG . (a) **Structure of RO-SAIL Trp; (b) 2D CH TROSY HSQC spectrum of the aromatic region ; (c) 2D HSQC of the aliphatic region.**

We have tried to apply the RO-SAIL method to even larger protein particles, such as the ~900 kDa GroEL-GroES complex, and succeeded in observing some of the aromatic and aliphatic CH resonances. However, it became obvious that further elaboration in the isotope-labeling approach will be absolutely necessary to perform extensive analyses of the structures and dynamics of such massive systems. In this presentation, we will also discuss future perspectives of the isotope-labeling methods.

References

[1] M. Kainosho, *et al.*, (2006), *Nature* **440**, 52-56; [2] T. Torizawa, *et al.* (2005), *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 12620-12626; [3] M. Takeda, *et al.* (2010), *J. Biomol. NMR* **46**, 45-49; [4] Y. Miyanoiri, *et al.* (2011), *J. Biomol. NMR* **51**, 425-435; [5] C.J. Yang, *et al.* (2015), *Biochemistry* **54**, 6983-6995; [6] V. Tugarinov, *et al.* (2002), *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 10025-10035; [7] Y. Miyanoiri, *et al.* (2013), *J. Biomol. NMR* **57**, 237-249; [8] 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 the Japan Agency for Medical Research and Development (AMED), a JSPS KAKENHI Grant-in-Aid for Scientific Research (C), and a Grant-in-Aid for Scientific Research on Innovative Areas.

SL5

安定同位体標識法の応用による、蛋白質の動的構造の解明

○上田　卓見[1]，嶋田　一夫[1]
1東京大学・大学院薬学系研究科

Application of Isotope-Labeling Methods for Studying Protein Dynamics

○Takumi Ueda[1], Ichio Shimada[1]
[1] *Division of Physical Chemistry, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo*

In P2X receptors, a cation-selective pore in the transmembrane region expands upon ATP binding to the extracellular ATP-binding site, and the currents evoked by α,β-methylene ATP are lower than those evoked by ATP. However, the mechanism underlying the partial activation of the P2X receptors is unknown. Here, we observed the NMR signals from M339 and M351, which were introduced in the transmembrane region, and endogenous alanine and methionine residues of zebrafish $P2X_4$ receptor in the apo, ATP-bound, and α,β-methylene ATP-bound states. Our NMR analyses revealed that, in the α,β-methylene ATP-bound state, M339, M351, and the residues that connect the ATP-binding site and the transmembrane region, M325 and A330, exist in conformational equilibrium between closed and open conformations with slower exchange rates than the chemical shift difference (< 100 s^{-1}), suggesting that the small population of the open conformation causes the partial activation in this state.

P2X受容体は、細胞外のATPにより開口して、各種陽イオンを透過する、リガンド依存型イオンチャネルであり、感覚受容や炎症反応の制御、血管収縮等の生理機能を制御する。ATPの α 位と β 位のリン酸をつなぐ酸素原子がメチレン基に置換された、α,β–メチレンATPは、$P2X_4$受容体およびその他のP2X受容体をATPより弱く、部分的に活性化することが知られている。このようなP2X受容体の部分作動薬は、副作用の少ない治療薬となることが期待される。

ゼブラフィッシュ由来$P2X_4$受容体 (以下単に$P2X_4$受容体と記述する。) の結晶構造が、アポ状態およびATP存在下で解かれている。ATP存在下の結晶構造では、ATPは細胞外領域に結合していて、膜貫通領域に近い領域が約10 Å拡大しており、膜貫通領域にポアが形成されている。しかし、閉構造と開構造のスナップショットだけでは、P2X受容体が部分的に活性化することを説明することはできない。そこで本研究では、α,β–メチレンATP結合状態の$P2X_4$受容体の動的構造平衡を明らかにして、P2X受容体が部分的に活性化される機構を解明することを目的とした[1]。

$P2X_4$を昆虫細胞に発現させて、界面活性剤DDMで可溶化して、精製した上で、再構成高密度リポ蛋白質 (rHDL) の脂質二重膜に再構成した。その結果、リガンド結合活性を保持した$P2X_4$-rHDLが培地1 L あたり0.05 mgの収量で得られた。ゲルろ過クロマトグラフィーの溶出体積がrHDLのストークス径と対応したこと、およびSDS-PAGEにおけるMSPと$P2X_4$のバンドの強度比がモル比として2:3であったことから、3量体の$P2X_4$がrHDLに再構成されたことが示された。

部分重水素化とメチオニン^{13}C標識を両方施した$P2X_4$-rHDLのNMRスペクトルをapo状態およびATP結合状態の両状態で取得した結果、$P2X_4$のメチオニン残基数 (5個, Fig.1) とおよそ対応する数のシグナルが観測された。各メチオニン残基の変異体のスペクトルと比較することで、

昆虫細胞発現系，アラニン選択標識，ナノディスク

○うえだたくみ，しまだいちお

全ての残基のシグナルを帰属した。また、昆虫細胞発現系において、重水素化とアラニン選択標識を両方行う手法を新規に開発した上で、ATPが結合する細胞外領域とポアを形成する膜貫通領域を繋ぐ位置に存在するA330 (Fig. 1) のシグナルの観測および帰属を行った (Fig. 2)。さらに、膜貫通領域の動的構造平衡を調べるために、膜貫通領域に位置するL339およびL351 (Fig. 1) にメチオニン残基を導入した変異体のスペクトルを取得して、M339、M351のNMRシグナルの観測および帰属を行った (Fig. 2) 。

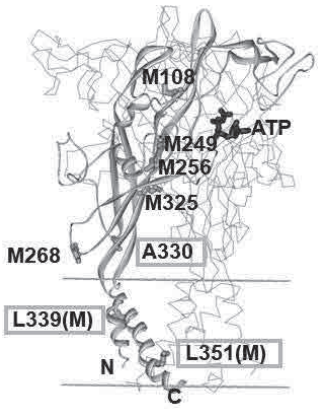


Fig. 1. Distribution of the methionine residues and A330.

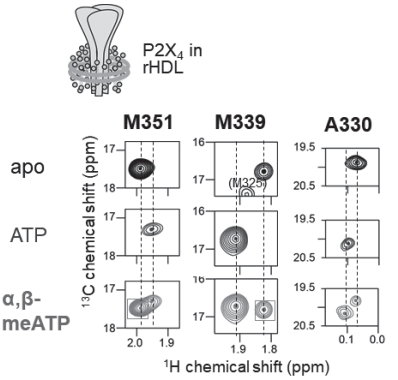


Fig. 2. ^{1}H-^{13}C HMQC spectra of $P2X_4$ in rHDL.

次に、α,β–メチレンATP結合状態における、上記の残基に由来するNMRシグナルを観測した。その結果、膜貫通領域に導入したM351とM339、ならびにlower bodyの膜側に位置するA330とM325のシグナルが二つ観測され、一方はアポ状態と、もう一方はATP結合状態と化学シフトが同じであった (Fig. 2)。また、温度を上昇させた結果、ATP結合状態と化学シフトが同じシグナルの相対強度が可逆的に増大した。したがって、膜貫通領域およびリガンド結合部位と膜貫通領域を繋ぐ領域が、閉じた状態と開いた状態の間を化学シフト差よりも遅いタイムスケール (< 100 /s) で交換していることが示された (Fig. 3)。

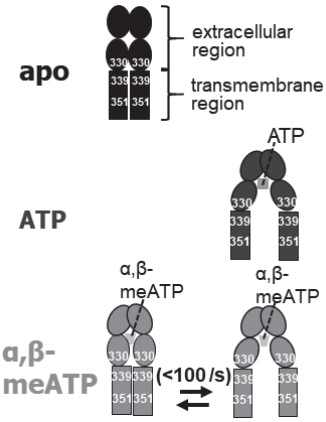


Fig. 3. Mechanism for the partial activation of $P2X_4$ bound to a partial agonist α,β-meATP.

NMRスペクトルから示唆される、α,β–メチレンATP結合状態においてP2X4が開構造を取る割合は、電気生理実験において、P2X4に α,β–メチレンATPが作用した時に観測された電流の相対的な大きさ (Fig. 4) と良く対応していた。したがって、α,β-メチレンATP結合状態において、開構造をとるP2X4受容体が少量存在することにより、部分的に活性化されることが示された。

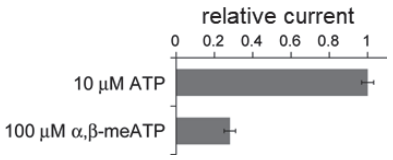


Fig. 4. Relative currents evoked by ATP and α,β-meATP.

また、DDMミセル中の α,β–メチレンATP結合状態のP2X4では、A330およびL339のNMRシグナルは、rHDL中とは異なり、ATP結合状態のシグナルとほぼ同一であった。DDMミセル中の構造平衡では、α,β–メチレンATP結合状態における、部分的な活性化を説明できない。したがって、P2X4においても、活性を決定する構造平衡は、膜環境の影響を大きく受けると結論した。

References

(1) Minato Y., Suzuki S., Hara T., Kofuku Y., Kasuya G., Fujiwara Y., Igarashi S., Suzuki E., Nureki O., Hattori M., Ueda T., and Shimada.I. (2016) Conductance of $P2X_4$ purinergic receptor is determined by conformational equilibrium in the transmembrane region. *Proc. Natl. Acad. Sci. 113*,4741-4746

SL6

Concluding Remarks: Isotope-Labeling Methods-*past and future*

Masatsune Kainosho[1,2]
[1]*Graduate School of Science and Technology, Tokyo Metropolitan University, 1-1 Minami-ohsawa, Hachioji, 192-0397 Tokyo, Japan.*
[2]*Structural Biology Research Center, Nagoya University, Furo-cho, Chikusa-ku, 464-8602 Nagoya, Japan.*

During the past half-century, various isotope-labeling techniques have significantly contributed to the development of NMR research of biological macromolecules. I was asked by Prof. Ito, the main organizer of the symposium, to hold a topical session from the viewpoint of the long-term contributions by Japanese scientists to this field. In the beginning of the session, Prof. Markley will provide an overview of the isotope-labeling methods for protein NMR, including a recollection of the early days of the method, and then Prof. Kato will describe the current status of isotope-aided methods for carbohydrates and glycoproteins. Following these two keynote lectures, three active scientists in this field will present their latest accomplishments.

Meanwhile, the major role of NMR spectroscopy in structural biology has been gradually shifting from structure determination to characterization of dynamics with various time-scales of biologically interesting targets, such as membrane proteins and large protein complexes, for which the three-dimensional structures are often determined by alternate methods, such as X-ray crystallography or cryo-electron microscopy. Even though the structures are known, the dynamic aspects of the protein-protein and protein-ligand interactions, which are closely related to their biological functions, can only be efficiently studied by NMR spectroscopy using proteins residue-selectively labeled with amino acids bearing optimized labeling patterns, such as SAIL amino acids (1, 2). It is my greatest pleasure to reconfirm, through the lectures by the three active younger scientists, that the NMR community of Japan is still contributing remarkably to the advancement of this crucial technology.

If time permits, I will briefly share my personal perspective on isotope-aided biological NMR spectroscopy, in the coming era, featuring ultrahigh-field spectrometers beyond 1 GHz.

(1) Masatsune Kainosho, Mitsuhiro Takeda, Yohei Miyanoiri (2017) Isotope-Aided Methods for Biological NMR Spectroscopy-*Past, Present, and Future*. In: *Experimental Approaches of NMR Spectroscopy – Methodology and Application to Life Science and Material Science*, Springer-Nature, *in press*.

(2) Yohei Miyanoiri, Mitsuhiro Takeda, Masatsune Kainosho (2017) Stable-isotope-aided NMR Spectroscopy. In: *Modern Magnetic Resonance, 2nd Ed.* Springer-Nature, *in press*.

Isotope-aided NMR method, SAIL method, Protein NMR

L3-1

Sulfur-33 NMR of Organic Solids II

○Kazuhiko Yamada

Interdisciplinary Science Unit, Multidisciplinary Sciences Cluster, Research and Education Faculty, Kochi University, Oko Campus, Nankoku city, Kochi 783-8505, Japan

Experimental and theoretical aspects of solid-state ^{33}S nuclear magnetic resonance (NMR) in organosulfur compounds and ones forming covalent bonds, by using variable superconducting magnets, are presented. Solid-state ^{33}S NMR experiments of stepwise-field-swept types and frequency-swept types in lower magnetic fields were carried out to obtain ^{33}S NMR parameters including quadrupole coupling constants (C_Q value) more than 30 MHz. For spectral simulations, the direct diagonalization method, in which the combined Zeeman and quadrupole Hamiltonian is numerically calculated to obtain probabilities for each transition, were applied to the experimental NMR spectra to accurately extract ^{33}S NMR parameters. It is found that such ^{33}S NMR parameters are highly sensitive to the local molecular structures, which suggests that solid-state ^{33}S NMR is useful for understanding of cross-linked structures in a rubber.

Sulfur plays important roles in a variety of research fields in chemistry. For example, organosulfur compounds are essential for biological activities. Sulfur-containing methionine and cysteine are two of the twenty common amino acids in the human body. In another example, the physical properties of a rubber, which supports current automobile society, depend on cross-linked structures with sulfur atoms, although they have not been completely understood yet despite their importance.

Sulfur has one NMR active nucleus, that is, ^{33}S (I = 3/2, natural abundance = 0.75%, $\gamma = 2.055 \times 10^7$ rad $T^{-1}s^{-1}$, $Q = -5.5 \times 10^{26}$ m^{-2}). There have been a large number of literatures on solid-state ^{33}S NMR of inorganic compounds, while very little research concerning organosulfur compounds, biological molecules, and polymers. This is because the formation of covalent bonds has made the quadrupolar interactions drastically increase, compared to the cases of inorganic compounds where the molecular symmetry is commonly high. There have traditionally been two NMR techniques to observe NMR spectra broadened by large quadrupolar interactions, namely, frequency-swept NMR and field-swept NMR. Apparently, the former is very frequently applied in the research fields of chemistry and biochemistry. On the other hand, the latter is generally applied to research fields not in chemistry but in physics. This may be because variable field superconducting magnets are not commonly distributed and used in chemistry. In this presentation, stepwise-field-swept NMR, in which FID signals can be accumulated with a static magnetic field, and frequency-swept NMR in lower magnetic fields, in which narrower spectral width is found by taking advantages of a variable superconducting magnet, are presented for ^{33}S NMR of organosulfur compounds and ones forming covalent bonds as an alternative method with chemical applications in mind. Spectral simulations for field-swept types and cases of lower magnetic fields, where the standard perturbation theory is no longer valid, are also described.

Sulfur NMR, Organosulfur compounds, rubber, Cross linked structure

○ やまだ　かずひこ

Figure 1 shows solid-state ^{33}S zero-field NMR spectrum of [^{33}S]-S-4-phenyl 4-toluenethiosulfonate, observed at 100 K. Unfortunately, it is theoretically impossible to obtain NMR parameters such as C_Q values and the asymmetry parameter, η_Q, by analyzing the zero-field NMR spectrum alone since the nuclear spin number is 3/2. In this work, two experimental approaches were applied; (1) stepwise-field-swept NMR experiments in which high-digital resolution is achieved in contrast to the conventional field-swept NMR, indicating the possibilities of application of current solid-state NMR techniques such as MAS methods, multi-pulse and multi-dimensional NMR experiments, etc., and (2) the application of frequency-swept NMR in lower magnetic field in which the spectral width broadened by larger quadruo[polar interactions has restrained less than a few megahertz-order by varying the external magnetic fields.

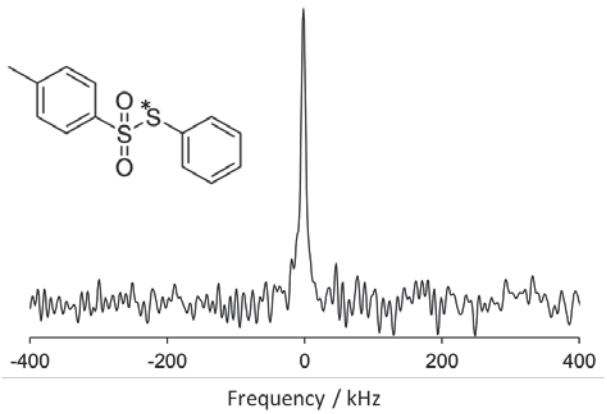


Figure 1 solid-state ^{33}S zero-field NMR spectrum of [^{33}S]-S-4-phenyl 4-toluenethiosulfonate, observed at 100 K

Figure 2 shows the dependence of calculated field-swept solid-state NMR spectra of I = 3/2 on η_Q, and η_Q was varied from 0 to 0.4 to 0.8 to 1.0. These calculations were carried out on the basis of the direct diagonalization method. A complicated line shape could be observed in a similar manner to a conventional NMR spectrum measured with a static magnetic field, or calculated line shapes based on the perturbation theory. The line shapes of field-swept types totally depend on η_Q, and the spectral width of the spectrum, that is, the range of magnetic fields, tends to increase with increasing C_Q values. A true spectral analysis promises to yield NMR parameters of quadrupolar interactions as well as those of chemical shift interactions, dipole-dipole interactions, and even indirect spin-spin interactions, if high digital-resolution NMR spectra can be realized.

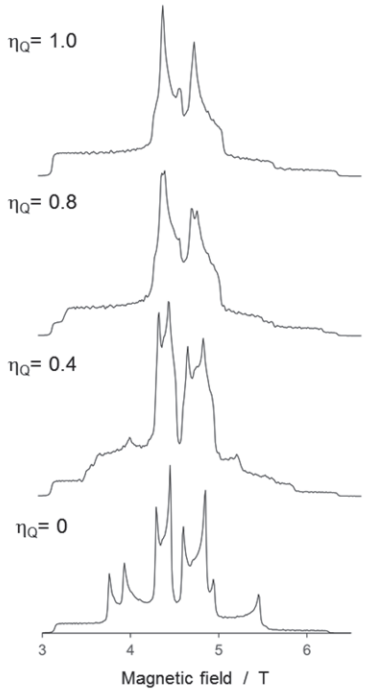


Figure 2 Dependence of calculated field-swept solids-state NMR spectra of I =3/2 on η_Q. η_Q was varied from 0 to 1.0.

Finally, I discuss the meaning of the newly obtained ^{33}S NMR parameters of compounds forming covalent bonds since there have been very few literatures on these NMR parameters, and I believe that solid-state ^{33}S NMR is one of the best methods to uncover the cross-linked structure in a rubber.

This work was financially supported by SENTAN Program of Japan Science and Technology Agency in collaboration with the University of Tokyo, Kyoto University, Waseda University, Yamagata University, and RIKEN.

L3-2

感度1000倍の固体NMR –16.4T, 30KでのDNP–

○松木　陽[1]，中村新治[2]，福居滋夫[3]，出原敏孝[4]，神田泰治[1], 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

Over 1000-Times More Sensitive MAS NMR –DNP at 16.4 T and 30K –

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

[1]Institute for Protein Research, Osaka University, Japan, [2]JEOL RESONANCE Inc., Japan, [3]Cryovac Corp., Japan, [4]Research Center for Development of Far-Infrared Region, University of Fukui, Japan, [5]Bridge12 Technologies Inc., MA, USA

Sensitivity enhancement of MAS NMR 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 overcome this issue, we have been developing a helium-temperature MAS DNP probe system, an advanced submillimeter wave irradiation system and novel polarizing agents based on the transition metal ion complexes. Last year, the efforts resulted in the total sensitivity gain $\varepsilon^{T}(=\varepsilon^{DNP}*\varepsilon^{Curie})$ of about 300 at B_0=16.4 T, T = 48 K and ν_R = 6 kHz. This year, we have extended our system in various ways, and achieved $\varepsilon^{T}>$ 1300 at T = 35 K and ν_R = 4 kHz, establishing a way to highly efficient high-field MAS DNP. This gain greatly exceeds the record-high ε^{T} of ~180 reported by an MIT group in 2012 for the same field condition. In the presentation, we will overview our recent developments, and some new possibilities opened up with the highly polarized nuclear spin.

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、極低温MAS DNPプローブの開発、先進的なサブミリ波照射法の開発、新規分極剤の開発を含む、多角的なアプローチで取り組んできた。この結果、DNPによる信号増強(ε^{DNP})と試料冷却によるキュリー磁化の増大率(ε^{Curie})をあわせた総合感度利得$\varepsilon^{T}(=\varepsilon^{DNP}*\varepsilon^{Curie})$は昨年度、外部磁場$B_0$=16.4 T(^{1}H周波数で700MHz)の条件で約300倍に達した。本年は、下記に詳述するようにこの装置をさらに発展させ、ε^{T}>1300倍を達成するに至った(Fig. 1)。本発表では、最近の装置改良と分極剤開発の進捗を最新のDNPデータと合わせて報告する。

Dynamic Nuclear Polarization (DNP), Magic-Angle Spinning NMR, Sensitivity Enhancement, High-Field Condition

○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，かんだたいじ，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

A. 装置の改良

より低温のDNP測定を可能にしてスピン(n and e^-)の緩和を抑えれば、高磁場におけるDNP効率を大きく向上できると考えられる。これは膜蛋白質などメチル基を多く含む試料系では特に重要である。我々は2015年、極低温ヘリウムで試料冷却と回転を行う完全閉回路He-MAS DNPプローブシステムを開発、測定条件の長期安定度と経済性を飛躍的に向上させた[1]。本年はより低温、より高速の試料回転を、繰り返し安定的に実現する事を目指し、次の改良を加え装置をさらに発展させた。(1)ガス漏れを抑えるMASモジュールの新設計、(2)より高速のジェットを実現するドライブガスノズルの改良、(3)サブミリ波の損失を抑えるプローブ内光伝送系の改良、(4)「低温でも抜けない」試料管キャップの開発である。「抜けない」キャップはDNP応用測定のスループットを格段に向上させた。

真空管発振器であるジャイロトロンの出力と周波数の長期安定性は元々それほど高くなく、DNP法を長時間に渡る精密なNMR測定に応用するには、発振の安定化技術は重要課題の一つである[2]。昨年はサブミリ波周波数の帰還制御システムを作成したが、本年は出力の安定化も同時に行えるシステムに拡張した。具体的には常時観測下にある検出ダイオード信号をPID制御の上、変調陰極の電圧に帰還し、電子のサイクロトロン軌道の垂直運動成分を自動制御できるようにした。

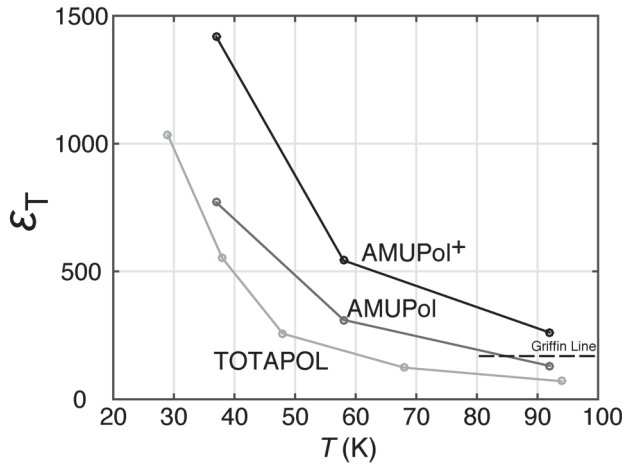


Fig. 1 Total sensitivity gain ε^T in function of the sample temperature. ε^T is defined as $\varepsilon^T=\varepsilon^{DNP}*\varepsilon^{Curie}$, where $\varepsilon^{Curie} \sim 300/T$. Data were taken for the polarizing agents TOTAPOL and AMUPol at B_0 = 16.4 T and ν_R = 6 kHz, except for T <40 K data, for which ν_R was 4 kHz. Data labeled with "AMUPol+" were recorded with a factor of ~2 higher submillimeter wave power at the sample. The sample was ^{13}C-urea and 20 mM polarizing agent in d_8-glycerol/D_2O/H_2O =6.5/2.5/1 matrix. The closed-cycle He MAS system was used. The dashed line indicates the record-high ε^T reported in 2012 under the same external field condition at T = 80—100 K.

B. 分極剤の開発

高磁場条件では細いEPR信号を持つ分極剤の利用がより有利と考えられる。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から極低温-高磁場条件に適した新規分極剤として大きな可能性を持っている。昨年に引き続きMn^{2+}錯体ベースの分極剤：Mn^{2+}DOTAと、Mn^{2+}錯体とニトロキソラジカルから成るMn^{2+}-TEMPOバイラジカルの合成と精製を進めた。上記の通り、サブミリ波の発振周波数を自在かつ安定に制御できるようになり、Mn錯体を用いたDNP測定も可能になってきた。

発表では、「1000倍強いスピン分極」が拓く新しい可能性についても触れる。

[文献]

[1] Y. Matsuki et al., *J. Magn. Reson.* **2015**, 259, 76-86. [Open Access]

[2] Y. Matsuki et al., *JMR* **2016**, 264, 107-111.

[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。

L3-3

Exploring the salt–cocrystal continuum with solid-state NMR using natural-abundance samples: implications for crystal engineering [1]

Lalit Rajput[1], Manas Banik[1], Jayasubba Reddy Yarava[2], Sumy Joseph[1], Manoj Kumar Pandey[2,3,4], ○Yusuke Nishiyama*[2,3], Gautam R. Desiraju*[1]

[1]*Solid State and Structural Chemistry Unit, Indian Institute of Science, Bangalore, 560 012, India*

[2]*RIKEN CLST–JEOL Collaboration Center, RIKEN, Yokohama, Kanagawa 230-0045, Japan*

[3]*JEOL RESONANCE Inc., Musashino, Akishima, Tokyo 196-8558, Japan,*

[4]*Department of Chemistry, Indian Institute of Technology Ropar, Rupnagar, India.*

There has been significant recent interest in differentiating multi-component solid forms, such as salts and cocrystals, and, where appropriate, in determining the position of the proton in the X—H…A—Y X^-…H—A^+—Y continuum in these systems (Figure 1), owing to the direct relationship of this property to the clinical, regulatory and legal requirements for an active pharmaceutical ingredient (API). The fundamental difference in these forms arises from the hydrogen positions. While X-ray diffraction is widely used for structural determination, it is very challenging task to determine hydrogen positions to distinguish salt/cocrystal/continuum. On the other hand, solid-state NMR (ssNMR) gives direct measure of internuclear distances and is in principle suitable to tackle this issue. However, there are still several road blocks to apply natural abundance samples; a) low abundance of ^{15}N (0.4%), b) very long ^{1}H T_1 relaxation time in most pharmaceutical compounds, and c) presence of intense ^{1}H-^{1}H dipolar interactions.

In the present study, four model compounds in a series of prototypical salt/cocrystal/continuum systems exhibiting {PyN…H—O—}/{PyN^+—H…O^-} hydrogen bonds (Py is pyridine) with naturally abundant ^{15}N nuclei were prepared (Figure 2) and investigated by ssNMR. The whole crystal structures were determined at both low and room temperature using X-ray diffraction. The hydrogen atom positions were determined by measuring the ^{15}N—^{1}H distances through ^{15}N-^{1}H dipolar interactions. To overcome the difficulty mentioned above, we utilize high-field (700 MHz) ssNMR at ultrafast (ν_r = 60–70 kHz) magic angle spinning (MAS). The ultrafast MAS suppresses the ^{1}H-^{1}H dipolar interactions enabling ^{1}H inverse detection to improve sensitivity [2]. The sensitivity is further improved by the high magnetic field. The radio frequency driven dipolar recoupling (RFDR) schemes were employed during repetition delay to enhance the spin diffusion [3], thus reducing the optimal repetition delay. The ^{1}H-^{15}N dipolar interactions were measured using two-dimensional inversely proton-detected cross polarization with variable contact-time (invCPVC) ^{1}H→^{15}N→^{1}H experiments [4]. It is observed that this method is sensitive enough to determine the proton position even in a continuum where an ambiguity of terminology for the solid form often arises (Figure 3). This work, while carried out on simple systems, has implications in the pharmaceutical industry where the salt/cocrystal/continuum condition of APIs is considered seriously.

塩, 共結晶, 水素結合

ラジプット, ラリット; バニック, マナス; ヤラバ　ジャヤスッバレディー; ジョセフ, サミー; パンディ, マノジクマール; ○ニシヤマ, ユウスケ; デジラジュ, ゴータム

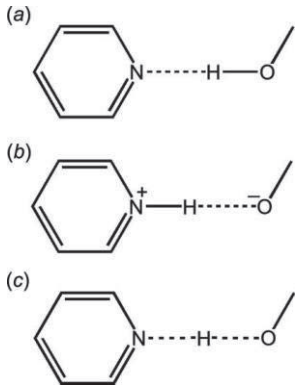


Fig. 2. Schematic presentation of (a) a cocrystal, (b) a salt and (c) a continuum (where the H-atom position is shared between the two heavy atoms) in a typical O…H…N interaction.

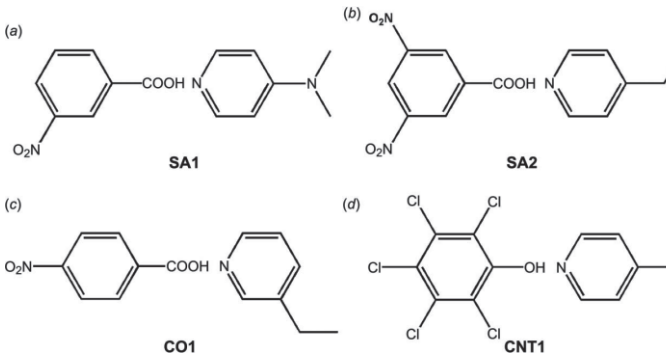


Fig. 2. Schematic representation of the compounds used in the present study, showing (a) SA1 (3-nitrobenzoic acid and N,N-dimethypyridin-4-amine), (b) SA2 (3,5-dinitrobenzoic acid and 4-ethylpyridine), (c) CO1 (4-nitrobenzoic acid and 3-ethylpyridine) and (d) CNT1 (pentachlorophenol and 4-methylpyridine).

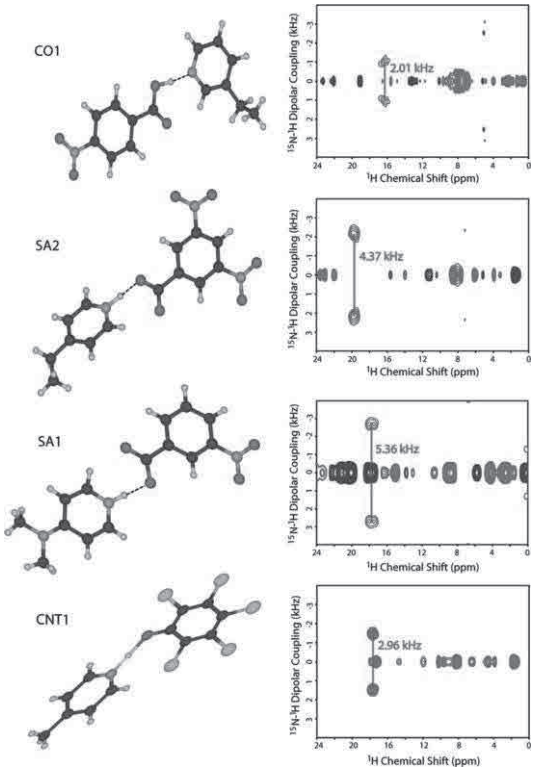


Fig. 3. The molecular structures and the two-dimensional invCP-VC spectra (^{15}N-^{1}H dipolar couplings versus ^{1}H chemical shift) of SA1, SA2, CO1 and CNT1.

References

[1] L. Rajput†, M. Banik†, J.R. Yarava, S. Joseph, M.K. Pandey, Y. Nishiyama* and G.R. Desirajua*, Exploring the salt-cocrystal continuum with solid-state NMR using natural abundance samples: implications for crystal engineering, IUCrJ 4 (2017) 466-475.

[2] Y. Nishiyama*, Fast Magic-Angle Sample Spinning Solid-State NMR at 60-100 kHz for Natural Abundance Samples, Solid State Nuclear Magnetic Resonance, 78 (2016) 24-36.

[3] Y.-Q. Ye, M. Malon, C. Martineau, F. Taulelle, Y. Nishiyama*, Rapid measurement of multidimensional 1H solid-state NMR Spectra at ultra-fast MAS frequencies, J. Magn. Reson. 239 (2014) 75-80.

[4] Y. Nishiyama*, M. Malon, M.J. Potrzebowski, P. Paluch, J.P. Amoureux*, Accurate NMR determination of C–H or N–H distances for unlabeled molecules, Solid State Nucl. Magn. Reson. 73 (2016) 15-21.

L4-1

固体NMRによるpH及びアルカリ金属イオンに対するKR2の構造変化の解析

○重田安里寿[1]・金子莉奈[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 change of Na^+ pumping *Krokinobacter* rhodopsin 2 induced by pH and alkali metal ions by solid-state NMR

○Arisu Shigeta[1], Rina Kaneko[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*

Sodium ion pumping *Krokinobacter* rhodopsin 2 (KR2) is one of the unique example to understand the mechanism and structure correlation. Firstly, the crystallography revealed the unique movement of counterion at retinal-binding pocket. Secondly, existence of Na^+-binding site at extracellular side is characteristic feature of KR2, but the mechanistic meaning is yet unsure. Thus, we focused on these two parts and revealed the functionally important interactions at retinal-binding pocket by changing buffer pH, and relevance between structure and transporting ion by changing alkali metal ion in buffer. These information should deepen the understandings of unique protein, KR2.

【Introduction】

Recently-found light-driven sodium ion pump rhodopsin, *Krokinobacter* rhodopsin 2 (KR2) from marine bacteria, *K. eikastu*s [1], is gathering attention as KR2 is a first example of non-proton cation transporter.

①Structural change of retinal-binding pocket induced by pH change

Crystallography revealed the two conformations of Schiff base counterion, Asp116, at neutral and acidic pH. The movement of counterion is meaningful since this explains how Na^+ overcome the electrostatic barrier of plus-charged Schiff base and pass through from cytoplasmic side to extracellular side. In order to obtain detailed information of structure of retinal and residues in the vicinity of retinal (Fig. 1), we selectively observed the residues by using retinal- and residues-labeled sample and by measuring with DARR method which allows to observe only magnetization transfer between ^{13}C-^{13}C close each other.

②Structural analysis of Schiff base and residues at extracellular side upon alkali metal ion exchange

Na^+-binding site at extracellular side is locating near N-helix, conserved among Na^+ pumping rhodopsin,

Solid-state NMR, Rhodopsin, Sodium ion pump

○しげたありす，かねこりな，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

and BC-loop and is one of the factors of stabilizing the protein [2,3]. Ions in a buffer control which ion to transport as following: Na^+ in NaCl, H^+ in KCl, and in H^+ in NaCl/KCl [1]. Structural changes induced by the ion bound to Na^+-binding site at extracellular side vary much depending on which ion is bound i.e. bound ion controls the transporting ion. Thus, we focused on the structure formed by Na^+ binding and its functional meaning.

【Materials & Methods】

During the expression of KR2 with *E. coli*, stable isotope labeled amino acids and retinal are inducted to obtain ① [14, 20-^{13}C]Retinal, [Phenyl-4-^{13}C]Tyr, [6-^{13}C]/[7-^{15}N]Lys-WT-KR2 and ② [U-^{13}C/^{15}N]WT-KR2. Samples were reconstituted into POPE/POPG liposome. Hydrated samples were measured with 600 MHz solid-state NMR spectroscopy at 278 K, 10 kHz of MAS frequency and ^{13}C-^{13}C Dipolar Assisted Rotational Resonance (DARR), ^{13}C CP-MAS, ^{15}N CP-MAS were conducted. DARR method allows to observe the magnetization transfer between ^{13}C-^{13}C in short distance, thus, we assigned amino acids in the vicinity of retinal based on the distance information from crystallographic structure. For hydration, ①Tris/NaCl buffer (pH 8, 6, 4), ②Tris/NaCl, Tris/LiCl, Tris/KCl, Tris/RbCl, Tris/CsCl (pH 8) were used.

【Results & Discussion】

①Structural change of retinal-binding pocket induced by pH change

We assigned retinal C20, C14, Tyr218Cz and Lys255Nz and revealed followings [4].

1. Retinal Schiff base counterion, Asp116, is locating at unique position conserved among Na^+ pump and, therefore, induces torsion around Schiff base. Interaction of Schiff base with counterion strengthen upon protonation of Asp116 suggesting the different structure from crystallography.
2. H-bonding strength of Tyr218 is weak compared to other rhodopsins suggesting the availability of Asp251 to bind to Na^+ during photocycle.
3. pKa value range of Asp116 and Asp251 were determined by pH-induced chemical shift change of Schiff base and Tyr218Cζ, respectively.

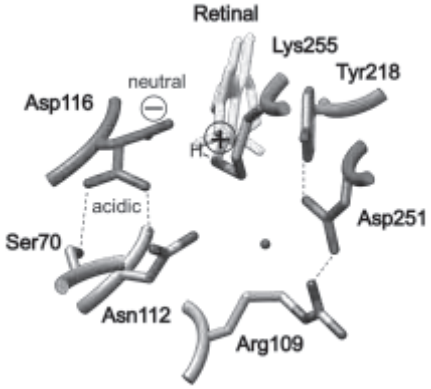


Fig. 1. Retinal-binding pocket. Asp116 is known to have two conformations depending on the buffer pH.

②Structural analysis of Schiff base and residues at extracellular side upon alkali metal ion exchange

Ions at Na^+-binding site at extracellular side were dissociated or replaced by buffer exchange and revealed the followings.

1. Comparing to the chemical shift under Na^+-containing buffer condition, changes in Schiff base signal were observed indicating that the structural change is induced by the absence/existense of bound ion or the ion size.
2. Changes in residues close to the binding site were observed.

Hence, the structure of Na^+-binding site affects to the protein structure including retinal-binding pocket.

References

[1]Inoue, K. et al. (2013) *Nat. Commun.* **4**, 1678. [2]Kato, H. E. et al. (2015) *Nature* **521**, 48–53. [3]Gushchin, I. et al. (2015) *Nat. Struct. Mol. Biol.* **22**, 390-395. [4]Shigeta, A. et al. (2017) *Biochemistry* **56**, 543–550

L4-2

Cooling-free dissolution DNP with an enhancement factor of above 660

○Makoto Negoro[1,2], Akinori Kagawa[1], Kenichiro Tateishi[3], Yoshiki Tanaka[1], Tomohiro Yuasa[1], Keigo Takahashi[1], and Masahiro Kitagawa[1]

[1]*Graduate School of Engineering Science, Osaka University,* [2]*JST PRESTO*

[3]*RIKEN Nishina Center for Accelerator-Based Science*

Dynamic nuclear polarization (DNP) has recently gained attention, along with dissolution DNP, as a method to enhance the sensitivity of liquid NMR spectroscopy and MRI. Here, we demonstrate dissolution DNP without cooling, achieving a polarization enhancement factor of above 660 for proton spins. 660 is the theoretical limit of conventional DNP using thermally polarized electrons. We employ DNP using triplet electrons polarized through a quantum process after photoexcitation. Dissolution DNP without cooling can be realized at a low cost and with compact instrumentation, and is thus expected to become widely used in chemical research and healthcare.

NMR signal intensity and sensitivity is proportional to nuclear spin polarization. At room temperature, in a strong magnetic field which is typically used in NMR spectroscopy and MRI, the ^{1}H spin polarization is ~10^{-5}. Dynamic nuclear polarization (DNP) has recently gained attention as a method to increase the nuclear spin polarization by transferring polarization to nuclei from unpaired electrons, which have 660 times the Zeeman energy as ^{1}H spins. In 2003, Ardenkjaer-Larsen et al. developed dissolution DNP, a method for hyperpolarizing liquids by dissolving solids polarized with DNP at very low temperatures in high magnetic fields in hot aqueous solutions (1). With this, transient chemical phenomena of various molecules have been studied in liquid-state NMR spectroscopy (2). By injecting molecular sensors with hyperpolarized nuclear spins, real-time in vivo metabolic imaging was realized and used for the assessment of cancer therapy (3,4).

In conventional DNP, unpaired electrons in free radicals are polarized to 660 times the polarization as proton spins by thermal equilibration. The polarization enhancement factor of conventional DNP is, in principle, limited to 660 for proton spins. One way to overcome the limit is to use photoexcited triplet electrons instead (5). In photoexcited π-conjugated molecules, e.g. pentacene, electron spins are polarized to more than 10% through the intersystem crossing from the photoexcited singlet to triplet states (Fig. 1). The polarization is insensitive to temperature and magnetic field strength. DNP using photoexcited triplet electrons is referred to as triplet-DNP. With triplet-DNP, we have achieved a ^{1}H spin polarization of 34% at room temperature in 0.4 T, which gives a polarization enhancement factor of 250,000, far beyond 660 (6). All samples hyperpolarized by triplet-DNP have so far been water-insoluble solids. By contrast, in the present work, we succeeded in triplet-DNP of samples of benzoic acid (BA), which is water-soluble. Then, we have demonstrated dissolution DNP.

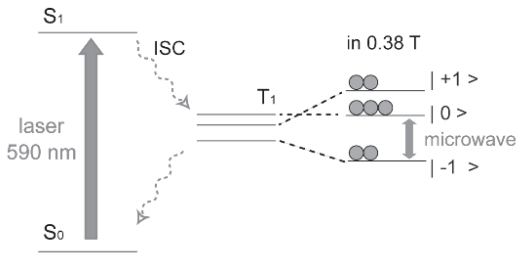


Fig. 1. Energy diagram of pentacene.

Triplet-DNP, Hyperpolarization, Dissolution-DNP

○ねごろまこと，かがわあきのり、たていしけんいちろう、たなかよしき、ゆあさともひろ、たかはしけいご、きたがわまさひろ

All experiments were carried out in 0.38 T at room temperature. Triplet-DNP expriments was conducted by repeating the sequence of photo-excitation and pulsed microwave, which coherently transfers the polarization to ^{1}H spins from photo-excited electrons, via the so-called integrated solid effect (ISE) (5). We increased the ^{1}H spin polarization of the whole sample, until the buildup and the ^{1}H spin lattice relaxation reached equilibrium. As shown in Fig. 2, we obtained a ^{1}H spin polarization of 0.35%, in a powder sample of BA with 0.04 mol% pentacene, where the ^{1}H spin T_1 was 5 min. The T_1 of BA-d_1, in which carboxyl hydrogen is regioselectively deuterated (Fig. 1C), was 7 min. For a powder sample of BA-d_1 doped with 0.04 mol% pentacene-d_{14}, we achieved a ^{1}H spin polarization of 0.8%. The polarization achieved was 6100 times as high as the thermal polarization at room temperature in 0.38 T. We also show the results for BA crystals with the orientation in which the highest polarizations are obtained. A polarization of 2.4% was achieved with a single crystal of BA-d_1 doped with pentacene-d_{14}.

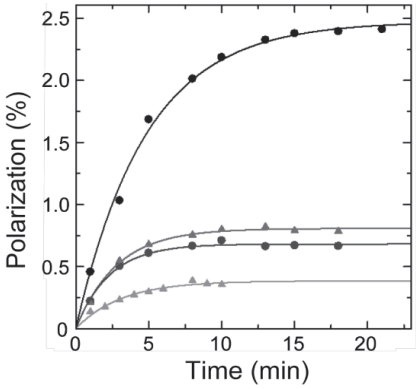


Fig. 2. Polarization buildups of powder and crystalline samples. Triangles are the powder and crystal of BA doped with pentacene-h_{14}, while circles are the powder and crystal of BA-d_1 doped with pentacene-d_{14}.

We dissolved the deuterated powder sample after conducting triplet-DNP for 10 min and obtained NMR signals from the hyperpolarized liquid, which will be shown in the presentation. Various molecules soluble in BA can be hyperpolarized. In the last meeting, we demonstrated hyperpolarization of glassy matrices of ethanol:water and toluene:benzene doped with a solubilized pentacene derivative, though the polarization enhancement factor was less than 100 (7). A number of molecules soluble in these matrices can be hyperpolarized and utilized for metabolic imaging. Here, we achieved cooling free dissolution DNP using photo-excited triplet electrons with enhancement factor beyond 660. This breakthrough will open the way for triplet-DNP applications in pharmaceutical, medical, and life sciences, as well as in healthcare, in a manner similar to, but dramatically more economical and compact than, conventional DNP.

This work was supported by CREST, JST Grand Number JPMJCR1672; JSPS KAKENHI 26620009.

References

(1) Ardenkjaer-Larsen, J. H. *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).

(2) Keshari, K. R. & Wilson, D. M. Chemistry and biochemistry of 13C hyperpolarized magnetic resonance using dynamic nuclear polarization. Chem. Soc. Rev. **43**, 1627-1659 (2014).

(3) Day, S. E. *et al.* Detecting tumor response to treatment using hyperpolarized 13C magnetic resonance imaging and spectroscopy. Nat. Med. **13**, 1382-1387 (2007).

(4) Nelson, S. J. *et al.* Metabolic imaging of patients with prostate cancer using hyperpolarized [1-^{13}C] pyruvate. Science Tans. Med. **5**, 198ra108 1-10 (2013).

(5) Takeda, K. Triplet state dynamic nuclear polarization (VDM Verlag Dr. Müller, 2009).

(6) Tateishi, K. *et al*. Room temperature hyperpolarization of nuclear spins in bulk. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **111**, 7257-7530 (2014).

(7) Tateishi, K., Negoro, M., Nonaka, H., Kagawa, A., Sando, S., Wada, S., Kitagawa, M. & Uesaka, T., 54th annual meeting of the nuclear magnetic resonance society of Japan (2015).

L4-3

^{17}O MAS NMR of surface Si-OH groups of silica-alumina materials

○ Toshikazu Takahashi[1], Juliette Blanrchard[2], Yanick Millot[2], Yoshimich Kiyozumi[3]
[1]Interdisciplinary research center for catalytic chemistry, AIST, [2]Laboratoire de Reactivite de Sruface, CNRS, [3]Tohoku Center, AIST

Summary Si-OH signal was obtained in 3QMQMAS spectra of ^{17}O enriched Al-MCM-41 and related materials. These materials have indicated Si-OH signals as a well separated peak in the 2D chart at around a similar region. The exchange rate of Si-OH groups of Al-MCM-41 with atmospheric water (22°C, 50% humidity) was unexpectedly fast.

Introduction: Solid-state NMR is a powerful tool for shedding light on the surface molecular structure of the solid catalysts with some assistance of magnetization transfer techniques from the surface adsorbed molecules, surface isotope-enrichment or other available surface focusing methods. Solid oxide catalysts mainly consisted of silica and alumina are one of the most important catalyst materials. Especially for zeolites and related silica-alumina catalysts, the Brønsted acid sites, Si-OH-Al are of the primary importance [1]. Although Si-OH groups on silica are also important, there are relatively less data available for the ^{17}O MAS signals of Si-OH groups, especially, for those of MQMAS data [2]. The structural analysis of the surface Si-OH groups on silica and silica-alumina materials are useful not only for catalysis materials but also for the functional solid materials themselves and for the surface modification of them. In this contribution, we will report the ^{17}O NMR of isotope-enriched Al-MCM-41 and related materials. Especially, for the Si-OH groups

Experimental: Al-MCM-41 was prepared using the method we have reported elsewhere [3]. CARiACT Q_6 was kindly provided by Fuji Silycia Chemical Ltd. HY zeolite was prepared from the JRC-ZY5.5 provided by Japan Reference Catalyst organization. For the ^{17}O enrichment experiments, we used BELSORP MAX for the 550°C vacuum drying then 12 to 48 h contact under 40 or 50°C with $^{17}O_2$ enriched water (40% or 90% enriched ^{17}O, purchased from NUKEM isotopes GmbH). In the other ^{17}O enrichment conditions, we have used autoclaves having 20 ml inner volume with 120 or 180 °C vacuum drying and room temperature, 80, 120 or 180 °C contact with water or its vapor. All the NMR experiments were performed on a Bruker Avance III 400WB NMR with MAS proves for 4 mm rotors having HX or HXY channels. The Hahn-echo and z-filtered 3Q MQMAS are taken for each sample. The analysis software installed on TOPSPIN 3.5PL7 was used for signal extraction from the 2D maps.

Keywords: ^{17}O MQMAS, Al-MCM-41, Zeolites, Si-OH, isotope exchange

Results and Discussions: Fig. 1 shows the z-filtered 3Q MQMAS spectrum of HY zeolite. We can find two main groups of peaks within the 2D map. Comparing this data with that of already reported one [Ref. 1], we can extract the peak position of Si-OH-Al by using analysis tool. For MQMAS of CHA (figures not shown here), we could see these signals more clearly. For the samples of MCM-41 and Al-MCM-41(figures not shown here), we have also found these signals in the similar area and, in addition to that, we also have found S-OH signals within another separated area around the position designated in Fig. 1. These signals showed around 2 to 4 MHz of P_Q and around 10 to 20 ppm in δ_{iso}. These values were dependent on the preparation conditions. We also have observed very small signal in this region with a sample prepared from the same HY.

Quantum chemical calculations [4] report that the ^{17}O signal from Si-OH should be of 6-8 MHz of CQ and 0.7 to 0.9 of η. However, the reported assignments of Si-OH signals have showed 0 to 3 MHz CQ and 0 to 0.5 η. The signals we have observed are found at the similar region to the reported ones.

We also have found that these signals are very easily lost by storing the samples under room atmosphere. Only 15 min contact to air was sufficient for the ^{17}O exchange. Because the strongly bound waters should have much larger C_Q's, these signals are sought to be surface Si-OH.

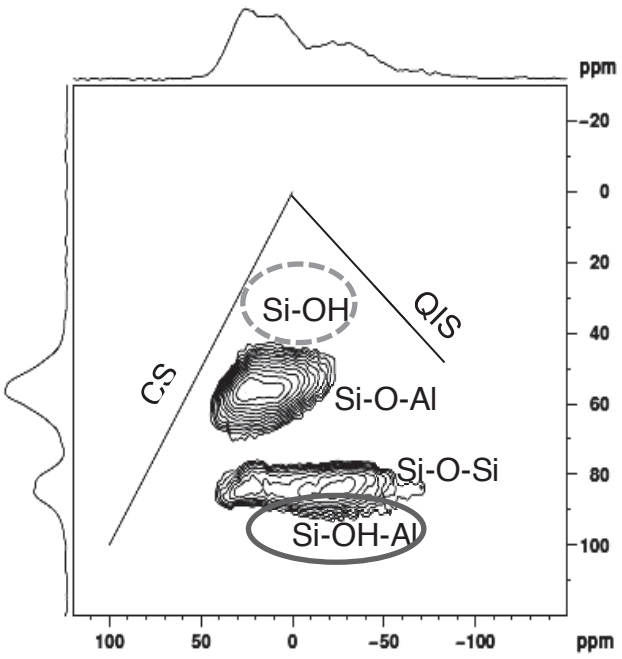


Fig 1. Z-filtered 3Q MQMAS data of a HY zeolite.

This work is supported by Ultra High-Throughput Design and Prototyping Technology for Ultra Advanced Materials Development Project ,NEDO.

References [1] Nicolas Merle, et al., *J. Am. Chem. Soc.* 2012, **134**, 9263−9275. [2] Luming Peng, et al., *Nature Materials,* 2005, **5**, 216-210. [3] Katsuyuki Iwanami, et al., *Chem Commun.* 2008, 1002-1004 [4] Xianyu Xue, et al, *J. Phys. Chem. B.,* 2001, **105**, 3422-343410.

IL1

Applications of dynamic nuclear polarization (DNP)-enhanced solid-state NMR to materials science

Takeshi Kobayashi
U.S. Department of Energy, Ames Laboratory, Ames, IA, 50010, U.S.A.

Recent developments in the gyrotron technology, cryogenic MAS probes and the use of exogeneous sources of unpaired electrons (biradical polarizing agents) [1] have stimulated renewed interest in dynamic nuclear polarization (DNP), which was theoretically predicted by Overhauser and confirmed by Slichter in the 1950s.[2] DNP's unprecedented sensitivity enhancement, often by over two orders of magnitude, pushes the conventional limits of solid-state (SS)NMR's capability and enables the detection of increasingly challenging nuclei, minute concentrations of molecules, and the examination of surfaces and interfaces of materials at natural abundance.

We will highlight some of the new opportunities that DNP SSNMR brings to the studies of materials science, which extend far beyond the limits of conventional NMR, including (1) studies of spatial distribution of functional groups covalently attached to the surfaces of mesoporous silica nanoparticles by 2D ^{29}Si-^{29}Si and 2D ^{13}C-^{13}C correlation spectroscopies, (2) the measurements of undistorted ^{17}O spectra at natural abundance, (3) the elucidation of coordination geometries of surface species adsorbed on the surfaces of Pd/Al_2O_3 catalyst by ^{13}C-^{27}Al distance measurements, (4) the measurements of DNP-enhanced ultra-wideline SSNMR spectra of ^{207}Pb in aged paint and ^{195}Pt in metal-organic frameworks (MOFs).

References

(1) a) Becerra, L. R.; Gerfen, G. J.; Bellew, B. F.; Bryant, J. A.; Hall, D. A.; Inati, S. J.; Weber, R. T.; Un, S.; Prisner, T. F.; McDermott, A. E.; Fishbein, K. W.; Kreischer, K. E.; Temkin, R. J.; Singel, D. J.; Griffin, R. G. *J. Magn. Reson*. A **1995**, *117*, 28 − 40. b) Rosay, M.; Lansing, J. C.; Haddad, K. C.; Bachovchin, W. W.; Herzfeld, J.; Temkin, R. J.; Griffin, R. G. *J. Am. Chem. Soc*. **2003**, *125*, 13626 − 13627. c) Hu, K.-N.; Yu, H.-h.; Swager, T. M.; Griffin, R. G. *J. Am. Chem.Soc*. **2004**, *126*, 10844 − 10845.

(2) a) Overhauser, A.W. *Phys. Rev*. **1953**, *92*, 411-415. b) Carver, T.R.; Slichter, C.P. *Phys. Rev*. **1953**, *92*, 212-213.

Dynamic Nuclear Polarization (DNP), solid-state NMR, materials science

IL2

NMR on membrane proteins – The use of magic angle sample spinning and dynamic nuclear polarization for the investigation of ABC transporters, GPCRs and Photoreceptors

Clemens Glaubitz

Goethe University Frankfurt, Centre for Biomolecular Magnetic Resonance, Frankfurt, Germany, www.glaubitz-lab.de

Motivation

The advancement in structural biology of membrane proteins mainly due to crystallography has created a great demand and offers also the opportunity of in-depth spectroscopic studies to resolve functional mechanisms. In this context, solid-state NMR plays an important role as it allows analysing membrane proteins directly within the lipid bilayer. In principle, two general modes for applications have emerged: Best spectral resolution is usually achieved on non-frozen samples under magic angle sample spinning (MAS) at highest possible magnetic fields, which enables full resonance assignment and even 3D structure determination. In contrast, best sensitivity is obtained by using dynamic nuclear polarisation (DNP), which works best at lower fields and under cryogenic conditions. In our hands, signal enhancements for membrane proteins between 40 and 100-fold can be routinely achieved. This enables tailored applications, which are often hypothesis-driven and complementary to 'conventional' solid-state NMR approaches. Here, examples from two different membrane protein families will illustrate how advanced solid-state NMR can contribute to membrane protein research.

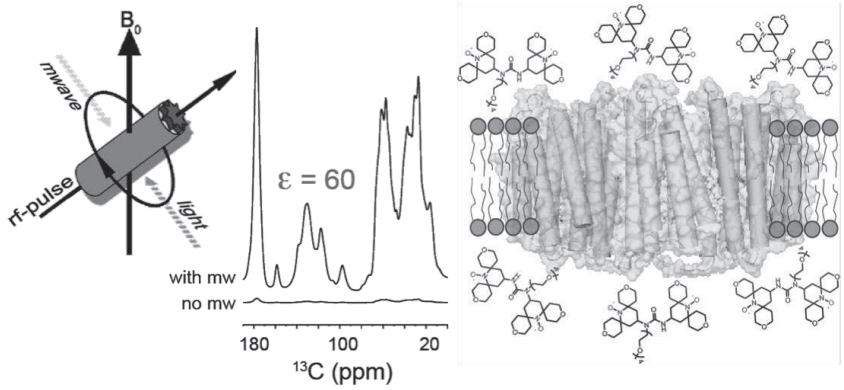


Figure 1: DNP-enhanced MAS-NMR enables significant signal enhancements on membrane proteins, which allows many new applications. For example, the combination with additional illumination allows trapping of intermediate states of photoreceptors. The membrane proteins can be kept in lipid bilayers. Soluble stable radicals are added to the sample as source for polarisation.

Analysis of cryo-trapped photointermediate states and oligomer interactions in microbial rhodopsins

The discovery of many new microbial rhodopsins has shown that the typical structural scaffold with 7 transmembrane helices and a retinal cofactor provides the basis for a great variety of functions, including cation and anion pumps, sensors and channels. These also manifest themselves in different optical properties, photocycle kinetics or populated intermediate states, which indicate important differences in their energy landscapes. These fine details need to be understood in order to comprehend how apparently

Membrane Proteins, Solid-state NMR, Dynamic Nuclear Polarization

similar molecular designs can yield such a variety of functions. Photointermediate states can be stabilized by illumination with subsequent cryo-trapping. For efficient light penetration, the sample amount within the MAS rotor has to be reduced. The resulting loss of sensitivity is compensated by the application of DNP for signal enhancement. This approach will be demonstrated for channelrhodopsin-2, a light-gated ion channel, which has gained great popularity in optogenetics. Using various ^{13}C-labelled retinals, it was possible to demonstrate unambiguously that the cofactor exists in a 100% all-*trans* conformation in the dark state [1]. By applying thermal trapping and relaxation schemes, a number of photostates could be identified, which were further characterized by the interpretation of chemical shift data and dipolar distance measurements.
Interestingly, the oligomeric state of these microbial rhodopsins varies from protein to protein. While channelrhodopsin-2 forms dimers, the most abundant retinal-based photoreceptor, proteorhodopsin, forms pentamers. By preparing mixed-labeled complexes, it was possible to identify a number of cross-protomer interactions through DNP-enhanced through-space dipolar correlation spectroscopy and link them to functional properties [2]. The low number of contributing spins and the weak dipolar couplings made the use of DNP indispensible.
The combined use of DNP-enhanced and 'conventional' solid-state NMR for the analysis of ABC transporters
ABC transporters connect ATP hydrolysis catalyzed in conserved nucleotide binding domains (NBDs) with substrate transport across membranes through specialized transmembrane domains. The use of time-resolved ^{31}P-MAS NMR has revealed for the *E. coli* lipid-A transporter MsbA the ATPase hydrolysis is linked via cyclic mechanism with an adenylate kinase mechanism, which is especially important in situations of ATP depletion [3]. By applying DNP-enhanced through-space dipolar correlation spectroscopy, new contacts between nucleotides and MsbA could be identified. In addition, interactions between lipid-A and MsbA could be identified. Furthermore, chemical shift perturbations throughout the protein could be observed during different steps of the catalytic cycle at high field.
These examples will be presented and discussed in the context of novel NMR developments as well as with respect to advancements in these specific protein research areas.

[1] Becker-Baldus J, Bamann C, Saxena K, Gustmann H, Brown LJ, Brown RC, Reiter C, Bamberg E, Wachtveitl J, Schwalbe H, Glaubitz C. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 112, 9896-901 (2015)
[2] Maciejko J, Mehler M, Kaur J, Lieblein T, Morgner N, Ouari O, Tordo P, Becker-Baldus J, Glaubitz C *J Am Chem Soc* 137, 9032-43 (2015)
[3] Kaur H, Lakatos A, Nöll A, Tampé R, Glaubitz C *Nature Comm* 7, 13864 (2016)

IL3

Chaperone–client-interactions: From basic principles to roles in health and disease

S. Hiller[1], B. M. Burmann[1], L. He[1], R. Riek[2], J. A. Gerez[2] and S. G. Rüdiger[3]

[1]*Biozentrum, University of Basel, Switzerland*

[2]*Laboratory of Physical Chemistry, ETH Zurich, Switzerland*

[3]*Bijvoet Center for Biomolecular Research, Utrecht University, The Netherlands*

Molecular chaperones are essential in cellular protein homeostasis. Central aspects of chaperone function are still not comprehensively understood at the atomic level, including how chaperones recognize their clients, and in which conformational states clients are bound. I will describe our research efforts to understand such aspects, employing high-resolution NMR spectroscopy as the main method.

Our initial work on the periplasmic holdase Skp with bound outer membrane proteins provided the first atomic-level description of a natural full-length chaperone–client complex [1, 2]. Subsequent work combining NMR spectroscopy with single-molecule force spectroscopy showed how periplasmic chaperones shape individual client folding trajectories, funneling the client polypeptide towards the native structure [3]. A characterization of the Spy–Im7 model system revealed how the chaperone Spy selectively recognizes the flexible, locally frustrated regions of partially folded client Im7 in a highly dynamic fashion. The interaction sites are identical for further chaperones, highlighting that general principles govern client recognition [4].

We then utilize our mechanistic insights to investigate the functional role of chaperones in Parkinson's disease. Parkinson's is one of the most common neurodegenerative disorders, pathologically manifested by intracellular accumulation of aggregates of the intrinsically disordered protein α-Synuclein. Systematic investigations on an array of chaperones identified a general chaperone interaction motive at the α-Synuclein amino-terminus. The dominant role of chaperone interactions for cytosolic α-Synuclein was validated with *in-cell* mass-spectrometry and NMR spectroscopy and the functional basis for the effects of several known post-translational modifications of α-Synuclein could thus be reconstituted *in vitro*. The data reveal how molecular chaperones control the state and function of α-Synuclein *in vivo* and how the disturbance of these interactions leads to progress of pathologically relevant aggregates.

References

[1] B.M. Burmann, C. Wang, S. Hiller, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **20**, 1265 (2013).

[2] M. Callon, B.M. Burmann, S. Hiller, *Angew. Chem. Int. Ed.* **53**, 5069 (2014).

[3] J. Thoma, B.M. Burmann, S. Hiller, D.J. Müller, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **22**, 795 (2015).

[4] L. He, T. Sharpe, A. Mazur, S. Hiller, *Sci. Adv.* **2**, e1601625 (2016).

Molecular chaperones, protein homeostasis, protein aggregation

IL4

Single cell Hi-C and single molecule imaging to study nuclear architecture

Tim J. Stevens[1,2], David Lando[1], Srinjan Basu[1], Yang Cao[1], Lisa-Maria Needham[3], Devina Shah[1], Kai J. Wohlfahrt[1], Wayne Boucher[1], Steven F. Lee[3], Brian Hendrich[4], Dave Klenerman[3] & Ernest D. Laue[1]

[1]*Department of Biochemistry, University of Cambridge, Cambridge, United Kingdom*
[2]*MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, United Kingdom*
[3]*Department of Chemistry, University of Cambridge, Cambridge, United Kingdom*
[4]*Wellcome Trust – MRC Stem Cell Institute, University of Cambridge, Cambridge, United Kingdom*

Our research has focused on the development of new NMR methods and structural studies of protein complexes, in particular those involved in the assembly and control of chromatin structure. We have developed new ways to record NMR data that utilise pulsed field gradients, and we have been particularly interested in developing new methods to process multidimensional (3D/4D) NMR spectra. During the course of these studies we realized that we could exploit our new methods for processing NMR spectra, such as maximum entropy, in order to record NMR experiments more efficiently using selective (exponential) data sampling. As a result of our expertise in the development of software for NMR, we were then asked to set up and establish the CCPN project (http://www.ccpn.ac.uk) – a highly collaborative open source software development project, which involved many of the major NMR groups around the world – to coordinate the provision of a well-connected suite of software for NMR data analysis and structural studies.

In addition to carrying out structural studies, we have always been interested in using the structural information we gain to understand how the complexes we were studying function *in vivo*. Around ten years ago we realized that we could take advantage of two key developments – single-molecule super-resolution fluorescence microscopy to image proteins at near molecular resolution *in vivo*, and high throughput DNA sequencing to determine the DNA sequence of single cells – to develop an approach to calculate structures of chromosomes and intact genomes in single cells. In this lecture I will describe how we have developed and used an NMR inspired approach to study chromosome and genome structure, and how we are also now combining that with single-molecule super-resolution microscopy to study nuclear architecture.

Keywords: single molecule super resolution imaging, single cell Hi-C, chromosome and genome structure

Using data from our approach, which allows us to first image and then biochemically process and sequence single cells, we have been able to calculate the first 3D structures of entire mammalian genomes, at present at a scale of ~25 kb. We can now see that the structures of chromosomes, individual topological-associated domains, loops, and the way they interact with each other, varies very substantially from cell to cell. Conversely, A and B compartments, lamina-associated domains, and active enhancers and promoters are organized in a consistent way on a genome-wide basis in every cell, suggesting that they could drive chromosome and genome folding. Mapping genome-wide ChIP- and RNA-seq data onto the single cell structures suggested that genes regulated by pluripotency factors and the nucleosome remodelling deacetylase (NuRD) complex cluster, a hypothesis that we were able to confirm using single molecule super resolution microscopy.

Single-molecule imaging is becoming a powerful method for tracking proteins and studying their dynamics in living cells. The combination of single-molecule super-resolution imaging, biochemical processing and DNA sequencing of single cells to determine single-cell genome structure now provides a powerful new approach for investigating biological processes. Currently, however, there is no generally applicable method to distinguish whether a protein is moving as part of one or several different complexes. I will also describe a novel approach that we are developing, where we place a photo-stable acceptor dye in close proximity to a photo-activatable donor fluorophore. Transfer of energy via FRET increases the photo-stability of the donor fluorophore, thereby significantly increasing the length of time those molecules can be tracked in live mammalian cells. By tagging two different proteins the longer tracks can also be used to distinguish whether a protein is present in a particular complex, as opposed to being on its own or in other complexes. We anticipate that this approach to directly image and map the localization of particular protein complexes will be very useful when combined with our approach for single-cell genome structure determination.

HL1

Small Volume. Why not?

Seizo Takahashi
Prev. Japan Women's Univ., Tokyo, Japan

NMR technique devised in our laboratory was disclosed. We have not always been available in the market to appropriately handle small volume samples. Thus, glassware was devised under the necessity of reducing contamination and sample loss. FT-NMR with super conducting magnet prompted me to delve into a sample tube geometry, leading to a so called Shigemi tube. A few unfinished approaches were also addressed.

NMR has been made a marked progress in its application following the progress of its instrumentation. For example, the nominal S/N ratios have improved over 200 times since the beginning of my NMR career. In my youth, the research targets were restricted to some small biological molecules because of the poor sensitivity. The sample preparation often required a long and laborious process, since the NMR technique required a large volume with high concentration among the available spectroscopic approach. The tools available in the market were not always suitable for our purpose, which led us to devise some tools and techniques by ourselves to appropriately handle limited samples.

Dialysis was one of the choices to purify the polymers, however reducing the volume increased the sample loss when withdrawing from the bag. My first invention was to cap the membrane at the orifice of the 1 mL glass tube instead of the small volume bag. After dialysis, the sample was frozen and lyophilized by putting the tube into a standard container of lyophilizer. Three different types of glassware were devised for the lyophilization using a vacuum line according to the volumes 0.1 mL, 1 mL, and 100 mL. The glassware for the standard volume was my favorite but not known to the public. Direct lyophilization using the NMR tube was found not suitable for general use because of the difficulty in handling.

Filtering technique using the ultra-membranes was unsatisfactory to me. Precious samples were often damaged because of the presence of defects in the membrane. However, a devised tool for the filtering of small volume samples gave me an idea to make direct concentration in the NMR tube. Later on, I used this technique daily to push down the liquid in the tube to the bottom and degassing. Commercial vacuum centrifuge equipment was of course not suitable to the NMR tube, thus an extensive modification was made.

Of course pH titration used to be a popular technique to probe the conformation of biological molecules. Commercial long thin pH electrodes for NMR use were imported from US in those days, which gave an unstable response and worked under pH 10. Moreover, it was reported that there was leakage of KCl solution to the sample through a pinhole of the reference electrode. Thus, I made a special order according to my idea to avoid the electrostatic influence as much as possible. As a result, stable pH response was obtained equivalent to a standard pH glass electrode. The key point was to reduce the impedance replacing a pinhole liquid connection to a sleeve connection at the cost of a smaller size of electrode sensor.

For the NMR tube, there was not much choice but to reduce the volume size inserted into the standard tube, resulting in the lower filling factor at the coil position. I found that the

Small volume handling, micro-tube, symmetric geometry, application

smaller diameter tubes suffer from less homogeneous field, which prompted me to delve into the tube itself. The turning point was Dr. Nagayama who told me "the symmetric geometry around the sample is adjustable to the filed gradient." Firstly, I devised a vortex stopper which contains the same solvent and hold at the top. Then, I tried to make a same configuration at the bottom, namely a container of same solution. This design was however hard to handle and obviously unsatisfactory as a product. Then, we tested several glass types available in the market. I knew at the time the poor quality glass gave better resolution. At last, I found the worst quality glass he left in the basement matched the magnetic susceptibility to that of water. I told Mr. Shigezane to collect the glass by any means from all over Japan, since it was no longer produced in Japan. I estimated the market size of this micro-tube to be at most 10 to 50 sets per year, and told him to produce the goods even though the stock lasts less than 10 years.

Since this model has sold far more than we expected, the glass supplies will soon become short. We try to make a glass material ourselves. We are struggling in stabilizing the magnetic susceptibility of glass over the past decade. Dr. Mike Lin at PPG co. at that time notified me about the importance in the balance of the ferrous and ferric ion ratios. Now, the glass material itself has become reasonably stable although the costs of making glass pressed us to use an offset formulation from the ideal.

If the time allows me, I would like to quickly address part of my NMR work which is to be studied.

Firstly, brain tissue in the tube suffers from an inhomogeneous environment. The quick aid is to suspend the tissue with Freon with different polymeric sizes, namely FC77 and FC70. The mixing ratio 3:2 gave a matched magnetic susceptibility. The 1D NMR spectra gives us poorly separated peaks with huge overlapped resonances of large molecular bio-molecules. 2D spectra gives well separated peaks at the cost of extended scan time. I devised 1.5D spectral acquisition which finish within 7.5 minutes for one spectrum. Using a 10mm tube, the acquisition will finish in a 1/4 of 5mm tube.

The second approach is to create 2D spectrum from acquired 1D spectrum. This approach does not give new information at all but gives more separated peaks. This technique is best used for the mixture sample to calculate the overlapped peak intensities.

Thirdly, working on the salivary samples, I obtained several unexpected results. The chemical shift of acetate does not follow the titration profile at all. Acetate methyl resonance gives a double quantum resonance. The intensity profile as a histogram of ensemble does not follow the log-normal nor inverse-normal distribution. It is more likely to happen to the distribution of metabolite bio-molecules. It was also found that the intensity distribution at the baseline, which is masked by noise, would indicate the amount of large molecular metabolites.

第3日目
11月16日（木）
日本語セッション

Day 3（Thursday, 16 November）
（Japanese Sessions）

L5-1

2次の非線形帯磁率によるオーバーハウザー効果の検討

○戸田充[1,2]，藤井裕[2]
[1]（株）JEOL RESONANCE・技術部
[2]福井大学・遠赤外領域開発研究センター

Discussion of the Overhauser effect by the 2nd-order non-linear magnetic susceptibility

○Mitsuru Toda[1,2], Yutaka Fujii[2]
[1] *JEOL Resonance Inc., Engineering Division*
[2] *Research Center for Development of Far-Infrared Region, University of Fukui*

The Overhauser effect might give odd feeling when it is compared with other common NMR experiments, because the resonance frequencies are so different. Although, when we consider the mechanism of the Overhauser effect in view of the 2nd-order non-linear magnetic susceptibility, we find many common characters with non-linear optics. We use the density matrix method, which is commonly used to discuss the sum- and difference-frequency generations in non-linear optics, and discuss if this method helps to understand the role of the non-linear fluctuation in the Overhauser effect.

前回の発表[1]で、オーバーハウザー効果の熱力学的側面を検討することにより、非平衡状態で発達する核スピンー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、結論付けた。オーバーハウザー効果は磁気共鳴の世界では、若干異質な実験方法と言えるが、同様の非線形性を有し、これまでに繰り返し議論が行われてきた研究分野として、非線形光学の世界がある。差周波、和周波、高調波の発生を議論する際によく利用される密度行列の方法を応用して、オーバーハウザー効果に特徴的に見られる非線形ゆらぎや物理量を議論できるか、検討する。

非線形光学応答の分野で著名なShenの“Principles of Nonlinear Optics”[2]に倣い、密度行列の方法で問題を取り扱うことにする。密度行列演算子を

$$\rho = \overline{|\psi\rangle\langle\psi|} \qquad (1)$$

と置き、物理量$\boldsymbol{M}$のアンサンブル平均を

$$\langle \boldsymbol{M} \rangle = \overline{\langle\psi|\boldsymbol{M}|\psi\rangle} = \mathrm{Tr}(\rho \boldsymbol{M}) \qquad (2)$$

とする。ハミルトニアン $\mathcal{H}$ の下での $\boldsymbol{\rho}$ の時間発展を、以下のLiouvilleの式で示す。

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} = \frac{1}{i}[\mathcal{H}, \rho] \qquad (3)$$

$\mathcal{H}$ としては、$S = 1/2$、$I = 1/2$ からなる、磁場下でNMR周波数、ESR周波数の電磁波を照射された電子―核スピン結合系を考え、ゼーマン項を$\mathcal{H}_Z$、静磁場と垂直な成分の振動磁場との相互作用に基づく摂動項を$\mathcal{H}_{int}$、超微細相互作用の摂動項を$\mathcal{H}_A$、周囲の熱浴によるランダムな摂動項を$\mathcal{H}_{random}$の和で表すことにする。すると、式(3)は以下の様に表すことが出来る。

オーバーハウザー効果，非線形帯磁率，密度行列

○とだみつる，ふじいゆたか

$$\frac{\partial\rho}{\partial t}=\frac{1}{i}\left[\mathcal{H}_Z+\mathcal{H}_{int}+\mathcal{H}_A,\rho\right]+\left(\frac{\partial\rho}{\partial t}\right)_{relax}, \tag{4}$$

$$\left(\frac{\partial\rho}{\partial t}\right)_{relax}=\frac{1}{i}\left[\mathcal{H}_{random},\rho\right]. \tag{5}$$

$(\partial\rho/\partial t)_{relax}$の評価については、NMRの緩和時間を考える際の議論と同様で、熱浴との相互作用で誘引される遷移の結果として分布数の変化を考える。$W_{n\to n'}$ を状態$|n\rangle$から状態$|n'\rangle$へ熱的に誘起される遷移とすると、状態$|n\rangle$における過分な分布に対する緩和率は、以下の式で表される。

$$\left(\frac{\partial\rho_{nn}}{\partial t}\right)_{relax}=\sum_{n'}\left[W_{n'\to n}\rho_{n'n'}-W_{n\to n'}\rho_{nn}\right]. \tag{6}$$

熱平衡状態における密度行列演算子を$\rho_{nn}^{(0)}$とすると、

$$\frac{\partial\left[\left(\rho_{nn}\right)_{relax}-\rho_{nn}^{(0)}\right]}{\partial t}=\frac{\partial\left(\rho_{nn}-\rho_{nn}^{(0)}\right)_{relax}}{\partial t}=-(T_1)_n^{-1}\left(\rho_{nn}-\rho_{nn}^{(0)}\right). \tag{7}$$

非対角項の緩和は複雑であるが、メカニズムによらず、指数関数的にゼロに近づくと仮定すると、$n\neq n'$ の条件で、

$$\left(\frac{\partial\rho_{nn'}}{\partial t}\right)_{relax}=-\Gamma_{nn'}\rho_{nn'},\qquad \Gamma_{nn'}=\Gamma_{n'n}=(T_2)_{nn'}^{-1}. \tag{8}$$

$\mathcal{H}_Z$、$\mathcal{H}_A$、$\mathcal{H}_{int}$、$(\partial\rho/\partial t)_{relax}$などが分かれば、上式を用いて、Liouville 方程式から物理量 ***M*** の運動を考えることが出来る。物理量 ***M*** として 2 次の非線形磁化（S^+I^-など）を考え、その生じやすさを非線形帯磁率として緩和時間の表式で表すと、以下の式を得る。

$$\chi_{ijk}^{(2)}\left(\omega=\omega_j+\omega_k\right)=\frac{\mathrm{Tr}\left\langle A\left\{S^+I^-\rho_{23}^{(2)}\left(\omega_j+\omega_k\right)+S^-I^+\rho_{32}^{(2)}\left(\omega_j+\omega_k\right)\right\}\right\rangle}{H_j\left(\omega_j\right)H_k(\omega_k)}. \tag{9}$$

数式の詳細は、講演において説明する。

通常のNMRの緩和の理論においては、このような非線形帯磁率を議論することは無いが、照射するマイクロ波のエネルギーが非常に強く、非線形波が無視できない場合、熱浴とスピン系の間の相互作用を議論する際に、こうした揺らぎの発達を考えることは、有意義である。

References

(1) 戸田，藤井，光藤，出原，“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”，第55回NMR討論会，講演番号 P93.
(2) Y. R. Shen, “Principles of Nonlinear Optics”, Wiley Series in Pure and Applied Optics, 1984.

L5-2

フラーレン空間内部において静電的摂動を受けた孤立水分子の運動性評価

○橋川 祥史[1]，村田 理尚[1]，若宮 淳志[1]，村田 靖次郎[1]
[1]京大化研

Evaluation of Electrostatically-Perturbed Dynamic Behavior of Isolated Water Molecule inside the Fullerene Sphere

○Yoshifumi Hashikawa,[1] Michihisa Murata,[1] Atsushi Wakamiya,[1] and Yasujiro Murata[1]
[1]*Institute for Chemical Research, Kyoto University.*

Fullerene C_{60} has an internal sphere with a diameter of ca. 3.7 Å. A water molecule can be put into its cavity by the way of the molecular surgery which requires creation of the opening, insertion of a molecule, and closure of the opening.[1] The thus obtained molecular complex is so-called endohedral fullerene and can be abbreviated as $H_2O@C_{60}$.[2] We have successfully obtained $H_2O@C_{59}N$ dimer[3] and its cationic form $H_2O@C_{59}N^+$ by the synthesis commenced with $H_2O@C_{60}$. Recently, we reported that there is negligible van der Waals interaction in $H_2O@C_{60}$ according to the single molecular junction study.[4] Herein, we report the dynamic behavior of water molecules incarcerated inside the electrostatically-perturbed fullerene sphere by using the ^{1}H NMR relaxation time (T_1 and T_2) as an indicator. We found that the T_1/T_2 ratio is closely related to the molecular rotation of encapsulated H_2O and the value of $H_2O@C_{59}N^+$ is remarkably higher than that of $H_2O@C_{59}N$ dimer. This is indicative of the existence of strong intramolecular $C_{59}N^+$•••OH_2 interaction in $H_2O@C_{59}N^+$.

序論　フラーレンC_{60}は，約3.7 Åの内部空間をもっており，有機化学的手法により[1]，内部に水分子を導入することができる[2]．我々は，この水分子を内包したフラーレン（$H_2O@C_{60}$）を原料に用いることで，水分子を内包した中性のアザフラーレン（$H_2O@C_{59}N$）をダイマーとして合成することに成功し[3]，溶液中で安定なカチオン種（$H_2O@C_{59}N^+$）を発生できることを見い出した．C_{60}骨格上の炭素原子を1つ窒素原子に置き換えたこれらのフラーレンにおいて，窒素原子の導入に基づく静電的な摂動が内包された水分子の運動性に影響を与えると推測される．そこで，内包された水分子の運動性を明らかにするために，^{1}H NMR緩和時間を測定し，その温度依存性を評価した．

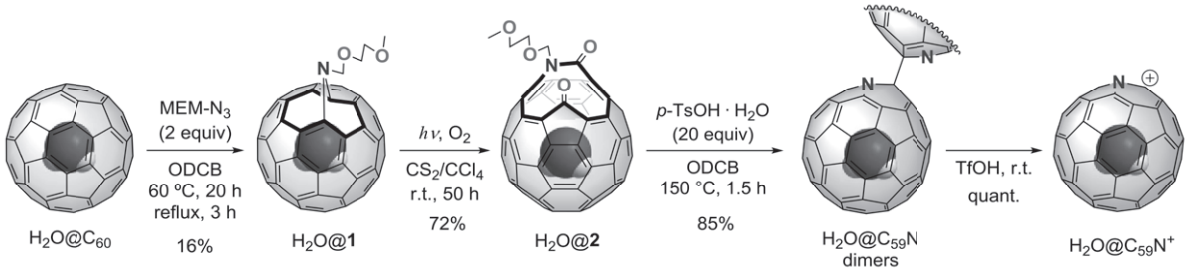
結果と考察　まず，内包率28%の$H_2O@C_{60}$を合成し[2]，3段階で$H_2O@C_{59}N$をダイマーとして合成・単離した（Scheme 1）[3]．その後，酸化反応を検討する過程で，アザフラーレン$(C_{59}N)_2$は，硫酸中において微量ではあるがカチオン種$C_{59}N^+$を発生することがわかった．さらなる検討の結果，トリフルオロメタンスルホン酸（TfOH）中で，効率的に$C_{59}N^+$が発生し，1ヶ月以上溶液中で安定に存在することがわかった．$C_{59}N^+$の発生は，UVおよび^{13}C NMR測定によって確認した．また，水内包体についても同様の処理を行なうことで，$H_2O@C_{59}N^+$を得た（Scheme 1）．

得られた$H_2O@C_{60}$および$H_2O@C_{59}N$ dimersのODCB-d_4溶液を用いて，500 MHzにおいて緩和時間を測定した[3]．$H_2O@C_{59}N^+$の測定では，TfOH溶液が入った5ϕのNMR管内に，D_2Oキャピラリーを導入し，800 MHz下において測定した．スピン-格子緩和時間T_1は反転回復法により，スピン-スピン緩和時間T_2はCPMG法により測定した．90°パルス幅は，各温度において測定した．

フラーレン，緩和時間，静電的相互作用

○はしかわよしふみ，むらたみちひさ，わかみやあつし，むらたやすじろう

Scheme 1. Synthesis of cationic endohedral azafullerene, $H_2O@C_{59}N^+$



測定結果をFigure 1に示す．$H_2O@C_{60}$では，T_1-T_2値の間に大きな差は見られず，温度上昇とともに緩和が促進していることから（Figure 1a），この緩和は内包水分子の回転運動に起因していると考えられる．$H_2O@C_{59}N$ dimersでは，T_1値が$H_2O@C_{60}$に比べ約3倍程度大きくなることがわかった．これは，内包された水分子の運動が抑制されていることを示している．理論計算の結果，アザフラーレン骨格の窒素原子の内側は正に帯電しており，水分子との間に静電的相互作用が存在すると考えられる．この相互作用は低温になるほど，より強くなると推測され，T_1/T_2値の温度依存性に反映されることがわかった（Figure 1b）．$H_2O@C_{59}N^+$においては，中性の$H_2O@C_{59}N$ dimersと同様のT_1, T_2値の温度依存性が見られたが，興味深いことに，T_1/T_2値が低温において顕著に増大することがわかった．280 Kにおいて比較すると，$H_2O@C_{59}N$ dimersでは2.5であった値が，$H_2O@C_{59}N^+$では6.0と非常に高く，$H_2O@C_{59}N^+$における水分子の回転運動の抑制効果は，温度換算にして40 K程度も$H_2O@C_{59}N$ dimersに比べて大きいことがわかった（Figure 1b）．これは，$C_{59}N$骨格上のカチオン中心が骨格外部のみならず内部にまで静電的な影響を及ぼし，内包された水分子の運動性に非常に大きな摂動を与えていることを示す結果である．

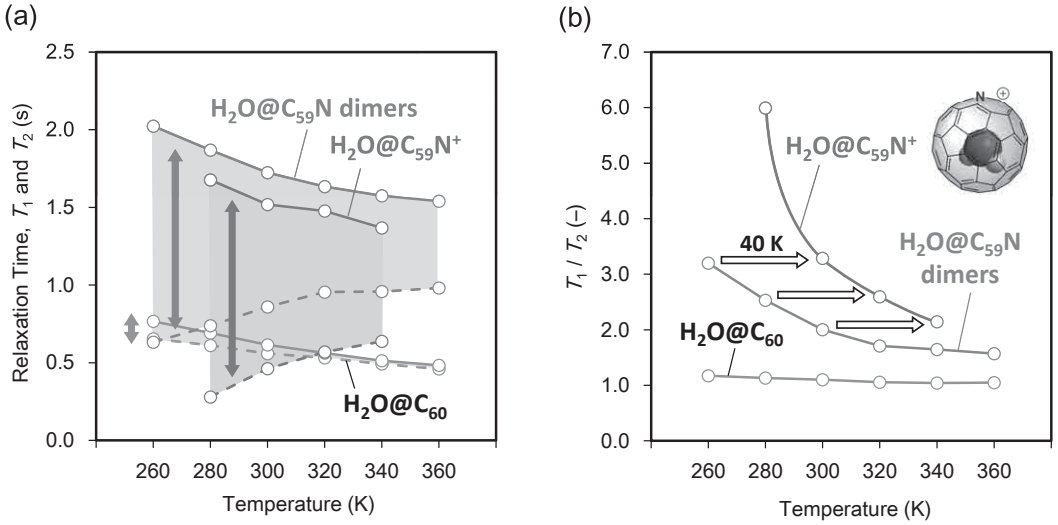


Figure 1. (a) Relaxation times T_1 (solid line) and T_2 (dashed line) and (b) relaxation time ratio T_1/T_2 at variable temperatures for $H_2O@C_{60}$, $H_2O@C_{59}N$ dimers, and $H_2O@C_{59}N^+$. The data for $H_2O@C_{60}$ and $H_2O@C_{59}N$ dimers were obtained at 500 MHz in ODCB-d_4. The measurements for $X@C_{59}N^+$ were conducted in TfOH containing a D_2O capillary for an external rock at 800 MHz equipped with a cryogenic probe system.

References

[1] (a) Rubin, Y. *Chem.–Eur. J.* **1997**, *3*, 1009−1016. (b) Murata, M.; Murata, Y.; Komatsu, K. *Chem. Commun*. **2008**, 6083–6094.

[2] Kurotobi, K.; Murata, Y. *Science* **2011**, *333*, 613−616.

[3] Hashikawa, Y.; Murata, M.; Wakamiya, A.; Murata, Y. *J. Am. Chem. Soc*. **2016**, *138*, 4096−4104.

[4] Kaneko, S.; Hashikawa, Y.; Fujii, S.; Murata, Y.; Kiguchi, M. *Chem. Phys. Chem.* **2017**, *18*, 1229–1233.

L5-3

セレン含有糖鎖の NMR による解析

○鵜澤　洵[1)]　島袋隼平[2)]、鈴木達哉[2)]、安藤弘宗[2,3)]、山口芳樹[1)]
[1)]理研 糖鎖構造、[2)]岐阜大 応用生物科学部、 [3)]岐阜大 生命の鎖統合研究センター

Analysis of seleno-carbohydrates using NMR spectroscopy

Jun Uzawa[1)], Junpei Shimabukuro[2)], Tatsuya Suzuki[2)], Hiromune Ando[2,3)], Yoshiki Yamaguchi[1)]
1) Structural Glycobiology Team, RIKEN, 2) Dept. Applied Bioorg., Chem. Gifu University,
3) G-CHAIN, Gifu University

Abstract

Chemically synthesized model carbohydrates are useful for understanding of the structure-function relationships. Seleno-carbohydrates are those in which the oxygen of the glycosidic bond or the hydroxyl group is replaced with selenium. Spin coupling constants such as $^{2\text{-}3}J(^{77}\text{Se}, ^{1}\text{H})$ must be useful for the conformational analysis. There are several papers discussing the relationship between $^{2\text{-}3}J(^{77}\text{Se}, ^{1}\text{H})$ and conformation, however only few reports are found describing $^{1\text{-}3}J(^{77}\text{Se}, ^{13}\text{C})$, which will be also useful. Here we tried to obtain the ^{77}Se coupling constants of seleno-carbohydrates from ^{77}Se-selective HR-HMBC and ^{77}Se satellites in 1D ^{13}C spectra and examined the conformation with Newman Projection scheme.

Introduction

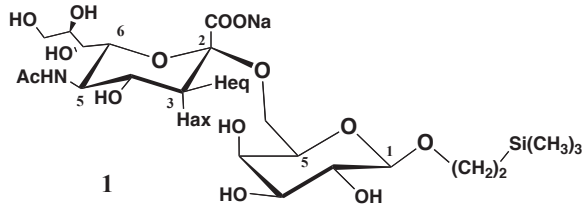
化学合成されたモデル糖鎖は、糖鎖の構造活性相関の理解に有用であり、関連研究は盛んに行われている。セレン含有糖鎖は糖鎖の水酸基やグリコシド結合の酸素がセレンに置き換わったものであり、X線結晶構造解析における位相決定などに利用されている[1)]。^{77}Se を対象とした NMR 研究は、その取組み易い側面を持っていることもあり関連報文も少なくないが[2,3,4,5,6)]、^{77}Se-NMR が糖鎖の研究に使われている例は限られている[2)]。演者らは 3 種類の合成セレノ単糖（**4**～**6**）、2 種類のセレノオリゴ糖（**2**, **3**）および **2** のセレン原子が酸素原子に置換されたオリゴ糖 **1** について検討を加えた。各種 NMR スペクトルを測定して ^{1}H と ^{13}C の帰属をした。^{1}H-^{77}Se スピン結合定数 $^{2\text{-}3}J(^{77}\text{Se},^{1}\text{H})$が得られれば、立体構造や配座について有益な情報をもたらす。これまでに $^{2\text{-}3}J(^{77}\text{Se},^{1}\text{H})$と立体構造との関係を議論した論文はあるが[5,6)]、同様に重要と考えられる $^{1\text{-}3}J(^{77}\text{Se},^{13}\text{C})$に関しての報告は少ない。そこで、本発表ではこれも含めて検討を加えた。$^{1\text{-}3}J(^{77}\text{Se},^{13}\text{C})$は 1D ^{13}C スペクトル中の ^{77}Se サテライトから求めた。$^{2\text{-}3}J(^{77}\text{Se},^{1}\text{H})$の算出には、糖鎖特有の信号の重なりを考慮して high resolution-HMBC (HR-HMBC-3)[7)]が最も適していると考えた。しかし、セレン原子が化合物中一つなら原法のままで良いが、化合物中複数のセレンが存在する場合は ^{77}Se 化学シフトの範囲の広さによるデジタル分解能の低下、あるいは長時間の測定時間が必要になる。そのため既にカーボン用に発表した ^{13}C-selective HR-HMBC のシーケンス[8)]の磁場勾配比率を変更して ^{77}Se-selective HR-HMBC のシーケンスとした。コンフォマーとの相関がより確立している $^{2\text{-}3}J(^{13}\text{C},^{1}\text{H})$と比較して、^{77}Se の J との共通点・相違点を考察した。

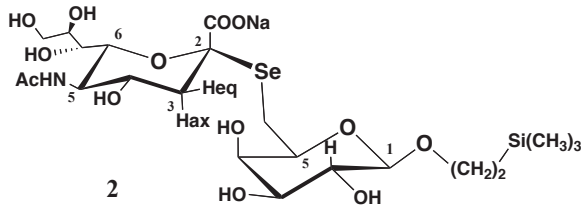
Key words : Seleno-carbohydrates, ^{77}Se-selective HR-HMBC, $^{1\text{-}3}J$(Se, H, C) and 3D structure

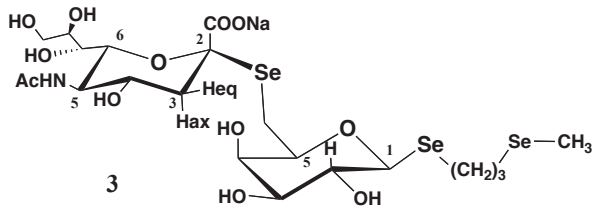
うざわじゅん，しまぶくろじゅんぺい、すずきたつや、あんどうひろむね、やまぐちよしき

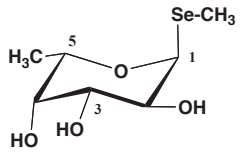
Experiments

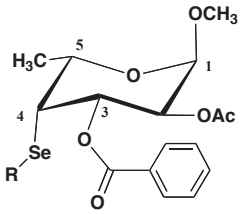
この研究に用いた試料を以下に示す。全ての試料は安藤らにより化学合成された[1)]。**1**〜**4** はシゲミ対称型試料管に D_2O（0.2 ml）に溶解し、**5** および **6** は $CDCl_3$ （0.6 ml）に溶解して測定した。 HSQC、^{13}C-HMBC、^{77}Se-HMBC、HSQC-^{1}H カップリングおよび 1D-NOE スペクトルは、TXI HCN Z 勾配プローブを備えた Bruker Avance 600 で行った。1D NOE 測定は SINC パルスを使用し、パルスの長さは 30 ms とし、アッテネータを減衰させることにより最も良い条件で測定した。一次元 ^{77}Se および ^{77}Se satellite ^{13}C スペクトルは、BBO プローブを備えた Avance 600 と TXI クライオプローブを備えた DRX-500 で測定した。



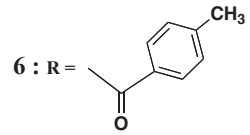








5 : R = CH_3



^{77}Se selective HR-HMBC スペクトルは、HCX-FG3 プローブを備えた JEOL-Resonance ECA-600 で行った。磁場勾配比率は ^{13}C-selective HR-HMBC のシーケンスにおいて GR-5 を 75%（^{13}C）から 62%（^{77}Se）へ変更した。^{77}Se selective パルスは REBURP 1 ms とし、アッテネータ値を調節した。 t_2 = 4092 ポイント、スペクトル幅 = 4 ppm、または t_2 = 8192 ポイント、スペクトル幅= 8 ppm とした。^{77}Se selective としたため、t_1 = 64 ポイント、スペクトル幅は全てのサンプルで 20 ppm とした。Scaling Factor (*n*)は全て 25 とした。繰り返し時間は 2.0〜2.2 秒、Low pass *J*-filter delay (d1)は 3.6 ms、1 / 2*J* に相当する待ち時間 (d2)は 60 ms とした。全てのスペクトルは 298 K で測定した。全てのスペクトルは ALICE Processing Software Ver-5 および Ver-6（JEOL）で処理した。

Results and Discussion

1　^{1}H, ^{13}C, ^{77}Se スペクトルの帰属と特徴

最初に ^{1}H と ^{13}C の帰属を各種測定法により行った。ガラクトースの H-6R と H-6S の帰属は大類則に拠った[9)]。セレノ糖鎖の化学シフトについて特徴を述べると、^{1}H シフトでは NeuAc α2-6 結合糖鎖の配座解析に重要な Gal 6 位のシグナルが、他のシグナルから高磁場シフトし、分離して観測された。^{13}C シグナルについても Se と直接結合したカーボンが NeuAc-2 や Gal-1 では約 20 ppm、Gal-6 については約 40 ppm 高磁場

シフトした。**2〜6** に含まれるセレンの帰属は ^{77}Se-HMBC により行った。

2　^{77}Se satellite ^{13}C 1D スペクトルによる $^{1\text{-}3}J$(Se,C)の算出

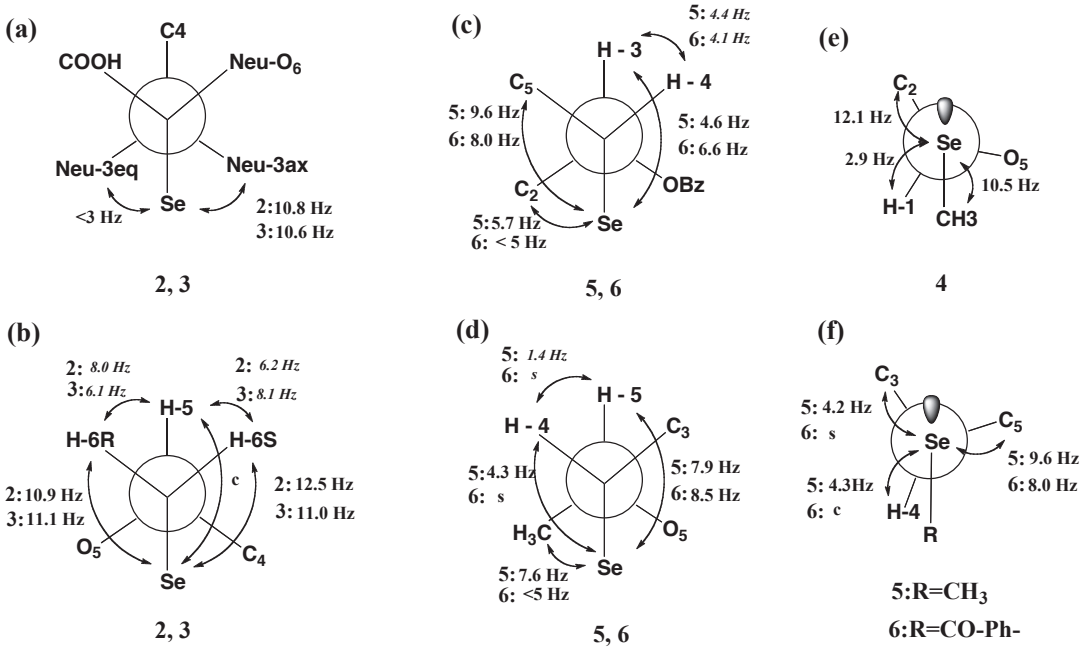
4、5、6 は分子全体の運動も速く、特に部分的に遅い運動部分も無いので、**^{13}C スペクトル中に**多くの ^{77}Se satellite が観測されたが、**3** では信号の広幅化などにより、^{1}J 以外は読み取ることができなかった。

3　^{77}Se selective HR-HMBC によるセレノ糖鎖各部分のスピン結合定数算出

各化合物について、^{77}Se の共鳴値をそれぞれ選択した ^{77}Se selective HR-HMBC スペクトルを測定し、HR-HMBC 法でなければ見ることはできない情報を得ることができた。誌面の都合でスペクトルは発表時に示すが、結論は次の Newman-projection による立体構造の考察の段落で論じるとし、いくつかの特徴を述べる。 **3** のセレン共鳴は 413 ppm、256 ppm、40 ppm と３つ得られた。^{77}Se(413 ppm)を選択した Selective HR-HMBC スペクトルで糖鎖の構造上興味深い、NeuAc-H-3 および Gal-H-6R と H-6S からのクロスピークが分離して得られた。しかし Gal-H-5 との関係は、複雑なパターンを示したために解析が不可能であった。またガラクトースの C1 に結合しているセレンの関わる J 値を求めることができた。Gal H-1 は溶媒ピークに隣接しているが、クロスピークでは ^{2}J(Se,H)値を読み取ることができた。同じく、セレノメチレンプロトン（2.1 ppm）部分も同様に読み取ることができた。プロトンシグナルが近接している 2.8-3.0 ppm（-Se-CH_2-）のメチレンを分離して読み取ることができた。一方で、Gal-H-2 部分は J 値を読み取ることが出来なかった。これは H-2 が 3.60 ppm であり H-3 の 3.61 ppm と極めて近接していることによるプロトン信号の複雑な分裂が原因と考えられる。スピンシュミレーションを試みたが、やはり複雑なスペクトルになった。

4　Newman-projection による立体構造の考察

今回得られた実験値を Newman-projection 上に表示した。NeuAc C3-C2 projection 図



In this figure, s mean small values, c mean complicate signals

(a) で示すように、Se-NeuAc-3ax とは **2**、**3** 共に ^{3}J(Se,H)が 10 Hz 以上と３ボンド gauche にしては大きめの値を示すのに対して、Neu-3eq とは 3 Hz 以下の値であった。これはカーボンの場合に確立している、Newman-projection 上、プロトンとカーボン

が gauche の関係で、プロトンの anti の位置に酸素など電気陰性度の大きい核がある時に見られる現象と同様であると考えられる [10]。ガラクトースの C6-C5 Newman-projection **(b)** では H-6R および H-6S とセレンとの関係を示しており、^{2}J(Se,H-6)値および ^{3}J(H-6,H-5)値が二つの化合物で微妙に異なる結果を得た。**(c)**と**(d)**に **5** および **6** の C4-C3 および C4-C5 の Newman-projection を示す。フコースの 4 位にセレンが結合しているが、その先が **5** はメチル基のみ、**6** は-CO-*p*-methyl-phenyl 基であるが、セレンとの ^{3}J(Se,H)値は両者の間に僅かの違いがあるものの、Karplus relation から大きくずれる小さい値であった。**(e)**で示すように **4** の H-1 とセレンの ^{2}J(Se,H) が 2.9 Hz と異常に小さい値を示したので、1D-NOE の結果を基に、ローンペアーと H-1 の projection を検討した。２ボンドのカップリング定数とローンペアーの二面角はゼロ度に近い配座にある存在確率が高いと見られるので、これによりこの 2.9 Hz という小さい値を解釈できる [6]。同様に、**(f)**には 4 位のセレンと周辺のプロトンおよびカーボンとの二面角をこの部分の NOE の結果と照合した。

Conclusion

酸素がセレンに置き換わったことによる近傍プロトンおよびカーボンの顕著な高磁場シフトは複雑でオーバーラップの多い糖鎖の NMR スペクトルの解析に有益であろう。スピン結合定数については以下のことが言える。 $^{1}J(^{77}Se,^{13}C)$に関しては混成軌道状態が基本であり、周囲の電子密度の変化が微妙に効いているように考えられた。$^{2}J(^{77}Se,^{1}H)$および $^{2}J(^{77}Se,^{13}C)$に関してはセレンのローンペアーとの配座による影響が大きいことを確認した。$^{3}J(^{77}Se,^{1}H)$ および $^{3}J(^{77}Se,^{13}C)$に関しては Karplus relation が支配的と見られたが、$^{3}J(^{77}Se,^{1}H)$は Newman-projection 図で 180 度でも 4.6-8.5 Hz と範囲が広く、これより小さいと考えられる gauche の関係にある NeuAc-3ax と ^{77}Se(413ppm) 間では 10.7 Hz と大きい値を示した。置換基効果などによる電子状態の影響で必ずしも dihedral angle だけでは説明できない結果となった。NMR スペクトロスコピーは溶液中における立体構造とダイナミックスに関する情報を同時に得られるという大きな特徴があり [11]、^{77}Se シフトと ^{1}H-^{77}Se および ^{13}C-^{77}Se スピン結合定数は糖鎖構造とそのダイナミックスの研究に貴重な情報を与えるパラメータと言えるだろう。

References

(1) T. Suzuki, et al, *Bioorg. Med. Chem.*, **2014**, 22, 2090.
(2) C. Harmark, et al, *Chem. Eur. J.*, **2014**, 20, 13905.
(3) H. Nakatsuji, et al, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1993**, 66, 3235.
(4) H. Duddeck, *Ann. Rep. NMR Spectrosc.*, **2004**, 52, 105
(5) K. E. Kövér, et al, *Magn. Reson. Chem.*, **2011**, 49, 190.
(6) Y. Y. Rusakov, et al, *Magn. Reson. Chem.,* **2011**, 50, 169.
(7) K. Furihata, et al, *Magn. Reson. Chem.*, **2010**, 48, 179.
(8) J. Uzawa et al, *The 53th NMR Symposium*, Osaka, **2014**, 160.
(9) H. Ohrui, et al, *J. Org. Chem.*, **1991**, 56, 1726.
(10) J. A. Schwarcz and A. S. Perlin, *Can. J. Chem.,* **1972**, 50, 3667.
(11) H. W. Spiess, *Macromolecules,* **2010**, 43, 5491.
H. W. Spiess, *The 52th NMR Symposium*, Kanazawa, **2013**, IL11.

L5-4

ベンチトップNMR実現に向けた超電導バルク磁石の開発

○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

Development of Superconducting Bulk Magnet for Bench-top NMR spectrometer

○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

In recent years there is also a price of liquid helium that is soaring, and bench-top NMR using permanent magnets attracts attention. The permanent magnet does not need refilling refrigerant and has various advantages such as high safety, but unfortunately it can not generate a magnetic field of 2 T (Tesla) or more. On the other hand, although NMR magnets using high-temperature superconductors have also appeared, attention is paid to a strong magnetic field (> 24 T), and it will be the future to become a conventional NMR magnet. We developed a superconducting magnet which is a high-temperature bulk superconductor (Eu-Ba-Cu-O), not a wire material, extremely compact, cryogen-free and movable with a stronger magnetic field (4.7 T) than a permanent magnet. We report on high resolution NMR observation successfully on this magnet.

近年、高騰する液体ヘリウムの価格もあり、永久磁石を用いたベンチトップNMRに注目が集まっている[1]。永久磁石には冷媒補給の必要もなく、クエンチの危険性もないため、安全性が高いなど様々な利点があるが、残念ながら2 T(テスラ)以上の磁場を発生することができず、化学シフトの分離能を上げることができない。一方、高温超電導体を用いたNMR磁石も現れてきているが、強磁場（>24 T）の開発が先行[2]しており、通常のNMR磁石として使えるようになるのは、まだまだ先のこととなる。一方、我々は線材ではなく、バルク状の高温超電導体（Eu-Ba-Cu-O）で、永久磁石より強磁場（4.7 T）で非常にコンパクト、移動も可能な無冷媒型超電導磁石(SCM: Superconducting Magnet)を開発[3]してきている。

本研究では、バルク磁石のみで構成される(Fig. 1a)から、上下端が外径64 mm, 内径32 mm, 高さ26 mm、中央部が外径64 mm, 内径40 mm, 高さ82 mmの全高134 mmのバルク内部に外径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4層、継ぎ目が重ならぬようにずらして巻いた円筒を作製し、内挿超電導円筒にすることで、我々が先に報告した超電導を捕捉する超電導体のc軸方向を直交させる組み合わせで磁石内部の磁場均一度が大幅に向上するというシミュレーション結果[4]から作製した磁石(Fig. 1b)を用意し、静磁場着磁法（FCM: Field Cooling Method）を用いて超電導磁石を作製した。着磁前にバルク温度を100 Kでコントロールし、

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

着磁用SCM内部でSCシムを用いて水のプロトン信号の半値幅が1 ppm以下になるよう調整し、減磁速度を0.3 A/min.に制御して4.75 Tに着磁した。減磁修了後のバルク磁石はφ8 mm試料管ファントムで、およそ10 ppmの磁場均一度を保持した。この磁石に対して以前に報告[3]した高分解能NMR測定用のプローブ、室温（RT: Room Temperature）シムコイル（$Z_1, Z_2, X, Y, ZX, ZY, XY, X_2\text{-}Y_2$）、試料回転装置、そして磁場ロックを用いて、このバルク磁石が高分解能NMR装置として利用可能か評価を行なった。

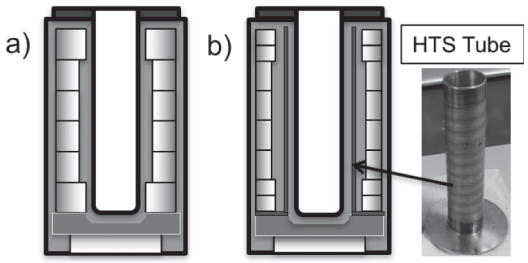


Fig. 1. Schematic View of Superconducting Bulk Magnet, a) Normal Cylindrical Magnet, b) New Design Magnet with HTS Tube

最終的に得られた^{1}H NMRスペクトルを示す(Fig.2a)。評価に用いた試料は永久磁石型装置でも分解能の指標によく使われているクロトン酸エチルで、Fig.2bは比較のために市販の270 MHz装置（Ex-270）で同一試料を測定したものである。RFプローブはφ5 mmに対応しているが、本研究のバルク磁石ではφ5 mmではシム調整により、良好なスペクトルが得られなかったので、シゲミ製の特殊マイクロNMRチューブ[5]で上部の外径はφ5 mm、測定部分の外径はφ4 mmの試料管を用いて測定した。観測されたスペクトルはスピンカップリングも市販装置と同様に分離して観測されており、本研究で開発したバルク磁石で高分解能NMRの観測が可能と証明できた。

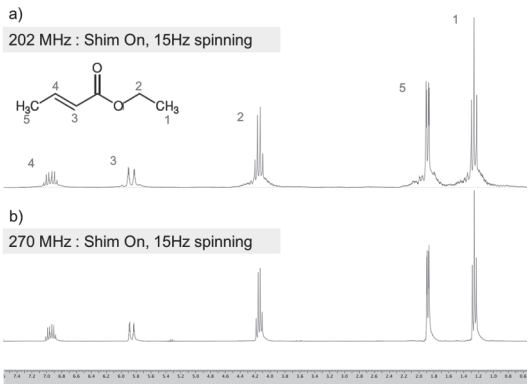


Fig. 2. Comparison of Ethyl Crotonate ^{1}H NMR Spectra of Bulk Magnets and Conventional Superconducting Magnets a) 202 MHz Bulk Magnet b) Conventional 270 MHz Superconducting Magnet

磁場均一空間の形成に関しては、設計時に必要な均一空間領域を想定して製作される従来型のSCMと違い、元となるSCMの静磁場均一領域をバルク体内部で誘起する電流分布によって磁場空間が再構成されるため、SCMの磁場不均一性やバルク体自身の不均一さなどを重畳したものとなり、従来の理想的な対称型の球面調和関数で設計されている室温シム（2次項まで）では完全に補正できない。特に、バルク体は配向した結晶成長を行うため成長方向に境界線ができ、径方向の不均一さを生み出す原因と示唆される。

いままでの超電導磁石とは全く異なるコンセプトの磁石で、高分解能NMRの観測に成功した。バルク磁石は単体では磁場発生ができないので、着磁用磁石も同時に開発する必要があるが、今回の4.75 T(202 MHz)の磁場強度は、昨年の報告5.5T(234 MHz)[6]にもあるように強磁場化も可能である。また、磁場を保つために必要な冷凍機の電力は1.2 kWと家庭用のドライヤーと同程度で、空冷式のためチラーも必要ない。従来の超電導磁石と違い、設置後の移動も簡単で、すでに広まりつつある永久磁石型装置と同様な利用方法で、かつ、超電導磁石の持つ強磁場が提供できる。

本研究は国立研究開発法人日本医療研究開発機構(AMED)の先端計測分析技術・機器開発プログラムに支援された。ここに深く謝意を表する。

Reference [1] Edwards, J.C. (2016) *Magn Reson Chem*, 2016. **54**(6): p. 492–3. [2] H. Maeda and T. Simizu (2016) *TEION KOGAKU* **51** (2016) 324–328 (in Japanese) [3] Nakamura, T. et al. (2015) *J. Magn. Reson.* **259** 68-75. [4] Fujishiro, H., et al. (2015) *Superconductor Science & Technology*, **28** (9). [5] http://www.shigemi.co.jp/page13 [6] 仲村ほか (2016) 第55回 NMR 討論会 326.

L5-5

非コードRNAとTLS/FUSタンパク質の相互作用様式と結合に伴うTLS/FUSの大きな構造変化

真嶋司[1,2], Hamad Nesreen[1,2], 小澤駿介[1,2], 渡辺大輝[3], 内橋貴之[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]名古屋大学・大学院理学研究科, [4]埼玉医科大学・ゲノム医学研究センター

Interaction of TLS/FUS with non-coding RNA and large structural change of TLS/FUS upon RNA-binding

Tsukasa Mashima[1,2], Hamad Nesreen[1,2], Shunsuke Ozawa[1,2], Hiroki Watanabe[3], Takayuki Uchihashi[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]*Graduate School of Science, Nagoya University*
[4]*Research Center for Genomic Medicine, Saitama Medical University*

Translocated in liposarcoma (TLS, also known as FUS) is an RNA/DNA-binding protein which is related to cancers and ALS. TLS also regulates transcription. It is assumed that upon binding of non-coding RNA, TLS/FUS undergoes closed to open large structural change, which causes the interaction with and inhibition of histone acetyltransferase, CBP/p300, resulting in repression of transcription. We identified that some domains of TLS and a 33-mer region of non-coding RNA are critical for TLS-RNA interaction. The mode of the interactions between these domains of TLS and 33-mer RNA were characterized by NMR. Assumed large structural change of TLS upon binding of non-coding RNA was demonstrated by FRET. Further insight on the structural change of TLS is being accumulated by AFM.

TLS(別名FUS)は多機能性のRNA及びDNA結合タンパク質で、癌や筋萎縮性側索硬化症(ALS)と関連する。DNAの光損傷に伴いサイクリンD1遺伝子の上流領域から転写された非コードRNAは、同遺伝子のプロモータに繋留され、TLS/FUSのC端側の核酸結合ドメイン(図1)と結合する。非コードRNAとの結合に伴いTLS/FUSは閉構造から開構造に構造遷移する事が予想されており、この構造変化によって露出したTLS/FUSのN端側のドメインがCBP/p300と相互作用してこれらのヒストンアセチルトランスフェラーゼ(HAT)活性を阻害し、転写を阻害すると考えられている(図2) (1)。最近この非コードRNAの全長塩基配列が決定され、TLSとの結合に特に重要な31残基からなる領域が決定された(2)。

今回我々はNMR法を用いた解析によって、31残基の非コードRNAの二次構造を決定し、5'側半分は1本鎖構造で、3'側半分はステムーループ構造をとる事を見出した(図3)。ケミカルシフトパータベーションを用いた解析から、非コードRNAの1本鎖構造領域とステムーループ構造領域は、TLS/FUS中の異なる核酸結合ドメインと相互作用する事が分かった。後者に関しては、TLSの当該核酸結合ドメインの構造を決定し、RNAとの複合体のモデルを構築した(図4)。

非コードRNA, タンパク質－RNA相互作用, 構造遷移

ましまつかさ, はまっどねすりん, おざわしゅんすけ, わたなべひろき, うちはしたかゆき, 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

次にTLS/FUSの両端にBFPタンパク質(FRETのドナー)とGFPタンパク質(FRETのアクセプター)を結合したものを調製した(図5)。非コードRNAが無い時にはFRETに由来したGFPの蛍光が観測され、TLS/FUSの両端が接近した系閉構造を形成している事が分かった。非コードRNAを加えるとGFPの蛍光強度の減少とBFPの蛍光強度の増加が見られ、両端の距離が広がった開構造に移行した事が示唆された。また高速AFMを用いた観測からも、非コードRNAの結合に伴うTLS/FUSの閉構造から開構造への遷移を示唆する結果が得られた。

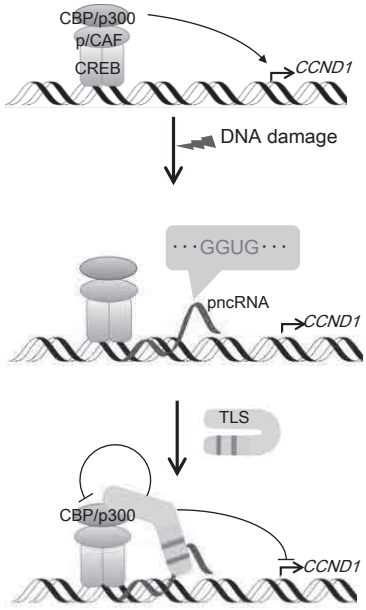


図 2 非コード RNA(pncRNA)との相互作用によって TLS に誘起される閉から開への構造変化に基づく CBP/p300 の活性阻害・*CCND1* の転写阻害

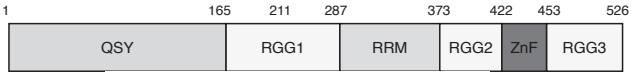


図 1　TLS のドメイン構造

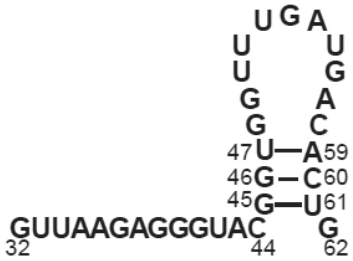


図 3　33-mer 非コード RNA の二次構造

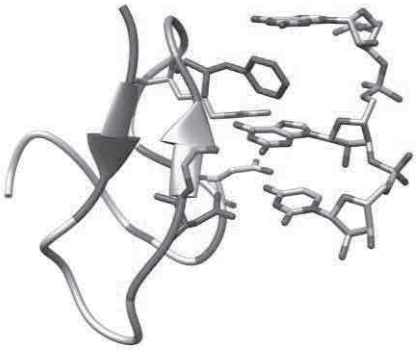


図 4 TLS の核酸結合ドメインと非コード RNA の複合体モデル

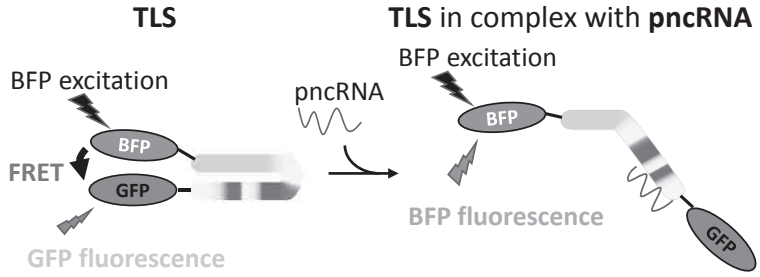


図 5 非コード RNA の結合に伴う TLS の大きな構造変化の FRET を用いた検出

References

(1) Wang, X., Arai, S., Song, X., Reichart, D., Du, K., Pascual, G., Tempst, P., Rosenfeld, M.G., Glass, C.K. and Kurokawa, R. (2008) ***Nature***, **454,** 126-130. "Induced ncRNAs allosterically modify RNA-binding proteins in cis to inhibit transcription"

(2) Yoneda, R., Suzuki, S., Mashima, T., Kondo, K., Nagata, T., Katahira, M. and Kurokawa, R. (2016) ***Cell Biosci.***, **6**, 4. "The binding specificity of translocated in liposarcoma/fused in sarcoma with lncRNA transcribed from the promoter region of cyclin D1"

L6-1

緩和速度の磁場依存性解析によるGタンパク質へのGDP結合の動的制御機構の解明

○外山侑樹[1,2], 加納花穂[1], 間瀬瑶子[1], 横川真梨子[1], 大澤匡範[1], 嶋田一夫[1]
1 東京大学大学院薬学系研究科
2 日本バイオ産業情報化コンシーシアム

Dynamic regulation of GDP binding to G proteins revealed by magnetic field-dependent NMR relaxation analyses

○Yuki Toyama[1,2], Hanaho Kano[1], Yoko Mase[1], Mariko Yokogawa[1], Masanori Osawa[1] and Ichio Shimada[1]
[1] *Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo*
[2] *Japan Biological Informatics Consortium (JBiC)*

Heterotrimeric guanine-nucleotide binding proteins (G proteins) serve as molecular switches in signaling pathways, by coupling the activation of cell surface receptors to intracellular responses. Mutations in the G protein alpha subunit (Gα) that accelerate guanosine diphosphate (GDP) dissociation cause hyperactivation of the downstream effector proteins, leading to oncogenesis. However, the structural mechanism of the accelerated GDP dissociation has remained unclear. Here, we use magnetic field-dependent NMR relaxation analyses to investigate the structural and dynamic properties of GDP bound Gα on a microsecond time scale. We show that Gα rapidly exchanges between a ground state conformation, which tightly binds to GDP and an excited conformation with reduced GDP affinity. The oncogenic D150N mutation accelerates GDP dissociation by shifting the equilibrium towards the excited conformation.

【背景】

ヘテロ3量体Gタンパク質は細胞表面の受容体と共役し、細胞外からの刺激を細胞内へ伝達する働きを有する分子である。ヘテロ3量体Gタンパク質はαサブユニット (Gα) 、βサブユニット (Gβ) 、γサブユニット (Gγ) からなる。刺激非存在時には、Gαにグアノシン-2リン酸 (GDP) が結合した不活性化状態にあるが、刺激を受容すると受容体によりGDPの解離反応が触媒され、細胞内に豊富に存在するグアノシン-3リン酸 (GTP) が結合した活性化状態に遷移することで下流のエフェクター活性化を制御する。Gタンパク質を介したシグナル伝達は、細胞のがん化に深く関与している。例えば、がん細胞において見出されたGαのD150N変異体は、GDP解離が受容体非存的に亢進することで恒常的に活性化状態になり、細胞増殖シグナルを過剰に誘起することでがん化を引き起こす。これまでに立体構造の観点から変異体においてなぜGDP解離が亢進しているかが調べられてきたものの、Asp150はGDPと直接結合する残基ではないことから、変異によってGDP解離が亢進する詳細な構造機構は不明であった。そこで本研究ではNMR法を用いて、Gαの発がん性変異体においてGDP解離が亢進する構造機構を明らかにすることを目的とした。

---

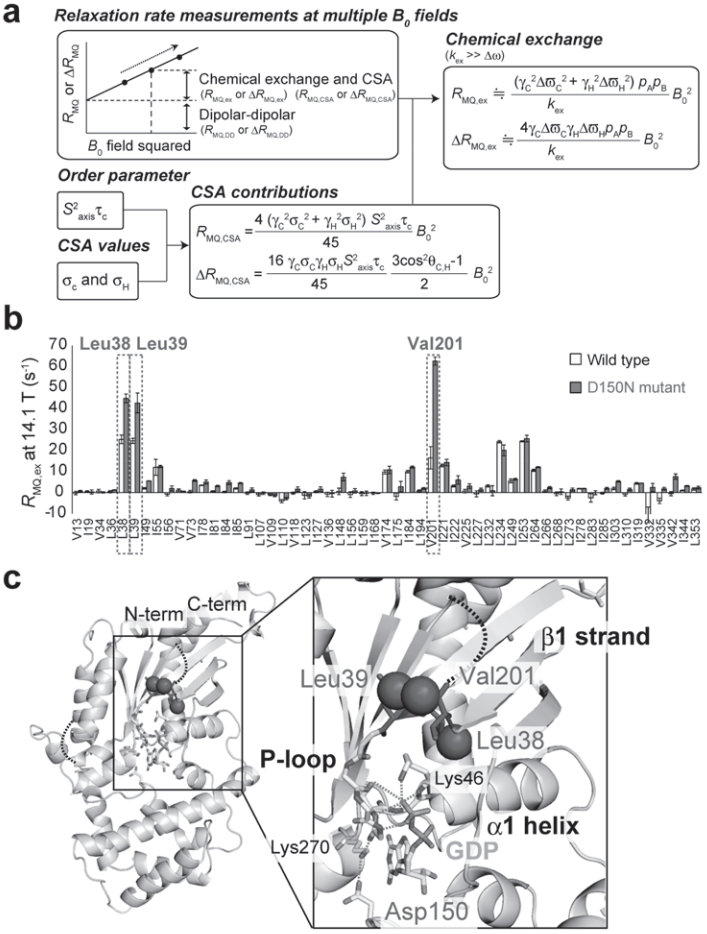
guanine-nucleotide binding protein, multiple quantum transition, methyl group

○とやまゆうき, かのうはなほ, ませようこ, よこがわまりこ, おおさわまさのり, しまだいちお

【結果と考察】

野生型とD150N変異体について、GDP結合状態の {u-^{2}H, Ileδ1, Leuδ2, Valγ2-[$^{13}CH_3$]} Gαを調製し、側鎖メチル基の^{1}H-^{13}C HMQCスペクトルを比較した。観測された化学シフト変化量は最大0.1 ppmと小さく、また化学シフト変化が観測されたメチル基はGDP結合部位近傍に集中していなかったことから、GDP結合部位の静的構造は大きく変化していないことが分かった。

そこで、GDPの解離がGαに内在する動的構造の違いに起因するかどうかを調べることとした。高分子量タンパク質においても高感度に測定可能な側鎖メチル基の^{1}H-^{13}C 多量子遷移の緩和速度 (R_{MQ}) を対象として、測定磁場強度依存的なR_{MQ}の増大からマイクロ秒オーダーの構造平衡に起因する緩和の寄与 ($R_{MQ,ex}$) を算出した (Fig. a) 。野生型とD150N変異体について、各メチル基の$R_{MQ,ex}$の寄与を比較したところ、D150N変異体ではGDP結合部位に隣接するβ1ストランド上のLeu38, Leu39、ならびにβ3ストランド上のVal201に顕著な$R_{MQ,ex}$の増大が観測されていることが分かった (Fig.b, c)。



Figures (a) Schematic representation of the magnetic field-dependent MQ relaxation analyses. (b) Plots of the $R_{MQ,ex}$ rates of the wild type (white) and those of the D150N mutant (gray) at 14.1 Tesla. (c) Expanded view of the Leu38, Leu39, and Val201 methyl groups in the crystal structure of Gα (PDB ID: 1GDD). The methyl carbons are shown as gray spheres. Lys46, Lys270, and Asp150 are shown as sticks.

観測された$R_{MQ,ex}$の変化がGDPの解離速度の変化と関連したものであるかを調べるため、GDP解離を抑制するGoLoco14ペプチド結合状態においても同様の解析を行ったところ、ペプチド結合状態ではβ1ストランド上の$R_{MQ,ex}$が減少しており、構造平衡が抑制されていることが示された。

以上の結果から、Gαに内在する構造平衡はGDPが安定に結合した基底状態と、GDPが解離しやすい活性化状態との間の遷移を反映していると考察した。そして、D150N変異体では活性化構造をとる割合が増大することによりGDPの解離が促進されることが示唆された。以上の考察から、GDPの結合はGαに内在する構造平衡の遷移によって制御されるという動的制御機構を提唱した。

【参考文献】

Toyama, Y., Kano, H., Mase, Y., Yokogawa, M., Osawa, M., and Shimada, I. (2017) Dynamic regulation of GDP binding to G proteins revealed by magnetic field-dependent NMR relaxation analyses. *Nature Communications* **8**, 14523.

L6-2

アゾベンゼン結合タンパク質の光異性化反応による変性メカニズム

○長島敏雄，植田啓介，山崎俊夫
理化学研究所・ライフサイエンス技術基盤研究センター

Denaturation mechanism induced by photo-isomerization of azobenzene-crosslinked protein

○Toshio Nagashima, Keisuke Ueda, Toshio Yamazaki
RIKEN Center for Life Science Technologies

Azobenzene (AB)-crosslinked protein GB1 was converted to native and denatured structures by photoisomerization at *trans*- and *cis*-AB, respectively. The protein GB1 in *cis*-AB form was distributed into two isolated conformations depended on the sample temperature. At lower temperature, structure of *cis*-protein GB1 was distorted native structure, on the other hand, at higher temperature, was partially unfolded structure retained α-helix and β-hairpin structure; and furthermore putatively a hydrophobic core surrounded these secondary structures. The photoisomerization of the azobenzene-cross-linker possesses the ability for switching the denaturation temperature.

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(AB)架橋剤の*cis-trans*異性化反応による大きなジオメトリー変化を用いる場合、通常のサンプル条件で架橋した部位特異的に変性させることが可能になる。これは、まるでタンパク質構造を指でつまんで操作する様である。また、AB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。ストップドフローのような一方向の状態変化ではないため、NMRに適した方法である。例えば、この構造変換をNOESYの緩和遅延時間と混合時間内にそれぞれ一方向に起こすことで、一般的な化学交換と似た2構造間の同一核間に対応する交差ピークが、対角に対して非対称に得られる。この方法をもとに、既知構造から変性未知構造の化学シフト情報を得る方法(構造相関NMR法)は報告済みである[1]。

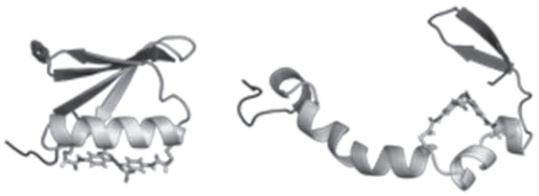


Fig. 1. Model structures of AB-crosslinked protein GB1 in *trans*-form (left) and in *cis*-form (right)

今回、この手法を用いてGB1タンパク質のヘリックス上の2残基のシステイン変異部に2,2′-bis(sulfonato)-4,4′-bis(chloroacetamido)azobenzeneを共有結合させ、立体構造を変化させることに成功した。*trans*構造は天然構造に近い状態で、分離の良いNMRスペクトルが得られたが、*cis*構造はABによる距離変調を受け変性している。この変性構造は、3M urea存在下で変性させた場合のNMRスペクトルとは異なっていた。

そこで、構造相関NMR法を用いて*cis*状態の変性構造の帰属を行った。用いたパルスシークエン

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，やまざきとしお

スは、HNCO、CBCACONH、NOESY-HSQC、HSQCを改良して、適切な展開時間を挟むように2種類の光を照射することで、挟まれた展開時間においてcis構造の化学シフト、観測時間にはtrans構造になるようにした。Fig. 2上段に示したパするシークエンスは、標準的なNOESY-^{15}N-edited HSQCのrelaxation delayにUV光、mixing timeに青色光を照射するようにしたものである。展開時間t1を挟むようにcis構造を作ったので、Fig. 2下段のスペクトルのF1方向にdiagonal peakとは別にcis構造由来のcross peakが現れている。このようにして、信号分離の良いtrans構造の帰属をもとに分離の悪いcis変性構造のHN、N、HA、CA、CB、Cの化学シフトの帰属を行った。結果、cis構造には2つのコンフォメーションが存在しており、温度依存的にポピュレーションが相互に変化することが分かった。主鎖の帰属結果を用いて、SSPによる二次構造予測とRCIによるランダムコイル解析を行った。trans構造では、すでに報告されているGB1タンパク質の天然構造とよく一致する予測結果が得られた。

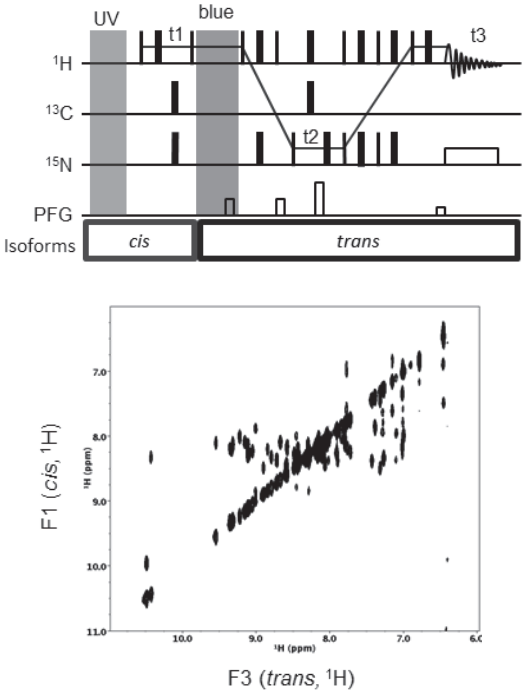


Fig. 2. Structure Correlation NMR spectrum and a pulse sequence for assignment of HN proton in *cis*-form.

一方で、30℃のcis構造において、αヘリックスのN末側、β3-β4で比較的SSPのスコアが高く二次構造が維持されているものの、全体に二次構造が消失している。また、β3-4のRCIが高いことからβ3-4がヘアピン構造を維持していることもわかる。この点は、これまでの研究から報告されているGB1の変性状態におけるβ3-4によくみられる共通点である。10℃のcis構造においては、AB結合点のシステイン残基周辺以外では、trans構造と比較して化学シフトで大きな違いはない。つまり、システイン残基の側鎖のコンフォメーションがcis構造に最適化されるだけで、タンパク質の主鎖の構造にはあまり影響していないことがわかる。円二色性スペクトルの温度依存測定から、transとcis構造の変性温度が、それぞれ40-70℃、20-30℃と異なることが分かった。ABによるタンパク質の2点間の距離変調は、タンパク質の変性温度を下げる効果があると結論付けた。

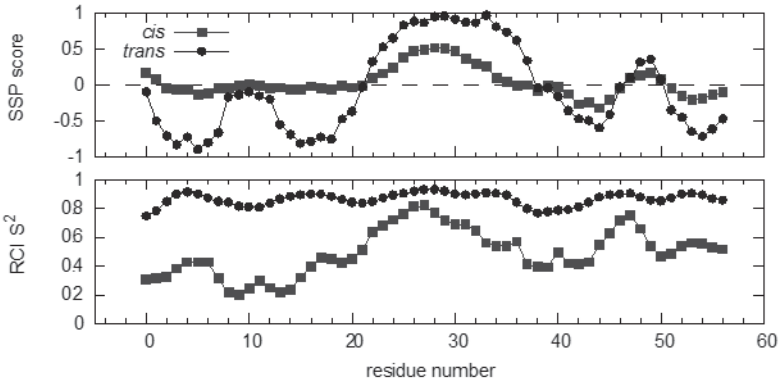


Fig. 3. An analysis of the secondary structure and random coil of AB-crosslinked protein GB1 at 30°C.

References

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

L6-3

藍色細菌由来の低分子量熱ショックタンパク質 Orf7.5 の構造機能相関

○森田勇人[1]、大宮永行[1]、石川南都子[2]、田中直樹[2]、林　秀則[3,4]、仲本　準[2]
1城西大学・理学部化学科
2埼玉大学・理工学研究科
3愛媛大学・プロテオサイエンスセンター
4愛媛大学・理工学研究科

Structural studies of cyanobacterial small heat shock protein Orf7.5 from *Synechococcus elongatus* PCC 7942.

Hayato Morita[1], Nagayuki Omiya[1], Natsuko Ishikawa[2], Naoki, Tanaka[2], Hidenori Hayashi[3,4], Hitoshi Nakamoto[2]
[1] *Department of Chemistry, Faculty of Science, Jyosai University*
[2] *Graduate School of Science and Engineering, Saitama University*
[3] Proteo Science Center, Ehime University
[4] *Graduate School of Science and Engineering, Ehime University*

In cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942, gene orf7.5 encodes the small heat shock protein. Orf7.5 is composed of 63 amino acid residues, and plays an indispensable role in growth and survival under heat stress. The mutant in which this gene is disrupted, shows remarkably high heat sensitivity. Until now, Orf 7.5 may regulate the expression of groESL1. However, the molecular mechanism between the structure and the function of Orf7.5 is not clearly understood. To clear this problem, we have analyzed the interrelationships between the physiological properties and physicochemical properties of Orf7.5 with chaperon activity measurements, and MALDI TOF-MS, UV-CD and heteronuclear multidimensional NMR spectral measurements. From these results, we have proposed the functional role of Orf7.5 for the cyanobacterial heat shock stress response.

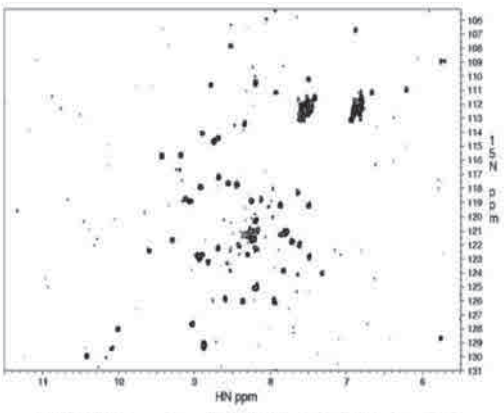
藍色細菌*Synechococcus elongatus* PCC 7942のゲノム中には、低分子量熱ショックタンパク質Orf7.5をコードする遺伝子が存在する。Orf7.5は、63アミノ酸より構成されているが、その生理学的機能には不明な点が多い。しかし、*orf7.5*を欠損した株では、高い熱ストレス感受性を示すことから、Orf7.5は、熱ストレス下での生存・生育に必須であると考えられている(1)。特に*groESL*オペロンの発現量が著しく低下されていたことから、*groESL*などの分子シャペロンの発現調節に関わっている可能性が示唆されている。一方で、Orf7.5が分子シャペロンとしての活性を保持している可能性も示唆されており、本研究では、Orf7.5の生理活性、特に分子シャペロン活性について明らかにするとともに、その生理活性がどのような分子構造に基づいて発現しているかを解析することを目的とした。Orf7.5が分子シャペロンとして生体中で機能していることを確認できれば、これまでに同定されているシャペロン機能を持つタンパク質の中では最小のものであることから、様々なシャペロン活性を持つタンパク質の分子進化の起源の解明につながる可能

Small heat shock protein, *Synechococcus elongatus* PCC 7942, Orf7.5

○もりたはやと、おおみやながゆき、いしかわなつこ、たなかなおき、はやしひでのり、なかもとひとし

性が期待される。

Orf7.5は、そのままでは、大腸菌中で封入体として発現されたため、pCold Pro S2 ベクターを用いて、ProsS2タンパク質との融合タンパク質としてコールドショック条件下で発現させることで可溶化することに成功した。得られたタンパク質は、ニッケルカラムに結合させ、FactorXaを作用させることで、Orf7.5を溶出させ、直後にBenzamidineFFカラムを通すことで,可溶性 Orf7.5を得た。



^{1}H-^{15}N HSQC spectrum of Orf7.5 (digested with fused protein)

また、封入体として発現したOrf7.5は、8M尿素で可溶化下後、透析によりリフォールディングを行ったところ同様に、可溶化したタンパク質を得ることに成功した。両者の^{1}H-^{15}N HSQCスペクトルの比較を行ったところ、大きな違いは見られなかったことから、ほぼ同様の立体構造を取っている可能性が示唆された。

現在、両者のシャペロン活性の比較、TOF-Mass、UV-CDスペクトルの比較を行うことで、溶液構造解析に最も適しているOrf7.5試料の大量発現・精製法の確立を進めており、その結果について報告する予定である。

References

(1) Nakamoto H, Tanaka N, Ishikawa N. *J Biol Chem*. **276**:25088-25095, 2001.

L6-4

In-cell NMR実験の質や再現性を直接左右する最もcriticalな実験パラメータの同定

○杉木俊彦[1]，山口良弘[2,3]，藤原敏道[1]，井上正順[3]，伊藤隆[4]，児嶋長次郎[1,5]
1大阪大学・蛋白質研究所
2大阪市立大学・複合先端研究機構
3ラトガース大学
4首都大学東京・理学研究科
5横浜国立大学・工学研究科

Identification of experimental parameters of which critically influence detectability and resolution of *Escherichia coli* in-cell NMR spectra.

○Toshihiko Sugiki[1], Yoshihiro Yamaguchi[2,3], Toshimichi Fujiwara[1], Masayori Inouye[3], Yutaka Ito[4], Chojiro Kojima[1,5]
[1] *Institute for Protein Research, Osaka University*
[2] *The OCU Advanced Research Institute for Natural Science and Technology, Osaka City University*
[3] *Department of Biochemistry and Molecular Biology, Rutgers University*
[4] *Graduate School of Science, Tokyo Metropolitan University*
[5] *Graduate School of Engineering, Yokohama National University*

The in-cell NMR technique offers significant insights into the structure and function of heterologous proteins in the physiological intracellular environment at an atomic resolution. *Escherichia coli* (*E. coli*) is one of the most widely used host cells for heterologous protein expression as well as for in-cell NMR studies of protein of interest. In many cases, it is not easy to obtain well-resolved in-cell NMR spectra because the detectability and resolution of these spectra are significantly influenced by intracellular factors such as nonspecific intermolecular interactions. In this study, we reexamined the experimental parameters of *E. coli* in-cell NMR and found that the detectability and resolution of the NMR spectra clearly depend on the growth phase of the host cells at the timing of starting induction of protein over-expression and length of cell cultivation period during the protein over-expression.

In-cell NMR測定法は，生体内のmolecular crowding環境中における解析対象分子の立体構造や動的ダイナミクスなどについて，原子レベルでの解析を可能にする技術であり，いわば生体分子の生きた姿を原子レベルで写活することのできる構造生物学的手法である。

大腸菌，酵母，昆虫，哺乳動物などの細胞を用いてin-cell NMR測定を行う基盤技術が確立されている．原核細胞である大腸菌はあくまでも細胞質の生理的環境を提供するに過ぎないが，解析対象分子の安定同位体標識のバリエーションやコスト，実験操作の手軽さなどから，目的蛋白質の性状や実験の目的等によっては依然として有用性が高い．

NMRシグナルの広幅化を可能な限り抑えて，かつ可能な限り完全数のin-cell NMRシグナルを高い再現性で測定することがin-cell NMR実験において重要である．これまでに，in-cell NMRスペク

In-cell NMR，大腸菌

○すぎきとしひこ，やまぐちよしひろ，ふじわらとしみち，いのうえまさより，いとうゆたか，こじまちょうじろう

トルの質に影響を与える実験パラメータを探索した報告例はあるものの[1)], 報告されている実験パラメータの影響の大きさは限定的であり, 高質のin-cellスペクトルを高い再現性で与えるうえで真に本質的なファクターが同定されたとは言い難い状況であった．そのため，正確性や信頼性の高いin-cell NMR実験をセットアップするための条件設定の方向性に明確な指針がない状況であった．

本研究では，大腸菌を宿主としてin-cell NMRの実験パラメータを網羅的かつ詳細に再検証し，高い質のin-cell NMRスペクトルを高い再現性で観測するうえで本質的にcriticalな実験パラメータを明確に同定することを試みた．

大腸菌発現系にて目的蛋白質を発現させる際にコントロール可能なパラメータは，発現系の種類(pET発現系かpCold発現系か等), 培地の成分, 培養時の温度, 大腸菌菌体の濁度, 発現誘導剤IPTGの濃度，発現誘導時間の長さなどであり，またin-cell NMR測定時においてはNMR試料管に大腸菌菌体を充填する際の菌体量，^{2}Hロックのための重水の濃度などがコントロール可能である．それぞれのパラメータを様々に変えてin-cell NMR測定を行ったところ，「目的遺伝子の発現の誘導をONにする時点(IPTGを添加する時点)での大腸菌の濁度」がin-cell NMRスペクトルの質を直接的にかつ最も大きく左右することを見出した(Fig. 1).

それに次いでin-cell NMRスペクトルの質を直接左右するパラメータは，「目的遺伝子の発現誘導時間の長さ(IPTG添加後から培養終了までの時間の長さ)」であった．そしてこの2つのパラメータを最適化することが，再現性よく質の高いin-cell NMRスペクトルを観測するうえで最も影響が大きいことがわかった．

GB1, TTHA1718, Calmodulinなど複数種類の蛋白質で同様の傾向が認められたことから，「発現誘導スタート時の大腸菌の濁度」および「発現誘導時間の長さ」は，発現させる蛋白質の種類によらず重要なパラメータであることがわかった．

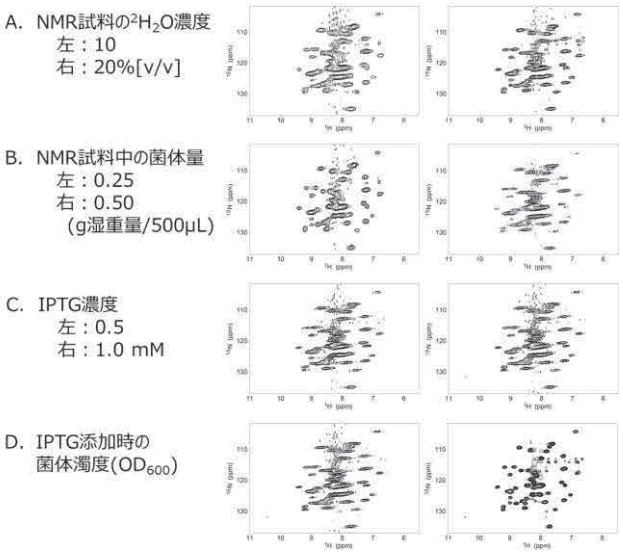


Fig. 1. Investigation of the experimental parameters for *E. coli* in-cell NMR measurements, the $^{2}H_2O$ concentration of the NMR sample (A), the cell density in a NMR sample (B), dose of isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) (C), and the cell density during cell culture (OD_{600} value) at the time of the addition of IPTG (D).

宿主細胞の培養の条件，その中でも「発現誘導時の細胞増殖のフェーズ」や「誘導時間の長さ」など“目的遺伝子の発現誘導に直接関連するパラメータ”がin-cell NMRスペクトルの高い質・再現性を最も大きく左右するファクターであることは，すなわち，目的蛋白質のin-cell NMRスペクトルは宿主細胞内の環境を鋭敏に反映するということも示唆する．当日の発表では，in-cell NMR実験において最適化すべき最も重要なパラメータについての議論に加えて，in-cell NMRは宿主細胞内の環境やそこで起きている生物学的イベントを鋭敏にモニターする手法としても優れている可能性についても議論したい．

Reference

1) Serber Z, Ledwidge R, Miller S, Dötsch V (2001) *JACS* **123:** 8895-8901

L6-5

長鎖機能性ノンコーディングRNA, SINEUPの構造解析

○大山貴子[1]，高橋葉月[1]，　Piero Carninci[1]，山崎　俊夫
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

Structure analysis of long functional non- coding RNA, SINEUP

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

In recent years, none-coding RNAs come under limelight, because those RNAs have functions such as controlling transcription, protein expression etc. Antisense RNA of mouse Uchl-1 is one of a functional non-coding RNA that increase protein expression[1]. But the mechanism is unclear. AS Uchl-1 includes a SINE B2 element, which is essential for the function. So, we are aiming to reveal the mechanism of protein expression enhancement by AS Uchl-1 from the viewpoint of structural biology.

近年、ノンコーディングRNAが転写や翻訳の制御に関与している例が数多く報告されている。これらの機能性ノンコーディングRNAの一つにSINEUPがある。SINEUPはマウスのユビキチンカルボキシ末端加水分解酵素UCHL-1のアンチセンスRNA(AS Uchl-1)から見いだされ、UCHL-1タンパク質の発現量を増幅させることが報告された。AS Uchl-1にはSINE B2が含まれている。AS Uchl-1の部分欠損実験から、タンパク質の発現量の増加にはこのSINE B2が関与していることが示された。しかし、SINEUPの詳細な作用機構は不明である。そこで我々は、SINE B2の構造解析と作用機序を解明することを目的としている。

SINE B2は165残基(MW ～56,000)から成り、構造を形成している部分が未知であったため、我々はまずはじめにRNA二次構造予測プログラムRNAfoldを用いてSINE B2の二次構造予測を行った。得られた2次構造をFig. 1に示す。そしてこの構造を元に、部分構造に断片化したRNAを設計した。設計した各RNA断片と全長のSINE B2はT7 RNA ポリメラーゼを用いて試験管内転写法により大量調製した。それらのRNA断片と全長のSINE B2について^{1}H 1D NMR スペクトルを測定した。これらの断片のうち、全長を2分割にしたfragment A(75 nt, Fig. 1A)とfragment B(97nt,Fig 1B)のイミノプロトンシグナルが観測される10－15 ppmの領域を比較しをFig. 2に示す。Fragment AとBは全長のSINE B2と化学シフト値がほぼ一致した。このことからfragment AとBは全長のSINE B2の部分構造であると考えられる。

そこで我々はさらに、Fragment AとBののNOESYスペクトルを測定し、二次構造を形成している部分を同定した。Fragment Aは12塩基対からなるステム構造を形成する部分(Fig. 1 a2)があることが分かった。NOESYスペクトルから確認された2次構造と2次構造予測プログラムから得られた2次構造を比較すると、NMRでは2次構造形成が確認できない領域(Fig. 1

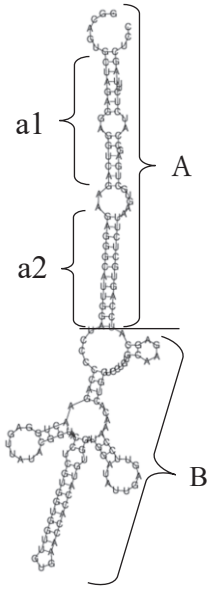


Fig.1　Schematically drawing of SINE B2 predicted by RNAfold.

long non-coding RNA

○おおやまたかこ、たかはしはづき、ぴえろかるにんち、やまざきとしお

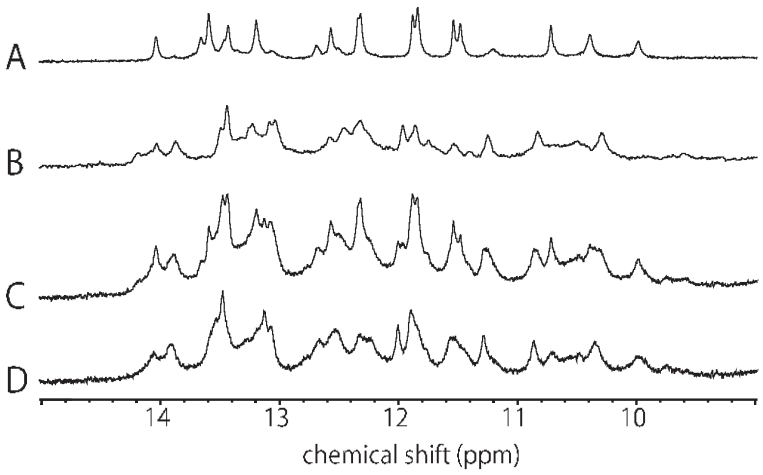


Fig.2 Imino proton region of SINEB2 fragments. A fragment A, B fragment B, C sum of A and B, D full length SINE B2.

a2)があった。そこで、fragment Aをさらに断片化した。その結果、a1の領域にはイミノプロトンは観測されるものの、明確なNOEは観測されず、安定なステムは形成されていないことが示唆された。

Fragment BはNOESY解析の結果、2次構造予測で予測された3つのステムループと１つのステムのうち２つのステムループと１つのステムを持つことが明らかとなった。しかし、2次構造予測とNMR解析の結果が一致しない領域も含まれていた。また、fragment AとBの境界には、2次構造予測では比較的おおきなバルジ構造が予測されたが、この部位は、fragment Bのステムの安定性に寄与していることが示された。このことから、SINE B2には2次構造予測では未知の3次構造の形成が示唆される。

まとめ

全長165残基の構造未知の機能性ノンコーディングRNAについて、2次構造予測プログラムとNMRを用いて2次構造を推定した。得られた2次構造は2次構造予測では得られない3次構造が形成されていることが示唆された。

Reference

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

L6-6

トリガーファクターシャペロン二量体のNMR立体構造解析

○斉尾 智英[1,2,3], 川越 総一郎[2], 久米田 博之[4,5], 石森 浩一郎[1,2], Charalampos G. Kalodimos[6]
[1]北海道大学 大学院理学研究院
[2]北海道大学 大学院総合化学研究院
[3]JST・さきがけ
[4]北海道大学大学院 先端生命科学研究院
[5]北海道大学 国際連携研究教育局 ソフトマターグローバルステーション
[6]Department of Structural Biology, St. Jude Children's Research Hospital, TN

NMR structural study of dimeric molecular chaperone Trigger Factor

○Tomohide Saio[1,2,3], Soichiro Kawagoe[2], Hiroyuki Kumeta[4,5], Koichiro Ishimori[1,2], Charalampos G. Kalodimos[6]
[1]*Graduate School of Science, Hokkaido University*
[2]*Graduate School of Chemical Sciences and Engineering, Hokkaido University*
[3]*PRESTO, JST*
[4]*Graduate School of Life Science, Hokkaido University,*
[5]*Global Station for Soft Matter, Global Institute for Collaborative Research and Education, Hokkaido University*
[6]*Department of Structural Biology, St. Jude Children's Research Hospital, TN*

Molecular chaperones play key roles in the cell to maintain protein homeostasis by preventing protein aggregation or by helping newly synthesized protein to fold into its native state. Trigger Factor (TF) is one of the most popular and the best-studied bacterial molecular chaperone. TF forms a 96 kDa dimer in solution but monomerizes upon binding to the ribosome or to an unfolded protein substrate. Although the detailed mechanisms for substrate recognition of TF has been unveiled by previous structural studies, the mechanisms of dimerization and regulation of monomer-dimer switching has long been obscured due to the scarcity of the detailed structural information of the dimer. Relatively weak and dynamic interaction and larger molecular weight have prevented detailed structural study. Here we show our recent results of the structural study on the TF dimer by solution NMR equipped with paramagnetic spin labeling as well as methyl-specific isotope labeling.

【序論】

分子シャペロンは新生タンパク質の折りたたみや輸送の補助，凝集抑制などによってタンパク質新生や品質管理といった生命の基本的なプロセスにおいて重要な役割を果たす (1). 細菌の細胞質で機能するリボソーム結合型シャペロン，トリガーファクター (Trigger Factor: TF) は ribosome-binding domain (RBD: 1-112), peptidyl prolyl isomerase domain (PPD: 150-246), substrate-binding domain (SBD: 113-149, 247-432), の3つのドメインから構成され (Fig. 1), 新生タン

シャペロン，マルチドメインタンパク質，PRE

○さいおともひで，かわごえそういちろう，くめたひろゆき，いしもりこういちろう，かろでぃもすちゃららんぽす

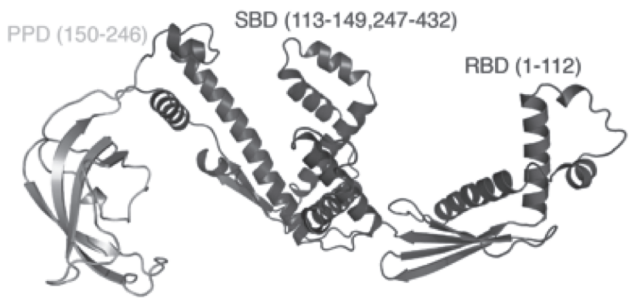


Fig. 1 Structure of *E. coli* TF (PDB ID 1W26).

パク質の輸送や折りたたみを補助し，凝集を抑制するなどといった多彩な機能を持つ． 我々のこれまでの研究によって，TFは4箇所の基質結合サイトを用いて変性状態の基質タンパク質を認識し，基質タンパク質の疎水性領域を互いに引き離した状態に保持することによって凝集やミスフォールディングを抑制することが明らかになるなど，TFによる基質認識や抗凝集活性のメカニズムについては理解が深まりつつある (2)．しかしTFによる折りたたみ補助のメカニズムはほとんど理解が進んでいなかった．また，TFは溶液中で比較的弱い二量体を形成し，リボソームや基質となる変性状態のタンパク質との結合によって単量体へと解離する (Fig. 2). GroEL (14量体) やSecB (四量体), Hsp90 (二量体) など多量体を形成するシャペロンは多いが (1,3), その多くが安定な多量体を形成する．単量体-二量体の平衡において機能するTFは多量体化の観点からも特徴的なシャペロンであるが，TFの二量体形成のメカニズムや機能上の役割などについてはほとんど明らかになっていなかった．そこで本研究ではTF二量体に対する溶液NMRを用いた立体構造解析に取り組み，二量体形成のメカニズムや，二量体化を伴った基質の折りたたみ促進のメカニズムの解明を目指した．

【結果・考察】

NMR測定にはメチル基選択的安定同位体標識TFを用いた．TFにMTSLスピンラベルを導入しparamagnetic relaxation enhancement (PRE) 効果を観測した結果，多くの信号から分子間PREが観測された．変性状態の基質タンパク質の滴下によって分子間PREが解消したことから，基質タンパク質との結合が二量体化を阻害することが示された (Fig. 2)．MTSLの導入部位を変えた3通りのTFサンプルに対してPREを観測し，分子間の長距離情報を取得した．加えてメチル基間のNOEを観測し，分子間および分子内の束縛条件を取得した．PREとNOEに基づいて立体構造計算を行った．立体構造解析の結果，TF上の基質結合サイトの一部が二量体形成に用いられており，基質結合と二量体化が競合していることが示唆された．発表では，立体構造解析に加え，TFの二量体化を伴った基質放出と折りたたみ促進のメカニズムなどについても議論する．

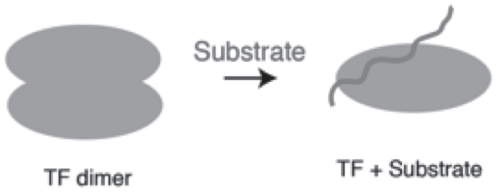


Fig. 2 Monomerization of TF upon binding to the unfolded substrate.

【References】

(1) Hartl FU, Bracher A, Hayer-Hartl M. Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature*, 475, 24-32, 2011.

(2) Saio T, Guan X, Rossi P, Economou A, Kalodimos CG. Structural basis for protein antiaggregation activity of the trigger factor chaperone. *Science*, 344, 1250494, 2014.

(3) Huang C, Rossi P, Saio T, Kalodimos CG. Structural basis for the antifolding activity of a molecular chaperone. *Nature*, 537, 202-206, 2016

L6-7

F_1F_2-selective NMR spectroscopy

Erik Walnda[1]，森本大智[2]，白川昌宏[2]，○菅瀬謙治[2]
1京都大学・大学院医学研究科
2京都大学・大学院工学研究科

F_1F_2-selective NMR spectroscopy

○Erik Walinda[1], Daichi Morimoto[2], Masahiro Shirakawa[2], Kenji Sugase[2]
[1] *Graduate School of Medicine, Kyoto University*
[2] *Graduate School of Engineering, Kyoto University*

Conventional biomolecular NMR relies on the acquisition of 3D and 4D data matrices to establish correlations between chemical shifts in the frequency domains F_1, F_2, F_3 and F_1, F_2, F_3, F_4 respectively. These datasets require a substantial amount of acquisition time, are visually highly unintuitive, require expert knowledge to process, and sample dark and bright regions of the frequency domains equally. Here, we present an alternative approach to obtain multidimensional chemical shift correlations for biomolecules. This strategy focuses on one narrow frequency range, F_1F_2, at a time and records the resulting F_3F_4 correlation spectrum by two-dimensional NMR. As a result, only regions of the frequency domain that contain signals in F_1F_2 are sampled. F_1F_2 selection is achieved by Hartmann–Hahn cross-polarization using weak radio frequency fields. This approach reveals information equivalent to that of a conventional 4D experiment, while the dimensional reduction may shorten the total acquisition time and simplifies spectral analysis.

従来のタンパク質のNMR法では必要な情報を分離して取得するために、３次元NMRや４次元NMRを用いるが、それぞれのNMR実験には長時間の測定時間を必要とする。しかも、シグナルがない領域もシグナルがある領域と同じように等しく測定される。また、得られたスペクトルは３次元のキューブ（３次元NMR）、またはキューブが積み重なったハイパーキューブ（４次元NMR）であるため、直感的にシグナルの位置を把握できない。そのため、例えば、４次元NMRの場合、特定の周波数（F_1, F_2）で切り出した（F_3, F_4）のスライスを２次元表示する（Fig. 1A）。さらに、スペクトルの解析には、解析用ソフトウェアの使用法ならびに、それぞれのNMR実験ではどのような情報が得られるかといった専門的な知識が必要とされる。私たちは、最近、弱いパワーのcross polarization（CP）で特定の領域を選択的に照射することによって、４次元NMRの特定の２次元スライスだけを観測できるF_1F_2-selective NMR法を開発した（Fig. 1B）[1]。F_1F_2-selective NMR法を用いると、全てのデータが２次元スペクトルとして得られるため、基本的に分光計上のソフトウェア

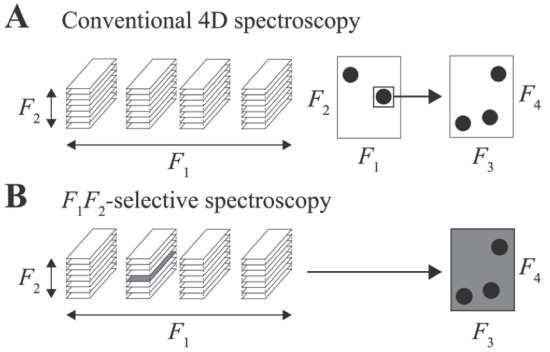


Fig. 1 Methods for obtaining multidimensional chemical shift correlations. A) Chemical shift correlations between F_1-F_2-F_3-F_4 are obtained from conventional 4D NMR experiments. B) Concept of F_1F_2-selective NMR spectroscopy. The two frequencies F_1 and F_2 are fixed *a priori*.

周波数選択，CP

うぁりんだえりっく，もりもとだいち，しらかわまさひろ，○すがせけんじ

（TopSpin）だけで解析できる。単にスペクトルの重ね合わせという極めて直感的な方法で化学シフトの帰属やNOE情報の取得が完了する。また緩和実験にも応用できる。以下に、このF_1F_2-selective NMR法の原理を記す（Fig. 2）。

F_1F_2-selective NMRでは、^{1}H-^{15}N HSQCスペクトル上の特定の化学シフト（F_1-F_2）のシグナルを弱いCPで選択照射し、^{1}Hから^{15}Nに磁化移動することで、理想的には１つの^{15}N in-phase single-quantum coherenceをつくる（Fig. 2A, B）。^{1}H-^{15}Nの場合、40 HzのCPパワーが最適で、おおよそ80 Hz × 80 Hzの領域を選択照射できる。続けて同じCPを繰り返せば特定のスピンの^{1}H in-phase single-quantum coherenceが得られる（Fig. 2B）。前者のビルディングブロックは連鎖帰属用の４次元NMRに用いられる。後者は、４次元NOESYなどに使用できる。また、F_1F_2-selective NMRのメリットの１つとして、特定の領域由来のシグナルだけが観測され、シグナルの折り返しがないため、スペクトル幅を極めて狭い領域に絞ることができる（Fig. 2C）。このメリットは$R_{1\rho}$ dispersion測定などの緩和実験に活かされる。

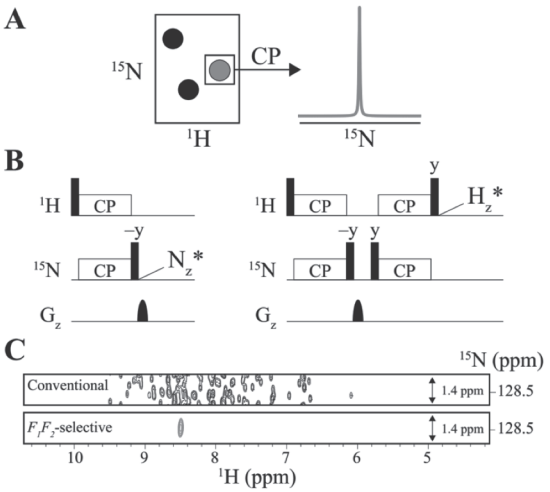


Fig. 2 Principle of F_1F_2-selective NMR spectroscopy. A) Excitation of a target resonance in the HSQC spectrum by CP. B) Pulse sequence building blocks for F_1F_2-selective NMR spectroscopy. C) No folding or aliasing in an F_1F_2-selective spectrum.

ここでは４次元^{15}N-HSQC-NOESY-^{15}N-HSQCへの適用例を示す。F_1F_2-selective NOESY-^{15}N-HSQCでは、４次元^{15}N-HSQC-NOESY-^{15}N-HSQCのパルスプログラムにおける初めのHSQCをCP-CPに置き換える（Fig. 3A）。これによって特定の^{1}H^{N}シグナルだけが生き残る。続けて、NOESY-^{15}N-HSQCを適用すれば、特定の^{1}H^{N}シグナルから磁化移動してきたNOEを観測できる（Fig. B,3C）。NOEシグナルの帰属は、単にすでに帰属がなされた^{1}H-^{15}N HSQCと重ね合わせるだけで完了する。基本的にシグナルの重なりが極めて少ないため、シグナルの帰属はかなり正確なものとなる。従来の連鎖帰属法で帰属が曖昧なシグナルに対して同手法を適用すると、帰属をより確実なものにすることができる。また、CP-CP後のビルディングブロックをNOESY-^{13}C-HSQCのものに置き換えると、特定の^{1}H^{N}からNOESYで磁化移動した^{1}H^{C}を同定できる（Fig. 3D）。NOEシグナルは同様に帰属が完了した^{1}H-^{13}C HSQCと重ね合わせるだけである。

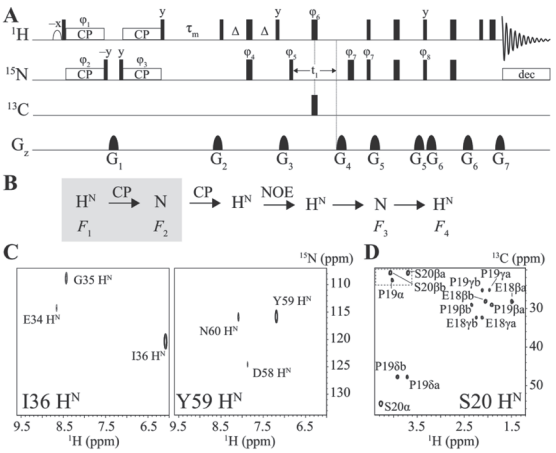


Fig. 3 F_1F_2-selective NOESY-HSQC A) Pulse program. B) Evolution of magnetization. C) F_1F_2-selective NOESY-^{15}N-HSQC spectra of Ile36 (left) and Tyr59 (right) of ubiquitin. D) F_1F_2-selective NOESY-^{13}C-HSQC spectra of Ser20 of ubiquitin.

本討論会においては、このF_1F_2-selective NMR法の連鎖帰属や緩和実験への応用も含めてその詳細を報告する。

References

(1) Walinda, E., Morimoto, D., Shirakawa, M., and Sugase, K. (2017) F_1F_2-selective NMR spectroscopy. *J. Biomol. NMR 68*, 41-52.

ポスター発表要旨

Poster Abstracts

P1

蛋白質選択的飽和による蛋白質-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 for protein 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 a well-known powerful technique for mapping the interaction site of a ligand on a target protein using NMR, which monitors the change of the longitudinal relaxation rate of each of the ligand spins by the protein spin saturation. To saturate selectively the protein spins, off resonance irradiation near -1 ppm is performed with Gaussian pulse trains and then, all of the protein protons are saturated by spin diffusion without distinguishing each of the protein protons. Here, we have developed a new selective aromatic ^{1}H spin saturation method using adiabatic spin lock and applied it to the conventional direction method. Then we are able to obtain distance information between ligand protons and aromatic protons of the target protein.

はじめに

現在,リガンド観測による蛋白質との相互作用のNMR観測法としてwaterlogsy法, STD法, DIRECTION法[1]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法は簡便に蛋白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その信号強度がリガンドの緩和時間に依存するため,定量的にエピトープマッピングを行うのは一般的に困難である.DIRECTION法は蛋白質を選択飽和した状態でのリガンド側の^{1}H核のT_1を観測しその変化を得ることで，定量的なエピトープマッピングを行う手法である.この手法では0～-1ppmにある蛋白質の^{1}H核を連続的に選択照射し,スピン拡散を通して蛋白質全体の^{1}Hを一様に飽和させることとなる.当然ながら飽和させる^{1}Hに区別はなく,より詳細な構造情報を得られる手法が望まれていた.昨年度，我々は蛋白質とリガンドの$T_1\rho$が大きく異なることを利用しadiabatic spin-lockにより蛋白質の芳香族^{1}Hの選択励起を行う方法を報告した(Fig. 1).本研究ではリガンドとの複合体構造が大きくゆらいでいて分子間NOEの取得が困難な系に対して適用し、^{1}H-^{15}N HSQCのChemical Shift Perturbations(CSPs)により得られたHADDOCKドッキング構造との比較を行った[2].

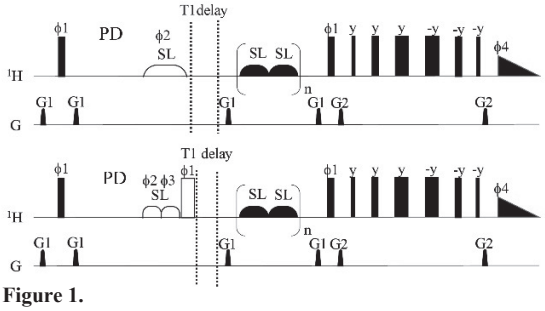


Figure 1.
A. DIRECTION using adiabatic spin-lock pulse sequence. Phase cycle: $\phi1$=2x, 2(-x); $\phi2$=4y, 4(-y); $\phi3$=4(-y), 4y; $\phi4$=x, -x, -x, x. Pulse filed gradient: G1=31.2 G/cm, 2.5ms; G2=15.6 G/cm, 1ms. 20% smoothed Chirp adiabatic spin-lock (32ms, 14 kHz sweep, B1=2.4 kHz) were applied as a T1ρ filter. In addition, adiabatic spin-lock pulse (32ms 10 kHz sweep, B1=2.0 kHz) applied as a protein saturation pulse at the open SL pulse, which are switched on and off alternately. **B.** DIRECTION using aromatic selectively adiabatic spin-lock pulse sequence. Phase cycle: $\phi1$=x, x, -x, -x; $\phi2$=4y, 4(-y); $\phi3$=4(-y), 4y; $\phi4$=x, -x, -x, x. Pulse filed gradient: G1=31.2 G/cm, 2.5ms; G2=15.6 G/cm, 1ms. 20% smoothed Chirp adiabatic spin-lock (32ms, 14 kHz sweep, B1=2.4 kHz) were applied as a T1ρ filter. In addition, adiabatic spin-lock pulse (32ms 10 kHz sweep, B1=2.0 kHz) applied as a protein

スピン拡散, DIRECTION
○くりたじゅんいち，ひらおゆうか，にしむらよしふみ

方法

Modefied DIRECTION法

GST融合mSin3を10μM,名古屋市立大学宮田研において合成された化合物A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、蛋白質飽和のためのスピンロックは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.

CSPs guide docking calculation

^{15}N安定同位体標識mSin3を100μMに対し,化合物Aを1:1,1:10になるように加え,CSPsを観測した. 複合体ドッキング計算は先に報告されているmSin3 PAH1 ドメインのフリーの構造(PDB:2CR7)とエネルギー最小化計算を行った化合物Aの構造を初期構造として用いプログラムHADDOCKにより行った. HADDOCKではrigid bodyドッキングを1000構造について行い,そのうちスコア上位200構造についてsemi-flexibleの分子動力学計算,続いて水分子を加えた精密化を行った.

結果と考察

化合物Aには回転異性体が4つ存在し、良く分離しているシグナルについては, Modefied-DIRECTION法を適用できた(Fig. 2&Table 1).全^{1}H飽和実験の結果から,疎水ポケットの最深部に4位のメチル基が位置し,芳香族^{1}H選択飽和実験から4位のメチル基が8位のメチル基よりも芳香族に近いことが示唆された.これはCSPガイドドッキング計算の構造を支持するものであり,さらにはa位の^{1}Hの付近には芳香環は存在せず, c,d,g位の^{1}Hの付近には芳香環が存在していることもドッキング構造を支持する結果であった.本研究では,スピン拡散がまず望めない分子量が一万程度の蛋白質に対してもGST融合蛋白質を用い見かけの分子量を増大させることで,Modefied-DIRECTION法が適用できることを示した.また,このことは複合体構造のゆらぎが大きくNOESYによる分子間距離情報が困難な系においても芳香族との距離という曖昧ではあるものの距離情報を引き出せることを意味する.将来的には,この距離情報を取り込んだドッキング計算手法の確立が期待される.

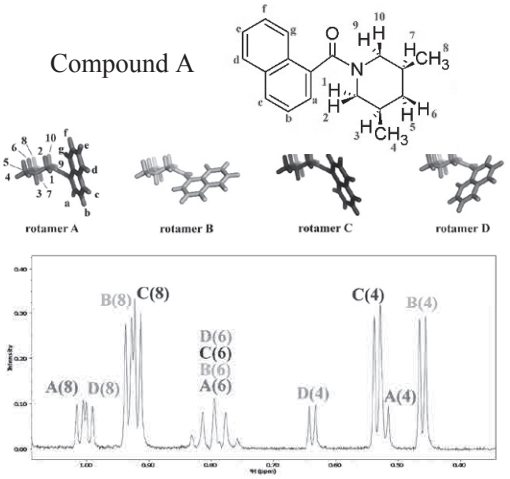


Figure 2.
Possible conformers of compound A (four rotational isomers) are shown (upper). The methyl region of the 1D proton spectrum with the assignments of the rotamers of compound A (lower). The four rotamers are clearly identified.

Table 1. .

Assignments (rotamer)	Longitudinal relaxation rate (s^{-1})			Perturbations (s^{-1})	
	All proton saturated	Aromatic proton saturated	Non saturation	All proton saturated	Aromatic proton saturated
c,d	1.25	1.06	0.75	0.50	0.31
g(D)	1.13	0.99	0.69	0.43	0.30
g(A)	1.24	1.03	0.76	0.47	0.27
b, e,f	1.26	1.09	0.80	0.46	0.29
a (C)	1.27	1.03	0.89	0.38	0.14
a (B)	1.20	0.96	0.84	0.37	0.12
8 (B,C)	2.32	2.07	1.83	0.49	0.24
4 (C)	2.37	2.07	1.75	0.62	0.32
4 (B)	2.51	2.19	1.85	0.66	0.33

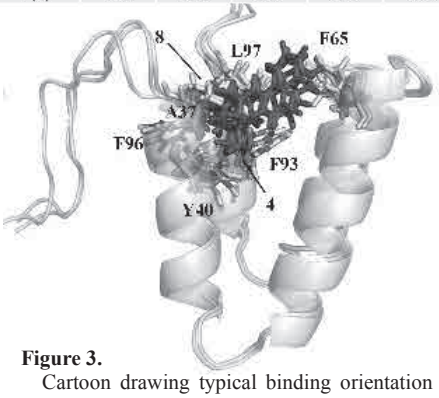


Figure 3.
Cartoon drawing typical binding orientation of compound A in its mSin3 PAH1 domain complex. Hydrophobic residues closed to the ligand, which are A37, Y40, F65, F93, F96 and L97, are drawn with stick model. The rotamers B, C and C' are colored red.

[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.

[2] J. Kurita, Y. Hirao, N. Miyata, Y. Nishimura, NMR Screening of mSin3B Binding Compounds for the Interaction Inhibition with a Neural Repressor, NRSF/REST, in: G.A. Webb (Ed.), Mod. Magn. Reson., 2nd ed., Springer Netherlands, 2017.

P2

COSY 法の新しい応用測定-----MDEC-J-resolved COSY 法について

○ 降旗一夫 1，田代 充 2
東大院農・応生化 1、明星大・理工 2

DPFGSE-MDEC-J-Resolved-COSY: A New Method for Measuring Proton-Proton Spin Coupling Constants of Multiplet Signals

K. Furihata[a)] and M. Tashiro[b)]
a) Division of Agriculture and Agricultural Life Sciences, University of Tokyo
b) Department of Chemistry, College of Science and Technology, Meisei University,

Natural products such as polyketides very often possess several spin systems, consisting of a methine group directly bonded to a methyl group (-CH-CH(CH3)-CH-). The methine proton splits into a broadened multiplet by coupling with several vicinal protons, making the determinations of JH-H of the aforesaid methine protons difficult in DQF-COSY or E-COSY. In consideration of these disadvantages, we have developed new techniques, named MDEC-J-resolved-COSY and DPFGSE-MDEC-J-resolved COSY. The key point of these methods is the selective decouple of methyl groups using MDEC(multi-frequency-homo-decoupling). Application of these novel techniques to the model compound possessing many methyl groups, portmicin, has proved its usefulness for determination of JH-H coupling constants of the complicated molecules.

天然有機化合物の相対立体構造解析において、プロトンープロトン JHH を如何にして効率よく観測するかが重要な課題の一つである。すでに、COSY 法を利用したプロトンープロトンのスピン結合定数を観測する方法として DQF-COSY、E-COSY といった方法が既に報告されている。しかし、multiplet に分裂した複雑なクロスピークではプロトンープロトンのスピン結合の解析は非常に困難である。たとえば、ポリケタイド抗生物質には-CH-CH(CH3)-CH-といったメチル基を多く含んだ化合物が存在する。このメチル基の付け根のメチンプロトンは隣接プロトンと multiplet に分裂しブロードなシグナルとなるため、このメチンプロトンのスピン結合の解析は困難となる。また、メチル基の付け根のメチン炭素はアシメ炭素であることが多く、この炭素に結合した置換基の相対立体の解析には、この炭素に結合した隣接プロトンからのスピン結合の観測は重要なポイントになる。このメチンプロトンのスピン結合を解析する方法としては、1D-NMR の homo-decoupling が有効である。このメチル基を decoupling すれば、メチンプロトンは double-doublet に分裂し、隣接プロトンとのスピン結合は容易に解析される。しかし、シグナルが重なった複雑なスペクトルではこの homo-decoupling 法の測定は困難である。一方、2D-NMR において、homo-decoupling しながらの COSY 測定は考えられる。しかし、homo-decoupling を入れた COSY 測定では、homo-decoupling による t1-noise が生じ、良好なスペクトルを得ることが困難である。また、スピン結合を観測するためには高い resolution を必要とする。そのため、あまり実用的な方法ではない。この COSY 法に homo-decoupling を導入し、プロトンープロトンスピン結合を観測する方法を検討し、新しく BASHD-J-resolved COSY 法を開発した [1)]。この方法の問題点は、分散したメチルシグナル全体の広い領域を decouple するやめに、メチルシグナル間で観測するプロトンも照射するという問題があった。これを避けるためには、個々のメチル基それぞれを選択的に decouple することが重要である。メチル基を選択的にしかも多数 decouple する方法として、MDEC(multi-frequency-homo-decoupling)法がある [2)]。この MDEC 法を J-resolved COSY 法に応用し、MDEC 法の有効性を検討した。また、選択励起による DPFGSE-MDEC-J-resolved COSY に付いても検討した。

MDEC(multi-frequency-homo-decoupling), MDEC-J-resolved COSY, J-resolved COSY
ふりはたかずお、たしろみつる

Fig.1 に(a)MDEC-J-resolved-COSY と(b)DPFGSE-MDEC-J-resolved COSY の pulse 系列を示す。MDEC-J-resolved COSY 法は BASHD-J-resolved COSY 法の BASHD pulse を MDEC pulse として使用する方法である。この方法のポイントはCOSY スペクトルにおいて、目的とするシグナルを decoupling し multiplet シグナルを単純化すること、また、スピン結合を解析するために、resolution を高めることである。

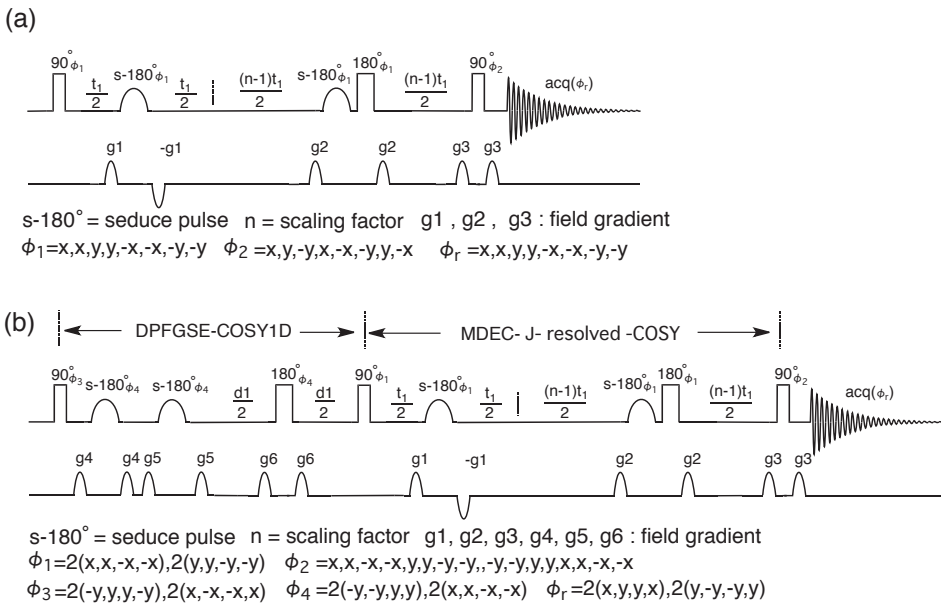


Fig.1 Pulse sequence of (a) MDEC-J-resolved - COSY and (b) DPFGSE-MDEC-J-resolved - COSY

COSY 法での homo-decoupling は t1 の展開時間の中心に選択的 180° pulse を導入し、目的のプロトンを反転させ、t1 の展開期の終わりで refocus させる。その結果、180° pulse を受けたプロトンと 180° pulse を受けないシグナルとの間で decoupling される。一方、t1 の展開期につづく J-resolved 法での homo-decoupling は、(n-1)t1 の展開期の中心に hard 180° pulse と選択的 180° pulse を同時に導入する。この選択的 180° pulse は t1 の展開期の pulse と共通である。選択的 180° pulse と hard 180° pulse を受けたプロトンは 0° pulse となり、defocus する。一方 180° pulse を受けたプロトンは J-moduration を受ける。その結果、0° pulse を受けたプロトンと 180° pulse を受けたプロトンの間で decouple される。このようにして、t1 および(n-1)t1 の展開時間の間で、選択的 180° pulse を受けたプロトンは homo-decoupling が実行される。

一方、multiplet シグナルを単純化しても分解能が不足しており、そのままではスピン結合を観測するには至らない。通常 COSY 法では t1max は 200〜300msec ぐらいまでしか展開していない。スピン結合を観測出来るまで分解能を上げるためには、t1max を 400〜800mec まで高める必要がある。しかし、実際はこのような値まで展開することは実際的でない。そこで、スピン結合に対しては t1max が 400〜800msec まで展開できるように、J-scaling pulse((n-1)t1-180-(n-1)t1-)を導入した。2D-J-分解法の t1 の設定では t1max は観測するスピン結合 1/J のオーダーを超えるように設定しなければならない。このオーダーよりも小さな値で測定した場合はスペクトルのサンプリング定理が満たされず、スピン結合定数は観測できない。例えば J=2Hz を観測する

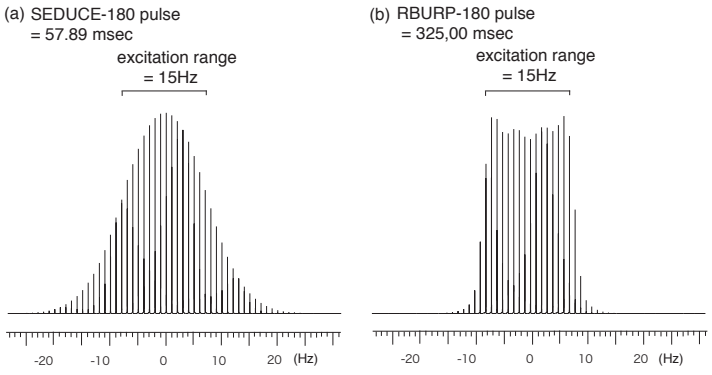


Fig.2 Excitation profiles acquired using DPFGSE-1D of SEDUCE and RBURP. In the excitation range of 15Hz, the pulse widths of SEDUCE and RBURP were 57.89 msec and 325.00 msec . Resonance offsets were recorded at 1 Hz increments. A solution containing 5 % D2O was used

ためには digital resolution が 2Hz 以下 t1max が 500msec 以上になるように設定しなければならない。MDEC-J-resolved COSY 法においても、J-分解法と同様に nt1max がスピン結合定数 1/J を超えるように scaling factor(n)を設定する。その結果スピン結合定数は実際の値よりも n 倍の値として観測される。

MDEC 法として、個々のプロトンを選択励起する場合、自ずと pulse 巾が長くなる。そのため、この MDEC 法で使用する pulse は選択性が高く、しかも、pulse 巾が短いことが重要である。今回は SEDUCE pulse を使用した[3]。DPFGSE-MDEC-J-resolved COSY 法は MDEC-J-resolved COSY 法に選択観測用の DPFGSE 法を追加したものである[4]。DPFGSE 法は選択励起したメチル基の磁化をメチンプロトンに移動させ、その磁化のみを MDEC-J-resolved COSY で観測する。そのため、不要なクロスピークは消去され、目的のクロスピークのみが観測するため、スペクトルの解析は容易となる。DPFGSE の励起 pulse は MDEC pulse と同じパルスを使用する。

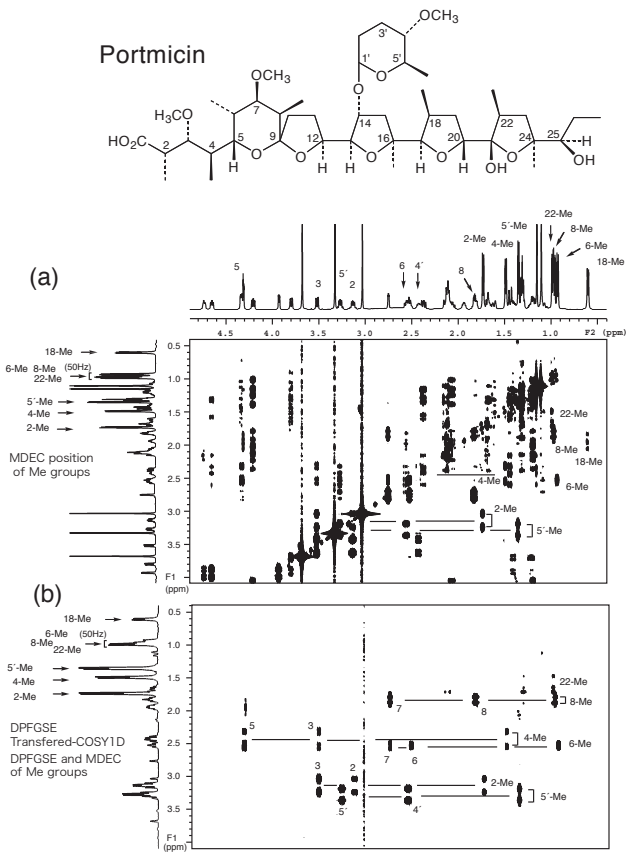


Fig.3 (a) MDEC-J-resolved COSY (b) DPFGSE-MDEC-J-resolved COSY spectra of Portmicin, $F_1 \times F_2 = 2500 \times 2500$ Hz, point = 512 x 2048, scaling factor(n) = 10, scans = 16, SDUCE 180 pulse = 52.90 msec(15Hz)

Fig.2 には SEDUCE pulse と RE-BURP pulse の excitation profile スペクトルを示す。MDEC-J-resolved COSY 法では個々のプロトンを選択照射するため、どのような shaped pulse を使うのかが重要になる。Fig.2 において、メチル基の励起範囲として 15Hz に設定したときの(a)SEDUCE pulse と(b)RE-BURP pulse の励起範囲と pulse 巾を示した。MDEC-J-resolved COSY 法においては、pulse 巾は 50msec よりも長くなると、T_2によるシグナルの減衰が顕著となり実用的でないため、pulse 巾の短い SEDUCE pulse を使用した。RE-BURP pulse は図に示すように選択性が高いが、pulse 巾が SEDUCE pulse が 57.8 msec に対して、325.0msec と長くなるため、MDEC-J-resolved COSY では有効ではない。

Fig.3 では(a)MDEC-J-resolved COSY と(b)DPFGSE-MDEC-J-resolved COSY のスペクトルを示す。Portmicin の 0.6ppm から 2.0ppm で観測される doublet の分裂した 7 個のメチル基を MDEC 法で照射したスペクトルである。個々のメチル基の照射範囲は 15Hz である。0.93ppm, 0.96ppm, 1.03ppm の 3 個のメチル基は化学シフトが近いため、まとめて一つの周波数(50Hz)で照射している。(a) MDEC-J-resolved COSY のスペクトルでは、多くの J-resolved COSY ピークと decouple ピークが共に観測されているためにスペクトルは煩雑になっている。そこで、目的のクロスピークのみを観測するために DPFGSE-MDEC-J-resolved COSY 法を検討した。

(b)DPFGSE-MDEC-J-resolved COSY スペクトルでは、いくつかのメチル基を DPFGSE 法により選択的に励起し、その磁化をメチンプロトンに移動出せる。その後にメチル磁化を選択的に decouple する方法である。この場合、DPFGSE の選択励起 pulse と decouple pulse は同じ pulse を使用する。その結果、

DPFGSE-MDEC-J-resolved COSY スペクトルでは、MDEC-J-resolved COSY と比較してスペクトルが単純化され、目的のメチンのクロスピークの解析が容易になったことが分かる。とくに、高磁場の 1ppm 付近の H6、H18、H22 と言ったメチンクロスピークが観測された。

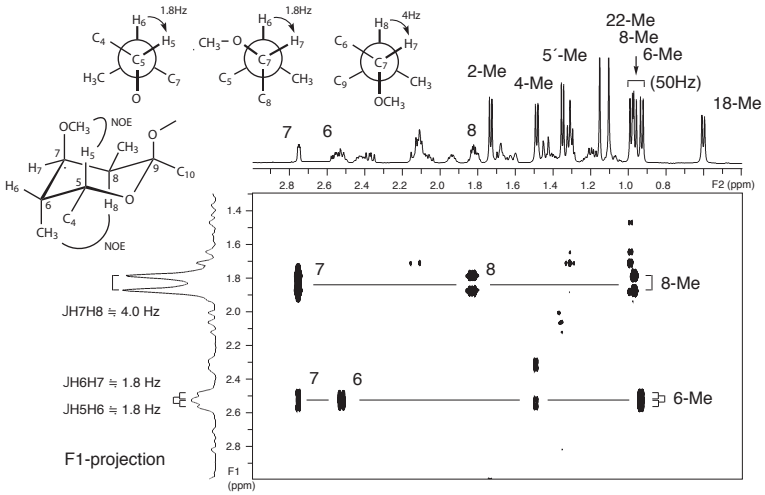


Fig.4 DPFGSE-MDEC-J-resolved COSY spectra of Portmicin

Fig.4 は MDEC-J-resolved COSY の拡大スペクトルである。Portmicine のスピロケタール環における、H6 と H8 のプロトンからのスピン結合は、通常の COSY スペクトルからはスピン結合を観測することは困難である。これに対して、DPFGSE-MDEC-J-resolved COSY スペクトルにおいて、H6 のメチンプロトンのクロスピークから、H5-H6,H6-H7 のそれぞれのスピン結合は 1.8Hz であった。H5 と H6 のスピン結合Hは 1.8Hz で gauche の関係にあるが、H5 が axial に位置しているため、H6 は equatorial に位置していることがわかる。また、H6 と H7 のスピン結合は 1.8Hz であるため、gauche の関係にある。そして、7 位の O-CH3 が H5 と NOE が観測されることから、H7 は equatorial に位置している。同様に、H8 のメチンクロスピークからは H7 と H8 はスピン結合が 4.0Hz であるため、gauche の関係にある。また。H8 と 6-Me に NOE があることから、H8 は axial に位置することが分かる。このように、従来は multiplet のプロトンシグナルからのスピン結合の解析は困難であったが、MDEC-J-resolved COSY、DPFGSE-MDEC-J-resolved COSY スペクトルから multiplet のプロトンでもスピン結合の解析は可能であることを示した。

まとめ

J-resolved COSY 法は F1 軸の分離能を高めるためにプロトンープロトンの J 値の解析が容易となる。しかし、multiplet シグナルでは解析は困難である。一方、MDEC 法はプロトンープロトンの homo decoupling を可能にする。この二つが結合することにより、複雑な multiplet プロトンは単純化され、プロトンープロトンの J 値の観測は容易となることが判明した。これらの方法を portmicin に応用しその有効性を明らかにした。

MDEC-J resolved-COSY 法および、DPFGSE-MDEC-J-resolved COSY 法は Me 基の付け根のメチンプロトンという限られたスピン系の解析手段であるが、multiplet に分裂したメチンプロトンにおいて、プロトンープロトン JHH を如何に観測するかという問題の一つの解決法である。

Selective pulse としては、複数のメチル基を同時に励起してもスピン結合にも、化学シフトにも影響されず、位相が揃い、なおかつ、シグナルの選択性が高いことが重要である。ここでは SEDUCE を使用した。この方法で使用する照射磁場は、励起範囲が狭く高い選択性が要求される。そして、測定にあたっては、隣接プロトンに照射磁場の漏れを最小にし、off resonance を避ける必要がある。また、照射磁場同志が干渉し合うことを避けることが重要である。また照射パルスが長くなるため、T_2 による S/N の低下は避けられないので注意が必要である。

1) K. Furihata and M. Tashiro, Magn. Reson. Chem. 2012, 50, 713 -716.

2) A. P. Espindola, R. Crouch, J. R. DeBergh, J. M. Ready, and J. B. MacMillan, J. Am. Chem. Soc. 2009, 131, 15994-15995.

3) M.A.McCoy and L. Mueller, J. Magn. Reson. A.101,122 -130(1993)

4) T. L. Hwang and A. J. Shaka, J. Magn. Reson. A 112, 275 -279(1995)

P3

生体系の溶液NMRにおける超偏極技術の新たな展開

○大木出[1]，藤咲貴大[1]，池上貴久[2]，白川昌宏[1]
[1]京都大学大学院・工学研究科
[2]横浜市立大学・生命医科学研究科

Perspectives for hyperpolarization in biomolecular solution NMR

○Izuru Ohki[1], Takahiro Fujisaku[1], Takahisa Ikegami[2], Masahiro Shirakawa[1]
[1] *Department of Molecular Engineering, Graduate School of Engineering, Kyoto University*
[2] *Graduate School of Medical Life Science, Yokohama City University*

The sensitivity of nuclear magnetic resonance (NMR) is very low because the signal strength depends on the small population difference between two spin states in magnetic fields. Hyperpolarization turns low NMR responses into strong signals so that measurements of biological macromolecules in biological systems become possible. This is achieved by reversible interaction of para-hydrogen with target molecules on the metal complex (Signal Amplification by Reversible Exchange method; SABRE). In the present study, we show improvements of metal catalysts used for SABRE applicable to biological macromolecules. In addition to this, different polarization transfer schemes for biological macromolecules will be compared and discussed.

細胞や生体系において、分子の構造や相互作用、動的構造変化を生きた状態で調べ、理解することは生命科学の大きな挑戦の1つである。NMRはそれを可能とする数少ない手法であるが、生体系への適用には感度の低さ（測定には10^{17}個以上の核スピンが必要）が問題となってきた。このNMRの感度の低さは、核スピンの磁場中での基底−励起状態のエネルギー準位差（Zeemanエネルギー）が極めて小さいため、熱平衡により両準位に存在するスピン占有数がほぼ等しくなることに由来する。例えば、一般的な溶液NMR測定条件である室温、10T磁場においては両準位の占有数差（偏極率）は0.003%しかなく、スピンが10万個存在していても実質3個分のNMRシグナルしか得られない。

超偏極（Hyperpolarization）は、この低い偏極率を100%に近づけるけることで、NMRシグナル強度を最大数万倍まで増幅する手法である[1)]。基本的には、特殊な条件下で偏極率が100%になるスピン系（極低温下のラジカル分子の電子スピンや水素分子の核スピン、あるいは光励起した三重項電子スピン等）を、核スピンにうまく接触させて偏極を移動することにより得られる。これまで、超偏極は極低温や特殊な化学構造を持つ有機分子等の制限された条件で達成される事が多かったが、近年では、dissolution DNP [2)]、Overhauser DNP [3)]、光励起Triplet DNP [4)]、パラ水素SABRE [5)] 等の手法の発展により、より生理的な条件下（室温、溶液条件）で超偏極を生体分子、あるいは溶媒分子に移動させる事が可能になってきた。既にdissolution DNPにおいては、超偏極させた水から溶液状態の蛋白質に偏極を移す事で、蛋白質の多次元NMRスペクトルを高感度に測定することに成功している[6)]。しかし、DNPを用いる手法は、極低温あるいは高磁場下で電子から核への偏極移動を行う必要があるため、どうしても装置が大がかりとなり利用や導入は容易ではない。

溶液NMR，超偏極，パラ水素

○おおきいずる，ふじさくたかひろ、いけがみたかひさ、しらかわまさひろ

そこで、本研究では、DNPと比べて装置も取扱いも容易であるパラ水素（核スピンが超偏極した水素分子）を用いた偏極移動法（SABRE）に着目し、これを生体高分子に適用可能な形に改良し、生体系（*in cell/in situ/in human*）においても分子動態を高感度に観測できるような汎用的で導入も容易な技術に発展させることを目指している。このSABRE法は2009年にDuckettらにより開発された新しい超偏極技術であり、遷移金属触媒上でパラ水素の核スピンから標的分子の核スピンへと化学交換を利用して偏極を移すものである（Fig. 1）。標的分子には有機低分子が用いられることが多いが、触媒に配位可能であれば良く、分子構造の自由度が高いのが特徴となっている。また、偏極移動には特殊な装置は必要としない。これまでに、触媒にイリジウム（$[Ir(IMES)(Py)_3]$-H_2）、標的分子に^{15}Nピリジンを用い、室温・溶液状態で、パラ水素（液体窒素下で作成。偏極率47%）を低磁場（^{1}H: 3 mT, ^{15}N: 500 nT）で系にバブリング後、溶液NMR装置（Bruker Avance700）に移して測定する事で、^{1}H、^{15}Nシグナルをそれぞれ20、400倍に増幅することに成功している。現在、標的を溶媒分子に変え、そこから化学交換で蛋白質へ偏極を移動することを試みている。

発表ではこれらに加え、本研究室で進めているダイヤモンドNV中心を用いた光励起DNP/ODMR/nano NMR[7)8)9)]の手法も合わせ、各超偏極技術の比較、生体高分子・生体系への適応範囲、偏極寿命の問題点、長寿命化等についても議論したい。

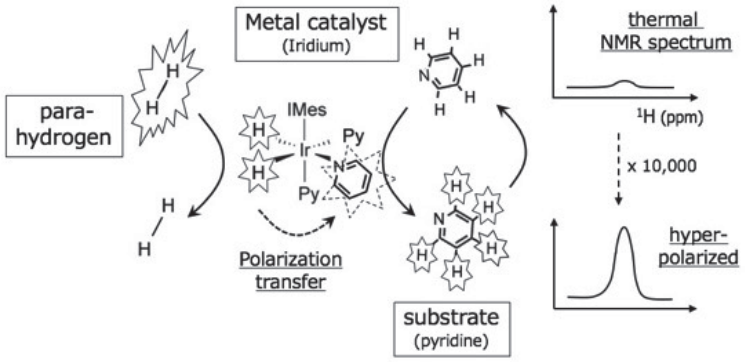


Figure 1. Polarization transfer cycle by SABRE method

References
1. Ardenkjaer-Larsen, Frydman *et al.,* Facing and overcoming sensitivity challenges in biomolecular NMR spectroscopy. *Angew. Chem. Int. Ed.* 54, 9162 (2015).
2. Ardenkjaer-Larsen *et al.,* Increase in signal-to-noise ratio of >10,000 times in liquid-state NMR, *PNAS* 100, 10158 (2003).
3. Bentum *et al.,* Quantitative analysis of high field liquid state dynamic nuclear polarization, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 13, 17831 (2011).
4. Henstra *et al.,* High dynamic nuclear polarization at room temperature, *Chem. Phys. Lett.* 165, 6 (1990).
5. Adams, Duckett *et al.,* Reversible interactions with para-hydrogen enhance NMR sensitivity by polarization transfer. *Science* 323, 1708 (2009).
6. Olsen, Frydman *et al.,* Optimizing water hyperpolarization and dissolution for sensitivity-enhanced 2D biomolecular NMR, *J. Magn. Reson.* 264, 49 (2016).
7. Lovchinsky, Lukin *et al,* Nuclear magnetic resonance detection and spectroscopy of single proteins using quantum logic. *Science* 351, 836 (2016).
8. Aslam, Wrachtrup *et al,* Nanoscale nuclear magnetic resonance with chemical resolution. *Science* 357, 67 (2017).
9. Schmitt, Jelezko *et al,* Submillihertz magnetic spectroscopy performed with a nanoscale quantum sensor. *Science* 356, 832 (2017).

P4

定量NMRと高速液体クロマトグラフィーを組み合わせたハロ酢酸混合標準液の濃度測定

○山﨑太一[1]，中村哲枝[1]，沼田雅彦[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
2国立医薬品食品衛生研究所

Determination of halo-acetic acids in mixed standard solution by combination of qNMR and HPLC

○Taichi Yamazaki[1], Satoe Nakamura[1], Masahiko Numata[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 (NMIJ/AIST)*
[2]*National Institute of Health Sciences (NIHS)*

Halo-acetic acids are important monitoring targets for ensuring safety of tap water. Although many analytical methods for halo-acetic acids by high-performance liquid chromatography (HPLC) have been reported, the accurate standard solution is not supplied as a SI traceable standard. The standard is essential to an accurate determination in general. However it is difficult to prepare and supply pure materials of halo acetic acids because these are volatile and hygroscopic compounds. In this research, we studied direct determination for the mixed standard solution based on the molar ratio between analyte and internal standard (IS) obtained from quantitative NMR (qNMR) spectroscopy. The relative molar sensitivity (RMS) was determined in each component by qNMR spectroscopy and HPLC. Concentrations in mixed halo-acetic acids solution were determined by combination of qNMR spectroscopy with HPLC. All components concentrations were evaluated within the uncertainties lower than 1 % (k=2), and these were good agreement with reference values determined by mass balance approach.

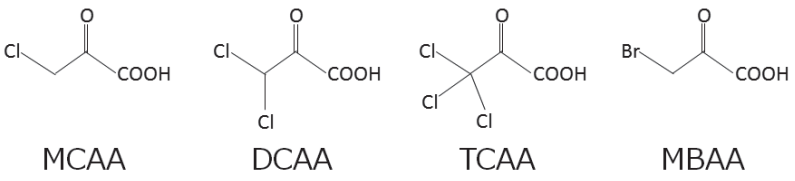


Fig. 1. Structures of the halo-acetic acids.

ハロ酢酸（Fig. 1，クロロ酢酸(MCAA)，ジクロロ酢酸(DCAA)，トリクロロ酢酸(TCAA)，ブロモ酢酸(MBAA)）は水道法における水質検査項目にも挙げられ、安全な水道水の供給のために重要な分析対象成分であり，カラムメーカーや装置メーカーからハロ酢酸類の一斉分析例が数多く報告されている．また，2015年4月に改訂された水道法の中ではJCSS (Japan Calibration Service System)で供給される標準液が水質検査で使用可能となったが，ハロ酢酸においては供給されていない．これまでJCSSで供給されてきた有機標準液は，純度評価された基準物質を用いて，

qNMR，濃度測定，qNMR/クロマトグラフィー

○やまざきたいち，なかむらさとえ，ぬまたまさひこ，にしざきゆうぞう，すぎもとなおき，いはらとしひで

質量比混合法によって調製されてきた．一方，ハロ酢酸は純物質における吸湿性や揮発性などの取り扱い条件の難しさからこれまでと同様のスキームでの標準液の開発は困難である．精確な定量分析のためには標準物質が必要不可欠であり，信頼性の高い標準液の早急な整備が望まれている．当研究グループでは，qNMRとクロマトグラフィーを組み合わせることで分析対象成分の標準物質を必要としないqNMR/クロマトグラフィーを確立している[1 -3]．qNMR/クロマトグラフィーでは，qNMRで物質量比を評価した検量線用の溶液を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で分析して相対モル感度(RMS，Relative molar sensitivity)を決定し，RMSから混合標準液中の各成分の濃度測定を行うことができる．本研究では従来の質量比混合法で標準液の供給が困難なハロ酢酸類にqNMR/クロマトグラフィーを適用した．

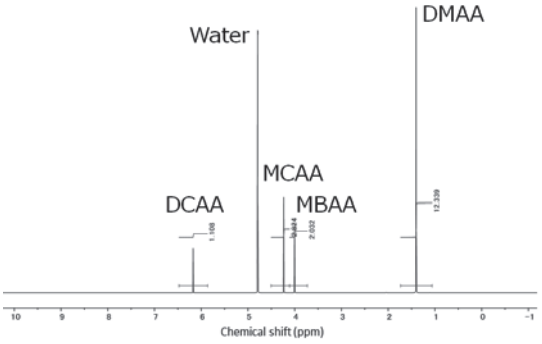


Fig. 2-1. ^{1}H NMR spectrum of the halo-acetic acids mixed solution.

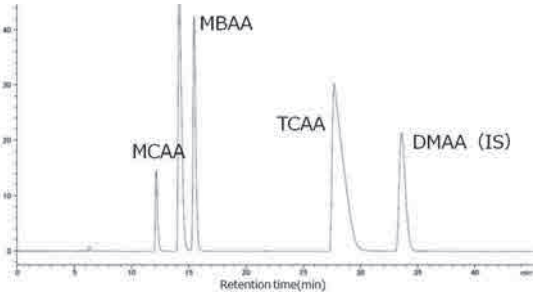


Fig. 2-2. Chromatogram of the halo-acetic acids mixed standard solution.

Fig. 2にはハロ酢酸と内標準物質(IS)を混合した溶液の^{1}H NMRスペクトルとクロマトグラムを示す. ISには分析対象成分と類似構造を持つジメチルマロン酸を用いることで，対象となる成分並びにIS間で良好な分離条件が達成できた．qNMR/クロマトグラフィーでは一般にRMSを決定するには，成分同士のNMRシグナルの重複を避けるために各成分ごとに別々の検量線用の溶液を調製する必要があったが，各ハロ酢酸は ^{1}H NMRのシグナルが互いに分離しているために，混合溶液を用いたRMSの評価が可能であることが確認できた. このことにより, 他の対象物質と異なって測定試料数を大幅に減らすことができた．Table 1に本研究で得られた測定結果を示すが，揮発・吸湿を抑えるために低温・低湿下で実施した質量比混合法によって決定した参照値と全ての成分において1 %以下の不確かさで一致することが確認できた．この結果から，本法は取り扱いが難しいハロ酢酸の純物質を必要とせず，混合標準液の濃度を直接かつ精確に評価可能な分析法であることが確認された．

Table 1. Determination of concentrations of the halo-acetic acids mixed standard solution.

Component	Reference value** (mg kg^{-1})	Measurement value** (mg kg^{-1})	Deviation %	$\|En\|$
MCAA	1427±4	1431±10	0.30	0.40
DCAA	1374±4	1373±6	-0.05	0.10
TCAA*	1418±4	1425±8	0.37	0.78
MBAA	1433±4	1441±8	0.56	0.90

*Determined by calibration curve method
**The after value of ± shows expanded uncertainty (k=2)

References

(1) 西﨑雄三，他 (2015) モル吸光係数比を利用したジャマイカカッシア抽出物中のクアシンおよびネオクアシンの新規定量法の開発，*食衛誌*, **56(5),** 185-193.

(2) Yuko K., et. al., (2017) Determination of PAHs in solution with a Single Reference Standard by a Combination of ^{1}H Quantitative NMR Spectroscopy and Chromatography. *Anal. Chem*., **89(13),** 6963-6968.

(3) 佐藤直子，他 (2017) qNMR および HPLC による機能性表示食品中の機能性関与成分ルテインの定量，*日本食品化学学会誌,* In press.

P5

マルチサイトの選択励起パルスを用いた二次元NMR測定の分解能の向上

○金場哲平[1,2]，堤遊[1]
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

Improvement of the resolution of 2D NMR spectra by multisite selective excitation pulses

○Teppei Kanaba[1,2], Yu Tsutsumi[1]
[1] *Bruker BioSpin K.K.*
[2] *Department of Chemistry, Tokyo Metropolitan University*

In multi-dimensional NMR experiments including 2D ^{1}H-^{13}C HSQC, spectral aliasing is used as a method to increase of spectral resolution of the F1 dimension. In 2D ^{1}H-^{13}C HMBC experiment, however, the aliased peaks lying outside of the spectral domain cause ambiguities of in the interpretation of the 2D HMBC spectrum. In this study, we applied the spectral folding and Hadamard NMR[(1)] to ^{1}H-^{13}C HMBC experiment to obtain the high resolution and unambiguous spectra. In this approach, we used the multisite selective excitation pulses that consist of several chemical shift region excitation pulses that are phase alternated according to a Hadamard matrix. To use this approach, we succeeded in obtaining the high-resolution 2D HMBC spectrum within the same amount of experimental time as the conventional 2D HMBC experiment.

[序論]

多次元NMR測定では、しばしば間接観測軸のスペクトル幅を実際にシグナルが存在する領域よりも狭く設定して測定を行い、スペクトル範囲外のシグナルを折り返しとして観測することによって間接観測軸の分解能の向上が行われる。しかし2D ^{1}H-^{13}C HMBCの場合、折り返しシグナルはスペクトルを非常に複雑化し、解析を困難にしてしまう。本研究では、Hadamard NMR[(1)]を応用した、複数の領域を選択的に励起し、かつ位相を変化させたシェイプドパルスを作成し、2D HMBC測定への適用を行った。スペクトルの折り返しと組み合わせて一連の2D HMBC測定を行い、そのスペクトルを足し引きして最終的なHMBCスペクトルを再構成することにより、高分解能かつ解析の曖昧さの少ないスペクトルを得ることを試みた。

[実験]

通常の2D HMBCのパルスシーケンスの、^{13}Cのexcitationとflip-backの90度パルスをそれぞれマルチサイトを選択励起するシェイプドパルスに変更したパルスプログラムを作成し、測定に用いた。サンプルには5 mg Tyrosine, 5 mg Phenylalanine混合溶液 (Tyr+Phe)を用いた。1D ^{13}Cスペクトルを Fig.1に示す。HMBC測定にはFig.1に示した三つの領域を選択励起するパルスを使用し、またスペクトル範囲もそれぞれの領域が折り返してスペクトル上に現れるように設定した。選択励起する箇所それぞれの位相をHadamard行列に従って変更したシェイプドパルス4種類を作成し、excitationのパルスとして用いた。シェイプドパルスのexcitation profileの一例をFig.2に示す。

選択励起パルス，2D ^{1}H-^{13}C HMBC，WaveMaker

○かなばてっぺい，つつみゆう

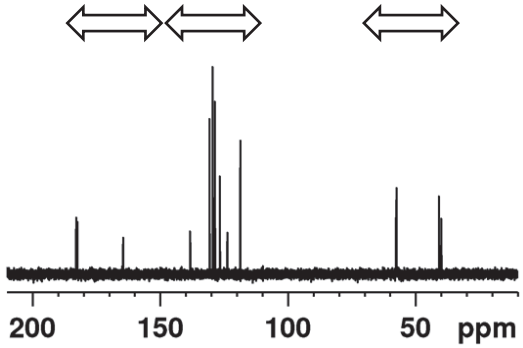


Fig 1. 1D ^{13}C spectrum of Try + Phe
The regions excited by selective pulses are indicated.

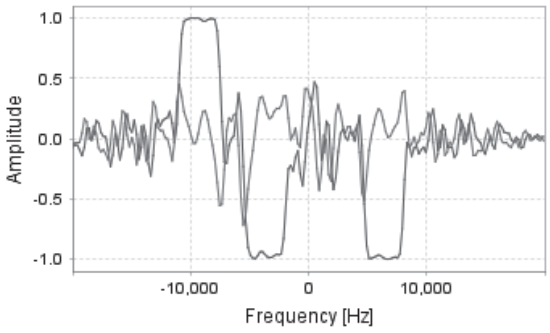


Fig 2. Multisite selective excitation pulse
The excitation profile of the multisite selective excitation pulse.

測定ではpseudo 3Dの形式で、シェイプドパルスを変更した2D HMBCスペクトルを4つ測定した。flip-backのパルスにはすべての測定で励起する三カ所の位相が同じになるパルスを用いている。これらシェイプドパルスの作成にはプログラムWaveMakerを用いた。比較のために通常のHMBCのパルスシーケンスを用いて、スペクトル幅を^{13}C全領域、間接観測軸のポイント数を折り返しの測定と同じに設定し、積算回数を4倍にして測定時間をそろえたconventionalの測定も行った。

[結果]

位相を変更したシェイプドパルスを用いて測定した4つのHMBCスペクトルの足し引きを行う事により、Fig.3(右)に示す3つのスペクトルを得た。conventionalのHMBCスペクトルの対応する領域(Fig.3,左)との比較を行うと、conventionalと同じ位置にのみシグナルが観測されていることが分かる。分解能を比較すると本研究の手法ではより間接観測軸の分解能が高いスペクトルが得られていることが分かる。

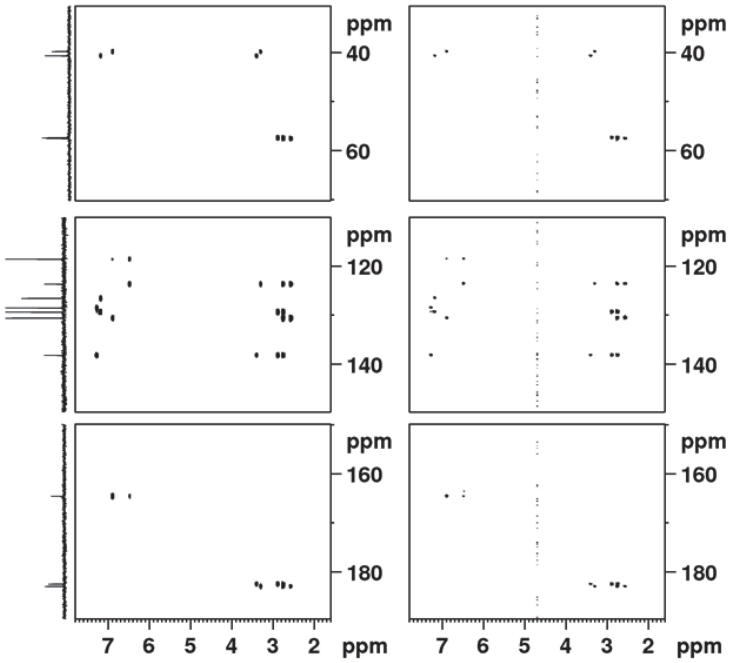


Fig 3. 2D ^{1}H-^{13}C HMBC spectra of Tyr + Phe
(left column) The conventional 2D HMBC spectra
(right column) The 2D HMBC spectra obtained in this study.

[考察とまとめ]

本研究の手法を用いることで、高分解能かつ解析の妨げとなる折り返しピークが除外された2D HMBCスペクトルを得ることが出来た。本測定はconventionalな測定に比べ、励起にシェイプドパルスを用いており、また間接観測軸の最大展開時間が4倍になっているためS/N比の低下が見られる。これについての詳細は年会では議論を行う。

[reference]

(1) Kupce E. and Freeman R., J. Magn. Reson. (2003) 162, 300-10

P6

緩和分散 CPMG 法におけるスピン状態に依存したアーティファクト削減の解析

長土居有隆[1]，○池上貴久[2]
1 技術サービス・ブルカーバイオスピン株式会社
2 横浜市立大学・生命医科学研究科

Analysis of a spin-state selective artifact suppression method in CPMG relaxation dispersion experiments

Aritaka Nagadoi[1], ○Takahisa Ikegami[2]
[1] *Bruker BioSpin K.K.*
[2] *Structural Epigenetics Lab., Graduate School of Medical Life Science, Yokohama City University*

Relaxation dispersion experiments provide kinetics and thermodynamics information of molecules for which the conformations exchange between the major visible and minor invisible states. Obtaining smooth dispersion profiles, however, requires careful calibration of various parameters for measurements. Particularly at the lowest repetition rate of the Carr–Purcell–Meiboom–Gill (CPMG) pulse trains, which are separated by a pulse sequence functioning as spin-state selective inversion (P-element), false large relaxation rates are sometimes observed for parts of ^{1}H–^{15}N correlations. Here we show examples of artifacts actually observed when the anti-TROSY component was inverted selectively by the P-element on purpose in ^{1}H/^{15}N (^{1}H/aromatic ^{13}C) TROSY-based ^{15}N (^{13}C) CPMG pulse sequences, and demonstrate how well they can be suppressed by correcting the P-element so that the TROSY-component was inverted.

NMR 緩和分散法は蛋白質などの運動性を詳しく解析できる方法の一つであり CPMG 法と呼ばれるスピンエコーの連続照射がよく使われる(1)。蛋白質のアミド基 ^{1}H が ^{1}J カップリングした ^{15}N の 2 スピン系においては、^{15}N の二重線の間の交差緩和の影響を打ち消すために、CPMG 期間を二つに分けて反位相の磁化を同位相の磁化に変換する方法がよく使われる(P-element in Fig.1)。ここでは、この変換のためのパルスの位相を工夫することにより、CPMG のアーティファクトをかなり減らすことができ、その小さくなったアーティファクトがオフレゾナンス効果にあまり依存せず、パルス強度のずれに対しても強いことを示す。さらに、アミド基だけでなく芳香環の ^{1}H/^{13}C TROSY 系列においても、この方法が有効であることを示す。

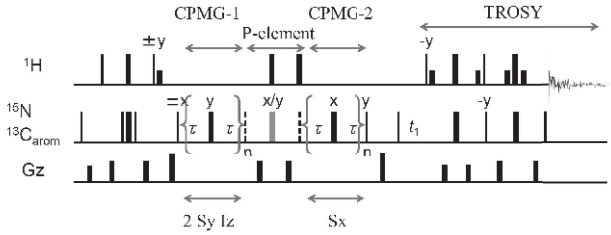


Fig. 1. Relaxation compensated CPMG pulse sequence

Fig.1 は今回の実験で使った CPMG-TROSY パルス系列である。Constant-time として設計された CPMG 期間は 20 ms ずつ二つに分けられ、前半の $CPMG_1$ 期間では反位相の磁化を、後半の $CPMG_2$ 期間では同位相の磁化を対象として ^{15}N のスピンエコーをそれぞれ n 回ずつ繰り返す。近似的には反位相の方が ^{1}H の縦緩和の影響により緩和が速い。このパルス系列は、その同位相と反位相の間の緩和速度の違いを補正するために提案され、relaxation-compensated 法とも呼ばれる(2)。

緩和分散、CPMG、オフレゾナンス効果

ながどい ありたか、○いけがみ たかひさ

このパルス系列で 50 残基の感度の高いキチナーゼ蛋白質試料を測定したところ、n=1 (ν_{cp}=25Hz) での見かけの R_2 の値が奇妙なほど大きくなるような現象が多くのアミド基の信号に観られた。Fig. 2 は n=1 における二次元 ^{1}H–^{15}N 相関スペクトルである。この図（左）の枠で囲まれたピーク（Lys-673）は、理想的な値に比べて強度が 10%ほど小さい。この違いは、ピーク強度を *R*ex に変換した際には 3.3Hz ほどの誤差にも達する。この蛋白質は以前の研究から構造交換や化学交換をほぼ持っていないことが分かっており、CPMG 実験において意味ある *R*ex は出ないはずであった。交換速度が遅めの場合、CPMG 周波数（ν_{cp}）の低い領域での緩和分散曲線にある種の振動が観られることが知られている。今回のアーティファクトは、この振動にも似ており、それゆえ間違えた解釈を導く可能性がある。

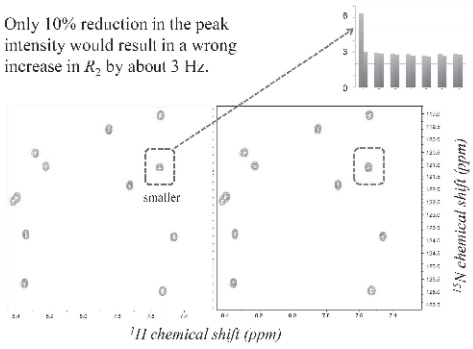


Fig. 2. ^{1}H-^{15}N TROSY-CPMG spectra measured with the ^{15}N π pulse in P-element applied from x (left) and y (right) at a CPMG frequency of 25 Hz (n=1)

測定で見られたアーティファクトの現象をより深く解析するため、{$CPMG_1$ (20ms)}-{P-element}-{$CPMG_2$ (20ms)} のハミルトニアンによる展開を経た後の磁化ベクトルの大きさをシミュレーションした。横軸はオフレゾナンスの大きさを表す。n はそれぞれの CPMG 期間におけるスピンエコーの繰り返し回数を表す。n=1, 2, 40 (それぞれ ν_{cp}=25, 50, 1000 Hz) CPMG π パルスについても実験での条件に等しく 80 μs (6,250 Hz)とした。(a, b) では RF-磁場強度がオンレゾナンスで理想的になるように設定した。すると、P-element の中の S-spin への π パルスの位相を x (b, d) から y (a, c) に変えることでオフレゾナンスに沿ったピーク強度の振動がかなり小さくなった。さらに特徴的な点は、この時の振動はスピンエコーの回数 n にほとんど依らないことである。これは緩和分散曲線を描いた時にオフレゾナンス効果によるアーティファクトが非常に小さいことを意味する。さらに、(c, d) は全期間の S-spin π パルスの RF-磁場強度を理想値より 10% 減らした場合のシミュレーション結果であるが、P-element の中の S-spin への π パルスの位相を y に変えることにより、パルス強度に対してもその影響を受けにくくなった。

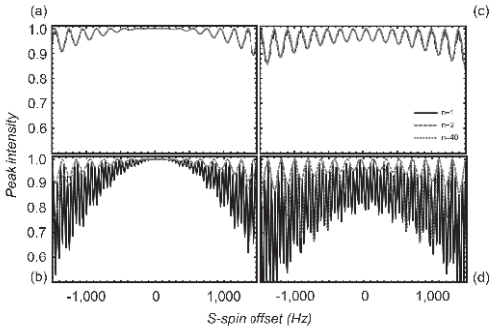


Fig. 3. Simulation of artifacts occurring in CPMG experiments

この方法は残余双極子相互作用によって分裂した ^{15}N 二重線それぞれの緩和分散をスピン状態選択的に測定する際に利用されている(3)。実際には TROSY か anti-TROSY かのどちらかの成分にしかこの手法は適用できない。P-element の中の π パルスを x にすべきかそれとも y にすべきかは、実はその他のパルスの位相やマシンのパルスの位相そのものにも依存しており、実際に感度のよい試料でどちらが正しいかを確認することが重要と考えられる。また、芳香環の ^{1}H–^{13}C TROSY にもこの方法が有効であることが分かった。

References

1. Hansen, D.F., Vallurupalli, P., and Kay, L.E. (2008) *J. Phys. Chem. B* 112, 5898–5904.
2. Loria, J.P., Rance, M., and Palmer III, A.G. (1999) *J. Am. Chem. Soc.* 121, 2331–2332.
3. Vallurupalli, P., Hansen, D.F., Stollar, E., Meirovitch, E., and Kay, L.E. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 18473–18477.

P7

溶液NMR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]，工藤工[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 NMR

○Akihiro Kidou[1], Takumi Kudou[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.*

Multi-domain 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】

マルチドメインタンパク質とは、それぞれが別々の機能を有するドメイン（領域）が直列に繋がって全長を構成しているタンパク質である。マルチドメインタンパク質では、このドメインが相互作用することでタンパク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タンパク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タンパク質の構造および機能の解析が必要不可欠となる。しかしながらマルチドメインタンパク質の全長の構造解析はいまだ未発達の領域である。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困難であり、必然的にタンパク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。また、このような柔軟な構造や弱い相互作用の解析に適するとされている NMR による構造決定においては、高分子量のマルチドメインタンパク質全長の構造決定は困難となる。

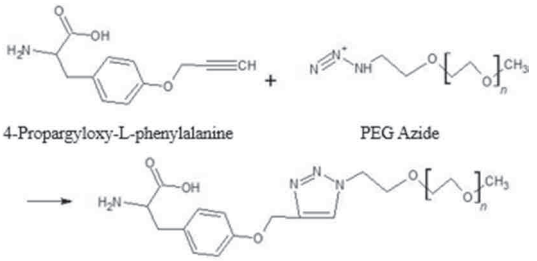


Fig.1 Schematic drawing of click reaction of 4-Propargyloxy-L-phenylalanine and PEG Azide.

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、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

溶液NMR，マルチドメインタンパク質

○きどうあきひろ，くどうたくみ，かなばてっぺい，いとうゆたか，みしままさき

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。

本研究ではクリック反応などを用いることでタンパク質のドメイン同士をつなげてタンパク質全長の再構成を試みている。クリック反応とはアジド基とアルキンがトリアゾール環を形成する反応である(Fig.1)。クリック反応を行うためにサプレッサーtRNAとアミノアシルtRNA合成酵素によってアンバーコドンにアルキンを持つ非天然アミノ酸である4-Propargyloxy-L-phenylalanineを導入した。

【実験】

まず、クリック反応において反応方法を確立するためにPKCより安定なSHARP-RRM1ドメインをテストサンプルとして用いた。非天然アミノ酸である4-Propargyloxy-L-phenylalanineを導入するベクターとの共発現系(Fig.2)を作製した。次に発現の際に目的の非天然アミノ酸が導入されているかを確認するために非天然アミノ酸を加えたものと加えていないものの2通りを培養し、精製した。そして、精製したRRM1ドメインとPEG Azideを用いてクリック反応を行った。反応には銅(Ⅰ)触媒とそのリガンドとしてBTTAAを用いた。

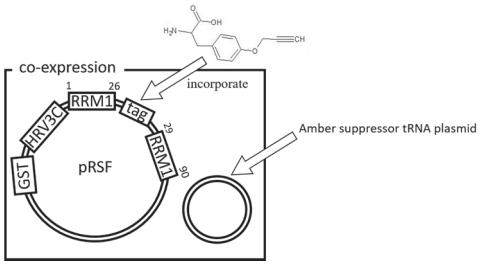


Fig.2 Schematic drawing of the expression system.
The expression vector contains an amber codon to incorporate to 4-Propargyloxy-L-phenylalanine by amber suppressor codon.

【結果・展望】

SHARP-RRM1において非天然アミノ酸を導入するための共発現系の作製に成功した。また、発現の際に目的の非天然アミノ酸が導入されていることがSDS-PAGEから確認できた(Fig.3)。クリック反応ではSDS-PAGEよりSHARP-RRM1ドメインとPEG Azideのつながったもののバンドが確認できた(Fig.4)。今後は部位特異的にアルキンを導入し、クリック反応により金属キレートタグを付けてPCSの観測を試みる。また、クリック反応を利用することで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。

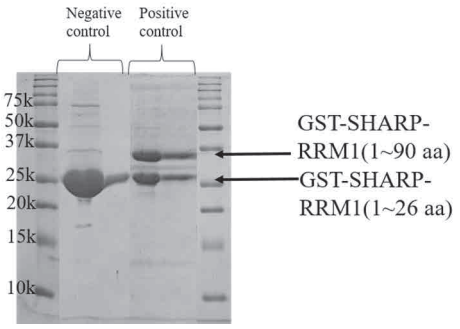


Fig.3 SDS-PAGE of expression check.
Positive control includes 4-Propargyloxy-L-phenylalanine.

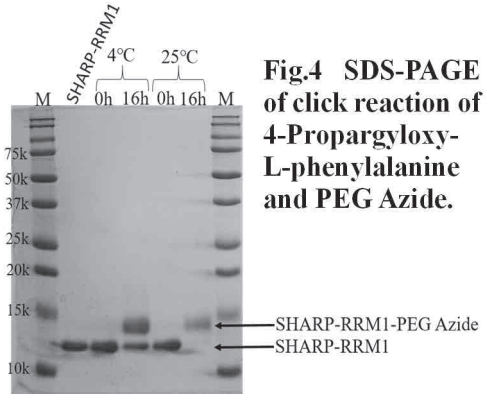


Fig.4 SDS-PAGE of click reaction of 4-Propargyloxy-L-phenylalanine and PEG Azide.

【参考文献】

Choy Theng Loh, et al., Bioconjugate Chemistry. 2013, 24, 260-268, 10.1021/bc3000631z

【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。

P8

ガス圧 NMR 法によるタンパク質における酸素結合部位の決定

○北原亮 [1]，桜庭俊 [2]，亀田倫史 [3]，奥田三四郎 [4]，Xue Mengjun[5]，Frans AA Mulder[5]

1 立命館大学・薬学部，2 東京大学大学院　新領域創成科学研究科，3 産業技術総合研究所人工知能研究センター，4 立命館大学大学院・生命科学研究科，5 オーフス大学 iNANO 研究所

Nuclear magnetic resonance-based determination of dioxygen binding sites in protein cavities

○Ryo Kitahara[1], Shun Sakuraba[2], Tomoshi Kameda[3], Sanshiro Okuda[4], Mengjun Xue[5], and Frans A.A. Mulder[5]

[1]College of Pharmaceutical Sciences, Ritsumeikan University, Nojihigashi 1-1-1, Kusatsu 525-8577, Japan

[2]Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo, Kashiwa, Chiba 277-8561, Japan

[3]Artificial Intelligence Research Center, Advanced Industrial Science and Technology, 2-4-7 Aomi, Koto, Tokyo 135-0064, Japan

[4]Graduate School of Life Sciences, Ritsumeikan University, Nojihigashi 1-1-1, Kusatsu 525-8577, Japan

[5]Department of Chemistry and Interdisciplinary Nanoscience Center (iNANO), University of Aarhus, Gustav Wieds Vej 14, DK-8000 Aarhus C, Denmark

O_2-induced paramagnetic relaxation enhancements (PREs) to the backbone amide and side chain methyl protons in the cysteine-free wild-type T4 lysozyme were measured using O_2 gas-pressure NMR spectroscopy. O_2-induced PREs were observed specifically around two hydrophobic cavities in the C-terminal domain with increasing the dissolved O_2 concentration in solvent to 8.9 mM. To determine the number of O_2 binding sites and their atomic coordinates from the $1/r^6$ distance dependence of the PREs, we established an analytical procedure using the Akaike Information Criterion and a grid-search, which was independent of the initial parameters. Two O_2-accessible sites were identified in the protein cavities. One site was consistent with the xenon-binding site in the protein in crystal, and the other site was established to be a novel ligand-binding site.

ガス圧 NMR　PRE　T4 リゾチーム

○きたはら　りょう、さくらば　しゅん、かめだ　ともし、おくだ　さんしろう、シュー　メンジュン、ムルダー　フランス

【緒言】

タンパク質の分子内空洞（キャビティー）は、タンパク質構造の一部であり、構造揺らぎや熱安定性、リガンド結合などの機能発現と関わっている可能性がある。X 線結晶構造解析においては、キセノンなどの希ガスの結合部位の決定が可能であるが、溶液 NMR 法では確立されたガス分子の結合部位の決定法はない。リガンドが相互作用可能なキャビティーの探索は、疎水性化合物の結合部位の推定やそれに基づく化合物分子設計・探索に役立つとともに、タンパク質の安定化を目的とした変異体設計にも有用である。著者らは、分子内にキャビティーを有する T4 リゾチーム L99A 変異体[1]や OspA[2]について、酸素ガスの加圧により溶存酸素濃度を大気圧下の約 35 倍(酸素分圧 0.7 MPa)まで増加させ、溶液 NMR 法によりタンパク質と溶存酸素の相互作用について研究を行った。酸素分子は、2 つの不対電子を持ち常磁性となるため、キャビティーや分子表面への結合に伴い、原子核の縦・横緩和に強力な常磁性緩和促進(PRE)をもたらす。縦緩和への PRE（同圧力における酸素圧下と窒素圧下の縦緩和速度定数 R_1 の差として定義する）が常磁性体と水素核間の距離の 6 乗に反比例することを利用し、酸素結合部位の推定が可能である。PRE は式 1 で表される。

$$\Delta R_1 = C_0 + \sum_{\mathrm{i}=1}^{\mathrm{n}} C_i \left((x_a - X_i)^2 + (y_a - Y_i)^2 + (z_a - Z_i)^2\right)^{-3} \quad (1)$$

$x_\mathrm{a}, y_\mathrm{a}, z_\mathrm{a}$ は水素の座標、$X_\mathrm{i}, Y_\mathrm{i}, Z_\mathrm{i}$ は酸素の結合部位 i の座標である。多数の水素核における PRE を式 1 にグローバルフィットすることにより、$C_0, C_\mathrm{i}, X_\mathrm{i}, Y_\mathrm{i}, Z_\mathrm{i}$ を求めることができる。しかしながら、解析においては結合部位数 n の増加とともにパラメーター数が増加し、フィッティングに初期値依存性があるという問題があった。式 1 を用いた酸素結合部位の決定に際し、グリッドサーチ法と統計モデルの良さの指標となる赤池情報量基準(AIC)を用いた初期パラメーター値に依らない解析手法を確立した（北原ら、論文投稿中）。

【結果と考察】

T4 リゾチーム擬野生体（C54T/C97A）について、大気圧（酸素分圧 0.02 MPa）から酸素圧（または窒素圧）0.7 MPa までの範囲で ^{1}H/^{15}N HSQC と ^{1}H/^{13}C constant time (CT) HSQC 測定を行い常磁性シフトを観測した。また飽和回復法を組み込んだ HSQC 測定から、アミド水素とメチル水素の縦緩和速度定数 R_1 を求めた。同圧力における酸素圧下と窒素圧下の差から PRE(ΔR_1)を求めた。上記解析手法により、酸素結合部位は 2 箇所(図 1： site 1 と 2)であり、site 1 への結合が site2 へのそれより 10 倍強いことがわかった。

図 1　T4 リゾチームにおける酸素結合部位(site 1 と 2)。

【参考文献】

[1] Kitahara, R. et al., Sci. Rep. 6:20534, 2016 [2] Kawamura, T. et al., Biophys. J. 112, 1820-1828, 2017

P9

レオロジーNMRを用いたタンパク質線維形成機構の解明

○森本大智[1]，Erik Walinda[2]，岩川直都[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
3Leibniz Institute of Polymer Research Dresden
4ブルカー・バイオスピン株式会社

Elucidation of amyloid fibril formation mechanism by using Rheo-NMR spectroscopy

○Daichi Morimoto[1], Erik Walinda[2], Naoto Iwakawa[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.*

Abnormal protein aggregation is a common hallmark of Alzheimer's and other neurodegenerative diseases. Despite the growing interest in their pathogenesis, no existing method can capture aggregate nucleation and subsequent growth at atomic resolution. In this study, we have recently established high-sensitivity Rheo-NMR spectroscopy that enables us to detect atomic-level structural changes of a protein during amyloid formation *in situ* in real time. By using the newly developed Rheo-NMR, we detected site-specific structural information on amyloidogenic proteins during their amyloid formation, gaining insight into mechanism underlying amyloid nucleation at atomic resolution.

脳内に異常なタンパク質凝集体が蓄積する。これはアルツハイマー病をはじめとする神経変性疾患の病理学的特徴である。異常タンパク質凝集体（アミロイド）の物質的、構造学的特徴はこれまで深く研究されているが、一方、その形成機序に関しては原子レベルの情報が不足している。本研究では、NMR管内の試料に剪断流を加えることの出来るレオロジーNMR法を用いて、アミロイド形成する「その場」を原子レベルで解析することを目指した。だが、既存のレオロジーNMR法は感度が低く、低濃度もしくは高分子量試料に関しては適していない。そこで、我々はクライオプローブ装着のNMR装置に適用できるレオロジーNMR法を新たに開発した(1)。

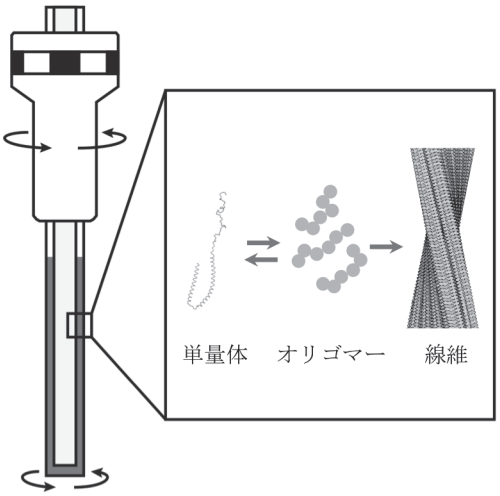


Fig. 1. Schematic diagram of newly developed biological Rheo-NMR spectroscopy.

レオロジーNMR，アミロイド

○もりもとだいち，うぁりんだえりっく，いわかわなおと，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

開発したレオロジーNMRシステムでは、NMR装置のデフォルト機能であるスピナー回転を利用している。固定したガラス管をNMR管に挿入し、スピナー回転でNMR管を回転させることにより、溶液中に一方方向に剪断流を与えることが出来る。このシステムを、クライオプローブ装着のNMR装置に適応することで、タンパク質試料に適した高感度レオロジーNMRシステムを構築することが出来た。

まず、開発した新しいレオロジーNMR装置のNMR感度ならびに安定性の評価をおこなった。剪断流がある場合とない場合のモノユビキチンのR_1、R_2、^{15}N異種核NOEを測定し、オーダーパラメータS^2を算出したところ、二者はほぼ同じクオリティーで測定することが出来ており、数値に差が無いことが分かった(Fig. 2)。これは、剪断流中でもタンパク質試料のNMR測定を感度良く測定することが出来ることを示しており、モノユビキチンは頑丈な立体構造を有していることから、加えた剪断流はその構造にほとんど影響を与えなかったことを示唆する。

次に、アミロイド線維を形成するヘキサユビキチン[(2)]が、開発したレオロジーNMR装置によって線維を形成するかどうかを検証した。35 Hzのスピナー回転による剪断流を与えたところ、ヘキサユビキチンはチオフラビンT陽性のアミロイド線維を形成した(Fig. 3)。加えて、アミロイド線維形成に際し、^{1}H-^{13}C HSQCスペクトル中の幾つかのクロスピークについて、化学シフト変化があることが分かった(Fig. 4)。変化があった残基は立体構造表面に位置しており、特にプロリン残基は全て含まれていた。このことから、プロリンのシス-トランス異性がヘキサユビキチンの線維形成に関わっていることが示唆された[(3)]。

本発表では、これらの結果に加え、最新のレオロジーNMRデータを発表する予定である。

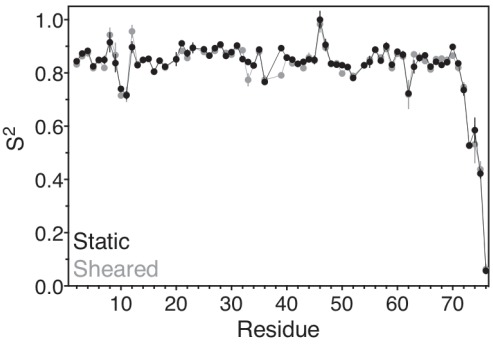


Fig. 2. Order parameter S^2 of ubiquitin under static and sheared conditions.

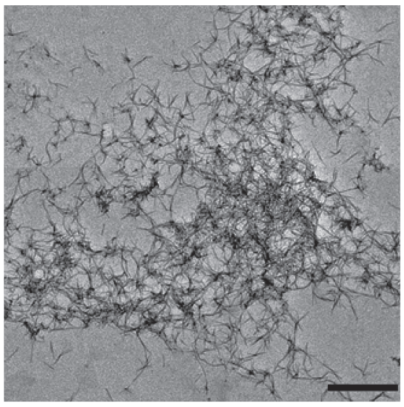


Fig. 3. Electron microscopy image of sheared linear hexaubiquitin.

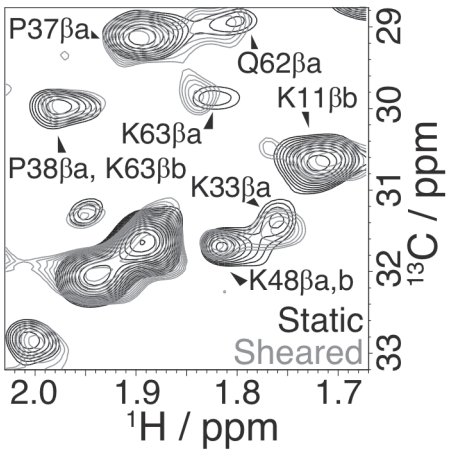


Fig. 4. Cross-peak changes in ^{1}H-^{13}C HSQC of linear hexaubiquitin by fibril formation.

References

(1) Morimoto, D., *et al*., Anal. Chem., 2017, 89 (14), 7286-7290.

(2) Morimoto, D., *et al*., Nat. Commun., 2015, 6, 6116.

(3) Jahn, T. R., *et al*., Nat. Struct. Mol. Biol., 2006, 13 (3), 195−201.

P10

^{13}C検出法によるアルギニン側鎖のNMR信号検出およびイオン化状態の同定

○吉村 優一[1]，Nur Alia Oktaviani[2]，米澤 健人[3]，上久保 裕生[3]，Frans A. A. Mulder[1,2]

1 オーフス大学・Interdisciplinary Nanoscience Center (iNANO) and Department of Chemistry

2 フローニンゲン大学・Groningen Biomolecular Sciences and Biotechnology Institute

3 奈良先端科学技術大学院大学・物質創成科学研究科

^{13}C-detected NMR spectroscopy for probing arginine side-chains and determining their ionization states

○Yuichi Yoshimura[1], Nur Alia Oktaaviani[2], Kento Yonezawa[3], Hironari Kamikubo[3], Frans A. A. Mulder[1,2]

[1] *Interdisciplinary Nanoscience Center (iNANO) and Department of Chemistry, Aarhus University*

[2] *Groningen Biomolecular Sciences and Biotechnology Institute, University of Groningen*

[3] *Graduate School of Materials Science, Nara Institute of Science and Technology*

We present a ^{13}C-detected NMR experiment for probing individual arginine residues in proteins notwithstanding the presence of chemical and conformational exchange effects. Arginine head group $^{15}N^{\eta}$ and $^{15}N^{\varepsilon}$ chemical shifts are correlated with that of the directly attached $^{13}C^{\zeta}$. The number of protons in the arginine head group can be obtained directly from the ^{15}N–^{1}H scalar coupling splitting pattern. We applied this method to unambiguously determine the ionization state of the R52 side chain in the photoactive yellow protein from *Halorhodospira halophila*. Although only three H^{η} atoms were previously identified by neutron crystallography, we show here that R52 is predominantly protonated in solution.

Because of the unique potential of the arginine head group (Fig. 1) to form multiple hydrogen bonds, arginine is a key component of protein–protein interfaces and interactions between protein and nucleic acid molecules. Arginine also functions as a charge carrier in photoreceptor proteins and ion channels. Arginine in proteins rarely exists in its deprotonated state due to its strongly basic character. Photoactive yellow protein (PYP), a photoreceptor protein from *Halorhodospira halophila*, contains two arginine residues, R52 and R124, and knowledge of the ionization state of R52, which functions as a gateway in the reaction center of PYP, is important for understanding the energetics of the photo cycle. Although the nuclear density indicated that R52 was deprotonated,[1] subsequent electrostatics calculations proposed that R52 is protonated.[2] This controversy therefore calls for unambiguous determination of the charge state of R52 through experiments.

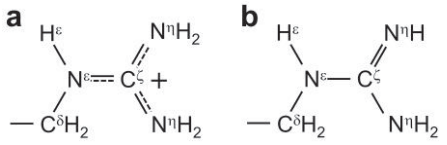


Fig. 1. Structure of the guanidinium (a) and guanidino (b) forms of arginine.

---

^{13}C direct detection，^{15}N–^{1}H spin-spin coupling，cross polarization

○よしむら ゆういち，おくたふぃあに ありあ，よねざわ けんと，かみくぼ ひろなり，むるだー ふらんす

NMR experiments relying on ^{1}H detection are compromised by exchange broadening effects. The 2D ^{15}N–^{1}H HSQC spectrum for the arginine head groups for PYP (Figure 2a) could be interpreted to mean that the two $^{15}N^{\eta}$ and the four $^{1}H^{\eta}$ for R52 chemical shifts are all averaged, indicating that the partly buried R52 in the protein would rotate faster than the solvent-exposed R124. This conclusion is incorrect, and the correct conclusion can only be reached using data from a novel ^{13}C-detected NMR experiment as shown below.

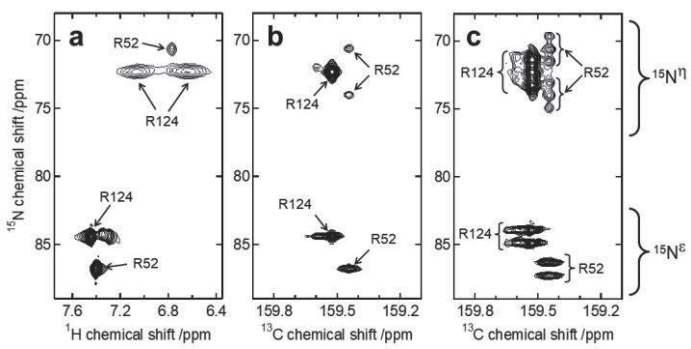


Fig. 2. Probing the arginine head groups of PYP. (a) ^{15}N–^{1}H HSQC spectrum of PYP. (b, c) ^{1}H-decoupled (b) and ^{1}H-coupled (c) $^{15}N^{\eta/\varepsilon}$–$^{13}C^{\zeta}$ correlation spectra of PYP.

In the new 2D NMR experiment, the head group $^{15}N^{\eta/\varepsilon}$ chemical shifts are correlated with the directly attached $^{13}C^{\zeta}$ chemical shift.[3] Briefly, the magnetization transfer can be described as $^{1}H^{\eta/\varepsilon} \rightarrow {}^{15}N^{\eta/\varepsilon}(t_1) \rightarrow {}^{13}C^{\zeta}(t_2)$. The use of cross polarization for the simultaneous transfer of polarization from the $^{15}N^{\eta/\varepsilon}$ spins to $^{13}C^{\zeta}$ is crucial to mitigate coherence losses due to chemical exchange processes. Figure 2b shows the arginine $^{15}N^{\eta/\varepsilon}$–$^{13}C^{\zeta}$ correlation spectrum for PYP. In contrast to the ^{15}N–^{1}H HSQC spectrum, two $^{15}N^{\eta}$ signals are detected for R52 at 74.0 and 70.6 ppm. The observation of separate $^{15}N^{\eta}$ resonances indicates that the R52 side chain displays impeded mobility. R124, on the other hand, rotates faster, leading to a single averaged peak. It is now clear that the single peak observed for R52 in the ^{15}N–^{1}H HSQC spectrum (Fig. 2a) corresponds to only one of the amino groups, while the other resonance is not detected.

Although conformational and chemical exchange broadening precludes direct $^{1}H^{\eta}$ detection, a count of the number of protons can nevertheless be made if exchange with the solvent is slow enough to observe ^{15}N–^{1}H spin-spin couplings. Figure 2c shows a 2D arginine $^{15}N^{\eta/\varepsilon}$–$^{13}C^{\zeta}$ correlation spectrum measured in the absence of ^{1}H decoupling during the ^{15}N chemical shift encoding period. In the ^{1}H-coupled spectrum, all signals for $^{15}N^{\eta}$ show triplets due to two simultaneous ^{15}N–^{1}H couplings per nitrogen. Our experimental data demonstrate the presence of four H^{η} protons for R52, indicating that the cationic form prevails in solution. Although neutron crystallography identified only three H^{η} atoms for R52,[1] a reconciliation may lie in intrinsic differences in the protein structure of the solution and solid states. In summary, we show that the charge states of individual arginine side chains in proteins are accessible by the ^{13}C-detected NMR experiments presented herein.

References

(1) Yamaguchi, S., Kamikubo, H., Kurihara, K., Kuroki, R., Niimura, N., Shimizu, N., Yamazaki, Y., Kataoka, M. (2009) Low-Barrier Hydrogen Bond in Photoactive Yellow Protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *106*, 440–444.

(2) Saito, K., Ishikita, H. (2012) Energetics of Short Hydrogen Bonds in Photoactive Yellow Protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *109*, 167–172.

(3) Yoshimura, Y., Oktaviani, N. A., Yonezawa, K., Kamikubo, H., Mulder, F. A. A. (2017) Unambiguous Determination of Protein Arginine Ionization States in Solution by NMR Spectroscopy. *Angew. Chem. Int. Ed.*, *56*, 239–242.

P11

溶液NMRを用いたリン酸化タンパク質と マルチドメインタンパク質の複合体の構造解析

○工藤　工[1]，伊藤　隆[1]，三島　正規[1]
[1]首都大学東京　理工学研究科

Structural studies of the phosphorylated protein / multi-domain complex by NMR

○Takumi Kudo[1], Yutaka Ito and Masaki Mishima[1]
[1]*Graduate School of Science and Engineering, Tokyo Metropolitan University*

Multi-domain 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.Protein Kinase C θ (PKCθ) play key role in T lymphocyte activation. PKCθ is consisted of C2-like, C1A, C1B, and kinase domains. In PKCθ, the regulatory domain which receives signals from the upstream regulates the activity of the kinase domain, so it is essential to analyze full–length structure. The C2 domain of almost PKC is an eight-stranded βsandwich protein involved in Ca^{2+}-dependent membrane binding for conventional isoforms. However, it was reported that C2-like domain of PKCθand δ bind phosphorylated CDCP1. To reveal the molecular recognition of regulatory factor by PKCθ,we try to determine the PKCθ/ regulatory factor complex structure.

序論

真核生物内では、タンパク質の80%以上がマルチドメインタンパク質であり、それらはフレキシブルなタンパク質であることが多い。しかし、このフレキシビリティにより結晶化が困難で、X線による結晶構造解析がしばしば適応できないことが課題である。そこで本研究では、溶液NMR法を用いてマルチドメインタンパク質PKCθの構造解析およびカウンターパートとの相互作用を分子構造レベルで理解することを目的とした。

PKCθ(Protein Kinase C θ)は、Tリンパ球の活性における重要な役割を担っており、3つの制御ドメインのC2-like, C1A, C1Bドメインと触媒ドメインの kinaseドメインを持つマルチドメインタンパク質である。個々のドメインが柔軟なリンカーで結合しており、ドメイン間の相互作用によって全体の活性を制御している。このシグナル伝達に関わるドメイン配向の変化等、全長の構造解析は、PKCθの機能を理解するうえで重要である。同時に、活性の制御機構を理解するために制御ドメインと、その制御因子の複合体の立体構造の知見も極めて重要である。

PKCθのC1A、 C1Bドメインが細胞膜のDAG(diacylglycerol)と結合することによってkinaseドメインが活性化することはコンベンショナルなPKCと同様であるが、興味深いことにC2-likeドメインはSrcキナーゼによってリン酸化された膜結合タンパク質のCDCP1と相互作用し、これがPKCθの活性を制御している可能性が報告されている(1)。そこで本研究ではPKCθ/CDCP1複合体の構造解析を行い、その分子認識を理解することを目的としている。

溶液NMR,マルチドメインタンパク質

○くどう　たくみ、いとう　ゆたか、みしま　まさき

実験

まず PKCθ_C2-likeドメイン(5-116 残基)の発現系の構築を行った。pRSF ベクターを用い、精製用の GST タグ、タグの切断サイトには HRV3C 認識配列を用いた。これを BL21(star) *E.coli* に形質転換した。この大腸菌の発現系を用いて安定同位体標識 PKCθ_C2-like の発現、精製を行った。また、CDCP1 の Y762 が Src によってリン酸化されることにより PKC θ _C2-like と結合するため CDCP1 (756-771 残基) 由来のリン酸化ペプチド (MALYSI-pY-QPYVFAKKK) を化学合成によって調製した。このペプチドと PKCθ_C2-like について NMR を用いた結合実験を行った。

結果

NMR 測定の結果、PKCθ_C2-like:CDCP1_peptide=1:0 (Fig.1)のとき HSQC 測定において分離のよいスペクトルが得られた。PKCθ_C2-like:CDCP1_peptide=1:2 (Fig.1)のとき化学シフト変化が見られ、その後ペプチドの量を増やしたがスペクトルに変化は見られなかったため、PKCθ_C2-like:CDCP1_peptide=1:2 で完全に結合したことが確認された。

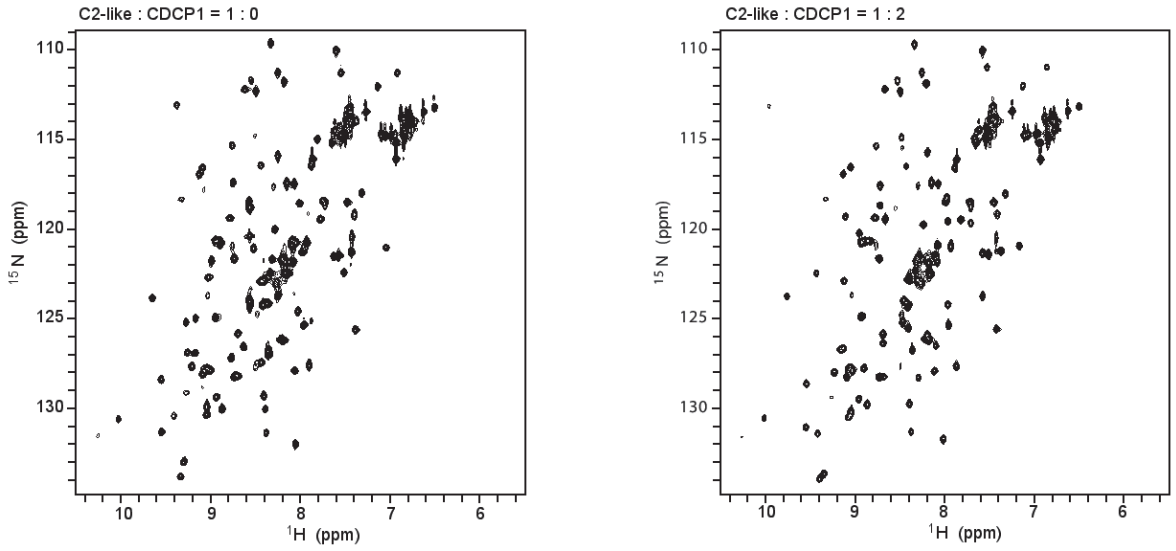


Fig.1 The 1H15N spectra of titration between PKCθ_C2-like and CDCP1 peptide
(Left) PKCθ_C2-like : CDCP1 = 1:0
(right) PKCθ_C2-like : CDCP1= 1:2

展望

化学合成によって調製されたペプチドで化学シフト変化が確認された。現在、構造をとった CDCP1 の結合領域のタンパク質の精製を試みている。今後は CDCP1 と PKCθ_C2-like の複合体の構造解析を行っていく。

参考文献
(1)Robert V. et al.,*J.Biol. Chem.* (2012) 287, 300518-300528

P12

RNA結合タンパク質Musashi-1のRBD2:r(GUAGU)複合体溶液構造決定と標的RNA選択メカニズムの解明

○岩岡　諒[1,2], 永田　崇[1,2], 津田　健吾[3], 今井　貴雄[4,5]
岡野　栄之[4], 小林　直宏[6], 片平　正人[1,2]
[1]京都大学大学院・エネルギー科学研究科
[2]京都大学・エネルギー理工学研究所
[3]理研・CLST
[4]慶應義塾大学・医学部・生理学教室
[5]慶應義塾大学・医学部・化学教室
[6]大阪大学・蛋白質研究所

Structural determination of Musashi-1 RBD2:r(GUAGU) and structural insight of target RNA selection mechanisms

○Ryo Iwaoka[1,2], Takashi Nagata[1,2], Kengo Tsuda[3], Takao Imai[4,5], Hideyuki Okano[4], Naohiro Kobayashi[6], and Masato Katahira[1,2]
[1]*Graduate School of Energy Science, Kyoto University.*
[2]*Institute of Advanced Energy, Kyoto University.*
[3]*CLST, RIKEN.*
[4]*Department of Physiology, Keio University School of Medicine.*
[5]*Department of Chemistry, Keio University School of Medicine.*
[6]*Institute for Protein Research, Osaka University.*

Musashi-1 (Msi1) plays critical role in the promotion of stem cell self-renewal by repressing the translation of mRNAs encoding proteins involved in cell cycle progression. Recently, Msi1 is drawing much attention in the field of medicine, since it reportedly promote self-renewal of tumor cells. Msi1 has two RNA-binding domains (RBDs), RBD1 and RBD2, both of which adopt a β1α1β2β3α2β4 topology [1,2]. Previously, we carried out chemical shift perturbation assay, and showed that RBD1 and RBD2 recognize r(GUAG) and r(UAG), respectively[3]. The recognition of these minimal recognition sequences seems critical for Msi1 to find its target sequences, r(UAGX_nGUAG) (n=1-50 nt), among an enormous number of RNA transcripts. Here, we present the first NMR structure of Msi1 RBD2 in complex with r(GUAGU)[4]. The structure revealed that the central trinucleotide, r(UAG), is specifically recognized by the intermolecular hydrogen bonds, as well as electrostatic, aliphatic-π, and π-π stacking interactions on the β-sheet surface. Furthermore, we built a structural model of consecutive RBDs (RBD1-2) bound with r(UAGGUAG), using our structures (PDB ID: 2RS2 and 5X3Z). The structural model suggested how Msi1 RBD1-2 recognizes the target RNA sequence, r(UAGX_nGUAG) (n=0-50 nt), found in nature.

タンパク質-RNA複合体, RNA結合タンパク質, モデリング

○いわおかりょう, ながたたかし, つだけんご, いまいたかお, おかのひでゆき, こばやしなおひろ, かたひらまさと

【緒言】

体性幹細胞の未分化状態及び増殖性の維持と発癌に関わるMsi1は、Notchシグナル伝達を抑制するタンパク質Numbの発現を翻訳レベルで抑制する。通常翻訳は、5′端のキャップ複合体の構成因子eIF4Gと、3′端のポリ(A)に結合したPoly(A)-Binding Protein (PABP)との相互作用により、促進される。しかし体性幹細胞では、mRNAに結合したMsi1がeIF4Gと競合して直接PABPに結合し、eIF4GとPABPの結合を阻害するため、翻訳が抑制される。これまでに我々は、Msi1が有する二つのRNA結合ドメイン(RBD1とRBD2)のNMR構造を明らかにした[1,2]。RBD1については、標的配列に含まれるr(GUAGU)との複合体構造を決定することでRBD1:r(GUAG)の結合様式を明らかにした[3]。本研究では、$^{13}C/^{15}N$均一標識したMsi1 RBD2を調製し、RBD2:r(GUAGU)複合体について構造解析を行い、得られた構造に基づいてRBD2:r(UAG)の結合様式を明らかにした[4,5]。さらにMsi1が標的とするmRNA分子の配列を解析することで、新たにMsi1が$r(UAGX_nGUAG)$ (n=0 nt)を含む配列を認識し得ることを示した。加えて、n=0 時のRBD1-2:r(UAGGUAG)モデル構造を構築した。他方、最近ジカウイルスに感染した細胞において、Ala184Valの変異を持つMsi1が発現し、核酸結合能が低下することが報告されている[6]。我々の構造データを基にし、Ala184Val変異がMsi1のRNA結合能に与える影響についても考察する。

【結果】

1. 溶液NMR法によるRBD2:r(GUAGU)複合体構造決定

RBD2（残基109-200）に対して、r(GUAGU)の滴定実験をおこなった。主に、βストランド上においてChemical shift perturbation (CSP)が観測された。また、C端領域の残基185-190においても強いCSPが観測された。このことから、βストランドのみならず、C端領域もRNA結合に関与することが示された(Fig.1)。

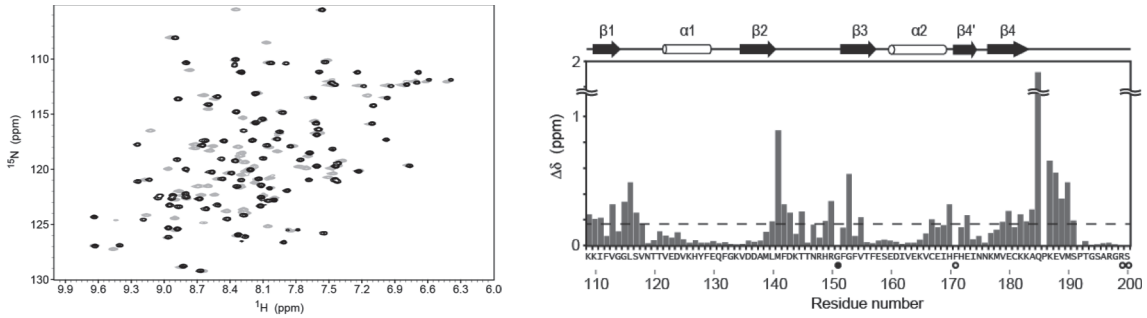


Fig. 1. $^{1}H,^{15}N$ HSQC spectra of RBD2 in free form (gray) and in complex (black) with r(GUAGU) (left). CSP of Msi1 RBD2 upon binding with r(GUAGU) (right).

RBD2単独とRNA複合体について各種他核多次元NMRスペクトルを測定し、シグナルの帰属を行った[5]。結果、ほぼすべての主鎖と側鎖の化学シフトを帰属することが出来た[BMRB IDs: 36058, and 36059]。RBD2単独においては、3D ^{13}C-edited NOESYと3D ^{15}N-edited NOESYからCYANAにより自動帰属されたNOE情報を取得し構造決定を行った。また、複合体においても3D ^{13}C-edited NOESYと3D ^{15}N-edited NOESYからCYANAにより自動帰属されたNOE情報を取得した。加えて、RNA分子内のNOE情報を^{13}C, ^{15}N-[f1, f2]-filtered NOESYから取得し、タンパク質-RNA間のNOE情報を^{13}C, ^{15}N-[f2]-filtered NOESYとRNA分子内のNOEを基に取得した。得られた分子間距離制限情報とCYANAにより自動帰属されたRBD2のNOE情報を基に、RBD2:r(GUAGU)複合体の溶液構造を決定した(Fig.2)。RBD2は、r(GUAGU)のうちr(UAG)を認識していた。また、r(UAG)の認識にはβ

ストランド上のアミノ酸残基とのπ－πスタッキング、脂肪族鎖－π相互作用、静電相互作用及び水素結合が関与していた。また、C端領域の残基185-190もRNA結合に直接関与していた。

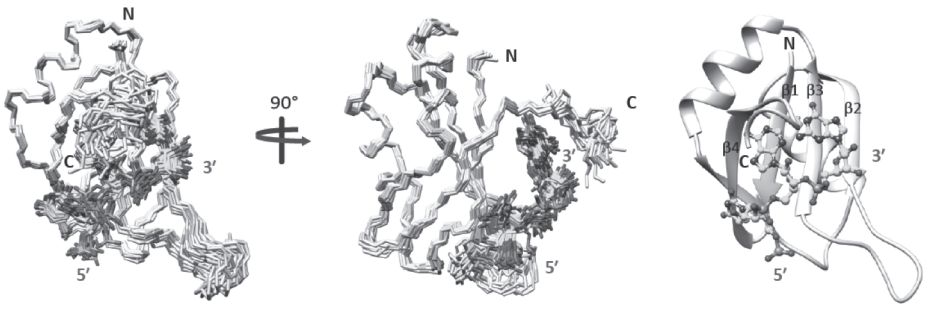


Fig. 2. Solution structure of the Msi1 RBD2:r(GUAGU) complex. Only r(UAG) portion of r(GUAGU) is shown for RNA. Backbone traces of the 20 conformers of the complex are superimposed (left and middle). Ribbon representations of the lowest energy conformer of the complex (right). RNA is shown as a ball-and-stick model in all representations.

Steady-state NOEの値によりC端領域185-190、のflexibilityを評価した (Fig.3)。RNA結合に伴って、この領域のSteady-state NOE値は多少上昇した。しかしながら、複合体形成後も185-190領域の運動は完全には抑えられないことが判明した。構造解析では、K187またはM190とRNAとのNOEをいくつか検出していたが、距離情報が十分に得られなかったのはこの運動性のためだと考えられる。RBD2(110-184)の部位と比較すると、RBD2(185-190)は低い収束性を示した。

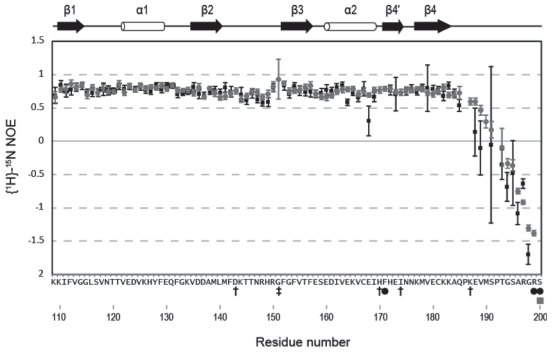


Fig. 3. {^{1}H}-^{15}N steady state NOE analysis of RBD2 in free (■) and complex (●) forms.

2. RBD1-2:r(UAGGUAG)モデル構造構築

近年、タンパク質-RNA間のハイスループットな相互作用解析方法が確立され、Msi1が標的とするmRNA分子が次々と報告されている。Msi1はmRNAの3′-UTRに結合し、翻訳を抑制するタンパク質である。近年新しく報告されたヒトmRNAの3′-UTRにおけるMsi1の結合配列をサーベイしたところ、いくつかのmRNAにおいてr(UAGGUAG)モチーフを見出した(Fig.4)。このモチーフは、r(UAGX_nGUAG)においてn=0の配列である。

APC	9382	AACUAGAUUUUAUCUGAAAGUAGGUAGAAUUUUUGCUAUGCUGUAAU	9428
doublecortin	8752	CACAUGUAAUCCAAAGACAGUAGGUAGUGAUGUCCCUUAUCCCUGCA	8798
Jagged1	4177	ACCGCGGGCACUGCCGCCGCUAGGUAGAGUCUGAGGGCUUGUAGUUC	4223

Fig. 4. Alignment of the 3′-UTR regions of the Msi1 target mRNAs. The Msi1 target mRNAs contain the r(UAGGUAG) sequence (highlighted in black).

われわれは以前、RBD1-2:r(UAGGUAGUAGUUUUA)の複合体構造解析に挑戦したが、RBD1-2と核酸を混合するとサンプルが沈殿し、複合体の構造解析まで至らなかった[3]。そこで、以前に溶

液NMR法を用いて構造決定したMsi1 RBD1:r(GUAGU) (PDB ID: 2RS2)と、今回新たに構造決定した Msi1 RBD2:r(GUAGU) (PDB ID: 5X3Z) を基に、RBD1-2:r(UAGGUAG)のモデル構造を構築した。

モデル構造構築のテンプレートとして、Protein Data Bank上からアミノ酸の保存性とRNA認識様式の保存性の観点からHrp1 RBD1-2:r(UAUAUAU) (PDB ID: 2CJK)を見出した。

モデル構造はHrp1のRBD1とRBD2に、Msi1の２つのRBDをそれぞれ重ね合わせた。さらに、エネルギー最小化計算を行い、モデルの最終構造とした(Fig.5)。このモデル構造を用いて、抗癌剤の*in silico* スクリーニングが期待できる。

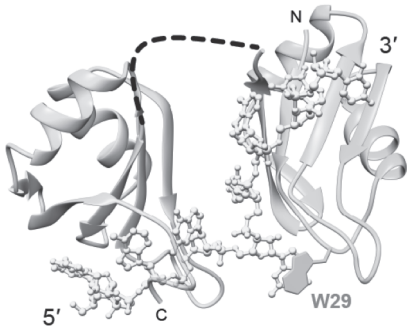


Fig. 5. Model structure of RBD1-2:r(UAGGUAG).

3. Msi1のAla184Val変異体の核酸結合能について

ジカウイルスに感染した神経幹細胞において、Ala184Valの変異をもつMsi1（RBD2^{Ala184Val}）の発現が確認された[6]。Ala184は、RBD2のβ4の終わりに位置するアミノ酸である。この変異によって、Msi1のRNA結合能が低下し、正常な脳の発達が阻害される可能性が報告されている。また、RNA結合能の低下は、Valとアデニンの立体障害によると報告されている。そこで、我々が決定したRBD2:r(GUAGU)の構造を基に、RBD2^{Ala184Val}:r(GUAGU)複合体モデル構造を構築し、検証を行った。しかし、立体障害を見出すことが出来なかった。我々が解析した野生型RBD2:RNA複合体について、Ala184の3D ^{13}C-edited NOESYスペクトルを確認すると、Ala184 Hβとβストランド上に位置しRNAの側鎖とスタッキングするPhe112とPhe154の側鎖の間にNOEが観測されていた (Fig.6)。したがって、AlaからValへの置換は例えばPhe112とPhe154の様に、核酸結合に関わるアミノ酸の側鎖の構造変化を誘発し、その結果RNA結合能に影響が出るのではないかと推察している。現在、実験系を構築中である。

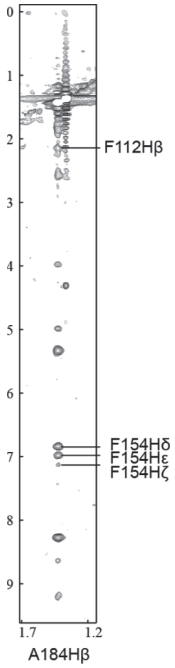


Fig. 6. 3D ^{13}C-edited NOESY spectrum of RBD2 in complex with r(GUAGU).

【参考文献】

[1] Nagata *et al*. (1999) *JMB*. **287**, 315-330

[2] Miyanoiri *et al.* (2003) *JBC*. **278**, 41309-41315

[3] Ohyama *et al.* (2012) *NAR*. **40**, 3218-3231

[4] Iwaoka *et al.* (2017) *molecules*. **22**, 1207

[5] Iwaoka *et al.* (2017) *Biomol NMR Assign.* (doi: 10.1007/s12104-017-9760-9)

[6] Chavali *et al.* (2017) *Science*. (doi: 10.1126/science.aam9243)

【謝辞】

本研究の一部は、「大阪大学蛋白質研究所共同利用・共同研究拠点」により実施されました。

P13

常磁性効果を用いた溶液NMR法による蛋白質の立体構造解析

○岡田 真由[1]，池谷 鉄兵[1]，Rajesh Sundaresan[1]，野尻 英里[1]，
美川 務[2]，伊藤 隆[1]
[1]首都大学東京・大学院理工学研究科
[2]理化学研究所・生命システム研究センター

Protein structural refinement using paramagnetic effects in solution NMR

○Mayu Okada[1], Teppei Ikeya[1], Rajesh Sundaresan[1], Eri Nojiri[1], Tsutomu Mikawa[2], Yutaka Ito[1]
[1] *Department of Chemistry, Graduate School of Science, Tokyo Metropolitan University*
[2] *RIKEN, QBiC*

Paramagnetic effects such as paramagnetic relaxation enhancement (PRE) and pseudo-contact shift (PCS) have become an indispensable technique for protein structural analysis by solution NMR. These provide substantially long-range distance and orientation information (~40 Å). However, the process to extract a maximum amount of structural information from the data and lead to 3D conformations has not been sufficiently established yet. We recently developed a refinement method that iteratively optimizes explanatory variables of those effects, signal assignment, and protein structure. Here we discuss its performance and future perspective, and also show a protein structure refinement of yeast ubiquitin hydrolase 1 (YUH 1) as a practical application of the paramagnetic NMR.

【序論】

近年溶液NMRによる蛋白質の構造解析において, paramagnetic relaxation enhancement (PRE) や pseudo-contact shift (PCS)のような常磁性効果を利用する手法が多く活用されるようになった．従来のNMRによる構造解析では，化学シフトから得られる二面角情報やNOEにより得られる5Å以下のプロトン間の距離情報が用いられてきた．しかしながら，構造解析の対象となる蛋白質が大きくなるに従い，NMRシグナルの重なりや速い横緩和により構造情報を十分に得ることが困難になる．PCSやPREから得られる長距離情報は，こうした構造情報の不足を補い，高分子量蛋白質の解析やin-cell NMRに極めて有用である．特にPCSは，最大40Åの構造情報を得ることができ，化学シフト変化として観測されるため，ピーク強度の減衰として現れるPREに対し精度が高く，低感度試料にも適用しやすいという特徴がある．一方で，PCSデータは常磁性体中心からの距離や角度, 磁化率テンソルなど複数の説明変数を含むため, 実験値から構造情報への変換が複雑になるという問題があった．このため, PCSはこれまで主に全体構造がすでに得られている段階すなわち構造決定の最終段階に限定されて用いられてきた．そこで本研究では，構造決定の初期段階からPCSを利用し，効率的に構造情報を抽出する計算手法の開発を目的とした．本手法は, PCSの磁化率テンソルの計算と構造最適化計算を再帰的に実行することで, 構造とPCSスコアを段階的に改善させて最終構造を決定する．さらに，本手法を立体構造計算プログラムCYANAのNOE自動帰属機能と組み合わせることで，NOE解析と構造決定の精度を大幅に向上することに成功した．ここでは，既知構造から模擬的に作成したPCSデータとNOEピークリスト，および主鎖の二面角情報

常磁性NMR, pseudo-contact shift, 構造計算アルゴリズム

○おかだ まゆ，いけや てっぺい，らじぇしゅ すんだれさん，のじり えり，みかわ つとむ，いとう ゆたか

データを利用した評価と，具体的な応用例として我々グループで構造解析を行っている蛋白質(YUH1)に対しても本手法の適用を進めており，これらについても発表予定である．

【方法】

Ubiquitin, Rhoをモデル蛋白質として既知構造をもとに，H^N, N^H, C^a, C'のPCS値とNOEピークリストの模擬データを作成した．NOEによる距離情報が不足する難解試料(in-cell NMRデータ等)を想定し，遠距離情報が優先的に減少するように70〜80%のピークをランダムに除き，100個の不完全なピークリストを用意した．主鎖二面角拘束には，化学シフトからTALOS-Nを用いて得られたデータを入力とした．

PCSの計算は，CYANAのNOE自動帰属ステップの3サイクル目から開始し，10サイクルまで繰り返した後(従来法では7サイクル)，得られた角度・距離情報をもとに再度構造計算を行って最終構造を得た．新規手法で得られた構造を，従来法により得られたものと比較することで本手法の性能評価を行った．

【結果と考察】

Ubiquitin, Rhoそれぞれについて，入力データの異なる100回の独立した計算を行い，それぞれについて，正解構造に対する二乗平均平方根偏差(RMSD)を計算した．本手法により，ほとんどの計算において，従来法と比較して大幅な構造の改善が見られた(Fig. 1). Figure. 2は，100回の独立した計算の中から選んだ代表的なアンサンブル構造の例を示す．NOEによる距離情報だけでは全く収束しない場合においても，PCSと新しい計算手法を用いることで劇的に収束した構造が得られている．これは，「PCSは収束構造の最適化のみにしか用いることができない」という従来の問題を明確に解決していることを示している．NOEの自動帰属の精度も本手法により改善されており，長距離の距離拘束(5残基以上離れた原子間距離拘束)が増えていることが分かる(Table 1). 本手法により構造がより収束し，この構造を元にNOEの自動帰属精度が向上したものと考えられる．

今回適用した再帰計算による構造決定では，PCSの磁化率テンソルの決定とNOEの自動帰属の精度を段階的に改善させることで，PCSから得られる構造情報を最大限に得ることに成功した．

現在，PCSの実験値を用いてさらに検証を重ねており，計算パラメーターの最適化を進めている．また，本手法の応用例として，YUH1蛋白質の立体構造決定への適用も進めている．

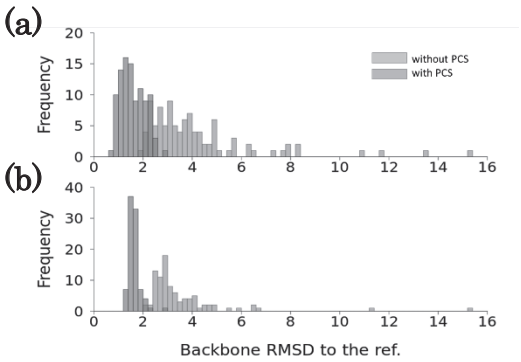


Fig. 1 Distributions of RMSDs of ubiquitin (**a**) and Rho (**b**) structures to the reference. The 100 structures were independently calculated with different input data. The RMSD distributions from the conventional method and new method with PCS are shown in light and dark gray, respectively.

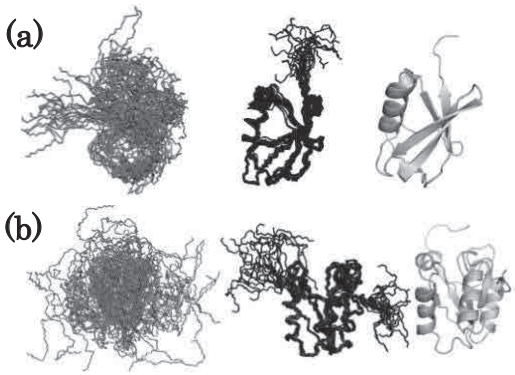


Fig. 2 Representative structures of ubiquitin (**a**) and Rho (**b**). The final conformers obtained by the conventional calculation and new method with PCS data are represented as the gray and black cylinder model, respectively. The gray ribbon models show the reference structures.

		Ubiquitin		Rho	
		without PCS	with PCS	without PCS	with PCS
RMSD	Backbone RMSD to the reference	15.32 Å	1.46 Å	15.28 Å	1.52 Å
	All heavy atom's RMSD to the ref.	15.42 Å	1.91 Å	15.41 Å	2.23 Å
NOESY peaks assignment	Number of assignment	623	601	732	727
	Ratio of correct assignment	77.5%	79.9%	80.6%	82.9%
	Distance restrain Short/medium/long	262/104/126	245/84/157	401/158/170	372/127/198

Table 1 Statistics data of the representative calculations shown in Figure 2.

P14

ヘム軸配位子ヒスチジンの電子構造における共鳴がミオグロビンの外部配位子識別に与える影響

○山本泰彦[1]、田口耕太朗[1]、鳥澤真鈴[1]、渡邉美帆[1]、西村龍[1]、柴田友和[1]、鈴木秋弘[2]、根矢三郎[3]、逸見光[4]
1 筑波大院・数理物質
2 長岡高専・物質工
3 千葉大院・薬
4 農研機構・食品部門

Control of Exogenous Ligand Discrimination of Myoglobin through Electronic Structure of Axial Histidine Residue

○Yasuhiko Yamamoto[1], Kotaro Taguchi[1], Marin Torizawa[1], Miho Watanabe[1], Ryu Nishimura[1], Tomokazu Shibata[1], Akihiro Suzuki[2], Saburo Neya[3], and Hikaru Hemmi[4]
[1] *Department of Chemistry, University of Tsukuba, Tsukuba, Japan*
[2] *Departmen of Materials Engineering, Nagaoka National College of Technology, Nagaoka, Japan*
[3] *Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba University, Chiba, Japan*
[4] *National Food Research Institute, National Agriculture and Food Research Organization, Tsukuba, Japan*

Electronic structure of axial histidine (His93) side chain imidazole in sperm whale myoglobin has been characterized in order to elucidate electronic control of discrimination between oxygen (O_2) and carbon monoxide (CO) in the protein. We found a significant difference in the His93 electronic structure between O_2- and CO-bound proteins, which could be reasonably interpreted in terms of a resonance between the two canonical forms of the imidazole π system, i.e., Form A with N_δ-C_ε double bond and C_ε-N_ε single one and Form B with N_δ-C_ε single and C_ε-N_ε double ones. Form B is thought to dominate over Form A in both O_2- and CO-bound proteins due to electron transfer from Fe to O_2 upon the Fe^{2+}-O bond formation and π-back donation upon the formation of Fe^{2+}-C bond in the former and the latter, respectively, and the extent of the Form B dominance in the former is expected to be larger than that of the latter. The difference in the resonance hybrid of the His93 imidazole between the two different ligation states of the protein was manifested in shifts of the His93 imidazole ^{15}N signals.

序論 酸素貯蔵タンパク質であるミオグロビン(Mb)は、タンパク質部分と補欠分子族のヘム(Fig. 1左)から構成される。Mbの酸素(O_2)親和性などヘム鉄の反応性の調節には、軸配位子His93のイミダゾール環の電子構造が重要であると考えられている。本研究では、O_2と一酸化炭素(CO)それぞれが結合したMbにおけるHis93(Fig. 1右)のイミダゾール環の電子構造の解析を通してMbの配位子識別におけるHis93の役割を考察した。なお、測定試料としては、天然のMbよりO_2結合状態の安定性がはるかに高いL29F変異体 (T. Carver *et al*. (1992))を^{15}N標識して用いた。

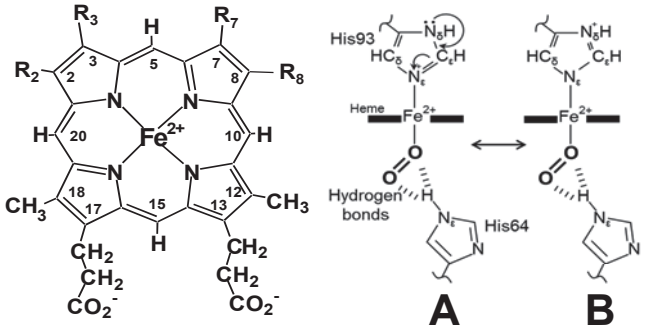


Fig. 1. Structures of the heme cofactors used in the study (left) Proto (R_2 = R_7 = CH_3, R_3 = R_8 = CH=CH_2), Meso (R_2 = R_7 = CH_3, R_3 = R_8 = C_2H_5), 3,8-DMD (R_2 = R_3 = R_7 = R_8 = CH_3), 7-PF (R_2 = CH_3, R_3 = R_8 = C_2H_5, R_7 = CF_3), and 2,8-DPF (R_2 = R_8 = CF_3, R_3 = R_7 = CH_3) and schematic representation of resonance between two canonical forms of His93 imidazole of O_2-bound form of myoglobin (right).

ミオグロビン、ヘム電子構造、外部配位子認識機構

○やまもと　やすひこ、たぐち　こうたろう、とりざわ　まりん、わたなべ　みほ、にしむら　りゅう、しばた　ともかず、すずき　あきひろ、ねや　さぶろう、へんみ　ひかる

結果・考察　^{1}H NMRスペクトルの解析から、L29Fアミノ酸置換はヘム近傍の立体構造にほとんど影響を与えないというX線結晶構造解析の結果(T. Carver *et al*. (1992))が確認できた。

L29F変異体のO_2結合型(L29F(O_2))の^{1}H-^{15}N HMQCスペクトル(Fig. 2)では、His93の$^{1}J_{NH}$を通した$^{15}N_{\delta}$-^{1}H相関、$^{2}J_{N(C)H}$を通した$^{15}N_{\delta}$-C_{ε}^{1}H相関と$^{15}N_{\varepsilon}$-C_{ε}^{1}H相関に加え、ヘム鉄に結合したO_2と水素結合を形成するHis64の$^{15}N_{\varepsilon}$-^{1}H相関が観測された。一方、CO結合型(L29F(CO))のスペクトルでは、His64の$^{15}N_{\varepsilon}$-^{1}H相関はN_{ε}Hプロトンの速い交換のため観測されなかった(Table 1)。また、ヘムとHis93の間の電子的な相互作用を解析するため、Fig. 1左に示す化学修飾ヘムをL29F変異体に組込んで得られたHis93シグナルのシフト値も比較のためにTable 1に示した。

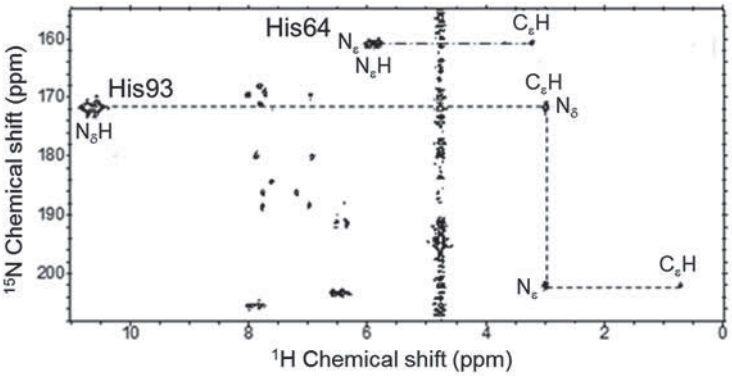


Fig. 2. ^{1}H-^{15}N HMQC spectrum of L29F(O_2) at pH7.4 and 25 ℃. Connectivities used for the assignments of His64 and His93 imidazole signals are indicated.

Table 1. Chemical shifts (ppm) of His93 imidazole signals of L29F(O_2) and L29F (CO) possessing various heme cofactors, at pH 7.4 and 25 ℃.

	O_2			CO		
	$^{15}N_{\delta}$	N_{δ}H	$^{15}N_{\varepsilon}$	$^{15}N_{\delta}$	N_{δ}H	$^{15}N_{\varepsilon}$
2,8-DPF	172.6	10.80	202.4	166.7	9.68	210.2
7-PF	171.5	10.66	n.d.	164.7	9.48	n.d.
Meso	170.7	10.46	n.d.	165.2	9.37	n.d.
Proto	171.7	10.64	202.0	165.9	9.52	213.3

n.d. Not detected

L29F(O_2)とL29F(CO)で、His93の対応する^{15}Nシグナルのシフト値に、約5 – 8 ppmの差が観測された。L29F(O_2)とL29F(CO)に含まれるヘム鉄はいずれも不対電子をもたないので、両者のHis93の^{15}Nシグナルで観測された大きなシフト差は、His93のイミダゾール環の電子構造がヘム鉄に結合する配位子(O_2 *vs* CO)に依存することを示している。O_2結合型のHis93のイミダゾール環の電子構造はFig. 1右に示す共鳴混成体として存在すると考えられるので、His93のN_{δ}とN_{ε}の電子密度($\rho_{N\delta}$と$\rho_{N\varepsilon}$)に着目すると、共鳴混成体へのAの寄与が大きい程$\rho_{N\delta}$は大きく、そして$\rho_{N\varepsilon}$は小さくなる、一方、逆にBの寄与が大きければ$\rho_{N\delta}$は小さく、$\rho_{N\varepsilon}$は大きくなる。O_2結合型における$Fe\text{-}O_2$結合では、FeからO_2へ電子1つが移動するためヘム鉄の電子密度(ρ_{Fe})が低いので、Aの場合よりもN_{ε}の電子の数が形式的に多いBの寄与が増大すると考えられる。CO結合型のHis93も同様な共鳴混成体として存在すると考えられ、Fe-CO結合の形成に重要なFeからCOへのπ逆供与により共鳴混成体へのBの寄与がAよりも多いものの、その程度はO_2結合型の場合ほどではない。したがって、CO結合型よりも、O_2結合型の$\rho_{N\delta}$は小さく、$\rho_{N\varepsilon}$は大きいことが予想され、L29F(CO)に比べてL29F(O_2)のHis93 $^{15}N_{\delta}$シグナルは低磁場シフト、一方、$^{15}N_{\varepsilon}$シグナルは高磁場シフトして観測される結果(Table 1)を説明することが出来る。

ヘム側鎖としてCF_3基を導入すると、CF_3基の大きな電子求引性のためρ_{Fe}は減少する。化学修飾ヘムを組込んだL29F変異体のO_2結合型とCO結合型いずれの場合も、His93$^{15}N_{\delta}$と$^{15}N_{\delta}$Hのシフト値はMeso < 7-PF < 2,8-DPFとρ_{Fe}の順になっており(Table 1)、ρ_{Fe}の減少によりFig. 1右に示すHis93のイミダゾール環の電子構造の共鳴でBの寄与が増大することが反映されている。

結論　ヘム鉄の軸配位子His93のイミダゾール環の電子構造の共鳴は、Feに結合する外部配位子、O_2 *vs* CO、により影響を受けることが明らかになった。したがって、Mbにおけるヘム鉄の外部配位子認識は、ヘムポルフィリン環π電子、ヘム鉄および軸配位子His93イミダゾール環の間の電子的な相互作用により調節されていると考えられる。

P15

^{19}F含有化合物を用いた蛋白質と薬剤との相互作用解析法の開発

○新家粧子[1]，小橋川敬博[2]，滝沢剛[3]，半沢宏之[3]，藤原敏道[1]，児嶋長次郎[1,4]
[1]大阪大学・蛋白質研究所
[2]熊本大学・大学院生命科学研究部
[3]第一三共RDノバーレ株式会社・合成化学研究部
[4]横浜国立大学・大学院工学府

NMR study of Protein-Drug interaction using ^{19}F-containing compounds

○Shoko Shinya[1], Yoshihiro Kobashigawa[2], Takeshi Takizawa[3], Hiroyuki Hanzawa[3], Toshimichi Fujiwara[1], Chojiro Kojima[1]
[1] *Institute for Protein Research, Osaka University,*
[2]*Faculty of Life Science, Kumamoto University,*
[3]*Daiichi Sankyo RD Novare Co., Ltd*
[4]*Graduate School of Engineering, Yokohama National University*

In Fragment-based Drug Discovery (FBDD), the structural information of protein-drug complex is essential for a fragment hit identification and optimization. Recently, ^{19}F nucleus is used as one of a powerful NMR screening tool because of its high sensitivity and the large variation in chemical shift. We have analyzed the inter-molecular interaction analysis taking advantages of ^{19}F-containing compounds to determine the binding-mode of low-affinity compound and protein. In this study, tyrosine kinase was selected as an attractive therapeutic target and both ligand-based and protein-based approaches were used.

【序論】

Fragment-based drug discovery (FBDD)は、フラグメント化合物のスクリーニングを起点として、蛋白質の立体構造に基づいて新規薬剤の設計を進める手法である。そのため、起点となるフラグメント化合物と標的蛋白質の複合体立体構造解析が求められる。しかしながら、一般にフラグメントのような蛋白質に対する親和性が低い化合物は、X線結晶構造解析によって相互作用様式を明らかにすることが困難である。

一方、天然存在比が100%である^{19}F核は、^{1}Hについで感度が高く、化学シフトの観測範囲が広く信号のオーバーラップがほとんどないことから、NMRスクリーニング実験における強力なツールとなっている。阪大蛋白研では、220化合物の^{19}F含有フラグメントライブラリを整備している。すでにこれらを用いて、モデル蛋白質FKBP12に対して^{19}F-NMRスクリーニングを行った結果、FK506と同じ結合部位に結合すると考えられるヒット化合物を見出し、^{19}F観測の有用性を報告している[1]。

19F NMR、スクリーニング、薬剤相互作用
○しんやしょうこ、こばしがわよしひろ、たきざわたけし、はんざわひろゆき、
こじまちょうじろう、ふじわらとしみち

本研究では、がんを始めとして様々な疾患に関わる重要な創薬ターゲットである受容体型チロシンキナーゼ、cMetを研究対象とした。チロシンキナーゼは大腸菌に対して毒性を示すことから大腸菌発現系で可溶性蛋白質として得ることが困難である。近年、小橋川らによって、低温発現の利用、薬剤耐性の変更、および、ホスファターゼとシャペロン蛋白質の共発現を用いた大腸菌発現系が開発された[2]。本研究では、この発現系を用いてチロシンキナーゼの安定同位体標識を低コストで行い、NMR解析に利用した。

【実験方法・結果】

大腸菌発現系により得たcMetキナーゼについて、R_2フィルター法により220化合物の^{19}F-NMRスクリーニング実験を行った。その結果、cMetキナーゼの添加により、8個の化合物についてピークの消失が観測された。つづいてcMetの既知阻害剤であるCrizotinibによる競合実験を行った結果、これら8化合物は全て、図1に示すようなシグナル強度の回復がみられた。このことから、これらの化合物の結合はCrizotinibと競合関係にあることが示唆された。十分な溶解度を示すヒット化合物についてcMetとのSaturation Transfer Difference (STD)実験を行った結果、cMetとの結合を示すSTDシグナルが得られた。結合が強く交換速度が遅い場合、STDシグナルの検出が困難であることが知られているが、様々な工夫により、cMetに対して数nMのK_d値を示すCrizotinibについてSTDシグナルを得ることに成功しつつある。

つぎに、大腸菌発現系を用いて、cMetのメチオニンメチル基の^{13}C選択標識を行い、^{13}C-HSQCスペクトルの測定を行ったところ、8個のメチオニンメチル基シグナルが観測された。Crizotinibの添加を行った結果、cMetのメチオニン残基数と一致する10個のシグナルが観測された。このことから、apo型のcMetでは局所的な構造多形によるシグナルのブロードニングが起こっていると考えられる。現在、cMetのメチオニンメチル基のHSQCと^{19}F含有化合物の^{19}F STD-HSQCに基づいて化合物の結合位置の同定を進めている。

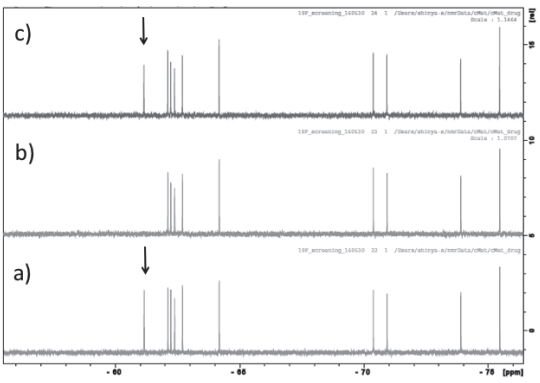


Fig. 1. ^{19}F spectra of a fragment mixture (a) in the absence of cMet, (b) in the presence of cMet, and (c) in the presence of cMet and Crizotinib. The signal of hit compound is shown by arrows.

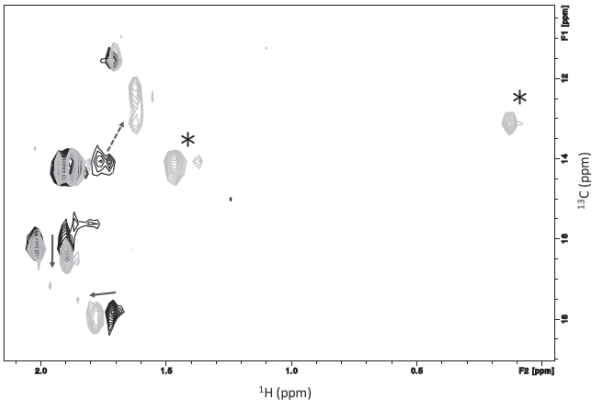


Fig. 2. ^{13}C-HSQC spectra of a Met-$^{13}CH_3$ cMet in the absence (dark) and in the presence (light) of Crizotinib. In the presence of Crizotinib, two new signals (asterisks) were appeared.

【参考文献】

1. 片平ほか, 第53回 NMR討論会, 2014年11月, 大阪.
2. Kobashigawa *et al., Genes to Cells,* 2015, **20**, 860-870.

P16

哺乳類においてイントロン中で保存されている領域から発現している低分子non-coding RNAの二次構造解析

○鈴村拓馬[1]，清澤秀孔[2]，河合剛太[1,2]
[1]千葉工業大学・大学院工学研究科，[2]千葉工業大学・先進工学部

Secondary structure analysis of a small non-coding RNA expressed from a region conserved in introns among mammals

○Takuma Suzumura[1], Hidenori Kiyosawa[2], Gota kawai[1,2]
[1] *Chiba Institute of Technology, Graduate School of Engineering*
[2] *Chiba Institute of Technology, Faculty of Advanced Engineering*

MsncR-10, a novel RNA with 115 residues found in mouse brain, is encoded on the intron of a gene relating to the cell signaling. Since the sequence near the MsncR-10 locus is conserved in mammals, it is expected that this RNA is involved in higher-order life phenomena. In order to elucidate the function of MsncR-10, it is required to analyze its structure. In the present study, the secondary structure of MsncR-10 was analyzed by NMR. Based on the predicted secondary structure, five fragments were designed and their imino proton signals were analyzed.

序論

マウス脳から16個の新規低分子RNAが発見され[1)]，その構造と機能の解析が進められている．すでにその一つであるMsncR-11については，二次構造の解析と機能の推定が行われ，tRNA様の構造を形成し，ミトコンドリアのmRNAの成熟化に関与していることが明らかとなった[2)]．今回は，細胞内情報伝達に関与すると推定されているdock9遺伝子のイントロンに位置しているMsncR-10について，構造と機能の解析を進めた．ゲノム上で，MsncR-10領域の配列は哺乳類で保存されていることから（Fig. 1），MsncR-10は高次生命現象に関与している可能性がある．

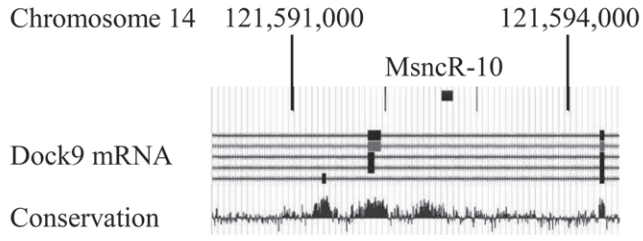


Fig. 1 Genomic locus of MsncR-10
Sequence structures of five mRNAs near the MsncR-10 locus (upper) and the sequence conservation among mammals (lower) were shown. The original figure was obtained from the UCSC Genome Browser.

方法

二次構造予測にはvsfold5を用いた（http://www.rna.it-chiba.ac.jp/vsfold5/）．予測に必要なパラメータであるkuhn lengthについては7.0および10.0を用いた．RNAの調製は，試験管内転写法によって行った．転写効率を上げるために配列の5'末端がG残基となるように設計した．このとき，予測される二次構造に変化がないことを確認した．SL_Dについては，北海道システム・サイエンス（株）に化学合成を委託した．溶液条件は50 mM塩化ナトリウムを含む20 mMリン酸緩衝液（pH 6.5）とし，298 Kにおいて，AVANCE600（BRUKER社）を用いてNMRスペクトルを測定した．

secondary structure, non-coding RNA, intron

○すずむらたくま，きよさわひでのり，かわいごうた

結果

【解析用断片の設計】

MsncR-10の全長について，2種類の構造が予測された（model 1とmodel 2）．そこで，それぞれの予測されたステムループ（A～EおよびA'）を含む断片を設計した（Fig. 2のSL）．なお，全長に対応するRNA（Full）については5'末端にG残基を2つ付加してある．SL_Eについてはループ部分がkissing 構造を形成したため，G残基をUに置換した．

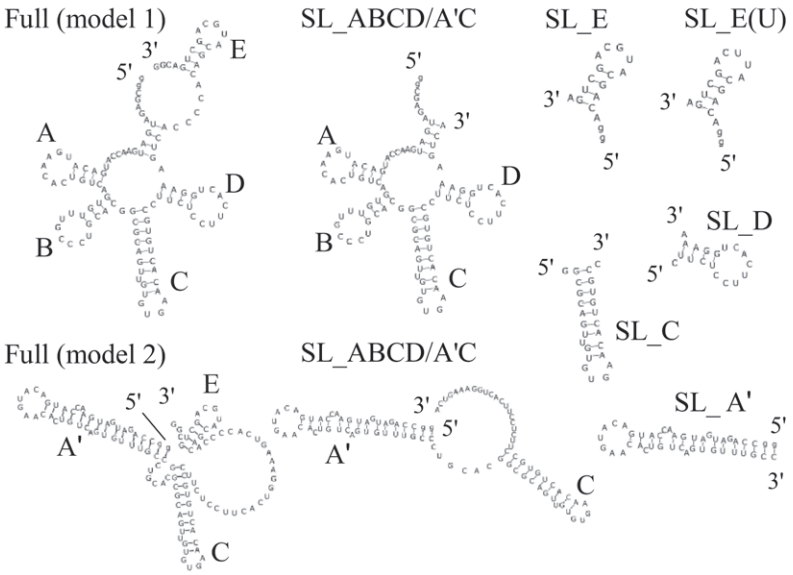


Fig. 2 Fragments for the secondary structure analysis of MsncR-10
Stem-loops were indicated by A-E and A'. The G residues added to increase the transcription yield were shown in lowercase letters.

【NMRスペクトルの解析】

Full と SL_ABCD/A'C

Full と SL_BCD（A'C）のイミノプロトンスペクトルはよく一致していた（Fig. 3）．このことから SL_ABCD（A'C）は Full と同じ構造を形成していることが示唆された．

SL_ABCD/A'C と SL_A'，SL_C

SL_ABCD/A'C のスペクトルは，SL_A'と SL_C のスペクトルの和とほぼ一致していた．したがって，ステムループ C が SL_ABCD/A'C においても形成されていることが分かった．SL_D のシグナルは SL_ABCD/A'C とは一致しなかった．これらのことから Full は，SL_A'および SL_C と同じ構造を形成し，一方，SL_D とは異なる構造を形成していることが示唆された．

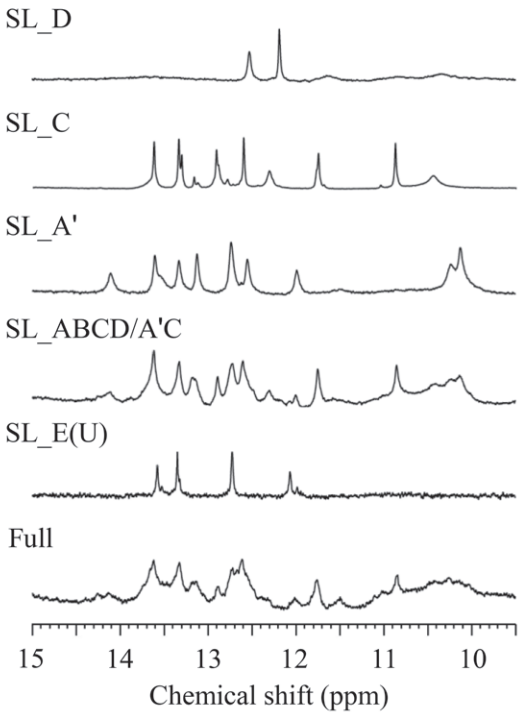


Fig. 3 ^{1}H-NMR spectra of the fragments

考察

解析の結果から，MsncR-10 は model 2 に近い二次構造を形成している可能性が高いと考えられる．今後は，SL_A'の NMR スペクトルを解析することによって，その二次構造を決定したいと考えている．また，比較的小さいステムループである SL_D および SL_E(U)については，非易動性プロトンのシグナルを比較することによって，その形成の有無を確認する予定である．

引用文献

1) Kiyosawa, H., Okui, S., Ushida, C., Kawai, G., *Genomics* **106**, 122-128, 2015.

2) Okui, S., Ushida, C., Kiyosawa, H., Kawai, G., *J. Biochem*. **159**, 341-350, 2015.

P17

新規Rheo-NMR法を用いたALS関連タンパク質SOD1線維形成機構の解明

○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
[2]京都大学大学院・医学研究科

Elucidation of fibrillization mechanism of ALS-related protein SOD1 by using novel Rheo-NMR spectroscopy

○Naoto Iwakawa[1], Daichi Morimoto[1], Erik Walinda[2], Kenji Sugase[1], Masahiro Shirakawa[1]
[1] *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 amyloid fibril formation of superoxide dismutase 1 (SOD1) in motor neurons. To elucidate the detailed fibrillization mechanism of SOD1, we developed a high-sensitivity Rheo-NMR spectroscopy, which enables to obtain atomic-level structural information during fibril formation under shear flow. Time-dependent Rheo-NMR spectra showed chemical shift changes of the residues located on one specific surface of SOD1, suggesting that SOD1 interacts with its fibrillization intermediates through this region. Secondary structure propensity analysis indicated that native structure of SOD1 was changed to cross-β-like structures by the applied shear flow. We will determine the structures of intermediates and fibrils by using Rheo-NMR and solid-state NMR, respectively, which will reveal detailed structural changes and lead to a further understanding of fibrillization mechanism of SOD1.

【序論】

筋萎縮性側索硬化症（ALS）は運動機能に障害をもたらし，発症から3から5年で死に至る難病である．ALSの発症原因の一つとして考えれられているのが，運動ニューロンにおけるスーパーオキシドジスムターゼ1（SOD1）というタンパク質のアミロイド線維形成である. SOD1は細胞内の活性酸素種を除去する重要なタンパク質である．これが変性し，アミロイド線維を形成すると，その細胞毒性により運動障害を引き起こすと考えられている（Fig. 1）．しかし，アミロイド線維形成の詳細な機構は解明されておらず，未だ決定的なALS治療法開発に至っていない．

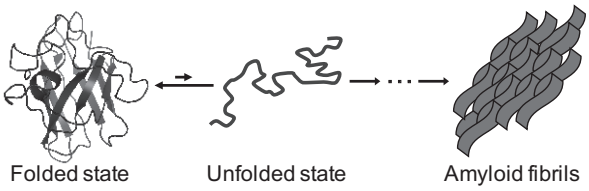


Figure 1. Fibrillization model of SOD1.

従来, アミロイド線維形成過程に関する研究にはチオフラビンTの蛍光測定が多く用いられてきたが，蛍光測定からはタンパク質の構造変化情報を得ることができず，詳細な線維形成機構解明には至っていない．この問題点を解決するために，我々は新規Rheo-NMR法を開発した[1]．この手法は，せん断流れ中におけるタンパク質のNMR情報を得ることができる手法である．せん断力によりタンパク質のアミロイド線維形成が促進されることが知られており[2]，この手法を用いることで，線維形成過程の構造情報を原子レベルでリアルタイムに取得可能である．

Rheo-NMR, アミロイド線維形成, SOD1

○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

【線維形成のせん断速度依存性】

^{15}N標識SOD1について，Rheo-NMR装置を用いてせん断力を加えた条件で^{1}H-^{15}N HSQC測定を行った．サンプル管の回転速度を10, 20, 30 Hzと変え，せん断速度依存的なHSQCスペクトル変化を観察した．20および30 HzでのRheo-NMR測定終了後のサンプル管内にはSOD1のアミロイド線維が見られたが，10 Hzでは線維は形成しなかった．また，Rheo-NMRスペクトルに以下の変化が見られた．

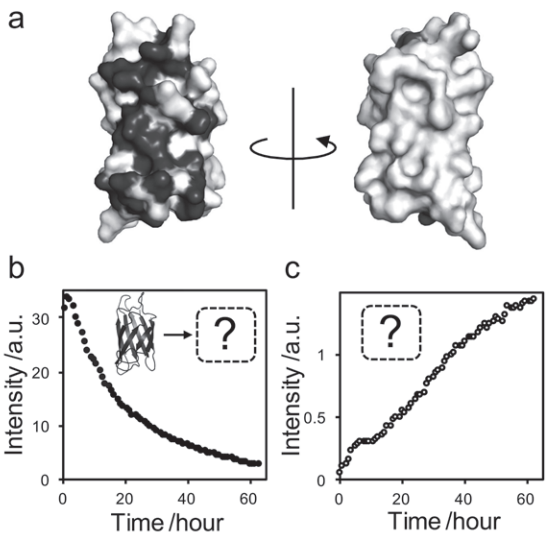


Figure 2. Results obtained by the Rheo-NMR measurements at a spinning frequency of 20 Hz. a, Mapping of the residues that have large chemical shift differences during fibril formation (black). Time-dependent intensity changes of the peaks derived from native (b) and intermediate (c) states.

化学シフト変化

全ての条件において，化学シフト変化が見られた．大きな化学シフト変化を持つ残基はSOD1の片側の分子表面に集中していた（Fig. 2a）．この分子表面が線維形成中間体と相互作用している可能性が考えられる．

ピーク強度の減少

20および30 Hzでの測定では線維形成に伴い，天然構造由来のピーク強度の減少が見られた（Fig. 2b）．また，10 Hzにおいては線維形成していないにも関らず，一部の残基のピーク強度の減少が見られ，これは，20および30 Hzにおいてピーク強度の減少する速度が速いピークと一致していた．

マイナーピークの出現

20 Hzでの測定中，静止条件では見られなかったマイナーピークが出現した（Fig. 2c）．尿素による変性条件下でNMR連鎖帰属法を行うことにより，マイナーピークの一部が変性構造由来のものであることが明らかとなった．

【せん断流れ中でのSSP値変化】

^{13}C, ^{15}N標識SOD1について，20 HzでRheo-NMR測定を行い，^{1}H-^{15}N HSQC，HNCOスペクトルを交互に取得した．本測定においてSOD1は線維形成しなかったが，化学シフトの変化が見られた．せん断力を加える前後の主鎖（HN, N, CO）の化学シフト値を用いてsecondary structure propensity（SSP）を求めた[3]．これにより，せん断力を加えるとSOD1のβシート性が上がることが示唆された．つまり，アミロイド線維中で構成されるクロスβ構造に近い構造へと変化した後に，線維形成が開始する可能性が示された．

【結論および展望】

Rheo-NMR測定により，線維形成過程における構造変化情報を原子分解能で取得できた．今後は，Rheo-NMR測定により線維形成中間体の立体構造を，固体NMR測定により線維中でのSOD1の立体構造を決定し，線維形成過程におけるSOD1の構造変化を原子レベルで解明する．

References

1. Morimoto, D. *et al.* High-Sensitivity Rheo-NMR Spectroscopy for Protein Studies. *Anal. Chem.* (2017).

2. Bekard, I. B., Asimakis, P., Bertolini, J. & Dunstan, D. E. The effects of shear flow on protein structure and function. *Biopolymers* **95,** 733–745 (2011).

3. Marsh, J. A., Singh, V. K., Jia, Z. & Forman-Kay, J. D. Sensitivity of secondary structure propensities to sequence differences between α-and γ-synuclein: Implications for fibrillation. *Protein Sci.* **15,** 2795–2804 (2006).

P18

高圧力 NMR 法によるユビキチンの局所変性状態の立体構造決定

○若本拓朗[1]，北沢創一郎[2]，池谷鉄兵[3]，亀田倫史[4]，Roumestand Christian[5]，Baxter Nichola[6]，Williamson Mike[6]，北原亮[2]

1 立命館大学大学院・生命科学研究科，2 立命館大学・薬学部，

3 首都大学東京・理工学研究科，4 産業技術総合研究所・創薬基盤研究部門.

5 モンペリエ大学，6 シェフィールド大学

Structure determination of the locally disordered state of ubiquitin by high-pressure NMR spectroscopy

○Takuro Wakamoto[1], Soichiro Kitazawa[2], Teppei Ikeya[3], Tomoshi kameda[4], Christian Roumestand[5], Nichola Baxter[6], Mike Williamson[6] and Ryo Kitahara[2]

[1] Graduate School of Life Sciences, Ritsumeikan University, [2]College of Pharmaceutical Sciences, Ritsumeikan University, [3]Graduate School of Science and Engineering, Tokyo Metropolitan University,

[4] Biotechnology Research Institute for Drug Discovery, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, [5]Centre de Biochimie Structurale, University of Montpellie,

[6]Department of Molecular Biology and Biotechnology, University of Sheffield

We have demonstrated that ubiquitin has at least two high-energy conformations: an alternatively folded conformation N_2 and a locally disordered conformation I between the basic folded and totally unfolded conformations [1,2]. The structure of N_2 stabilized by Q41N mutation and hydrostatic pressure, was previously determined by high-pressure NMR spectroscopy [3]. Here, We report the structure and dynamics of the I-conformer of the Q41N variant.

蛋白質は水溶液中で様々な形を取りながら存在している。不要タンパク質の除去や DNA 修復などに関わるユビキチンには、少なくとも 2 つの高いギブズ自由エネルギーを持つ状態(高エネルギー状態)が存在していることが高圧力 NMR 法によって明らかにされている(準安定状態 N_2 と局所変性状態 I)[1,2]。実際に N_2 状態の原子座標は高圧力 NMR 法によって決定されているが[3]、I 状態に関しては座標決定に至っていない。その理由として、常圧下では I 状態の存在確率が座標決定において不十分であるからである。

高圧力 NMR 法、高エネルギー状態、構造解析

○わかもとたくろう，きたざわそういちろう，いけやてっぺい，かめだともし,るーめすたんどくりすてぃあん，にこらばくすたー，うぃりあむそんまいく，きたはらりょう

今回、高圧力 NMR 法と天然状態 N_1 を不安定化させた変異体 Q41N を用いることで I 状態の存在確率を増加させることで座標決定に成功したため報告する。

Q41N 変異体を用いて低温(278K)・酸性(pH4.0)の条件で ^{1}H-^{15}N HSQC 及び ^{1}H-^{13}C HSQC 測定を 500 気圧ごと 2500 気圧までの範囲で行った。多くのアミノ酸残基に対応するアミドグループの NMR 信号強度は加圧に対して協同的かつ緩やかに減弱していたが、33-41 番のアミドグループの NMR 信号強度が選択的かつ急激に減弱していた。この急激な信号強度の減弱は野生型のユビキチンにも観られており I 状態への構造転移を示している。^{15}N スピン緩和解析(R_1, R_2, hNOE)の結果から、R_1 値と hNOE の値は圧力の増加に伴ってほとんど変化しないのに対して、33-41 番の領域の R_2 値が急激に増加していたことから、その領域でμs～ms レベルで生じる構造転移が起きていることを示唆された。加圧と同時に ^{1}H の化学シフトの狭い領域(^{1}H:7.5-8.5ppm)で新たな NMR 信号が現れたことから完全変性状態への構造転移も起きている。天然状態と I 状態が NMR のタイムスケールよりも遅い化学交換だとすると、加圧に伴って現れる 33-41 番由来の NMR 信号は急激に現れてくるはずである。しかしながら、新たに出現した全てのアミドグループの NMR 信号強度は加圧と同時に協同的に上昇していくことがわかった。さらに加圧に対する CαH グループと CβH グループの NMR 信号強度解析では、33-41 番領域で急激な減弱はみられなかった。以上の結果から、33-41 番のアミドグループの NMR 信号だけが加圧に対して影響を受けていることがわかった。CLEANEX-PM 測定による水-アミド水素交換速度定数を調べると、33-41 番の交換速度定数が高圧下で増加していることがわかった。このことから NMR 信号の減弱は水和状態の不均一性による可能性があると考察した。33-41 番のアミド水素 NMR 信号が減弱しているため NOE のみに基づいた立体構造決定は困難であるため常磁性プローブを導入した常磁性緩和促進(PRE)法によって原子間距離情報を補填した。常磁性プローブ(MTSL)を NMR 信号が減弱している領域である K33 及び Q40 にシステイン変異を導入し、ジスルフィド結合を介して導入した。構造計算プログラム CYANA による構造解析後、ベイズ推定によって構造精密化を行った。面白いことに、得られた立体構造は β_5 ストランドの配向と 33-41 番の領域が N_1 構造と大きく違っていた(Fig1)。

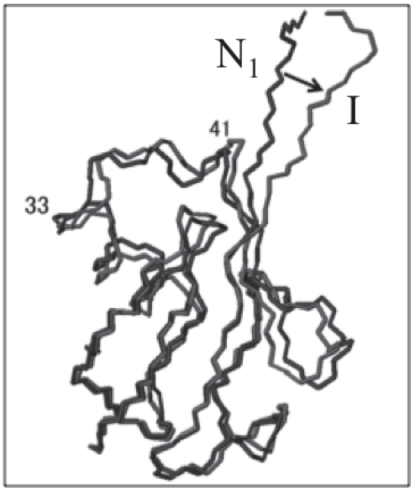


Fig1. The structures of N_1 (blue) and I (red). A displacement of the b_5-strand is marked by an arrow.

【参考文献】

[1] Kitahara, R. et al., *J. Mol. Biol.*, 347, 277-285 (2005), [2] Kitahara, R. et al., *PNAS*, 100, 3167-3172 (2003)
[3] Kitazawa, S. et al., *Biochemistry*, 53, 447-449 (2014)

P19

翻訳開始前複合体において形成される翻訳開始因子間の結合ネットワークの役割

○永田崇[1,2]，吉田尚史[3]，雲財悟[4]，浦野健[5]，浅野桂[6]，尾林栄治[5]
[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]神奈川科学技術アカデミー・創薬グループ，[4]法政大学・生命機能学科
[5]島根大学・医学部，[6]カンザス大学・生物学科

Interactions between eukaryotic initiation factors implicated during ribosomal scanning and start codon recognition

○Takashi Nagata[1,2], Hisashi Yoshida[3], Satoru Unzai[4], Takeshi Urano[5], Katsura Asano[6], and Eiji Obayashi[5]
[1]Institute of Advanced Energy and [2]Graduate School of Energy Science, Kyoto University
[3]Drug Design Group, Kanagawa Academy of Science and Technology (KAST)
[4]Department of Frontier Bioscience, Hosei University
[5]Department of Biochemistry, Shimane University School of Medicine
[6]Division of Biology, Kansas State University

In eukaryotes, ribosomes initiate translation with high accuracy from AUG start codon. This stringency is imposed partly by the interaction network among eukaryotic initiation factors (eIFs) that bind to the 40S ribosomal subunit in the 43S preinitiation complex (PIC). The interaction network reportedly rearrange during start codon scanning. Previously, genetic studies of one of the eIFs, eIF3c, revealed that its N-terminal domain (eIF3c-NTD) contains two distinct elements with opposing roles in initiation accuracy. The eIF3c-NTD reportedly binds with eIF1 (a gatekeeper protein that maintains the open conformation of the PIC until the AUG start codon is recognized by Met-tRNA$_i^{Met}$) and eIF5 (the GTPase activating protein for eIF2 bound to Met-tRNA$_i^{Met}$). However, the molecular mechanisms by which the eIF3c-NTD interacts with eIF1 and eIF5, and regulates the stringency of the translation initiation are unknown. Here, we investigate the interactions between the eIF3c-NTD, eIF1, and eIF5 by combining biochemical and biophysical methods including functional mutagenesis, analytical ultracentrifugation (AUC), isothermal titration calorimetry (ITC), and NMR binding and structural analyses[1]. We propose a model how the rearrangement of the eIF3c, eIF1, and eIF5 within the PIC during start codon scanning initiates the eIF1 release from PIC, and how eIF1 is kept away from the 40S ribosomal subunit in the following translation initiation events.

Firstly, we made a construct of the full-length eIF1 (residues 1-108) and several N- and C-terminal deletion constructs of the eIF3c-NTD (1-163) and eIF5 (1-405), and carried out GST-pull down assay to find the combinations that form binary and ternary complexes. As a result, eIF1 and several different fragments of the eIF3c-NTD formed binary complexes with different affinities; eIF1 and the C-terminal region of eIF5 (242-405; eIF5-CTD) formed the binary complex; eIF1, eIF5-CTD, and the longest construct of the eIF3c-NTD (1-163) formed the ternary complex. Formation of these complexes was further analyzed quantitatively by means of AUC and/or ITC.

---

translation, eIF, pre-initiation complex

○ながたたかし,よしだひさし,うんざいさとる,うらのたけし,あさのかつら,おばやしえいじ

Since the structure of eIF3c had not been investigated yet, we determined the NMR structure of the eIF3c-NTD (Figure 1; PDB ID: 5H7U), next. We used the construct comprising residues 36-163 (eIF3c-B), which possesses the same binding affinity toward eIF1 as the eIF3c-NTD. We also determined the structure of eIF1 (PDB ID: 2RVH), although it was reported previously (PDB ID: 2OGH). Our newly determined structure exhibited higher resemblance to the structure of eIF1 in the complex with 40S ribosomal subunit (PDB ID: 4V5O), over the previously determined one (Figure 2). Both eIF3c-B and eIF1 have an intrinsically disordered region (IDR) and compactly folded structured region. Importantly, the structured region of eIF3c-B, residues 105-159 (3c2), was shown to fit well to the recently reported cryo-electron microscopic map of the eIF1:eIF3:40S complex, in which the corresponding structure was missing[1),2)]. Now, 3c2 is shown to face uS15/S13 protein within 40S. Clearly, the locations of eIF1 and the eIF3c-NTD in the scanning PIC are determined (Figure 3).

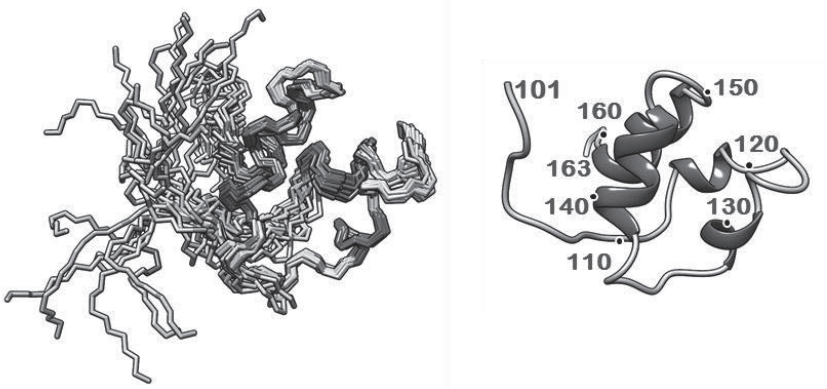


Figure 1. NMR structure of eIF3c-B. Superpositioning of backbone heavy atoms of the 20 final structures (left) and the lowest energy structure (right) of eIF3c-B [PDB ID: 5H7U]. Residues 101-163 are shown.

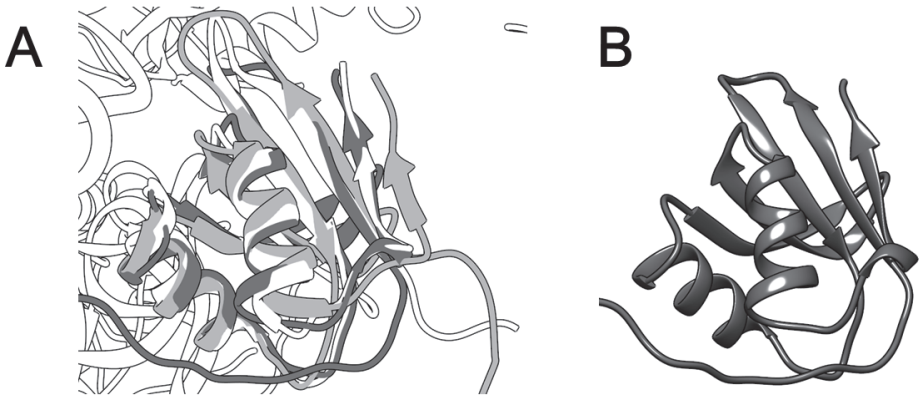


Figure 2. Newly determined NMR structure of eIF1. (A) Comparison of two NMR structures of eIF1 in free forms [PDB ID: 2RVH (this study; dark gray) and PDB ID: 2OGH (previous study; light gray)] with a crystal structure of eIF1 in complex with 40S [PDB ID: 4V5O (outlined)]. Structural regions of eIF1 are superimposed. The regions of 40S close to eIF1 are also shown (outlined, top and left-hand sides). **(B)** NMR structure of eIF1 [PDB ID: 2RVH (this study)].

We then carried out the chemical shift perturbation (CSP) analysis to map the eIF3c- and eIF5-binding surfaces on eIF1 in the context of binary complex: (i) [^{15}N]-labeled eIF1 was titrated with one of the deletion constructs of non-labeled eIF3c-N; (ii) one of the [^{15}N]-labeled eIF1 constructs, including wild type, a double-mutant (eIF1 R53S/K56A) and two single-mutants (eIF1 K60E and eIF1 L96P), each of which either completely or partially lack binding affinity toward 40S, were titrated with non-labeled eIF5-CTD. Figure 4 shows the binding-sites on eIF1 that are involved in the formation of the binary complexes; the IDR of eIF3c-B is suggested to wrap around the front- and backside of eIF1. The CSP analysis for [^{15}N]-labeled eIF3c-B

upon addition of one of the four above mentioned eIF1 constructs was also carried out, which suggested that the eIF1-binding sites on the eIF3c-NTD reside in the region comprising 58-87 (3c1) (Figure 5).

Altogether, our data indicate that in the eIF3c-NTD:eIF1:eIF5-CTD ternary complex, the region comprising 1-57 (3c0), 3c1, and 3c2 of the eIF3c-NTD interact with eIF5-CTD; 3c1 also interacts with eIF1. In the eIF3c-NTD:eIF1 binary complex, 3c0 and 3c1 binds to eIF1. Thus, it is tempting to hypothesize that 3c0 exhibits context-dependent interaction with eIF5 and eIF1.

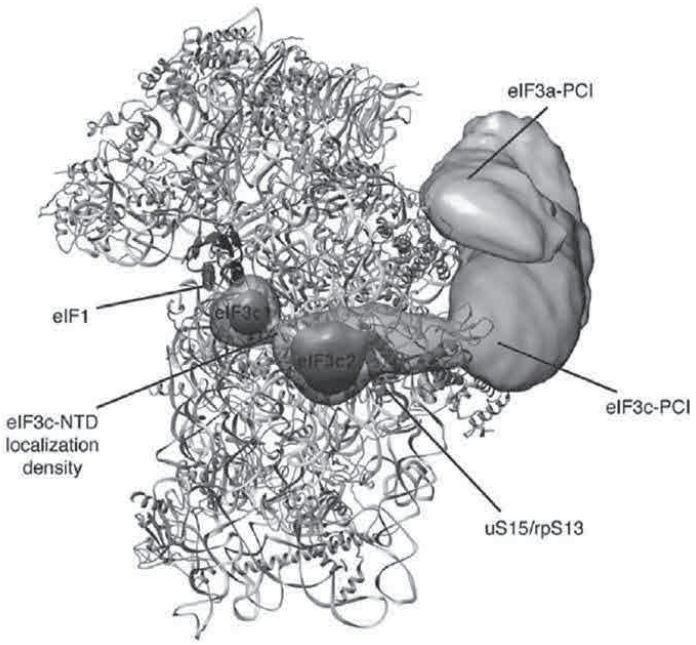


Figure 3. Locations of the structured regions of eIF3c-B (3c2) and eIF1 in the eIF1:eIF3:40S complex. A cryo-EM density map reported by Erzberger *et al*., 2014 [2] has been recalculated by incorporating the NMR structure of eIF3c-B [PDB ID: 5H7U] [1]. 40S is shown in ribbon. eIF3a and eIF3c are shown as blob. The predicted locations of 3c1 (IDR) and 3c2 of eIF3c are emphasized.

Finally, our model (Figure 6): when the PIC is (i) in scanning-competent "open" conformation, eIF3c uses 3c1 and 3c2 to bind eIF1 and PIC, respectively, to anchor them, during which 3c0 is hindered for eIF1-binding by eIF5; (ii) on its move to take on scanning-arrested "closed" conformation, 3c0:eIF1 interaction diminishes eIF1 binding to the 40S. When AUG start codon is recognized, interactions concerning eIF5, and conclusively the binding of 3c0 and eIF1, facilitate eIF1 release. We

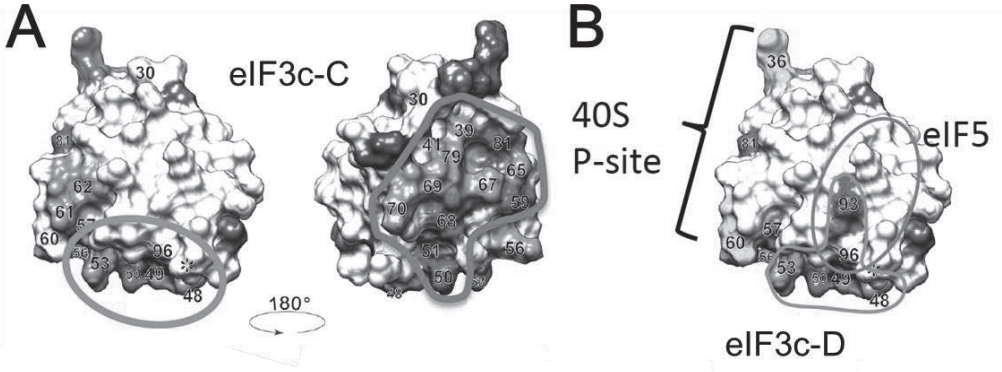


Figure 4. eIF3c-, eIF5-, and 40S-binding sites on eIF1. The residues of eIF1 that showed either strong CSP or line broadening by addition of one of eIF3c-C (36-87) **(A)**, eIF3c-D (residues 58-163) **(B)**, and eIF5-CTD **(B)** are presented. The 40S-binding region **(B)** was deduced from the eIF1:40S complex structure [PDB ID: 4V5O]. The surface presentations of the eIF1 structures [PDB ID: 2RVH; this study] are viewed from the same direction as in Figure 2.

proposed here the intricate interaction network within the PIC, programmed for prompt scanning-arrest at the AUG start codon.

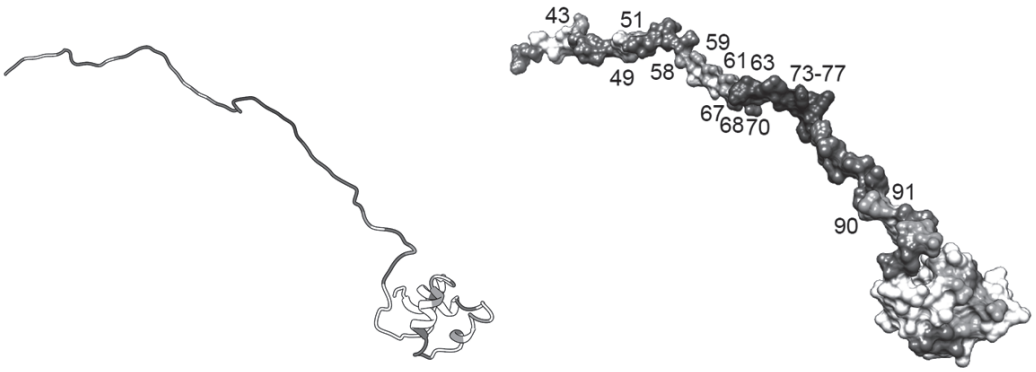


Figure 5. eIF1-binding sites on eIF3c-B (residues 36-163). The residues of eIF3c-B that showed either strong CSP or line broadening by addition of eIF1 are presented. The ribbon (left) and surface (right) presentations of the eIF3c-B structure [PDB ID: 5H7U; this study] are viewed from the same direction as in Figure 1.

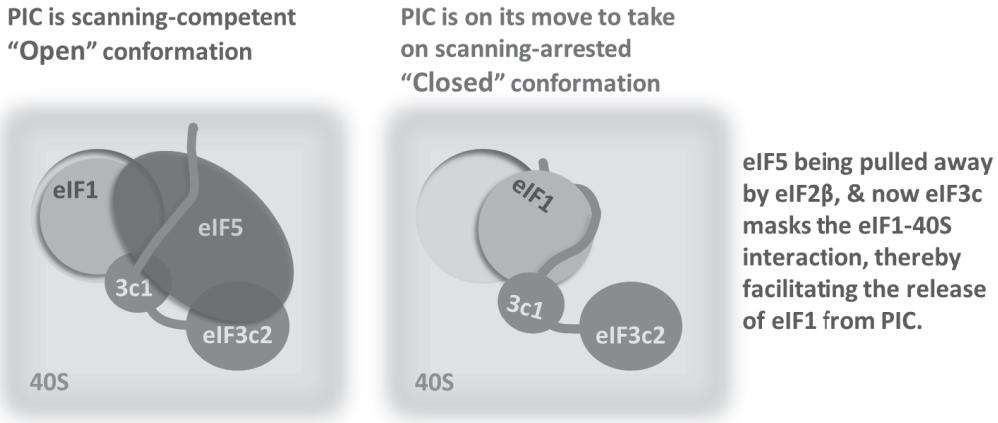


Figure 6. Structure and binding analyses-based model of the rearrangement of the eIF3c, eIF1, and eIF5 within the PIC during translation initiation. A model is built to show how the rearrangement of the eIF3c, eIF1, and eIF5 within the PIC during start codon scanning initiates the eIF1 release from PIC, and how eIF1 is kept away from the 40S ribosomal subunit in the following translation initiation events.

References

(1) Obayashi E., Luna R.E., Nagata T., Martin-Marcos P., Hiraishi H., Singh C.R., Erzberger J.P., Zhang F., Arthanari H., Morris J., Pellarin R., Moore C., Harmon I., Papadopoulos E., Yoshida H., Nasr M.L., Unzai S., Thompson B., Aube E., Hustak S., Stengel F., Dagraca E., Ananbandam A., Gao P., Urano T., Hinnebusch A.G., Wagner G., Asano K. (2017) Molecular Landscape of the Ribosome Pre-initiation Complex during mRNA Scanning: Structural Role for eIF3c and Its Control by eIF5, *Cell Rep*., *18*, 2651-2663.

(2) Erzberger J.P., Stengel, F., Pellarin, R., Zhang, S., Schaefer, T., Aylett, C.H., Cimermančič, P., Boehringer, D., Sali, A., Aebersold, R., Ban, N. (2014) Molecular architecture of the 40S·eIF1·eIF3 translation initiation complex, *Cell*, *158*, 1123-1135.

P20

ダイユビキチンの結合様式特異的な動的構造の解明

○高嶋真吾[1], ヴァリンダエリック[2], 森本大智[1], 菅瀬謙治[1], 白川昌宏[1]
[1]京都大学大学院・工学研究科
[2]京都大学大学院・医学研究科

Elucidation of linkage-specific conformational dynamics in diubiquitin

○Shingo Takashima[1], Erik Walinda[2], Daichi Morimoto[1], Kenji Sugase[1], and Masahiro Shirakawa[1]
[1]*Graduate School of Engineering, Kyoto University, Kyoto.*
[2]*Graduate School of Medicine, Kyoto University, Kyoto.*

Ubiquitin chains adopt distinct three-dimensional conformations depending on the linkage-types, thereby regulating virtually all cellular functions via specific interactions with receptor proteins and deubiquitinating enzymes. However, this simple structure–function relationship is challenged by the two following findings. Ubiquitin chains with different linkages can adopt quite similar structures. Alternatively, the chains of the same linkage type are found to form different structures. To solve this contradictory behavior, we have examined the dynamic motion of K48-, K63-, and M1-linked diubiquitin. We find that K63- and M1-linked diubiquitin exhibit highly flexible motion on the submicrosecond timescale leading to many kinds of structures. By contrast, the motion of K48-linked diubiquitin occurs on the much slower timescale. These results suggest a new model accounting for the broad variety of diubiquitin conformations in protein complexes.

【緒言】

ユビキチンは標的タンパク質に鎖状に共有結合することで、その機能や局在、寿命を制御している。この制御機能に欠陥が生じると、アルツハイマー病や免疫疾患などの重篤な疾患を引き起こす。ユビキチン鎖には多数の結合様式が存在し、機能に応じて多様な四次構造を形成するため、ユビキチン鎖の機能解明には構造に立脚した解析が重要である。これまでに、ユビキチン鎖の最小単位であるユビキチン二重合体（ダイユビキチン）の結晶構造が複数決定されているが、同じ結合様式の二重合体でも異なる構造が報告されている点や、標的分子の有無により構造が異なる点から、溶液中ではより柔軟に構造変化していると考えられる（Fig.1）。したがって、ユビキチン鎖の認識機構を理解するためには、溶液状態での動的構造の解析が必要と言える。そこで本研究では、タンパク質の動的構造を原子レベルで観測できる核磁気共鳴（NMR）法と分子動力学（MD）法を組み合わせ、3種類の主要なダイユビキチン（M1型、K48型、K63型）の動的構造を解析し、結晶構造だけでは解明できないユビキチン鎖の結合様式特異的な動的構造特性を明らかにした。

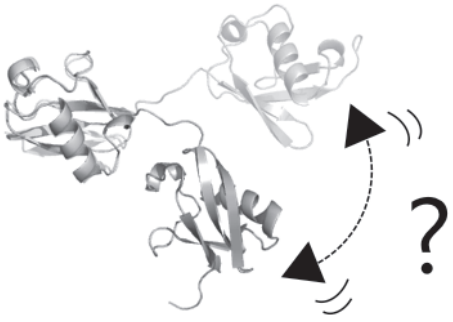


Fig.1 Schematic diagram of dynamics in diubiquitin.

ユビキチン、動的構造

○たかしましんご、うぁりんだえりっく、もりもとだいち、すがせけんじ、しらかわまさひろ

【結果・考察】

まず、1 マイクロ秒の MD シミュレーションを行ったところ、K48 型は 2 つのユビキチンサブユニットが相互作用した四次構造（閉じた構造）を維持していた。一方、K63 型と M1 型では、サブユニット間の相互作用は一時的に存在するものの、柔軟に四次構造を変化させ、複数の開いた構造を形成していた（Fig. 2)。興味深いことに、得られた構造を 2 つのサブユニット間の距離と角度により分類すると、M1 型は K63 型に比べ多様性に富んだ構造を形成することが示唆された。また、K63 型と M1 型に関して横緩和速度（R_2）を測定したところ、C 末端側のユビキチンユニットの R_2 値に差異が見られ、結合様式によって異なる挙動を示すという MD シミュレーションの結果を支持する結果が得られた（Fig. 3)。

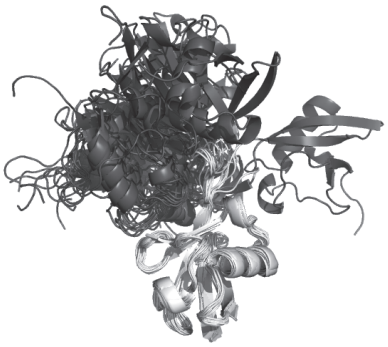


Fig.2 Snapshots from 1-μs MD simulations of M1-linked diubiquitin.

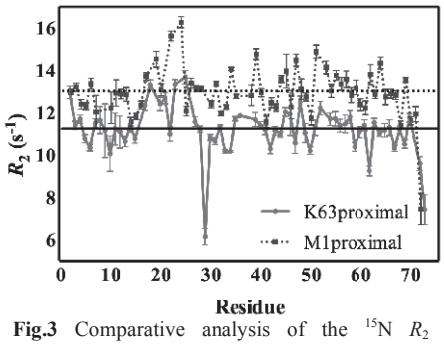


Fig.3 Comparative analysis of the ^{15}N R_2 relaxation rates of the proximal subunits of K63-, and M1-linked diubiquitin.

次に、NMR 緩和分散法である $R_{1\rho}$ dispersion 法を用いて、マイクロ秒～ミリ秒の構造変化を解析すると、K48 型にのみ緩和分散による実効緩和速度（$R_{1\rho}^{eff}$）の増加が観測され、その部位は２つのサブユニットの相互作用界面に局在することが明らかとなった（Fig. 4)。さらに、得られた緩和分散データを二状態モデルにフィッティングすると、検出された構造変化は K48 型の 2 つのサブユニット間の開閉運動であることが示唆され、そのタイムスケールは 286 ± 15 μs であった。CLEANEX−PM 法により、K48 型のアミド水素と溶液中の水との水素交換速度を観測すると、相互作用界面の交換速度がモノマーに比べて減少していた。しかし、その減少の度合いは限られたものであり、水素交換が完全に消失することはなかった。この結果から、K48 型は主に閉じた構造を形成しているが、過渡的に水との水素交換が可能な開いた構造に構造変化すると考えられる。

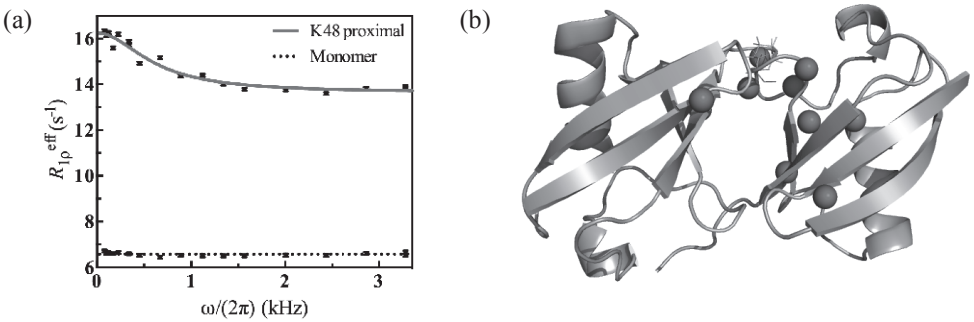


Fig.4 (a) On-resonance ^{15}N $R_{1\rho}$ relaxation dispersion profiles for Gln49 of K48-linked diubiquitin and monoubiquitin. (b) Mapping of the residues showing $R_{1\rho}$ dispersion onto the crystal structure of K48-linked diubiquitin.

以上より、ダイユビキチンには、結合様式に応じて異なるマイクロ秒～ミリ秒オーダーの動的構造特性を持つことが明らかとなった。一般的にタンパク質間の相互作用はこのタイムスケールで起こるとされている。そのため、これらの結果はユビキチン結合タンパク質が、各結合様式で異なるユビキチン鎖の動的構造を基に結合する相手を認識している可能性を示唆する。本発表では、これらの動的構造から考えられるダイユビキチンとユビキチン結合タンパク質との相互作用のモデルを提唱する。

P21

タウ凝集化を阻害するプロリン異性化酵素Pin1の異性化活性メカニズム

○栃尾尚哉[1]，Jing Wang[2]，楯　真一[2]，楯　直子[1]
[1]帝京大学薬学部
[2]広島大学大学院　理学研究科

Mechanism for *cis–trans* isomerase of Pin1, which helps understanding a hyper-phosphorylated TAU aggregation-dissolution

Naoya Tochio[1], Jing Wang[2], Shin-ichi Tate[2], Naoko Tate[1]
[1]*Faculty of Pharma-Science, Teikyo University,* [2]*Graduate School of Science, Hiroshima University*

Prolyl isomerase, Pin1, specifically recognizes the motif composed of phosphorylated serine (pSer) or threonine (pThr) and proline (Pro), pSer/pThr−Pro, and is thought to inhibit aggregation of the hyper-phosphorylated Tau through its *cis−trans* isomerase activity. It was already reported that a hydrogen bonding network containing Cys113−His59−His157−Thr152 buried in the Pin1 catalytic domain contributes to maintaining its ternary structure and isomerase activity. Here, we focused on the central dual-histidine within the hydrogen bonding network and analyzed the dynamics for the dual-histidine using mutagenesis and relaxation experiments.

アルツハイマー病などの神経変性疾患では、高度にリン酸化されたタウタンパク質の凝集による神経原線維変化が観測される。プロリン異性化酵素Pin1は、リン酸化されたセリンまたはスレオニンとプロリンからなる配列モチーフを特異的に認識し、モチーフ内のペプチド結合の*cis−trans*異性化を促進する。Pin1はその*cis−trans*異性化活性によってリン酸化されたタウの凝集化を阻害すると考えられている。Pin1の異性化活性ドメイン内部にはCys113－His59－His157－Thr152から成る水素結合ネットワークが存在し、立体構造および異性化活性維持への寄与が報告されている。しかしながら、Pin1のプロリン異性化メカニズムの詳細については未だ明らかになっていない。我々は、水素結合ネットワーク内の2つのヒスチジン(His59とHis157)とその周辺の動的挙動および機能の解析を行った（Fig. 1）。

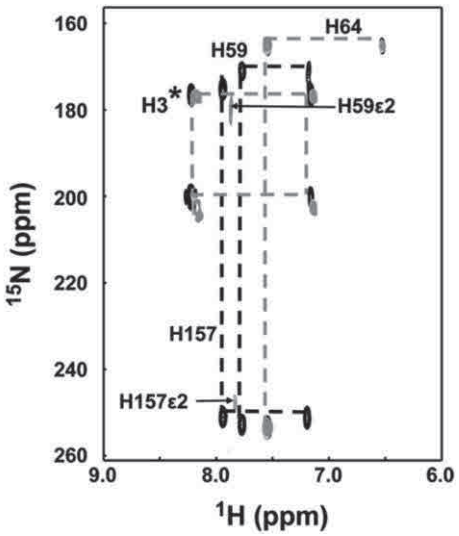


Fig. 1. $^{1}H–^{15}N$ multibond HSQC spectra for the imidazole rings in the Pin1 catalytic domain: the wild type (black); C113A (light grey); and C113S (dark grey). A set of signals marked with an asterisk represent the histidine located within the N-terminal tag derived segment (H3).

Barman & Hamelbergによる理論研究(1)は、上記水素結合ネットワーク内の2つのヒスチジンの互変異性体構造転移と酵素のターンオーバーとの関係を指摘しており、さらに、ヒスチジンの互変異性体構造転移がCys113の

プロリン異性化酵素、Pin1、水素結合ネットワーク、互変異性体

○とちおなおや，わんじん，たてしんいち，たてなおこ

チオール基のprotonation/deprotonationと密接に関係していることを示唆している。そこで、我々はCys113チオール基のprotonation/deprotonationの疑似的な変異体としてC113SおよびC113A変異体を用いてHis59とHis157への影響を解析した。

C113A変異体の場合、野生型ではepsilon protonationを示したHis59がepsilon–delta protonationの構造平衡状態を示し、また野生型に比べ約50分の1という著しい異性化活性の低下を示した。一方、C113S変異体ではepsilon protonation–imidazoliumの構造平衡状態を示し、さらにその異性化活性は観測下限値以下にまで低下した（Fig. 2）。

本研究により、Cys113の化学的環境がPin1の活性ドメイン内水素結合ネットワークの維持、とりわけ2つのヒスチジン間の水素結合形成に大きく寄与することにより、Pin1異性化活性に多大な影響を及ぼすことを明らかにした(2)。

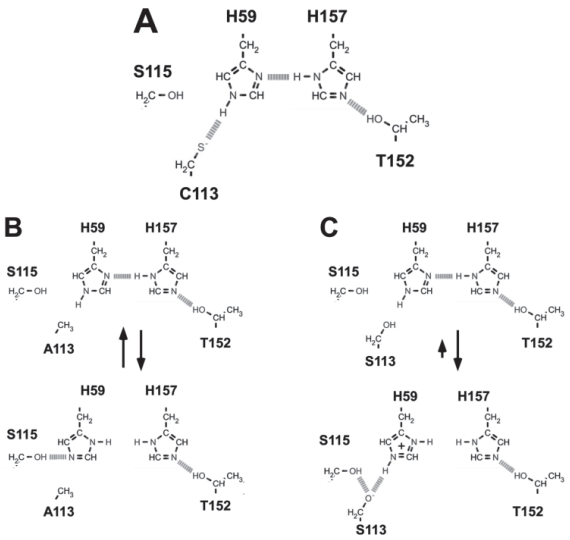


Fig. 2. **Dynamics of the hydrogen bond network.**
(A) Hydrogen bonding network identified in the wild-type Pin1 catalytic domain, where C113 is drawn to position the thiolate as theoretically proposed. (B,C) Rearrangement of the hydrogen bonding network caused by the C113A (B) and C113S mutation (C).

(1) Barman, A., and Hamelberg, D. Cysteine-mediated dynamic hydrogen-bonding network in the active site of Pin1. *Biochemistry*, **53**:3839-3850 (2014)

(2) Wang, J., Tochio, N., Kawasaki, R., Tamari, Y., Xu, N., Uewaki, J., Utsunomiya-Tate, N.,and Tate, S. Allosteric Breakage of the Hydrogen Bond within the Dual-Histidine Motif in the Active Site of Human Pin1 PPIase. *Biochemistry*, **54**:5242-5253 (2015)

P22

酵母*Pichia pastoris*発現系を用いたメチル基選択的^{13}C標識タンパク質試料の調製とNMR解析

○鈴木里佳，坂倉正義，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

Preparation of methyl-selective ^{13}C labeled proteins by using the yeast *Pichia pastoris* for NMR analyses

○Rika Suzuki, Masayoshi Sakakura, Masaki Mori, Moe Fujii, Hideo Takahashi
Graduate School of Medical Life Science, Yokohama City University

Methyl-selective isotope labeling is a useful tool to analyze structures and interactions of large proteins such as membrane proteins by NMR. Methyl-selective isotope labeling can be achieved cost-effectively by using the metabolic precursors of Ile, Leu, and Val in the *E. coli* expression system. On the other hand, methyl-selective labeling strategies have not been fully developed for the yeast *Pichia pastoris* expression system, which has advantages in mammalian membrane protein expression. Here we report a novel strategy to selectively incorporate ^{13}C into methyl groups of Leu and Val by using the Leu/Val precursor, α-ketoisovalerate (KIV). We found that acidic pH of culture medium is essential for the yeast cells to uptake KIV, and that up to 11±0.9% (Leu) and 73±2.6% (Val) of the methyl groups in a model protein (β-lactoglobulin) could be labeled by our method. We also developed a Val-methyl-selective ^{13}C incorporation method, which is useful to simplify spectra of large proteins.

[Introduction]

測定感度が高いメチル基は、膜タンパク質をはじめとする高分子量タンパク質の NMR 解析において有用な観測対象基である。大腸菌発現系においては、アミノ酸代謝前駆体を用いることで、選択的かつ効率よく、メチル基に ^{13}C を導入する方法が確立されており、汎用的に用いられている[1]。しかしながら、大腸菌にヒトの膜タンパク質を発現させることは容易でなく、発現したタンパク質が凝集体を形成してしまうことも多い。一方、メタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* (*P. pastoris*) は、取り扱いが容易である上、GPCR をはじめとする多くのヒト膜タンパク質や、抗体などの分泌タンパク質の発現報告例が存在するため、大腸菌発現系を補う発現系として重要性が高いと考えられる。しかし、本発現系については、リコンビナントタンパク質への安定同位体標識導入手法が十分には確立されておらず、特にメチル基選択的標識法に関しては、Ile の側鎖メチル基への ^{13}C 標識導入法のみが確立されている[2]。本研究では、特に膜タンパク質に多く含まれ、構造解析のプローブとして有用性が高いと考えられる Leu および Val の側鎖メチル基に、選択的に ^{13}C 標識を導入するための手法開発を目的として、酵母培養条件の検討、ならびに、培養方法の最適化を行った。モデルタンパク質として、分子内ジスルフィド結合を 2 個有し、大腸菌を用いて活性型として発現させることが困難であるが、*P. pastoris* 発現系により分泌発現が可能なことが知られている、β-lactoglobulin （β-LG、分子量 18 K ）を選択した。

酵母発現系，メチル基選択的^{13}C標識，高分子量タンパク質

○すずきりか，さかくらまさよし，もりまさき，ふじいもえ，たかはしひでお

[Results and Discussion]

1．酵母細胞へのLeu/Val代謝前駆体(KIV)の取り込みのpH依存性の解析

これまでに、LeuおよびValの共通の代謝前駆体である α-ketoisovalerate（KIV、Fig. 1）を用いて、標準的な条件下において培養を行った場合、Leu/Valへの標識導入効率が非常に低い(<5%)ことが報告されている[2]。この原因を明らかにするため、酵母培養液中のKIV濃度の経時変化をNMRを用いて解析した。この結果、KIV濃度の変化が観測されず、培地から細胞へのKIVの取り込み効率が低いことが、低標識率の要因であることが示唆された。酵母細胞への有機酸の取り込みには様々なトランスポーターが関与しており、これらのトランスポーターの活性は、トランスポーターの周囲の pH により変化することが知られている[3]。そこで、培地のpHが、細胞へのKIVの取り込み効率に与える影響を明らかにするため、酵母細胞が細胞内に取り込むKIV量のpH依存性を解析した。この結果、培地のpHの低下に伴い、KIVの取り込み効率が上昇することが明らかとなった（Fig. 2）。さらに、KIVの取り込み効率と目的タンパク質への標識導入率の相関を明らかにするため、pH 3.5と6.0の2条件下において酵母を培養し、発現したタンパク質（β-LG）のNMRスペクトルの比較を行った（Fig. 3）。pH 3.5の培養により得られたβ-LGの^{1}H-^{13}C HSQCスペクトルには、主にValの側鎖メチル基に由来する強いシグナルが観測された。以上の結果から、培地のpHを酸性域に設定することにより、酵母細胞へのKIVの取り込み効率が上昇し、それに伴って目的タンパク質への標識導入率が向上することが示された。

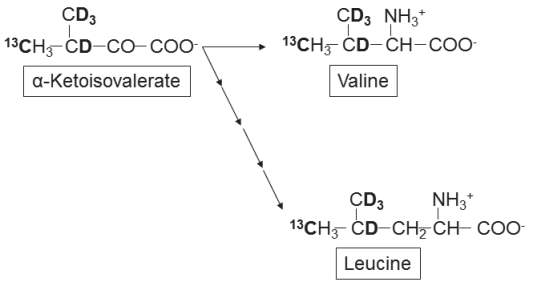


Fig. 1. Simplified biosynthetic pathways of Leu and Val.

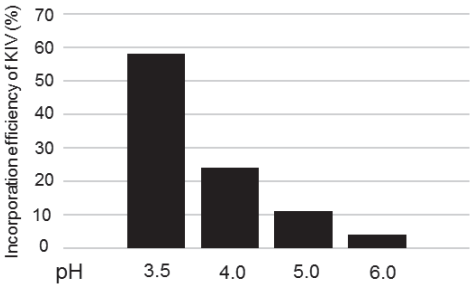


Fig. 2. pH dependent change in the cellular uptake of KIV for 24 hours.

2．安定同位体標識率の定量的評価

Leu/Valのメチル基における^{13}C標識率を定量的に評価するため、β-LGのペプチドフラグメントの質量分析を行った。非標識β-LG、および200 mg/Lの[3,4,4,4-^{2}H, 3-^{13}C] KIVを含むpH 3.5の培養液から得られたLeu/Val-$^{13}CH_3$標識β-LGを、還元アルキル化処理した後、Lysyl Endopeptidase消化を行い、得られたペプチド混合物について MALDI-TOF-MS を用いて質量スペクトルを測定した（Fig. 4）。軽水培地中において、[3,4,4,4-^{2}H, 3-^{13}C] KIVを用いて培養を行った場合、1残基あたり、質量が5増加する（Fig.

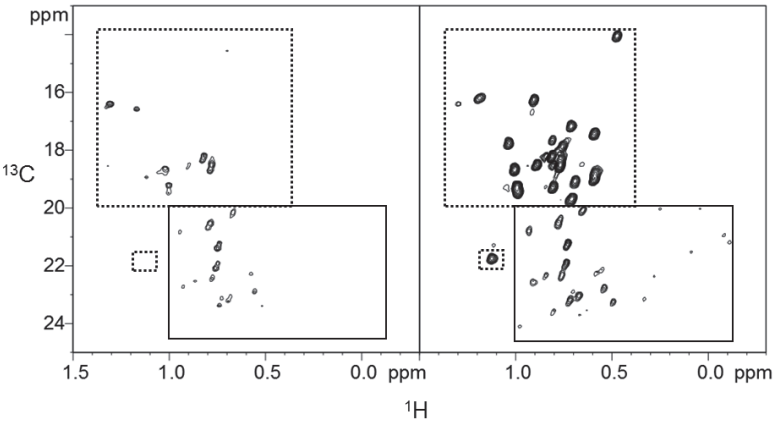


Fig. 3. ^{1}H-^{13}C HSQC spectra of [Leu/Val-$^{13}CH_3$] β-LG expressed at pH 6.0 (left) and pH 3.5 (right).

Signals from Leu and Val are boxed with solid and dotted lines, respectively.

1）。ValまたはLeuを含むフラグメントについて、標識導入に伴う、M+5の同位体シグナルの相対強度の変化を解析した結果、Leu-$^{13}CH_3$標識が11±0.9%、Val-$^{13}CH_3$標識率が73±2.6%であることが明らかとなった。Valに対してLeuの標識率が低く、Leuの生合成までの過程がValと比べて長いことに起因すると考えている。これまでに、BCAT遺伝子をcotransfectionさせた酵母 *Kluyveromyces lactis* (*K. lactis*) 発現系を用いて、Leu/Val-$^{13}CH_3$標識を行った場合、Leu-$^{13}CH_3$標識率が10%、Val-$^{13}CH_3$標識率が15%であることが報告されている[4]。本手法により得られたVal-$^{13}CH_3$標識率は、これまでに報告されている酵母発現系を用いたVal-$^{13}CH_3$標識率を大きく超えており、酵母発現系を用いて、大腸菌発現系に近いレベルの標識率を達成することができたと結論した。

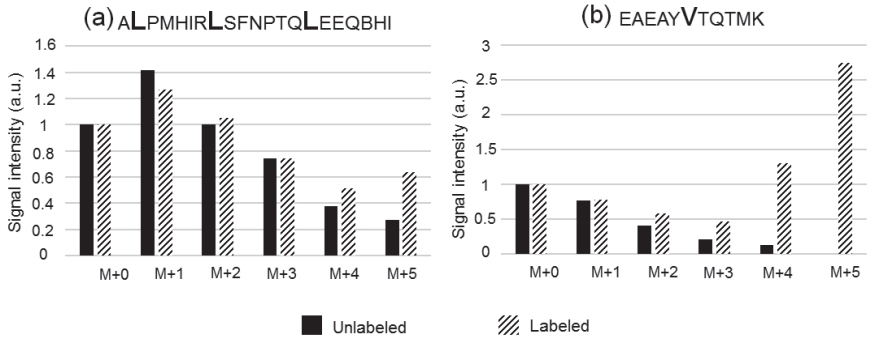


Fig. 4. Relative signal intensities of the isotope peaks observed for the [Leu/Val-$^{13}CH_3$]-labeled and unlabeled β-LG peptide fragments.
The labeling efficiency (x) was calculated using the formula
$x\ (\%) = \{I_{M+5(labeled)} - I_{M+5(unlabeled)}\} / \{I_{M+5(labeled)} - I_{M+5(unlabeled)} + N\}$, where $I_{M+5(labeled)}$ and $I_{M+5(unlabeled)}$ indicate relative signal intensity of the M+5 isotope peaks in the MS spectra for the labeled and unlabeled β-LG peptide fragments. N indicates number of Leu or Val in β-LG peptide fragments.

3．pH低下に伴う収量低下を克服するための培養方法の改良

pH 3.5の培養条件においては、β-LGの発現量が減少し、pH 6.0において1 L培養当たり約10 mgであった収量が、約5 mgに低下した。*P. pastoris* は、pH 3から7の間において生育可能であり、また、酸性域では酵母が分泌するプロテアーゼの活性が低いと報告されている。従って、β-LGの収量低下は、低pH条件におけるリコンビナントタンパク質合成系の活性低下、β-LGの安定性低下等が要因である可能性が考えられ、他のリコンビナントタンパク質についても同様な収量低下が起こり得ると考えられる。そこで、pH低下に伴う収量低下を軽減させることを目的として、酵母を、KIVを含むpH 3.5の培地において20時間培養し、KIVを細胞内に取り込ませた後、培地をpH 6.0のKIVを含まない培地に交換して、タンパク質発現を誘導した。この結果、β-LGの収量は1 L培養当たり約10 mg程度に上昇した。また、Leuの側鎖メチル基の標識率が14±1%、Valの側鎖メチル基の標識率が57±0.9%であった。この培養手法を用いた場合、目的タンパク質のVal側鎖の標識率が、pH 3.5で誘導を行った場合の標識率と比較して、約15%低下したが、目的タンパク質の収量が約2倍に増加した。従って、得られたタンパク質のNMRスペクトルの検出感度は、約70%増加すると考えられる。以上の結果から、低pHに対する安定性が低いタンパク質に対しても適用可能な、より汎用性の高いLeu/Val標識方法を確立したと結論した。

４．Val選択的$^{13}CH_3$標識法の開発

膜タンパク質の膜貫通領域には、Leu/Valが多数含まれるため、Val選択的標識によるスペクトルの簡略化が有効となる場合も考えられる。そこで、KIVを含む培地に対して、非標識Leuを添加することにより、Val選択的$^{13}CH_3$標識タンパク質の調製を試みた。酵母を、KIVを含むpH 3.5の培地において20時間培養し、KIVを細胞内に取り込ませた後、KIVを含まず、200 mg/Lの非標識Leuを含むpH 6.0の培地に交換して、タンパク質発現を誘導した。この培養によって得られたβ-LGの^{1}H-^{13}C HSQCスペクトルをFig. 5に示す。得られたスペクトルにおいて、β-LGに含まれる10個のValに対応すると考えられる、19個以上のシグナルを観測することができた。また、Leu由来シグナルは、観測されなかった。これらの結果は、質量分析により決定した標識率（Leuの側鎖メチル基の標識率が1%以下、Valの側鎖メチル基の標識率が56±1 %）と矛盾せず、Val選択的$^{13}CH_3$標識法の確立に成功したと結論した。

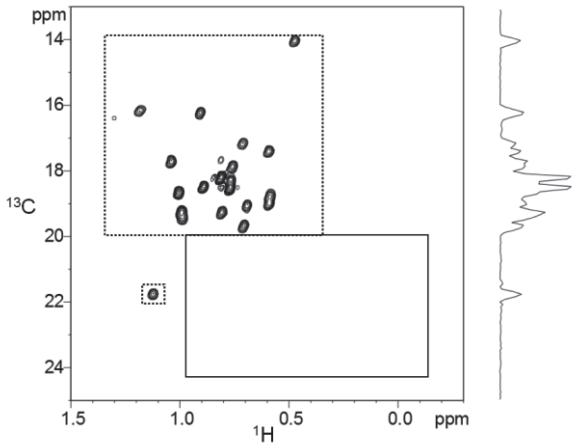


Fig. 5. ^{1}H-^{13}C HSQC spectrum of Val-selectively-$^{13}CH_3$ β-LG.

Signals from Leu and Val are boxed with solid and dotted lines, respectively.

[Conclusion]

本研究において開発した手法を用いることにより、これまでに、酵母 *P. pastoris* 発現系を用いた場合にはIleにしか導入することができなかった$^{13}CH_3$標識が、LeuおよびValについても導入可能となった。Leu/Valは、膜タンパク質の膜貫通ヘリックスの構成残基の約24%を占めている[5]。従って、本安定同位体標識手法の開発により、NMRを用いた構造生物学解析における*P. pastoris* 発現系の有用性が高まったと考えられる。

[References]

(1) Goto. N. K, et al. (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,et al. (2015) Methyl labeling and TROSY NMR spectroscopy of proteins expressed in the eukaryote *Pichia pastoris*. *J. Biomol. NMR*. **62**, 239–245.

(3) Jamalzadeh. E, et al. (2011) pH Dependent Uptake of Fumaric Acid in *Saccharomyces cerevisiae* under Anaerobic Vonditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**. 705-716.

(4) Miyazawa-Onami. M et al. (2013) Perdeuteration and methyl-selective ^{1}H, ^{13}C-labeling by using a *Kluyveromyces lactis* expression system. *J. Biomol NMR*. **57**, 297-304.

(5)Liu. Y. et al. (2002) Genomic analysis of membrane protein families; abundance and conserved motifs. *Genome Biology*. **3**, 54.1-54.12

[Acknowledgment]

安定同位体標識率の定量評価に関して、横浜市立大学大学院生命医科学研究科の明石知子准教授に多大なご協力をいただきました。ここに感謝申し上げます。

P23

酸化ストレス応答における Keap1 の構造・相互作用解析

Structural and interaction analyses of Keap1 in oxidative stress response

井上　仁[1]、村松亜紀[2]、鈴木隆史[2]、磯　達朗[2]、小柴生造[1]、山本雅之[1,2]

Jin Inoue[1], Aki Muramatsu[2], Takafumi Suzuki[2], Tatsuro Iso[2], Seizo Koshiba[1], Masayuki Yamamoto[1,2]

1. 東北大学　東北メディカル・メガバンク機構
2. 東北大学大学院　医学系研究科
1. Tohoku Medical Megabank Organization (ToMMo), Tohoku University
2. Graduate School of Medicine, Tohoku University

活性酸素種や親電子性物質によってもたらされる酸化ストレスは、DNA など生体高分子の損傷を引き起こす。酸化ストレスに対する速やかな応答は細胞内の恒常性維持に重要であり、そのために生物は応答・防御機構を保持している。その中心的な役割を果たすのがストレスセンサータンパク質 Keap1 とそれに結合する転写因子タンパク質 Nrf2 である。Keap1 は細胞質でユビキチン E3 リガーゼのアダプターとして機能し、非ストレス下では Nrf2 を認識してユビキチン化し、プロテアソームによる分解へ導くことにより機能を抑制している。しかし、酸化ストレスに晒されることにより Keap1 は不活性化し、Nrf2 のユビキチン化が停止する。このようにして安定化した Nrf2 は核へ移行し、種々の酸化ストレス応答遺伝子の発現を促進する。

Keap1 は BTB ドメイン、IVR ドメイン、DGR ドメインから構成され（図 1)、624 残基中 25 個のシステイン残基を持つ。これらのシステイン残基が酸化ストレスにより修飾されて Keap1 に構造変化が生じ、ユビキチンリガーゼとしての活性を失うことが Nrf2 の活性化につながるものと考えられる[1]。しかし、Keap1 にどのような構造変化が起こると Nrf2 を活性化するのか、その詳細は不明である。そこで本研究では、Keap1 の構造変化とストレス応答制御との連関を明らかにすることを目的として、NMR による Keap1 の構造及び相互作用解析を実施する。本発表では、Keap1 と低分子化合物の相互作用について、Keap1 の BTB-3box 領域などを用いた NMR 滴定実験による解析を実施した。

Keap1 全長タンパク質は不安定であり大量調製が難しい。そのために、種々の Keap1 断片の調製を試みたところ、BTB ドメインと BTB ドメインと隣接する 3-box を含む領域 (BTB-3box) については可溶性タンパク質を得ることができた。しかし、他の領域については可溶性タンパク質を得ることができなかった。

BTB-3box について安定同位体標識試料を調製して NMR 測定を行った結果、主鎖アミドプロトンが 7 割程度観測された（図 2）。この結果は BTB-3box の一部が flexible であることを示唆している。

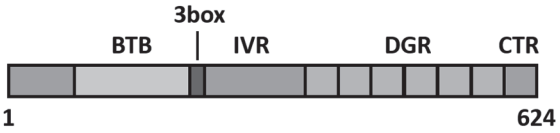


図1. Keap1 のドメイン構造.

次に Keap1 との結合が確認されている化合物（Sulforaphane, DEM, CDDO-Im）[2] と BTB-3box との NMR 滴定実験を行った。その結果、いずれの化合物においても結合に由来する BTB-3box のシグナルの変化が観測された。変化が起きたシグナルは一部であることから、化合物は BTB-3cox に結合するが大きな構造変化は引き起こさず、局所的な変化を生じていることが示唆された。また、化合物添加によって変化が生じたシグナルには共通するものが多いことから、それぞれの化合物は BTB-3box 上の特定の領域に結合することが示唆される。

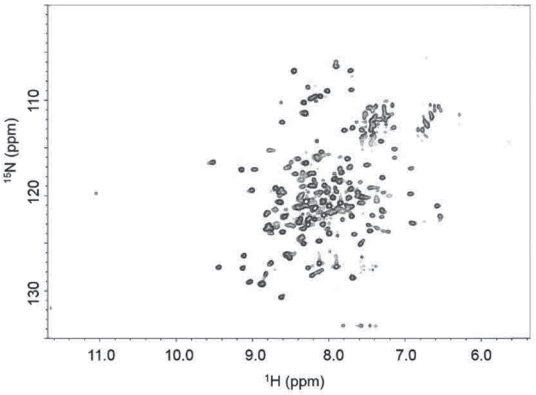


図2. Keap1 BTB-3box の ^{1}H-^{15}N HSQC スペクトル.

今後、化合物の結合部位を同定するため、BTB-3box の主鎖 NMR シグナルの帰属を行う。IVR など他の領域を含む断片についても NMR 試料調製のための条件検討を行う。また、システイン残基が化合物の認識・結合に直接関与しているかについて、システイン選択的標識などの方法により検証していく予定である。

References

1. Mitsuishi Y., Motohashi H., Yamamoto M. (2012) The Keap1–Nrf2 system in cancers: stress response and anabolic metabolism. *Front. Oncol.* 2:200.
2. Saito R., Suzuki T., Hiramoto K., Asami S., Naganuma E., Suda H., Iso T., Yamamoto H., Morita M., Baird L., Furusawa Y., Negishi T., Ichinose M., Yamamoto M. (2015) Characterizations of Three Major Cysteine Sensors of Keap1 in Stress Response. *Mol. Cell. Biol.* 36(2):271-84.

P24

Conformation and dynamics of soluble repetitive domain of spider dragline silk protein rationalizes an initiation step of β-sheet formation

Nur Alia Oktaviani and Keiji Numata

Enzyme Research Team, RIKEN Center for Sustainable Resource Sciences, Wakoshi,Saitama, Japan.

Spider dragline silk is well known due to its superior mechanical properties and potential for industrial applications. The β-sheet is the pivotal structure underlying the outstanding mechanical properties of spider silk. Spider silk protein (spidroin) consists of relatively small and highly conserved N-terminal domain (NTD), C-terminal domain (CTD), in addition to a long repetitive domain. This protein is soluble at high concentration in spider gland and is transformed into insoluble fiber after passing pH-gradient process. Several studies demonstrated that conformation of NTD and CTD display strong pH-dependence and are essential for controlling assembly of spider silk protein. The CTD forms a folded dimer at neutral pH and becomes unfolded at low pH, while the NTD is monomeric at neutral pH and constitute a dimer with an antiparallel orientation at acidic pH (Figure 1). Until now, the comprehensive mechanism underlying β-sheet formation from soluble silk proteins during the transformation into insoluble fibers still remains elusive. This is particularly the case for the assembly of the repetitive domains that dominate the length of the protein chains. Here, we report conformation and dynamics of soluble precursor of recombinant repetitive domain of spidroin from *Nephila clavipes* at different pH using solution-state NMR and CD spectroscopy.

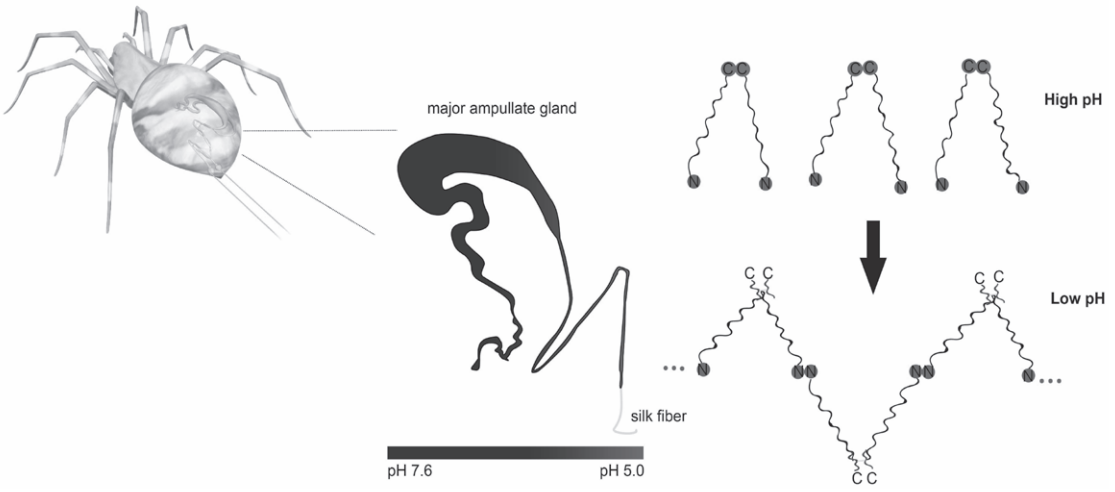


Figure 1. NTD and CTD of spider dragline silk are pH-dependent conformation. In the spinning gland, NTD forms monomer and CTD forms dimer. However, closer to spinning duct, where the pH is more acidic, NTD forms dimer with antiparallel orientation and CTD becomes unfolded.

We expressed unlabeled and doubly labeled (^{13}C, ^{15}N) of recombinant repetitive domains of spider dragline silk in different lengths using *E. coli* BL21(DE3). The gene used to express recombinant repetitive domain was designed based on the gene of repetitive domain from *N. clavipes*. Those recombinant repetitive domains used in this study were monomer, dimer, trimer, hexamer and 15-mer, which correspond to 1, 2, 3, 6 and 15 repeat units of dragline silk, respectively. The repetitive domain was purified using two-steps purifications, which were His-tag and size-exclusion chromatography. For NMR experiments, concentration of each doubly labeled (^{13}C, ^{15}N) protein was approximately 1.5-2 mM in 10 mM phosphate buffer pH 7, 0.1 mM DSS, 10% D_2O, which is comparable with molar concentration of spider silk found in ampullate gland.

All backbone (N^H, H^N, Cα, Hα, Cβ, C') and side chain chemical shifts of each repetitive domain were completed using 2D and 3D NMR experiments. These chemical shift assignments were utilized to analyze dynamics ($^{15}NT_1$, $^{15}NT_2$ and $\{^1H\}$-^{15}N Heteronuclear NOE), ^3J HNHA coupling constant, and distribution population of secondary structure of repetitive domains as well as chemical shift differences between repetitive domain (15-mer, hexamer, trimer and dimer) and monomer. Our NMR results showed that soluble repetitive domain consists of two major populations, which were random coil (~65%) and Polyproline type 2 (PPII) helix (~24%). PPII helix is a type of conformation which adopt backbone dihedral angles ϕ and ψ (-75°, 150°). The PPII helix conformation is relatively open and has no internal hydrogen bonding due to its extremely extended conformation. Importantly PPII helix conformation has the ability to form reverse turn, which is important to form intramolecular interaction in polyalanine region. Furthermore, our results showed that polyalanine region of repetitive domain is more flexible because it consists of more random coil population, while the glycine-rich region has more limited flexibility compared to polyalanine region as PPII helix population increases in this region. The presence of PPII helix population in repetitive domain was strongly supported by our circular dichroism (CD) data as well as vibrational circular dichroism (VCD) data from a previous study (Levefre. T *et al*, Biomacromolecules, 2007). Based on CD data, dimer, trimer, hexamer and 15-mer displayed minima ~196 nm and observable maxima ~215 nm, which is an indicative of the presence PPII helix population, while monomer only displayed minima around ~200 nm, which is an indicative of disordered protein (random coil).

Furthermore, the PPII helix population in glycine-rich region is considered as soluble pre-fibrillar population which can contribute to the efficiency of the spinning process because this type of conformation will undergo to form intramolecular interactions in response to shear forces, dehydration, extensional flow and change in biochemical environment (Figure 2). Additionally, the limited flexibility of the glycine-rich region might function to maintain the solubility of spider silk in the ampullate gland.

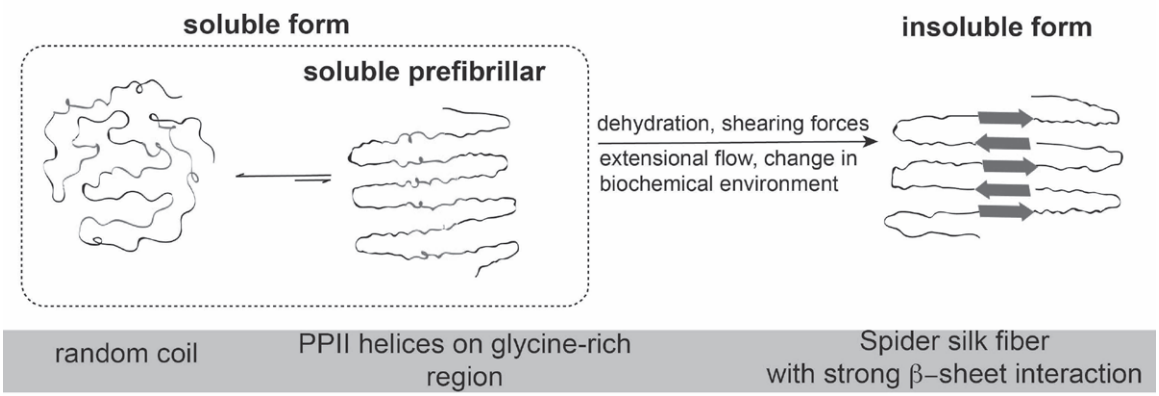


Figure 2. Schematic illustration of the proposed mechanism of the β-sheet formation of spider dragline silk. Two major populations of spider dragline silk, which are the random coil and PPII helix in the glycine-rich region, exist in soluble form. The presence of PPII helix in the glycine-rich region is proposed as a soluble prefibrillar form of spider dragline silk. The polyalanine region is in red, and the glycine-rich region is in blue. In response to dehydration, shearing forces, extensional flow and changes in the biochemical environment, this prefibrillar form will form spider dragline fibers through strong β-sheet interactions.

The pH effect on repetitive domain of spider dragline silk was investigated to mimic the acidification process in the spider gland. Our data demonstrated that there is no change in the conformation of repetitive domain at acidic pH. This finding indicates that pH changes in the gland do not affect the pre-fibrillar form of repetitive domain. In addition to this finding, the side chain Tyr pK_a of repetitive domain was also clarified because a previous study reported deprotonation of Tyr side chain of repetitive domain was considered to be responsible for maintaining the solubility of spider dragline silk. Our result showed that Tyr side chain pK_a of repetitive domain is 10.3, which is similar to pK_a of solvent-exposed Tyr. Therefore, based on result of our study, the solubility of repetitive domain of spider dragline silk is not due to deprotonation of Tyr side chain, but due to the limited flexibility of glycine-rich region. Together, these findings provide a better understanding of the initiation step of β-sheet formation and the high solubility of spidroin in the major ampullate gland.

Spider silk, β-sheet formation, unfolded protein

P25

NMRを用いた血清中での抗体の相互作用解析

○谷中冴子[1,2]，山崎俊夫[3]，與語理那[1,2]，矢木宏和[2]，加藤晃一[1,2]
1 自然科学研究機構　分子科学研究所
2 名古屋市立大学　大学院薬学研究科
3 理化学研究所　ライフサイエンス技術基盤研究センター

NMR Analysis of antibody interactions in the serum environment

○Saeko Yanaka[1,2], Toshio Yamazaki[3], Rina Yogo[1,2], Hirokazu Yagi[1,2], Koichi Kato[1,2],
1 Institute for Molecular Science, National Institutes of Natural Sciences
2 Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University
3 Center for Life Science Technologies, RIKEN

Although antibodies function in heterogeneous extracellular environments, structural characterization of antibody interactions has been investigated under homogeneous *in vitro* conditions. Here we propose an NMR approach to characterize antibody interactions in serum. In human serum, mouse IgG-Fc exhibited attenuation of NMR peak intensities with various magnitudes, which was also induced by polyclonal IgG-Fab isolated from the serum, indicating that mouse IgG-Fc is reactive with a subset of IgGs that exist in human serum without preimmunization. The serum IgG-interaction zones cover the entire Fc surface, including the binding sites to Fc receptors and C1q. Our *in-serum* NMR approach will offer new tools for structural characterization of biopharmaceuticals in physiologically relevant environments, giving insights into *metaepitopes* recognized by the immune system.

分子が混み合った血中の環境では、様々な蛋白質同士が衝突しあい、希釈溶液中では無視されてきた弱い相互作用が増強される。このような非特異的相互作用は抗体医薬をはじめとするバイオ医薬品を設計開発する際に問題となる。しかし、このような血中環境と希釈溶液中での相互作用の違いはこれまで見落とされてきた。本研究では、血中の混み合い環境での抗体と血中因子との特異的あるいは非特異的な相互作用を明らかにすることを目的とし、NMR を用いた相互作用の観測と解析を行うこととした。

動物細胞発現系を用いてマウス免疫グロブリン G（IgG）に安定同位体標識を施し、これをヒト血清に加え、NMR 測定を実施した。ここでは特に IgG から切り出した Fc 領域に着目し計測を行った。その結果、分子質量 52kDa の糖タンパク質である Fc 領域の NMR 信号を高分解能、高感度で得ることができ、連鎖帰属によって主鎖アミドのシグナルを帰属することに成功した（Fig. 1）。

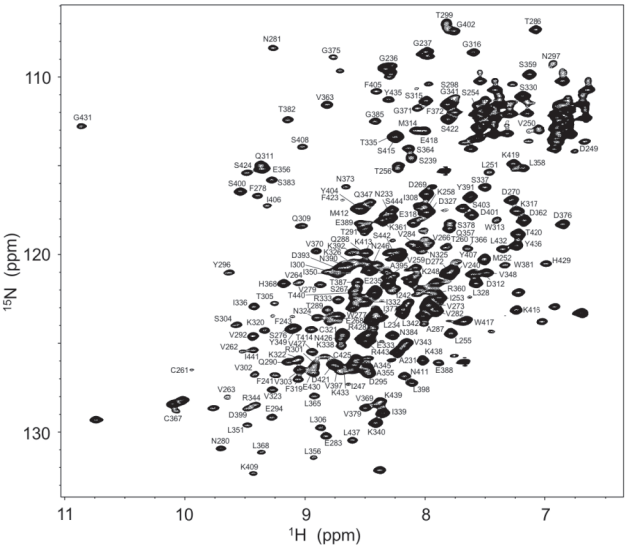


Fig. 1 ^{1}H–^{15}N HSQC spectrum of uniformly ^{13}C, ^{15}N-labeled mouse IgG2b-Fc glycoprotein recorded at 52°C at 800 MHz. Backbone assignments are annotated by the resonance peaks with one-letter amino acid codes and the sequence.

血清存在下で Fc 領域のシグナルを観測したところ、Fc 由来の多くのシグナルが選択的な減弱を示した(Fig. 2a)。このことは、Fc が血清中の成分と何らかの相互作用をしていることを意味する。血清中の主要な蛋白質成分はアルブミンとポリクローナル IgG の Fab 領域である。そこで、これらの蛋白質と安定同位体標識 Fc との相互作用を検討したところ、Fc は血清中のアルブミンとはほとんど相互作用せず、ポリクローナル IgG と相互作用することが明らかとなった(Fig. 2b, 2c, 2d)。ポリクローナル IgG と Fc の結合界面は、Fcγ 受容体、胎児性 Fcγ 受容体、補体因子 C1q との結合部位を含み、Fc の表面を広範に覆っていることが明らかとなった(Fig. 3)。これらの結果は、特定の抗原によって感作されていない血液環境においても、そこに内在するポリクローナル IgG によって、抗体の Fc 領域が認識され、免疫機能に影響を与え得ることを示唆している。

本研究で開発した NMR 観測手法は、バイオ医薬品の評価や血中環境での分子認識メカニズムの解明など様々な応用展開が期待される。

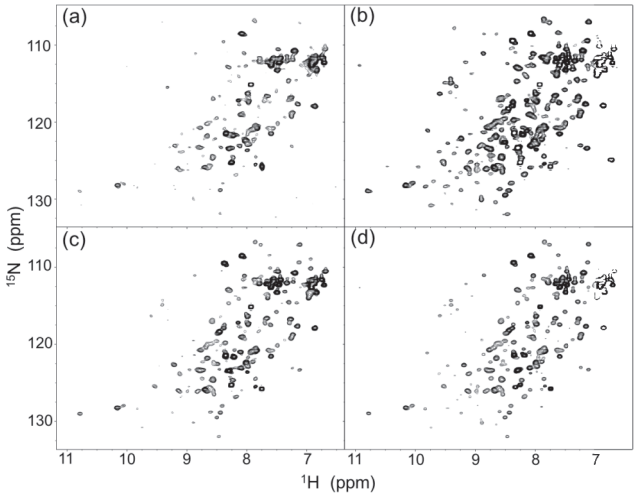


Fig. 2 Comparison of ^{1}H–^{15}N HSQC spectra (red) of uniformly ^{13}C, ^{15}N-labeled mouse IgG2b-Fc (a) in human serum and in the presence of (b) HSA, (c) human polyclonal IgG, and (d) the Fab fragment derived from human serum polyclonal IgG with the spectrum of the mouse IgG2b-Fc dissolved in 5mM sodium phosphate buffer, pH 7.4, containing 150 mM NaCl. The spectra were recorded at 37°C at 800 MHz.

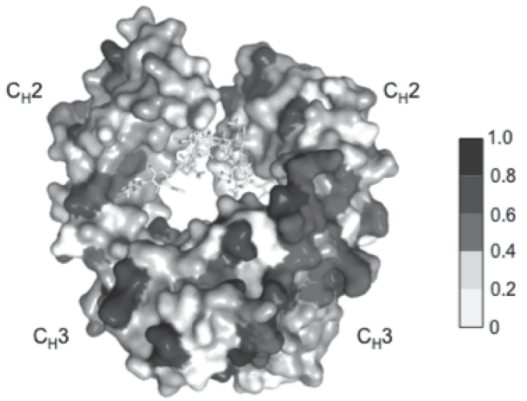


Fig. 3 Mapping on the crystal structure of mouse IgG2b-Fc (PDB code: 2rgs) of the observed spectral perturbations by addition of the Fab fragment derived from human serum polyclonal IgG. The attenuation in intensity of the HSQC cross peaks is mapped according to the magnitude of peak intensity reduction.

References

(1) Yagi, H., Zhang, Y., Yagi-Utsumi, M., Yamaguchi, T., Iida, S., Yamaguchi, Y. and Kato, K. Backbone ^{1}H, ^{13}C, and ^{15}N resonance assignments of the Fc fragment of human immunoglobulin G glycoprotein Biomol. NMR Assign. 9, 257-260 (2015)

P26

GPCRモジュレーターspinophilinとアドレナリン受容体細胞内ループとの相互作用：NMR情報を基にした相互作用部位の絞り込み

○浦野智子，島崎安希子，宮下祐美，細田和男，寺脇慎一，若松馨
群馬大学大学院　理工学府

Interaction of the third intracellular loop of adrenergic receptor with spinophilin, a modulator of GPCR signaling: narrowing down of the interaction regions with the aid of NMR information in the presence of aggregation protectant

○Tomoko Urano, Akiko Shimazaki, Yumi Miyashita, Kazuo Hosoda, Shin-ichi Terawaki, and Kaori Wakamatsu
GUNMA UNIVERSITY, Graduate School of Science and Technology

G protein-coupled receptors (GPCR) play important roles in signal transductions, and their functions are regulated by many different modulator proteins. Spinophilin (SPL), a scaffold protein abundant in neuronal spines is known to modulate activities of α-adrenergic receptors. The putative receptor-binding domain (RBD) in SPL does not contain typical domain sequences, nor be expected to adopt a defined conformation in its free state. To analyze the interaction of the RBD of SPL with the third intracellular loop (3iL) of α_{2A}-adrenergic receptor (α_{2A}-AR), we tried to narrow down the interaction regions. Because the 3iL is expected to have high tendency to form amyloid, we titrated [^{15}N]SPL with unlabeled 3iL in the presence of choline-*O*-sulfate (COS), an amyloid formation/aggregation protectant. With the aid of COS, we succeeded in observing clear spectral changes by the addition of 3iL and in narrowing down the interaction region by a factor of 4. The interaction region in 3iL was narrowed down by a factor of 9.

Gタンパク質共役型受容体（GPCR）による細胞内シグナル伝達は、ホルモン応答や神経伝達など様々な生理機能に関与している。GPCRシグナリングには種々の因子が関わっており、本研究ではGPCRの一種であるα_{2A}-アドレナリン受容体（α_{2A}-AR） の細胞内第3ループと結合し、シグナリングを制御するSpinophilin（SPL）に注目した。SPLは多くのGPCRと結合することが報告されている。しかし、SPLのGPCR結合領域（Receptor Binding Domain: RBD）は単独で構造をもたないと予測されており、RBDがどのようにARを認識するかなど、その詳細はわかっていない。さらに相互作用部位は報告によって異なっている[(1)-(3)]。そこでまず、α_{2A}-AR とSPLとの結合領域の絞り込みを行い、相互作用様式の決定及び複合体の立体構造決定を目標とし、HSQC解析を行った。

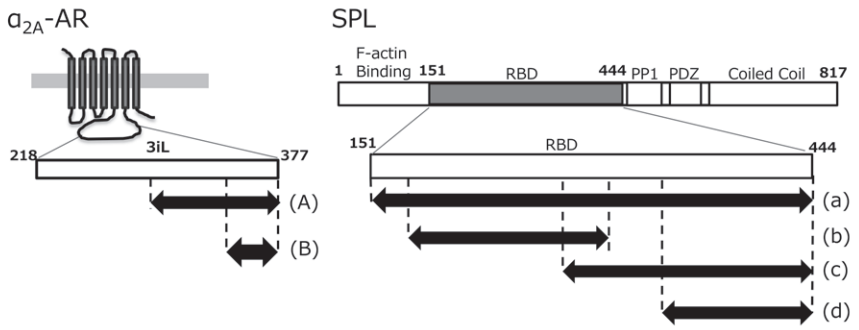


Fig. 1. The domain structures of α_{2A}-AR and spinophilin.

Gタンパク質共役型受容体，Spinophilin，α_{2A}-アドレナリン受容体

○うらのともこ，しまざきあきこ，みやしたゆみ，ほそだかずお，てらわきしんいち，わかまつかおり

まず、α_{2A}-ARのSPL結合部位を全長の約1/2（Fig.1-(A):AR-A）に、SPLのRBDを約1/2（Fig.1(c) :SPL-c）に絞り込んだ。pull down assayで結合を確認した後、 [^{15}N]SPL-cを調製しAR-Aを添加して^{15}N HSQCを測定した。シフト変化が観測されたものの（Fig.2(c)）、シグナル分離は不十分だった。Glyのシグナルにシフトが観測されたこと（Fig.2(a)）、Gln/Asnの側鎖NH_2のシグナルに全く変化がなかったこと（Fig.2(b)）を踏まえ、新規コンストラクトを作成した（Fig.1(d):SPL-d）。また、同様にα_{2A}-ARも約1/9とさらに短くしたものを作成した（Fig.1(B):AR-B）。Pull down assayにより両者の結合を確認し、SPLは70残基程度に、α_{2A}-ARは20残基程度に絞り込むことができた。

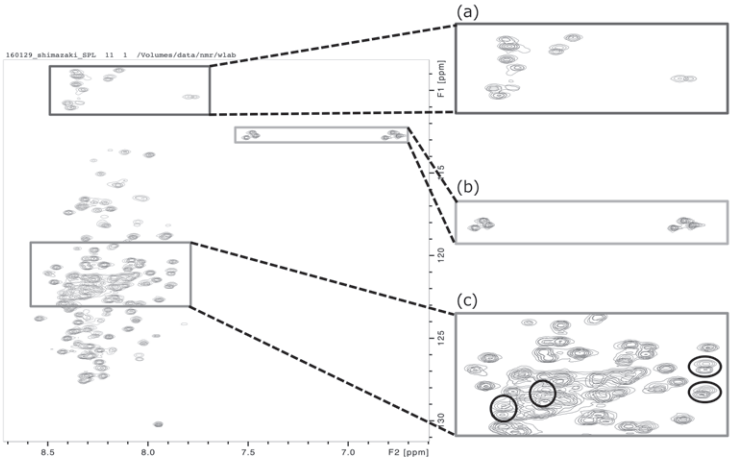


Fig. 2. ^{15}N HSQC spectra of [^{15}N]SPL-c in the absence (dark) and presence (light) of AR-A.

[^{15}N]SPL-d、GST-α_{2A}-AR-Bの発現・精製を行い、タイトレーションを行った。なお、SPLにAR-Bを加えると沈殿が生じた。SPLに酸性残基が多いのに対しAR-Bには塩基性残基が多いこと、AR-Bの配列は高いアミロイド形成能を示すことがその原因と考えられる。そのためタンパク質の凝集防止、ペプチドのアミロイド化を防止するCholine-*O*-Sulfate（COS）を添加した。GST-α_{2A}-AR-Bを少量ずつ加えたところ、全くシフトしないシグナルと（Fig.3(a)）、単調にシフトするシグナル（Fig.3(b)）を観測した。溶媒条件を最適化することによりシグナルの分離を改善すれば、全てのSPL-dのシグナルが帰属でき、相互作用部位の特定ができると考えている。またSPL-cのCD測定の結果では、2次構造がほとんどないことがわかっている（αヘリックスが約6%）。SPLは単独では明確な立体構造をとっていないがα_{2A}-ARと相互作用して構造を形成すると考えられるので、今後複合体の構造を決定したいと考えている。

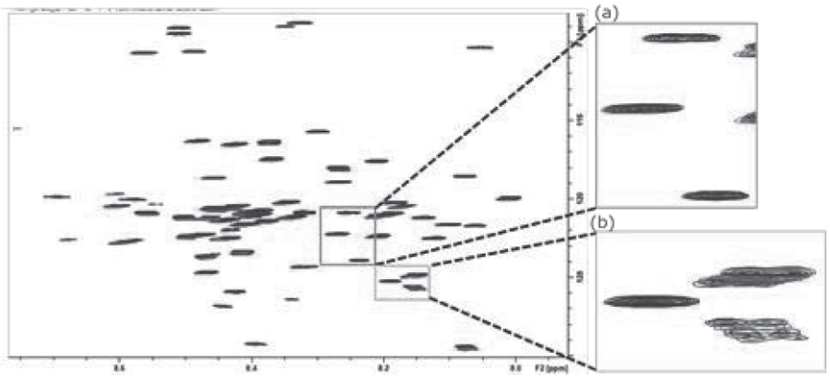


Fig. 3. Titration of [^{15}N]SPL-d with GST-α_{2A}-AR-B at 308 K.

References
(1) Sarrouilhe, D., et al., *Biochimie*. **88**, 1099–1113 (2006)
(2) Richman, J.G., et al., *J. Biol. Chem*. **276**, 15003–15008 (2001)
(3) Wang, Q., et al., *J. Biol. Chem*. **277**, 50589–50569 (2002)

P27

MAPK p38α によるストレス刺激に適合した基質選別機構の解明

○徳永裕二[1,2]，竹内恒[1]，高橋栄夫[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バイオ産業情報化コンソーシアム
3横浜市立大学・生命医科学研究科
4東京大学大学院・薬学系研究科

Structural basis for the mechanisms of optimum substrate selection for stress signaling by MAP kinase p38α

○Yuji Tokunaga[1, 2], Koh Takeuchi[1], Hideo Takahashi[3], and Ichio Shimada[4]
[1] *Molecular Profiling Research Center for Drug Discovery, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology*
[2] *Japan Biological Informatics Consortium*
[3] *Graduate School of Medical Life Science, Yokohama City University*
[4] *Graduate School of Pharmaceutical Sciences, the University of Tokyo*

It is essential for stress-responsive kinases, including MAPK p38α, to retain their activity in an abnormal intracellular condition caused by stress stimuli, where both intracellular concentration of ATP and pH are decreased. Even in such a condition, the stress-responsive kinases recognize and phosphorylate their specific substrates within the milieu of miscellaneous non-specific proteins. However, the structural bases for the robust and specific substrate phosphorylation remains unclear. To address this, we analyzed the effects of the pH decrease on p38α's structure and activity by using solution NMR. We found that the kinase activity of p38α was retained under the acidic condition, by stabilizing the active, high-ATP-affinity conformation in a conformational equilibrium. In addition, under the condition, the substrate selectivity was improved, by excluding the binding of non-specific proteins to the active site of p38α. These mechanisms contribute to our understanding of the robust and specific stress signaling via p38α.

【序論・研究の目的】 p38α は発生、炎症、ストレス応答など多様な細胞機能に関わるキナーゼであるが、各機能に固有の基質を選別する機構は明らかでない。また、ストレス応答においては、細胞内ATPが減少しpHが低下する、キナーゼ活性に不利と思われる環境にてシグナル伝達を行う必要がある。しかしながら、そのような環境においても活性が維持される機構は不明である。これまでに我々は、p38α の立体構造および酵素活性がリン酸化、ATP 結合および分子間相互作用により精緻に制御される機構を見出してきた(Ref)。本研究では、ストレス刺激に伴う細胞内環境の変化として代表的なpH 低下に伴うp38の動的立体構造を溶液 NMR 法を用いて解析することで、p38の酵素活性および基質選択性がストレス刺激に伴う細胞内環境の変化に対抗する構造的基盤を明らかにすることを目的として研究を行った。

【結果1】 酸性 pH 条件における p38αのキナーゼ活性の ATP 濃度低下に対する抵抗性
p38αのATP濃度依存的な基質リン酸化活性を、中性pH 7.5および酸性pH 6.7にて測定したところ(Fig. 1a)、ATP濃度低下に伴うp38αの活性低下は酸性pHにおいてより緩やかとなることが判明した。この構造的基盤を明らかとするため、*apo*状態p38αのNMRスペクトルを測定した。その結果、酸

キナーゼ，シグナル伝達，ストレス応答

○とくながゆうじ，たけうちこう，たかはしひでお，しまだいちお

性pHにおいては、ATPを結合した“活性化構造”に類似するシグナルが出現し、基底構造との平衡として観測された(Fig. 1b, c)。さらに、この“活性化”構造の存在割合が大きいほど、p38αのATPアナログに対する親和性が増強した(Fig. 1d)。よって、ATP高親和性の“活性化”構造の安定化がATP濃度低下に対する頑強な活性の構造基盤であることが示唆された。pHセンサー残基を同定するため、p38αの活性化構造モデルを検討したところ、酸性残基と近接する2個のHis残基H174およびH199を見出した(Fig. 1e)。これらHis残基の二重変異体では、酵素活性、ATPアナログに対する親和性、および構造平衡のpH依存性が消失した。よって、H174およびH199のプロトン化が活性化構造を安定化することで、p38α の頑強な酵素活性を達成していることが示唆された。

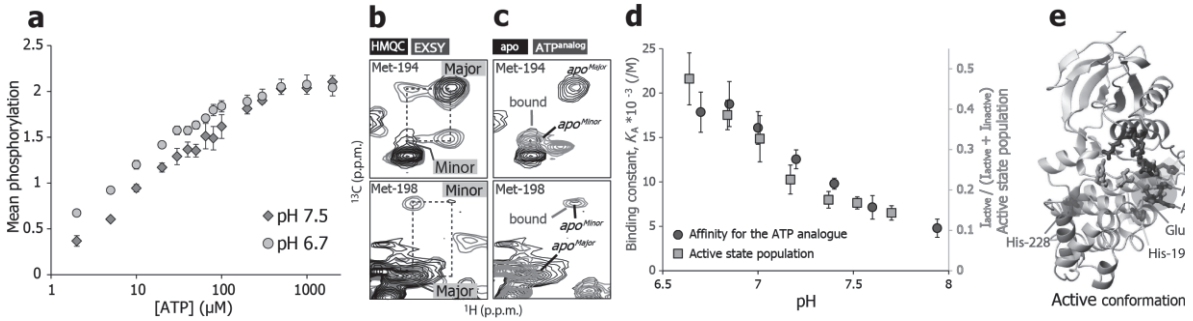


Fig. 1. Robust kinase activity of p38α under the acidic pH condition.

【結果2】 酸性 pH 条件における p38α の特異的基質の選別

p38α の ATP に対する親和性が pH にて調節されたことから、さらにリン酸化配列を含むペプチドに対する親和性を pH 依存的に解析した。pH低下に伴い、リン酸化配列を含むペプチドの親和性は低下した (Fig. 2a)。変異体解析より、この pH 依存性は、 p38α のリン酸化配列結合部位の近傍に位置する H228 に依拠することが示唆された (Fig. 2b)。p38α の特異的基質は、リン酸化配列とは独立に“ドッキング配列”と呼ばれる高親和性の認識モチーフを有し、酸性 pH においても p38α に対する結合を維持できる。したがって、リン酸化配列への親和性低下は、ドッキング配列を持たない非特異タンパク質の親和性のみを低下させ、 p38α に結合、リン酸化される確率を減じることで特異的なシグナル伝達を効率化する機構と考えられる (Fig. 3c)。

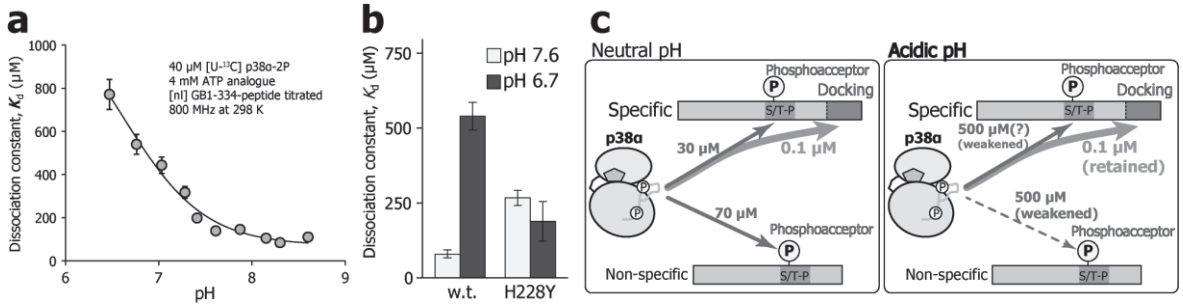


Fig. 2. Weakened interaction to the phosphorylation motif excludes “non-specific” proteins.

【考察】 p38α は特定の His 残基を介してストレス刺激下の細胞内pH低下に応答し、活性化構造の安定化および非特異タンパク質の排除を行うことで、ストレス細胞内において頑強かつ選択的なシグナル伝達を達成すると考えられる。

【Reference】 Tokunaga, Y., Takeuchi, K., Takahashi, H., Shimada, I. (2014) Allosteric enhancement of MAP kinase p38α’s activity and substrate selectivity by docking interactions. *Nat Struct Mol Biol 21*, 704.

P28

マルチドメインタンパク質における構造アンサンブルと各構造の存在比の解析

○瀧下俊平[1]，齋尾智英[1,2,3]，平松蒼野[1]，久米田博之[4,5]，清水和美[6]，
石森浩一郎[1,2]

[1]北海道大学大学院 総合化学研究院

[2]北海道大学大学院 理学研究院

[3]JST・さきがけ

[4]北海道大学大学院 先端生命科学研究院

[5]北海道大学 国際連携研究教育局 ソフトマターグローバルステーション

[6]早稲田大学大学院 教育・総合科学学術院

Analysis of structure ensemble and the population of each structure in multi-domain proteins

○Shumpei Takishita[1], Tomohide Saio[1,2,3], Soya Hiramatsu[1], Hiroyuki Kumeta[4,5], Kazumi Shimizu[6], Koichiro Ishimori[1,2]

[1] *Graduate School of Chemical Sciences and Engineering, Hokkaido University*

[2] *Department of Chemistry, Faculty of Science, Hokkaido University*

[3] *JST-PRESTO*

[4] *Graduate School of Life Science, Hokkaido University*

[5] *Global Station for Soft Matter, Global Institute for Collaborative Research and Education, Hokkaido University*

[6] *Faculty of Education and Integrated Arts and Sciences, Waseda University*

Since many of the multi-domain proteins are known to regulate their activities by changing conformational equilibrium, characterization of the structures including the population of the components is often the key to unraveling the detailed mechanisms of the functional regulations in multi-domain proteins. However, structural study of the conformational equilibrium as an ensemble is often challenging owing to averaging of the NMR signals. Here, we demonstrate an approach exploiting pseudocontact shifts (PCSs) and distance distribution from EPR with a 47 kDa-bacterial enzyme MurD consisting of three domains. The observed PCSs were interpreted as weighted-average of the PCSs from each of the components in the equilibrium. Calculation using a program MESMER has identified that ligand-free MurD exists as an ensemble of multiple conformations including open, closed and semi-closed conformation.

マルチドメインタンパク質の多くはドメインの配向が異なる複数の立体構造の平衡を有しており、その立体構造の存在比の変化が機能発現とその制御に関与していることが知られている[1]。そのため、マルチドメインタンパク質の分子機構を明らかにするためには、複数の立体構造とその存在比の情報が必須である。しかし、NMR を用いたタンパク質の立体構造解析においては、比較的速い交換にある平衡によって NMR 信号が平均化され、アンサンブルを構成する各成分を区別して解析することが困難となる。この問題は、マルチドメインタンパク質の立体構造解析に対して非常に有効な手法である常磁性ランタノイドプローブ法においても同様である。常磁性ランタノイドイオンなどにより誘起される pseudocontact shift (PCS)を含む常磁性効果は、固定した常磁性イオンからの相対的位置関係に依存した化学シフト変化として観測されるため、速い交換による NMR 信号の平均化によって、得られる立体構造情報が歪められてしまう。

Pseudocontact shift, マルチドメインタンパク質, 動的平衡

○たきしたしゅんぺい，さいおともひで，ひらまつそうや，くめたひろゆき，しみずかずみ，いしもりこういちろう

そこで本研究では、PCS と EPR を相補的に組み合わせることによって、このような平均化を解消し、常磁性ランタノイドプローブ法を用いた構造アンサンブル解析を目指した。具体的には、マルチドメインタンパク質の異なる二つのドメインに固定した常磁性ランタノイドイオン間の距離とその存在比の情報を EPR 測定により取得し、MESMER プログラム[2]により平均化された PCS を EPR 測定で得られたアンサンブルを構成する成分数とその存在比を基に分割して解析することで、マルチドメインタンパク質の構造アンサンブルの構築を試みた。モデルタンパク質としては、3 個のドメインを有し、ATP や UMA といった基質との結合に伴ってそのドメイン間の相対配置が大きく変化するペプチドグリカン生合成系酵素の MurD を用いた（Fig.1）。まず、MurD のドメイン 2 に対して常磁性ランタノイドイオンである Yb^{3+}を固定することによりドメイン 3 由来の PCS を観測した結果、MurD は基質との結合に伴ってドメイン 3 の配向を大きく変化させることが示された（Fig.2）。次に、ドメイン 2 とドメイン 3 に Gd^{3+}を固定し、MurD の EPR 測定によって Gd^{3+}間の距離とその分布情報を取得したところ、MurD は溶液中で複数の構造アンサンブルとして存在し、基質との結合によりその存在比が変化することが明らかになった（Fig.3）。上記のことから、観測された PCS は溶液中で存在する構造アンサンブルにより平均化された PCS であることが考えられた。

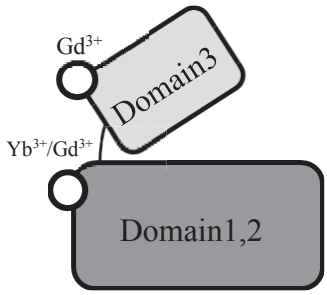


Fig.1 The position of the lanthanide ions fixed on MurD.

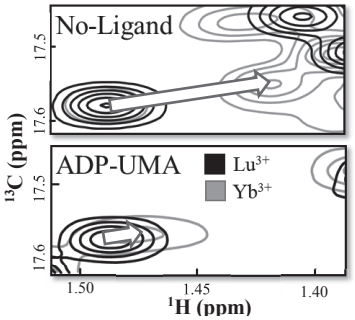


Fig.2 Observed PCS from domain3 with/without ligands.

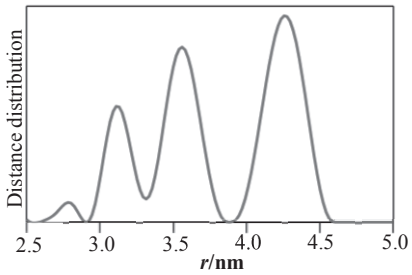


Fig.3 Distribution of the distance between the two Gd^{3+} obtained by EPR experiment.

そこで、はじめに基質非結合状態の MurD について、EPR から得られた距離分布と PCS を組み合わせてアンサンブル解析を行った結果、ドメイン 3 の配向が異なる 3 成分の立体構造が算出された（Fig.4）。算出された 3 成分におけるドメイン 3 の配向状態は、先行研究により明らかにされている open, semi-closed, closed の 3 状態に対応しており、MurD は基質非結合状態においても溶液中で基質結合型を含んだ 3 状態のアンサンブルとして存在することが明らかとなった。以上より、EPR 測定により得られたアンサンブルを構成する各成分の存在比の情報を利用し、平均化された PCS を解析することで溶液中におけるマルチドメインタンパク質の構造アンサンブルを解析可能であることが示された。このことから、これまで平均化された構造情報により決定された立体構造により予測されていたマルチドメインタンパク質の作用機序をより詳細に解析できると期待できる。

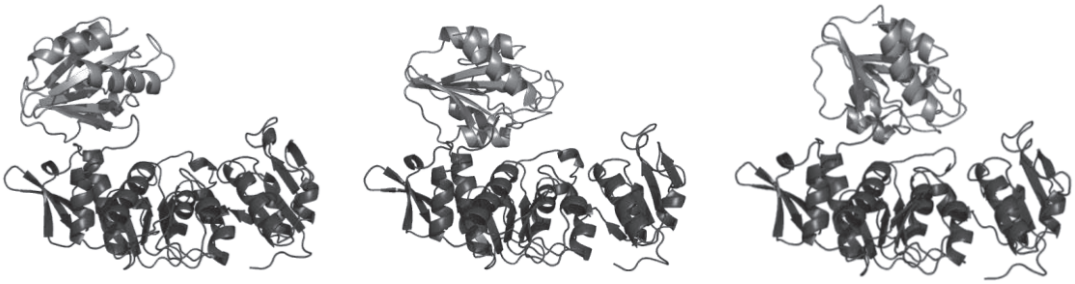


Fig. 4 The best-fitting ensemble determined by MESMER.

References

(1)Jan Philip Wurm *et al.,* (2017) *Proc Natl Acad Sci USA*, 114: 6034-6039

(2)Elihu C. Ihms and Mark P. Foster, (2015) *Bioinformatics*, 31(12), 1951-1958

P29

HP1αのN末端天然変性領域のリン酸化による ヘテロクロマチン形成機構の解析

○古川亜矢子[1], 栗田順一[1], 下條秀朗[1], 中山潤一[2], 西村善文[1]
[1]横浜市立大学・生命医科学研究科
[2]基礎生物学研究所

Heterochromatin formation by the phosphorylated HP1 α N-terminal disordered region

○AyakoFurukawa[1], Junichi Kurita[1], Hideaki Shimojo[1], Jun-ichi Nakayama[2], and Yoshifumi Nishimura[1]
[1] *Graduate School of Medical Life Science, Yokohama City University*
[2] *National Institute for Basic Biology*

The formation of transcriptionally silent chromatin, so called heterochromatin, is critical for genomic stability and cell differentiation. The heterochromatin structure is maintained by a heterochromatin protein 1 (HP1). HP1α, one of the isoforms, is composed of two structured chromodomain (CD) and chromo-shadow domain (CSD), and three disordered N-terminal, linker, and C-terminal regions. CD directly binds to lysine 9 methylated histone H3 (H3K9me3) and CSD can homodimerize. The N-terminal disorderd region has four succesive serin residues, whose phosphoriration enhances the binding to H3K9me3 and the formation of heterochromatin. To reveal the molecular mechanism, we have examined the structural dynamics of HP1α with and without the phosphorylation. First, we have analyzed CD connected to the N-terminal region (NCD). The phosphorylation of NCD reduced dynamics of the N-terminal disordered region without the structural change of CD. Second, we have examined structural changes of the N-terminal and CD regions in the full length HP1α between the phosphorylated and unphosphorylated forms. Interestingly, we have identified the chemical shift changes of the CD moiety between the two forms. This suggests that the linker and CSD regions of the full length of HP1α interact with the CD region upon the N-terminal phosphorylation.

クロマチンの基本構造単位はヌクレオソームである。クロマチンには、ヌクレオソーム間のDNAが緩んでいるユークロマチン構造とヌクレオソーム同士が固まった凝集体のヘテロクロマチン構造が存在する。この2種類のクロマチン構造によって、遺伝子発現の制御が行われている。ヘテロクロマチン形成に関与するヘテロクロマチンタンパク質（HP1)は、クロモドメイン(CD)とクロモシャドードメイン(CSD)から成る。CDがヒストンH3の9番目のリシンメチル化 (H3K9me3)に結合し、CSDが2量化して、ヘテロクロマチン構造を形成する。HP1のホモログであるHP1αは、CDのN末側にリン酸化部位を含む天然変性領域が存在し、リン酸化されるとH3K9me3への結合が強くなることやオリゴマー形成が促進されることによってヘテロクロマチン構造を調節していることが報告されている。そこで、これらの詳細な分子機構を明らかにするために、N末領域のリン酸化の有無によるHP1αの構造変化の解析を行った。我々は既にN末とCDを含んだ領域のみ(NCD)のリン酸化されていない構造(a)とリン酸化された構造(b)を決定している(Fig.1)。

ヘテロクロマチン、リン酸化、動的構造変化

○ふるかわあやこ, くりたじゅんいち, しもじょうひであき, なかやまじゅんいち, にしむらよしふみ

CD領域の構造には全く差がなかったが、リン酸化体のN末領域はリン酸化されていないものに比べてより伸びた構造を取り、しかも{^{1}H}-^{15}N hetero NOE を比較するとリン酸化によりN末領域がより固くなっていた(Fig. 2)。またNCDの化学シフトはリン酸化によりN末領域では大きく変化したが、CD領域ではほとんど変化が無かった(Fig.3の白い棒グラフ)。伸びた構造が実際にH3K9meとどのように相互作用しているかをNMRやMDで解析した結果、HP1 α のリン酸化された領域とヒストンH3K9meの揺らいでいる塩基性領域同士が相互作用している構造が動的に存在した。この揺らいだ紐同士の動的な相互作用が、H3K9me3の結合能の増加に重要である。

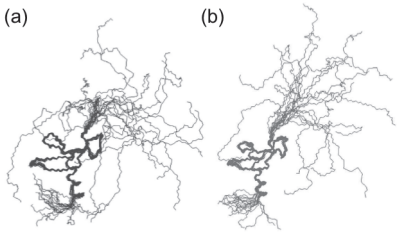


Fig. 1. NMR structures of the unmodified NCD (a) and the phosphorylated NCD (b).

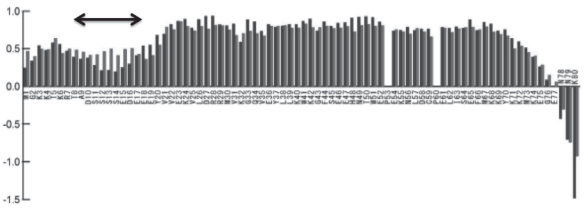


Fig. 2. Comparison of {^{1}H}-^{15}N hetero NOE values between the unmodified NCD (black bar) and the phosphorylated NCD (gray bar).

更にHP1 α 全長で、N末のリン酸化によるN末やCD領域の変化を解析した。リン酸化によるHP1 α 全長の化学シフト変化をFig. 3の黒い棒グラフで示す。全長のN末領域もNCDの時と同様にリン酸化によって大きく変化したが、CD領域の40番付近のいくつかの残基はNCDの時と異なり、全長ではリン酸化により有意な化学シフト変化が見られた。全長ではN末のリン酸化によりリンカー及びCSD領域がCD領域と相互作用している可能性が示唆される。現在、リン酸化によるHP1 α 全長が形成する多量体の相互作用様式を明らかにするために、解析を進めている。

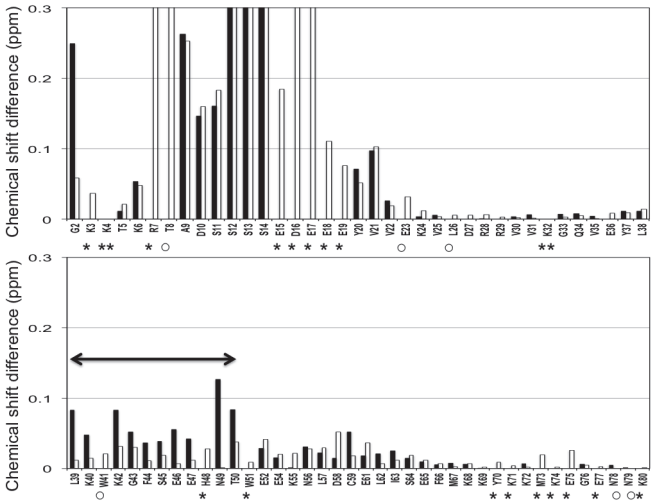


Fig. 3. Comparison of chemical shift differences between the unmodified HP1α and the phosphorylated HP1α (filled bar) and those between the unmodified NCD and the phosphorylated NCD (open bar). Asterisks show unassigned residues and open circles show disappeared residues upon phosphorylation.

References

(1) Shimojo H, Kawaguchi A, Oda T, Hashiguchi N, Omori S, Moritsugu K, Kidera A, Hiragami-Hamada K, Nakayama J, Sato M & Nishimura. (2016) Extended string-like binding of the phosphorylated HP1 α N-terminal tail to the lysine 9-methylated histone H3 tail. *Scientific Reports 6*, 3;6:22527.

P30

マルチドメインタンパク質のドメインダイナミクスが持つ機能上の役割の解明 －SAXSとNMR(RDC/PRE/CSP)による統合的アンサンブル構造解析－

○川嵜 亮祐[1]，Jie-rong Huang[2]，Yun-Tzai Cloud Lee[3]，栃尾 尚哉[4]，
Shang-Te Danny Hsu[3]，楯 真一[1,4]
[1]広島大学・理学研究科・数理分子生命理学専攻
[2]台湾國立陽明大學・生化暨分子生物學研究所
[3]中央研究院・生物化學所
[4]広島大学・クロマチン動態数理研究拠点(RcMcD)

Functional significance of the inter-domain dynamics tethered by intrinsically disordered region (IDR) revealed by the ensemble structure analysis using RDC, PRE, CSP and SAXS

○Ryosuke Kawasaki[1], Jie-rong Huang[2], Yun-Tzai Cloud Lee[3], Naoya Tochio[4], Shang-Te Danny Hsu[3], Shin-ichi Tate[1,4]
[1] *Department of Mathematical and Life Sciences, Graduate School of Science, Hiroshima University*
[2] *Institute of Biochemistry and Molecular Biology, National Yang Ming University*
[3] *Institute of Biological Chemistry, Academia Sinica*
[4] *Research Center for the Mathematics on Chromatin Live Dynamics (RcMcD), Hiroshima University*

Intrinsically disordered regions (IDRs) are easily found in multidomain proteins as tethering them. Peptidyl Prolyl Isomerase, Pin1, is one of them; two functional domains are linked by flexible linker-IDR. We previously revealed substrate binding affinity enhancement mechanism; the substrate is kept by migrating between two functional domains. This mechanism makes us perceive the importance of inter-domain dynamics for protein function. In this study, we corrected inter-domain dynamic conformational information using SAXS and NMR, paramagnetic relaxation enhancement (PRE) and residual dipolar coupling (RDC). According to these experimental data, we determine the dynamic ensemble structure. In this presentation, I discuss the relation between inter-domain dynamics and protein function.

生体内に存在する機能性タンパク質の中には，複数の安定な立体構造を持つ機能性ドメインが，天然変性領域（Intrinsically disordered region, IDR）により繋げられた構造を持つものがしばしば見受けられる．本発表で研究対象としている酵素Pin1も，2つの安定な立体構造を持つ機能性ドメインが，リンカーIDRで繋げられた構造を有している(Figure1)．酵素活性ドメインに比べて基質結合ドメインの結合能がはるかに強いことが分かっている．これらの機能性ドメインがIDRにより繋げられることで，空間的にドメイン同士が近接し，酵素ドメインから基質結合ドメインが基質を奪うことで，結合阻害

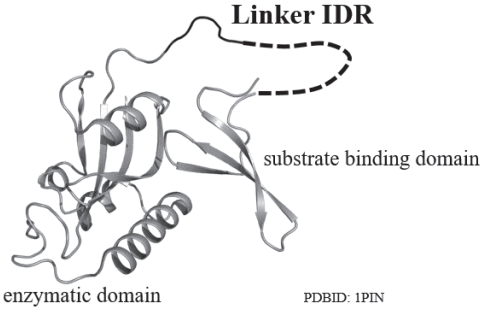


Figure1: Pin1 has enzymatic domain and substrate binding domain, and these are linked by linker IDR.

天然変性領域（IDR），ドメインダイナミクス，統合的アンサンブル構造解析

○かわさき りょうすけ，ジーロン ファン，ユンツァイ“クラウド”リー，とちお なおや，
シャンテ“ダニー”スー，たて しんいち

的に機能するということが直感できる．しかし以前の研究から，基質が2つのドメイン間で相互的に移行し基質を分子内で保持することで，分子全体の結合能を向上させる機構が明らかになった．このことから，柔軟なリンカーIDRで繋げられた2つの機能性ドメインの動的な空間配置が，溶液中で完全にランダムな状態ではなく，リンカーIDRにより動的構造中でも機能的に重要な空間配置を制御していることが示唆された．

そこで本研究では，マルチドメインタンパク質Pin1のドメイン間の動的構造を，NMRを用いた常磁性緩和誘導(PRE) (Figure2)，残余双極子カップリング(RDC) (Figure3)と，小角X線散乱(SAXS) (Figure4)の測定により実験情報を収集し，ランダム構築した構造プールから実験情報に基づいて構造を取捨選択することで，2つのドメイン間の動的アンサンブル構造を決定した[1,2,3].

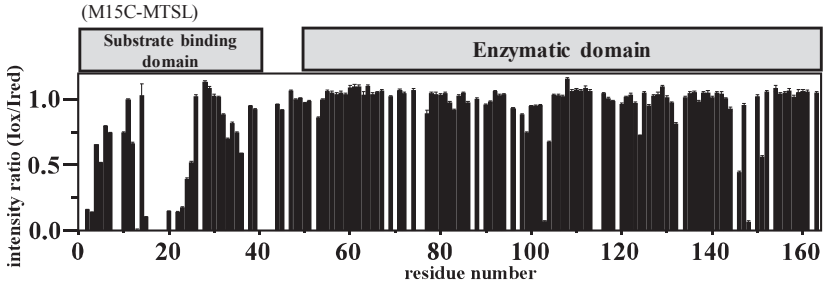


Figure2: PRE measurement

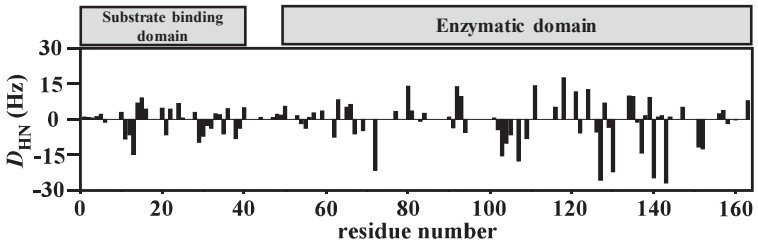


Figure3: RDC measurement

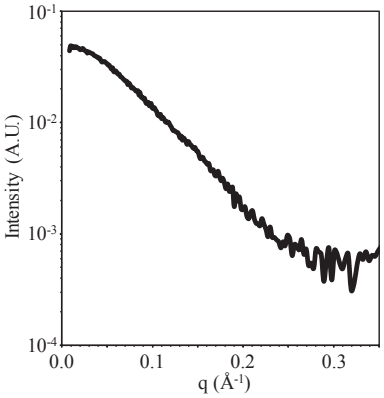


Figure4: SAXS measurement

この結果，安定な立体構造を持たないIDRで繋げられているにも関わらず，2つの機能性ドメインの相対的な空間配置には明らかに複数の局在パターンが見られた．この動的構造中で最適化されている局在パターンが，酵素Pin1の基質結合能や酵素活性を制御していることが考察できる．

発表では，動的アンサンブル構造決定に用いた各種測定の詳細と合わせて，酵素Pin1の動的構造のリンカーIDRによる制御の，タンパク質機能への役割について議論する．

References

[1] Salmon, L., et al., NMR characterization of long-range order in intrinsically disordered proteins. J Am Chem Soc, 2010. 132(24): p. 8407-18

[2] Jensen, M.R., et al., Exploring free-energy landscapes of intrinsically disordered proteins at atomic resolution using NMR spectroscopy. Chem Rev, 2014. 114(13): p. 6632-60.

[3] Nodet, G., et al., Quantitative description of backbone conformational sampling of unfolded proteins at amino acid resolution from NMR residual dipolar couplings. J Am Chem Soc, 2009. 131(49): p. 17908-18.

P31

レアアースイオン鉱物化ペプチドアプタマーのNMR解析

○松上明正[1]，畠中孝彰[2]，石田亘広[2]，林文晶[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豊田中央研究所・戦略研究部門

NMR analysis of peptide aptamers that mineralize rare earth ions

○Akimasa Matsugami[1], Takaaki Hatanaka[2], Nobuhiro Ishida[2], Fumiaki Hayashi[1]
[1] *Division of Structural and Synthetic Biology, RIKEN Center for Life Science Technology*
[2] *Strategic Research Division, TOYOTA Central R&D Labs Inc.*

Living organisms ingest metal or metal compounds and build organic/inorganic composite structures under low-energy conditions. This unique phenomenon is called Biominerarization, and teeth, bone, and pearls are known as its representative. Recently, the increasing demand for rare earth (RE) elements in advanced materials for permanent magnets, rechargeable batteries, catalysts and lamp phosphors necessitates environmentally friendly approaches for their recovery and separation. We found the RE mineralized peptide aptamer under low-energy conditions. In this study, we analyzed the RE ion recognition/mineralization mechanism of the peptide aptamer using NMR.

現代の社会において、レアアースは先端材料に必要な貴重な金属資源である。例えば永久磁石やバッテリーや光触媒など自動車や携帯電話のような身の回りの製品にレアアースを用いて作られた高性能部品が利用されている。しかし、ランタノイドに属するレアアースはどの金属も化学的性質が似ている為、分離回収には課題が存在する。一方で自然環境下には、様々な金属イオンから特定のイオンのみを選択的に認識して回収し材料化する能力を有した生物機能が存在していることが知られている。本現象は生物鉱物化（バイオミネラリゼーション）と呼ばれ、自然界では真珠・貝殻・骨・歯などがその例として知られている。我々は、永久磁石に活用されているネオジム・ジスプロシウムをターゲットに、バイオミネラリゼーションを着想とした新しい金属回収コンセプトを考えた。

全ての金属イオンは水溶液中において、イオンと水酸化物の平衡状態をとる。我々は、水酸化物に結合するペプチドが、溶液中の金属イオンを水酸化物化し、沈降できると考えた（図1A）。そこで、環状ペプチドライブラリ（10^7種以上）を T7ファージディスプレイにて構築し、表面が水酸化されたランタノイド酸化物ナノ粒子への結合を指標に、バイオパンニングによってペプチドを選抜した。選抜ペプチド（ペプチドアプタマー）を ランタノイド水溶液に添加すると、直後に白濁化し粒子の生成を確認した。本現象は、ターゲットランタノイドイオンを添加した模擬海水のようなマイルドな条件においても選択的な反応が確認された。

得られたペプチドアプタマーは特別な何かを加えることなくマイルドな条件下でランタノイドを鉱物化させるところがユニークな新規的特徴である。この反応過程において、ペプチドアプタマーはランタノイドイオンを認識した上で、ランタノイド水酸化物を安定化させ沈殿を生じさせる。その為、そのままの溶液条件下では全体の反応機構を調べることが出来なかった。そこで、我々はこの2つの反応機構を調べるために、ランタノイドイオンとの相互作用については水溶液

ペプチドアプタマー，レアアース，バイオミネラリゼーション

○まつがみあきまさ，はたなかたかあき，いしだのぶひろ，はやしふみあき

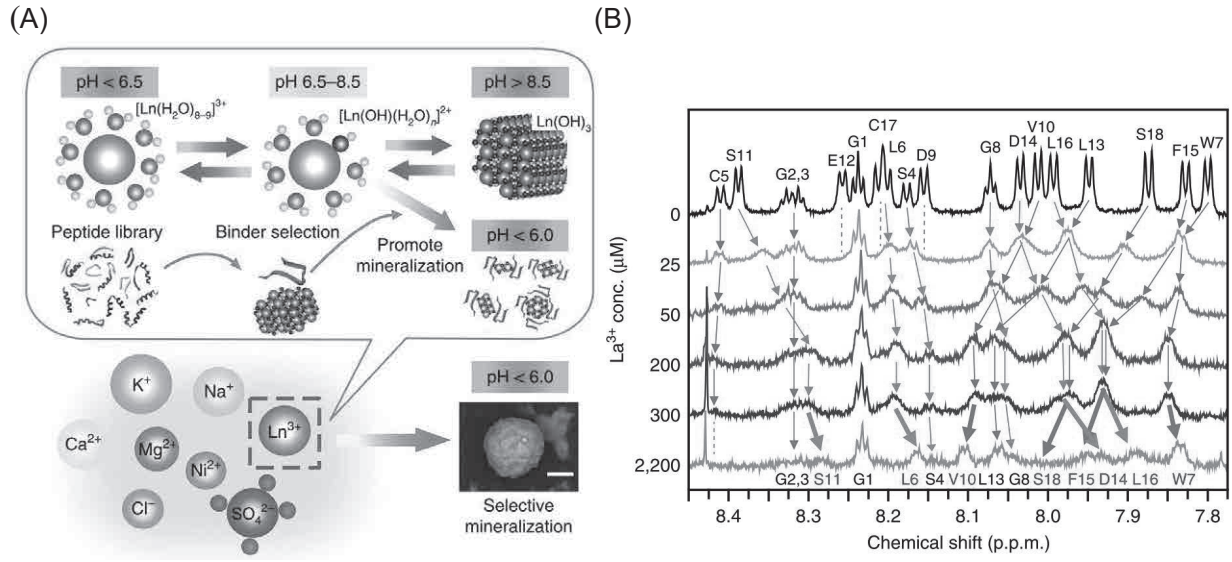


Fig. 1. (A) Schematic illustration of peptide-based selective mineralization. (B) ^{1}H NMR titration spectrum of peptide-aptamer adding La ions.

条件下で解析し（図1B）、ランタノイド水酸化物との相互作用については、ランタノイド水酸化物―ペプチドアプタマー複合体沈殿を有機溶媒にて可溶化させることにより解析した。その結果、ペプチドアプタマー中に含まれる酸性アミノ酸が、レアアースイオンの認識・水酸化物形成に重要な役割を担っていることが分かった[1]が、イオンの結合によりペプチドの構造も変化してしまうため、両者の効果が共存し、結合部位の詳細な相互作用様式の解明には至らなかった。そこで、様々なランタノイドイオンを用いて、その常磁性効果の違いを利用することでより詳細な相互作用機構についてNMR法で調べることを試みた。また有機溶媒で可溶化した沈殿は立体構造を形成することが分かった。現在、沈殿可溶化物の構造解析を進めており、ランタノイド水酸化物の相互作用機構や沈殿形成（鉱物化）メカニズムについて立体構造からの面と合わせて議論を行いたい。

今回、生命の保有する選択的なメタル認識を着想としたコンセプトで、レアアースイオンを選択的に鉱物化するペプチドを見出した。今回の知見は、自然環境における低品位のレアアースイオンであっても、マイルドな条件で直接回収できる可能性を示している。また、提案するコンセプトを活用することで、他の遷移金属イオンへの展開も期待できる。

Reference

(1) Hatanaka T, Matsugami A, Nonaka T, Takagi H, Hayashi F, Tani T, Ishida N. (2017) Rationally designed mineralization for selective recovery of the rare earth elements. *Nature Communications, 8*;15670.

P32

アポミオグロビンの折り畳み中間体の解析

○西村千秋[1]
[1]帝京平成大学・薬学部

Structure of the folding intermediate of apomyoglobin monitored by quench-flow and NMR: Comparison of the intermediate structure and folding rate among apomyoglobin mutants

○Chiaki Nishimura[1]
[1] *Faculty of Pharmaceutical Sciences, Teikyo Heisei University, Tokyo, Japan*

During the slow folding of apomyoglobin from the unfolded state to the native state, there is the kinetic folding intermediate. The structure of the burst-phase intermediate was analyzed by HD exchange pH-pulse labeling strategy followed by NMR detection. The kinetics of the apomyoglobin folding was monitored by the stopped-flow CD. Both the kinetics and the shape of the intermediate were changed by the mutations. The B-helix stabilized mutants (G23A/G25A, H24L/H119F) exhibited faster folding and more native-like intermediate than wild-type, whereas the F-helix stabilized mutant (P88K/A90L/S92K/A94L) indicated slower folding. In the latter case, it is possible that the intermediate structure was too stabilized compared to the native structure. The mechanism and kinetics of apomyoglobin folding will be discussed.

アポミオグロビンは典型的なヘリックス蛋白質であり(図1)、その折り畳み研究は長期間行われてきた。折り畳み中間体が存在し、その中間体はNMRと組み合わせたHD交換やクエンチフローの方法により主にヘリックスAGHでバースト相で構成されることが示されてきた。さらに種々の変異体を作成して、変異による中間体構造の変化を調べてきた。特にBヘリックスのI28、L29、I30、L32の疎水性アミノ酸のアラニン変異体では、それぞれ異なる変化が観測され、特にL32AではGヘリックスとのネーティブ様の相互作用が中間体で観測された。またL29AにおいてはBとEヘリックス間のノンネーティブな相互作用が中間体に存在した。一方、中間体の構造はファールディング速度に大きな影響を与えると考えられるが、I28AやL72Aなどは折り畳み速度を大きく減少させた。これらの疎水性残基が中間体から天然状態への折り畳みに重要だと考えられる。

本研究では，中間体に存在する非天然状態様の構造を考えるとともに、その構造と折り畳みの速さの関係を調べ、さらにヘリックスの構造形成順を議論する。

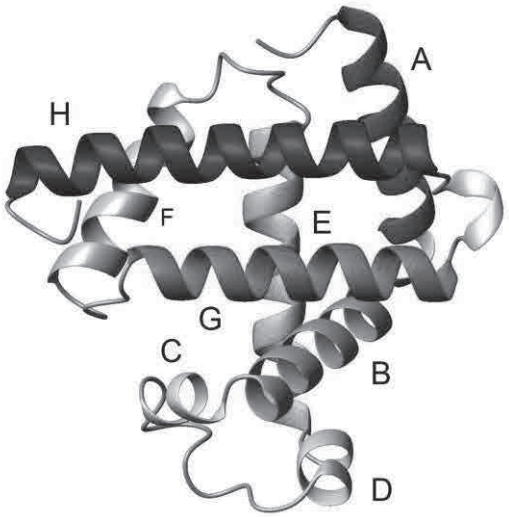


Fig. 1. Helical structure of apomyoglobin (1mbc.pdb).

過渡的中間体，pHパルスラベル，蛋白質の構造形成

○にしむらちあき

ヘリックスの折り畳みの順番性：自家製のミキサーを用いたところ、実験に要する最短の折り畳み時間を6ミリ秒から400マイクロ秒に短縮できた。新装置により、ヘリックスABGHの中でも、ヘリックスAGの折り畳みが速いように観測された。さらに他のグループの結果より、Gヘリックスが最も折り畳み初期の段階から安定であるように見られた。一方、Bヘリックス安定化変異体の結果より、ヘリックスABGHの次にはヘリックスEが折りたたまれる可能性が考えられた。

Table 1: Native-like and non-native structure in the folding intermediate of apoMb

Mutants	Folding rates (I to N)	Stabilized (helix, turn)	Destabilized (helix)
G23A/G25A	Fast	B,GH (Native-like)	
H24L/H119F	Fast	B,GH,E(Native-like)	
H64F	Fast	E (Native-like)	
I30A	Fast	B-C (Native-like)	
L32A	Fast		B-G (Native-like)
P88K/S92K	Slow		
P88K/A90L/S92K/A94L	Slow	F, GH(Non-native)	B (E)
I28A	Slow		B
L69A	Slow		E
L72A	Slow		E
V10A	Slow		A-H (Non-native)
L29A	Medium	E (Non-native)—	B (Non-native)—
L115A	Medium		G-H (Non-native)
	Distance (I to N)		
W14-AEDANS140	DistanceA-H (Non-native)		
W14-C135	DistanceA-H (Non-native)		

折り畳み速度と中間体の構造の相関：Bヘリックス安定化変異体と、Eヘリックスのヘムの結合に重要なdistal ヒスチジン64の変異は、折り畳みを加速させた。またBヘリックスのI30AとL32Aも折り畳みを加速させたが、これら5つの変異体において、中間体の中に天然状態様の構造が観測された(表1、文献1)。一方、折り畳みが遅くなったものには、P88K/A90L/S92K/A94LのFヘリックス安定化変異体の他にI28AとV10Aなどが存在した。これらの中には中間体状態においてノンネーティブな構造が観測されるものがあった。またFRETやシステインクエンチも距離情報を提供した。

Reference

(1) Nishimura, C. (2017) Folding of apomyoglobin: Analysis of transient intermediate structure during refolding using quick hydrogen deutrium exchange and NMR. *Proc. Jpn. Acad., Ser. B* **93**, 10–27.

P33

H2A-H2B dimerとヌクレオソーム中のH2A-H2BのNMR研究

○大友秀明[1]，山根努[1]，池口満徳[1]，森脇義仁[1]，栗田順一[1]，有村泰宏[2]，
胡桃坂仁志[2]，西村善文[1]
1横浜市立大学生命医科学研究科
2早稲田大学大学院先進理工学研究科

NMR studies on H2A-H2B heterodimer in nucleosome and its isolated form

○Hideaki Ohtomo[1], Tsutomu Yamane[1], Mitsunori Ikeguchi[1], Yoshihito Moriwaki[1], Jun-ichi Kurita[1], Yasuhiro Arimura[2], Hitoshi Kurumizaka[2], Yoshifumi Nishimura[1]
[1] *Graduate School of Medical Life Science, Yokohama City University*
[2] *Graduate School of Advanced Science and Engineering, Waseda University*

The fundamental unit of the chromatin is the nucleosome, in which about 146 base pair DNA wraps around histone octamer consisting of two H2A-H2B heterodimers and one H3-H4 tetramer. Each of H2A, H2B, H3 and H4 has functionally important disordered tails. In the crystal structure of the nucleosome, these disordered tails are invisible. We have investigated the solution structure and dynamics of the isolated H2A-H2B heterodimer by using NMR. The chemical shift indices show that both histone folds of H2A and H2B in the isolated H2A-H2B heterodimer correspond well to those in the nucleosome, however α_N helix, β_3 strand and 3_{10} helix found in the nucleosomal H2A are disordered in the isolated H2A-H2B. Additionally, H/D exchange, fast hydrogen exchange, and hetero-nuclear NOE experiments on the isolated H2A-H2B indicated that the disordered tails of H2A and H2B were not completely random coil. We have also investigated the dynamics of H2A and H2B in the nucleosome by using NMR and have observed the signals of tail regions, which were invisible in the crystal structure of the nucleosome.

クロマチンの最小構造単位であるヌクレオソームは、4種類のヒストンタンパク質(H2A, H2B, H3, H4)がそれぞれ2分子ずつ会合したヒストン8量体の周りに約146bpのDNAが巻き付いた構造体である[1]。H2A-H2Bヘテロダイマーは、溶液中で安定であり、ヒストンシャペロンなどの分子と複合体を形成する。H2AはN末端とC末端、H2BはN末端にヒストンテールと呼ばれる天然変性領域を持ち、これらはリン酸化、アセチル化などの修飾を受けて機能的に重要な役割を果たす[2]。しかしながら、結晶構造中ではヒストンテールのほとんどは見えない。

本研究はNMRを用いてH2A-H2Bヘテロダイマーの溶液構造とダイナミクスを調査した[3]。化学シフトインデックスは溶液中のH2A-H2Bヘテロダイマーがヌクレオソーム中のH2A-H2Bとほぼ同様の二次構造であることを示した。一方、ヌクレオソーム中のH2Aに見られるN末端領域のα_N、C末端領域のβ_3と3_{10}は、H2A-H2Bヘテロダイマーには見られなかった。この結果は、これらの構造はヌクレオソーム中のDNAまたは他のヒストンとの相互作用によって安定化されていることを示す。CS-Rosettaを用いてH2A-H2Bの溶液構造を決定し、H2A-H2Bヘテロダイマーがヌクレオソーム中のH2A-H2Bと同様の構造であることを明らかにした(Fig. 1)。

ヌクレオソーム，H2A-H2B

○おおともひであき，やまねつとむ，いけぐちみつのり，もりわきよしひと，くりたじゅんいち，ありむらやすひろ，くるみざかひとし，にしむらよしふみ

H/D交換、HET^{ex}実験により、H2A-H2Bヘテロダイマーのコア領域は主鎖のNHと溶媒の水との交換が遅く、固い構造であることが示された。一方、テール領域は全体的に交換が速く、フレキシブルな構造であることが示された。ただし、局所的にはテール領域にも交換が比較的遅い領域があることが示された。hetero-nuclear NOE実験でも同様に、H2A-H2Bヘテロダイマーのコア領域は固い構造である一方、フレキシブルなテール領域の中に若干固い領域が見られ、H2A-H2Bヘテロダイマーのテール領域は完全なランダムコイルではないことが示された。

さらに、我々はH2A-H2Bをラベルしたヌクレオソームを調整し、NMR実験を行った。H2AについてはMet0-Gly8とThr120-Lys129、H2BについてはMet0-Lys27のシグナルをアサインすることができた。アサインした領域は結晶構造では構造が見えない領域のほとんどをカバーしており、新たな重要な知見である。化学シフトインデックスにより、これらの領域には二次構造は形成されていない。またHET^{ex}実験により、ヌクレオソーム中のH2A-H2Bのテール領域のNHと水との交換速度は、ヘテロダイマーの状態よりも明らかに小さくなっていた(Fig. 2)。この結果は、ヌクレオソーム中では、H2A-H2Bのテール領域がDNAと相互作用しているため、主鎖のNHと水との交換速度が遅くなったことを示唆する。

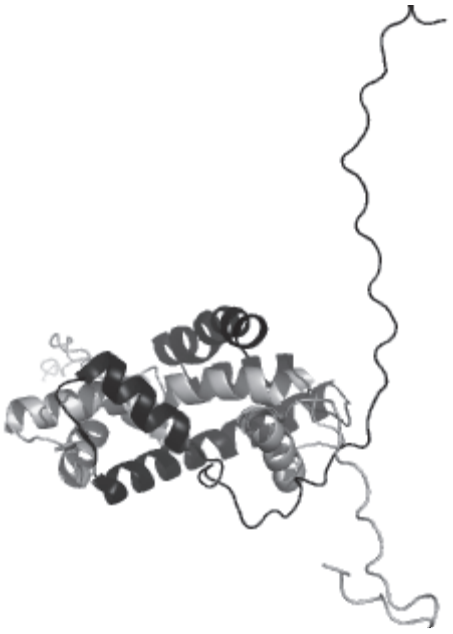


Fig. 1 CS-Rosetta structure of the isolated H2A-H2B. The structure with the lowest CS-Rosetta energy score of core region. H2A and H2B are shown in gray and black, respectively.

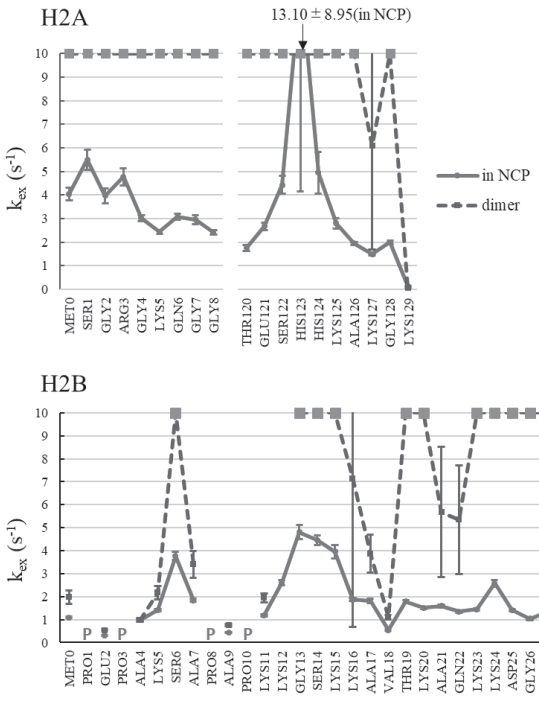


Fig. 2 Fast exchange of H2A-H2B in nucleosome and the isolated H2A-H2B dimer. Solid line and break line show the exchange rates of H2A-H2B in the nucleosome and the isolated H2A-H2B, respectively. Squares indicate the faster exchange rate. The exchange rates obtained by HETex-BEST-TROSY.

References

(1) Luger, K. Structure and dynamic behavior of nucleosomes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 13, 127–135 (2003).

(2) Downs, J. A., Nussenzweig, M. C. & Nussenzweig, A. Chromatin dynamics and the preservation of genetic information. *Nature* 447, 951–958 (2007).

(3) Yoshihito Moriwaki, Tsutomu Yamane, Hideaki Ohtomo, Mitsunori Ikeguchi, Jun-ichi Kurita, Masahiko Sato, Aritaka Nagadoi, Hideaki Shimojo & Yoshifumi Nishimura. Solution structure of the isolated histone H2A-H2B heterodimer. *Sci. Rep*. 6, 24999 (2016).

P34

タンパク–タンパク相互作用ネットワークにおけるハブタンパクの結合様式の解明

○奥田昌彦[1]，西村善文[1]
1横浜市立大学大学院・生命医科学研究科

Elucidation of the binding mode of a hub protein in protein–protein interaction networks

○Masahiko Okuda[1], Yoshifumi Nishimura[1]
[1] *Graduate School of Medical Life Science, Yokohama City University*

A protein with many interaction partners, which plays central roles in protein–protein interaction networks, is called a hub protein. p62 protein, a subunit of the general transcription factor TFIIH, is one of the hub proteins. TFIIH is a 10 subunit complex and functions not only in transcription, but also in DNA repair and cell cycle. The plekstrin homology (PH) domain of p62 is responsible for recruiting TFIIH into transcription start sites and DNA damaged sites by specifically interacting with intrinsically disordered acidic regions of transcription and DNA repair factors such as TFIIEα, p53 and XPC. In this study, we revealed the molecular mechanism of the malleable and specific binding of the p62 PH domain based on the structures of complexes. Furthermore, we successfully identified a new target of the p62 PH domain, the G_1/S cell cycle controlling transcription factor DP1 based on our common structural principle for the recognition of the p62 PH domain and determined the complex structure of DP1 and the p62 PH domain.

基本転写因子TFIIHは10個の異なるサブユニットから成る複合体で，転写のみならずDNA修復や細胞周期にも関与する多機能タンパクである．転写開始部位やDNA損傷部位へのTFIIHのリクルートは，主にp62サブユニットのプレクストリン相同(PH)ドメインと標的タンパクとの相互作用を通じて行われる．我々は，なぜp62 PHドメインが多数の標的タンパクとしかも特異的に結合できるのか，相反する特性がどのように実現されるのかに興味を持ち，複合体構造を通じてその認識機構を明らかにした．p62のようなタンパク–タンパク相互作用ネットワークのハブとしての役割をもつタンパクの認識機構の解明は，生体内で構築される高度に複雑なネットワーク理解への一助となる．

転写開始において，TFIIHはp62 PHドメインと基本転写因子TFIIEαの酸性ドメインとの相互作用により転写開始部位にリクルートされる．TFIIEαの酸性ドメインは，構造を有するコアの部分とそのN末端に酸性アミノ酸に富んだ天然変性領域から構成される．複合体構造から，コアも結合に付加的に寄与するが主要な相互作用はN末天然変性領域で行われていることが分かった(1) (Fig. 1a).

p62 PHドメインは転写調節因子の転写活性化ドメインとも結合する．腫瘍抑制因子p53の転写活性化ドメインとの結合は弱いが，p53の2残基が特異的にリン酸化されると結合は約25倍強くなる(2,3)．p53の転写活性化ドメインは天然変性領域にありハブとして様々なタンパクと結合する．これまでに多くの複合体構造が解かれ全てにおいてp53は両親媒性ヘリックスを形成していたことから，結合に共役したヘリックス形成がp53の結合様式であると考えられてきた．解析さ

タンパク–タンパク相互作用，タンパク複合体，天然変性

○おくだまさひこ，にしむらよしふみ

れた中にはヒトp62の酵母ホモログTfb1のPHドメインとの複合体も含まれる．驚くべきことに，ヒトp62 PHドメインとの複合体ではp53はヘリックスを形成せず紐のように伸びたコンフォメーションで結合していた(2) (Fig. 1b) ．

紫外線照射等でDNAが損傷すると，修復因子がそれを感知し直ちに修復が開始される．XPCはヌクレトチドに入った傷を見つけた後，除去修復に必要なTFIIHをリクルートする．この時，XPCは酸性アミノ酸を多く含む天然変性領域でp62 PHドメインと結合するが，どのようにお互いを認識するのかは不明であった．酵母ホモログの構造は既に解かれていたが，我々が決定したヒトの複合体構造から，ヒトと酵母では結合様式が大きく異なることが分かった(4,5) (Fig. 1c) ．

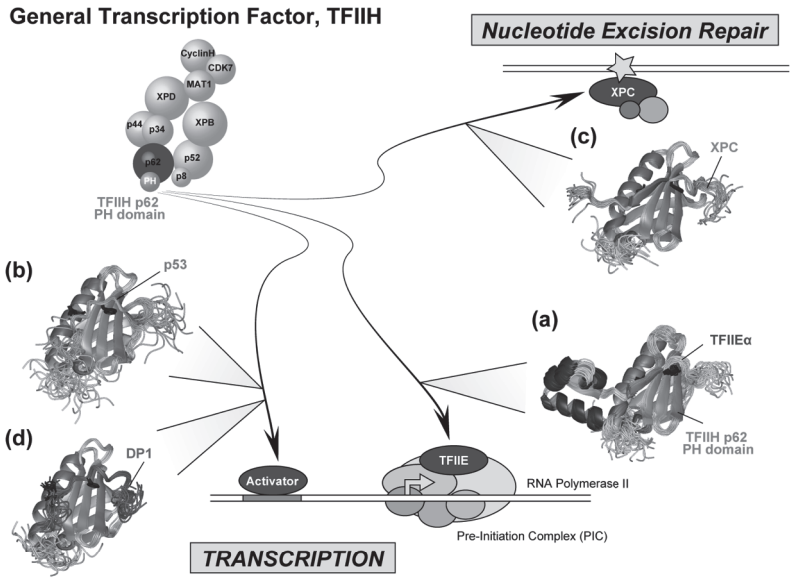


Fig.1 Hub protein, the general transcription factor TFIIH p62

p62 PHドメインとその標的タンパクの3つの複合体構造から興味深い次の共通結合様式が見出された．1) 標的タンパクの結合部位は天然変性領域に存在し，伸びた紐のようなコンフォメーションでp62 PHドメインと結合する．2) 標的タンパクの多くの酸性アミノ酸がp62 PHドメインの溶媒露出した塩基性表面と広範囲に静電気的相互作用する．3) 標的タンパクの酸性アミノ酸に挟まれたフェニルアラニン，あるいはトリプトファンのp62 PHドメインのポケットへの挿入が，特異的結合に必須である(6) ．これら知見を利用しp62 PHドメインの未知の標的タンパクを探索したところ，細胞周期(G_1/S期)の制御に重要な転写因子DP1が候補に挙がった．DP1はE2F1とヘテロ2量体を形成して機能する．TFIIHはE2F1の転写活性化ドメインと結合する報告がある一方で，p62 PHドメインの結合領域に推定されたDP1のC末領域の役割は不明であった．NMRやITCによる結合実験の結果から，p62 PHドメインはDP1と推定結合領域で特異的に結合することが分かり，その複合体の構造を決定した(7) (Fig. 1d)．この構造から結合の強さに大きく影響する新たな構造要因が明らかとなった．

References

(1) Okuda M., Tanaka A., Satoh M., Mizuta S., Takazawa M., Ohkuma Y. and Nishimura Y. (2008) *EMBO J.* 27, 1161–1171.

(2) Okuda M. and Nishimura Y. (2014) *J. Am. Chem. Soc.*, 136, 14143–14152.

(3) Okuda M. and Nishimura Y. (2015) *Oncogenesis* 4, e150.

(4) Okuda M., Kinoshita M., Kakumu E., Sugasawa K. and Nishimura Y. (2015) *Structure*, 23, 1827–1837.

(5) Okuda M. and Nishimura Y. (2016) *Data Brief*, 6, 571–577.

(6) Okuda M., Higo J., Komatsu T., Konuma T., Sugase K. and Nishimura Y. (2016) *Biophys J.* 111, 950–962.

(7) Okuda M., Araki K., Ohtani K. and Nishimura Y. (2016) *J. Mol. Biol.*, 428, 4993–5006.

P35

溶液NMRを用いたlncRNA結合タンパク質SHARPの構造解析

○永井　敢[1]，小林　彩保[1]，伊藤　隆[1]，三島　正規[1]
[1]首都大学東京　理工学研究科

Structural studies of the lncRNA-binding protein SHARP by solution NMR

○Kan Nagai[1], Ayaho Kobayashi[1], Yutaka Ito[1] and Masaki Mishima[1]
[1]Graduate School of Science and Engineering, Tokyo Metropolitan University

SHARP (SMRT/HDAC1-associated repressor protein), a transcriptional co-repressor, which possesses N-terminal RNA recognition motifs (RRMs) and a highly conserved C-terminal domain, SPOC domain. The RRM domains of SHARP is known to bind a lnc (long nonconding) RNA, SRA. Meanwhile, SPOC domain binds to SMRT, a component of HDAC (histone deacetylase complex) . Previously, we reported that the tertiary structure of the SPOC/phosphorylated SMRT complex[1)]. We also found that the interaction is phosphorylation dependent[1)]. Recently, it has been reported that SHARP binds to the lncRNA XIST RNA which is an essential factor for dosage compensation [2)3)]. Crystal structure of the RRM2-3-4 of SHARP was already reported[4)], but structure of the RRM1 and SHARP/Xist complex was not reported. To reveal the molecular recognition of Xist by SAHRP, we try to determine the SHARP/Xist complex.

序論

ヒトSHARP (SMRT/HDAC associated repressor protein) は、N末端側に4つのRRMドメインとC末端側にSPOCドメインを持つ。N末端領域のRRMドメインで長鎖ノンコーディング (lnc) RNAであるSRA（steroid hormone receptor RNA activator）と結合し、一方、C末端のSPOCドメインでは、HDAC (histone deacetylase complex) に含まれるSMRT (silencing mediator of retinoic and thyroid hormone receptors) と直接相互作用することで、HDACをリクルートし、転写が抑制される。我々は現在までにこのSPOCドメインとリン酸化されたSMRTとの複合体の立体構造を決定し、その結合がリン酸化依存的であることを報告している[1)]。

大変興味深いことに、ごく最近、SHARPがlncRNAであるXist RNAと直接相互作用し、HDACをリクルートすることが明らかになった[2)3)]。さらに、SHARPのホモログであるRBM15 (RNA binding motif protein 15) もXistを介した遺伝子抑制に必要な因子であると報告された[4)]。Xistは哺乳類における遺伝子量補正に必須のlncRNAであり、カウンターパートとの複合体の構造解析は、生物学的に極めて重要である。SHARPのRRMドメインについては、RRM2-4単独の結晶構造が報告されているが[5)]、本研究では、SHARPやRBM15とXist RNA複合体の立体構造解析によって、SHARP及びRBM15とXist RNAの相互作用の分子基盤を明らかにする。

参考文献

1) Mikami S. *et al.*, *Structure* 2014, 22, 35-46, 2) McHugh CA. *et al.*, *Nature* 2015, 521, 232-6, 3) Chu C. *et al.*, *Cell* 2015,161, 404-16, 4) Benoit M. *et al.*, *Cell Reports* 2015, 12, 562-572, 5) Arieti F. *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 2014 42, 6742-6752

溶液NMR, マルチドメインタンパク質, lncRNA

○ながいかん、こばやしあやほ、いとうゆたか、みしままさき

実験

大腸菌の発現系を用いて SHARP の 4 つの RRM やタンデム領域の発現、精製を行った。NMR を用いて化学合成によって調製された Xist RNA の A-repeat との結合実験を行った。また、現在までに相互作用解析、立体構造解析の報告のない RRM1 については、試料調製と各種多次元 NMR 測定を行い、CYANA による立体構造解析を行った。結晶構造の報告はある RRM2-4 については現在、RNA との相互作用解析に向けて NMR による主鎖、側鎖シグナルの帰属を行っている。RBM15 に関しては各 RRM ドメインの発現系の作成と NMR 測定に向けた試料調製を行っている。

結果・考察

【SHARP RRM ドメインと Xist RNA の相互作用解析】

NMR を用いて化学合成によって調製された Xist RNA の A-repeat と SHARP RRM1、RRM2、RRM2-4、RRM3-4 について結合実験を行った。その結果、RRM2 では fast exchange、RRM2-4 と RRM3-4 については intermediate に近いシグナルの変化が観測されている(Fig.1)。しかしながら、RRM2-4 と RRM3-4 については RNA の添加に依存して、試料の凝集が起きた。この実験からは RRM2-4 の領域で Xist RNA と結合していることが示唆された。

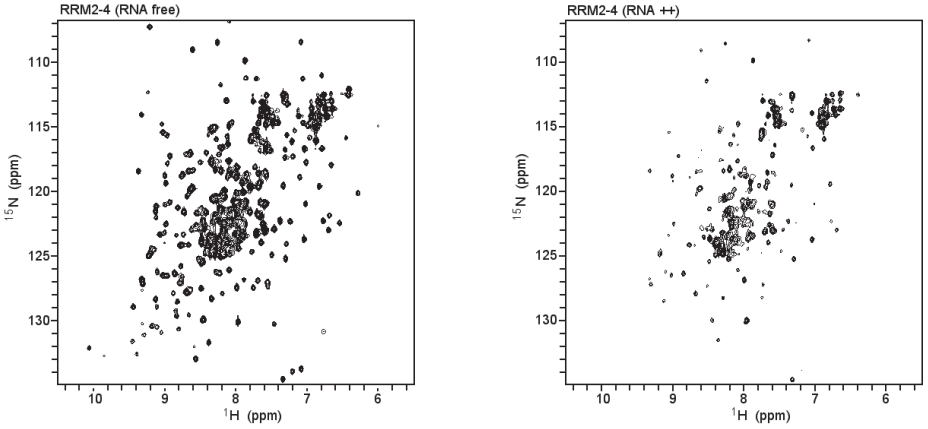


Fig.1

The ^{1}H-^{15}N HSQC spectra RRM2-4

The spectra of RNA-free and 2-fold excess unlabeled RNA are shown in left and right, respectively.

【SHARP RRM2-3 主鎖シグナル帰属】

RRM2-3 については RNA との詳細な相互作用解析に向けて、3D HNCACB、CBCA(CO)NH、 HN(CA)CO、 HNCO を測定し、主鎖シグナルの帰属を行った。90%以上のシグナルの帰属に成功した(Fig.2)。今後、Xist RNA と結合実験を行っていく。

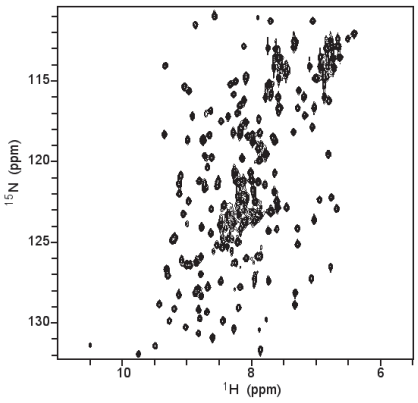


Fig.2

Signal assignments of SHARP RRM2-3

0.5 mM ^{15}N, ^{13}C SHARP RRM23 303 K 600 MHz
50 mM K-phosphate, 50 mM KCl, 1 mM TCEP

【RBM15 RRM ドメインの発現・精製】

RBM15 は N 端側に 3 つの RRM ドメインを持っている。その RRM ドメインについて、pColdI ベクターを用いて His タグと SUMO タグを組み込んで RRM1、RRM2、RRM3、RRM1-2、RRM2-3 及び RRM1-3 の領域の発現系の作成を行った。現在までに、RRM1、RRM2 及び RRM1-3 のコンストラクトにおいて NMR 測定に向けて ^{15}N 標識試料の調製を行った。その結果、RRM1-3 は SUMO タグを切断した段階で試料が凝集してしまったため NMR 測定には至らなかった。RRM1 に関しては試料の調製に成功し、^{1}H-^{15}N HSQC 測定を行ったところ分離の良いスペクトルを得ることができた。今後、残りのコンストラクトにおいても試料の調製を行っていく。また、RNA との結合実験を行っていく。

P36

藍色細菌 *Anabaena variabilis* 由来低温耐性タンパク質 RbpD の多次元 NMR 分光法による構造機能相関解析

○田中邑樹[1], 佐藤直樹[2], 林秀則[3,4], 森田勇人[1]
1 城西大学大学院理学研究科
2 東京大学大学院総合文化研究科広域科学専攻・生命環境科学系
3 愛媛大学プロテオサイエンスセンター
4 愛媛大学理学部化学科

Structural studies of the cyanobacterial RNA-binding protein, RbpD, from *Anabaena variabilis*

○Yuuki Tanaka[1], Naoki Sato[2], Hidenori Hayashi[3],[4], Eugene Hayato Morita[1]
[1]Graduate Scool of Science, Josai University (corresponding; Eugene Hayato Morita),
[2]Graduate School of Arts and Sciences, University of Tokyo
[3]Proteo Science Center, Ehime University,
[4]Gradate School of Science and Engineering, Ehime Unviersity

RbpD in *Anabaena variabilis* is a member of the small RNA-binding proteins containing a single RNA recognition motif (RRM). In *Anabaena variabilis*, low temperature induces the expression of rbp genes with the exception of rbpD gene. On the structural point of view Rbps other than RbpD consist of RRM and C-terminal glycine-rich domain. On the other hand, RbpD only contains RRM. To clear the functional differences between RbpD and other Rbps, in this study, we analyzed the solution structure of RbpD with heteronuclear multidimensional NMR spectroscopy. This study will also clear the relationship between the structure and the function of RRM domain.

藍色細菌 *Anabaena variabilis* の RbpD は、一つの RNA -recognition motif (RRM)を持つ RNA 結合タンパク質に属している。RbpD を除く *Anabaena variabilis* の *rbp* 遺伝子群は低温ストレスによって発現が誘導される。それらの Rbp は RRM と C 末端領域のグリシンに富んだドメインで構成されているが、RbpD は唯一 RRM のみを有する構造上の特徴がある。藍色細菌の RNA 結合タンパク質 RbpD と他の Rbp での機能の違いを明らかにするため、物理化学的手法や生化学的手法による分析と溶液構造の比較で解析することが必要となる。

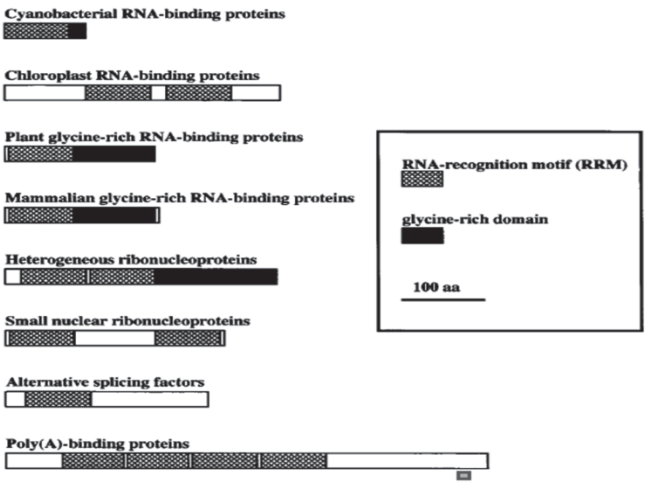


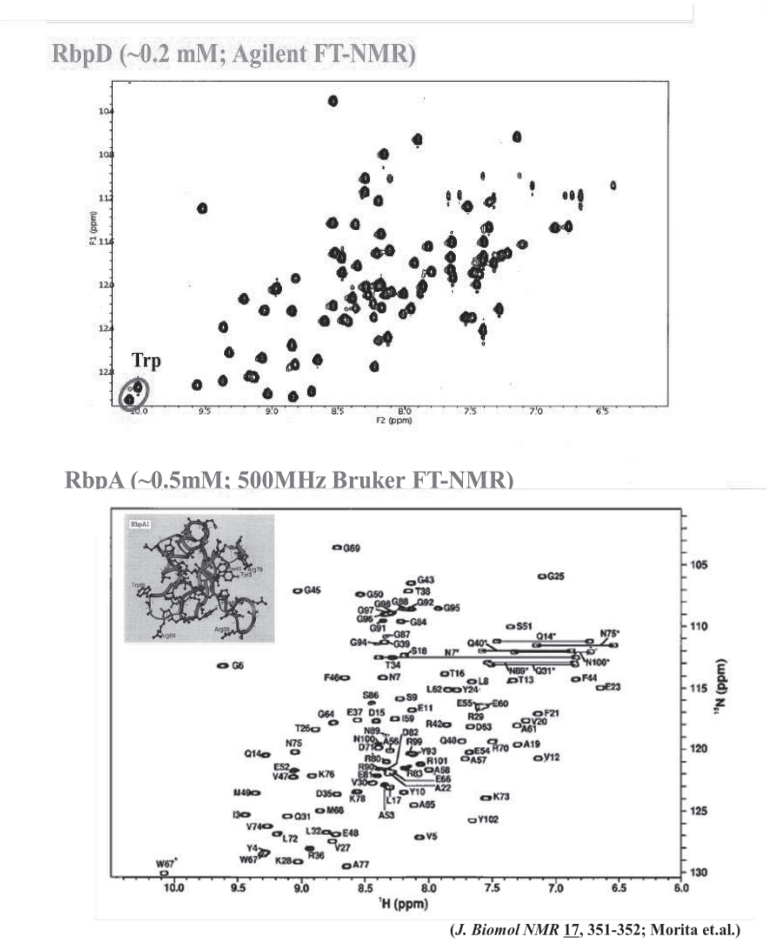
Fig.1.*Nucl. Acid . Res*. 27,2029-2036; Maruyama et al.

低温ストレス　RNA 結合タンパク質　藍色細菌

○たなかゆうき　さとうなおき　はやしひでのり　もりたはやと

そこで本研究では RbpD の大腸菌による大量発現系を構築するとともに、安定同位体標識法(^{15}N- ^{13}C-)を用いた多次元 NMR 分光法によりその溶液構造を解明することで Rbp の持つ特異ドメイン RRM の機能相関解析をすることにした。

共同研究者より供与された大腸菌の RbpD 発現ベクター（RbpD 遺伝子を pET-21 ベクターに組み込んだもの）の遺伝子配列を T7 および T7 ターミネーターの２つのプライマーで確認後、タンパク質大量発現用大腸菌 Rosetta-gami^{TM} B (DE3)/pLysS へ形質転換した。形質転換大腸菌を 37℃、M9 培地中で培養し、OD_{600}=0.6 で、IPTG を添加することで RbpD の発現誘導を行った。添加する IPTG の濃度は、安定同位体標識化合物を加えない条件下で最適化を行った。IPTG 添加後さらに 3 時間培養を行った。回収した菌体を超音波処理により破砕後、ポリエチレンイミンによる除核酸処理、硫安沈殿による粗精製処理を行い、HiTrap Q_{FF}（GE Healthcare)を用いた陰イオン交換カラムならびにゲル濾過カラム法により、純度 95%以上の精製 RbpD 試料を得た。^{15}N もしくは ^{15}N/^{13}C 標識 RbpD は、培養する M9 培地に $^{15}NH_4Cl$ または ^{13}C-Glucose を加えることで作出した。



精製 RbpD は限外濾過膜法でタンパク質濃度 0.3mM に濃縮し、城西大学設置の Agilent NMR System 700 を用いて、多次元 NMR スペクトルを測定した。RbpD の ^{1}H-^{15}N HSQC スペクトルと先行研究によって同定されている RbpA のスペクトルの比較したところ、完全に一致させることはできなかったが、スペクトルパターンが類似していることが分かった。

さらに、^{15}N- /^{13}C-二重標識 RbpD を用いて一連の 3 次元 NMR スペクトルの測定を行うとともに、その解析を進めている。本報告会では、その結果についても報告する予定である。

P37

細胞接着に関わるマルチドメインタンパク質 vinculin の溶液 NMR 法による構造解析

○会津 貴大[1],永井 敢[1],伊藤 隆[1],三島 正規[1]

[1]首都大学東京　理工学研究科

Structural studies of the multi-domain protein vinculin involved in cell adhesion by solution NMR

○Takahiro Aizu[1], Kan Nagai[1],Yutaka Ito[1] and Masaki Mishima[1]

[1]Graduate School of Science and Engineering, Tokyo Metropolitan University

Vinculin is an actin-binding multi-domain protein involved in cell adhesion, and its molecular weight is 116 kDa. It locates in the cell adhesion apparatus such as the extracellular matrix-cell focal adhesion and cell-cell adherens junction. It interacts with many molecules including talin. The domain organization of vinculin is composed of the N-terminal head domains <D1, D2, D3, D4> (approximately 800 amino acid residues), and the C-terminal tail domain <Vt> (approximately 200 amino acid residues) and proline rich linker connecting them. The interaction between D1 and Vt is strong ($K_D < 10^{-9}$). However , it has suggested that structure of vinculin changes dynamically in solution along with interactions between vinculin, talin and F-actin. We are trying to determine the structure and dynamic properties of multi-domain proteins solving the difficulties in among NMR analyses.

〈序論〉

本研究では溶液NMR法を用いて巨大なマルチドメインタンパク質であるvinculinのドメイン配向の解析、構造解析に取り組んでいる。vinculinは約1000アミノ酸残基からなる分子量116 kDaのアクチン結合タンパク質であり、細胞外マトリックス-細胞間の接着装置である接着斑(focal adhesion)と細胞-細胞間の接着装置であるアドヘレンス・ジャンクション(adherens junction)等に存在し、Talin を始めとして多くの因子と相互作用する。また、そのドメイン構造は大きく分けて、800アミノ酸残基程度のN末端頭部(D1,D2,D3,D4)と200アミノ酸残基程度のC末端尾部(Vt)、それらをつなぐプロリンリッチなリンカーからなる。vinculinはN末端頭部のD1とC末端尾部のVtドメインに強い相互作用が存在し、その相互作用により通常は閉じた構造(inactive conformation)をとっているが，Talin等がvinculinに対して作用するとD1とVtドメインの相互作用が弱まり、Vtドメインが開いた構造(active conformation)をとる。その状態のVtドメインに対してF-actinが結合し、D1にはTalinが結合するというモデルが提唱されている。このように巨大でなおかつ構造が動的に変化し、多くのタンパク質と相互作用を持つタンパク質を溶液 NMR 法を用いて立体構造解析し、このような高難度タンパク質の溶液NMR法を用いた構造解析手法を確立したい。

溶液 NMR, マルチドメインタンパク質,vinculin

○あいづ　たかひろ, ながい　かん, いとう　ゆたか, みしま　まさき

<実験>

大腸菌の発現系を用いて安定同位体標識したヒト vinculin、ニワトリ vinculin の全長、またニワトリ由来のものの N 末端頭部、C 末端尾部の発現、精製を行い、2D-^{1}H $^{-15}$N TROSY の測定を行った。C 末端尾部の 3D-HNCACB,3D-HNCOCACB,3D-HNCACO,3D-HNCO 測定を行った。それぞれ精製した N 末端頭部と C 末端尾部を sortase を用いてライゲーションを行った。

<結果>

ヒト vinculin では、分離の悪いスペクトルしか得られなかったが、ニワトリ vinculin では信号の分離のよい良好なスペクトルが取得できた（Fig.1）。

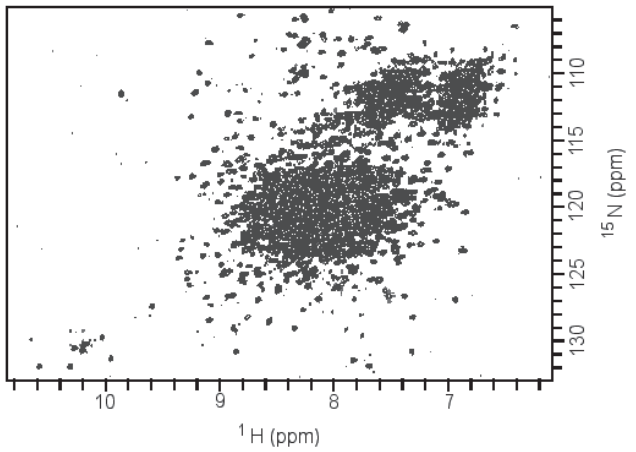


Fig.1 ^{1}H-^{15}N TROSY spectrum of Chicken Vinculin (1-1066)
0.1 mM (^{2}H, ^{15}N) 313 K 16h ,900 MHz.
Buffer : 50 mM K-phosphate (pH 6.9), 50 mM KCl, 1 mM TCEP.

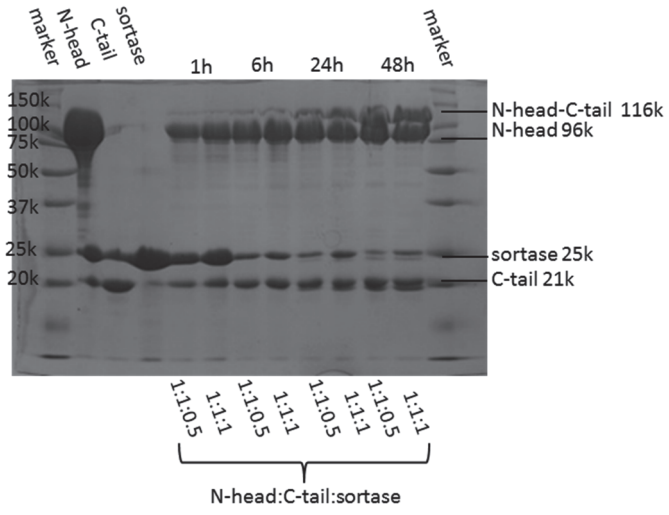


Fig.2.The SDS-PAGE result of domain ligation between vinculin N-terminal head domain and C-terminal tail domain

C 末端尾部については 2D-^{1}H $^{-15}$N TROSY,3D-HNCACB,3D-HNCOCACB,3D-HNCACO,3D-HNCO 測定の結果をもとに現在、主鎖シグナルの帰属を行っている。

また N 末端頭部と C 末端尾部の sortase によるライゲーションに成功した（Fig. 2）。N 末端頭部: C 末端尾部: sortase = 0.2 mM: 0.2 mM: 0.2 mM の割合で 100µl スケール,25℃,48h での反応が最適条件であることがわかった。今後、この結果を用いてドメイン選択的標識と、スピンラベルによるドメイン間の長距離情報の取得を進めていきたい。

<参考文献>

Xiao Peng et al., *Int. Rev. Cell. Mol. Biol*., 2011, 287,191–231

<謝辞>

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

P38

ヤエヤマサソリ由来毒素 LaIT2 の構造機能相関解析

○田村真生[1]、十一浩典[2],宮下正弘[2]、宮川恒[2]、森田勇人[1]
1 城西大学・大学院理学研究科
2 京都大学・大学院農学研究科

Correlation analysis of LaIt2 poison for *Liocheles australasiae*

○Maiki Tamura[1],Hironori juichi[2],Masahiro Miyashita[2],Hisashi Miyagawa[2],Hayato Morita[1]
[1]*Department of Chemistry, Graduate School of, Science, Josai University*
[2]*Department of Agriculture, Graduate School of Agriculture,, Kyoto University*

Japanese scorpion, *Liocheles australasiae*, mainly inhabits in the Yaeyama islands, has the poison specifically acting for insects. This poison contains a series of peptide which have characteristic structural properties. Among these peptides, in this study, we have focused our attention on LaIT2 which consists of 59 amino acids in the mature form. This peptide has not only insecticidal, but also antibacterial activities. On the basis the of results of MS analyses, this peptide has 3 intramolecular S-S bonds. In consideration of these, we constructed the overexpression systems for LaIT2 and analyzed the interrelationships between the physiological propertied and solution structure, with heteronuclear multidimensional NMR spectroscopy.

日本に生息する 2 種類のサソリのうちの 1 種ヤエヤマサソリから分泌される毒素には、昆虫に対する特異的に作用し、抗菌作用を持つペプチド成分 LaIT2 および、LaIT2 と類似の構造を持つと考えられている複数のペプチド（LaIT1、LaIT3、LaIT4 など）が含まれていることが知られている。しかし、これらの生理活性をもたらす分子構造上の特徴は特定されておらず、また、LaIT2 を初めとするこれら一連のペプチドすべてが殺虫活性と抗菌活性をともに示すかどうかについても明らかになっていない。

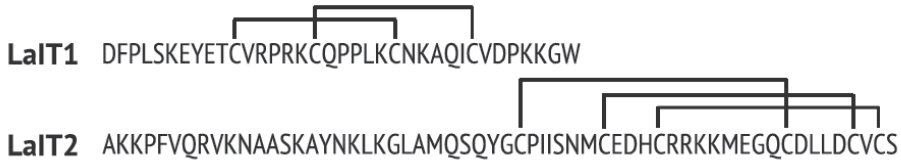


Fig.1.Amino acid sequence of LaIT1 and LaIT2

LaIT2　昆虫特異的毒性、抗菌活性

○たむらまいき、じゅういちひろのり、みやしたまさひろ、みやがわひさし、もりたはやと

本研究では、LaIT2 の毒素の昆虫特異的特性ならびに抗菌活性をもたらす構造要因を解明することを目的に、安定同位体標識した LaIT2 の大腸菌における大量発現の構築を行い、その高次構造解析を多次元 NMR 分光法により行う事を試みた。

LaIT2 をコードする cDNA 情報をもとに、大腸菌内での発現に適するようにコドンの最適化を行うとともに、アミド末端へのメチオニン導入、大量発現ベクターへの組み込みのための制限酵素サイトを付加した人工 DNA を合成した。合成した DNA 断片を、大腸菌大量発現系構築用ベクターpET-32a の NcoI、XhoI の制限酵素サイトで挿入することで、GST 融合タンパク質としての LaIT2 の大量発現用プラスミドを作成した。

作成したプラスミドは、大腸 Rosetta-Gami™ B (DE3)/pLysS に形質転換することで、LaIT2 の大量発現系を作成した。また、形質転換を行った大腸菌は LBA 培地中、37℃,30℃,25℃それぞれで培養し OD_{600}=0.5 で 1.0mM　IPTG の添加により LaIT2 の発現誘導を行った後、37℃は 3 時間、30℃は 4 時間、25℃と 20℃は 8 時間培養を行った。ランニングバッファーに MES-Tris 緩衝液を使用した Bis-Tris　ポリアクリルアミドゲル電気泳動法（PAGE)により、予想される分子量の位置に目的タンパク質の発現を確認することができた。各温度の培養液を、超音波破砕しセルと溶液に分け、可溶性を確認した。その結果、20℃が可溶性画分の割合が最も多いことがわかった。

低温での発現が GST-LaiIT2 融合タンパク質のフォールディングに有効であることが示されたことから、LaIT2 をコールドショック用ベクターpCold™ProS2 に組み込み、さらなる低温条件（15℃）での融合タンパク質の発現を行った。現在、発現した融合タンパク質の可溶性を最大にするための発現条件の最適化を行っており、本報告会では、これらの結果について報告する。

Reference

(1)　　サソリ毒は生理活性の宝庫　宮下正弘著　生物工学学会誌第 94 巻　pp.38-41

P39

アンサンブル学習を応用した水産物評価技術の開発

○朝倉 大河[1], 伊達 康博[1,2], 菊地 淳[1,2,3]
[1]特定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

Application of ensemble deep neural network to metabolomics studies for evaluation of fishery products

○Taiga Asakura[1,2], Yasuhiro Date[1,2], Jun Kikuchi[1,2,3,4]
[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*

Despite a large increase in consumption of fish, fish catches from ocean decline due to various environmental and artificial factors. Thus, enhancement of aquaculture is largely anticipated with technological progress such as improvement of fish feed and development of environmental load-reducing aquaculture. In this study, we focused on technological advancement toward improvement of monitoring technologies and discovery of metabolic biomarkers associated with fish growth stage. For this purpose, we have developed ensemble deep neural network (EDNN) algorithm for analysis of metabolic data derived from fishery resources. The EDNN should provide a technological insight into metabolomics studies.

【背景・目的】水産物は人類にとって主要な栄養源の一種であり、経済性においても大きな市場規模を持つ重要な資源である。加えて近年、漁獲量の減少に伴い養殖業の重要性が見直され、環境負荷を低減し、かつ経済性の高い養殖技術・餌料開発等が嘱望されている。こうした技術開発に迫るアプローチの一つとして、NMR による代謝物群の一斉計測（メタボロミクス）が注目されている。当該技術はスループット性に優れ、多様な物質の分析が可能なことから[1, 2]、比較的短時間に多くの情報を得ることが可能であるが、データが膨大になることで解析が困難となり、重要な変数の選択や効率の良い解析技術の開発等が求められている[3]。本研究では機械学習をメタボロミクス技術に応用し、重要変数の選択や精度の良い効率的なデータ解析を可能としたアンサンブル型のディープニューラルネットワーク（EDNN）法を構築した。本手法を用いることで、魚類筋組織プロファイルから生態や成長性の評価が可能かどうかを検討した。

【方法】本研究では関東及び東北地方の河口・沿岸から8種の魚類（Table 1）を採集し、MeOD可溶化成分の^{1}H及びHSQC計測を行った。^{1}H計測の多検体スペクトルは数値化し、魚試料の実測サイズと合わせてマトリックス化した後、開発したEDNN法に供試した。EDNN法は3ステップのアルゴリズムであり、①初期データをブートストラップ法によって学習データとテストデータに分割した後、変数を一定の割合でランダムサンプリングした学習用データを複数個作成し、②それぞれの分割学習用データに対してDNN解析を行い、③得られたモデルのうち外れ値を除外し、2乗平均平方根誤差（RMSE）の優れたものを統合した（Figure 1）。DNN解析にはフリーソフトウェアR及び

Machine learning, Fish, Metabolomics
○あさくら たいが，だて やすひろ，きくち じゅん

Distributed (Deep) Machine Learning Communityによって作成されたMXnetパッケージを用い、最適化されたパラメータで解析を行った。

【結果・考察】EDNNを構成する学習用データの数とランダムサンプリングした変数の割合について評価した結果、学習用データ数は150個、変数の割合は15%において最もRMSEが小さい値を示した（Figure 2）。次に、同様のパラメータ値を用いた通常のDNN、及びアンサンブル型の機械学習法であるRandom Forestを用いて、8種の魚類のサイズ予測モデルを作成し、作成したEDNNとの性能比較を行った結果、通常のDNNに対しては全ての魚種において、Random Forestに対しても多くの魚種において、EDNN法は低いRMSエラーのモデルを作成することが可能であった（Table 1）。

作成されたEDNN法によって得られた予測サイズと実測サイズの相関係数を魚種間において比較した結果、ブリ、マアジ、マサバ、スズキなどの回遊性の魚種においては相関係数が高く、ヒラメ、カレイ、マハゼなどの底生魚種においては相関係数が比較的低い傾向が得られた。イワシにおいては予測値が低かったが、試料のサイズ幅が狭く、成魚のみの解析となったことが原因と考えられた。また、これら回遊魚における回帰モデルの重要指数からIMP, GTP, Ala, Hisなどが重要な変数として特定でき、これらの物質がそれぞれの魚種の成長と関係がある物質であることを明らかにし、成長の指標となる重要な物質であることが示唆された。

[1] Yoshida et al. *Sci. Rep.* (2014)
[2] Asakura et al. *PeerJ* (2014)
[3] Mekuchi et al. *Sci. Rep* (2017)

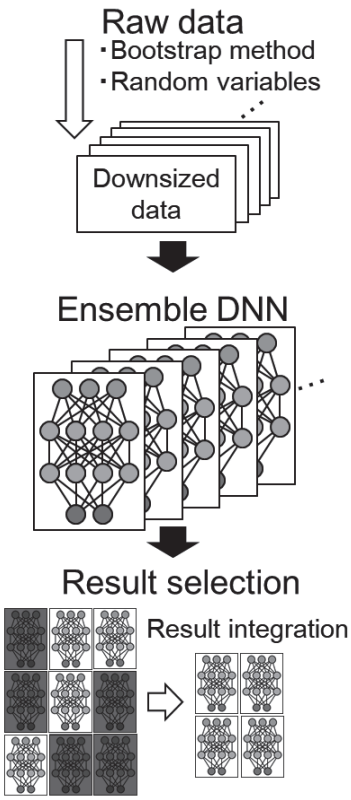


Fig. 1: Outline of EDNN

Table 1: RMS error of each machine learning

	Size (cm)±SD	RMSE EDNN	RMSE DNN	RMSE Radom Forest	R^2 EDNN
ヒラメ	41.63±10.32	7.29	13.79	10.13	0.49
ブリ	51.78±12.68	5.83	9.43	9.67	0.85
マアジ	22.05±11.94	2.08	3.89	4.01	0.98
マサバ	17.47±5.75	2.49	5.12	4.93	0.63
イワシ	14.71±0.87	1.75	3.29	0.64	0.03
カレイ	17.41±8.36	3.47	5.92	6.41	0.55
スズキ	17.19±8.4	4.54	9.2	8.74	0.82
マハゼ	13.4±3.08	3.11	4.82	2.59	0.27

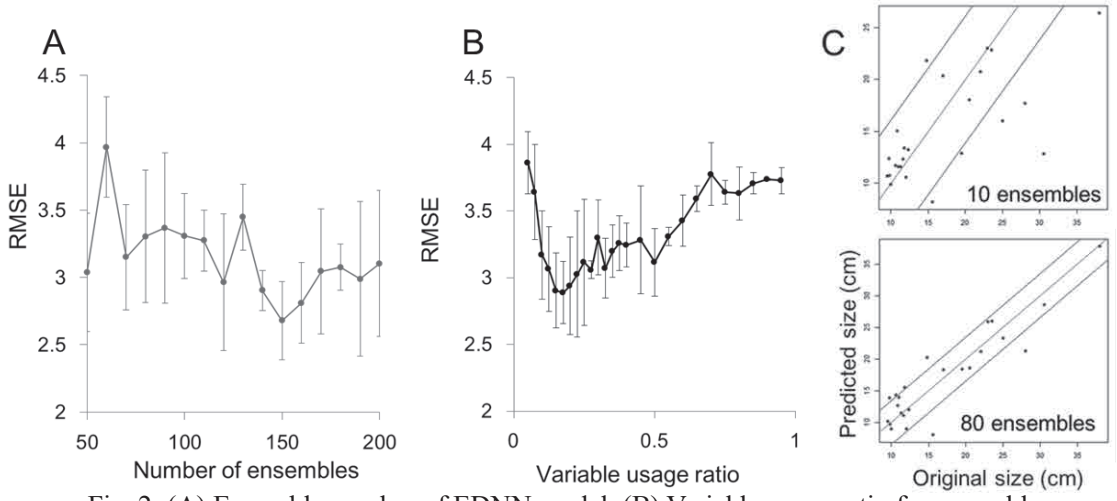


Fig. 2: (A) Ensemble number of EDNN model. (B) Variable usage ratio for ensembles.
(C) RMS error convergence by EDNN

P40

NMRメタボロミクスに適した生体試料調製法の検討

○山野めぐみ[1]，稲村勇雅[1]，北田直也[1]，清水由宇[1]，久米田博之[2, 3]，熊木康裕[4]，菊川峰志[1, 2, 3]，塚本卓[1, 2, 3]，出村誠[1, 2, 3]，中村公則[1, 3]，綾部時芳[1, 3]，相沢智康[1, 2, 3]
[1]北海道大学大学院生命科学院
[2]北海道大学GI-CoREソフトマターGS
[3]北海道大学大学院先端生命科学研究院
[4]北海道大学大学院理学研究院

Sample preparation for metabolomics by NMR of biological sample

○Yamano Megumi[1], Inamura Yuga[1], Kitada Naoya[1], Shimizu Yu[1], Kumeta Hiroyuki[2,3], Kumaki Yasuhiro[4], Kikukawa Takashi[1,2,3], Tsukamoto Takashi[1,2,3], Demura Makoto[1,2,3], Nakamura Kiminori[1,3], Ayabe Tokiyoshi[1,3], Aizawa Tomoyasu[1,2,3],
[1] *Graduate School of Life Science, Hokkaido University*
[2] *GI-CoR Softmatter Grobal Station, Hokkaido University*
[3] *Faculty of Advance Life Science, Hokkaido University*
[4] *Faculty of Science, Hokkaido University*

Metabolomics, as a multi-component analysis of tissues or biofluids for organic low-molecular metabolite, provides a novel insight on pharmacology, pathology, toxicology and genetics, which enabled its rapid development in disease diagnosis, toxicity screening, drug safety and efficacy assessment. Nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy, one of the most efficient tools with the advantages of rapidness, non-destruction and high-throughput, has been applied to metabolomics research. In this presentation, we will especially report sample preparation of feces which have complicated components.

【序論】

メタボロミクスは「生命の最下流の表現型」と言われるメタボローム (代謝物)の網羅的解析によって生命現象を解き明かすというもので、生物の代謝産物のみならず、食品科学・薬品の品質管理などの分野への応用も期待されている。メタボロミクスで用いられる主要な分析方法としてクロマトグラフィーとNMR装置があるが、本研究ではNMR法のサンプル調製の簡便性・高い網羅性に着目し、マウス糞便試料を対象としたメタボロミクス研究への応用を検討した。近年腸内環境が健康に及ぼす影響に関する研究が数多く報告され、特に糞便に含まれる代謝物と腸内環境の関係が注目されている。クローン病は若年で発症しやすく年々患者数が増加している原因不明の難治性の炎症性腸疾患であるが、その原因究明と治療を目標として腸内細菌叢及び代謝物に関する研究の進展が期待されている。そこで本研究では、健常マウスとクローン病類似炎症を自然発症するモデルマウスの糞便を対象としてNMR法を用いたメタボロミクスにより比較することで、クローン病における新規マーカーの発見、病理状態の追跡への応用を検討した。特に、複雑な組成を持つ糞便試料を対象としたNMRメタボロミクスにおいては、試料調製に関する知見も不十分でるため、まずその検討を重点的に進め、試料調製及び測定条件を決定した。

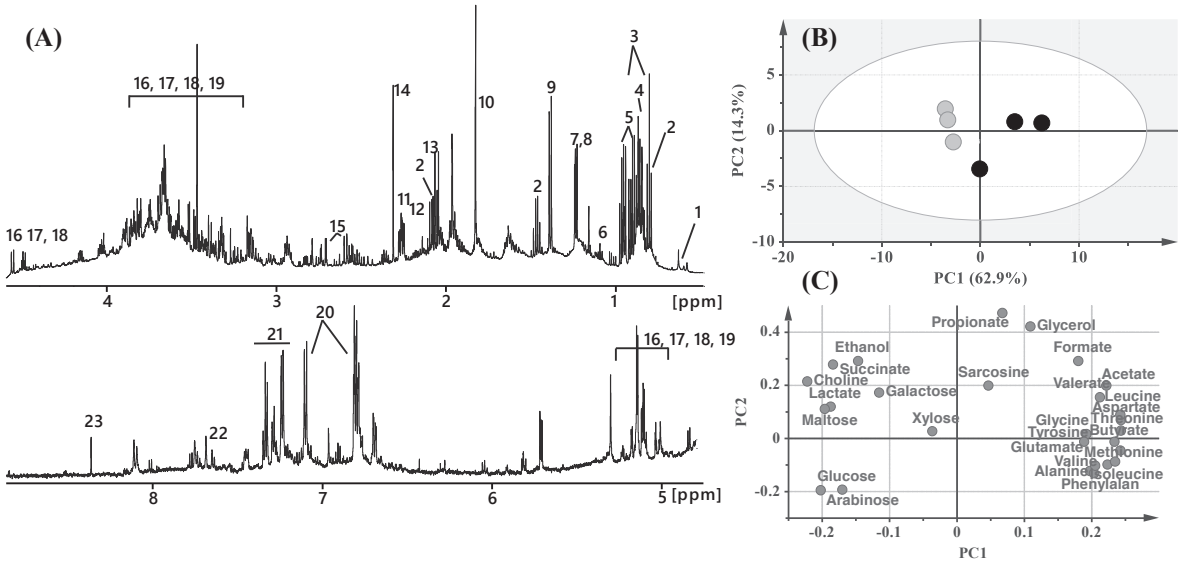
メタボロミクス，糞便

○やまのめぐみ，いなむらゆうが，きただなおや，しみずゆう，くめたひろゆき，くまきやすひろ，きくかわたかし，つかもとたかし，でむらまこと，なかむらきみのり，あやべときよし，あいざわともやす

【実験・結果】

糞便を対象としたNMRメタボロミクスでは、糞便に溶媒を加え代謝物を抽出し、溶液NMR法を用いて測定を行う手法が一般的である。しかし糞便試料の保存方法、抽出時間やその方法によっても各代謝物の抽出濃度が大きく異なると予想される[1]。種々の条件検討の結果、溶媒添加直後の試料に対する強い超音波処理により高濃度で検出される化合物については、試料中に含まれる微生物の内容物の漏出に由来するものであることが明らかになった。抽出時間を長くすると超音波処理と比較し濃度が上昇する化合物が検出されたが、これは糞便に含まれる食物残渣等の細菌由来の酵素による分解に由来すると推定された。^{1}H-NMR測定にはBruker 600 MHz (Bruker BioSpin, Rheinstetten, Germany)を使用した。また、専用のソフトウエア (Chenomx NMR Suite 7.5 software (Chenomx Inc., Edmonton, Canada))を用いることで化合物の同定を行った (Fig. A)。

予備検討段階の主成分解析で、健常マウス・クローン病モデルマウスのグループに大別できることが確認できた(Fig. B)。今後さらにデータ量を増やし、多変量解析による分析を進める予定である。



Figure

(A) 600 MHz ^{1}H-NMR 1D spectra and assignments of mice feces obtained from a mouse
1, Bile acid; 2, Butyrate; 3, Isoleucine; 4, leucine; 5, Valine; 6, Ethanol; 7, Threonine; 8, Lactate; 9, Alanine; 10, Acetate; 11, Glutamate 12, Glutamine; 13, Propionate; 14, Succinate; 15, Aspartate; 16, Glucose; 17, Galactose; 18, Xylose; 19, Ribose; 20, Tyrosine 21, Phenylalanine; 22, Tryptophan
(B) PCA score plots Grey circle; Crohn's disease model mice, Black circle; Control mice **(C) PCA loading plots**

【参考文献】

(1) Gratton Jasmine *et al*., ***Analytical Chemistry***, **88**, 9, 4661-4668 (2016)

P41

抗菌ペプチドnukacin ISK-1の溶液構造決定

○藤浪　大輔[1]，Abdullah-Al-Mahin[2]，Khaled M Elsayed[2]，永尾　潤一[4]，善藤　威史[2]，園元　謙二[2,3]，神田　大輔[1]
[1]九州大学・生体防御医学研究所
[2]九州大学・農学研究院
[3]九州大学・バイオアーキテクチャーセンター
[4]福岡歯科大学・機能生物化学講座

Structure determination of an antimicrobial peptide, nukacin ISK-1

○Daisuke Fujinami[1], Abdullah-Al-Mahin[2], Khaled M Elsayed[2], Jun-ichi Nagao[4], Takeshi Zendo[2], Kenji Sonomoto[2,3] and Daisuke Kohda[1]
[1]*Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University.*
[2]*Faculty of Agriculture, Graduate School, Kyushu University.*
[3]*Bio-Architecture Center, Kyushu University.*
[4]*Department of Functional Bioscience, Fukuoka Dental College.*

Nukacin ISK-1 is a typeA (II) lantibiotic, which is a ribosomally synthesized antimicrobial peptide containing unusual amino acids, such as dehydrobutyrine and lanthionine residues. Unlike other class lantibiotics, the molecular mode of action of the type A(II) lantibiotics has yet to be elucidated in detail. Here, we determined the first typeA (II) lantibiotic structure of nukacin ISK-1 by solution NMR and revealed the interaction mechanism between nukacin ISK-1 with its target cell wall precursor lipid II.

序論）ランチビオティックは分子内にランチオニン環構造（Ala-S-AlaまたはAbu-S-Ala）を持つ抗菌ペプチドの総称で、分子の形状からA(I), A(II), Bのタイプに分けることができる（Fig. 1）。このうちA(I), Bタイプに属するランチビオティックについては溶液構造が報告されている[1,2]。A(II)タイプに属するnukacin ISK-1は表皮ブドウ球菌*Staphylococcus warneri*により産生される抗菌性ペプチドであり、分子内に異常アミノ酸を有する。先行研究によりnukacin ISK-1は真正細菌の外膜上にある細胞壁ペプチドグリカン前駆体lipid IIを標的分子として結合し抗菌作用を示すことが明らかになった[3]。本研究では①nukacin ISK-1の溶液構造、②nukacin ISK-1とlipid IIとの相互作用領域を明らかにすることを目的とした。

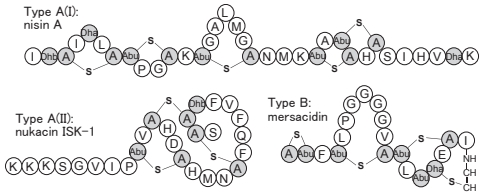


Fig.1 Major types of lantibiotics based on their structures.
Type A(I) lantibiotics are longer, more elongated and flexible (e.g., nisin), while type B lantibiotics are shorter and more compact (e.g., mersacidin). Type A(II) lantibiotics (e.g., nukacin ISK-1) have a liner N-terminal region and a globular C-terminal region. Shaded circle represents unusual amino acids. Abu-S-A, methyllanthionine; A-S-A, lanthionine; Dhb, dehydrobutyrine; Dha, dehydroalanine.

方法）*S. warneri*を培養したTSBYE培地上澄からnukacin ISK-1を精製した。溶液構造決定には終濃度1.1 mMのnukacin ISK-1を用いた。相互作用解析には$^{13}C/^{15}N$標識nukacin ISK-1と試験管内での酵素反応により生合成したlipid IIを用いた。nukacin ISK-1の安定同位体標識にはCHL培地（クロレラ工業社）を用いた。218 μMの$^{13}C/^{15}N$標識nukacin ISK-1に対して重水素化した界面活性剤n-octyl-β-D-glucoside（βOG）ミセル、lipid IIの滴定を段階的に行い各残基における化学シフト変化

抗菌ペプチド, 遅い化学交換, 溶液構造

○ふじなみだいすけ，あぶどぅるあるまひん，かれいどえるさいーど，ながおじゅんいち，ぜんどうたけし，そのもとけんじ，こうだだいすけ

を観測した。NMRスペクトルの測定にはAVANCE600（BRUKER社）を用いた。

結果1） Nukacin ISK-1の^{1}H-^{15}N HSQCスペクトルを示す（Fig. 2）。Nukacin ISK-1のスペクトルはK2~S27(A状態)とK2'~S27'(B状態)に帰属される二組のクロスピークからなっている。^{1}H-^{1}H EXSYを測定したところ、この二状態は化学交換しており、その交換速度k_{ex}はおよそ1.5s^{-1}であった。クロスピーク強度から２つの状態の存在比を推定したところ、A状態:B状態=4:1であった。NOESYスペクトル解析からB状態の収束構造を得ることができた（Fig. 3）。EXSYピークを抑えるために測定温度を下げ、化学交換速度を遅くする工夫をした。

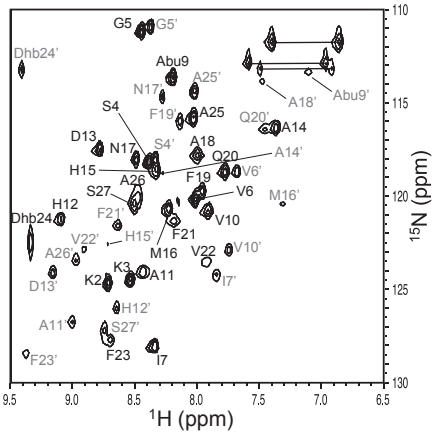


Fig.2 Backbone resonance assignment of nukacin ISK-1 in aqueous solution revealed two sets of cross peaks representing two different states, state A (black) and state B (gray).

結果2） βOGの滴定に伴う化学シフト変化と続くlipid IIの滴定に伴う化学シフト変化を示す（Fig. 4）。各滴定において、A状態は比較的大きな化学シフト変化を示したが、B状態は顕著な化学シフト変化を示さなかった。このことからA状態の方がリガンドに対して高い親和性を持つことが明らかになった。

考察） Nukacin ISK-1のC末端のglobular領域にある疎水アミノ酸（F19~Dhb24）の化学シフトはβOG、lipid IIの滴定に伴い変化した。一方、N末端領域（I7~V10）の化学シフトはlipid IIの滴定のみで変化した。この結果と他の実験により得られた知見[4]から、我々はC末端globular領域にある疎水性アミノ酸側鎖がlipid II脂肪鎖領域との結合に、N末端領域がリン酸基との結合に関与しているという相互作用モデルを提唱した（Fig. 5）。

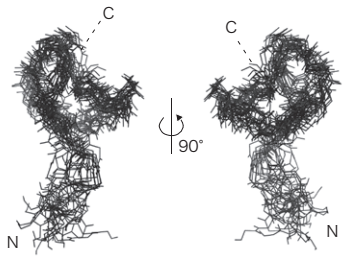


Fig. 3 Backbone overlay of the 20 lowest energy confomers of state B.

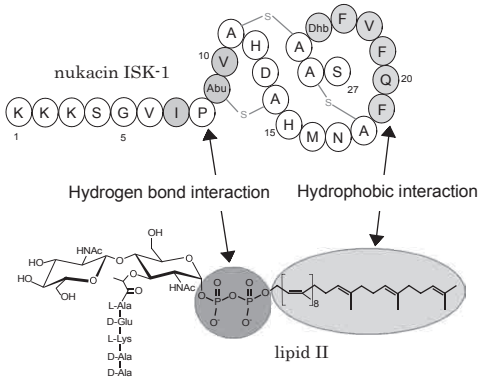


Fig. 5 Proposed interaction mechanism.

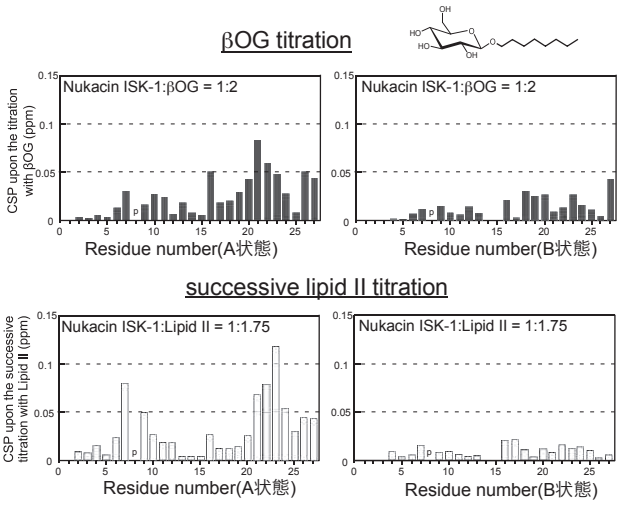


Fig.4 Chemical shift perturbations of ^{1}H-^{15}N cross peaks of nukacin ISK-1 in a two-step titration. The addition of βOG produced significant chemical shift perturbations of hydrophobic amino acids (Phe19-Dhb24) in the globular region of state A, but not state B. The subsequent lipid II addition produced large chemical shift perturbations in both the liner N-terminal region (Ile7-Val10) and the globular region of state A, where as little shift was observed in state B. The chemical shift perturbation of each backbone amide cross peak was calculated according to the equation, $[(\Delta\delta(^{1}H))^2+(\Delta\delta(^{15}N)/5)^2]^{1/2}$. The position of the proline residue is indicated with the letter 'p' in the panel.

1) Hsu S.T. and Breukink E. *et al*., *J. Biol. Chem.* **278**, 13110-13117, 2003.

2) Hsu S.T. and Breukink E. *et al*., *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**, 963-967, 2004.

3) Islam M.R. and Nishie M. *et al*., *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 3687-3690, 2012.

4)Elsayed K.M. and Islam M.R. *et al*., *J. Biosci. Bioeng.* **123**, 398-401, 2017

P42

NMR メタボローム解析を用いたルーメン内繊維分解細菌間相互作用に関する研究

○稲村勇雅[1]，山野めぐみ[1]，北田直也[1]，久米田博之[2,3]，熊木康裕[2]，大西裕季[2]，塚本卓[1,2,3]，菊川峰志[1,2,3]，出村誠[1,2,3]，福間直希[4]，村住侑毅[4]，小池聡[4]，小林康男[4]，相沢智康[1,2,3]

1 北海道大学大学院生命科学院

2 北海道大学大学院先端生命科学研究院

3 海道大学 GI-CoRE ソフトマターGS

4 北海道大学大学院農学研究院

Research of rumen fibrolytic bacterium interaction by NMR metabolomics

○Yuga Inamura[1], Megumi Yamano[1], Naoya Kitada[1], Hiroyuki Kumeta[2,3], Yasuhiro Kumaki[2], Yuki Onishi[2], Takashi Tsukamoto[1,2,3], Takashi Kikukawa[1,2,3], Makoto Demura[1,2,3], Naoki Fukuma[4], Yuki Murazumi[4], Satoshi Koike[4], Yasuo Kobayashi[4], Tomoyasu Aizawa[1,2,3]

[1]*Graduate School of Life Science, Hokkaido University*

[2]*Faculty of Advanced Life Science, Hokkaido University*

[3]*Soft Matter Global Station, GI-CoRE Hokkaido University*

[4]*Graduate School of Agriculture, Hokkaido University*

Ruminant animals mostly depend on microbial fermentation within the rumen to acquire energy from plant fibrous materials. Fermentation products made in rumen is primary energy source of host animals. So research of rumen bacterium plant fiber digestion and fermentation mechanism is important fundamental information to improve productivity. It is known that one fibrolytic and two non-fibrolytic rumen bacteria digest plant fiber cooperatively. In this study, we conducted NMR-based metabolomics to investigate interaction three bacteria with respect to metabolites.

【背景・目的】

反芻動物が摂取した植物繊維は第一胃(ルーメン内)の共生細菌による分解及び発酵を経て、宿主の栄養源に転換される。ルーメンで産生される発酵産物は、宿主である反芻動物の維持エネルギーのおよそ 70%をまかなう主要な栄養源となることから、ルーメン内細菌による植物繊維分解、発酵メカニズムの解明は重要な基礎的知見となる。植物繊維の一次分解者である繊維分解性細菌は、ルーメン内繊維分解において特に重要な存在である。一方で、このような繊維分解菌は非繊維分解菌とコミュニティを築き協調的に繊維分解を行うことが知られており、このような細菌集団は繊維分解コンソーシャムと呼ばれるが、その共生のメカニズムには未知の点も多い。これまでの研究で繊維分解菌 *Fibrobacter succinogenes*、非繊維分解菌 *Selenomonas ruminantium*、新規細菌群 U2 の 3 者が、ウシルーメン内の繊維分解コンソーシャムの重要構成細菌であることが特定されている[1,2]。本研究ではこれら三菌種の分離菌株を用いて、2 者及び 3 者共培養試験による繊維

ルーメン，メタボロミクス，NMR

○いなむらゆうが，やまのめぐみ，きただなおや，くめたひろゆき，くまきやすひろ，おおにしゆうき，つかもとたかし，きくかわたかし，でむらまこと，ふくまなおき，むらずみゆうき，こいけさとし，こばやしやすお，あいざわともやす

分解コンソーシャムモデルを構築し、その培養液の NMR を用いたメタボローム解析を行い、ルーメン内繊維分解コンソーシャムにおける細菌間相互作用の解明を試みた。

【方法】

F. succinogenes S85 株、新規細菌群 U2 に属する R-25 株、*S. ruminantium* S137 株の 3 菌株とイナワラを基質とした培地もしくは合成培地、ルーメン液含有培地を用いて、嫌気性条件下で各菌株の単独培養試験、いずれかの 2 菌株による 2 菌共培養試験、および全ての菌株を混合した 3 菌共培養試験を行った。48 時間もしくは 96 時間培養を行った後、それぞれのサンプルを遠心後、その上清に標準物質のトリメチルシリルプロパン酸-d4 (TSP)を加えて NMR 測定を行った。それぞれの ^{1}H NMR スペクトルはプレサチュレーションを用いた 1D NOESY で測定し、積算回数は 256 回、ミキシングタイムは 100ms とした。代謝物の同定と定量は Chenomx 社製のソフトウェアを用いて行った。

【結果】

^{1}H NMR スペクトルから 33 種の代謝物の同定と定量を行う事が出来た(Fig.1)。これらは、先行研究のクロマトグラフィーによる解析において定量されていた代謝物をすべて含み、NMR のみの測定でもその変動が迅速に解析可能であることが明らかになった。*F. succinogenes* S85 株の単独培養でコハク酸が生成されている事、3 菌共培養時にコハク酸は消費されプロピオン酸が多く生成された事、分岐鎖アミノ酸(BCAA)について 3 菌共培養時にその生合成が抑制されている事が確認された。また新たな知見として、キシロビオースが *F. succinogenes* S85 株の単独培養で多く生成され、R-25 株との共培養時にはその多くが消費されている事が確認された。今後は試料調製法の検討と、試料を増やして多変量解析を行う予定である。

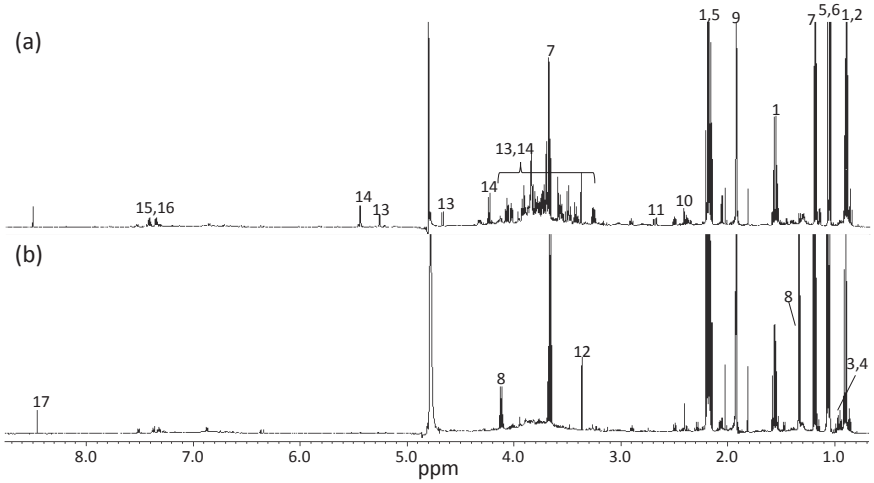


Fig.1 ^{1}H-NMR spectral of blank of culture medium (a), three-member co-culture (b)

1, Butyrate; 2, Isovalerate; 3, Isoleucine; 4, Leucine; 5, Propionate; 6, Isobutyrate; 7, Ethanol; 8, Lactate; 9, Acetate; 10, Succinate; 11, Malate; 12, Methanol; 13, Glucose; 14, Sucrose; 15, Phenylacetate; 16, 3-phenylpropionate; 17, formate.

【参考文献】

[1] Satoshi Koike, Sayo Yoshitani, Yasuo Kobayashi, Keiichi Tanaka, FEMS Microbiol. Lett., 229, 23-30, 2003

[2] Takumi Shinkai, Takaaki Ueki, Yasuo Kobayashi, Anim. Sci. J., 81, 72-79, 2010

P43

凝集構造を変化させたPMMAの気体輸送特性

○西口枝里子、吉水弘明
名古屋工業大学・大学院工学研究科

Gas transport properties of PMMA with aggregated structure changed

Eriko Nishiguchi, Hiroaki Yoshimizu
Nagoya Institute of Technology

Polymethylmethacrylate (PMMA) which is one of macromolecularly used macromolecules also belongs to a group with low gas permeability as compared with other polymer membranes. In this research, we aim to elucidate the mechanism that PMMA gas is difficult to pass through, in order to lead to new development of membrane materials showing higher gas barrier properties and improvement of existing materials. As the first step, we compare ① with PS which shows glass transition temperature and gas solubility similar to PMMA, ② compare the coagulation structure of PMMA with a film prepared from an annealing film, carbon dioxide exposure treated film, quenched film, PEO blend film The comparison was made on the four types.

＜緒言＞

工業的にも多く用いられている高分子の一つであるポリメタクリル酸メチル(PMMA)は，他の高分子膜と比較しても気体の透過性が低い部類に入る。本研究では，更に高い気体遮断性を示す膜素材の新規開発や既存材料の改良に繋げるため，PMMA の気体を通しにくいメカニズムの解明を目指す。その第一歩として，①PMMA とよく似たガラス転移温度と気体溶解性を示す PS との比較，②PMMA の凝集構造を徐冷膜，炭酸ガス曝露処理膜，急冷膜，PEO ブレンド膜からの調製膜の四種類での比較を行った。

＜実験＞

①短冊状に切った PS，PMMA 試料片約 50 mg を，外径 5 mm の耐圧 NMR 管に入れ，十分真空乾燥したのちに所定圧力の Xe を導入して，25，45，65，85，105 および 125 ℃下で、^{129}XeNMR 測定を行った。装置には JEOL Resonance 社製 ECZ700R 分光計を使用し，観測周波数約 193 MHz にて行った。気相 Xe の化学シフト値の圧力 0 への外挿値を化学シフトの基準値(0 ppm)とした。

②上記の 4 種類の膜を作製し、それぞれの DSC 測定、密度測定、Cahn 法・定容法による Xe 収着測定を行い、収着等温線の作製を行った。

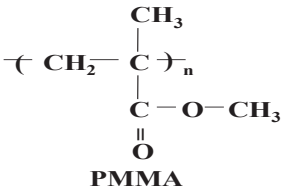


Fig. 1. Structure of PMMA.

PMMA, ^{129} Xe NMR, 凝集構造

○にしぐちえりこ，よしみずひろあき

＜結果・考察＞

①各試料で観測された 129Xe NMR スペクトルに約 200ppm 付近に現れた，試料内へ収着した Xe に帰属されるピークの，線幅と化学シフト値を比較した。

化学シフト値からは，収着 Xe の存在する極微小空間の大きさが考察できる。化学シフトが高磁場であるほど，Xe が動ける空間範囲の広いことがわかる。PMMA と PS との比較では，PMMA の方が高磁場側だったことから，PMMA の(Xe が感じる)自由体積は，PS のそれよりも大きいと考察された。また線幅からは気体拡散性の高低が推定できると考えられ，線幅が広くなるほど拡散性は低下するといえる。PMMA と PS 中の Xe の線幅を比較すると，PS の方が狭い値になったため，PMMA よりも気体を拡散させ易いと考察できる。

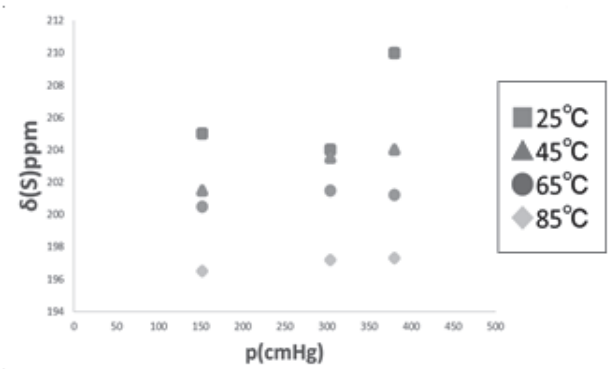


Fig.2 ^{129}Xe NMR chemical shifts of PMMA at 25℃，45℃，65℃，85℃ plotted against pressure of Xe.

PMMA の ^{129}Xe NMR 化学シフト値の圧力依存性を Fig. 2 に示す。

^{129}Xe NMR 化学シフト値が Xe 密度に対し線形変化する特性を踏まえると，Fig. 2 に示された非線形な変化は，二元収着モデルを示す気体収着等温線に類似した曲線を描いているように見え，PMMA の Xe 収着特性は二元収着に基づくことが示された。

②それぞれの凝集構造ごとに収着等温線は少しずつ異なることを示した。

P44

溶液NMR法によるtau凝集体と低分子化合物の相互作用解析

○山口芳樹[1]，松本加奈[1]，佐原成彦[2]
1理化学研究所・糖鎖構造生物学研究チーム
2量子科学技術研究開発機構放射線医学総合研究所

Solution NMR analysis of the interaction between tau aggregates and low-molecular-weight compounds

○Yoshiki Yamaguchi[1], Kana Matsumoto[1], Naruhiko Sahara[2]
[1] *Structural Glycobiology Team, RIKEN*
[2] *National Institutes for Quantum and Radiological Science and Technology (QST)*

Recent technical progress in solid-state NMR and cryo-EM have made it possible to determine the structure of amyloid fibrils at near-atomic resolutions. Knowledge of the atomic coordinates of amyloid fibrils may be useful for the rational design of specific aggregation inhibitors as well as tracer compounds. On the other hand, application of solution NMR to amyloid fibril is challenging due to its large molecular size and inherent inhomogeneity. We here attempt to get the information of amyloid fibrils in solution through the interaction analysis between tau aggregates and low-molecular-weight compounds. A series of solution NMR analyses including DOSY, STD-NMR and TR-NOE have been performed.

通常は可溶性であるタンパク質が繊維状の凝集体に変換することは、アルツハイマー病、パーキンソン病などの一連の疾患に共通にみられる事象である。それぞれの状況において異なったタンパク質が凝集を引き起こすが、生じる繊維は共通の構造・物理化学的性質をもつ場合が多く、アミロイド繊維と定義される。アミロイド繊維はβストランドが繊維の長軸と直交するかたちで並んでいることが提示されており、この特徴的な配列はクロスβ構造と呼ばれている。近年では、X線回折法や固体NMR法、cryoEM法によりAβペプチド[1-3]やα-synuclein[4], tau[5] (Fig. 1)などのアミロイド繊維の原子分解能での解析も進んでいる。

一方で溶液NMR法ではアミロイド繊維のような巨大分子量の試料を直接観測の対象とすることは容易ではない。そこで私達は溶液NMR法が得意とする化学交換の検出を通じてアミロイド繊維と相互作用する低分子化合物の情報の入手やアミロイド繊維のコア部分の同定が可能になると考えた[6]。

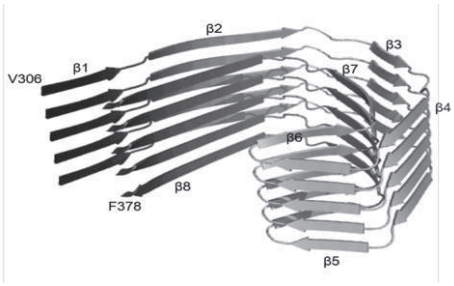


Fig. 1. Cryo-EM structure of tau filament isolated from a patient with Altzheimer's disease[5].
The secondary structure of the filament core was indicated.

タンパク質凝集体，天然変性タンパク質，tau

○やまぐちよしき，まつもとかな，さはらなるひこ

近年アミロイドpositron emission tomography (PET)イメージングへの応用研究が盛んに行われているが[7]、より特異性・親和性の優れたPET薬剤をデザイン・開発するためには、タンパク質凝集体と薬剤との相互作用の詳細を原子レベルで明らかにするような基礎研究が重要になる。本研究ではtauを対象としてタンパク質凝集体と低分子化合物の相互作用様式を溶液NMR法により解明することを目的とした。

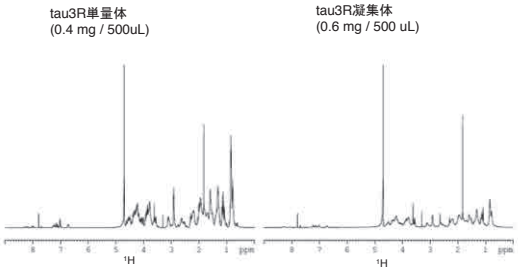


Fig. 2. ^{1}H-NMR spectral comparison between tau monomer and aggregates.

２種類のtau (4R2N, 3R2N)を大腸菌により組み換えタンパク質として大量発現し、数mgオーダーのtau単量体の精製を行った。必要に応じて^{15}Nにて均一に標識したtauを調製した。このtau単量体をヘパリン存在下で一定時間インキュベーションすることでtau凝集体を調製した。続いて、透析を行うことによりヘパリンフリーのtau凝集体を調製した。tau凝集体の性状解析および低分子化合物との相互作用解析を各種NMR法（DOSY, STD-NMR, TR-NOE）により実施した(Fig. 2)。

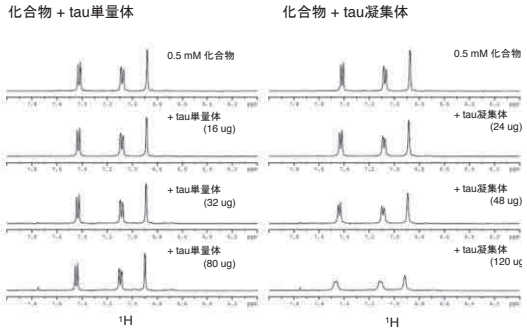


Fig. 3. ^{1}H-NMR titration experiments of tau monomer or aggregates against a low-molecular weight compound.

tau凝集体のDOSYスペクトルを測定したところ、算出された並進拡散定数から平均分子サイズは130 kDaと見積もられたが、様々なサイズの会合体の集合であることが示唆された。tau凝集体と様々な低分子化合物との相互作用解析をSTD-NMR法および TR-NOE法により実施したところ、(i) tau単量体には結合しないが、tau凝集体には結合する、(ii) tau凝集体のみならずtau単量体にも結合する、の２パターンに分類ことができた(Fig. 3)。

溶液NMR法に適したtau凝集体を調製することに成功し、この凝集体が各種低分子化合物と結合することをNMR法により確認することができた。これらの知見を活用することにより目的のtauを選択的に検出するようなプローブ開発が可能になると期待される。今後は安定同位体標識tauを用いてタンパク質側の情報を得る予定である。

References

(1) Lu et al. (2013) *Cell 154*, 1257-1268.
(2) Colvin et al. (2016) *J. Am. Chem. Soc. 138*, 9663-9674.
(3) Waälti et al. (2016) *Proc. Natl. Acad. Sci. 113*, E4976–E4984.
(4) Tuttle et al. (2016) *Nat. Struct. Mol. Biol. 23*, 409-415.
(5) Fitzpatrick et al. (2017) *Nature 547*, 185-190.
(6) Tsutsui et al. (2016) *Adv. Sci. (Weinh). 3*, 1600082.
(7) Maruyama et al. (2013) *Neuron 79*, 1094-1108.

P45

セルロース誘導体を構成するモノマー組成の決定

○甲野裕之[1]
1苫小牧高専・応用化学・生物系

Determination of the mole fractions of monomers comprising cellulose derivatives

○Hiroyuki Kono[1]
[1] *Division of Applied Chemistry and Biochemistry, National Institute of Technology, Tomakomai College*

Methylcellulose samples with different degrees of substitution were prepared by a heterogeneous reaction of cellulose. Two-dimensional NMR spectroscopy provided complete assignment of the ^{1}H and ^{13}C chemical shifts of the un-, 2-mono-, 3-mono-, 6-mono-, 2,3-di-, 2,6-di-, 3,6-di-, and 2,3,6-tri-substituted anhydroglucose units (AGUs). Comparative analysis of the chemical shift data revealed the relationship between the methyl substituents at the 2-, 3-, and 6-positions and the ^{1}H and ^{13}C chemical shifts of the AGUs; additivity could be applied to the ^{1}H and ^{13}C chemical shifts of methylcellulose. Quantitative ^{13}C NMR spectra of the samples determined the composition of the eight AGUs and the substituent distribution at the 2-, 3-, and 6-positions of cellulose. This provided estimations of the hydroxyl group reactivity toward methylation and the interactions between the substituent groups within the same AGU.

グルコース残基(AGU)が β-(1→4) 結合をした直鎖状多糖であるセルロースの誘導体化は主に水酸基のエーテルもしくはエステル置換で行なわれる. その物性を決定する構造因子は分子量, 置換基種, とその置換度(DS)であるが, 近年の研究によって置換基の分布状態が各種物性に影響を与えることが明らかになっている. 例えば最も単純なセルロースエーテルであるメチルセルロース(MC)はDS = 1.3–2.5で水溶性を示し, DS>2.5では有機溶媒に可溶となる. 一方, 完全均一系で合成したMCはDS > 0.9で水溶性となる[1]. つまり同一のDSであっても合成条件でその物性が変化し, 置換基の分布状態が物性に影響を及ぼすと考えられている.

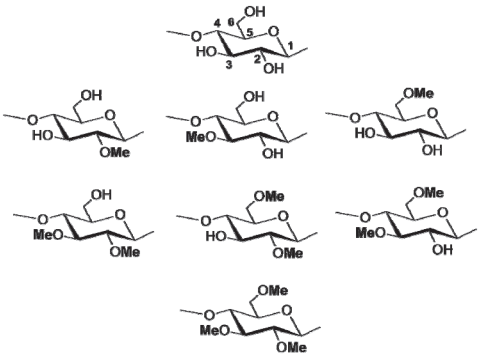


Fig. 1. Eight AGUs in MC chains

現在までに筆者はカルボキシメチルセルロース[2]や酢酸セルロース[3]の物性とその置換基の分布状態について検討を行い, カルボニル炭素共鳴線を用いて書各セルロース誘導体に含まれる8種類の各AGU(Fig. 1)を決定できることを明らかにした. その結果, CAについては溶媒への溶解性とAGUモノマー組成に強い相関があることを明らかにできた. 本研究ではMCについて, その構成モノマー組成を決定する方法を構築し, DS変化に伴うモノマー組成変化から, メチル化反応におけるセルロース水酸基の反応性について明らかにすることを目的とした.

MCは漂白セルロースパルプをイソプロパノール－50% NaOH水溶液（1:1）混合溶液でCH_3Iを加え, 60℃で4時間反応させ, 中和, 洗浄, 乾燥後, MC**1**を得た. この操作を4回繰り返すことでDSが異なるMC **1**–**4**を得た. DMSO-d_6に溶解し, NMR測定(500MHz)を行なった.

多糖誘導体, セルロース, モノマー組成

○こうのひろゆき

定量^{13}C NMRスペクトル解析からMC **1**–**4**のDSは順に0.66, 1.27, 1.64, 2.38であった．MC **1**および**4**について各種2D測定を行ない，8種の構成AGUの化学シフト帰属を行った結果，各残基の化学シフトはDSに依存せず，グリコシド結合を介した隣接AGUによる影響は無視できることが明らかになった．次にメトキシ基に置換されたピラノース環の2，3および6位炭素について，^{13}C定量スペクトルに波形分離を行なった結果，各波形は相関係数r^2=0.996以上でLorentz近似できること，さらに各Lorentz波形の面積強度に基づいて，MC **1**–**4**に含まれる8種のAGUのモル分率を決定した．

セルロース水酸基の反応性はいずれのDSでも2位>6位>>3位の順であった．また各AGUのモル分率変化については，DS増加に伴い未置換が減少し，置換されたグルコース残基が増加した．DS=0.66で一置換AGUが減少し始め，二置換および三置換AGUが急激に増加した．二置換AGUはDS=2.38で減少し，最終的に全て三置換化することが確認された．いずれもCMCのモル分率と同様の傾向となった[4]．一および二置換体のモル分率変化に注目すると，低DSでは，2-monoと6-mono-AGUの生成が急激に進行し，3-mono-AGUは殆ど存在しなかった．その後6-mono-AGUは減少し，同時に二置換AGUが生成し始めた．2, 6位の反応性は極めて高く，二置換AGUでは2,6-di-AGUが主に生成することが明らかになった．CMC合成における各AGUのモル分率では2,3-di-AGUのモル分率が2,6-および3,6-di-AGUよりも極めて低い値であったが，MCでは2,3-di-AGUと3,6-di-AGUのモル分率はほぼ同一であった．つまりMCでは同一AGUにおける2位および3位置換基における立体障害がCMCに比べて低いことが確認された．

以上の結果からMC合成における置換反応は以下のように進行すると考えられる．

・反応初期～一級水酸基である6位水酸基と酸性度が最も高い2位水酸基が優先してメチル化され，一置換AGUが生成すると同時に分子間水素結合が切断され，擬似的な均一状系反応に近づく．

・反応中後期～2-mono-AGUと6-mono-AGUは隣接AGUの6 位および2位水酸基の反応性を向上させ，2,6-di-AGUの生成を促進する．また3位置換基と2位水酸基の置換基相互作用は低く，3,6-di-AGUの2,3-di-AGUのモル分率に大差が現れない．最終的に未置換水酸基のメチル化により，三置換AGUとなる．

今後は置換基鎖長と置換基による立体障害を変化させ，そのDSと化学シフト，モル分率変化の関係性を明らかにすることで，アルキルセルロースの反応機構を明らかにする予定である．

References

[1] Hirrien, M., Desbrières, J., & Rinaudo, M. (1996). Physical properties of methylcelluloses in relation with the conditions for cellulose modification. *Carbohydrate Polymers, 31,* 243–252.

[2] Kono, H., Oshima, K., Hashimoto, H., Shimizu, Y., & Tajima, K. (2016). NMR characterization of sodium carboxymethyl cellulose 2: Chemical shift assignment and conformation analysis of substituent groups. *Carbohydrate Polymers, 150,* 241–249.

[3] Kono, H., Oka, C., Kishimoto, R., & Fujima, S. (2017). NMR characterization of cellulose acetate: mole fraction of monomers in cellulose acetate determined from carbonyl carbon resonances. *Carbohydrate Polymers, 170,* 23–32.

[4] Kono, H., Fujita, S., & Tajima, K. (2017). NMR characterization of methylcellulose: Chemical shift assignment and mole fraction of monomers in the polymer chains. *Carbohydrate Polymers, 157,* 728–738.

P46

^{2}H NMRを用いたオルガノソルブリグニンの溶媒との反応性評価

○熊谷　洸[1]，宮川　利文[1]，小山　啓人[1]，川又　勇来[2]，吉川　琢也[2]，
中坂　佑太[2]，増田　隆夫[2]
1出光興産株式会社
2北大院工

Quantitative analysis of the reactivity between organosolv lignin and solvent by ^{2}H NMR

○Hiromu Kumagai[1], Toshifumi Miyagawa[1], Yoshihito Koyama[1], Yuki Kawamata[2], Takuya Yoshikawa[2], Yuta Nakasaka[2], Takao Masuda[2]
[1] *Advanced Technology Research Laboratories, Idemitsu Kosan Co., Ltd. Chiba, Japan.*
[2] *Division of Applied Chemistry, Faculty of Engineering, Hokkaido University.*

The major components of plant biomass are cellulose, hemicellulose and lignin. In these components, lignin which is a polycondensate of aromatic compounds, attracts a lot of attention as alternative material for chemical products. However, due to the complexity of its composition, it is difficult to develop effective separation techniques and applications. In recent years, a lot of solvent extraction methods have been studied as separation techniques for lignin from plant biomass. In these reports, solvent addition to lignin has been reported. But it is difficult to evaluate the reactivity between lignin and solvent by direct analysis, since lignin is complex mixtures. Therefore, we report the novel experiment using the deuterated solvent and the novel method for the quantitative analysis of the reactivity between lignin and alcoholic solvent by ^{2}H NMR.

【序論】

植物バイオマスの主要成分はセルロース、ヘミセルロース、リグニンである。これらの中でも芳香族化合物の重縮合体であるリグニンは、化成品の代替原料として注目を集めているが、その組成の複雑さから、有効な分離技術および用途開発が課題となっている。植物バイオマスからのリグニン分離技術として、近年、溶媒抽出法が数多く研究されている。そこでは、リグニンへの溶媒付加が報告されているが、リグニンは非常に多くの成分からなるため、直接的な分析により、溶媒との反応性を評価することは難しい[1-3]。そこで今回、重水素化した溶媒を用いたリグニン抽出モデル実験および^{2}H NMRによる新たな評価法を見出したので報告する。

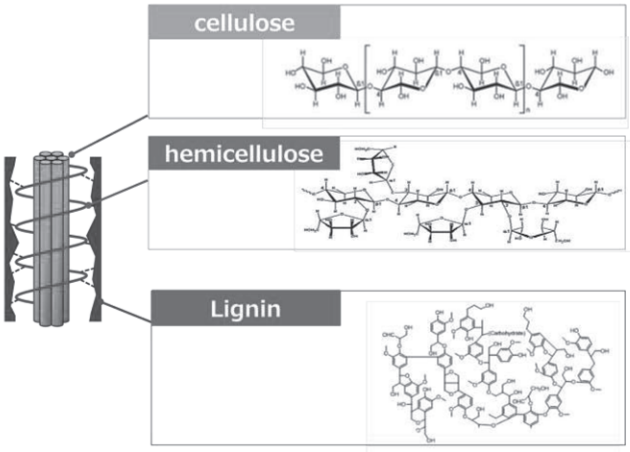


Fig. 1. Schematic illustration of plant biomass components.

リグニン、^{2}H NMR、ブタノール

○くまがい　ひろむ、みやがわ　としふみ、こやま　よしひと、かわまた　ゆうき、よしかわ　たくや、なかさか　ゆうた、ますだ　たかお

【実験】

1. モデル実験

原料バイオマスにバガスを用い、1-butanol-d_{10}と水を添加して、回分式処理装置で200℃、2時間処理した。得られた処理溶液は、固形分と液相とを濾別し、濾液の有機相と水相を液／液分離した。有機相の溶媒を留去し、真空乾燥することでリグニンモデルサンプルを得た。

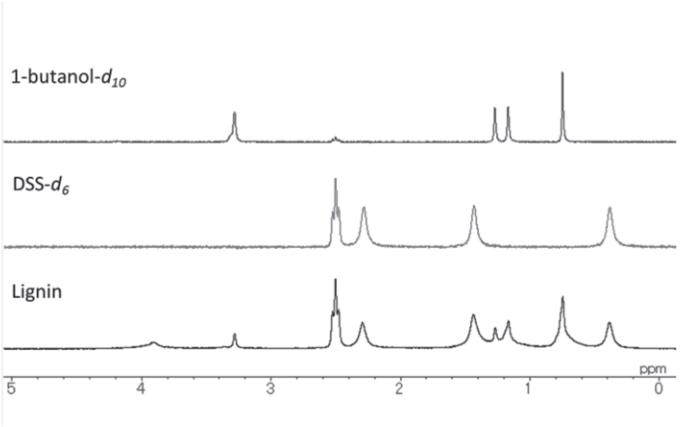


Fig. 2. ^{2}H NMR spectra.

2. ^{2}H NMR測定実験

装置は、ブルカー・バイオスピン(株)社製DRX500を使用した。プローブは、TCI 5φクライオプローブ、分光計は、AVANCE Ⅲ HDを用いた。

モデルサンプルとして得られたリグニンを、内部標準物質であるDSS-d_6を含むDMSOで溶解し、^{2}H NMR測定を行った。

【結果と考察】

リグニン、DSS-d_6、1-butanol-d_{10}の^{2}H NMRスペクトルをFig.2に示す。Fig. 2より、モデルサンプルの^{2}H NMRスペクトルでは、δ ＝3.9 ppm付近にDSS-d_6と1-butanol-d_{10}には帰属されないピークが観測された。化学シフトの範囲から、本ピークはリグニン中の芳香族アルコールと1-butanol-d_{10}が反応して形成された芳香族エーテルに由来するピークである可能性が示唆された。よって、重水素化された溶媒を用いた実験および^{2}H NMRを用いた評価により、従来では評価することが困難であったバイオマスからのリグニン抽出過程におけるリグニンと溶媒との反応性が評価出来る可能性が示唆された。また、内部標準であるDSS-d_6のピークを基準とし、δ ＝3.9ppm付近のピーク積分値を評価することで、リグニンに対する1-butanol-d_{10}の反応量も評価することが出来る。発表では、リグニンと溶媒との反応性について議論する。

【謝辞】

本研究は、科学技術振興機構(JST)の先端的低炭素化技術開発(ALCA)からの助成により行った。

【参考文献】

(1)E. K. Pye and J. H. Lora, TAPPI JOURNAL, March 1991, vol. 74 (3) .

(2)B. M. Yurevich, B. Alex, D. H. Thomas, et. al., U. S. Patent, No. 135,804, A1 (15 February 2010).

(3)B. Alex, U. S. Patent, No. 097721, A1 (15 February 2011).

P47

高速磁場サイクリングNMRによるフッ素化スルホン酸アイオノマー水溶液の19Fのスピン格子緩和速度の測定

○山口　真
技術研究組合FC-Cubic

Fast field cycling NMR measurement of spin-lattice relaxation rate of ^{19}F in perfluorinated sulfonic acid ionomers in aqueous solution

Makoto Yamaguchi
Fuel Cell Cutting-Edge Research Center, Technology Research Association

Spin-lattice relaxation rate profiles of perfluorinated sulfonic acid ionomers with long or short side chains were measured in aqueous solutions by the fast field cycling (FFC) NMR method. While the relaxation rate obeys power law with index of -3/2 at high Larmor frequency (>5MHz) and shows little temperature dependence, it becomes almost constant below 0.5MHz and decreases with temperature. These features are explained by the one-dimensional limited defect diffusion model and consistent with hydrophobic polymer chains being tightly packed in particles dispersed in water. Effects of molecular structure and solvent are also briefly discussed and the method provides information on dynamics of ionomers which can complement structural information on dispersed particles by microscopic and small angle scattering studies.

ナフィオンなどのフッ素化スルホン酸アイオノマーは，PTFEと同じ疎水性骨格と超強酸のフッ素化スルホン酸末端の側鎖がミクロに相分離し高いプロトン伝導性を発現するため，固体高分子形燃料電池のプロトン伝導膜や触媒層に用いられている．製膜時の原料となる水アルコール混合溶媒の高濃度溶液中では粒子は凝集しており，オートクレーブ処理により単分子鎖の粒子に分散すると考えられ，我々は処理前後のSAXS測定から単分子鎖の粒子構造と規則配列構造形成を明らかにし，高速磁場サイクリング（Fast Field Cycling : FFC）NMRによる19F核のスピン格子緩和速度の測定結果もこれと整合的と報告したが，周波数依存性の解析は不十分であった[1].

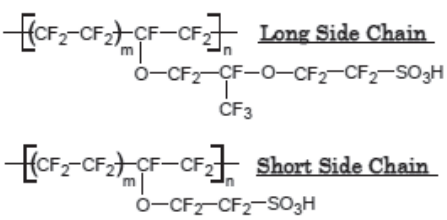


Fig. 1 Structural formula of PFSA ionomers

その後，市販のフッ素化スルホン酸水溶液がアルコールを全く含まず粒子サイズの均一度が高く，側鎖構造や等価重量（EW）が異なる高濃度の試料が入手可能であることがわかり，これらを用いてフッ素化スルホン酸アイオノマーの分散粒子の構造や凝集状態に対する濃度やEW，側鎖構造，溶媒組成の影響を各種の分析手法を援用し進めている．今回は^{19}F核のFFC-NMRによるスピン格子緩和速度の測定から分散粒子の内部運動を考察した結果を報告する．

試料はナフィオンと同じ側鎖をもつ長側鎖型（Long side chain : LSC）のFumatech社のfumionと短側鎖型（Short Side Chain : SSC）のSolvay社のAquivionの水溶液を用いた．FFC-NMR測定はStelar

ナフィオン，高分子電解質，欠陥拡散モデル

○やまぐちまこと

社SpinMaster2000で行った．分極磁場（Larmor周波数27.5MHz）を印加して縦磁化を生成し，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．これを緩和磁場強度をLarmor周波数5kHz～40MHzの範囲で変えて測定した．測定温度は30～70℃である．

Fig.2はEW1000のLSCアイオノマー水溶液（LSC1000と記す）のスピン緩和速度を示す．ラーモア周波数5MHz以上では実線で示す指数-3/2のべき乗則に従い，温度依存性はほとんどみられない．一方，1MHz以下では周波数依存性は非常に小さく，温度とともに緩和が遅くなる傾向を示す．指数-3/2のべき乗則はKimmichらによる欠陥拡散モデル[2]で説明され，拡散領域が有限なため低周波数側で緩和速度一定となる．アイオノマー粒子の内部では疎水性の主鎖が規則構造をとると推定され，PTFEで観察されるらせん反転欠陥に類似した主鎖欠陥の拡散が緩和に寄与するが，側鎖の存在で拡散領域が制限されていると推測される．欠陥とその一次元拡散領域の長さをパラメータとして実測値をフィッティングし，欠陥の拡散係数の活性化エネルギーは約20kJmol^{-1}と見積もられた．

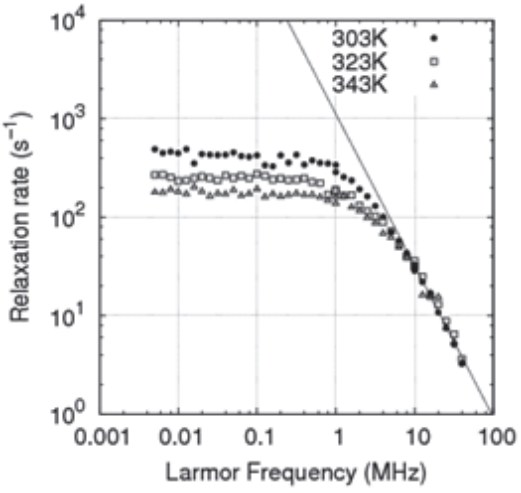


Fig. 2. ^{19}F Spin-lattice relaxation rate of LSC1000 aqueous solution

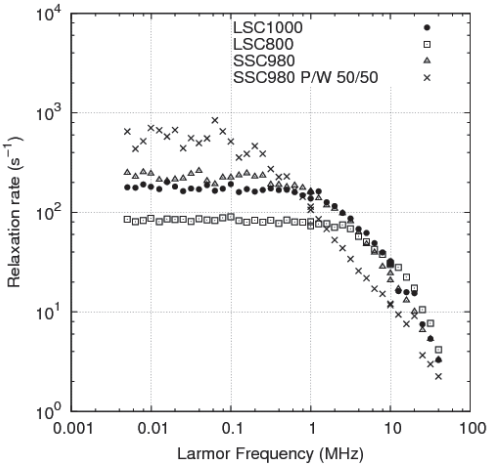


Fig. 3. ^{19}F Spin-lattice relaxation rate of 5wt% LSC and SSC PFSA ionomer solutions at 343K

Fig.3は各種アイオノマーの緩和速度を比較した．数字はEWを示す．LSC800は高周波数側でLSC1000と同じべき乗則に従い，緩和がわずかに速いが，低周波数側ではLSC1000よりも遅く，3MHz付近から緩和速度がほぼ一定となる．またSSC980はLSC1000と非常に近い緩和速度を示したが，溶媒に1-プロパノールを含む場合は高周波数側でべき乗の指数がおよそ-1に変化し，低周波数側での緩和速度も2倍程度になった．前者はアルコールの添加による側鎖の運動性向上を示し，後者はそれによって粒子間の相互作用が生じたためと推測される．

以上のように，フッ素化スルホン酸アイオノマーの均一分散した水溶液のスピン格子緩和時間の周波数依存性から粒子内の分子鎖の凝集状態や粒子間の相互作用の変化が議論できる可能性が示され，SAXSや顕微鏡観察などから得られる静的な構造を補完する動的な状態の解析手法として活用できる見通しが得られた．

本発表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．

References (1)山口真，松永拓郎，雨宮一樹，大平昭博，長谷川直樹，篠原和彦 (2016) 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，第55回NMR討論会，p100. (2) Kimmich, R., Voigt, G. (1978) Defect Diffusion Models in NMR and Dielectric Relaxation. *Z. Naturforsch. 88a*, 1294-1306.

P48

エチレンビニルアルコール共重合体の含水状態における気体の拡散特性

○松下晴香, 吉水広明
名古屋工業大学大学院　工学研究科

Diffusion properties of ethylene vinyl alcohol copolymer swollen by water

○Haruka Matsushita, Hiroaki Yoshimizu
Department of Engineering, Graduate School of Science, Nagoya Institute of Technology

In this study, the effect of water on ethylene vinyl alcohol copolymer was investigated using deuterium oxide for the purpose of studying the properties of it. As the result,we could confirm a small amount but strongly bond water molecule.

＜緒言＞

高分子膜には程度の差こそあれ高いガスバリア性を有する特徴があるものが存在し，産業や医療など様々な分野に利用されている。エチレンビニルアルコール共重合体(EVOH)はガスバリア性を有する代表的なポリマーで，ポリエチレンテレフタラート(PET)やポリ塩化ビニル(PVC)よりもこの特徴が強いとされ，広く使われている。一般にガスバリア性は結晶化度が高くかつ非晶層が緻密なものほど優れる傾向にある。結晶相はその格子サイズや結晶構造にも依存するが，非晶相と比較して緻密で気体分子を通さないのが常識的である。そのため，ガスバリア性の良し悪しは，非晶相に依存すると考えられている。しかし，EVOH は親水性基であるヒドロキシ基を豊富に有するため，高湿度環境下ではガスバリア性が著しく低下することや，絶乾状態に比べわずかに吸湿した状態の方がガスバリア性は向上するという特異的な湿度依存性も知られている。含水状態における EVOH ではどのように気体が収着しており，結果としてそれがどのように透過性に影響を及ぼしているかのメカニズムは解明されていない。本研究では，含水状態における EVOH の気体透過機構を知る一歩として，メタンを収着させることにより EVOH の運動性がどのように変化するかの詳細を主に ^{1}H NMR 法で評価した。

＜実験＞

EVOH(クラレ社提供;エチレン含量 32 mol%)を 24 h 真空乾燥した後，二日以上 H_2O に浸漬させ，DSC・XRD 測定にて含水による EVOH の構造変化の有無を評価した。^{1}H パルス NMR 測定は Bruker Biospin 社製 minispec mq20 で行い，室温にてスピンースピン緩和時間，T_2 を測定して分子運動性を評価した。^{1}H NMR 測定は JEOL Resonance 社製 ECZ700R を使用し，観測周波数 700 MHz，温度は 25 ℃～100 ℃にて行った。市販の耐圧試料管(エムアールテクノロジー社製 PCAV-5)に試料片を入れ，所定分圧のメタンを導入して十分平衡収着状態となる時間放置してから測定に供した。

＜結果・考察＞

DSC および X 線回折測定から含水前後の結晶構造にほぼ変化がないことを確認した。^{1}H パルス NMR 測定の結果，乾燥状態では単一の非常に短い T_2 値が得られ，結晶・非晶両相の分子運動性はともに非常に低いと考察された。含水状態では結晶と非晶領域に対応すると考えられる二成分の T_2 値が観測されたので，含水状態では非晶部の運動性が高くなることが確認された。また，結晶相由来の T_2 値は乾燥試料の値と同じであり，含水状態であっても結晶相の運動性は変わらないことが指摘された。

EVOH, ^{1}H NMR, 高分子膜

○まつしたはるか, よしみずひろあき

乾燥サンプルの ^{1}H NMR スペクトルには，約 2 ppm 付近に微小ではあるがエチレン由来の広幅なピークが観測され，非晶相のごく一部分は揺らいでいると指摘できた。このサンプルに分圧で約 7 気圧のメタンを導入して得たスペクトルでは，約 3 ppm 付近に大きく観測されたシャープな遊離メタンのピークとともに，このエチレン由来のピークも強度はほぼ変わらず観測されたため，メタンは乾燥状態の EVOH へはほとんど収着していないと考えられる。一方，含水サンプルでは約 4.5 ppm 付近に広幅で大きな水分に由来するピークとともに，エチレン由来のピークも乾燥サンプルと比べ強度が大きく観測された。この結果から，非晶相の分子運動性は高くなっていると考察した。メタンを共存させた含水サンプルのスペクトルでは，このエチレン由来のピークは小さくなった。メタンの収着により非晶部の運動性が低くなったのではないかと考察される。以上のことから、EVOH 内に収着した CH_4 のピークを観測する測定条件を特定するには至らなかったが，含水サンプルにメタンが共存しているとスペクトルが変化することが確認された。

P49

NMR測定でわかるゴム状高分子に収着した気体の拡散性

○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

Diffusion of gas sorbed in rubbery polymer as found by NMR measurement

○Asami Miyashiro[1], Yoshimizu Hiroaki[1]
[1] *Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology*

As a study of a gas separation membrane, attention was paid to the movement of gas in the sample and the gas diffusion coefficient. In the laboratory of the past, measurement was carried out using the gravimetric method, but this time we attempted to calculate from NMR measurement. For the measurement, selective irradiation experiment and PFG-NMR measurement were carried out and compared with results obtained by the conventional method. As a result, since the respective gas diffusion coefficients became equivalent values, it was possible to measure the gas diffusion coefficient using NMR measurement.

Measurement was carried out using three kinds of samples having different proportions of the mixture. Therefore, we examine how the difference in ratio influences the gas diffusion coefficient. Also, the relationship between NMR measurement and gas diffusion coefficient was also discussed.

＜緒言＞

近年、高分子膜を用いた気体分離膜の需要が高まってきている。この高分子膜を用いての気体分離の利点として、必要なエネルギーが気体の圧力差のみであるため、低エネルギーかつ低コストだという点が挙げられる。核磁気共鳴法(NMR法)は原子・分子レベルでの静・動的構造を検討することに優れているため、膜分離に大切な膜物質の性質について精密に測定することが可能である。本研究では気体分離膜の研究として膜内の気体の動き、気体拡散係数に着目して実験を行った。そこで従来の方法で求めた気体拡散係数とNMR法を用いて求めた結果を比べた。試料にはゴム状高分子であるブタジエンゴムを用いた。一般的に、ゴム状高分子のセグメントは活発にミクロブラウン運動をしているため、気体拡散性が高く、試料中に存在している気体分子の運動性が高いため、NMR信号の検出が比較的容易であるといえる。また比較試料としてブタジエンゴムにアクリロニトリルが共重合した共重合ゴムを用いてNMR測定と機械拡散係数の相関について考察を行った。収着気体には材料との相互作用がなく、収着気体と遊離気体のピークが明確に観測されるXeガスを用いた。

＜実験＞

試料作製としてブタジエンゴムを溶液キャスト法により膜厚0.1㎜の薄膜を作成した。まず従来の方法での気体拡散係数測定として重量法を用いての実験を行った。試料の入った容器にガスを導入していき、その時の重量の変化から気体拡散係数を算出した。

その後NMR法を用いての気体拡散係数測定を試みた。耐圧のNMR管に試料を詰め、十分に真空引きしたのちXeガスを7atm導入し、収着平衡に達するまで十分な時間をおいたのちに測定を開始した。行った実験は選択照射実験とPFG-NMR測定である。まず選択照射実験ではNMR測定で検出された遊離気体側のピークにのみ選択的に照射することで、遊離気体側のピーク信号を消すこ

気体拡散係数、Xe、ゴム状高分子

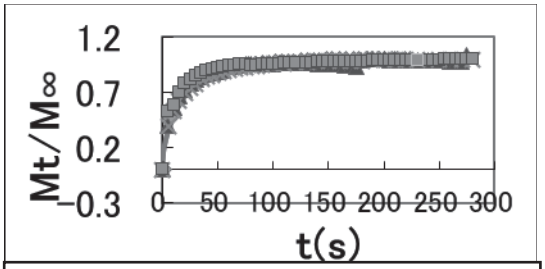
○みやしろあさみ、よしみずひろあき

とができる。観測までの間に試料の中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が減衰する。観測までの時間を0秒から5秒まで変化させてその減衰から気体拡散係数を測定した。PFG-NMR測定ではdiffusion time 20ms、δ 0.5ms　として磁場勾配をかけていき、そのピーク減衰から気体拡散係数を算出した。

アクリロニトリル-ブタジエン共重合ゴム(NBR)を用いた実験ではアクリロニトリルの割合の異なるNBR15,NBR29,NBR37を用いて変化を観察した。行った実験は重量法とNMR測定である。この2つの結果から関連を考察した。

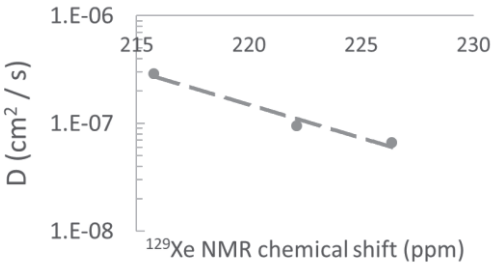
＜結果・考察＞

重量法では重量変化の曲線が任意の圧力に対して同様の曲線を描いたため、圧力依存がないことが確認できた。この曲線から近似式を用いて気体拡散係数を算出した。



Fig,1　Time dependence Xe sorption relative for　BR membrane.

NMR測定では選択照射実験では照射時間を長くするにつれて若干ではあるがピークの減衰が確認できた。そのためこの減衰から気体拡散係数を算出した。PFG-NMR測定では磁場勾配を高くするにつれてピークの減衰が確認できた。以上の結果から従来の方法で求めた気体拡散係数とNMR測定で求めた2つの気体拡散係数の値が同等の結果を示したため、NMR法を用いての気体拡散係数測定が可能になったといえる。



Fig,2　Correlation between NMR and gas diffusion coefficient.

NBRを用いた実験では重量法で求めた気体拡散係数ではアクリロニトリルの割合が多くなるにつれて気体拡散係数が低くなっていた。このことからアクリロニトリルが膜内の気体の動きを制限をしていることが考えられる。NMR測定ではアクリロニトリルの割合によってピークの化学シフト値が異なった。重量法の結果とNMR測定の結果を組み合わせることによって新たな気体拡散係数の算出ができるのではないかと思う。

P50

揮発性有機化合物（クロロエチレン）標準液の定量NMR法による精確な濃度校正法の検討

○斎藤直樹[1]、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

Study on an Accurate Calibration Method of Concentration of the Standard Solution of Chloroethylene as a Volatile Organic Compound by Quantitative ^{1}H NMR Spectroscopy

○Naoki Saito[1] and Toshihide Ihara[1]
[1]*National Metrology Institute of Japan, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Ibaraki, Japan*

In this study, we performed an accurate calibration of concentration of the chloroethylene standard solution by quantitative ^{1}H NMR spectroscopy (qNMR). We examined optimal conditions for possibilities to decrease volatilization of chloroethylene in preparation of a measured solution in addition to NMR measurements. By sampling the chloroethylene standard solution dissolved in methanol-d_4 at sample temperatures of -20 ˚C to -80 ˚C, molar ratio of chloroethylene and methanol-d_3 showed high constant value. When the solution sampled at the sample temperature of around -80 ˚C was measured with qNMR, molar ratio of chloroethylene and methanol-d_3 showed higher constant value when the head space in the NMR tube was around 25 % or less. By performing a calibration of concentration of the chloroethylene standard solution utilizing methanol-d_3 as an internal standard under these conditions, the calibration value was 117 mg/kg. Because the concentration of methanol-d_3 had been determined accurately using a reference material with qNMR, the calibration value would have been evaluated accurately.

1.　はじめに　　土壌汚染対策法の一部改正に伴い、土壌および地下水中のクロロエチレンの基準値が設定されたことから、正確な定量分析のために信頼性が確保された分析機器校正用のクロロエチレン標準液の整備が求められている。しかし、クロロエチレンは常温気体であるため取扱いが難しく、その標準液を精確に調製することは困難である。そこで、あらかじめ目標濃度付近に大まかに調製されたクロロエチレン標準液に対して、近年適用範囲が広がる^{1}H核磁気共鳴法による定量分析（以下、定量NMR法）[1)2)]での濃度校正を検討した。特に、NMR測定に供する試料溶液の調製ならびにNMR測定の際に、クロロエチレンの有意な揮発を抑えるための最適条件を模索した。

2.　実験　　分析試料にはメタノール-d_4を用いて100 mg/L程度に調製されたクロロエチレン標準液（関東化学製）を用い、定量NMR法における^{1}H信号量の基準に用いる内標準物質には当該標準液に含まれるメタノール-d_3を用いた。このとき、当該標準液の調製に使用された溶媒であるメタノール-d_4を別途用い、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（関東化学製）を内標準物質として、メタノール-d_3の濃度をあらかじめ決定した。また、試料調製ではミクロ天びんあるいはウルトラミクロ天びん（メトラー・トレド製）、NMR測定には^{1}H核の共鳴周波数として400 MHzあるいは600 MHzのNMR装置（日本電子製あるいはバリアン製）、解析ソフトウェアにはMestReNova ver.7.0.2（MestreLab製）をそれぞれ用いた。なお、NMR測定では繰返し待ち時間を90秒以上、積算回数を128回～256回、測定温度を25 ℃を基本条件とした。

chloroethylene, qNMR, sample preparation

○さいとうなおき、いはらとしひで

3. 結果と考察

【3･1 NMR管への分注操作による影響】 アンプル封入されたクロロエチレン標準液を開封ならびにNMR管へ分注する際、大気中へクロロエチレンが有意に揮発する可能性が考えられた。そこで、異なる試料温度で開封およびNMR管へ分注する実験を実施した(Fig. 1a)。その結果、試料温度が-20 ℃付近（◆）の場合では、25 ℃付近（■）の場合に比べてクロロエチレンとメタノール-d_3の物質量比が約6 %増加した（Fig. 1c）。一方、試料温度が-80 ℃付近（▲）の場合では、-20 ℃付近（◆）の場合と同等の物質量比が得られた。したがって、試料温度を-20 ℃～-80 ℃として当該アンプルを開封およびNMR管へ分注することで、クロロエチレンの有意な揮発を抑えた正確な分注操作を実現できると考えられる。

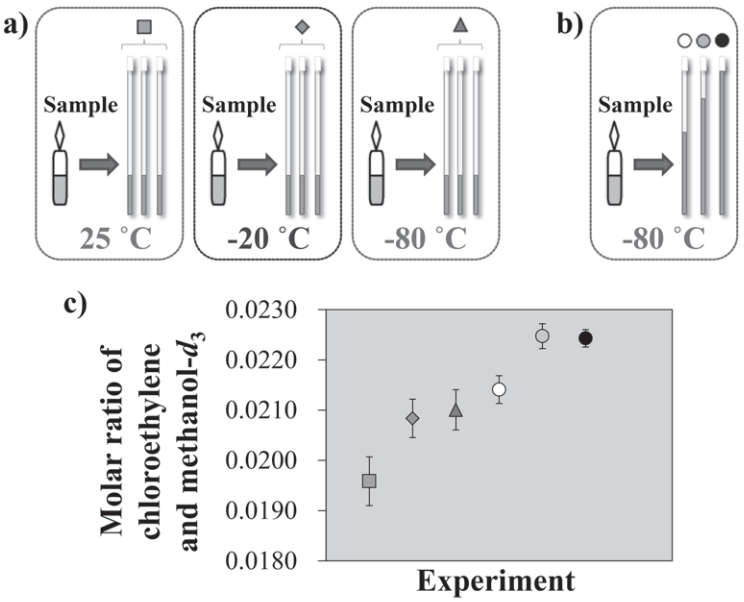


Fig. 1 Effect of volatilization of chloroethylene. The bar indicates the doubled standard deviation.

【3･2 NMR管内のヘッドスペースによる影響】 クロロエチレン標準液が分注されたNMR管を繰返し測定した際、クロロエチレンとメタノール-d_3の物質量比の変化は認められなかったが、クロロエチレンの気液分配係数がメタノール-d_3のそれよりも小さいと予想されたため、NMR管内のヘッドスペースの体積と当該物質量比に相関がある可能性が考えられた。そこで、試料温度を-80 ℃付近（3･1参照）として、NMR管内のヘッドスペースが異なるようクロロエチレン標準液の分注量を変化させる実験を実施した（Fig. 1b）。その結果、ヘッドスペースが約25 %（●）の場合では、約72 %(▲)の場合に比べてクロロエチレンとメタノール-d_3の物質量比が約7 %増加した(Fig. 1c)。一方、ヘッドスペースが1 %以下（●）の場合では、約25 %（●）の場合と同等の物質量比が得られた。したがって、NMR管内のヘッドスペースが25 %以下となるようにクロロエチレン標準液をNMR管へ分注することで、正確な定量測定を実現できると考えられる。

【3･3 メタノール-d_3を基準としたクロロエチレン標準液の濃度校正】 3･1で得た知見から、試料調製の際のクロロエチレンの有意な揮発を防ぐためには、内標準物質を添加する操作を省略するなど調製操作の簡略化が必須であると考えた。そこで、クロロエチレン標準液をNMR管へ分注する操作のみでクロロエチレンの濃度校正を実現するために、当該標準液に含まれるメタノール-d_3を内標準物質として用いる方法[3)]を活用した。その結果、100 mg/L程度に大まかに調製された当該標準液中のクロロエチレンの濃度を117 mg/kg ± 1 mg/kg（±の後の値は繰返し測定の標準偏差を2倍したもの）と十分な精度で校正することができた。今後、当該標準液の密度測定を行うことで、ここで得た校正値を一般に必要とされるmg/Lの単位に変換する予定である。なお、メタノール-d_4に含まれるメタノール-d_3の濃度をあらかじめ決定した際、内標準物質である1,4-ビス（トリメチルシリル）ベンゼン-d_4よりも有意に揮発する傾向があることを確認した。そのため、メタノール-d_3の濃度を正確に評価する際にも、NMR管への分注操作における試料温度ならびにNMR管内のヘッドスペースを考慮した適切な条件で実験を実施することが不可欠であると考えられる。

参考文献1) S. K. Bharti and R. Roy, *TrAC-Trends. Anal. Chem.*, **35**, 5 (2012). 2) N. Saito et al., *Accred. Qual. Assur.*, **22**, 171 (2017). 3) T. Kato et al., *Anal. Sci.*, **32**, 729 (2016).

P51

^{19}Fと^{1}H間NOE効果及びNMR緩和速度測定によるルテニウムを含む新規有機金属イオン液体の構成と動態の研究

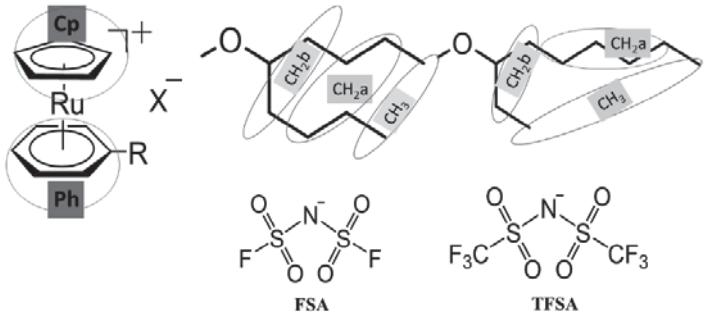
○鄭　智海[1]，桑原　大介[2]，持田　智行[3]
[1]電通大　情報理工学研究科,[2]電通大　研究設備センター
[3]神戸大　大学院理学研究科

Configurations and dynamics of ruthenium-containing organometallic ionic liquids studied by Nuclear Overhauser Effects between ^{19}F and ^{1}H nuclei and NMR relaxation-rate measurements

○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*

We prepared four new ionic liquids containing ruthenium. These ionic liquids have different high viscosities in room temperatures; we could not determine the crystal structures under glass transition temperatures around -60 °C. In order to study what makes the difference of their viscosities, we performed one-dimensional (1D) Heteronuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy (HOESY) NMR experiments and usual relaxation-rate ($1/T_1$ and $1/T_1$) measurements. We determined the intermolecular cross-relaxation rates between some cation blocks and the anion in each ionic liquid by analyzing the experimental data based on the extended Solomon differential equations. As a result, we could determine several intermolecular distances between the cations and anions in the new ionic liquids. This is the first NMR application in which the intermolecular cross-relaxation rates of such highly viscos heteronuclear multiple-spin systems as the four ionic liquids were determined and the intermolecular distances were determined without the support of any X-ray data.

序論



2016 年、金属ルテニウム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などに起因する。この研究では、NMR 実験データのみ(X 線結晶解析不可能)から見たイオン液体分子間距離および運動相関時間をすべて決定しました。この 2 種類の情報に基づいて、我々は 4 つの新しいイオン性液体の粘度変化の主な原因を解明した。

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

理論

ソロモン拡張微分方程式[2]により、カチオン多スピン系、陰イオン 1 スピン系のイオン液体を時間 t=0 に近い時点で観測する。これにより、物理系を理想的な 2 スピン系状態にする。この状態では交差緩和速度曲線がソロモン微分拡張方程式[2]により線形となるので、比例定数の形として交差緩和速度が計算できる。観測したカチオン分子相関時間と交差緩和速度を双極子-双極子相互作用による交差緩和速度関係式に代入すると、各々分子間サイトの平均距離が得られる。

結論&考察

Table 1. Motional correlation times, τ_c , at 25°C of the ^{1}H nuclei contained in each block of the four ionic liquids.

	$\tau_c \,/10^{-9} s$				
	CH_3	$CH_2^{(a)}$	$CH_2^{(b)}$	Cp	Ph
C4C4-TFSA	1.793	2.312	2.610	2.021	2.876
C4C4-FSA	1.875	2.357	2.638	2.113	2.876
C2C6-TFSA	1.455	1.760	2.101	1.704	2.458
C2C6-FSA	1.551	1.863	2.178	1.785	2.438

Table 2. Average distances from individual ^{1}H sites contained in a block in the four ionic liquids to the fluorine site interacting with the block.

$r/$Å	CH_3	$CH_2^{(a)}$	$CH_2^{(b)}$	Cp	Ph
C4C4-TFSA	3.98	4.10	4.12	4.00	3.98
C4C4-FSA	3.71	3.73	3.86	–	3.86
C2C6-TFSA	4.04	3.84	3.85	3.98	3.96
C2C6-FSA	–	3.21	3.17	3.26	3.10

本研究では、新しく調製したイオン性液体の粘度の違いを明らかにするために、1D HOESY NMR 実験と通常の緩和速度測定を行った。本発明者らは、カチオン ^{1}H 共鳴とアニオン 19F 共鳴との間の交差緩和速度を、ソロモン微分方程式を研究中の 4 種類のイオン液体のような多重スピン系に拡張することを決定した。その結果、カチオン部分の運動状態および成分カチオンとアニオン間の配置（すなわち、分子間距離）に関する詳細な情報を得ることができた。強調すべき重要な点は、4 つのイオン液体のような高度に粘性のある液体の分子間距離が、X 線データを支持することなく決定されたことである。得られた詳細な情報のおかげで、4 つのイオン性液体の室温より低い粘度の差は、主に成分カチオンの側鎖の運動状態に起因することが解明された。我々は現在、ガラス転移温度付近の成分イオンの静的および動的挙動を解明するために、4 つのイオン性液体の固体 NMR 研究を行っている。近い将来、詳細が報告されます。

[1]T. Higashi, T. Ueda, T. Mochida. *Phys. Chem. Chem. Phys.***2016**, *18* 10041.

[2]I. Solomon, *Phys.Rew.1955*, *99* 559.

P52

拡散NMRと誘電分光法を用いたマウス臓器の水分子ダイナミクス解析

○川口翼[1]，青山剛志[2]，齋藤徹哉[2]，喜多理王[2]，新屋敷直木[2]，八木原晋[2]，福崎稔[3]，増田治史[4]
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
4東海大学医学部生体構造機能学

Molecular Dynamics of Water in Mouse Organs Analyzed by Means of NMR Diffusometry and Dielectric Spectroscopy

○Tsubasa Kawaguchi[1], Tsuyoshi Aoyama[2], Tetsuya Saito[2], Rio Kita[2], Naoki Shinyashiki[2], Shin Yagihara[2], Minoru Fukuzaki[3], Haruchika Masuda[4]
[1] *Graduate School of Science and Technology, Tokai University*
[2] *Department of Physics, School of Science, Tokai University*
[3] *Kumamoto Liberal Arts Education Center, Tokai University*
[4] *Department of Physiology, Division of Basic Medicine, Tokai University School of Medicine*

The dynamics of water structures of mouse organs; liver, heart, spleen, and kidney were observed by Dielectric Spectroscopy (DS) and NMR diffusometry. Control and disease model mice were prepared for the samples. The dielectric relaxation time τ evaluating mobility of water molecules indicates a significant difference between the control and disease groups. However, there was no difference among respective organs for the control group. On the contrary, the diffusion coefficient did not show any differences between control and disease, but it did show difference between organs. These results were considered to reflect the characteristic spatial scale of each measurement technique. The dynamical water structures were also quantitatively analyzed by means of the fractal concept and Ryabov's expression, and different water structures between control and disease organs were suggested. Further consideration to conjugate DS and NMR data will be discussed in the session.

生体は多量の水を含み、水が動的に生体物質と相互作用をとることで様々な機能を発現する。逆に言えば、水の"動的構造"を解析することができれば、生体の評価を行えると期待されるが、直接水のダイナミクスを観測することは実験的に難しいこともあり、これまで十分な理解がなされていない。誘電分光法は水などの構成分子が永久双極子モーメントを持つ物質に電場を印加することにより、分子回転に起因するダイナミクスを誘電緩和過程として観測する手法である。一般に、水の特徴的な緩和は常温でGHz域(ピコ秒域)に現れることが知らており、Time Domain Refrectometry (TDR)法などの手法で水の回転ダイナミクスを直接観測することができる。また最近では、得られた緩和パラメータからフラクタル次元の概念を取り入れた解析[1)]を用いることで、定量的な水構造評価を行える。一方で、拡散NMR法では分子の並進拡散係数を測定することができる。本研究ではTDR法による誘電分光とPFG-STE法[2)]による拡散NMR法を複合的に用いることで、マウス臓器内の水構造解析を行い、病態の識別を検討する。

水分子ダイナミクス，NMR Diffusometry，誘電分光法
○かわぐちつばさ，あおやまつよし，さいとうてつや，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，ますだはるちか

測定試料として、健常および炎症疾患(敗血症)モデルマウス(8 週齢 種別：C57BL/6J オス、測定前日に LPS 20 mg/kg BodyWeight 投与)の 2 群および水素水(Aquela)または脱気水を飲水させて育てた 2 群の計 4 群のマウスをそれぞれ 10 個体用いた。致死量の麻酔下に、心腔内穿刺による脱血後、心臓、肝臓、腎臓、脾臓を摘出し測定を行なった。誘電分光法では摘出直後に臓器に直接電極を接触させることで、NMR では 2mm 径のガラスキャピラリーに裁断した臓器を詰め込むことで測定を行なった。なお、本実験は東海大学が定める「動物実験計画書」を提出し承認を受けた(承認番号:141077)。

得られた誘電緩和曲線に対し、以下に示す Cole-Cole式[3]を用いたカーブフィッティングを行い、誘電緩和パラメータを算出した。

$$\varepsilon^* = \varepsilon_\infty + \frac{\Delta\varepsilon}{1+(j\omega\tau)^\beta} \quad (0 < \beta \leq 1) \quad (1)$$

ここで、ε^*、ε_∞、j、ωはそれぞれ複素誘電率、光学領域における誘電率、虚数単位、角周波数である。また、$\Delta\varepsilon$、τ、βは緩和強度、緩和時間、緩和時間分布パラメータであり、それぞれ水分量、運動に要する平均時間と不均一性を表している。Fig. 1にそれぞれの条件における水の緩和時間を示す。各プロット、エラーバーはそれぞれ10個体の平均値、標準偏差である。健常群と疾患群間で有意な差が認められたが、水素水の有無では有意差は認められなかった。興味深いことに、健常群では臓器間の緩和時間に有意差は認められなかった一方で、拡散係数は臓器間で有意に異なる値を示した。これは、NMRと誘電分光の各測定手法の観測時空間スケールの大小に起因する結果を表しているためと考えられる。

さらに水構造の違いを定量的に議論するため、Fig. 2に示すτとβの関係から健常群・疾患群それぞれに対し以下に示すRyabovの式[1]を用いてフラクタル次元d_Gを求めた。

$$\beta = \frac{d_g}{2}\frac{\ln(\tau\omega_s)}{\ln(\tau/\tau_0)} \quad (2)$$

ここで、ω_s, τ_0はそれぞれ分子拡散の特性周波数、カットオフ時間である。健常・疾患群ではそれぞれ有意に異なるフラクタル次元が得られたことから、病態による水構造の違いが検出されたと言える。発表では拡散係数も加え、相補的な水構造解析に迫る。

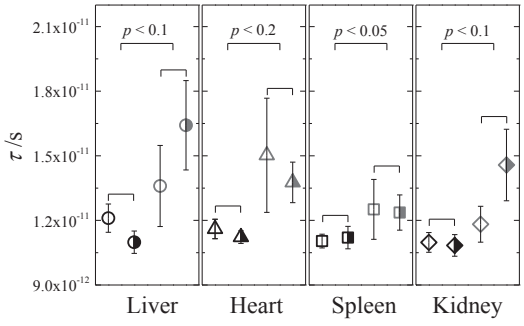


Fig. 1. The relaxation time of water for organs. Black and red plots represent control and disease groups, respectively. Half-filled plots represent hydrogen-water intaking sample. The error-bars are standard deviation for 10 samples.

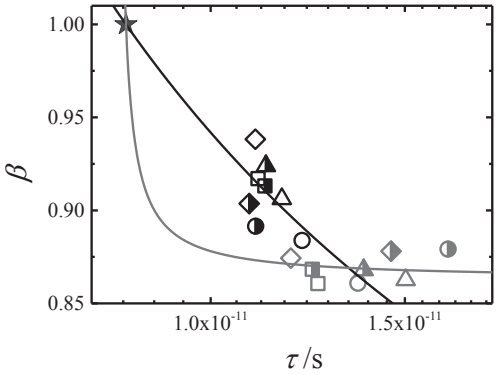


Fig. 2. The τ-β diagram for mouse organs. The blue star plot represents pure water and other plot assignments are same with those in figure 1. Black and red lines show trajectories for the fractal analysis for control and disease samples with the fractal dimension of 0.87 and 1.73, respectively.

References

(1) Ryabov, Y. E., Feldman, Y., Shinyashiki, N., and Yagihara, S. (2002) *J. Chem. Phys.*, 116(19), 8610-8615.
(2) Tanner, J. E. (1970) *J. Chem. Phys.*, 52(5), 2523-2526.
(3) Cole, K. S., and Cole, R. H. (1941) *J. Chem. Phy.*, 9(4), 341-351.

P53

PFG-NMRによる木材中における水分子の異方的な動的挙動の解析

○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]，
須藤誠一[5]，鈴木養樹[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]東海大学理学部物理学科
[4]東海大学熊本教養教育センター
[5]東京都市大学共通教育部
[6]森林総合研究所

Analysis of anisotropic dynamic behavior of water molecules in wood by PFG-NMR

○Yuki Hori[1], Tsubasa Kawaguchi[2], Rio Kita[3], Naoki Shinyashiki[3], Shin Yagihara[3], Minoru Fukuzaki[4], Seiichi Sudo[5], Suzuki Youki[6]

[1]Graduate School of Science, Tokai University
[2]School of Science and Technology, Tokai University
[3] Department of Physics, Tokai University
[4]Liberal Arts Education Center, Kumamoto Campus, Tokai University
[5]Liberal Arts and Sciences, Tokyo City University
[6]Forestry and Forest Products Research Institute

Diffusion phenomena of water molecules in wood samples of Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) were observed by pulsed field gradient stimulated-echo NMR method with the diffusion time from 20ms to 800ms. The measuring parts were cut out for each direction along the fiber or the radial direction to analyze anisotropic behaviors of the diffusion of water molecules. As a result, the diffusion coefficient in fiber direction was larger than radial direction. Therefore, it is considered that the difference in the diffusion coefficient in the direction obtained in our result is well corresponding to the wood structure. From these results, the analysis of the diffusion process of water molecules in the view point of anisotropy is an effective tool to evaluate the organizational structure of the wood.

木材の構造には異方性が存在し、性質も異なる。一般に地面から垂直方向を繊維方向、木材を繊維方向から見た断面の中心から外側の方向を半径方向と呼ぶ。本研究では水分子の拡散係数の異方性が木材の構造をどのように反映しているか明確にすることを見出すことを目的とする。

試料には福島県只野市のスギ（*Cryptomeria japonica*）の頂上高8.5mの部分を使用した。この試料の辺材、心材部分における繊維、半径方向をそれぞれ5mmφのNMR管にはいる大きさにカットし、

磁場勾配NMR、木材、水分子ダイナミクス

○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，すどうせいいち，すずきよういき

純水に浸漬させたものを使用した。拡散計測には、STimulated Echo(STE)法[1]を用いて、拡散時間Δを変化させることによって各時間領域での測定を行った。拡散係数Dを求めるために、下式のStejskal-Tannerの式[2]を拡張指数関数型にしたものを用いた。

$$I_{(g)}/I_0=\exp(-(\gamma^2 g^2 \delta^2(\Delta-\delta/3)\cdot D)^{\beta}) \quad (0<\beta\leq 1) \quad (1)$$

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、βは拡散係数の分布の不均一性を表す。右辺の$\gamma^2 g^2 \delta^2(\Delta-\delta/3)$をq-valueと呼ぶ。

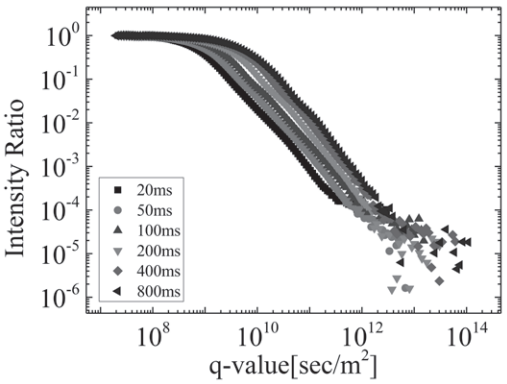


Fig. 1. The relationship between Intensity Ratio and q-value for radial direction of heartwood. A diffusion time Δ was varied from 20 to 800 ms.

Fig. 1は、各時間域での心材の半径方向におけるシグナル強度比とq-valueの関係を示す。拡散時間の増加と共にプロットが右にシフトしていることから、水分子が細胞壁に衝突する頻度が増加することによって拡散係数が減少したと考えられる。これらのデータについて（1）式で表される拡散過程を3つ重ね合わせてフィッティングを行い、得られたDとβをまとめたものがFig. 2である。拡散係数が一番大きい成分であるFig. 2 (a)において、拡散時間が小さいところにおいて純水の拡散係数に近いことと、βの値が1に近いことから細胞内腔や細胞壁の間で液体状に存在する自由水だと考えられる。また、拡散時間の増加と共に繊維方向よりも半径方向の方が減少した。針葉樹であるスギは、主に中が空洞で繊維状の細胞である仮道管が繊維方向に伸びており、それが放射状に集まり木部を形成していることが知られている。つまり、繊維方向より半径方向の方が細胞壁に衝突する頻度が多くなるため、その影響が表れたと考えられる。

これらの結果を踏まえて、異方性の観点からの水分子拡散過程の解析は、木材の組織構造を評価するのに有効なツールであると考えられる。

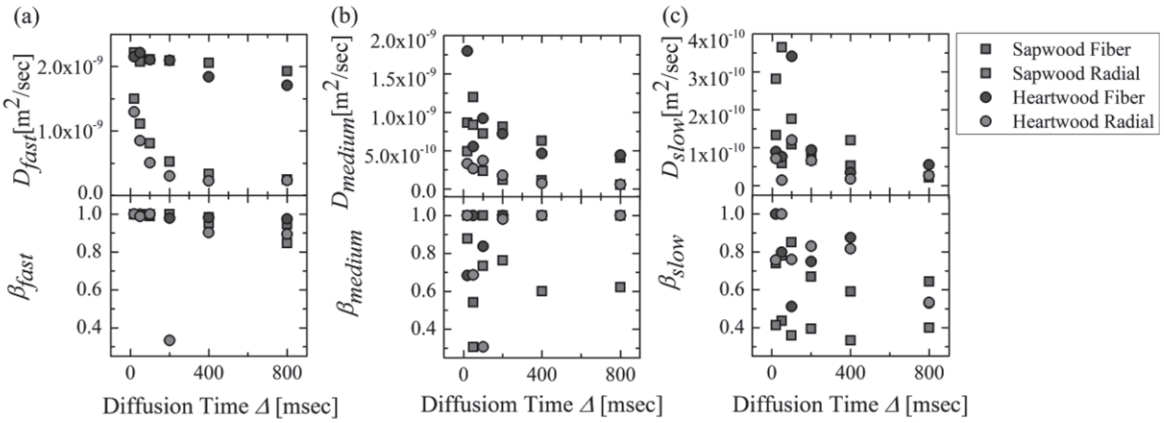


Fig. 2. Diffusion time dependences for diffusion coefficient and distribution parameter in fast component (a), medium component (b) and slow component (c).

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).

P54

LIB用多層膜セパレータのイオン拡散挙動

○堀池 則子，栗間 昭宏，橋本 康博
旭化成株式会社　研究・開発本部　基盤技術研究所

Ion diffusions behavior in multi-layer separators analyzed by PGSE-NMR and NOESY

○Noriko Horiike, Akihiro Kurima, Yasuhiro Hashimoto
Analysis & Simulation Center,　ASAHI KASEI CORPORATION

Lithium ion diffusion behavior in the separator micro-pore is expected to have significant impact on the power characteristics of the lithium ion battery. In the case of the multi-layer separators, several factors such as 1) lithium ion diffusion within the individual layer, and 2) the inter-layer migration, may affect the electric resistance. Here, PGSE-NMR and NOESY studies were carried out for the ceramic coated polyolefin separator to comprehensively understand the lithium ion migration behavior with respect to its influence on the power characteristics of the battery.

１．諸言

リチウムイオン二次電池（LIB）の出力特性を理解するには、セパレータ細孔内でのリチウムイオンの拡散挙動を把握することが重要であり、このリチウムイオンの拡散係数を直接計測可能なPGSE-NMRは非常に有用なツールである。

LIB用多層膜セパレータは、各層内部のイオン拡散挙動に加え、層間に抵抗層が存在するか否かが出力特性に影響を与える。これまで層間の抵抗層の有無は解析が困難であったが、今回モデル膜のPGSE-NMR解析において制限拡散パターンが観測され、層間にイオンの障壁となる界面が存在することを直接捉えることができた。さらに、NOESYから界面を通過して層間を移動するイオンを定量的に解析し、界面が出力特性に与える影響を考察した。

２．実験方法

多層膜セパレータは無機層/ポリオレフィン層/無機層(5μm/6μm/5μm)の3層構造で(Fig.1)、無機層中のバインダー量を変えたモデル膜Ⅰ～Ⅲ（出力特性：Ⅰ＞Ⅱ＞Ⅲ）を用いた。これに電解液を含浸させ、セパレータを重ねてサンプル管に導入してPGSE-NMR測定を行うことにより、膜厚方向の^{7}Li、^{19}F観測によるカチオンおよびアニオンの自己拡散係数を得た。Δを20 ms～800 msまで変化させ、Δ依存性によりセパレータ内部のイオン拡散挙動を評価した。電解液には1M LiTFSI EC-MEC[1:2(vol.)]を用い、自己拡散係数D /m^2·s^{-1} は式１に基づく拡散プロットから求めた。

NOESYはPGSE-NMRと同一試料で、mixing time を20 ms～800 msまで変化させて測定した。

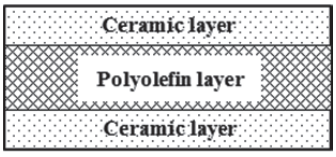


Fig.1　Multi-layer separator

$$\ln(E/E_0) = -D\times(\gamma^2\delta^2 g^2(\Delta - \delta/3)) \qquad \text{式１}$$

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}·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·m^{-1}

PGSE-NMR，NOESY，リチウムイオン二次電池

○ほりいけ のりこ，くりま あきひろ，はしもと やすひろ

３．結果と考察

無機層とポリオレフィン層中に存在するイオンのNMR信号が分離することを確認し、尚且つΔを短くして（Δ 20ms, 拡散距離約2 μ mに相当）PGSE-NMR測定を行い、各層内のイオンの拡散係数を比較することが出来た。いずれの試料もポリオレフィン層より無機層のLi^+のほうが拡散係数が大きく(Fig.2)、無機層中のバインダー量がイオン抵抗とはならないことがわかった。Δが短い時には均一拡散であり拡散プロットは直線となるが、Δを長くしていくとLi^+、$TFSI^-$ とも特異的な回折パターンがみられた。まずは、感度の良い^{19}Fで$TFSI^-$ の拡散挙動を解析した結果(Fig.3)、回折パターンはイオンが障壁で跳ね返されて観測される“制限拡散”であり、膜厚違いのセパレータで検証するとプロットの回折位置が膜厚に応じて変化しており、第一回折が膜厚に相当することがわかった。これにより層間の界面に拡散障壁が存在し、イオンの移動が制限されていることを明らかにすることができた。

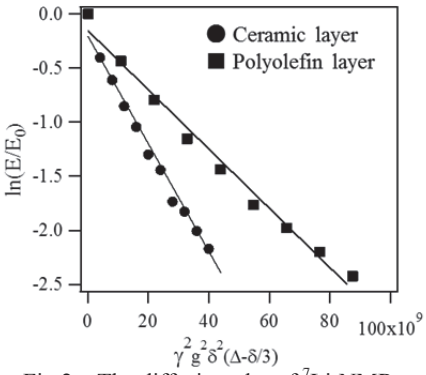


Fig.2 The diffusion plot of ^{7}Li-NMR for the Sample Ⅰ (Δ 20 ms).

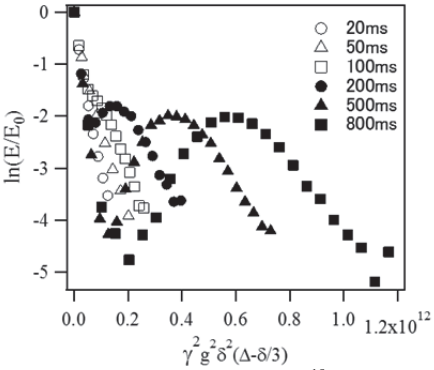


Fig.3 The diffusion plot of ^{19}F-NMR for the Sample Ⅰ (Δ 20 – 800 ms).

PGSE-NMRで観測されるイオン挙動は各層内での制限された拡散であり、層間を移動したイオンは観測されない。そこで、界面を通過し層間を移動したイオンを定量的に解析するため ^{19}F-NOESYを試みた(Fig.4)。mixing timeが短い時は交換ピークが検出されず、mixing timeが長くなるにつれ増大した。この交換ピークが層間を通過するイオンに相当すると考えられ、バインダー量が少なく出力特性が良好な膜ほど通過イオンの比率が多い結果となった(Fig.5)。また、通過イオン/全イオンと出力特性をプロットすると相関がみられた(Fig.6)。このように、界面が出力特性の重要な因子であることがPGSE-NMRとNOESYを組み合わせることにより明確となった。

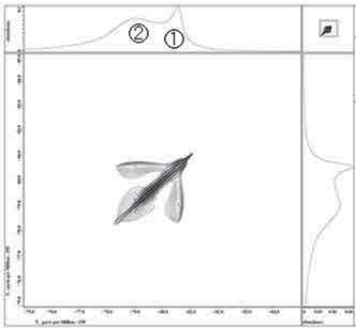


Fig.4 ^{19}F-NOESY spectrum of Sample Ⅰ (mixing time 500ms). $TFSI^-$ in ①Polyolefin and ② Ceramic layer.

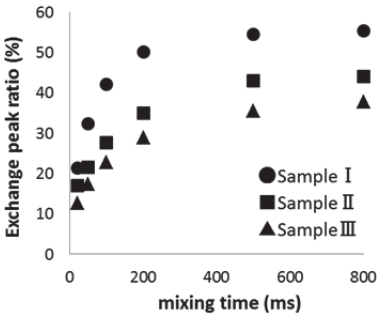


Fig.5 Increase of exchange peak ratio [=(exchange peak / (exchange peak + diagonal peak)] with mixting time.

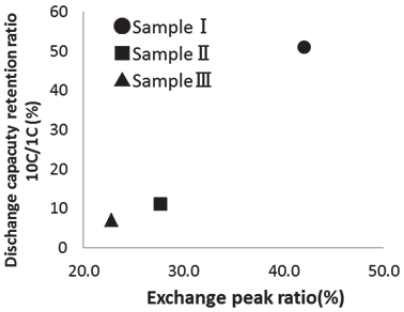


Fig.6 The relationship between exchange peak intensity (Δ100ms) and power characteristics.

参考文献

1) Hayamizu K. et al, *J. Phys. Chem. B,* 1999, **103**, 519-524

2) 早水 紀久子, *高分子論文集*, 2006, **63**, 1, 19-30

3) 橋本 康博, 森川 卓也, 吉野 彰, *BULLETIN OF THE NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE SOCIETY OF JAPAN*, 2015, **6**, 11

4) P.T.Callaghan, Traslational Dynamics & Magnetic Resonance, Oxford University Press, Oxford, UK, 2011

P55

水溶液中の重原子イオンと重原子に結合した炭素のスピン分極シフト

○横山拓海[1]，岡田瞭英[1]、高橋直哉[1]、中川直哉[1]、桑原大介[1]
[1]電気通信大学・大学院・情報理工学研究科

Spin polarization NMR chemical shifts of heavy atoms in aqueous solutions and of carbons bonded to heavy atoms in organometallic compounds

○Takumi Yokoyama[1], Ryoei Okada [1], Naoya Takahashi[1], Naoya Nakagawa[1], Daisuke kuwahara[1]
[1], *Faculty of Informatics and Engineering Graduate School of Science, The University of Electro-Communications*

In 1967, Nakagawa et al. [1] presented the article 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 researches on the calculations of the relativistic effect on the NMR chemical shifts. However, the relativistic effect has not been thoroughly investigated experimentally. In this work, we present the experimental observations for the chemical shifts of lead, iodine, potassium, lithium, cesium, sodium, bromine and rubidium covalently bonded to water molecules.

1．序論

1967 年に中川等は、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共有結合している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非常に大きいので、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イオンについて、水溶液の濃度変化と温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

最初に濃度約 15%の重水を作成した。この重水に様々な重金属化合物を溶かして試料溶液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 の間であった。それぞれの観測核については relaxation delay の値を緩和時間に近くなるように設定した。積算に関しては、濃度の薄い試料は、濃度の濃いものと同等の感度が得られるまで積算を行った。

試料の温度変化では、20℃から 70℃の間で温度を変化させて測定した。温度が変化した後は、温度が均一になるよう 10 分待って測定を行った。

ヨウ化カリウムの単結晶は、飽和溶液を常温で48時間以上静置して、作成した。

スピン分極、重原子、化学シフト

○よこやまたくみ，おかだりょうえい，たかはしなおや，なかがわなおや，くわはらだいすけ

3. 結果および考察

図 1 にヨウ化カリウムの単結晶の測定結果を示す。測定した核種はヨウ素である。ヨウ化カリウム水溶液のヨウ素は、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を行った。これに単結晶の測定結果を合わせることで、濃度が 5.0mol/kg よりも濃い、理論上溶媒ゼロの濃度での測定結果を得ることができた。また作成したヨウ化カリウムの単結晶においては、ヨウ素を測定することはできたが、カリウムの信号はまだ測定できていない。当日の発表では、カリウムの信号を報告したい。

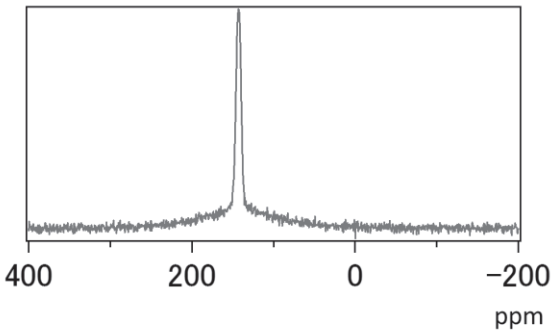


Fig1. NMR chemical shift of iodine in a KI single crystal.

次に、硝酸鉛溶液 1.5mol/kg の、鉛の測定結果を図 2 に示す。図 3 にはヨウ化リチウム溶液 5.0mol/kg の、リチウムの測定結果を示した。これらの測定結果は 30℃から 70℃まで 10℃間隔で測定したものである。図 2 と図 3 を比較すると、図 2 の鉛のほうが、図 3 のリチウムよりも温度変化による化学シフトの変化量が大きいことがわかる。スピン分極シフトの理論において、そのシフトの大きさは原子番号の 4 乗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。しかしながら、スピン分極シフトの温度変化に関しては、理論的に明らかにされていない。本研究の実験結果によってスピン分極シフトの大きさは、温度とともに変化することがはじめて実験的に明らかになった。

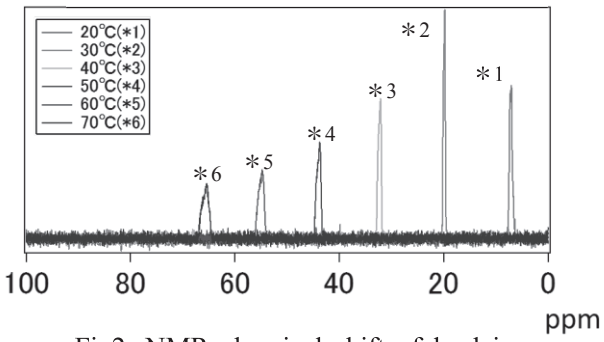


Fig2. NMR chemical shift of lead in $Pb(NO_3)_2$ solutions.

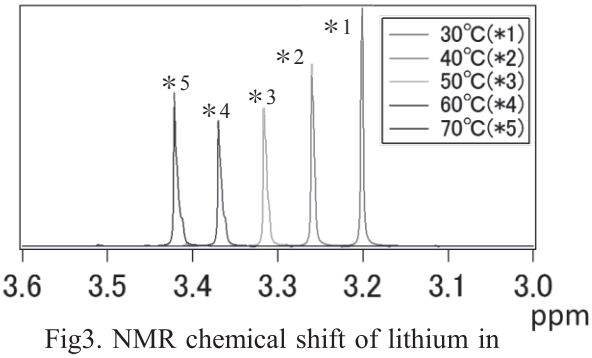


Fig3. NMR chemical shift of lithium in LiI solutions.

また、重原子に結合した炭素の化学シフトに特異な変化（フリップフロップ）が見られたこと、他の化合物水溶液における化学シフト温度変化の測定、他の核種の化学シフト濃度変化の測定などについては、当日の発表で報告する。

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

P56

高磁場極低温下のMAS-DNP固体NMRにより誘起された超偏極核磁化のスピン相関項成分の観測

○杉下友晃[1]，深澤隼[1]，松木陽[1]，藤原敏道[1]
[1]大阪大学・蛋白質研究所

Observation of spin correlated component in hyperpolarized nuclear magnetization induced by MAS-DNP solid-state NMR under a high magnetic field and an ultra-low temperature

○Tomoaki Sugishita[1], Jun Fukazawa[1], Yoh Matsuki[1], and Toshimichi Fujiwara[1]
[1] *Institute for Protein Research, Osaka University, Osaka, Japan.*

Recently, we have obtained nuclear hyperpolarization at a spin temperature much lower than 1 K by dynamic nuclear polarization (DNP) under a high magnetic field 16.4 T and a low temperature 30 K. As a result, the hyperpolarized state provided a spin correlated state in addition to the linear polarization given by the high temperature approximation. In this study, we will discuss pulse NMR experiments under magic-angle spinning for observing this spin correlated component and its application to the measurement of the absolute proton polarization through ^{13}C-NMR.

通常、NMR で扱う核ゼーマンエネルギーおよびラジオ波の周波数は小さく、ボルツマン分布に従って両準位のスピン占有数比は室温下では非常に小さい。それゆえ、平衡状態の密度演算子

$$\rho_{\mathrm{eq}}^{I} = \frac{1}{Z}\exp\left(-\frac{\hat{H}_0}{kT_I}\right) = \frac{1}{Z}\left(1 + \frac{\hbar\omega_I}{kT_I}I_z + \cdots\right) \qquad (1)$$

において指数関数展開後、^{1}H ゼーマンエネルギーが温度因子に比べて極めて小さいため、NMR では一般的に密度演算子として一次項のみを残すという高温近似がなされる。ここで、(1)の Z は分配関数、T_I はスピン温度、ω_I は I スピンの周波数を示している。しかし、近年は高磁場動的核分極（DNP）法の発展や極低温の達成により超偏極条件下での測定が行えるようになり、MAS-NMR 測定でもスピン温度 T_I をゼーマン項に匹敵するほどの低温にすることが可能となった。その結果、もはや高温近似は成り立たず、高次項を無視することができなくなってきている。

今、2 スピン系 IS の平衡状態の密度演算子を考えると、これは完全な形で以下のように書ける。

$$\rho_{\mathrm{eq}}^{IS} = \mathrm{Tr}\{I_z\rho\}I_z + \mathrm{Tr}\{S_z\rho\}S_z + \mathrm{Tr}\{2I_zS_z\rho\}2I_zS_z + \mathrm{Tr}\left\{\frac{1}{2}E\rho\right\}\frac{1}{2}E \qquad (2)$$

ただし、$\rho = (1/Z)\exp(-\hat{H}_0^I/kT_I - \hat{H}_0^S/kT_S)$である。通常偏極下では ^{13}C 一次項$S_z$の寄与$\mathrm{Tr}\{S_z\rho\}$と比較してスピン相関項$2I_zS_z$の寄与$\mathrm{Tr}\{2I_zS_z\rho\}$は一万分の一以下に過ぎないため、高温近似によってスピン相関項を無視できる。しかし、超偏極下では$\mathrm{Tr}\{2I_zS_z\rho\}$は $\mathrm{Tr}\{S_z\rho\}$の数%程度にすることが可能で、スペクトル上に現れるはずである。

本研究では、まず超偏極磁化におけるスピン相関項の観測を行った。また次のような式に従って、^{13}C 一次項とスピン相関項のピーク強度比から ^{1}H のスピン偏極率を得ることができる[1]。

$$\mathrm{Tr}\{2I_zS_z\rho\}/\mathrm{Tr}\{S_z\rho\} = 2\mathrm{Tr}\{I_z\rho\} \qquad (3)$$

従来、DNP 偏極率はサブミリ波照射の on/off 時のピーク強度比から推定されてきたが、このような方法で得られる値はラジカルの常磁性の影響によって一部のシグナル強度が弱くなったり消え

固体NMR，動的核分極（DNP），超偏極

○すぎしたともあき，ふかざわじゅん，まつきよう，ふじわらとしみち

たりしてしまっていることを考慮しておらず、純粋な熱平衡状態の磁化を反映しているとは言い難い。そこで、今回の手法が ^{1}H の絶対偏極率を正確、かつ直接測定できるような手法になり得るか検討した。

【実験】

一次項由来のピーク強度とスピン相関項由来のピーク強度を比較する必要があるため、これらのスペクトルを別々に得られるようなパルスプログラム（Fig. 1.）を作成した。また、スペクトル・シミュレーション（Fig. 2.）の結果から、スピン相関項の観測にはCH系が最も適していることが示されたため、^{13}C-^{1}H系をもつ2-^{13}C標識L-アラニンを試料として用いた。超偏極条件下の測定には当研究室で開発した電子スピン共鳴周波数460 GHz-^{1}H共鳴周波数700 MHzの固体DNP-NMR装置と閉回路ヘリウム冷却MASプローブシステム[2]を利用した。

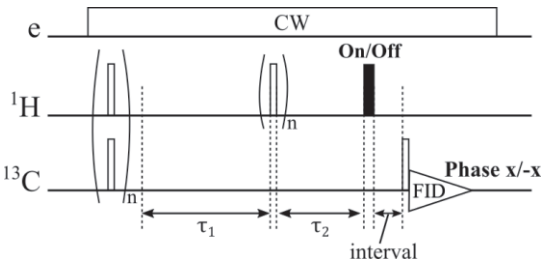


Fig. 1. Pulse sequence for observing the spin correlated component.
The black rectangle denotes a 180° pulse. Acquisition phase is inverted synchronously with on/off of the ^{1}H 180° pulse. The ^{13}C magnetization is recovered during τ_1 and ^{1}H hyperpolarization is created under DNP during τ_2 following the saturation. Alternatively, the ^{13}C magnetization can be prepared by cross-polarization from ^{1}H to improve the signal sensitivity.

【結果と考察】

35 Kの極低温下において高磁場MAS-DNP-NMR法によって得られた従来法から見積もったスピン分極の増大率は約1000倍であった（スピン温度約330 mK相当）。この超偏極を達成した条件で上述の試料の測定を行った。その結果、スペクトル上に通常偏極下では出現しなかったanti-phase形のピークが出現した。このピークはスペクトル上の交差分極（CP）パルスの有無やパルス間の待ち時間に関わらず同じ線形で出現した。このことから、CP期間の^{13}C^{1}H双極子相互作用によるスピン秩序やパルス間の相互作用によって現れたピークではないことが確認された。また、^{1}H磁化が飽和パルスによって消えているときにはシグナルは得られず、^{1}H磁化の成長と同期してピーク強度は強くなり、定常状態に至るとともに安定した。以上から、この測定において本研究の目的であるスピン相関項の寄与が観測されたものと考えられる。

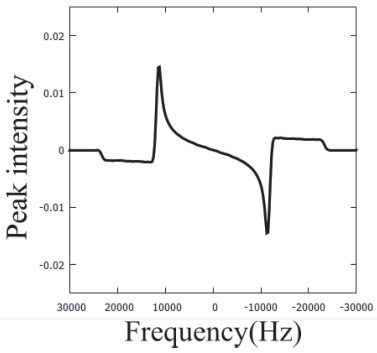


Fig. 2. Spectrum simulated for a ^{13}C-^{1}H system.
Spectrum due to the anti-phase term $2I_zS_z$ evolving under ^{1}H-^{13}C heteronuclear dipolar spin Hamiltonian. (This simulation does not take MAS into account.)

相関項由来のピークと一次項由来のピークについて、その強度比から得られた ^{1}H 偏極率は約5 %であった。この値は、スピン温度 330 mK 時における ^{13}C 観測の磁化一次項に対する相関項の寄与率 5.1 %とよい一致をみせた。以上から、この指標は偏極率の評価に利用できる新規手法であることが示された。

【References】

[1] B. Vuichoud et al. (2015) *J. Magn. Reson.*, **260**, 127-135.
[2] Y. Matsuki et al. (2016) *J. Magn. Reson.*, **264**, 107-115.

P57

高温DNPを指向した新規ガラスマトリックスの探索

○山田和哉[1]，藤原敏道[1]，松木陽[1]
1大阪大学・蛋白質研究所

Exploration of new glassy matrix for high temperature DNP

○Kazuya Yamada[1], Toshimichi Fujiwara[1], Yoh Matsuki[1]
[1] *Institute for Protein Research, Osaka University*

Dynamic nuclear polarization (DNP), which is able to enhance the sensitivity of solid-state NMR by orders of magnitude, is a powerful emerging technology facilitating the measurements of low-concentration molecules, such as large membrane protein assemblies and material surfaces or interfaces. Typically, the molecule of interest and a polarizing agent are dissolved or suspended in glycerol-water solvent that forms glassy matrix at ≈ 100 K. However, such low temperature suppresses most of the molecular motions that underlies the protein function and requires elaborate low-temperature MAS equipment. Known solvents having higher glass transition temperature such as *o*-terphenyl (OTP) have high melting temperature (≈ 330 K), and not suitable for biomolecules. In this study, we systematically explored a wide range of sugar/sugar-alcohol water binary solvents for “high-temperature” DNP at T ≳ 200 K. As a result, we discovered some promising glass forming compositions whose glass transition temperature was higher than 210 K. In the presentation, we will also discuss the stability of the polarizing agent in the matrix, the stability of the matrix itself, and the temperature dependent DNP enhancement.

【序論】 動的核分極(DNP)法は固体NMRの感度を2–3桁増強できる発展途上の方法で、サンプルに占める割合が希少である大型膜タンパク質複合体や、材料表面または界面に存在する分子を観測する上で有用である。DNP-NMR測定をする際、一般に分極剤と目的の試料をグリセロール・水系の溶媒(グリセロールマトリックス)に溶解または分散し、100 Kでガラス化する[1]。しかし、このような低温下ではタンパク質の機能発現に寄与する分子運動は抑えられ[2]、また液化冷媒か電気冷凍機を用いる大掛かりな低温MASシステムが必要である。一方、室温付近にガラス転移点を持つOTPなどは融点も330 K程度と高く[3]、生体高分子への応用には不向きである。ここに、低融点でガラス転移点が高い系が求められていた。本研究では、ガラス転移点が210 Kより高いマトリックスを用いてDNPにより感度増強できることを目指す。

【結果と考察】 松木らの最近の研究で、従来のグリセロールマトリックスよりキシリトールマトリックスは、高いガラス転移点を示すことが示唆されていた。そこで、本研究では探索の範囲を糖または糖アルコールに広げ、高いガラス転移点を持つ系を徹底的に探索した。-80 ˚C冷凍庫での冷却テストの結果、D-ソルビトール、L-イジトール、D-フルクトース、D-リボースと水の混合溶媒(8.5:1.5/8.25:1.75/8:2/7:3/6:4)が、200 K程度でガラス状に硬化した。高いガラス転移温度には、分子構造の非対称性に伴う水への高い溶解度が効いていると考えられる。

次に、これらの糖/糖アルコールについてガラスの安定性を次の様に確認した。微結晶α-グルコースを分散したソルビトール、フルクトース及びリボースマトリックス試料を調製し、-80 ˚Cで^{13}C CP-MASスペクトルの継時変化を見た。すると、ソルビトールマトリックスのみ、ソルビトール結

動的核分極(DNP)，**高温**DNP，**ガラスマトリックス**

○やまだかずや，ふじわらとしみち，まつきよう

晶化に対する鋭いピークが出現した(Fig. 1)。フルクトース及びリボースマトリックスでは、同様の結晶由来ピークは見られなかった。従って、高濃度なソルビトールマトリックスは結晶の析出を伴って劣化することを示唆しており、今後の検討ではソルビトールを除外した。

各種マトリックスの正確なガラス転移温度を、DSCを用いて計測したところ(Table. 1)、リボース及びイジトールマトリックスが210 Kを超えるガラス転移温度を示し、有望だと分かった。キシリトール及びフルクトースマトリックスでは、ガラス転移温度より40 ˚C程度高い温度領域で結晶化転移点が見られた。従って、これらのマトリックスは、ソルビトールマトリックスと同様に、長時間測定中には一部結晶化する恐れがある。グリセロール、リボース及びイジトールマトリックスでは、結晶化は見られなかった。

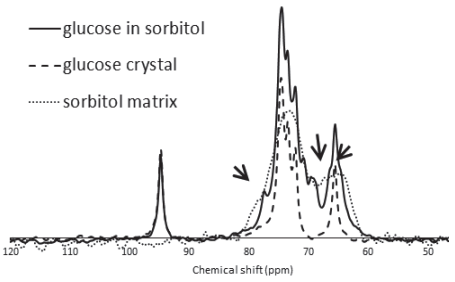


Figure 1. 1D ^{13}C CP MAS spectra of crystalline α-glucose suspended to sorbitol matrix, α-glucose crystal, and sorbitol matrix. The arrows indicate the sharp peaks of crystallized sorbitol.

Glycerol	165.9 K
Xylitol	183.3 K
Fructose	189.1 K
Ribose	214.3 K
Iditol	219.2 K

Table 1. Measured glass-transition temperature of various glassy matrices.

DNPによる感度向上のプローブ分子として用いる目的で、尿素、グルコース、プロリンのマトリックス候補への溶解度と安定性を調べた。結果、グルコースの溶解度は50 mM以下と低く、プロリンはリボースと反応して分解した。尿素は200 mM溶解し安定であったので、プローブとして尿素が最適と結論した。

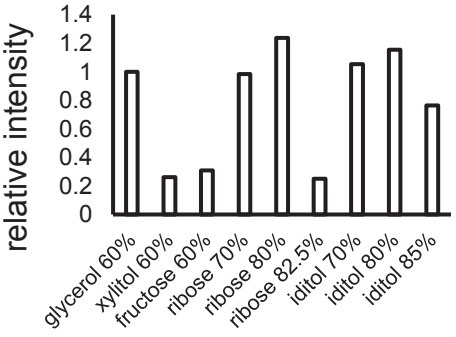


Figure 2. Relative ESR signal intensities of TOTAPOL in various matrices.

最後に、ESRを用いて溶液中のラジカル濃度を計測し、候補マトリックスへのTOTAPOLの溶解度と安定性を評価した。結果、糖/糖アルコールのキシリトール、フルクトース、高濃度(82.5%)リボースではESR信号強度が著しく低く、TOTAPOLの析出が示唆された。一方、低濃度なリボース及びイジトールでは、グリセロールマトリックスを用いた際との強度比が1に近くなり、TOTAPOLが完全に溶解していると考えられ、有望である(Fig. 2.)。フルクトースとリボースは還元性のアルデヒド基を持つため、TOTAPOLのラジカルを還元してしまう懸念がある。そこで、ラジカルを溶解したマトリックスを、室温と-80度下で保存した際のESR強度を求めた。結果、室温ではTOTAPOLが還元されたが、低温で保存した場合にはラジカル量が変わらず、低温下なら長時間測定可能なことが分かった。

発表では、^{1}H, ^{13}C T_1測定からガラスマトリックスの硬さの検討データ、DNPエンハンスメントの温度依存性も報告する予定である。

References

[1] Su, Y.; Andreas, L.; Griffin, R. G. (2015) Magic Angle Spinning NMR of proteins: High-Frequency Dynamic Nuclear Polarization and ^{1}H Detection, *Annu. Rev. Biochem.*, *84*, 465–497.

[2] Nakagawa, H.; Kamikubo, H.; Kataoka, M. (2010) Effect of conformational states on protein dynamical transition, *Biochim, Biophys. Acta*., *1804* (1), 27–33.

[3] Tateishi, K.; Negoro, M.; Kagawa, A.; Kitagawa, M. (2013) Dynamic nuclear polarization by photoexcited triplet electrons in a glassy matrix, *Angew. Chem. Int. Ed*., *52* (50), 13307–13310.

P58

センサリーロドプシンのレチナール構造変化に対する^{13}C NMR化学シフト値計算

○槇野　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

Quantum chemical calculation of ^{13}C NMR chemical shift for conformational change of retinal in sensory rhodopsin

○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.*

Sensory rhodopsin is a photo receptor with a retinal chromophore and has a function as phototaxis. *pharaonis* phoborhodopsin (*p*pR) shows a negative phototaxis during photocycle. So far, we have demonstrated the presence of N'-intermediate on the photoreaction pathway by *in-situ* photo-irradiation solid-state NMR experiments of [14, 20-^{13}C]Retinal-labeled *p*pR. The decay of N'-photointermediate with 13-*cis* configuration is very slow at -60 °C and the its chemical shift value of 20-^{13}C retinal at 23.9 ppm is unusual. In this study, we calculated chemical shift values of retinal by means of quantum chemical calculation to reveal the conformation of retinal in the photo-intermediates and interaction of retinal with protein. The calculations indicated that the N'-intermediate was generated by twisted conformation of retinal and the Schiff base interacted with D75 as counter anion.

［序論］

センサリーロドプシンはレチナールを発色団として持つ膜タンパク質であり、固有のトランスデューサータンパク質と複合体を形成し光走性を担う。高度好塩菌*Natronomonas pharaonis*中に存在するセンサリーロドプシンII(*pharaonis* phoborhodopsin: *p*pR)は近紫外光に対する忌避応答を示すことから、負の光走性を担う膜タンパク質として知られている。このような光走性は、*p*pRの発色団レチナールが光異性化反応に基づくフォトサイクルと呼ばれる特有の光反応過程を経て機能発現に至る。我々が開発をした*in- situ*光照射固体NMRを用いてレチナールの20位の炭素原子をモニタリングすることで、フォトサイクル中に存在するいくつかの光中間体を定常的に捕捉して構造変化に基づいた光反応経路を明らかにしてきた。レチナールの20-^{13}Cはその12C-13C=14C-15Cの配座変化に対して鋭敏に化学シフト値の変化を示す。その結果、M-中間体、O-中間体を観測するとともにさらに、13-*cis*型の配座を持つN'中間体の存在を明らかにし、そのN'中間体は低温では

in situ 光照射固体NMR，レチナール，化学シフト値計算

○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

減衰速度が極めて遅い・^{13}C-20の化学シフト値が他の13-*cis*型の中間体に比べて低磁場側に観測される、などの特徴を示してきた。

本研究では光中間体におけるレチナールの構造を明らかにすることを目的として、レチナールの20位の炭素に加え、14位の炭素が安定同位体標識されたレチナールを用いて光照射固体NMRによる化学シフト値の変化をモニタリングした。さらに量子化学的な計算手法を用いてレチナールの13-*cis*/*trans*,15-*syn*/*anti*の配座変化に対する化学シフト値計算から光中間体のレチナールの詳細構造を決定した。

[実験方法]

*pp*Rは*E. coli* (BL21)を用いて発現し、[14, 20-^{13}C] retinal-*pp*Rを調製した。得られたタンパク質試料はEgg-PC脂質二重膜に再構成した。NMR測定においては*in-situ*光照射固体NMR法を用いて、^{13}C CP-MAS NMRスペクトルを測定した。化学シフト値計算に関しては、Gaussian 09 パッケージを用いてGIAO法を用いて行った*pp*Rの結晶構造(PDB:1jgj)に対して、レチナールの13C=14C、および15C=ζN回りで二面角を回転させて、その各々に関して14-^{13}C 及び20-^{13}Cの化学シフト値を計算した。

[結果と考察]

-60°Cで520 nmの光照射条件の固体^{13}C NMR測定から、基底状態(G-state)の信号が減少しM-,O-,およびN'-中間体の信号が観測され、それらの化学シフト値はTable 1のようになった。G-stateと各中間体のレチナール配座はバクテリオロドプシンとの比較によって、G-stateはall-*trans*、M-中間体は13-*cis*,15-*anti*、O-中間体は13-*trans*,15-*anti*、N'-中間体は13-*cis*,15-*syn*であることが示唆された。また、N'中間体の化学シフトはほかの13- *cis*型の中間体よりも低磁場に観測され、-60°C条件下においては、熱的な緩和速度が極めて遅く、48時間以上経過してもG-stateに完全には戻らなかった。

Table 1. Experimental ^{13}C chemical shift values of retinal in *pp*R (ppm) at -60°C

		20-^{13}C	14-^{13}C	Configuration
*pp*R	G-state	13.6	121.6	13-*trans*, 15-*anti*
	O-intermediate	16.4	118.2	13-*trans*, 15-*anti*
	M-intermediate	22.6	127.1	13-*cis*, 15-*anti*
	N'-intermediate	23.9	115.4	13-*cis*, 15-*syn*

一方、量子化学計算を用いて、レチナールの13C=14Cのねじれに対する20位の^{13}Cの化学シフト値を計算したところ12C-13C=14C-15Cの角度依存的な化学シフト変化を得ることができた。この計算結果を用いて光照射固体^{13}C NMR測定の化学シフト値を評価したところN'中間体は13-*cis*配座よりも45度程度ねじれていることが明らかになった。同様にして、15C=ζNのねじれに対しても化学シフト値を評価すると、15-*syn*配座に比べておよそ45度ねじれた構造であった。このようにして、N'中間体のレチナールは13-*cis*,15-*syn*配座をねじった構造であることが示唆された。この構造はレチナールとK205との間の共有結合部位であるシッフ塩基に対するカウンターイオンであるD75との距離が近くなる構造である。そのため、一度生成したN'中間体では水素結合を介してlockされた構造となり、そのレチナール-タンパク質間相互作用は-60°Cにおける熱運動の揺らぎでは解消されない程度の大きさであることが考えられた。

以上のように、本研究は光照射固体NMRによる実験データについて量子化学計算を用いて調べることでユニークな光中間体の詳細構造とそのレチナール-タンパク質間相互作用を明かした。この結果はN'中間体を含むセンサリーロドプシンのフォトサイクルを理解するうえで有用な手法である。

P59

Pradimicin A/Mannotriose複合体の固体相関NMR

○須藤　亜紀乃[1]，中川　優[2,3]，渡邉　泰典[2]，
野田　泰斗[1]，竹腰　清乃理[1]
[1]京都大学大学院　理学研究科
[2]名古屋大学大学院　生命農学研究科
[3]理化学研究所

Solid-State NMR to the complex of Pradimicin A and Mannotriose

○Akino Sudo[1], Yu Nakagawa[2], Yasunori Watanabe, Yasuto Noda, and Kiyonori Takegoshi
[1]*Graduate School of Science, Kyoto University*
[2]*Graduate School of Bioagricultural Science, Nagoya University*
[3] *Synthetic Cellular Chemistry Laboratory, RIKEN*

Pradimicin A (PRM-A), which is a natural antibiotic derived from antinomycete, exhibits anti-HIV activity through selective recognition of D-mannopyranoside (Man) by forming a dimer structure in the presence of Ca^{2+}ion. PRM-A is considered having two Man binding sites. The first binding site has been clarified to be around the alanine part, however, the second one is not. In this study, we analyze the complex of PRM-A and Mannotriose (Man3), which is the sugar chain having the most simple branch, by using solid state NMR. By analyzing the build-up of cross-peaks between PRM-A and Man3 obtained with DARR, we postulate that the second site exists near the C8 position.

Pradimicin A (PRM-A; Fig. 1) は放線菌から単離された抗生物質であり、非ペプチド性の低分子化合物であるにも関わらず、Ca^{2+}存在下でマンノース (Man) と特異的に結合する[1,2]。PRM-Aは現時点でMan結合能を有する唯一の低分子化合物である上、Man結合に由来するユニークな抗HIV活性及び抗真菌活性を示す[3]ことから、天然物化学、創薬化学、糖鎖科学など多くの研究分野で注目されている化合物である。

PRM-AはManとPRM-A:Ca^{2+}:Man = 2:1:4で結合し、PRM-AにはFig. 2のようにManの一次結合部位と二次結合部位が存在する。一次結合部位に関しては単糖での実験によってalanine部分付近であることが判明している[4]。しかしながら、糖鎖との結合に重要とされている二次結合部位は未だに同定されていない。

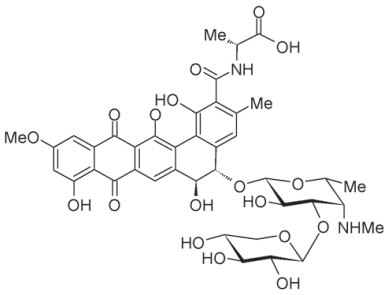


Fig. 1. Pradimicin A (PRM-A).

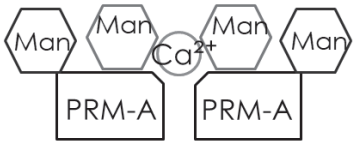


Fig. 2. Schematically depicted PRM-A/Man complex.
Two Man molecules in the middle express those binding to the first site, and the others on the outside express binding to the second one.

固体NMR、Pradimicin A、分子間相互作用

○すどうあきの，なかがわゆう，わたなべやすのり，のだやすと，たけごしきよのり

そこで本研究では二次結合部位を特定するためにPRM-Aと最も単純な分岐型糖鎖であるMannotriose (Man3) の複合体の固体相関NMR測定により結合部位を解析した。

試料はFig.3のように^{13}Cラベルした PRM-Aと、二つの非還元末端Manをそれぞれラベルした Man3との複合体である。ここで、ラベルしていない Man-OMeの6位炭素に結合するManを(A)、3位炭素に結合するManを(B)とする。固体相関NMR実験はDARR法を用いて14 T磁場中で行い、交差ピークの混合時間依存性を解析した。

二次元DARR実験を行うと、一次結合部位であるアラニン部分の炭素のピークおよび8位炭素のピークと(A)と(B)両方のMan3との相関ピークが確認できた。この結果は、一次結合部位には(A)と(B)のうちどちらかが選択的に結合するのではなく、ランダムに結合することを示している。また、二次結合部位はPRM-Aの8位炭素付近に存在することが示唆された。この結果を検証するために、PRM-Aのラベル位置をFig.4のように変えた試料で実験を行っており、詳細を当日発表する。

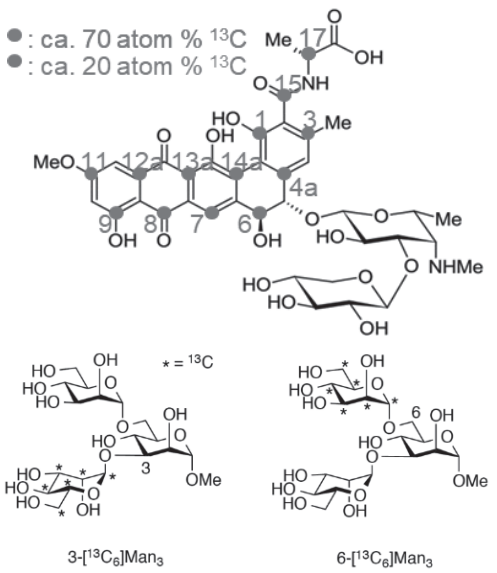


Fig. 3. ^{13}C lavel pattern in PRM-A (top) and Man3 (bottom).

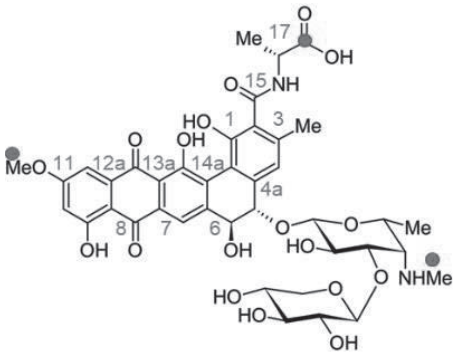


Fig.4. ^{13}C labeled PRMA-A at 18, 11-OMe, and 4'NHMe for new experiments.

謝辞

PRM-A産生菌を提供くださった富山県立大学の五十嵐康弘教授にこの場を借りて御礼申し上げます。また、糖鎖合成と複合体サンプルの調製に関してご助言いただきました理化学研究所の伊藤幸成先生に感謝申し上げます。

References

[1] T. Oki, M. Konishi, K. Tomatsu, K. Saitoh, M. Tsunakawa, M. Nishio, T. Miyaki, and H. Kawaguchi, *J. Antibiot.* 1988, **41**, 1701-1704.

[2] a) Y. Sawada, K. Numata, T. Murakami, H. Tanimatsu, S. Yamamoto, and T. Oki, *J.Antibiot*. 1990, **43**, 715-721; b) Y. Fikugawa, T. Ueki, K. Numata, and T. Oki, *Actinomycetol.* 1993, 7, 1-22.

[3] J. Balzalini, *Nat. Rev. Microbiol.* 2007, **5**, 583-597.

[4] a)Y. Nakagawa, Y. Masuda, K. Yamada, T. Doi, K. Takegoshi, Y. Igarashi, and Y. Ito, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2011, **50**, 6084-6088; b) Y. Nakagawa, T. Doi, Y. Matsuda, K. Takegoshi, Y. Igarashi, and Y. Ito, *J. Am. Chem. Soc.* 2011, **133**, 17485-17493.

P60

抗菌ペプチドHylin b1のpH変化に対する運動性の解析

○川村　出[1]，廣重 玲奈[1], Batsaikhan Mijiddorj[1,2]，松尾雄大[1]，上田一義[1]
1横浜国立大学・大学院工学府
2National University of Mongolia

Studies on pH dependence of the dynamics of antimicrobial peptide Hylin b1

○Izuru Kawamura[1], Reina Hiroshige[1], Batsaikhan Mijiddorj[1,2], Yuta Matsuo[1], Kazuyoshi Uedaeina[1]
[1] *Graduate School of Engineering, Yokohama National University, Japan,*
[2] *National University of Mongolia, Mongol.*

Hylin b1 and b2 are antimicrobial and hemolytic 19-residue peptides from frog skin secretions of the Brazilian tree frog *Hyla biobeba.* Only difference between those primary sequences is 14-position residue (hylin b1: His, b2: Gly). In this study, the influence of membrane interaction of the peptide by the protonation state of His14 is investigated by ^{31}P and ^{13}C solid-state NMR at pH 3.5 and 8.5. In ^{13}C DD-MAS of [1-^{13}C]Gly-labeled hylin b1 in DMPC at pH 3.5, the higher signal intensity is clearly seen in comparison to hylin b2. The side chain of His14 in transmembrane hylin b1 could be significantly protonated at pH 3.5. In addition, MD simulations for charged and uncharged His states show the different topology of peptide in the membrane. It is indicated that dynamics of hylin b1 in the membrane at acidic condition is increased.

[はじめに]　両生類は水陸圏にまたがって生育しているため、様々な病原微生物と接する。そのため、生体防御システムの一つとして抗菌ペプチドなどを皮膚から多く分泌することで、外敵から守っており、皮膚分泌物成分に関する研究は注目されている。そのような抗菌ペプチドの細胞膜との相互作用をはじめとする抗菌発現の作用機序は興味深い[1]。ハイリンb1 (Hylin b1)およびb2はブラジルの内陸部に生息する*Hyla biobeba*というカエルの皮膚分泌物から発見された2つのカチオン性ペプチドである(Net charge +2) [2]。それらの一次構造は、hylin b1では14残基目がHisであるのに対し、b2ではGlyである。これらは両親媒性のαヘリックス構造を形成するため、細胞膜に相互作用し溶血性・抗菌性を有することが示されている[2]。一方で、このHis残基の役割は分かっておらず、細胞膜中でのペプチドの構造にどのような影響を及ぼしているのか注目すべき残基である。

アミノ酸配列

Hylin b1　FIGAILPAIAGLV**H**GLINR-NH_2
Hylin b2　FIGAILPAIAGLV**G**GLINR-NH_2

本研究ではHylin b1のHis残基の側鎖の電荷に注目し、酸性と弱塩基条件でのDMPC細胞膜中での構造や運動性に注目し、固体NMRおよびMDシミュレーションによる解析を行った。

固体NMR, ペプチド, ヒスチジン

○かわむらいずる，ひろしげれいな，ばとさいはんみじどるじー，まつおゆうた，うえだかずよし

[方法]15残基目のGlyのみに^{13}C標識を施した[1-^{13}C]Gly15標識Hylin b1およびb2のペプチドはマイクロ波アシスト型ペプチド合成機を用い、Fmoc固相合成法で合成した。逆相HPLC、MALDI-TOF MSによる精製の確認を行った。NMR測定用の膜試料はペプチド:DMPC (1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine)=1:20 (モル比)で、pH 3.5の酢酸バッファーまたはpH 8.5のTrisバッファーで水和した。固体NMR測定はBruker Avance III 600 MHz分光計で4 mmの二重共鳴プローブを用い、静止状態の^{31}P NMR、^{13}C DD-MAS測定(繰り返し時間 4秒)を行った。MDシミュレーションはDMPCとHylin b1およびb2の系でCHARMM36 force fieldsを用い、GROMAC5.1で実行した。

[結果] pH8.5, 40°Cの^{31}P static NMR測定の結果、Hylin b1とb2はともに類似のスペクトルパターンを示し、DMPC膜との相互作用は大きな差がないことが示唆された。一方、pH 3.5ではb1の系のみ鋭い等方信号を観測した。このことから、Hylin b1は酸性条件では大きな膜分断作用を示すことが示された。

そこで酸性条件での^{13}C DD-MAS (温度40°C)を測定したところ、DMPCの信号を173.6 ppmに観測するとともに、Hylin b1のGly15のカルボニル炭素の信号を172.4 ppmに高い強度で観測し、α-ヘリックス構造を形成していることが判明した。Hylin b2の試料ではペプチド由来の信号強度はb1よりもはるかに弱いものであった。これは酸性条件でHylin b1の運動性が高いことを示している。また、ペプチドのみを同じ酢酸バッファーに溶解させたところ、およそ1 ppm異なる171.5 ppmに観測され、膜から遊離した状態のペプチドとしてアサインした。この結果から、酸性条件ではb1は膜結合状態でありながら運動性が高いことが判明した。これはHis残基の電荷が関与しており、pH3.5では膜中であっても十分にイミダゾール環が電荷を有することで、ペプチドのHis14が細胞膜の疎水環境を避け、その結果、細胞膜-水界面付近に位置し、ペプチドの運動性を高めていることが示唆された。

MDシミュレーションによって、DMPC中でのペプチドの挙動を追跡した。Hylin b1のHis14の電荷をもたせた場合では、His14とリン脂質頭部との相互作用によって、脂質二重膜の法線に対してヘリックスが傾いた。イミダゾール環の電荷がない場合では、ヘリックスが傾かずに膜中に留まっている構造が得られた。このようにHisの電荷の状態に依存して、DMPC膜との相互作用が変化することが示された。

[まとめ] 抗菌ペプチドのHis残基の電荷状態は細胞膜中での運動性を制御し、細胞膜との相互作用を変化させていることが示された。酸性において、より活性が高まる現象は生体防御の観点からも興味深い結果であった。

[参考文献]

[1] **抗菌ペプチドの機能解明と技術利用 (監修 長岡功)** (2017)

[2] M. S. Castro et al. (2005) ***Protein Peptide Letters,*** 12, 89-93.

P61

固体NMRを用いた木質素材の樹脂含浸及び熱処理過程の解析

○西田雅一[1]，田中智子[1]，三木恒久[1]，早川由夫[1]，金山公三[2]
1産業技術総合研究所
2京都大学・生存圏研究所

Solid-state NMR analysis of resin impregnation and heat treatment process for woody materials

○Masakazu Nishida[1], Tomoko Tanaka[1], Tsunehisa Miki[1], Yoshio Hayakawa[1], Kozo Kanayama[2]
[1] *National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)*
[2] *Research Institute for Sustainable Humanosphere, Kyoto University*

Effects of impregnation and heat treatment for Japanese cypress were examined by spectral and relaxation time changes in solid-state NMR. The substituents having higher molecular mobility, such as CH_3, CH_2OCH_3, and CH_2OH, showed larger signal intensities in ^{13}C PST-MAS NMR spectra. The intensities of CH_2OCH_3 and CH_2OH signals were weakened by the heat treatment indicating that a bridging of melamine and phenolic resins occurred with heating. Although T_1H values of the cypress increased with the impregnation, the T_1H values decreased with the heat treatment. Because variable temperature T_1H measurement showed that the T_1H values increased with increasing temperature, the impregnation suppressed the longitudinal relaxation via OCH_3 of lignin, which was accelerated by the heat treatment.

木質系素材を工業材料として用いるためには、製造プロセスにおける品質管理を分子レベルから行う必要がある。本発表では、木質系素材の製造プロセスとして、ヒノキのフェノール樹脂やメラミン樹脂の含浸過程及び含浸素材の熱処理過程に着目して、固体NMRスペクトル法を用いた計測手法により、それらの製造プロセスにおいて、ヒノキの構成要素と薬剤に対して分子レベルでどのような変化が起こるのかを調べた。

測定対象となる木質系素材として、全乾かさ密度0.39g/cm3、気乾含水率8%のヒノキを出発原料とし、フェノール樹脂処理では30%固形分濃度水溶液に含浸させ Weight per gain (WPG) 87.4%の試料を、メラミン樹脂処理では同じく30%固形分濃度水溶液に含浸させWPG 86.7%の試料を、また対照として、アセチル化処理WPG18%の試料を用いた。

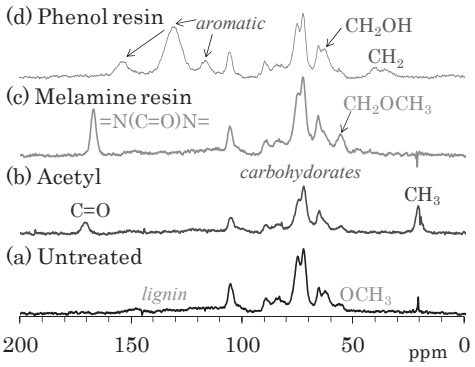


Fig. 1. ^{13}C CP-MAS NMR spectra of impregnated Japanese cypresses.

Fig. 1に含浸試料の気乾状態での^{13}C CP-MAS NMRスペクトルの測定結果を示す。フェノール樹脂含浸により低磁場側に強い芳香環のシグナルが観察されるとともに、高磁場側にCH_2のシグナルが確認できた。メミラン樹脂含浸では=N(C=O)N=が、アセチル化では$C=O$とCH_3のシグナルが確認できた。また、フェノール樹脂のCH_2OHが糖鎖のC6炭素と、メミラン樹脂含浸のCH_2OCH_3がリグニンのOCH_3と、それぞれのシグナルが重複して観察された。

Biomass polymer; Variable temperature measurement; Curing process

○にしだまさかず，たなかともこ，みきつねひさ，はやかわよしお，かなやまこうぞう

次に、^{1}Hを近傍に持つ運動性の高い置換基を感度よく検出できる^{13}C PST-MAS NMR 測定を行った。**Fig. 2**に示すように、ヒノキでは糖鎖の末端シグナル(C6)及びリグニンのOCH_3を感度よく検出できるが、薬剤含浸により、CH_2OCH_3やCH_2OHなどがCP-MAS同様に重複して観察された。また、この際に糖鎖のシグナル強度比の変化も同時に観察された。

以上の結果を踏まえ、熱処理（120, 150, 170℃）後の変化を調べた。一例として、フェノール樹脂含浸ヒノキの^{13}C CP-MAS NMRの変化を**Fig. 3**に示す。熱処理温度に依存して、CH_2OHシグナル、置換可能な水素を持つ芳香環（115ppm）シグナルが減少するとともに、CH_2シグナルが増加し、熱硬化による架橋の促進を観察することができた。CH_2OHシグナルの減少については、^{13}C PST-MAS NMRでも観察することができた。メラミン樹脂についても熱処理による変化は同様に観察できたが、未処理及びアセチル化ヒノキについては熱処理による変化はほとんど観察できなかった。

続いて、20℃で測定を行った薬剤含浸ヒノキの熱処理によるT_1H（^{1}H MAS: saturation recovery法）の変化を**Fig.4**に示す。薬剤含浸を行うことで、未処理のものと比較してT_1Hが大きく増大していた。一方、熱処理を行うことによって、未処理のヒノキでは加熱温度に応じてT_1Hがわずかに増加するのに対して、フェノール樹脂含浸ヒノキとアセチル化ヒノキではT_1Hが大きく減少し、メラミン樹脂含浸ヒノキではT_1Hはいったん減少した後、再び増加していた。さらに、T_1Hの温度可変測定では、**Fig.5**にフェノール樹脂含浸ヒノキとアセチル化ヒノキの結果で示したように、昇温過程においてはT_1Hは増加し、逆に降温過程においてはT_1Hは減少した。例外として熱処理前のフェノール樹脂含浸ヒノキでは、T_1Hの変化率が小さく、また降温過程でもわずかなT_1Hの増加が見られた。

ヒノキのT_1H緩和は主にリグニンのOCH_3を経由して起こるが、T_1Hの温度依存性の結果から、高温ではOCH_3の分子運動が大きくなることで縦緩和が阻害され、その結果としてT_1Hが大きくなると考えられた。一方、^{13}C PST-MAS NMRから判断すると、薬剤含浸ヒノキではCH_3, CH_2OCH_3, CH_2OHなどの運動性が大きく、それらの置換基によりOCH_3を経由する縦緩和が阻害され、その結果T_1Hが大きくなると考えられた。一方、熱処理によるT_1Hの減少は架橋などの化学反応により添加した薬剤の運動性が低下し、OCH_3を経由する縦緩和が再び起こりやすくなるためであると考えられた。

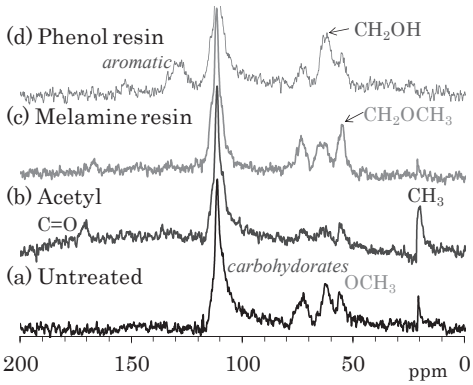


Fig. 2. ^{13}C PST-MAS NMR spectra of impregnated Japanese cypresses.

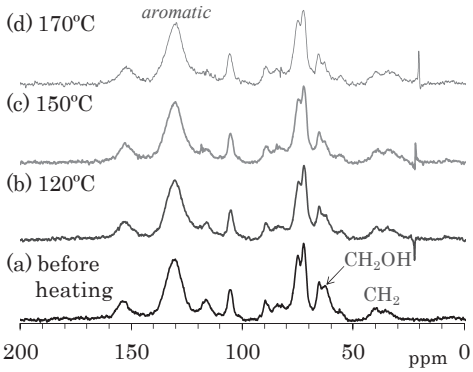


Fig. 3. Changes of ^{13}C CP-MAS NMR spectra of phenol resin impregnated cypresses with heat treatment.

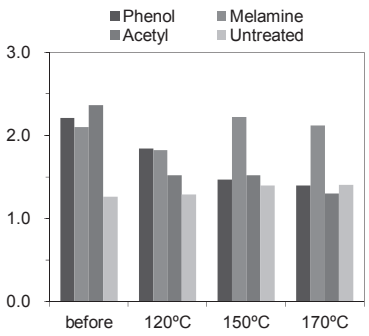


Fig. 4. Changes of T_1H in impregnated cypress.

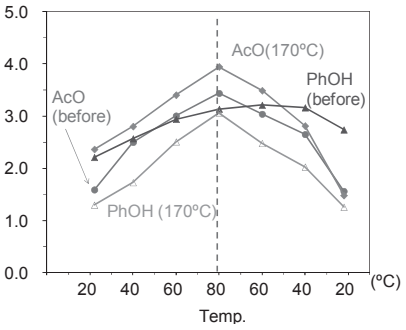


Fig. 5. Variable temperature T_1H of impregnated cypress.

P62

固体 NMR による Phe-Phe モチーフをもつペプチドの自己組織化集合体の分子構造の解析

○尾澤 夢実[1]，Batsaikhan Mijiddorj[1]，佐藤　久子[2]，内藤　晶[1]，川村　出[1]
1 横浜国立大学大学院・　工学府
2 愛媛大学・理工学研究科

Structure of self-assembled Phe-Phe motif peptide as studied by solid-state NMR

○Yumi Ozawa[1], Batsakhan Mijiddorj[1], Hisako Sato[2], Akira Naito[1], Izuru Kawamura[1],
[1] *Graduate School of Engineering, Yokohama National University*
[2] *Graduate School of Science and Engineering, Ehime University*

L-Phe-L-Phe-OH is well known in self-assembled peptides to form highly ordered nanostructure. In this study, we investigated the structural difference among four kinds of Phe-Phe peptide fiber (L-Phe-L-Phe-OH (FF), D-Phe-D-Phe-OH (ff), L-Phe-D-Phe-OH (Ff) and D-Phe-L-Phe-OH (fF)) by ^{1}H, ^{13}C and ^{15}N solid-state magic angle spinning (MAS) NMR experiments. As a result, the spectral patterns of FF were quite different from its diastereomers of Ff and fF. In addition, we observed different morphology and NMR signals between L-Phe-L-Phe-L-Phe (FFF) and L-Phe-D-Phe-L-Phe peptide (FfF). Thus, we found a suitable d-amino acid substitution is possible to regulate the morphology and nanostructure of self-assembled peptide.

[序論]　ヘキサフルオロイソプロパノール(HFIP)に高濃度で溶解した L-Phe-L-Phe-OH (FF)ペプチド(Figure 1)に水を加えることによってこのペプチドの自己組織化が促され、ファイバーを形成することが知られている[1]。Görbitz's らの X 線構造解析を用いた研究によると、６つの FF が環状に集まることでファイバー中に約１nm の親水性ナノポアを形成し、その中には水が内包されていると考えられている。また、C 端に対して N 端がイオン結合、アミド窒素が水素結合していることと、ペプチド主鎖に対して芳香環が同じ方向に向くことで π-π スタッキングをしていることがファイバーの構造の安定性に寄与している[2]。このような構造は圧電素子やハイドロゲルとして応用されている[3]。我々は、L 体の代わりに D 体のフェニルアラニンを用いることで、自己組織化したペプチドファイバーの形態や分子構造が変化させることができると考えた。そこで、L-Phe-L-Phe-OH (FF), D-Phe-D-Phe-OH (ff), L-Phe-D-Phe-OH (Ff), D-Phe-L-Phe-OH (fF)の４つの立体異性体からなるペプチドファイバーの分子構造の違いを固体 NMR によって明らかにすることを目的とした。加えて、Phe-Phe-Phe についても検討し、適切に D アミノ酸を導入することによって、その形態と分子構造の変化を調べた。

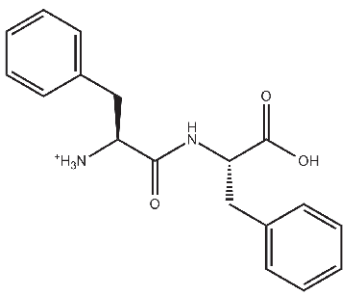


Figure 1. Chemical structure of L-Phe-L-Phe-OH peptide.

[実験]　４つのジフェニルアラニン立体異性体はペプチド合成機（Biotage Initiator^{+} Alstra）を用いて Fmoc 固相合成法により合成した。ジフェニルアラニン 1.0 mg に 10 μL の HFIP に溶解後、90 μL の水を加えることでファイバーを調製した。SEM の（FE-SEM SU8010）観察は水を加えて

固体 NMR, 自己組織化, ペプチド

○おざわゆみ，ばとさいはんみじどるじー, さとうひさこ, ないとうあきら, かわむらいずる

から 10 分後、1 時間後、2 時間後、24 時間後に乾燥させたペプチドファイバーを炭素両面テープで試料台に固定し、導電性を上げるために白金パラジウムでコーティングして行った。固体 NMR 観察時には 10-20 mg のペプチドファイバーを十分に室温で乾燥させたのちに 4 mm ジルコニア固体 NMR 試料管に詰めた。NMR 測定は Bruker Advance III 固体 NMR スペクトロメーター、4 mm E-free プローブ(^{1}H-^{13}C-^{15}N 三重共鳴プローブ)を用い、^{1}H MAS（MAS=12 kHz）、^{13}C および ^{15}N CP-MAS（MAS=10 kHz）の実験を行い、測定温度は 298 K に設定した。一部のサンプルでは Mn^{2+}を導入し、常磁性効果の影響について調べた。また、Phe-Phe-Phe の系についても上記と同様の手順で実験を行った。

[結果と考察] Phe-Phe 自己組織化後の ^{13}C CP-MAS NMR の結果を Figure 2 に示す。いずれのペプチドファイバーも C 端は 178.3 ppm または 179.5 ppm に現れたため、COO^-であることが分かった。またこの信号(COO^-)の線幅はおよそ 60 Hz と狭く、極めて均一な構造であることが示唆された。エナンチオマーの関係においては全く同じスペクトルを示すのに対し、ジアステレオマーの関係では全く異なるスペクトルであった。特に芳香環のピークの形が全く異なることから、芳香環同士の π-π スタッキングのタイプが全く異なることが示唆された。また、^{15}N CP-MAS において、Ff、fF ファイバーは FF ファイバーに比べて N 端は 16 ppm、アミド窒素は 6.3 ppm 低磁場シフトしたことから、主鎖構造が全く異なることも分かった。^{1}H MAS NMR において、FF と ff ファイバーのスペクトルからはナノポアの中の内部水と思われる信号を観測できたが、Ff および fF からはそのようなピークを得ることが出来なかった。このようにビルディングブロックとなる分子構造が異なることが示され、MD シミュレーションや VCD の測定でも検討している。

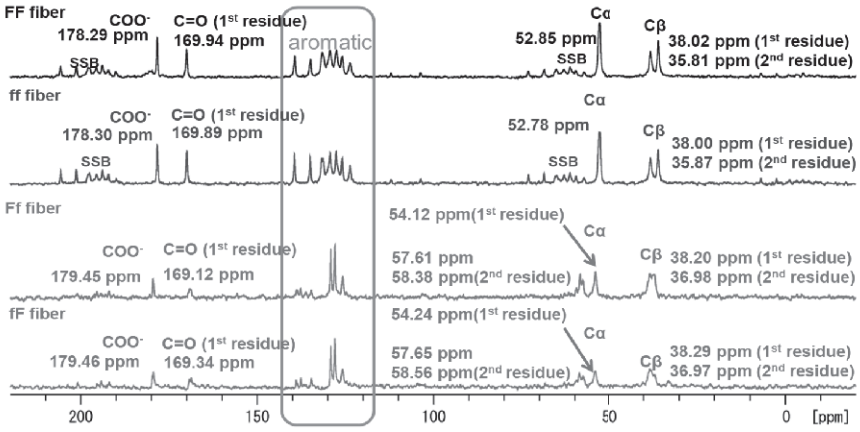


Figure 2. ^{13}C CP-MAS NMR spectra of FF, ff, Ff and fF fibers

L-Phe-L-Phe-L-Phe-OH (FFF)、L-Phe-D-Phe-L-Phe-OH (FfF)において、SEM による最終生成物の観察では、FFF はプレート状の凝集物を形成したが、FfF はそれとは異なるファイバー状の凝集物を形成した。両者の ^{13}C CP-MAS NMR の結果は芳香環の信号をはじめとして似ていたが、^{15}N CP-MAS では N 端は FFF が 16 ppm, FfF が 14 ppm に観測され、さらに主鎖のアミド窒素においては FFF が 91 ppm, FfF が 101 ppm となり、FfF が FFF よりも 10 ppm 程低磁場シフトした。 ペプチド主鎖に対する側鎖の芳香環の向きが変化することで、ビルディングブロックとなる分子構造が変化し、形成される集合体の形態が変化することが示された。

[まとめ] 固体 NMR により Phe-Phe モチーフをもつペプチドの分子構造の違いを明らかにし、ペプチドファイバーの形態と分子構造の関係を明らかにした。

［参考文献］

[1] M. Reches and E. Gazit (2003) Science 300, 625-627.

[2] C. H. Görbitz, (2007) Chem. Eur. J. 13, 1022-1031.

[3] L. A. Abramovich and E. Gazit , (2014) Chem. Soc. Rev. 43, 6881-6893

P63

アンモニウムイオンで部分置換した$Cs_2(HSO_4)(H_2PO_4)$におけるスピン拡散とスピン－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

Spin diffusion and spin-lattice relaxation in $Cs_2(HSO_4)(H_2PO_4)$ partially replaced by ammonium ions

○Shigenobu Hayashi, Keiko Jimura
Research Institute for Material and Chemical Measurement, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Japan

Inorganic solid acid salts with hydrogen bond networks frequently show very long spin-lattice relaxation times even for ^{1}H because the hydrogen bonds suppress motions. In the present work, the ^{1}H relaxation in $Cs_2(HSO_4)(H_2PO_4)$ containing a small amount of ammonium ions were studied in detail by use of the effect of magic angle spinning on the relaxation. The ^{1}H spin-lattice relaxation times of the acid protons decreases with increase in the ammonium ions. Reorientation of the NH_4 group fluctuates the dipole-dipole interaction and relaxes the ammonium protons as well as the acid protons. Spin diffusion between the acid and the ammonium protons averages partially the ^{1}H relaxation of the acid and the ammonium protons at the MAS rate of 8 kHz, while it is suppressed completely at the MAS rate of 50 kHz. Spin diffusion between the acid protons is not suppressed at the MAS rate of 50 kHz.

$CsHSO_4$、CsH_2PO_4に代表される無機固体酸塩ではAO_4型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、「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でも超プロトン伝導相が長い時間維持される[1,2]。しかし、室温相においては水素結合でプロトンが固定されているため、プロトンであっても100秒以上の長いスピン－格子緩和時間を示す[3]。本研究では、Csイオンの一部をNH_4イオンで置換し、プロトンの緩和について調べた。プロトンの緩和に対するマジック角回転の影響を調べ、スピン拡散の寄与を評価した。

少量の水に$CsHSO_4$、CsH_2PO_4、$NH_4H_2PO_4$を所定量加え、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。

^{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。^{1}Hのスピン－格子緩和時間T_1はsaturation recovery法によって測定した。

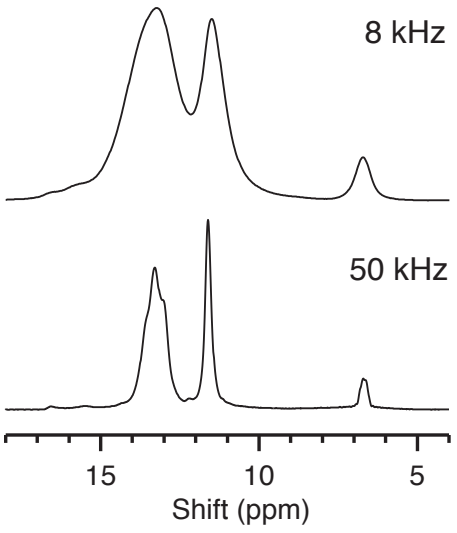


Fig. 1. ^{1}H MAS NMR spectra of the sample with x_{NMR} = 1.3% at spinning rates of 8 and 50 kHz.

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

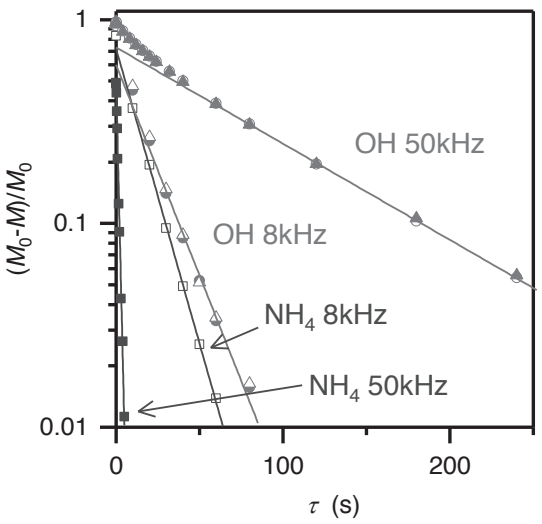


Fig. 2. ^{1}H spin-lattice relaxation curves for the acid and the ammonium protons in the sample with x_{NMR} = 1.3%.

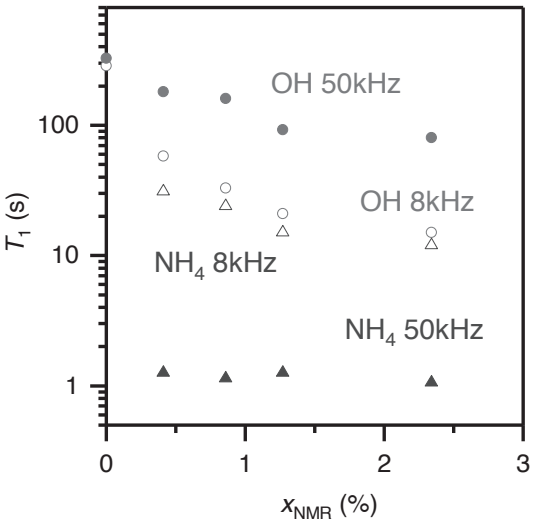


Fig. 3. The ammonium content dependence of the ^{1}H spin-lattice relaxation times.

Fig. 1に、^{1}H MAS NMRスペクトルを例示した。13.3、11.5 ppmにOH、6.7 ppmにNH_4プロトンが観測された。NH_4^+の置換量（x_{NMR}）はスペクトル強度から見積もった。

Fi g. 2に、x_{NMR} = 1.3% の試料の緩和曲線を示した。OHとNH_4が回転数8 kHzでは近い緩和速度を示したが、50 kHzでは大きくかけ離れた。OHの２つのシグナルは同一の緩和挙動を示した。

Fig. 3に緩和時間T_1のNH_4濃度依存性を示した。Fig. 3の結果を説明する緩和経路をFig. 4に示した。Fig. 4Aが8 kHzの回転、Fig. 4Bが50 kHzの回転に対応している。OHとNH_4間のスピン拡散は50 kHzの回転で完全に抑制されている[4]。一方、OH間のスピン拡散は50 kHzでも抑制されない。

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。

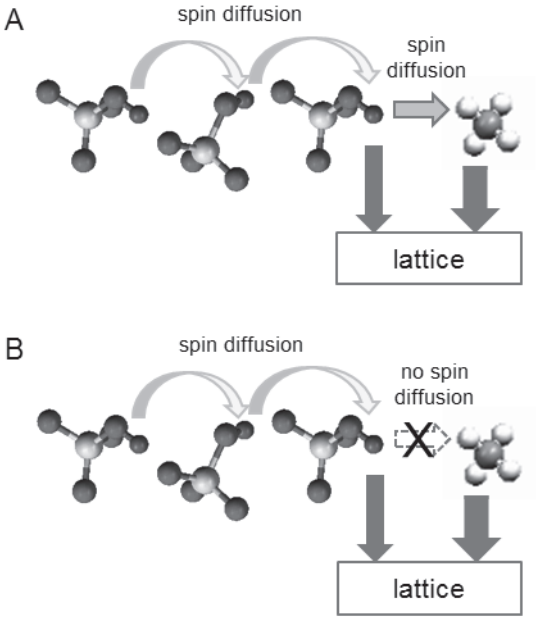


Fig. 4. Schematics of the ^{1}H relaxation paths at the spinning rates of (A) 8 kHz and (B) 50 kHz.

References

(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: *J. Phys. Chem. C* **121**, 12643-12651 (2017).
(4) S. Hayashi, K. Jimura: *Solid State Nucl. Magn. Reson.* **87**, 24-28 (2017).

P64

野蚕絹繊維に特徴的な分子間精密構造の決定とその繊維化過程に関するNMR構造解析

○西村明生，朝倉哲郎
東京農工大学大学院 工学部 生命工学科

Fiber Forming Process of Silk Fibroin from Wild Silkworm, *Samia cynthia ricini* and Their Packing Structure studied with ^{13}C Solid-state NMR Spectroscopy

○Akio Nishimura, Tetsuo Asakura
Department of Biotechnology, Tokyo University of Agriculture and Technology

Silks from well-known silkworm and wild silkworms including spider continue to attract attention of researchers in many fields widely because of their excellent mechanical properties. In this work, a wild silkworm, *Samia cynthia ricini* was studied. The primary structure consists of alternative sequences of polyalanine and glycine-rich regions, which is similar to that of the spider silk. At first, the stretching-induced structural transition from α-helix to β-sheet structure in the polyalanine region was monitored for [3-^{13}C]Ser-, [3-^{13}C]Tyr-, and [3-^{13}C]Ala- silk fibroin stored in the silk gland by focusing divided into the crystalline and non-crystalline regions. Secondary, the packing structure of the silk fiber at atomic level was determined by several ^{13}C sold-state NMR including dipolar-assisted rotational resonance (DARR) and theoretical chemical shift calculation with Gauge Including Projector Augmented Wave (GIPAW) method.

絹は、高強力・高弾性の優れた力学物性を有することから、多くの分野の研究者に興味を持たれ、また、近年は新たな再生医療素材としても着目されつつある。家蚕絹は繊維の女王として知られているが、自然界には異なる構造や物性を有する野蚕の絹も多種類存在し、新たに魅力的な素材として注目される。

本発表では、野蚕の一種であるエリ蚕の絹に着目し、その繊維化機構の解明と繊維結晶部の分子間精密構造の決定について報告する。

エリ蚕絹の繊維化機構の解明

エリ蚕絹は、Fig.1のように、Polyalanine連鎖から成る結晶部とGly-rich非晶部から構成される。近年注目を浴びつつあるクモの絹も同様の一次構造を有する。

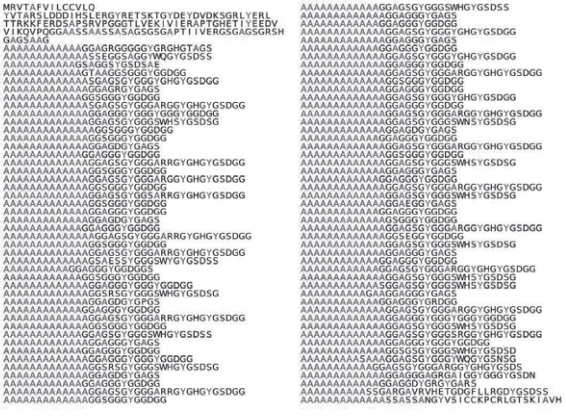


Fig. 1 The primary structure of *S. c. ricini* silk fibroin.

結晶部のAlaおよび非晶部のSerとTyrからの構造情報を選択的に得るために、蚕への経口投与によって絹の^{13}Cラベル化を施した。液状絹を摘出後、延伸倍率を変えた試料を作製、繊維化に伴う構造変化を^{13}C CP/MAS NMRにより追跡した。Alaは90%が結晶部に、Serは結晶部に近い非晶部に、Tyrは結晶部から離れた非晶部に位置する。

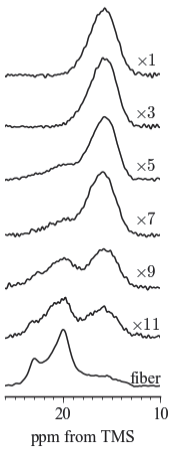
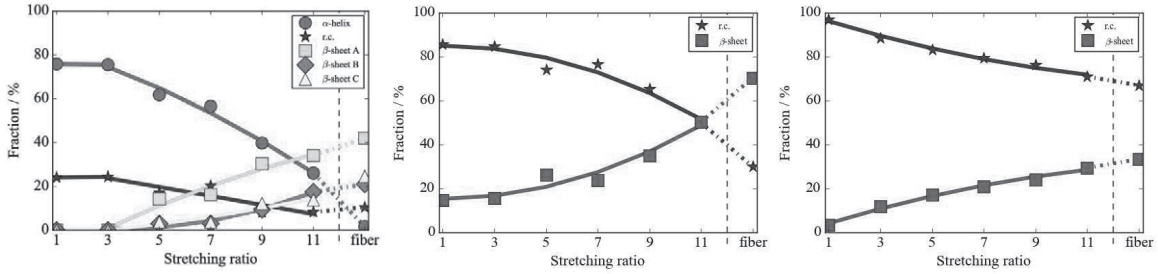


Fig. 2 Change in the Ala Cβ region of the difference ^{13}C CP/MAS spectra of [3-^{13}C] Ser, [3-^{13}C] Tyr and [3-^{13}C] Ala -labeled *S. c. ricini* silk fibroin with different stretching ratio. The spectrum of the silk fiber is also shown.

エリ蚕絹繊維，^{13}C CP/MAS NMR，分子間精密構造

○にしむらあきお，あさくらてつお

Fig.2は、延伸に伴うエリ蚕絹の構造変化の様子をAla Cβピークについて追跡した結果であり、α-helixからβ-sheet構造に転移する様子が観察される。Fig.3に、Ala, Ser, Tyr Cβピークについて各コンフォメーションの分率をシミュレーションによって決定し、延伸に伴う変化をプロットした。(a) Ala残基は、5倍延伸から急激に構造変化が起こること、(b)結晶部の近傍に位置するSer残基も、5倍延伸付近でrandom coilからβ-sheet構造に転移することがわかる。一方、結晶部から離れて位置するTyr残基は、結晶部の変化に追随せずに徐々にβ-sheet構造に転移する。このように、位置選択的に構造転移が起こることを示し、これらの知見は新しい絹を分子設計する際の指針を与える。



(a) Ala　(b) Ser　(c) Tyr

Fig. 3. Fractions of several conformations determined from deconvolutions of Ala Cβ, Ser Cβ and Tyr Cβ peaks in the ^{13}C CP/MAS NMR spectra of ^{13}C labeled *S. c. ricini* silk fibroin plotted against the stretching ratio. The data of ^{13}C-labeled silk fiber are also shown.

エリ蚕絹繊維の結晶部の分子間精密構造決定

Fig.2,3(a)から、β-sheet構造において、3本の化学シフトの異なるピークA,B,Cが出現することがわかる。そのピークを帰属するとともに、繊維のPolyalanine結晶部のPacking構造を決定することを以下に試みた。

まず、PolyalanineのX線解析の構造[2]をベースに、エリ蚕絹繊維の^{13}C DARRスペクトル(Fig. 4)と^{1}H-^{13}C double CP測定結果から得られた分子間距離の情報を考慮して、分子動力学ならびにCASTEP計算を行い、構造最適化を行った。そして、GIPAW 法で化学シフトを計算し、その傾向が^{1}H固体および^{13}C固体NMR化学シフトの実測値と最もよく一致する構造を、新たなstaggeredモデル(Fig. 5)と決定した。

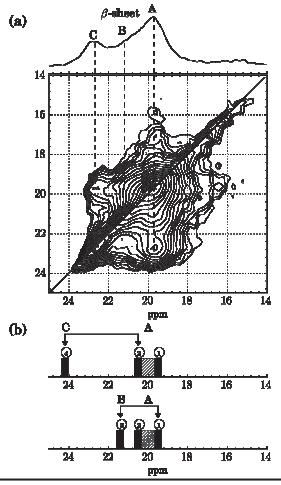


Fig. 4. (a) Expanded Ala Cβ region in ^{13}C-^{13}C DARR spectrum of [U-^{13}C] silk fibroin fiber. (b) The distances less than 5Å between the group (carbons ① and ②) and carbon ④ and also those between the group (carbons ① and ②) and carbon ③ in the new staggered model shown as histograms.

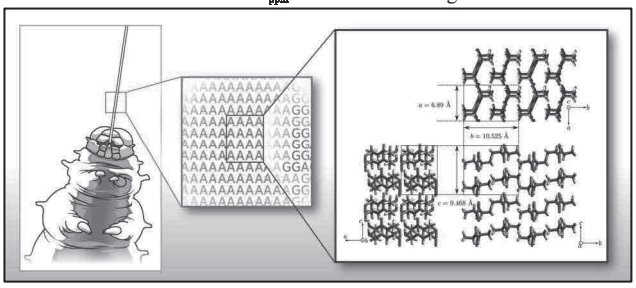


Fig. 5. A schematic diagram of a spinning larvae of *S.c.ricini*, the primary structure, and new staggered packing model of polyalanine region of *S.c.ricini* silk fibroin fiber determined here.

Fig.5の構造において、水素結合を形成するNH···OC間の距離の平均値は、X線解析構造では1.88Åであるのに対し、今回求めた新たなstaggeredモデルでは1.81Åであり、より密に充填されていた。このように、新たにエリ蚕絹繊維の分子間精密構造を提案できた。[3]

〈謝辞〉本研究は一部、平成26年度科研費基盤A（課題番号 26248050）およびImPACT Projectにより実施された。また、化学シフト計算による解析は、京都大学化学研究所の梶弘典先生のグループとの共同研究である。

References

(1) Asakura, T., Nishimura, A., *et al.* (2017) *Macromolecules 50*, 2871-2880.
(2) Arnott, S., *et al.* (1967) *J. Mol. Biol. 30*, 201-208.
(3) Asakura, T., Nishimura, A., *et al.* (2017) *Biomacromolecules 18*, 1965-1974.

P65

吸着式ヒートポンプ用活性炭へのエタノール吸着における表面官能基の影響

○出田　圭子[1]，吉　鉉植[2]，秦　弘一郎[2]，尹　聖昊[1,2]，宮脇　仁[1,2]
1九州大学・先導物質化学研究所
2九州大学総合理工学研究院

Effect of surface functional groups in ethanol adsorption on activated carbon for adsorption heat pump

○Keiko Ideta[1], Hyun-Sig Kil[2], Koichiro Hata[2], Seong-Ho Yoon[1,2], Jin Miyawaki[1,2]
[1] *Institute for Materials Chemistry and Engineering. Kyushu Univ.*
[2] *Interdisciplinary Graduate School of Engineering Science, Kyushu Univ.*

In adsorption heat pump (AHP), cold water can be obtained using low-temperature waste heat discharged from the factory. However, since the volume of the apparatus is currently larger than its cooling capacity, miniaturization of the apparatus is desired. One solution is to relatively increase the amount of adsorbate adsorption. Although the surface area and the pore volume of the adsorbent are related to the adsorption amount, it is considered that the surface functional group of the adsorbent has an important influence on the adsorption / desorption behavior of the adsorbate. So we used activated carbon-ethanol system with high adsorption amount per unit weight. The adsorption behavior of ethanol molecules was investigated using ^{2}H solid-state NMR using activated carbon with comparable porosities and different amounts of oxygen-containing functional groups. As a result, ethanol molecules were found to strongly interact with oxygen-containing surface functional groups in the micropores.

【序論】

吸着式ヒートポンプは工場等から排出される200℃以下の低温排熱を利用して冷水等を得ることが可能（Fig. 1）なため近年開発が進んでいるが、その冷却能力に対する装置の体積が大きいため、縮小化が望まれている。解決策の1つとして吸着剤に対する吸着質の相対量を増やすことが考えられる。

活性炭 − エタノール系は単位重量当たりの吸着量が多い。活性炭への吸着には表面積、細孔体積の他、表面官能基が吸着質の吸脱着挙動に影響していると考えられる。そこで本発表では高表面積活性炭であるMAXSORB IIIに対し、極性官能基を導入もしくは減少させたモデル活性炭に対するエタノール分子の吸着量及び吸着速度を検討し、さらに固体^{2}H−NMRを用いて吸着挙動を検討したので報告する。

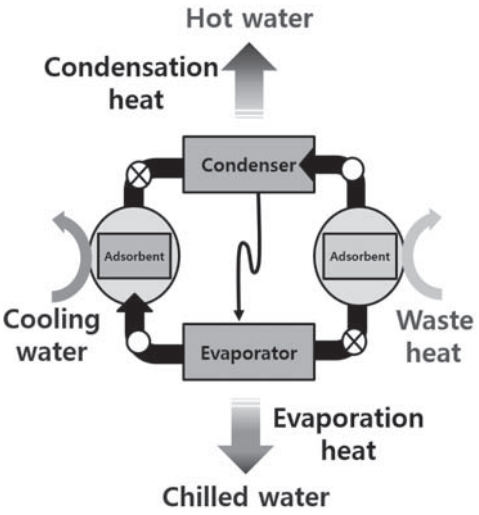


Fig. 1. Schematic diagram of the Adsorption heat pump (AHP).

吸着式ヒートポンプ，^{2}H-NMR

○いでたけいこ，きるひゅんしぐ，はたこういちろう，ゆんそんほ，みやわきじん

【実験】

試料は関西熱科学株式会社のMAXSORB III (MAX)とこれに対し水素処理を行い官能基を減らしたもの(H-MAX)、KOH 処理を行い極性官能基を増やしたもの(Ox-MAX)を使用した。NMR測定には重水素ラベルしたCD_3CH_2OH及びCH_3CH_2ODを用いた。これらの飽和蒸気中に活性炭を72時間暴露した試料について固体^{2}H-NMR測定を行った。 装置はJEOL RESONANCE社製ECX400（^{2}H：61.37 MHz)を用い、測定中のエタノールの蒸発及び発熱による脱着を防ぐため、Kel-F製密封キャップを用い、5 kHzの低速MASで測定した。

【結果と考察】

Fig. 2に示したように、酸素含有量が4.35％のMAXを原料とし、表面積はほとんど一定のまま、酸素1.75％（H-MAX）および10.46％（Ox-MAX）の活性炭を調整することに成功した。これらのエタノール吸脱着挙動を調べたところ、MAXおよびH-MAXはほぼ同様の吸脱着挙動を示すのに対し、Ox-MAXは約15%吸着量が低くなった。またデータは示していないが、吸脱着平衡に至るまでの時間がOx-MAXのみ短い結果となった。これらの結果から官能基によってミクロ孔内部でエタノールが捉えられるため、平衡までの時間は短く、同時にミクロ孔の深部に到達できない空間ができるため吸着量が減少したと考えられる。

これらを検証するため固体^{2}H-NMR測定を行いメチル基と水酸基の結果を比較した。Fig. 4はCH_3CH_2ODの結果であるが、酸素含有官能基量が増加するに従い線幅が太くなっており、OD部分の運動性が低下していることが示唆された。酸素含有官能基を多く含むOx-MAXでは酸素官能基とエタノールの水酸基の相互作用のために活性炭のミクロ孔中のエタノール拡散が低下したと考えられる。これらの結果から吸着式ヒートポンプの吸着剤として、最適な官能基量について議論する。

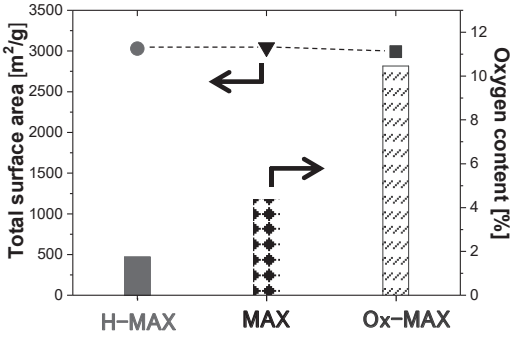


Fig. 2. Total surface areas and oxygen contents.

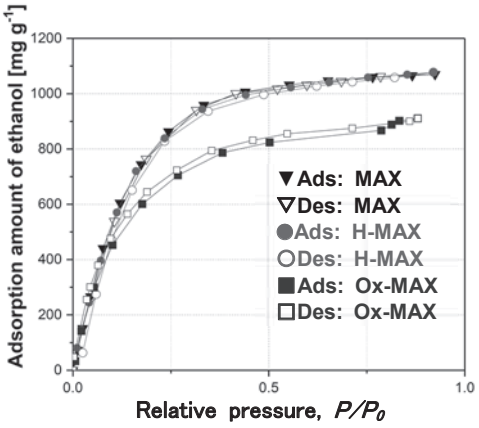


Fig. 3. Ethanol adsorption/desorption isotherms at 303 K

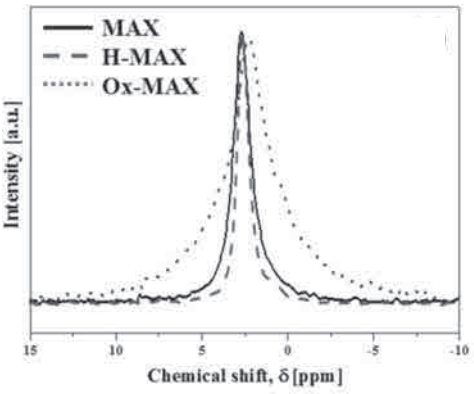


Fig. 4. ^{2}H solid-state NMR spectra of the CH_3CH_2OD-adsorbed Maxsorb III series

References

Hyun-Sig Kil, Taegon Kim, Koichiro Hata, Keiko Ideta, Tomonori Ohba, Hirofumi Kanoh, Isao Mochida, Seong-Ho Yoon, Jin Miyawaki, *Applied Thermal Engineering* ***72,***160-165(2014)

P66

励起三重項電子を用いたDNP法によるMOF骨格^{1}Hの高偏極化

○藤原才也[1], 細山田将士[1], 楊井伸浩[1 2 3], 立石健一郎[4], 上坂友洋[4], 君塚信夫[1 2]
1 九大院・工, 2 九大・CMS, 3 JST-さきがけ, 4 理研・仁科セ

Hyperpolarization of MOF protons with DNP utilizing the photo-excited triplet electrons

○Saiya Fujiwara[1], Masanori Hosoyamada[1], Nobuhiro Yanai[1 2 3], Kenichiro Tateishi[4], Tomohiro Uesaka[4], Nobuo Kimizuka[1 2]
[1] *Dept. Chemistry and Biochemistry., Kyushu Univ.*, [2] *CMS, Kyushu Univ.*, [3] *JST-PRESTO*,
[4] *RIKEN Nishina Center for Accelerator-Based Science*

Dynamic nuclear polarization (DNP) has attracted much attention as a method to enhance the sensitivity of NMR spectroscopy and MRI. In particular, DNP utilizing the photo-excited triplet electrons as polarizing agent (Triplet-DNP) is useful for nuclear hyperpolarization at room temperature. However, conventional Triplet-DNP systems are limited to pentacene-doped crystals or glass matrices which are unsuitable for suppressing relaxation of ^{1}H spins and incorporating guest molecules as polarizing target. In this work, we focused on metal-organic frameworks (MOFs) as new host materials. We incorporated a soluble pentacene derivative having carboxylate groups in ZIF-8 and investigated a generation of spin polarization in the MOF. Consequently, we achieved the ^{1}H polarization on the framework and observed its NMR signal enhancement through Triplet-DNP.

電子からの偏極移動により核スピンを高偏極化する動的核偏極法 (DNP) は、NMRやMRIの感度を向上させる技術として近年盛んに研究が行われている。中でも励起三重項状態の電子を偏極源とするTriplet-DNPは、通常のラジカル種を偏極源とするDNPにおける理論値を遥かに超える高偏極化を室温かつ低磁場で実現できる可能性があることから注目を集めている。[1,2] しかし従来のTriplet-DNPの応用は、有機結晶やガラスにペンタセンを偏極源としてドープした系に限定されており、^{1}H核スピン緩和が十分に抑制され、かつ様々な分子を偏極対象として導入可能な系は未だ報告されていない。そこで我々は、これらを両立する可能性を秘めた新たなホスト材料として、硬い結晶構造と分子を包接可能なナノ細孔を有する金属錯体骨格 (MOF) に着目した。本研究では、反磁性金属から構成され、また高い安定性・耐水性を有する代表的なMOFであるZIF-8 (Fig. 2)を採用した。今回の報告では、ZIF-8の結晶中に偏極源としてカルボン酸を修飾したペンタセン誘導体PDBAを導入し、PDBAの励起三重項状態のスピン偏極をZIF-8骨格の^{1}Hへと移行させることでMOF骨格を高偏極化させることを目的とした (Fig. 1) 。

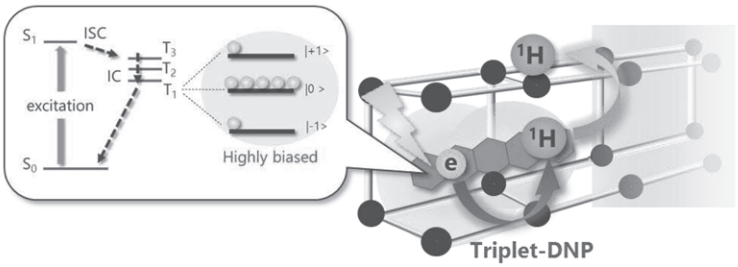


Fig. 1 Schematic illustration of spin polarization of MOF protons with Triplet-DNP.
Spin polarization is created among photo-excited triplet electrons and transferred to MOF ^{1}H through Triplet-DNP

動的核偏極，MOF，三重項電子

○ふじわらさいや，ほそやまだまさのり，やないのぶひろ，たていしけんいちろう，
うえさかともひろ，きみづかのぶお

ZIF-8の^{1}H の緩和時間 T_1 をAr雰囲気下、室温で測定したところ、約15秒であった。偏極源として、MOFとの親和性を高めるためカルボン酸で修飾した可溶性ペンタセンPDBA (Fig. 2) を新規に合成し、ZIF-8合成時に反応溶液に共存させる手法で結晶内部への導入に成功した。ここで合成時のPDBAの濃度を変えることによって、ZIF-8への導入量を調節できた。

次に偏極源を導入したZIF-8⊃PDBAについて、時間分解ESR測定からPDBAの励起三重項状態を評価した。Ar雰囲気、120 Kで、波長589 nmのパルスレーザーで励起した。その結果、いずれの導入量においても非熱平衡状態にあるスピン1の電子共鳴に特有な形状のESRスペクトルが得られ (Fig.3 a) 、その685 mT付近のピークトップの減衰がマイクロ秒オーダーであったことから (Fig. 3 b)、ZIF-8中におけるPDBAの励起三重項とその偏極の生成が示唆された。

続いてTriplet-DNPによって三重項電子の偏極がZIF-8骨格の^{1}Hへ移行するかどうかについて検証した。室温で約0.4 Tの静磁場、MASなしの条件下で、同様のパルスレーザーを照射したところ、Triplet-DNPによるシグナルの増強が確認された (Fig. 4) 。

また、偏極率の向上を目的とし、さらにMOF骨格^{1}Hの重水素化についても検討した。ZIF-8の配位子であるメチルイミダゾールのメチル基の回転が緩和時間短縮に大きく寄与していると考えられるため、メチル基を重水素化した配位子を用いてD-ZIF-8を新たに合成した。その緩和時間を同様の条件で測定したところ、通常のZIF-8の緩和時間の約4倍となる、1分程度にまで緩和時間を延ばすことに成功した。D-ZIF-8を用いることによって、NMRシグナルのさらなる増強が期待され、当日はその詳細な結果についても発表する予定である。

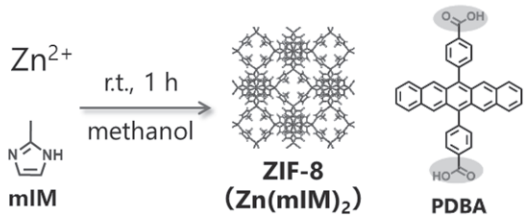


Fig. 2 Synthetic scheme of ZIF-8 and chemical structure of PDBA

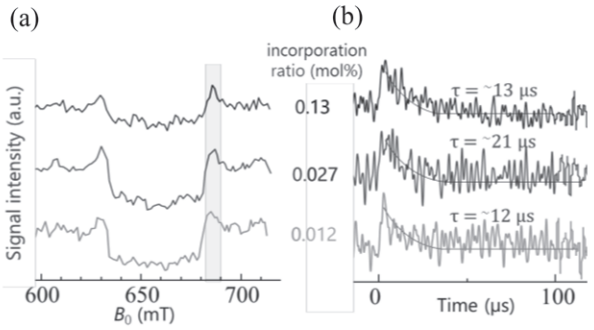


Fig. 3 Time-resolved ESR measurement of ZIF-8⊃PDBA.

(a) ESR spectra and (b) Decays of ESR signal intensity at 685 mT for different incorporation ratios of PDBA.

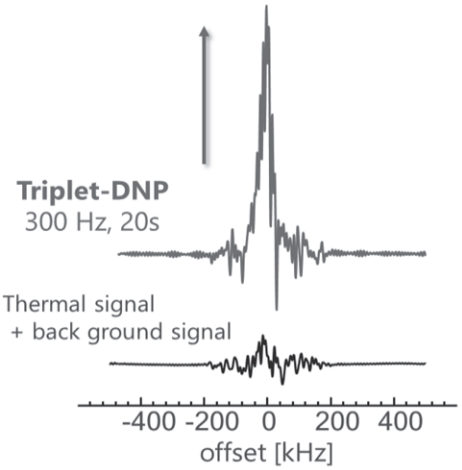


Fig. 4 NMR signal enhancement of ZIF-8⊃PDBA before and after Triplet-DNP .

References

1) K. Tateishi et al., *Angew. Chem. Int. Ed*. **2013**, 52, 13307.

2) K. Tateishi et al., *PNAS* **2014**, 111, 7529.

P67

クライオコイルMASプローブを用いた天然存在比の^{43}Ca MAS-NMR測定

○最上祐貴[1]，清水禎[1]，水野敬[2]，戸田充[2]，根本貴宏[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　理学研究科

Natural abundance ^{43}Ca MAS-NMR study by using the cryo-coil MAS probe

○Yuuki Mogami[1], Tadashi Shimizu[1],Takashi Mizuno[2], Mituru Toda[2], Takahiro Nemoto[2], Kiyonori Takegoshi[3]
[1] *National Institute for Materials Science*
[2] *JEOL RESONANCE Inc*
[3]*Department of chemistry, 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 solid-state NMR, which is one of the primary spectroscopic probes of the local environment of a nucleus, is difficult for ^{43}Ca because of low sensitivity due to its low natural abundance (0.135%), low gyromagnetic ratio　(γ = -1.80×10^{7} rad s^{-1} T^{-1}), and the presence of the quadrupole interaction (spin-7/2). So, the previous research on ^{43}Ca MAS-NMR were conducted using the high magnetic field (> 20T) and/or the large volume rotor(> 9.5φ). However, measurements in high magnetic fields, there is a demerit that the quadrupole linear derived from the structure information is scaled. As a measurement method that can satisfy the condition of high sensitivity at low magnetic field and high B_1, we introduced cryo-coil MAS. In this work, the ^{43}Ca MAS-NMR spectra were obtained at frequency of 26.9MHz (9.4T) using the Cryocoil MAS-NMR probe whose rotor diameter is 4mm.

【序論】

^{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 MAS-NMR は同位体置換(~50%)を行うことや[1,2]、大容量ローター(外径 9.5mm[3], 外径 14mm[4,5] など)を用いること、大きい外部磁場(>20T)を用いること[6]で信号雑音比の問題を克服することが多かった。

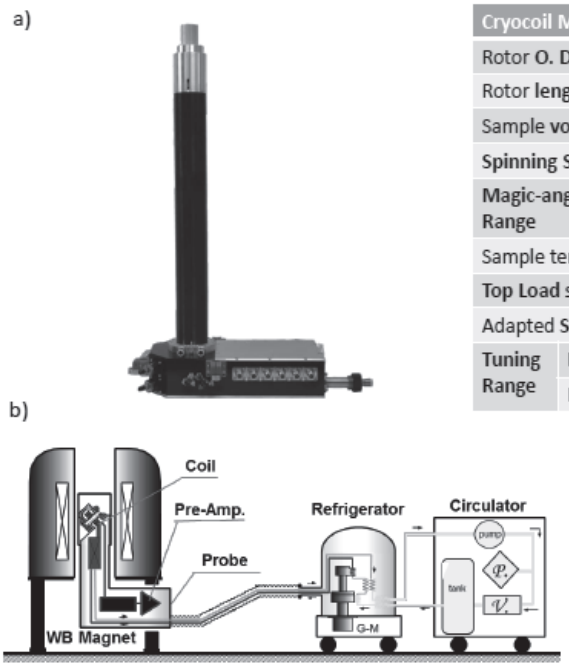
しかし、^{43}Ca のような四極子を有する低γ核の 1 次元 NMR 測定において、大きな外部磁場を用いることは、せっかくクローズアップしたい四極子相互作用がスケールされるため、必ずしも内部相互作用パラメータを正確に得るに適するとは限らない。四極子相互作用の大きさによっては、あえて四極子相互作用による線形の広がりをクローズアップできる中～低磁場下（~ 10 T）で測定した方が、内部相互作用パラメータを正確に得るには適している。

また、天然存在比の^{43}Ca MAS-NMRのような低感度核種のNMR測定は、特に未知試料に対し

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、とだみつる、ねもとたかひろ、たけごしきよのり

ては、マシンタイムの制約からパルス幅と繰返し時間の最適化が不十分なままに長時間積算が行われることが多く、そのような条件下で測定されたデータを線形解析して得られた内部相互作用パラメータは十分に検証に耐えるものとは言い難い。たとえば、従来研究においても、一般的な材料として知られるカルサイト（$CaCO_3$ 炭酸カルシウム，結晶系：三方晶）の四極子結合定数と非対称性パラメータは、実験値と計算値とで食い違いを示している（Table.1）。

今回、我々は、低磁場下(9.4 T)における ^{43}Ca MAS-NMR の低感度性を克服する装置として、単核共鳴ながら広帯域チューナブルのクライオコイル MAS プローブ(Fig.1)[7,8,9] を導入し、カルサイトの T_1 測定を行った。さらに、その結果をもとに待ち時間を最適化して ^{43}Ca -1 次元 NMR 測定を行い、得られた線形を解析することにより内部相互作用パラメータ（四極子結合定数、非対称性パラメータ）を求めたので、報告する。



Cryocoil MAS Probe Spec.		
Rotor O. D.		4 mm
Rotor length		22.5 mm
Sample volume		50 ul
Spinning Speed		<18 kHz
Magic-angle Adjust Range		±0.4 °
Sample temp.		0 – 80 ℃
Top Load system		Available
Adapted SCM		WB 9.4 -14.1T
Tuning Range	Low Freq.	26 – 90 MHz
	High Freq.	70 – 200 MHz

Refrigerator Spec.		
Coolant		Helium
Ambient temperature	Coil	14 K
	Pre-Amp.	45 K
Required time for start		6 hrs
Power Consumption		8 kW

Fig1. (a) The photo of the prototype of the cryo-coil MAS probe, and its performance in the column. (b) The operation diagram of the cryo-coil MAS probe on the left side, and the performance of the cooling system in the right column.

【実験】

本研究には磁場はJASTEC 400 MHz ワイドボアマグネット(9.4T, ^{43}Ca: 26.9 MHz)、分光計はJNM-ECA400、プローブはJEOL RESONANCE製単核共鳴クライオコイルMASプローブ試作6号機(ローター外径: 4 mm)を用いた。試作6号機のチューニングレンジは26.5 MHz～90 MHz である。

試料は、購入（和光純薬製）したカルサイトをそのまま試料管に封入した。試料量は71.2 mg であった。試料回転数は10.0 kHz であった。パルス出力は380 W (18° = 1.3 us)であった。また、マジック角は$N(CH_3)_4I$の^{14}N NMRを用いた。線形解析ソフトウェアとしてDMfit2015を用いた[10]。

クライオコイルMASプローブはコイル、プリアンプ、デュプレクサ等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[7,8,9]。今回用いたクライオプローブ試作機、冷凍機の性能および模式図をFig.1に示す。

【結果】

初めにカルサイトのT_1測定を行った(Fig.2)。飽和回復法(積算回数:35000回)による磁化成長曲線の結果を示す。I > 1/2の半整数核の緩和時間は複数の時定数を含む多項式によってあらわされるが、今回は実験条件として繰り返し時間を決めるための指標とすることを目的としたため簡易的に単一指数関数でフィッティングを行っている。このフィッティングの結果からT_1は約3.0秒と見積もられる。

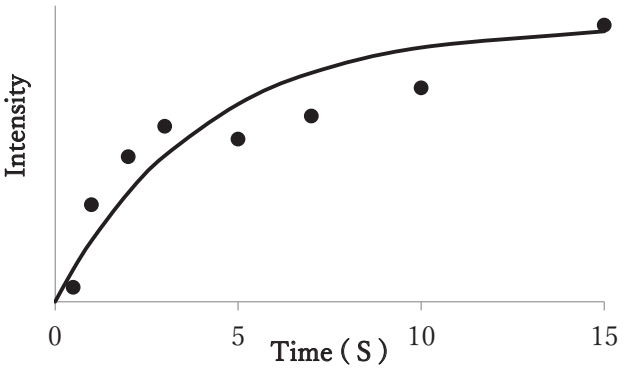


Fig.2 Magnetization build-up curbe of 43Ca MAS-NMR of calcite by saturation recovery method. Magnetization intensity (●) plotted with the fitted curbe by single exponential(T_1 = 3.0s)

Fig.3に待ち時間を変化させ(100 ms, 300 ms, 1 s, 3 s, 10 s)測定したsingle pulse NMRの測定結果を示す。積算回数はそれぞれ100 ms, 300 ms, 1 s,では350000回、3 sでは70000回、10 sでは35000回でdead timeはいずれも600usとした。T_1に対して十分といえる10 s程度の待ち時間を取らない場合S/Nが悪くなっている。待ち時間が1 s以下のスペクトルではかろうじて特異点たる二つのピークはエッジは観測可能であるが、スペクトル全体の線形は歪んでいる。このスペクトルを線形解析する際には特異点の現れる周波数だけでなくその強度も重要である。

Fig.4にFig.3の最下段のスペクトル(待ち時間10秒, 積算回数35000回)を抜き出して示す。DMfitによりMAS下の2次までの四極子相互作用の線形解析を行った。得られた四極子パラメータをTable.1に示す。

Cq(四極子結合定数)は先行研究の実験値に近い値となったがη(非対称性パラメーター)は0でない値となった。これは、本研究の場合は、十分な待ち時間を取ることによって$\eta \neq 0$に特徴的な非常に微弱な信号成分(「肩」や「裾」に相当する成分) をゆがめることなく観測することができたためと考えられる。したがって先行研究において、8.5 T下でカルサイトを含む様々なCaの試料の^{43}Ca NMR測定で設定された0.3 s~ 1.5 sという待ち時間は適切な値ではなかったと考えられる。

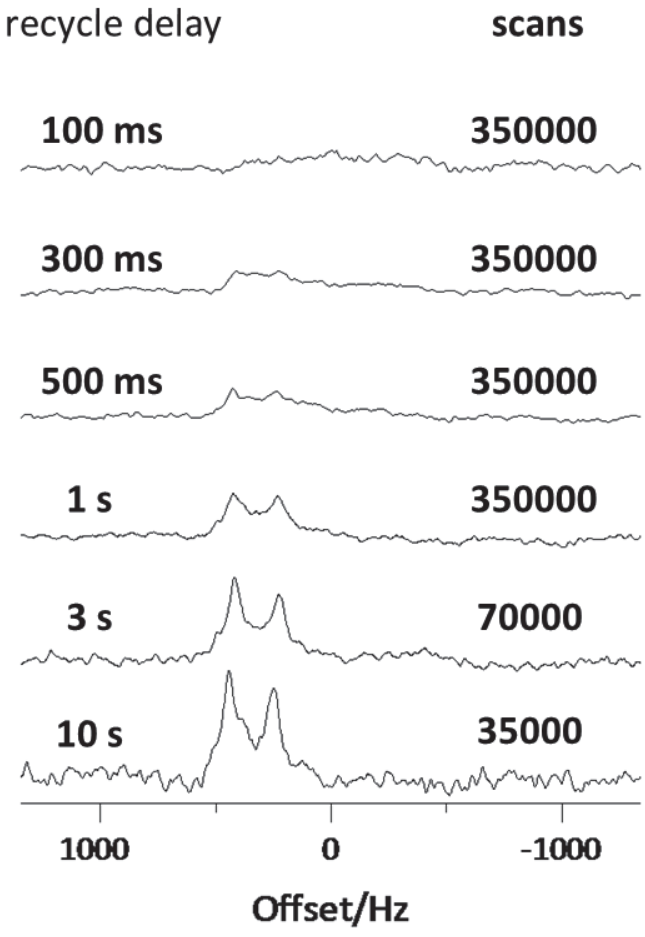


Fig.3 The ^{43}Ca NMR spectra of $CaCO_3$ (calcite) at the various recycle delay (100 ms, 300 ms, 500 ms, 1 s ,3s, 5s 10s). The recycle delay is indicated at the left and the count of scans is indicated on the right.

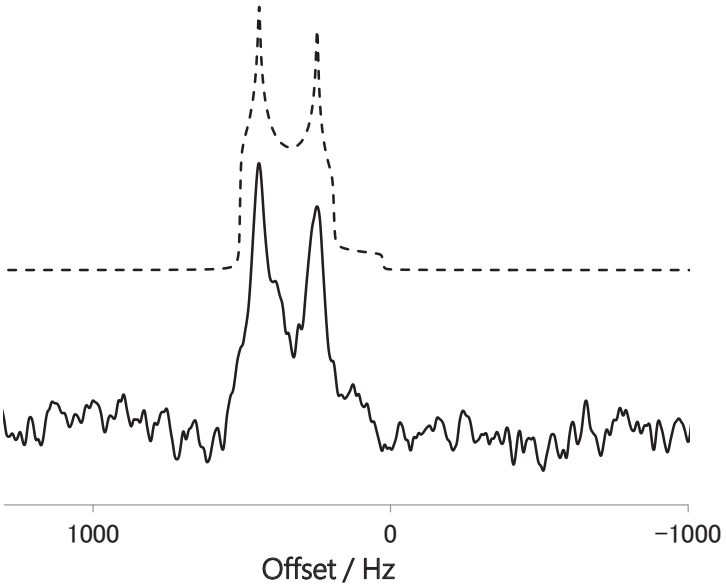


Fig.4 The ^{43}Ca MAS-NMR spectrum (solid line) of $CaCO_3$ (calcite) with the simulated spectrum (dashed line) fitted by DMfit 2015 .

	Previous work[5]		This work
	Calc.	Exp.	Exp.
C_Q/MHz	1.27	1.40	1.48
η	0.07	0.00	0.21

Table.1 ^{43}Ca Quadrupolar parameters (Quadrupolar coupling (C_q) and the asymmetry parameter (η) of the calcite.

【まとめ】

クライオコイルMASプローブを用い、低磁場下(9.4T)で線形解析の定量性を高めるために待ち時間を最適化したカルサイトの^{43}Ca MAS-NMR測定を行った。これにより先行研究とは異なる内部相互作用パラメータの値を得ることができた。

【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. D. L. Bryce, E. B. Bultz and D. Aebi, *J. Am. Chem. Soc.* 130 (2008) 9282.
7. T. Mizuno, K. Hioka, K. Fujioka and K. Takegoshi, *Rev. Sci. Instrum*. 79 (2008) 044706.
8. T. Mizuno and K. Takegoshi, *Rev. Sci. Instrum.* 80 (2009) 124702.
9. T.Nakai, M. Toda, J. Ashida, F. Hobo, Y. Endo, H. Utsumi, T. Nemoto and T. Mizuno, *Chem. Phys. Lett.* 678 (2017) 265.
10. D. Massiot, F. Fayon, M. Capron, I. King, S. L. Calve, B. Alonso, J. O. Dutand, B. Bujoli, Z. Gan and G. Hoatson, *Magn. Reson. Chem.* 40 (2002) 70.
11. C. Gervals, D. Laurencin, A. Wong, F. Pourpoint, J. Labram, B. Woodward, A. P. Howes, K. J. Pike, R. Dupree, F. Mauri, C. Bonhomme, M. E. Smith, *Chem, Phys. Lett.* 464 (2008) 42.

P68

カルシウムアルミノシリケートガラスの連鎖構造

○金橋康二
新日鐵住金（株）先端技術研究所

Structural connectivity for calcium aluminosilicate glasses

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

Calcium aluminosilicate (CAS) glasses and melts are one of the most important systems because of their extensive industrial use in industry, by virtue of the excellent chemical, mechanical, and optical properties of CAS glasses. Direct structural information on oxygen can be obtained by MAS and MQMAS spectra for the ^{17}O-enriched CAS sample. In the CAS glass, two types of oxygen mainly exist; bridging oxygens and non-bridging oxygens. However, spatial proximity of these oxygen species has not been clear. In this study, homonuclear through-space connectivity of dipolar-coupled oxygen species has been investigated using ^{17}O DQMAS. In addition, ^{27}Al DQMAS has been applied to obtain spatial proximity of different coordination numbers of aluminum species (tetrahedral and penta-coordinated Al).

はじめに

カルシウムアルミノシリケート（CAS）ガラス・融体は地質学的観点のみならず、様々な優れた特性を持つため、産業上広く利用されている。製鉄プロセスにおいても、CAS ガラス・融体はスラグやモールドフラックスの主要成分である。粘性等の高温物性は、ガラス・融体の化学構造、特に同種核および異種核間のネットワーク構造に支配されるため、これらの構造情報を得ることは重要である。CAS ガラスの ^{17}O NMR スペクトルを測定することによって、粘性を上げる作用のある架橋酸素（Si–O–Al, Si–O–Si, まれに Al–O–Al）と、下げる働きを持つ非架橋酸素（Si–O---Ca）を区別することができる。しかしながら、これらの酸素構造間の連鎖構造（空間的な近接度合い）に関する情報については、これまでにほとんど報告がなく、不明な点が多い。そこで今回、^{17}O 核間双極子を利用した DQMAS 測定を行った。また、CAS ガラス中の Al は大部分が酸素 4 配位型として存在しており、一部の Al は 5 配位型として存在することがわかっている [1]。これらの配位数の異なる Al 間の連鎖構造についても、^{27}Al DQMAS によって検討を行った。

実験

試薬の Al_2O_3, $Si^{17}O_2$（既報に従って合成[2]）, $CaCO_3$, Na_2CO_3, MgO を所定比に混合し、900℃にて脱炭酸した後、密閉した白金チューブ内にて 1600℃にて溶融後、クエンチすることによって

ガラス、DQMAS

○かねはしこうじ

$15Al_2O_3$-$55SiO_2$-15CaO-15RO (R=Na_2, Mg, Ca)（mol 比）の組成比を有する CAS ガラスを合成した。

固体 ^{17}O および ^{27}Al NMR スペクトルの測定は ECA-700（16.4 T）を用いた。MQMAS および DQMAS スペクトルは、それぞれ z-filter 型 3 パルス[3]および $SR2^1_2$ シーケンス[4]を用いた。^{17}O および ^{27}Al の化学シフト基準は、それぞれ $H_2{}^{17}O$→0 ppm、$AlCl_3$ 水溶液→–0.1 ppm とした。

結果

$15Al_2O_3$-$55SiO_2$-15CaO-$15Na_2O$ ガラスの ^{17}O 3QMAS スペクトル測定によって、1 次元の MAS スペクトルでは区別できなかった架橋酸素（Si–O–Al および Si–O–Si）と非架橋酸素（Si–O---Ca および Si–O---Na）が明瞭に区別された（Fig. 1）。2 種類の非架橋酸素は、大きく離れた化学シフト値を持つのが特徴的である[1]。

次に、DQMAS 測定の条件最適化を行うため、スピンロック実験によって nutation 周波数を変化させた際の ^{17}O の中央遷移（CT）ピーク強度の依存性について検討した（Fig. 2）。試料回転集周波数を 5〜18 kHz で変化させたところ、いずれの回転周波数においても Rotary resonance 条件（黒矢印：$\nu_r/2$、白抜き矢印：ν_r）でピークの強度が低下しており、特に最初にピーク強度が低下する条件（黒矢印）が同核の DQ コヒーレンス生成に有効である[4]。当日は ^{17}O だけでなく、^{27}Al DQMAS の結果を組み合わせることで、CAS ガラスの連鎖構造を検討した結果を報告する。

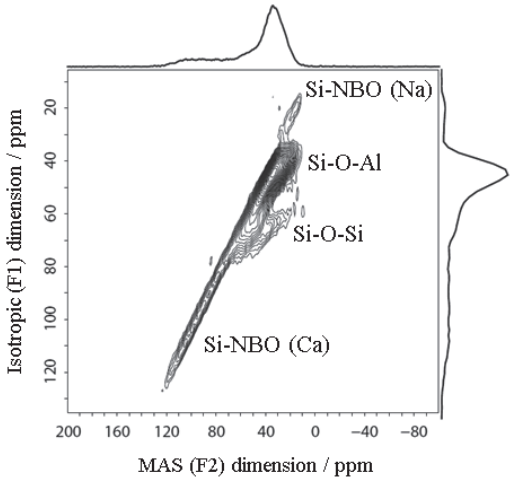


Fig. 1 ^{17}O 3QMAS spectrum for the $15Al_2O_3$-$55SiO_2$-15CaO-$15Na_2O$ glass at 16.4 T. MAS rate: 18 kHz.

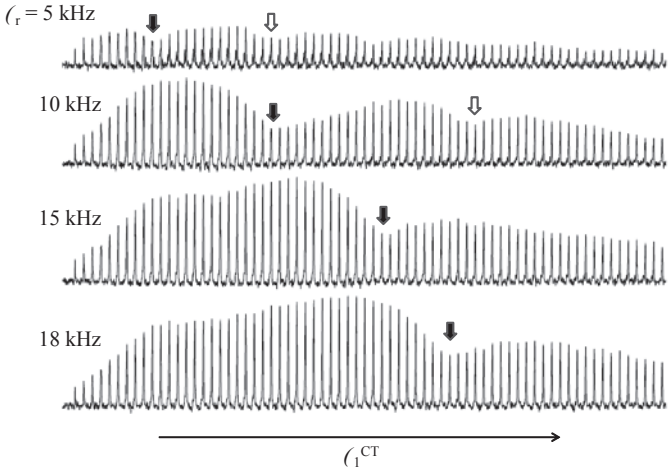


Fig. 2 ^{17}O spin-lock results for the $15Al_2O_3$-$55SiO_2$-15CaO-$15Na_2O$ glass providing ^{17}O central-transition coherences as functions of central-transition nutation frequency. Spin-lock time: 3 ms.

文献

[1] K. Kanehashi, *Solid State Nucl.Magn. Reson.*, **84** (2017) 158-163.

[2] A. E. Geissberger, P. J. Bray, *J. Non-Cryst. Solids*, **54** (1983) 121-137.

[3] J.-P. Amoureux, C. Fernandez, S. Steuernagel, *J. Magn. Reson. A*, **123** (1996) 116-118.

[4] G. Mali, G. Fink, F. Taulelle, *J. Chem. Phys.*, **120** (2004) 2835-2845.

P69

水陸バイオマス混合物の多面的計測ビッグデータの統合解析

○今榮康文[1,2]，坪井裕理[2]，菊地淳[2,3,4]
[1]株式会社住化分析センター，[2]理研CSRS，[3]横市院・生命医，
[4]名大院・生命農

Integrated analysis of plant biomass mixture based on multiply measured big-data

○Yasufumi Imae[1,2], Yuuri Tsuboi[2], Jun Kikuchi[2,3,4]
[1]*Sumika Chemical Analysis Service, Ltd.*
[2]*RIKEN Center for Sustainable Resource Science, Japan.*
[3]*Graduate School of Medical Life Science, Yokohama City University, Japan.*
[4]*Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University, Japan.*

Lignocellulose, the major component of terrestrial plant biomass composed of cellulose, hemicellulose, and lignin, is not simply a mixture of the macromolecules but a self-assembled supramolecular system in which the macromolecules are bound via weak interactions such as hydrogen bonding. While much of relations between the chemical structures and the physical properties are still elusive, uncovering mechanisms for the properties will promote effective utilization of lignocellulose in various research and industrial fields. In this study, we have been searching for useful information which reveals relations between chemical structures and physical properties of algal and plant biomass. We utilized multivariate analyses including peak decomposition, principal component analysis, and hierarchical cluster analysis using spectral data such as solid-state NMR spectra without isolation and purification of the sample specimens.

【背景・目的】

陸上植物由来バイオマスの大部分を占めるセルロース、ヘミセルロース、リグニンは高次に結合し、リグノセルロースを形成している。これは単なる混合物ではなく、自己組織化した超分子システムとして機能し、物性を発現している。これらの化学組成や構造はいまだ不明な点が多く、この物性を発現する機構が明らかになれば、様々な分野での高分子素材の活用が期待できる。同様に、アルギン酸やフコイダンなどの高分子で構成される海藻類バイオマスも、その一部が医薬品等で利用されることから、その工業的価値は極めて高いと考えられる。本研究室はこれまでに、藻類バイオマスの測定データ統合による多角的な評価手法の構築を行ってきた [1,2]。本研究では、藻類に加えて陸上植物バイオマスを試料として用いた。それらバイオマス試料を単離・低分子化してデータを解析するのではなく、分子集合体のまま各種高分子分析法に処し、多変量解析を行うことにより、有用な物理化学的特性情報の探索を試みた。

【方法】

藻類バイオマスとして微細藻類、紅藻、褐藻、緑藻を、陸上植物のバイオマスとしてコケ、シダ、草本、木本を試料として用いた。これらバイオマス試料を粉砕し、固体NMRや赤外分光等の各種高分子分析法で測定した。また、物性情報を得るため、示差熱重量測定（DTG）に供した。得ら

バイオマス，混合物解析，統合解析

○いまえやすふみ，つぼいゆうり，きくちじゅん

れた測定データを数値マトリックス化し、スペクトルのピーク分離や主成分分析、クラスター分析等の多変量解析を行った。

【結果】

各種スペクトルデータからの成分ピークの抽出および次元削減の手法として、NMF (non-negative matrix factorization, 非負値行列因子分解) によるピーク分離を採用した [2]。各バイオマス試料の固体NMRスペクトルをピーク分離し(Figure 1)、得られたピーク強度のデータを用いて主成分分析した結果をFigure 2aに示す。Figure 2aで示されたように、バイオマス試料の固体NMRスペクトルは試料種ごとに特徴的なプロファイルを示した。さらに、IRスペクトルおよびDTGスペクトルについても同様にNMFによるピーク分離を実施し、データマトリックスを並列に統合して多変量解析したところ、統合後のデータにおいても試料種ごとの傾向を見ることができた (Figure 2b)。本会ではこれらの結果に加えて、異なる測定データのピーク間の相関解析結果もあわせて発表する。

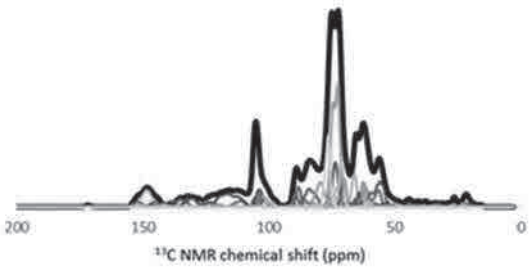
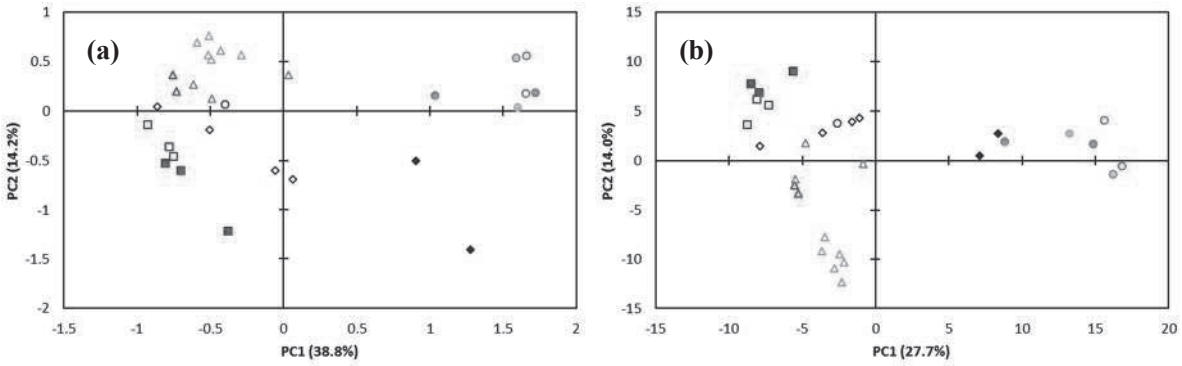


Fig. 1. Solid-state ^{13}C NMR spectrum of cedar biomass (bold) and peaks resulting from NMF peak decomposition.



○: microalgae, △: macroalgae, ◇: moss,
◆: fern, □: grass plant, ■: woody plant

Fig. 2. PCA score plots of peak decomposed solid-state ^{13}C NMR data (a) and integrated data (b).

References

[1] Ito, K., Sakata, K., Date, Y. and Kikuchi, J. (2014) *Anal. Chem*. **86**, 1098-1105.

[2] Wei, F., Ito, K., Sakata, K., Date, T. and Kikuchi, J. (2015) *Anal. Chem*. **87**, 2819-2826.

P70

温度可変NMRで見る$La_{2-x}Sr_xLiH_{1+x}O_{3-x}$における$H^-$のダイナミクス

○野田泰斗[1]，栗原拓也[1]，竹腰清乃理[1]、及川格[2]，高村仁[2]，小林玄器[3]
[1]京都大学大学院・理学研究科
[2]東北大学大学院・工学研究科
[3]分子科学研究所・協奏分子システム研究センター

Variable Temperature NMR for dynamics of H^- in $La_{2-x}Sr_xLiH_{1+x}O_{3-x}$

○Yasuto Noda[1], Takuya Kurihara[1], Kiyonori Takegoshi[1], Itaru Oikawa[2], Hitoshi Takamura[2], and Genki Kobayashi[3]
[1] *Division of Chemistry, Graduate School of Science, Kyoto University*
[2] *Department of Materials Science, Graduate School of Engineering, Tohoku University*
[3] *Research Center of Integrative Molecular Systems (CIMoS), Institute for Molecular Science*

Oxyhidride, where two kinds of anions O^{2-} and H^- coexist, is expected to show unique properties since H^- anion has no electrons in the *p* orbital unlike other anions. Recently, it was indicated that H^- anions conduct in $La_{2-x}Sr_xLiH_{1+x}O_{3-x}$ (x = 0, 1, 2), one of the oxyhidlides. In this research the activation energy of H^- anions in the $La_{2-x}Sr_xLiH_{1+x}O_{3-x}$ (x = 0, 1, 2) are examined by analyzing the longitudinal relaxation time of ^1H obtained with variable temperature NMR. The obtained activation energy is consistent with one derived by impedance method, and thus the H^- conduction is confirmed from a microscopic point of view.

近年、H^-とO^{2-}の二種類のアニオンが共存している酸水素化物が合成されさかんに研究されるようになった。他のアニオンと異なりH^-はp軌道を持たないことから、酸水素化物は特異な物性を発現することが期待されている。その酸水素化物の一つである$La_{2-x}Sr_xLiH_{1+x}O_{3-x}$ (x = 0, 1, 2) (Fig. 1)においてH^-イオンの伝導が報告された[1]が、そのダイナミクスついては明らかになっていない。本研究では、温度可変NMRを用いて^1Hの緩和時間の温度依存性を測定し、$La_{2-x}Sr_xLiH_{1+x}O_{3-x}$ (x = 0, 1, 2) 中のH^-のダイナミクスを微視的な観点から解析する。

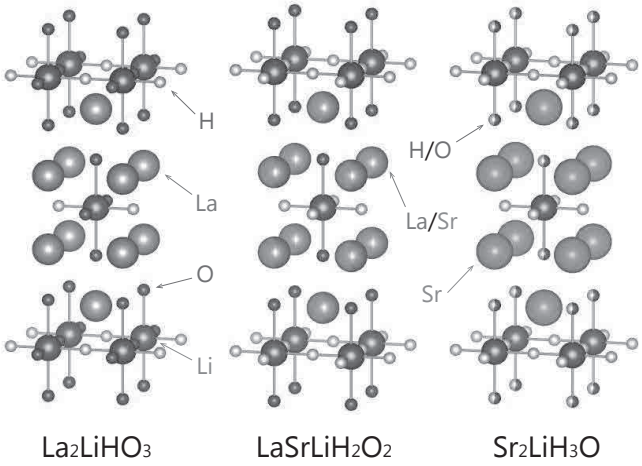


Fig. 1. Crystal structure of $La_{2-x}Sr_xLiH_{1+x}O_{3-x}$ (left: x = 0, center: x = 1, and right: x = 2).
All compounds consist of perovskite and rock-salt type structures stacked along the *c* axis.

温度可変 NMR，ハイドライドイオン，ダイナミクス

○のだやすと，くりはらたくや、たけごしきよのり、おいかわいたる、たかむらひとし、こばやしげんき

Table 1. Conductivity and activation energy obtained by impedance measurements.[1]

x in $La_{2-x}Sr_xLiH_{1+x}O_{3-x}$	σ / S cm^{-1} (573 K)	E_a / kJ mol^{-1}
0	5.2×10^{-6}	95.4
1	6.1×10^{-6}	75.9
2	3.6×10^{-5}	73.4

試料を既報と同様に高温高圧下で固相反応により合成した[1]。Table 1にインピーダンス測定より得た伝導度と活性化エネルギーををまとめた。水素化物の含有量が多くなると試料は水蒸気と反応し分解するため、Arガスが充満したグローブボックス内で試料をNMR測定用セルに導入し、温度と圧力、ガス種を制御して測定できるプローブシステム[2]を用いて常圧でArガスを流しながら温度可変NMRを実施した。観測周波数300.53 MHzで作動しているECA-300（JEOL RESONANCE）分光計で飽和回復法により^{1}Hの縦緩和時間を測定した。

Fig. 2に温度の逆数に対して^{1}Hの縦緩和時間を片対数プロットした。現時点ではx = 0に関しては一点しか正確に測定していないが、イオン伝導度が低い組成ほど縦緩和時間の極小値が高温側に現れることが示唆された。一般に緩和曲線の極小値が高温側にシフトすることは運動性が低いことを意味し、得られた傾向はインピーダンス測定結果と一致している。他の組成比については、緩和曲線の傾きから活性化エネルギーが48 kJ mol^{-1} (x = 1)、30 kJ mol^{-1} (x = 2) と求まり、オーダーでインピーダンス測定結果と一致している。x = 2の方が活性化エネルギーが低い傾向もインピーダンス測定の結果と一致した。ただし、NMRから得られたどちらの活性化エネルギーもインピーダンスから得られた値よりも小さい。これは今回測定した温度領域で観測している運動はH$^-$の長距離運動（イオン伝導）ではなく、局所的な運動であるためであると考えられる。x = 0 の活性化エネルギーを求め比較するには、より高温で測定することが必要である。現在、より高温での測定を準備しており、討論会当日では得られた結果を示し議論する予定である。

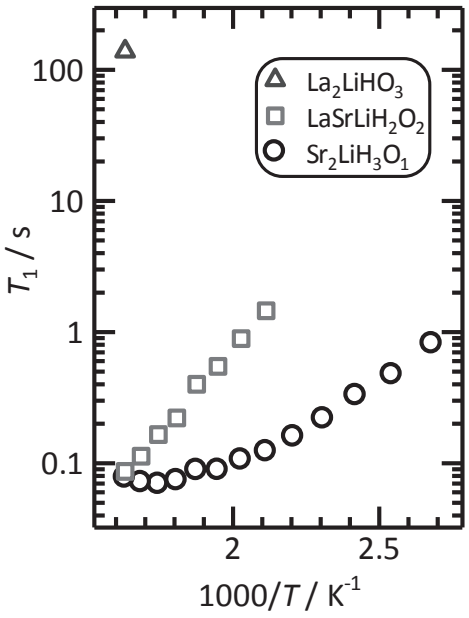


Fig. 2. Inverse temperature dependence of ^{1}H spin longitudinal relaxation time of $La_{2-x}Sr_xLiH_{1+x}O_{3-x}$ (triangles: x = 0, squares: x = 1, and circles: x = 2).

謝辞

本研究はJSPS科研費 新学術領域研究「複合アニオン化合物の創製と機能」 (JP16H06440) の助成を受けて実施された。

References

[1] G. Kobayashi, Y. Hinuma, S. Matsuoka, A. Watanabe, M. Iqbal, M. Hirayama, M. Yonemura, T. Kamiyama, I. Tanaka, and R. Kanno, *Science* **351** (2016) 1314-1317.

[2] S. Hashimoto, Y. Noda, H. Maekawa, H. Takamura, T. Fujito, J. Moriya, and T. Ikeda, *Rev. Sci. Instrum.* **81** (2010) 10401.

P71

固体NMRによるセメント関連材料の構造解析

○高橋貴文[1]，金橋康二[1]
[1]新日鐵住金・先端技術研究所

Solid State NMR structural analysis of cement-related materials

○Takafumi Takahashi[1], Koji Kanehashi[1]
[1] *Advanced Technology Research Laboratories, Nippon Steel & Sumitomo Metal Corporation*

Portland cement (cement) is a mixture constituting multi-component clinker minerals. In order to understand cement-hydrated reaction, structural information of clinker, supplementary materials, and hydrated ones is important. In this study we have collected solid state NMR spectra of synthesized clinker minerals, some supplementary materials, and investigated hydrated behavior of those components and Portland cement. The silicate parts of portland cement before hydration show multiple Q^0 units that are explained by alite and belite. It is suggested that the dissolution behavior clearly differs among Q^0 units. The degree of silicate polymerization of hydrated minerals is higher than that of original clinker minerals.

【緒言】

ポルトランドセメント（以下セメント）は、複数の鉱物相（クリンカー）から構成される混合物である。クリンカーとは、エーライト ($3CaO・SiO_2$)、 ビーライト（$2CaO・SiO_2$）、アルミネート相（$3CaO・Al_2O_3$）、およびフェライト相（$4CaO・Al_2O_3・Fe_2O_3$）である。セメントでは、クリンカーの水和反応によって水和物が生成し空隙を埋めることで、硬化し、強度を発現すると考えられている[1)]。代表的な水和物として、カルシウムシリケイト水和物（$mCaO・nSiO_2・lH_2O$; C-S-H）、エトリンガイト（$Ca_6Al_2(OH)_{12}(SO_4)_326H_2O$）、モノサルフェート（$Ca_4Al_2O_6SO_412H_2O$）などが知られている。この他にも、水和反応を制御する材料として、シリカフュームやフライアッシュが添加される場合がある。こうした複雑な化学構造の組成を有するセメント材料に対し、元素選択的な手法である固体NMRは非常に有効な構造解析手法である。セメントの化学構造を研究する際に、クリンカー、各種水和物の固体NMRスペクトルを把握しておくことは、重要なステップである。本研究では、エーライト等のクリンカー鉱物をはじめ、添加材であるフライアッシュ、さらには水和反応によって生成する各種水和物の構造解析を固体NMRにより実施した。

【実験】

固体NMR測定は、JEOL-ECA700(静磁場16.4*T*), CMX300(静磁場7.01*T*)およびJEOL-ECA400（9.4*T*）により行った。CMX300では、7mmφ試料管を用いて回転速度5kHzの下で、また、ECA400においては、8mmφ試料管を用いて回転速度7kHzにて測定を行った。^{29}Si MAS NMR 測定には18°パルスを用い、繰り返し時間は、試料の緩和時間T_1に応じて設定した。

^{27}Al-MAS&3MQAS 測定は、4mmφ試料管、回転速度18kHzにて行った。^{27}Al MAS測定時には、18パルスを用い、繰り返し時間は試料のT_1を応じて設定した。3QMAS 測定には、Soft pulse added mixing (SPAM) シーケンス[2)]を用いた。

固体NMR、セメント、水和
○たかはし　たかふみ，かねはし　こうじ

【結果および考察】

Fig.に、水和前のポルトランドセメントおよびaliteの^{29}Si MAS NMRスペクトルを示す。水和前のポルトランドセメントでは、約 -71ppm を中心に -68~-75ppmにかけてピークが観測される。alite単体のスペクトルを見ると、2つのピークが観測されている。aliteの結晶構造は既に知られており、Q^0構造（orthosilicate構造）のみが認められている[3]。ただし、固体NMRによる解析では、電子構造の異なる2つのQ^0サイトから成り立っていると考えられる。一方で、beliteの^{29}Siスペクトルは、-71ppmを中心としたピークのみであり、SiO_4四面体の連鎖構造としては、aliteと同じくQ^0構造を有する。

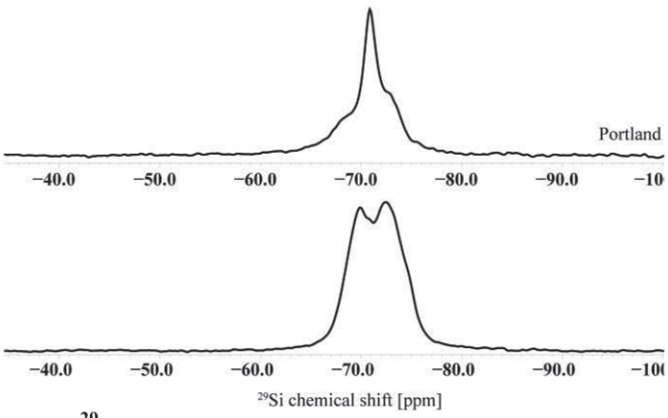


Fig.1. ^{29}Si MAS NMR spectra of Portland cement and alite before hydration.

水和後のポルトランドセメントおよび合成CSHの^{29}Si MAS&CPMAS NMRスペクトルをFig. 2に示す。Fig.2(a)より、クリンカー側のスペクトルを見ると、Fig.1(a)に比べて最も低磁場側の成分が大きく減少し、ほぼ消失していることが分かる。即ち、水和開始から24時間以内では、Q^0構造の中でも、最も低磁場側成分が、溶出し易い構造と考えられる。一方で、beliteに相当するQ^0構造は明らかにピーク形状が残されている。これは、従来の考え方どおり、beliteの水和反応がaliteに比べて遅い事と一致する。

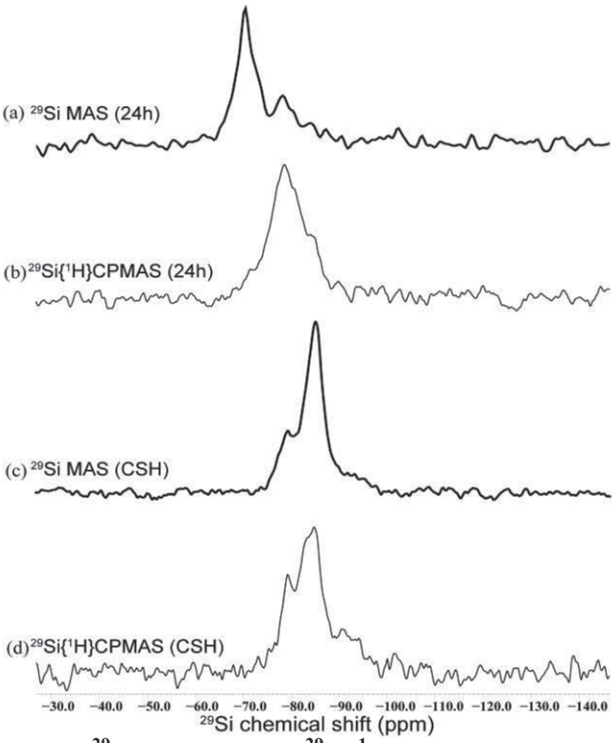


Fig.2. ^{29}Si MAS and ^{29}Si{^{1}H}CPMAS spectra of cement pastes and a synthesized C-S-H.

Fig.2(b)より、水和反応によって生成したC-S-Hは、元々のクリンカーよりSiO_4四面体の重合が進行していることが分かる。その化学シフト範囲に基づくと、セメントの水和で生成したC-S-HはQ^1~Q^2の重合度を有すると考えられる。また、Fig.2(b)&(d)の比較から明らかなように、セメントの水和で生成するC-S-Hと合成C-S-Hでは、Q^1とQ^2の比率が異なり、SiO_4四面体の多重度が異なる可能性が示唆される。

References

(1) H.F.W. Taylor (1997) Cement chemistry 2nd ed.

(2) Z. Gan and H.-T. Kwak *J.Magn. Reson.* (2004) **168**, 346-351

(3) Poulsen S L, Kocaba V, Le Saout, *et al. Solid State Nucl. Magn. Reson.* (2009) **36**, 32–34

P72

双極子および *J* 相互作用を利用した固体 NMR による CdSe クラスターのリガンド–表面結合の定量測定法

○栗原 拓也，野田 泰斗，竹腰 清乃理
京都大学大学院理学研究科

Dipolar and *J* interaction-based quantitative solid-state NMR for ligand–surface bond in CdSe nanoclusters

○Takuya Kurihara, Yasuto Noda, and K. Takegoshi
Division of Chemistry, Graduate School of Science, Kyoto University

The optoelectronic properties of semiconductor nanoparticles (NPs) are influenced by ligand–surface bonds, and thus characterization of the bonds is essential for applications of NPs. In this work, cysteine-capped CdSe nanoclusters are studied by *J*- and dipolar-correlated solid-state NMR experiments. To quantitatively examine the presence of the ligand–surface chemical bond and the bond length, *J*-single quantum filtered and rotational-echo double-resonance NMR techniques are applied, revealing that ~43% of the amines of the ligand-cysteine coordinate to the surface cadmium with the bond length of ≲2.47 Å, while ~11% of them are located nearby the surface without forming the bond.

1. 序論

溶媒中で有機分子をリガンド (保護基) に用いて合成される半導体ナノ粒子は、発光材料や太陽電池、ナノデバイスなどへの応用に向け研究されている。その物性には、有機分子の官能基と無機元素が相互作用する粒子の表面・界面の構造が大きく影響することが知られている。そのため、例えば異なる官能基を持つ複数種類の有機分子をリガンドに用いて発光効率を向上させる試みや、複数官能基を持つ有機分子をリガンドとした粒子をナノエレクトロニクスへと使用する研究などが行われている。こうした研究では、どの官能基が粒子表面のどの無機元素へ配位しているかを明らかにし、物性と結び付けることが非常に重要となる。単結晶 X 線法は強力な構造解析手法だが、半導体ナノ粒子は単結晶を得ることが困難である。そのため分光法により構造解析が行われるが、これまでにリガンド–粒子表面の化学結合の存在が直接的かつ定量的に明らかにされたことはなかった。

本研究では固体 NMR を用いてナノ粒子のリガンド–表面結合を定量的に解析する方法を考案し、システインをリガンドとした CdSe クラスター (CdSe-Cys) に対して実際に適用した[1]。システインは 3 つの官能基 (S^-、NH_2、COO^-) を持ち、CdSe-Cys では S が表面 Cd と結合しているのに加え、NH_2 も Cd へと配位している可能性があることが赤外分光法から主張されている[2]。我々はこれまでに NMR 活性な同位体で濃縮された CdSe-Cys の合成・固体化法を確立して固体 NMR による構造解析を行っており、^{15}N–^{113}Cd CP/MAS 測定では全体のうち一部のシステインの NH_2 が Cd へ配位している可能性を見出している[3]。このアミノ基と粒子表面との化学結合について、本研究では *J* 相互作用および双極子相互作用を利用した ^{15}N–^{113}Cd および ^{15}N–^{77}Se 相関 NMR 実験により解析を行った。

定量固体 NMR，化学結合，半導体ナノ粒子

○くりはら たくや，のだ やすと，たけごし きよのり

2. 理論

錯体では化学シフトがリガンドの結合角度に依存することが知られている[4]。ナノ粒子ではリガンドが配向しておらず、このため化学シフトが分布してピーク同士が重なり合い広幅化することから、化学シフトから原子の化学状態を議論することが困難な場合が多い。実際にCdSe-Cys でも ^{15}N スペクトルに観測されるのは左右非対称な 1 本のピークである[3]。そこで、以下の 2 種類の方法をナノ粒子表面の NMR 測定に相補的に適用することで、化学結合の有無や結合形成の割合、結合長の解明を可能にする。

2.1. *J*-single quantum filtered (*J*-1QF) 法[5]

Figure 1a に示す *J*-1QF 法では、広幅な 1 本のピークのうち *S* 核と化学結合した *I* 核による成分のみを観測することができる。そのシグナル強度 I_{IS} は τ に対し

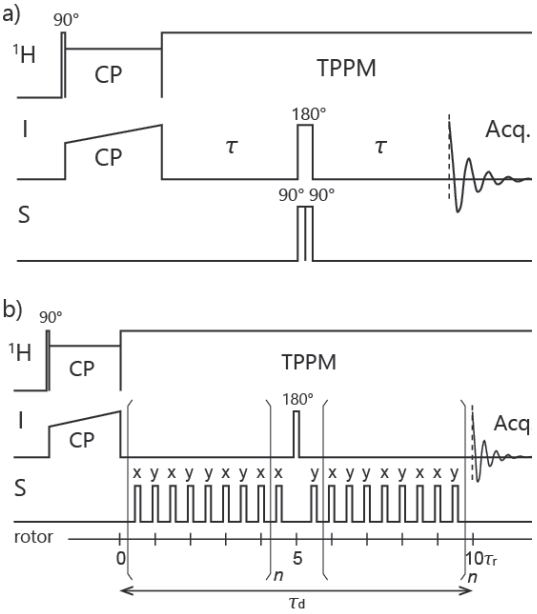


Fig. 1. Pulse sequences for (a) *J*-1QF and (b) REDOR experiments.

$$I_{IS} \propto N_{IS} \sin^2(\pi J_{IS}\tau) \exp(-2\tau/T_2) \tag{1}$$

に従って変化することが知られている。J_{IS} は *I*–*S* 間の *J* 結合定数、N_{IS} は 1 個の *S* 核と結合した *I* 核の個数である。一方、ピーク全体の強度 I_{full} はスピンエコー法において τ に対して

$$I_{\mathrm{full}} \propto N_{\mathrm{full}} \exp(-2\tau/T_2) \tag{2}$$

と表される。N_{full} は *I* 核の総数である。したがって、式(1)において $\sin^2(\pi J_{IS}\tau) = 1$ となる $\tau = 1/(2J_{IS})$ にて *J*-1QF 法とスピンエコー法の両実験を行い、得られたシグナル強度を比較することで、$I_{IS}/I_{\mathrm{full}} = N_{IS}/N_{\mathrm{full}}$ より *I* 核全体のうち *S* 核と結合しているものの割合を明らかにできる。

2.2. Rotational-echo double-resonance (REDOR) 法[6]

REDOR 法 (Fig. 1b) では、*S* 核へのパルス照射を有りおよび無しとした 1 組の実験より得られる *I* 核のシグナル強度 S_{r} および S_0 から、$\Delta S/S_0 = (S_0 - S_{\mathrm{r}})/S_0$ を求める。$\Delta S/S_0$ の τ_{d} に対する変化は *I*–*S* 間の双極子結合定数 $D = \mu_0\gamma_I\gamma_S\hbar/4\pi r^3$ の大きさに依存するため、実験から *D* を明らかにすることで *I*–*S* 核間距離 *r* を求めることができる。ここで、測定対象となる *I*–*S* 2 スピン系に核間距離が近いものと遠いものの 2 種類が混在する場合、ΔS は

$$\Delta S = f\Delta S^{\mathrm{close}} + (1-f)\Delta S^{\mathrm{far}} \tag{3}$$

と表される。*f* は *I* 核全体のうち *S* 核と近接しているものの割合である。*S* 核から遠い *I* 核の *I*–*S* 双極子相互作用が非常に弱く、$\Delta S^{\mathrm{far}} \sim 0$ と見なせると仮定すると、$\Delta S/S_0$ は第 1 種ベッセル関数 J_α を用いて

$$\frac{\Delta S}{S_0} = f\left[1 - \frac{\sqrt{2}\pi}{4} J_{1/4}\left(\sqrt{2}D\tau_d\right) J_{-1/4}\left(\sqrt{2}D\tau_d\right)\right] \tag{4}$$

のように表すことができる。これに従って実験結果の解析を行うことで、*I* 核全体のうち *S* 核に近接するものの割合およびその核間距離を明らかにできる。

3. 実験方法

CdSe-Cys の合成・固体化は、金属 ^{113}Cd (93.35%)、^{77}Se 粉末(99.2%)、L-システイン (^{15}N, 98%) を原料に用いて、以前我々が確立した方法により行った[3]。固体 NMR 測定は 9.4 T 磁場 (^{1}H 400.2 MHz, ^{113}Cd 88.8 MHz, ^{77}Se 76.3 MHz, ^{15}N 40.6 MHz) にて、3.2 mm 三重共鳴 T3 MAS プローブを用いて MAS 10 kHz で行った。REDOR 実験において、^{113}Cd へ照射する π パルスはシグナルの線幅 (~20 kHz) を考慮して 60°–300°–60° 複合 π パルス[7]を用いた。

4. 結果・考察

4.1. ^{15}N–{^{113}Cd or ^{77}Se} *J*-1QF NMR

Figure 2 に ^{15}N スピンエコー、^{15}N–^{113}Cd *J*-1QF、および ^{15}N–^{77}Se *J*-1QF スペクトルを示す。シグナルの有無により、システインのアミノ基はクラスター表面の Cd へと化学結合しており、一方 Se とは結合していないことが判明した。半導体ナノ粒子におけるリガンド–表面結合の存在を分光法で直接的に観測したのは本研究が初である。

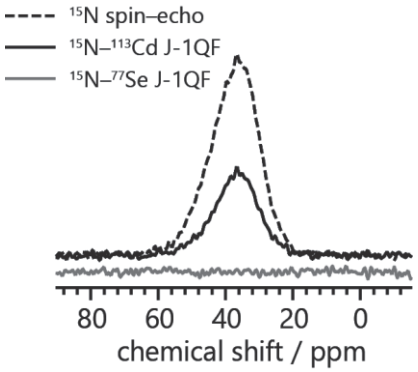


Fig. 2. ^{15}N spin–echo, ^{15}N–^{113}Cd *J*-1QF, and ^{15}N–^{77}Se *J*-1QF spectra acquired with τ = 8.55, 8.55, and 10 ms, respectively.

続いて Cd と結合するアミノ基の割合の解析を行った。スピンエコー実験におけるシグナルの τ 依存性より ^{15}N シグナルの T_2 を 10.8 ms、また *J*-1QF 実験におけるシグナルの τ 依存性より ^{15}N–^{113}Cd の J 結合定数を 58.5 Hz と得ており、ここから上記 2.1.に従い $\tau = 1/(2J) = 8.55$ ms において ^{15}N スピンエコーおよび ^{15}N–^{113}Cd *J*-1QF 測定を行った。Fig. 2 のスペクトルはどちらも τ = 8.55 ms で測定されたものであり、両者のシグナルの面積強度より I_{NCd}/I_{full} = 0.400 (±0.007) と得た。^{113}Cd の同位体濃縮率を考慮し、~43%のシステインのアミノ基が Cd へ配位していると結論付けた。

^{15}N スピンエコーと ^{15}N–^{113}Cd *J*-1QF スペクトルでピークの形状にあまり差がないが、これは先述のようにリガンドの表面に対する配向によって化学シフトに分布が生じ、^{113}Cd と結合を持つ ^{15}N のピークと持たないピークが重なり合っているためと考えられる。観測されたピークの線幅はおよそ 660 Hz だが、T_2 から計算される真の線幅は 29.5 Hz であり、このことはリガンドが配向しておらず化学シフトに分布が生じていることを裏付けるとともに、一見 T_2 が短そうなシグナルへの *J*-1QF 法の適用を可能にしている。

4.2. ^{15}N–{^{113}Cd} REDOR NMR

Figure 3 に REDOR 実験の結果および双極子結合定数 D を変数として計算した式(4)の曲線を示す。D = 180 Hz 、f = 0.5 として計算した曲線が実験結果とよく合ったことから、^{15}N–^{113}Cd 間の平均距離を 2.47 Å、^{113}Cd の同位体濃縮率を考慮してシステイン全体のうち Cd に近接したアミノ基の割合を~54%と得た。この割合は *J*-1QF 実験で得た値 (~43%) と比べ~11%大きい。REDOR 実験から明らかになる割合は化学結合

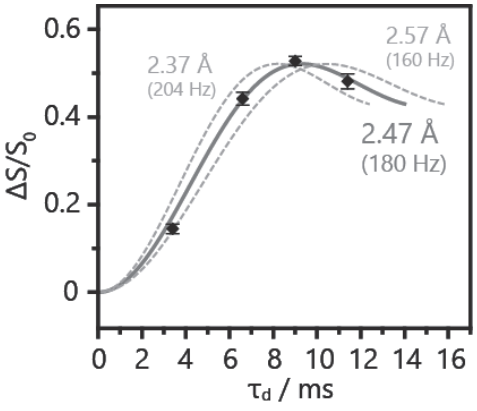


Fig. 3. Experimental ^{15}N–^{113}Cd REDOR fractions and calculated REDOR curves.

の有無に関わらず Cd と近接しているかどうかで決まることから、Cd と結合を形成せずにクラスター表面付近に位置するアミノ基が~11%存在していると予想される。Cd に近接したアミノ基のうち 2 割程度が結合を形成しておらず、その核間距離が N–Cd 結合長より長い可能性が高いことを考慮すると、真の結合長は測定された核間平均距離 2.47 Å より短いと考えられる。

4.3. CdSe-Cys における N–Cd 結合の考察

通常、*J* 結合の大きさから結合距離を推測することは困難だが、本研究で扱った ^{15}N–^{113}Cd *J* 結合に関しては、Eichele らが明らかにした ^{14}N–^{113}Cd *J* 結合定数が結合長の増加に伴い単調減少する傾向[8]を基に、CdSe-Cys における N–Cd 結合長を推測することができた。この Eichele らの研究と、CdSe-Cys の ^{15}N–^{113}Cd *J* 結合定数を ^{15}N と ^{14}N の磁気回転比の比 $\gamma_{14N}/\gamma_{15N} \sim 0.7$ でスケールして得た ^{14}N–^{113}Cd *J* 結合定数 41 Hz より、CdSe-Cys の N–Cd 結合長は大体 2.35–2.45 Å の範囲にあると見積もられた。4.2.において、REDOR 実験の結果に対し *J*-1QF 実験で得た結合の割合を基に行った結合長の考察は妥当であったと考えられる。この値は N–Cd 結合の距離としては長めであり、CdSe-Cys における N–Cd 結合は強いものではないとわかる。このことは、CdSe-Cys では全てのシステインの S が表面 Cd に結合しているのに対し、アミノ基は半分以上 (~57%) が結合を形成していないという結果と対応している。以上のように、化学結合の解析においては *J*-1QF 実験のような *J* 相互作用を利用した定量測定を相補的に組み合わせて行うことが重要だと言える。

5. 結論

本研究ではナノ粒子におけるリガンド–表面結合の解析を行うため、*J* 相互作用を利用した *J*-1QF 法および双極子相互作用を利用した REDOR 法を組み合わせた固体 NMR による定量測定法を考案し、CdSe-Cys に対し適用した。その結果、CdSe-Cys では全体のうち約 43%のシステインのアミノ基が 2.47 Å 弱の結合長で表面 Cd へ配位していること、また化学結合を持たずに表面付近に位置するアミノ基も約 11%存在することが明らかとなった。更にナノ粒子表面における化学結合の解析において、双極子相互作用を利用した距離測定だけでなく、*J* 相互作用を用いた結合の直接的な観測を相補的に行うことの重要性が示された。このように、ナノ粒子のリガンド–表面結合に対する有効な定量的解析方法を提案することができた。

6. 参考文献

[1] T. Kurihara et al., J. Phys. Chem. Lett. 8 (2017) 2555.
[2] Y.-S. Park et al., ACS Nano 4 (2010) 121.
[3] 栗原ら，第 54 回 NMR 討論会 (2015)，P70.
[4] G. S. H. Lee et al., Inorg. Chem. 32 (1993) 66.
[5] D. Sakellariou et al., J. Magn. Reson. 151 (2001) 40.
[6] K. T. Muller et al., Chem. Phys. Lett. 242 (1995) 535.
[7] A. J. Shaka and A. Pines, J. Magn. Reson. 71 (1987) 495.
[8] K. Eichele and R. E. Wasylishen, Inorg. Chem. 33 (1994) 2766.

7. 謝辞

本研究は JSPS 科研費 25888009 および JP16H06440 の助成を受けて実施された。

P73

固体NMRによるデシルジホスホン酸イミダゾリウム結晶（Im_2DDPAとImDDPA）の構造解析

○畝 亮太[1], 不破 寛規[2], 雨森 翔悟[3], 井田 朋智[1], 水野 元博[1,3]
[1]金沢大学大学院自然科学研究科，[2]金沢大学理工学域物質化学類
[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[2],Shogo Amwmori[3], Tomonori Ida[1], Motohiro Mizuno[1, 3]
[1]*Department of Chemistry, Graduate School of Natural Science and Technology, Kanazawa University*
[2] *School of Chemistry, College of Science and Engineering, Kanazawa University*
[3] *Institute for Frontier Science Initiative, Kanazawa University*

The development of solid proton-conductive materials using imidazole has attracted considerable attention. The imidazolium salts of dicarboxylic acids exhibit relatively high proton conductivity even though they are crystals [1]. 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 transport in the hydrogen network between the imidazolium ion and the carboxyl group and the reorientational motion of the imidazolium ion is considered to play an important role in the proton conduction mechanism [2,3]. A similar mechanism leading to the enhancement of proton conductivity can be expected for imidazolium salts of diphosphonic acids. We found that the imidazolium salt of decyldiphosphonic acid (imidazolium decyldiphosphonate crystals; Im_2DDPA) also exhibits high proton conductivity (Fig. 1). In the present work, the local structure and dynamics of imidazolium ions in the Im_2DDPA crystal were investigated using solid-state 2H NMR in order to elucidate the mechanism of proton conduction.

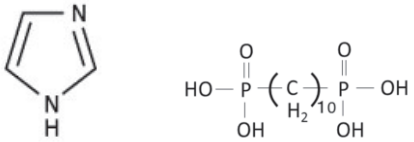


Fig. 1. Imidazole (left) and decyldiphosphonic acid (right).

【序】近年，燃料電池の電解質材料として固体の高プロトン伝導体が注目を集めており，イミダゾール及びその誘導体を含む多様な固体高プロトン伝導物質についての研究が行われている。デシルジホスホン酸イミダゾリウム結晶において，イミダゾール(Im) とデシルジホスホン酸(DDPA)のモル比が2：1の結晶（Im_2DDPA）は高温で高いプロトン伝導性（10-4 Scm-1）を示すが，モル比1：1の結晶（ImDDPA）はこのような高プロトン伝導性を示さない。そこで，本研究ではデシルジホスホン酸イミダゾリウム結晶の1：1試料と2：1試料について，固体NMRを用いて局所構造解析を行い，プロトン伝導メカニズムについて考察した。

【実験】デシルジホスホン酸(DDPA)とイミダゾール(Im)を混合し，加熱融解させることで試料を調製した。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，あめもりしょうご，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。ImDDPAは固相-固相転移はなく，融点は428Kだった。

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1.93 $\times 10^{-4}$ Scm^{-1}を示した。一方ImDDPAではσの最大値は7.20×10^{-7} Scm^{-1}であり，3桁以上の差が生じた。このIm_2DDPAとImDDPAにおけるプロトン伝導率の大きな違いは，プロトンキャリアであるImの割合だけでは説明できない。

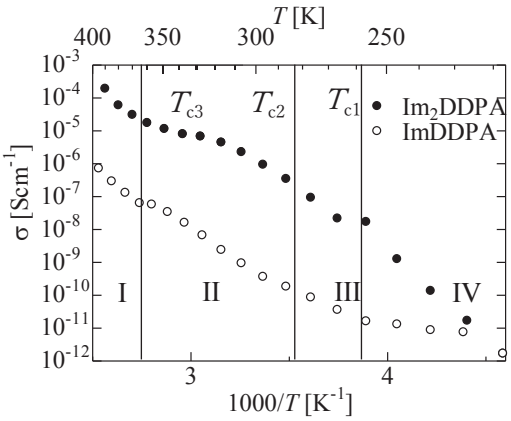


Fig. 2. Temperature dependence of proton conductivity for Im_2DDPA, ImDDPA.

Fig. 3 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。一方，ImDDPA は室温まで上げても Im は静止したままとなり，シャープ成分が現れるのが Im_2DDPA と比べて高い温度となった。393K まで温度を上げるとシャープ成分は 35%となり，Im_2DDPA と同程度となったが，ブロード成分の線形は静止していた。どちらの試料においても遅い成分と速い成分が確認できたが，2 : 1 は遅い成分でも運動しているのに対し，1 : 1 は静止したままであり，遅い運動が伝導率に関係があると考えられる。

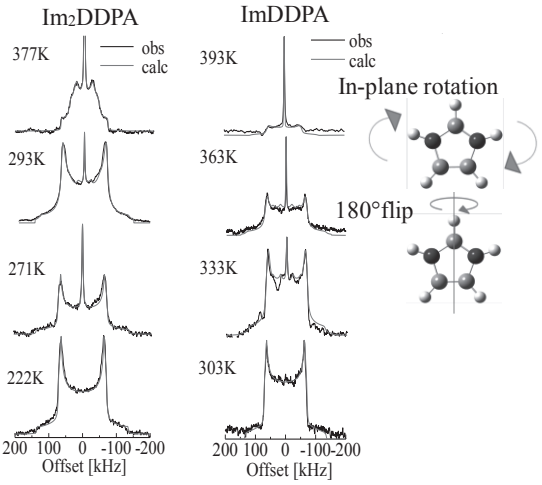


Fig. 3. ^2H NMR spectra for $(Im\text{-}d_3)_2DDPA$, (Im-d3)DDPA.

^{31}P NMR 測定を行ったところ，Im_2DDPA には ImDDPA にはない運動性の高いホスホン酸基が存在することが分かった。この運動性の高いホスホン酸基の存在比は，I 相では温度上昇に伴い増大した。Im_2DDPA の I 相でのプロトン伝導においては，面内回転の他にホスホン酸基の運動が関係していると考えられる。

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

CP-VC法によるアミノ酸、ポリペプチドのC-H, N-H距離の検討

○木村英昭[1]，堤遊[1]，荘司顯[2]
1 ブルカー・バイオスピン株式会社
2 群馬大学名誉教授

Analysis of C-H and N-H distances of amino acids and polypeptides by CP-VC method

○Hideaki Kimura[1], Yu Tsutsumi[1], Akira Shoji[2]
[1] *Bruker BioSpin K.K.*
[2] *Honorary Professor of Gunma University*

The relationship between the C_α-H and N-H distances and the poymorphic form of glycine crystals and the conformation of poly-L-alanine in the solid state has been studied utilizing the CP-VC (Cross Polarization with Variable Contact time) method. The influence of the C_α-H and N-H distances on the ^{1}H chemical shift differences by the poymorphs of glycine and the conformation of poly-L-alanine is investigated.

固体高分解能^{1}H NMRは、アミノ酸の結晶多形の解析，ポリペプチドのコンホメーション解析に有用な手法である[1-3]。我々は ^{1}H Conbined Rotation And Multiple Pulse Spectroscopy (CRAMPS)法を用いて、^{1}H化学シフトは、アミノ酸の結晶多形やポリペプチドのコンホメーションに依存して変化することを明らかにした。特に、αプロトン(H_α)とアミドプロトン(NH)は、アミノ酸の結晶多形の違いやポリペプチドのコンホメーションの違いによって化学シフトが変化するキー・シグナルである。一例として、Table 1にグリシンのα型及びγ型結晶形でのH_α、NH化学シフト値[1)]とポリ-L-アラニンのα-helix及びβ–sheetコンホメーションでのH_α、NH化学シフト[2-3)]をまとめた。グリシンのH_αシグナルは、α型結晶で2本に分裂するのに対し、γ型結晶では1本のピークのみが観測されるのが特徴的であり、結晶構造の違いによって最大1.1 ppmの化学シフト差が観測される。また，ポリ-L-アラニンのH_αシグナルもコンホメーションの違いによって1.2 ppmの化学シフト差が観測される。一方，NHシグナルも結晶多形やコンホメーションの違いによって化学シフトが変化するが、その化学シフト差はH_α化学シフトのそれよりも小さく、グリシンの結晶構造の違いによって0.4 ppm、ポリ-L-アラニンのコンホメーションの違いによって0.6 ppmの化学シフト差が観測される。水素結合に直接関与するNHシグナルの化学シフト差が、α炭素(C_α)に結合しているだけと考えられるH_αシグナルの化学シフト差より小さい理由を明確に説明することは難しい。

本研究では、高速MASと組み合わせることで正確なX-H間距離を算出する手法として注目されているCP-VC法[4)]を用いて、結晶形が異なるアミノ酸及びコンホメーションが異なるポリペプチドのC_α-H、N-H距離を算出し、^{1}H化学シフトの変化とC_α-H、N-H距離との関係を検討する。

Fig. 1にグリシンの(a) α型及び(b) γ型結晶の^{1}H MAS NMRスペクトルを示す。^{1}Hの共鳴周波数は400 MHzで、1.3 mm ^{1}H/BB CP-MASプローブを使用し、MAS回転周波数は65 kHzであった。65 kHzの高速MASにより固体高分解能^{1}H NMRスペクトルが観測され、グリシンのH_αシグナルがα型結晶で2本に分裂するのに対し、γ型結晶では1本のピークのみが観測されることが確認できる。

結晶多形，**ポリペプチド**，コンホメーション，**原子間距離**，CP-VC

○きむらひであき，つつみゆう，しょうじあきら

Table 1 グリシンのα型及びγ型結晶でのH_α、NH化学シフト値とポリ-L-アラニンのα-helix及びβ–sheetでのH_α、NH化学シフト

	グリシン		ポリ-L-アラニン	
	α型結晶	γ型結晶	α-helix	β–sheet
H_α化学シフト (ppm)	4.4, 3.4	3.3	3.9	5.1
NH化学シフト (ppm)	8.5	8.9	8.0	8.6

また、それぞれの^{1}H化学シフト値は、Table 1に示した^{1}H CRAMPSから得られた値とほぼ一致する。

Fig. 2 (a) に CP-VC法のパルス・シーケンスを示す。CP-VC法は、CP-MASの接触時間の部分をt_1 (間接軸)とし2次元展開するシンプルな方法である。高速MASと組み合わせて^{1}Hの同種核間双極子相互作用を平均化するので、多重パルスを用いてそれを平均化するPISEMA法のように間接軸がスケーリングされないので、より正確なX-H距離を算出することができる[4]。

Fig 2 (b)にグリシンのα型結晶のCP-VC 2Dスペクトルを示す。MAS回転周波数は50 kHz、^{1}Hデカップリングは強度150 kHzのXiXを用いた。このCP-VCスペクトルには、19.9, 14.0 kHzの2組のC_α-H双極子相互作用が観測され、それぞれの値からC_α-H距離が1.14, 1.29 Åと算出できる。この2組のC_α-H距離は、Fig. 1(a) に示した2本に分裂したH_αシグナルに対応するようである。発表時には、グリシンのγ型結晶の結果やN-H距離との比較、ポリペプチドでの結果についても示す予定である。

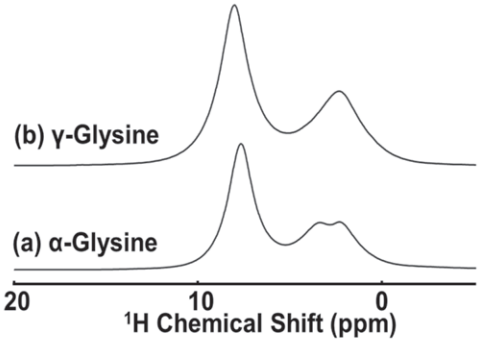


Fig.1 ^{1}H MAS NMR spectra of α- and γ-Glycines.

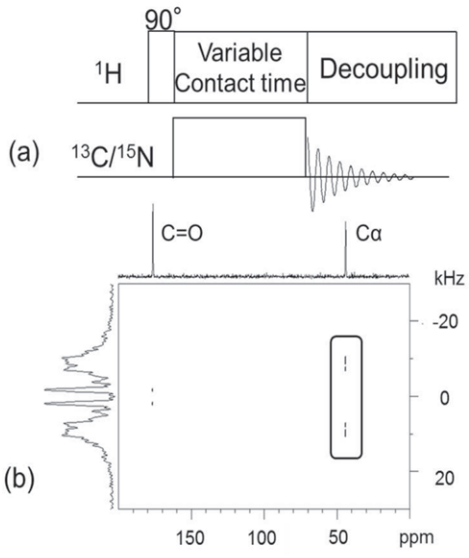


Fig. 2 Schematic drawing of CP-VC pulse sequence and CP-VC 2D spectrum of α-Glycine.

References

(1) Kimura, H., Nakamura, K., Eguchi, A., Sugisawa, H., Deguchi, K., Ebisawa, K., Suzuki, E., and Shoji, A. (1996) *J. Mol. Struct. 447*, 247-255.

(2) Shoji, A., Kimura, H., Ozaki, T., Sugisawa, H., and Deguchi, K. (1996) *J. Am. Chem. Soc. 118*, 7604-7607.

(3) Kimura, H., Ozaki, T., Sugisawa, H., Deguchi, K., and Shoji, A. (1998) *Macromolecules 31*, 7398-7403.

(4) Paluch, P., Pawlak, T., Amoureux, J.P., and Potrzebowski, M.J. (2013) *J. Magn. Reson. 233*, 56-63.

P75

マイクロ波照射ＮＭＲ分光法による液晶分子のマイクロ波加熱分子機構の解明

○内藤　晶[1]，田制侑悟[1，2]、槙野義輝[1]、藤戸輝明[3]、川村　出[1]
1横浜国立大学・大学院工学研究院
2東京農工大学・生命工学科
3プローブ工房

Microwave heating molecular mechanism in liquid crystals as revealed by microwave irradiation NMR spectroscopy

○Akira Naito[1], Yugo Tasei[1,2], Yoshiteru Makino[1], Teruaki Fujito[3], Izuru Kawamura[1]
[1] *Graduate School of Engineering, Yokohama National University*
[2] *Department of Biotechnology, Tokyo University of Agriculture and Technology*
[3] *Probe Laboratory*

Microwave (MW) irradiation NMR spectrometer was developed for the first time and was applied to elucidate the microwave heating mechanism of liquid crystalline materials. Local heating hot spot was observed in liquid crystalline N-(4-methoxybenzylidene)-4-butylaniline (MBBA) sample and the hot spot temperature was higher than the liquid crystalline bulk. The temperature of the MW heating sample in the isotropic MBBA was determined by the temperature dependent ^{1}H chemical shift values for the individual protons. Deferent temperatures were observed in the chemically different protons in the molecule under MW irradiation. This state is considered to be low entropy state which appear only under MW irradiation.

＜序＞

有機化学反応においてマイクロ波を照射することで、その反応速度や反応選択性が大きく向上することが報告されている。この反応促進効果はマイクロ波による溶媒の加熱が原因であると説明されているが、マイクロ波加熱効果の分子論的な理解は必ずしも十分ではない。極性分子は電場に配向する性質を持つが、電場が高周波で振動する場合、極性分子は電場の振動に追従することができず誘電損失を生じて、熱としてエネルギーが拡散する。液晶分子は誘電損失が大きく沸点が高いことから、マイクロ波照射によりより大きな加熱効果が期待できる。そこで、マイクロ波照射下でＮＭＲ信号の観測を可能にするマイクロ波照射固体ＮＭＲ分光器を開発した(1-4)。この装置を用いて液晶状態でマイクロ波加熱を観測したところ、液晶状態では局所加熱現象が観測された(1,2)。すなわち、液晶―等方相転移温度（Tc）以下で局所的に等方相の信号が現れ、その後、系全体が等方相に転移していく様子が観測された。一方、等方相以上の温度に設定してマイクロ波照射を行ったところ、液晶分子の中で、極性基に結合しているプロトンの温度が非極性基に結合しているプロトンに比べて高い温度になる現象が観測された(2)。このような加熱は通常加熱では起きないとから、マイクロ波加熱特有の状態が形成されることを示している。

＜In-situマイクロ波照射固体ＮＭＲ装置の開発＞

Fig. 1Aにマイクロ波照射固体ＮＭＲ装置の概略図を示す(1)。

マイクロ波照射NMR，液晶分子、マイクロ波加熱

○ないとうあきら，たせいゆうご、まきのよしてる、ふじとてるあき、かわむらいずる

この装置では固体ＮＭＲ分光器(CMX Infinity 400)にマグネトロン(IDX, 1.3 kW)マイクロ波発信機を装着した。ここから発生したマイクロ波を導波管により分光器近傍に伝送し、導波管同軸ケーブル変換器により変換して、同軸ケーブルをプローブ内に導入し、マイクロ波をＮＭＲプローブに照射した。このマグネトロンではＣＷおよびパルスマイクロ波発信を可能とした。パルス発信ではＮＭＲ分光器のトリガーパルスを使うことで、ＮＭＲパルス系列にマイクロ波パルスの組み込みを可能にした。マイクロ波共振回路の等価回路を Fig.2B に示す。このマイクロ波共振回路において、コンデンサー内部に試料を挿入した。これにより、電場を効率的に照射することが可能になり、マイクロ波加熱効率が格段に向上した。また、Fig.1C に示すようにラジオ波コイルはマイクロ波コイルの外側に位置することが重要であった。逆の場合、導電性金属はマイクロ波照射により、急速に加熱して昇華した。さらに試料管は二重管構造とし、外部からの熱を遮断する設計とした。

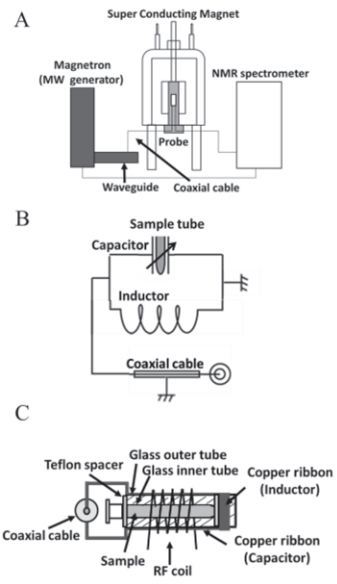


Fig. 1 A: MW irradiation NMR spectrometer. B: Equilizing microwave resonance circuit. C: Schematic diagram of MW resonance circuit. (1)

＜In situ マイクロ波照射ＮＭＲ分光法による液晶分子の液晶相における加熱過程＞

液晶物質 N-(4-methoxybenzyliden)-4-butylaniline (MBBA)の液晶状態におけるマイクロ波加熱現象を ^{1}H NMR スペクトルの解析から解明する試みを行った。まず、ＮＭＲ分光器の温度コントローラーにより 35 ℃に設定して液晶相の MBBA (Tc = 40.5 ℃) の ^{1}H NMR スペクトルを測定した (Fig.2B and D)。次に、温度を 45 ℃に設定したところ、液晶相の広幅の信号は先鋭な等方相の信号に変化した (Fig.2C)。その後、液晶相 MBBA の温度を 20 ℃に設定し、130 W のマイクロ波を連続照射した。照射 90 s 後、液晶の信号中にわずかに等方相の信号が現れた (Fig.2F－right)。この時、^{1}H NMR の線幅から求めた液晶相の温度は、36 ℃であり、相転移温度より 5 ℃低い温度であった。この結果は、マイクロ波加熱により液晶相内部にホットスポットができ、非平衡局所加熱状態が形成したことを示している (2)。

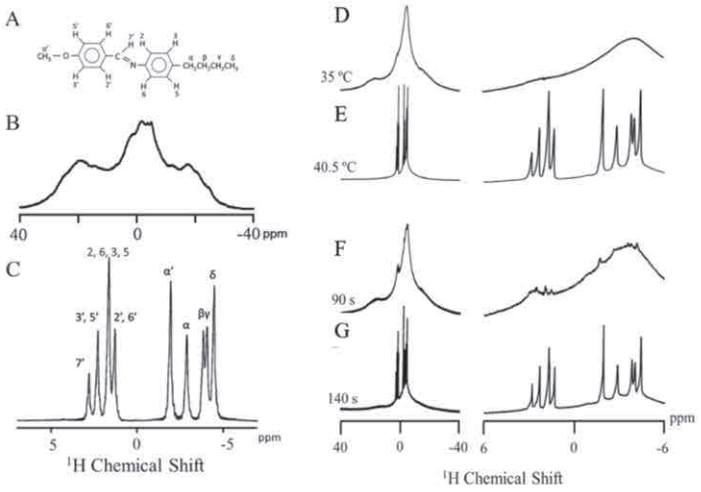


Fig. 2: A: Molecular structure of MBBA. B: ^{1}H NMR spectrum of liquid crystalline state at 35 ºC. C: Isotropic state at 45 ºC. D: ^{1}H NMR spectrum at 35 ºC E: At 40.5 ºC. F: ^{1}H NMR spectrum after 90 s of MW irradiation of 130 W by setting temperature at 20 ºC. G: After 140 s. (2)

＜In situマイクロ波照射ＮＭＲ分光法による液晶分子の等方相の加熱過程＞

液晶物質 MBBA（Tc = 41 ℃)についてＮＭＲ分光器の温度を 45 ℃に設定して、^{1}H NMR スペクトルを測定すると、各プロトンの信号が分離したスペクトルが得られた（2)(Fig. 2C)。反磁性物質では温度が上昇すると、^{1}H 化学シフト値は高磁場にシフトすることが知られている。そこで温度を変化して各 ^{1}H の化学シフト値を温度に対してプロットした。Fig. 3 left side より、各 ^{1}H の化学シフト値は温度に対して高磁場側に変化することが判明した。さらに、各 ^{1}H によってその傾きは異なっているが、^{1}H NMR 信号の化学シフト値と温度が直線関係になった。この結果を利用して、マイクロ波照射時の温度を液晶分子の ^{1}H 化学シフト値から決定することが可能になった。次に、等方相の温度を 50 ℃に設定して、マイクロ波の連続照射によって生じる等方相の液晶分子の温度上昇過程をマイクロ波照射時間に対してプロットした（Fig.3A,B)。65 W のマイクロ波を照射した場合、ほとんどの ^{1}H は 50 ℃から 75 ℃に上昇した。しかし、興味深いことに 7’，α'-位の ^{1}H は他の ^{1}H に比べてそれぞれ 115 ℃、105 ℃に上昇した。この結果はマイクロ波加熱では分子内で温度勾配ができることを示している。分子内温度勾配は、通常加熱では起こらないことから、マイクロ波加熱特有の現象であると考えられる。また、化学シフト値の特性を考慮すると、極性基近傍に結合するプロトンの電子密度が他のプロトンに比べて大きく上昇したと考察することができる。すなわち、マイクロ波照射により、極性基の分極状態が変化することを示している。この分極変化は化学反応の促進に関与するマイクロ波特有の加熱効果であると考察できる（2,4)。

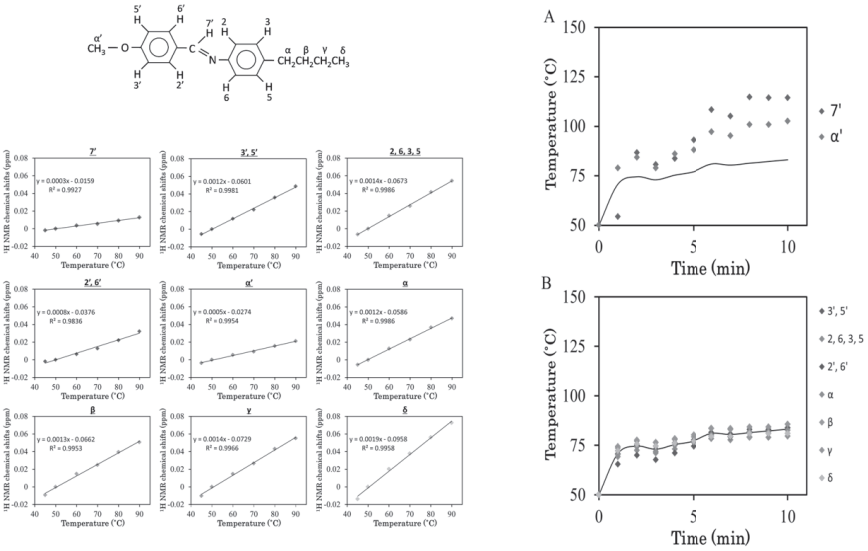


Fig. 3: Left side shows the relation ship of chemical shifts against temperatures for individual protons. A: Plot of temperature against MW irradiation time for 7’ and α’ protons. B: All other protons. (2)

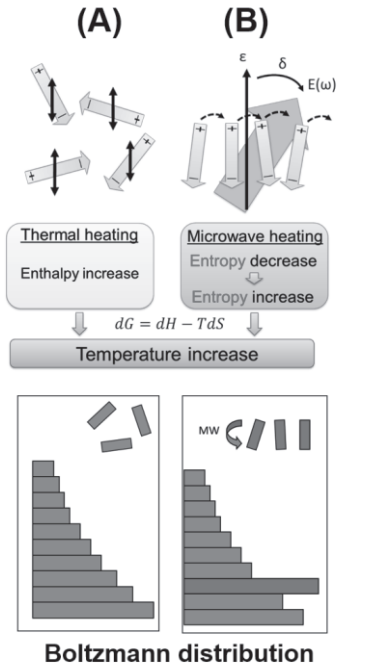


Fig. 4: A: Energy flow pathway under thermal heating and associated Boltzman distribution. B: Energy flow pathway under MW heating. Polar molecules are oriented in the oscilated electric field and is described as a non-Boltzmann distribution.

＜マイクロ波照射下でのエネルギー移動過程＞

マイクロ波加熱過程を理解するために、マイクロ波のエネルギーが分子に吸収される過程を考察する。強い電場が存在すると極性分子は電場方向に分子双極子を配向させて秩序を形成する性質を持つ。すなわち、エントロピーの減少が起こる。マイクロ波照射下ではこの配向した分子双極子は2.45 GHzで振動する

ので、系内の分子は2.45 GHzのエネルギーを持つ分子の占有数がより低エネルギーの占有数よりも多くなる。このことは系が非ボルツマン分布状態であることを意味している（Fig.4, bottom）。すなわちマイクロ波はエントロピーを減少させることで系はMWのエネルギーを吸収する（Fig.4B)。このエネルギーは分子秩序が分子間摩擦によって乱れることでエントロピーを増加させて分子の運動エネルギーを増加させる。この低エントロピー状態は通常の加熱では形成されない状態であり、マイクロ波加熱による特有の状態である。この低エントロピー状態では分子は配向しているので、分子間の電気双極子相互作用が発生する。この電気双極子相互作用のため、分子内の極性基の分極が起こる可能性が考えられる。この結果、極性基に結合したプロトンの電子密度が温度効果以上に変化するため、化学シフト値が変化し、同じ分子内で非極性基に結合したプロトンと異なる温度を示したことが考えられる。このように、マイクロ波照射下ではマイクロ波のエネルギーはエントロピーの減少により系に吸収され、その後、分子運動エネルギーに移動して温度が上昇するエネルギー移動過程が本実験により明らかになった。

＜結論＞

マイクロ波照射固体ＮＭＲ分光器を開発し、液晶のマイクロ波加熱による状態変化を観測した。液晶相の状態にマイクロ波照射を行った場合、相転移点（液晶相―等方相）より低い温度で、等方相が局所的に表れるホットスポットが観測された。液晶分子を等方相の温度でマイクロ波照射を行った場合、同じ分子内で極性基に結合したプロトンは他のプロトンに比べて高い温度になった。マイクロ波のエネルギーはエントロピーを減少させて系に吸収されるので、分子間電気双極子が生じて、分子の電子分極を変化させると考えられる。この低エントロピー状態は通常加熱では現れないマイクロ波照射特有の状態であることが判明した。

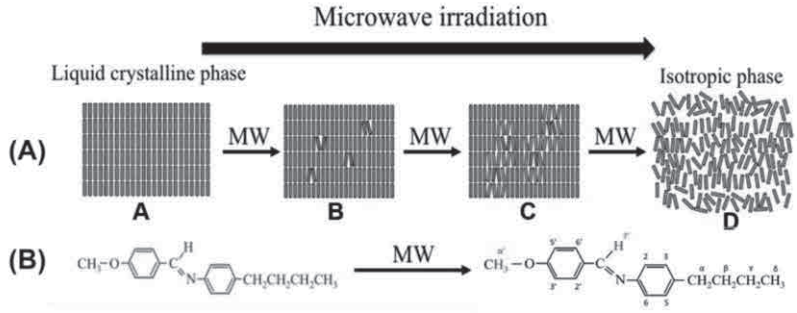


Fig. 5: (A) MW heating process (A→B→C→D) of liquid crystalline state. (B) MW heating process of MBBA molecule in the isotropic state.

References

(1) Y. Tasei, T. Yamakami, I. Kawamura, T. Fujito, K. Ushida, M. Sato, A. Naito, (2015) Mechanism for microwave heating of 1-(4’-cyanophenyl)-4-propylcyclohexane characterized by in situ microwave irradiation NMR spectroscopy. *J. Magn. Reson.* 254, 27-34.

(2) Y. Tasei, F. Tanigawa, I. Kawamura, T. Fujito, M. Sato, A. Naito, (2015) The microwave heating mechanism of N-(4-methoxybenzyliden)-4-butylaniline in liquid crystalline and isotropic phases as determined using in situ microwave irradiation NMR spectroscopy. *Phys. Chem. Chem. Phys*. 17, 9082-9089.

(3)内藤　晶、(2014）電磁場相互作用のＮＭＲによる研究、最新マイクロ波エネルギーと応用技術　吉川　昇　編、産業技術サービスセンター　発行，74-77.

(4) A. Naito, Y. Tasei, Y. Makino, I. Kawamura, (2017) Photoirradiation and microwave irradiation NMR spectroscopy. Experimental approaches of NMR spectroscopy. The NMR society of Japan Ed. Springer,　DOI 10.1007/978-981-10-5966-7_5.

P76

NMR を用いたポリ 4-メチルペンテン 1 の Xe 収着特性評価

○野村 優友，吉水 広明
名古屋工業大学大学院　工学研究科

Gas sorption properties of poly 4-methyl-1-pentene characterized by ^{129}Xe NMR

○Yusuke Nomura, Hiroaki Yoshimizu
Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology

Currently, gas separation membranes are active in various scenes such as suppressing emission of toxic gases and transporting gas. Among them, polymer separation membranes are attracting attention because of advantages such as low cost and cleanness. However, since the conventional polymer separation membrane is a separation in an amorphous phase having no ordered structure, there is a problem that gas selectivity and gas permeability are in a trade-off relationship. Therefore, we focused on poly-4-methylpentene 1 (PMP) with low density crystals in order to achieve gas separation in ordered crystalline phase. In this study, the gas sorption of the crystal phase was estimated by the constant volume method, and it was confirmed that it did not become zero and had a finite value. However, since the gas sorption characteristics of the amorphous phase was higher, the details of sorption of PMP were evaluated using NMR.

【緒言】18 世紀末の産業革命を契機に工業生産や技術革新が加速し，人々の生活が豊かになった。しかし，その影響で地球環境の劣悪化が進み，現在では我々ひとりひとりが意識し，積極的に取り組まなければならない世界的な問題になっている。このような社会的背景から産業社会では廃棄物から資源回収や有害物質の除去のため，物質分離技術の必要性が高まっている。その中でも，省エネルギーかつクリーンなプロセスを提供するという観点から高分子膜材料が注目されている。現在すでに高分子膜分離材料は医療などで活躍している。しかし，現状の高分子膜による分離は無定形高分子膜が用いられ，微細孔径分布に由来する拡散性の差異によって律せられるため，分離効率が不十分である。これを打破するために，秩序構造を形成する高分子を応用した分離膜が検討されている。高効率かつ高度な分離機能を兼ね備える究極の分離膜（スマートメンブレン；Fig. 1）を創成する挑戦は常用で必要不可欠なことである。本研究では，アイソタクチックポリ-4-メチルペンテン 1（PMP）の形成する低密度な結晶相に着目し，Xe を用いて結晶相の気体収着特性を検討した。

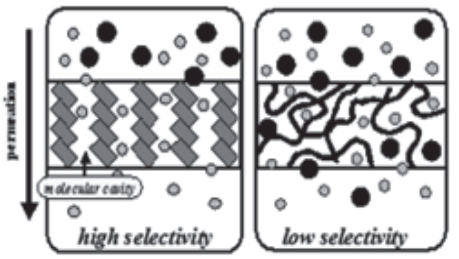


Figure1 Schematic representation of smart membrane.

【実験方法】

各サンプルの調製は以下のように行った。

PMP36 は三菱化学株式会社より提供された PMP 膜をそのまま使用した。PMP54 は同社から提供された PMP ペレットを膜厚が 100 μm になるように 270 ℃で溶融プレスした後，氷水で急冷した。PMP69 は同様に溶融プレスした後，室温まで徐冷した。PMP81 は PMP69 を真空下で 200 ℃，24 h 熱処理した。サンプル名の数字は DSC 測定から決定された結晶化度を示している。X 線回折測定により結晶形態が全て同じであることを確認した。これらの 25，0，−10 ℃における Xe 収着特性を定容法で測定した。25 ℃における収着挙動の詳細な情報を得るために ^{129}Xe NMR を行った。

PMP　気体分離膜　Xe

○のむらゆうすけ　よしみずひろあき

【結果及び考察】

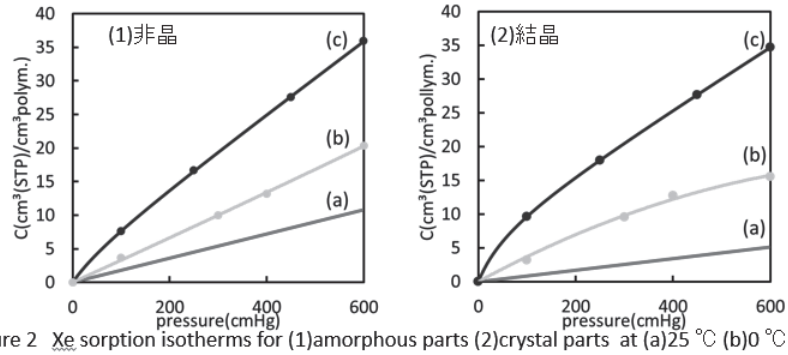


Figure 2 Xe sorption isotherms for (1)amorphous parts (2)crystal parts at (a)25 ℃ (b)0 ℃ (c)-10 ℃.

定容法を用いて得られた収着等温線から非晶、結晶における収着等温線を推定した。(Figure 2) Figure 2 から分かるように、25 ℃では収着等温線は Henry 型を示し，非晶相がゴム状態であることが確認できた。0, −10 ℃ではガラス状高分子の収着挙動である二元収着型の収着等温線を示した。これらの収着挙動変化は，先行研究でガラス転移温度が約 13 ℃と見積もられた事実を踏まえると，非晶相に関してはガラス転移に基づく結果と考察できる。Xe 収着量は低密度である結晶相の方が少ないという結果が得られ、密度とは逆の関係が得られた。そこで、より詳細な情報を得るために 25 ℃における ^{129}Xe NMR 測定を行った。各結晶化度のサンプルの化学シフト値の圧力依存を示すグラフからそれぞれ圧力 0 に外挿する値から Xe 分子 1 個(圧力がゼロ)のときの化学シフト値の結晶化度依存を推定した。(Figure 3)　Figure 3 から結晶化度の増加に伴って低磁場シフトしていることがわかる。このことから、結晶の方が Xe 分子の入り込める空間が小さいことが確認できた。さらに、Figure 3 から 0 に外挿する点を非晶の、100 に外挿する点を結晶の化学シフト値であると推定し、それぞれの化学シフト値から非晶と結晶の空孔の大きさを推定した。(Table 1)　Table 1 の結果からも同様に結晶の方が Xe 分子の入り込んでいる空孔のサイズが小さいことが確認できた。ピークの線幅の結果からも結晶の気体拡散性の方が低いことが確認でき、密度とは逆の関係になった。主な要因としては非晶部では高分子鎖が柔らかいため、Xe 分子が高分子鎖を押しのけて入り込むことができ、多量の Xe 分子が収着し、膜内での気体拡散性が高くなったと考えられる。

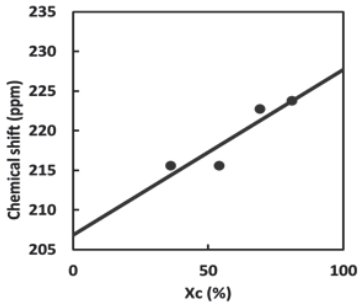


Figure 3Dependence of degree of crystallinity on ^{129}Xe NMR chemical shifts.

Table 1 ^{129}Xe NMR chemical shifts and size of microvoids .

	ピーク位置(ppm)	空孔サイズ(Å)
非晶	207	5.1
結晶	228	4.7

P77

NMRを用いたシンジオタクチックポリスチレンの結晶構造解析

○伊藤美翔，吉水広明
名古屋工業大学大学院 工学研究科

Crystal structure analysis of syndiotactic polystyrene by NMR method

○Mika Ito, Hiroaki Yoshimizu
Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology

Syndiotactic polystyrene show polymorphism, some are those applications as separation membranes is expected[1]. 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 local molecular mobility of the sPS films including the α, δ, and amorphous phases by solid-state NMR. The sPS films were prepared according to conventional methods[2]. ^{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[3]. 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 sPS is in the order of α form < amorphous < δ form. The second is that mobility of the sPS of amorphous became bigger with increasing temperature. The third is that mobility of the sPS 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)は結晶多形を示す、半結晶性高分子である。中でもα結晶はTTコンホメーションをとる主鎖をもち，結晶セル内にc軸に沿った直径が約3～5 Åの「キャピラリー状空孔」を形成する。また、δ結晶はTTGGコンホメーションをとる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結晶に特定の処理を施すと微細孔「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非晶部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[1]。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の詳細を理解する目的で，α，δ結晶含有膜および非晶部のみからなるアモルファス膜を対象に，固体^{13}C NMR（CP/MAS，CP/static，スピン―格子緩和時間(T_1^C，T_1^H)測定など）測定を行った。

＜実験＞

アモルファス膜はsPSペレット(出光興産提供；rr＝99.9 %，Mw＝2×10^5，Mw/Mn＝2.00)を280 ℃以上の溶融状態でプレス成形し，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ペレットを溶融成形した後，室温まで放冷して調製した。δ結晶含有膜はsPSペレットをクロロホルムに沸点近傍で溶解させ，70 ℃でキャストして調製した。調製した膜の主鎖コンホメーションと結晶構造の確認はFT-IRおよびX線回折測定から行った。

シンジオタクチックポリスチレン，固体NMR，結晶構造解析

○いとうみか，よしみずひろあき

CP/MAS測定はJEOL Resonance社製 ECA600Ⅱで行い，3.2 mmローターを用いMAS速度を15 kHzとした。緩和時間(T_1^C)測定も同様に行い，室温～90 ℃での値をTorchia法により得た[3]。緩和時間(T_1^H)測定は1 mmローターを用い、MAS速度を70 kHzとし，Inversion Recovery法により室温での値のみ得た。CP/static測定はVarian社製Inova 400plus NMR分光計を用い，室温～90 ℃で行った。

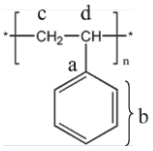
＜結果・考察＞

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_3	d_4
22	50	39	60	62	75	94	34	33	41	45	39
70	43	39	40	62	41	99	45	30	39	42	38
90	18	24	27	48	50	62	44	32	27	41	38

Table 2 ^1H spin-lattice relaxation time, T_1^H of sPS amorphous, α and δ form

sample	T_1^H (s)	
	b	c, d
amorphous	2.2	2.2
α	2.8	2.8
δ	1.1	1.1



各膜において，Torchia法により得られたT_1^Cの温度依存性をTable 1に示した。ピークの波形分離を行ったところ，α，δ結晶含有膜においては40 ppm付近に見られるd炭素のピークが2 本(d_1, d_2とd_3，d_4)に分裂したため，T_1^Cの値が2つずつ得られた。これらの異なる2つのT_1^C値は，化学シフトの値から，低磁場側d_1，d_3が結晶中，高磁場側d_2，d_4が非晶中由来のものと帰属される。アモルファス膜は，温度上昇とともにT_1^C値が減少するので，運動性が単調に増加するといえる。α結晶含有膜の各T_1^C値は，アモルファス膜のそれらより長いので，相対的に運動性が低いといえる。同様に考察して，δ結晶含有膜はアモルファス膜より運動性が高いと考えられる。また，この膜ではT_1^C値の温度依存性がほとんど見られなかった。一方、Inversion Recovery法により得られたT_1^Hの値(Table 2)は、どの膜においても主鎖と側鎖での値の変化は見られなかったが、各膜の運動性の大小は、T_1^C値から考察した結果と一致した。緩和時間測定では，側鎖ベンゼン環の炭素と主鎖メチレン，メチン炭素の運動性の違いを明瞭に指摘はできなったが，CP/static測定で得たスペクトル(Figure 2)と，化学シフト異方性の文献値から作成した粉末無配向膜のシミュレーションスペクトル(Figure 1)を比較したところ，温度上昇に伴い側鎖ベンゼン環のみ運動性が増加していることがうかがえた。どちらの測定からも，室温～90 ℃の範囲では，温度変化による急激な運動性の変化は見られなかったため，より高い温度での測定と，より遅い分子運動の観測方法を検討する必要がある。

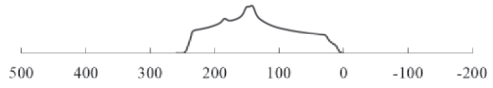


Figure 1 Simulation of ^{13}C NMR spectra of benzene rings of sPS.

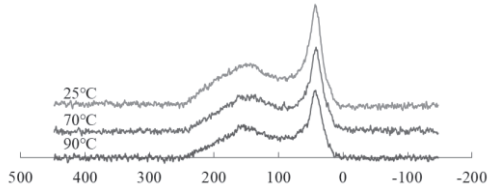


Figure 2 ^{13}C CP/static NMR spectra of sPS α form.

References

(1) Y. Tsujita, H. Yoshimizu, S. Okamoto, *J. Mol. Struct*., **739**, 3 (2005).

(2)G. Guerra, V. M. Vitagliano, C. De Rosa, V. Petraccone, and P. Corradini, *Macromolecules*, **23**, 1539 (1990).

(3) D. A. Torchia, *J. Magn. Reson*., **30**, 613 (1978).

P78

in-cell NMRなど困難な実験系を対象としたアミノ酸選択的安定同位体標識法

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

Amino-acid selective isotope labeling for challenging systems such as in-cell NMR

○Takuma Kasai[1,2], Kae Higuchi[1], Kohsuke Inomata[1], Takanori Kigawa[1,3]
[1] *RIKEN Quantitative Biology Center*
[2] *PRESTO, JST*
[3] *School of Computing, Tokyo Institute of Technology*

Amino-acid selective isotope labeling (AASIL) is a useful method to help main-chain assignment in challenging situations. We have developed a combinatorial labeling method, Stable isotope encoding (SiCode), inspired by information sciences. It regards AASIL as an encoding-and-decoding process, in which the amino-acid information is encoded to the isotope labeling pattern and decoded from the observed NMR spectra. To apply SiCode to low signal-to-noise-ratio (SNR) systems such as in-cell NMR, we introduced the optimal design of the labeling pattern for the robust amino-acid discrimination; the compensation of differences between samples such as experimental variances in protein incorporation or the numbers of cells; and the model-based analysis to retrieve amino-acid information from low-SNR spectra using prior knowledges of the amino-acid sequence and the labeling pattern.

アミノ酸選択的安定同位体標識法は、タンパク質の主鎖シグナル帰属にとって重要な手掛かりとなるアミノ酸型の情報をもたらす。このため、3次元三重共鳴測定による連鎖帰属の補助に用いることや、共有結合したカルボニル炭素とアミド窒素を検出するデュアル選択標識によって特定のアミノ酸の並び由来のシグナルを帰属することが可能であり、主鎖帰属が困難な場合に有用である。単純な選択標識法では1種類の選択標識体を1種類のアミノ酸に対応させるため、多種類の選択標識体が必要であったが、アミノ酸を選択標識体の組み合わせに対応させることで必要な選択標識体の数を減らす組み合わせ選択標識法が、多くのグループから提案されている。

我々は、選択標識法を「アミノ酸の情報を安定同位体標識に符号化し、NMRスペクトルから復号するもの」とみなすことで、情報科学の知見を活用し、必要な選択標識体の数を従来法よりも減らしたり、ノイズ耐性を向上させたりすることのできる「符号化標識法（Stable isotope encoding; SiCode）」を考案した[1]。本法は、安定同位体標識の有無の組み合わせだけで情報を表現するのではなく、中間の標識率をも活用して多くの情報量を保持させ、スペクトルを定量的に解析することでその情報を取り出すものである。このような特徴から、人間の目だけでは判断が難しいシグナルからであっても計算機を活用して情報を引き出すことができる。主鎖帰属が困難な実験系のひとつであるin-cell NMRに本法を適用するため、S/N比の低い条件でもなるべく正確な情報を得るための以下の3つの工夫を導入した。

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

①ノイズに強い標識パターンの設計

符号化標識法においては、各アミノ酸に対応させる標識率が、符号理論における「符号語」に相当する。ノイズに強い符号とするためには、符号語どうしの情報学的距離がなるべく離れるように設計するのがよい[1]。本研究で対象にしたヒトユビキチン変異体(L8A, I44A, V70A)にはシステインおよびトリプトファン残基がないため、残りの18種類のアミノ酸に対応する各符号語間の情報学的距離がなるべく離れるよう、シミュレーテッドアニーリング(SA)法を用いて標識パターンを最適化した(Fig. 1)。

	sample 1		sample 2		sample 3		sample 4	
	^{13}C	^{15}N	^{13}C	^{15}N	^{13}C	^{15}N	^{13}C	^{15}N
G	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
K	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.0	50.0
Q	100.0	100.0	79.0	89.5	0.0	50.0	100.0	100.0
L	0.0	50.0	100.0	100.0	79.0	89.5	100.0	100.0
I	79.0	89.5	0.0	50.0	100.0	100.0	100.0	100.0
T	100.0	100.0	37.0	68.5	50.4	75.2	51.8	75.9
M	50.4	75.2	100.0	100.0	37.0	68.5	51.8	75.9
Y	37.0	68.5	50.4	75.2	100.0	100.0	51.8	75.9
E	100.0	100.0	81.2	90.6	0.0	50.0	0.0	50.0
A	0.0	50.0	100.0	100.0	81.2	90.6	0.0	50.0
R	81.2	90.6	0.0	50.0	100.0	100.0	0.0	50.0
S	81.2	90.6	0.0	50.0	0.0	50.0	100.0	100.0
D	0.0	50.0	81.2	90.6	0.0	50.0	100.0	100.0
N	0.0	50.0	0.0	50.0	81.2	90.6	100.0	100.0
V	100.0	100.0	0.0	50.0	0.0	50.0	0.0	50.0
F	0.0	50.0	100.0	100.0	0.0	50.0	0.0	50.0
P	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0	0.0	0.0
H	0.0	50.0	0.0	50.0	0.0	50.0	100.0	100.0

Fig. 1. The labeling pattern optimized for Ubiquitin mutant protein.

②標識体間の実験誤差の補正

生細胞中のタンパク質を観測するin-cell NMRでは、細胞へのタンパク質導入量・細胞数・試料の均一さなどがばらつくため、通常の*in vitro* NMRに比べ、実験誤差による試料間の強度差が大きく、その補正が重要となる。符号化標識法では、タンパク質そのもののシグナルを利用して誤差補正をおこなっている。従来は^{15}N化学シフトから容易に判別できるグリシン残基のシグナルを用いていたが[1]、少数のシグナルのみに依存するこの方法は、S/N比が低い場合にはノイズの影響を受けやすいため、グリシン以外のアミノ酸残基も含めた多くのシグナルを利用することが望ましい。しかし、誤差補正とアミノ酸判別は相互に依存している。そこで、SA法により、誤差補正値と各シグナルのアミノ酸を同時推定する手法を開発し、より正確な補正ができるようになった。

③モデル選択によるアミノ酸情報取得

従来の符号化標識法では、NMRスペクトルからシグナル強度を取得し、標識率を逆算し、標識率の近いアミノ酸を選ぶという方法でアミノ酸判別をおこなっていた[1]。しかし、S/N比が低い場合やシグナルの重なりがある場合にはそもそも正確なシグナル強度を取得すること自体が難しい。そこで、既知の標識パターンとアミノ酸配列から、観測されうる強度比のモデルを網羅的に生成し、観測されたスペクトルをもっともよく説明するモデルを選択することで、アミノ酸の情報を取得することとした。この方法なら、標識パターンとアミノ酸配列の事前知識を利用してデータを解釈しているので、S/N比が低い状況でもより正しい情報が得られるからである(Fig. 2)。連続変数と離散変数からなる高次元のパラメータ空間における大域的最適化を必要とするため、レプリカ交換モンテカルロ法によりこれを実現した[2]。

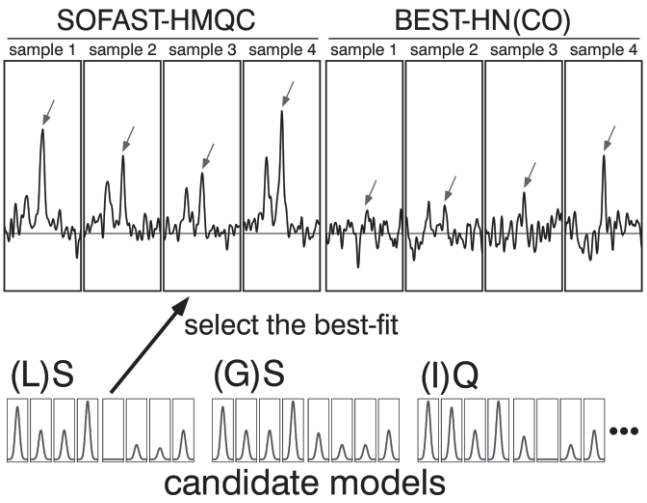


Fig. 2. Successful decoding of the amino-acid information from (L)S57 signal with the low-SNR in-cell NMR spectra of Ubiquitin mutant protein.

References

(1) Kasai, T., Koshiba, S,, Yokoyama, J., and Kigawa, T. (2015) *J. Biomol. NMR* 63, 213-221.

(2) Kasai, T., Nagata, K., Okada, M., and Kigawa, T. (2016) *J. Phys. Conf. Ser.* 699, 012003.

P79

NMRによるマルチドメイン蛋白質Drkの動態解析

○末元雄介[1], 井上 仁[1], 新井崇一郎[1], 鴨志田一[1], 三島正規[1], 猪股晃介[2],
葛西卓磨[2], 木川隆則[2], 池谷鉄兵[1], 伊藤 隆[1,2]
1首都大学東京・大学院理工学研究科
2理化学研究所・生命システム研究センター

NMR analysis of a multi-domain protein Drk

○Yusuke Suemoto[1], Jin Inoue[1], Souichirou Arai[1], Hajime Kamoshida[1], Masaki Mishima[1],
Kohsuke Inomata[2], Takuma Kasai[2], Takanori Kigawa[2], Teppei Ikeya[1] and Yutaka Ito[1,2]
[1]*Department of Chemistry, Tokyo Metropolitan University, Japan*
[2]*Quantitative Biology Center , RIKEN, Japan.*

In-cell NMR is currently the only approach that can provide structural information of proteins inside cells at atomic resolution. Extending in-cell NMR in order to study proteins inside higher eukaryotic cells, and thus making this method more useful in medical and pharmaceutical researches, was an important issue to be investigated. Various methods have been established for in-cell NMR studies in human cultured cells.

Drosophila Drk is composed of the SH3 domains (NSH3 and CSH3) at the N- and the C-terminus and the SH2 domain sandwiched between them. Although the overall structure has not been determined, solution NMR studies on NSH3 alone have shown that NSH3 is present in 1:1 equilibrium between fold and unfold states. In this study, we performed an in-cell NMR analysis of Drk NSH3 as well as *in vitro* NMR analyses of SH2-CSH3 di-domain and intact Drk so as to understand the dynamic property of Drk under phisiological conditions.

【背景】 生細胞中の蛋白質の動態を確認するための現存する唯一の手法として, in-cell NMRが注目されている. 本研究では, ヒト培養細胞を用いたin-cell NMR測定, および希薄溶液中のNMR測定を用いて, ショウジョウバエ由来のマルチドメイン蛋白質Drkの解析を行った. Downstream of receptor kinase (Drk)は, アミノ酸残基211残基の蛋白質であり, N末端とC末端に存在する2つのSrc-homology3 (SH3)ドメインと, これらに挟まれたSrc-homology2 (SH2)ドメインから構成されている. ホモログとして, ヒトGRB2, 線虫Sem-5などが存在する. GRB2/Drkは原がん遺伝子産物Rasが関与するシグナル伝達経路に存在し, 細胞膜に存在するレセプター蛋白質から伝達された増殖・分化などのシグナルをRasの活性化因子であるSosに繋げる役割をもつと考えられる. 全体構造は明らかになっていないが, N末端のSH3ドメイン(NSH3)に関しては溶液NMRによる解析がなされており, 興味深いことに単独で発現させた場合foldとunfoldの構造が1:1で存在していることが知られている. [1]

【実験】 大腸菌内の発現系を用いて, NSH3フラグメントおよびSH2-CSH3フラグメントの発現, 精製を行った. さらに$^{13}C/^{15}N$標識NSH3を電気穿孔法によりヒト培養細胞HeLa.S3に導入し, 2D ^{1}H-^{13}C SOFAST-HMQC測定を行った.

これと並行して, SH2-CSH3ドメインについてはまず溶液状態でのドメイン間の配向を決定を目指し, 蛋白質のシステイン側鎖チオール基とS-S結合で結合する常磁性ランタノイド金属タグM8-SPy[2]とのカップリング実験後, PCSの取得を試みた.

In-cell NMR, multi-domain proteins, paramagnetic NMR

○すえもとゆうすけ, いのうえじん, あらいそういちろう, かもしだはじめ, みしままさき,
いのまたこうすけ, かさいたくま, きがわたかのり, いけやてっぺい, いとうゆたか

またDrk全長状態でも解析を進めており，無細胞蛋白質合成系を用いて，^{13}C/^{15}N-Ala，^{15}N-Lys選択的標識試料を調製した．この標識試料を用いてHNCOスペクトルを測定した場合，NSH3に存在するA5-K6の配列に由来するシグナルのみが観測できる．これを利用して，全長でのNSH3ドメインの挙動を解析した．

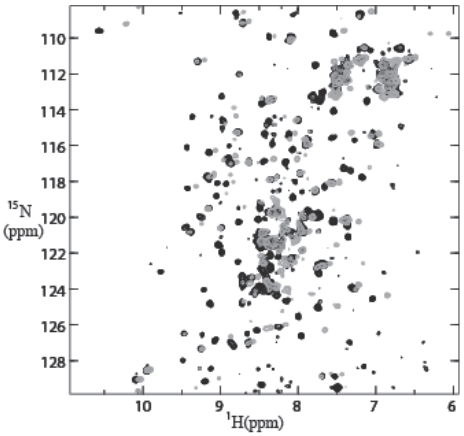


Figure 1. Overlaid 2D ^{1}H-^{15}N HSQC spectra of diamagnetic Lu^{3+}-M8-SPy-attached (black) and paramagnetic Dy^{3+}-M8-SPy-attached (grey) Drk SH2-CSH3 didomain with A68C/C100S mutations.

【結果と考察】　NSH3 については，現時点では良好な in-cell NMR スペクトルの取得に至っていない．原因として，細胞内への導入後速やかにNSH3が分解されている可能性，導入直後から細胞外に漏出している可能性などが考えられる．細胞内に導入されたNSH3の経時変化の追跡と，電気穿孔法のさらなる条件検討などを行うことによって，in-cell NMR スペクトル取得条件の確立を目指す．

野生型の SH2-CSH3 にはシステインが１残基存在するが，エルマン試薬に対する反応性がなかった．そのため新たに A68C という変異体を作成した．この変異体は，M8-SPy とのカップリング反応が効率よく進行し，良好な PCS の取得に成功した(Figure 1)．今後は，蛋白質主鎖 NMR シグナルの帰属を進め，PCS 情報の解釈を行う．また，A68C 以外のシステイン変異体を作成して PCS 情報を収集することで，希薄溶液条件でのドメイン間相対配向の決定を試みる．また，in-cell NMR 測定条件の検討も行い，細胞環境でのドメイン間相対配置の決定にも挑戦したい．

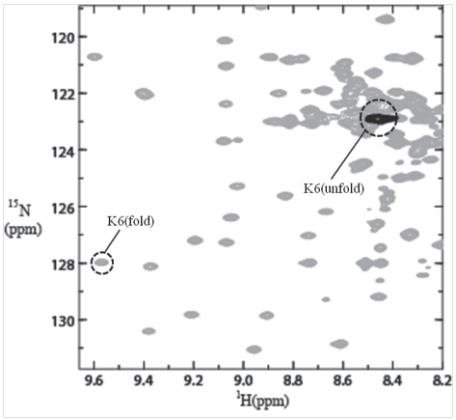


Figure 2. 2D HN(CO) spectrum of Ala-^{13}C/^{15}N and Lys-^{15}N labelled Drk (black) overlaid with 2D ^{1}H-^{15}N HSQC spectrum ^{15}N-labelled Drk NSH3 (grey) in which the cross peak positions due to K6 (fold) and K6 (unfold) residues are indicated.

全長 Drk について 278K で 2D HNCO 測定を行ったところ，1 つのシグナルのみが観測された．NSH3 単独の ^{1}H-^{15}N HSQC スペクトル（278K）と重ね合わせたところ，観測されたピークは unfold 型のものと推定された（Figure 2）．したがって，NSH3 ドメインは，全長では（NSH3 単独状態とは異なり）unfold 型に大きく平衡が偏っている可能性がある．選択的標識のパターンを増やすなどして，より詳細な解析を進め，全長蛋白質における NSH3 の動態の解明を目指す．

【Reference】

[1] Zhang, O. et al., *J. Biomol. NMR* **4**, 845-858 (1994);

[2] Häussinger, D. et al., *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 14761–14767 (2009).

P80

ヒト培養細胞中の蛋白質の 3D 三重共鳴 NMR 測定

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

3D triple-resonance NMR study of proteins in human cultured cells

○Hajime kamoshida[1,2], Teppei Ikeya[1,2], Masaki Mishima[1,2] and Yutaka Ito[1,2]
[1]Department of Chemistry, Tokyo Metropolitan University, Japan, [2]CREST/JST

Developments of elemental methodologies in in-cell NMR spectroscopy have allowed us to study a lot of proteins inside living human cultured cells. However the low concentration of target proteins which are incorporated into the cells from outside as well as the short lifetime of cells in NMR tubes have so far prevented us from performing high resolution 3D NMR experiments, such as 3D triple-resonance NMR spectra and 3D NOESY spectra. In this study, we have used *Streptococcus* protein G B1 domain, *T.thermophilus* HB8 TTHA1718, human ubiquitin with L8A/I44A/V70A mutations, and human calbindin D_{9k} (P47M+C80) as the model proteins and cultured HeLa.S3 cells as host cells. For 3D HNCA experiment in HeLa.S3 cells, TROSY-HNCA on $^{2}H/^{13}C/^{15}N$-labelled samples showed better S/N ratio compared to conventional, BEST- and BEST-TROSY-HNCA on $^{13}C/^{15}N$-labelled samples. Further, by using an altered version of the bioreactor system without mebiol gel-fixing of cells, we succeeded in measuring 3D ^{15}N separated-NOESY spectra of GB1 in HeLa.S3 cells with good S/N ratio.

【序論】

生きた細胞内は多種多様の蛋白質, 核酸, 脂質, 低分子で非常に混み合っているため, このような環境(macromolecular crowding)では, その中に存在する生体高分子の挙動に少なからず影響を与えることが示唆されている. 従って, 生きた細胞の中の生体高分子の生物活性, 動態をその場(*in situ*)で解析することは, 当該分子の「真の性質」を理解するうえで非常に重要である. NMR は非侵襲性の特徴を持つため, 生きた細胞中に含まれる蛋白質や DNA/RNA などの生体高分子についても解析可能である. 今日, NMR を用いた細胞内環境における生体高分子の解析(in-cell NMR)は, 原子分解能レベルで立体構造やダイナミクスの情報を得ることができる方法の1つとして注目されている.

ヒト培養細胞を用いた in-cell NMR では, 細胞内で安定同位体標識蛋白質を発現させる手法または精製した標識蛋白質を細胞外から導入する手法が報告され, 以前に比べ要素技術の進展により様々な蛋白質の導入が可能になってきた. しかし, これらの手法を用いて蛋白質を導入した場合でも, 達成できる蛋白質の細胞内濃度は依然として低く, 結果として3次元NMR測定のような長時間を要する測定法を使った詳細な解析は不可能であった. また, NMR 試料管内に詰めた細胞試料は培地を消費し枯渇していくため, 安定に長時間の in-cell NMR 測定を行うためには bioreactor システム [1]のような方法が必要不可欠である.

そこで本研究では, モデル蛋白質を用いて, ヒト培養細胞への導入手法の比較・検討を行い, その後, 従来感度の問題から解析可能なクオリティーのスペクトルの取得が不可能であった, 三重共鳴 3 次元 NMR スペクトルの取得を目指し, 様々な要素技術の改良・最適化を行った. さらに, 後述する NMR 試

In-cell NMR, electroporation, backbone resonance assignment, bioreactor system

○かもしだはじめ, いけやてっぺい, みしままさき, いとうゆたか

験管を改良した新しい bioreactor システムを用いることで，感度的にさらに困難と考えられた 3D ^{15}N separated -NOESY 測定も行った．

【実験・結果】

ヒト培養細胞としては，浮遊培養が可能で，NMR 試料管中での生存率が HeLa 細胞よりも良好な HeLa.S3 細胞を用いた．細胞内に導入するモデル蛋白質としては，連鎖球菌 protein G B1 ドメイン（GB1），高度好熱菌 TTHA1718，ヒト calbindin D_{9k}，ヒト ubiquitin L8A/I44A/V70A 変異体を用いた．細胞内への導入法としては，電気穿孔法を選択し，invitrogen 社の Neon 装置を用いてプロトコールの確立および種々の導入条件を検討した．NMR データの取得は H/C/N cryoprobe を装着した Bruker Avance-II 600MHz 装置を用い，nonlinear sampling による測定時間の短縮を行った．データ処理は Azara v.2.8 および QME ソフトウエアを用いた．NMR スペクトルの解析は CcpNmr Analysis v.2.2 ソフトウエアを用いた．

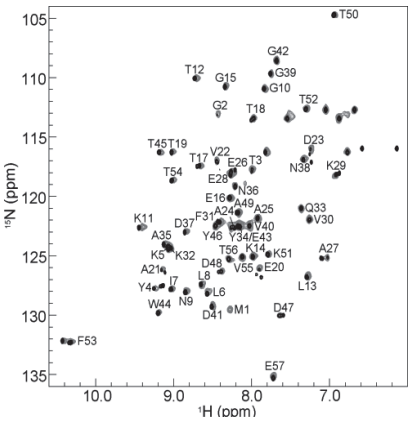


Fig. 1. Overlay of 2D ^{1}H-^{15}N SOFAST-HMQC spectrum of GB1 in HeLa.S3 cells (grey) and 2D ^{1}H-^{15}N HSQC spectrum of GB1 in vitro (black).

導入条件を検討した結果，4 種の蛋白質の中で最も良好な結果が得られた GB1 を最初の指標として用いることにした．この際の電気穿孔の条件は 1700 V/20 msec/1 pulse であった．次に in-cell NMR 測定後の生存率が 80%以上であること，および細胞外へのモデル蛋白質の漏れ出しが無視できるほど小さいことを条件として，測定可能な時間を最大でも 7 時間とした．Fig. 1 には，約 40 分の測定時間で取得した HeLa.S3 細胞中の GB1 の 2D ^{1}H-^{15}N SOFAST-HMQC スペクトルを示した．

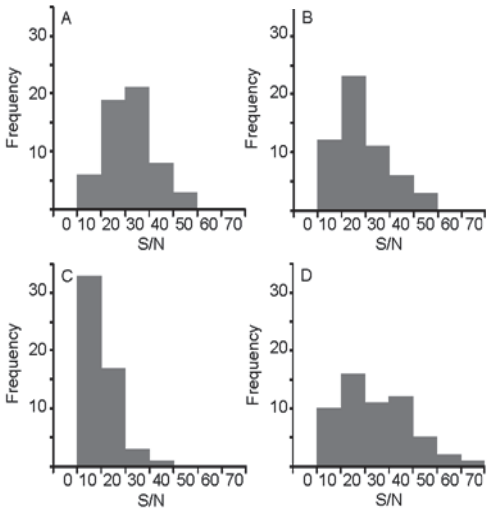


Fig. 2. Histograms of normalised signal to noise (S/N) ratio of cross peaks due to intra-residue correlation in 3D wfb-HNCA (A), 3D BEST-HNCA (B), 3D BEST-TROSY HNCA (C) and 3D TROSY-HNCA (D) spectra of GB1 in HeLa.S3 cells. ^{13}C/^{15}N-labelled GB1 samples were incorporated for wfb-HNCA, BEST-HNCA and BEST-TROSY-HNCA experiments, while ^{2}H/^{13}C/^{15}N-labelled GB1 was incorporated for the TROSY-HNCA experiment.

次に，上記の電気穿孔条件を用いて，蛋白質主鎖 NMR シグナルの帰属を行うために 3D HNCA 測定を試みた．In-cell NMR 測定では，細胞質内の粘性やクラウディング効果などの影響で，^{1}H，^{15}N 核の横緩和時間が著しく減少し，非常に幅広化したシグナルを与えることが知られている．また HNCA 測定では，同様の影響による $^{13}C^{\alpha}$核の急速な緩和も問題になることが予想された．したがって，in-cell NMR 測定に最適化された測定法を検討する必要がある．そこで，通常の HNCA（water flip back タイプ，以下 wfb-HNCA と表記）に加え，BEST-HNCA，TROSY-HNCA，BEST 法と TROSY 法を組み合わせた BEST-TROSY HNCA の 4 種の測定法を比較して検討した．BEST-HNCA は，選択励起された ^{1}H 核の T_1 が短いことを利用して繰り返し時間を大幅に短縮することで積算回数を増大させる SOFAST-HMQC のアイデアを HNCA に適用したものである．wfb-HNCA，BEST-HNCA，BEST-TROSY-HNCA の測定のためには，^{13}C/^{15}N 標識した GB1 を HeLa.S3 細胞に導入した試料を調製した．それぞれの試料に導入された ^{13}C/^{15}N-GB1 の細胞内濃度は約 155μM（wfb-HNCA），約 165μM（BEST-HNCA），約 150μM（BEST-TROSY-HNCA）と推定された．一方で TROSY-HNCA の測定のためには，^{2}H/^{13}C/^{15}N 標識した GB1 を HeLa.S3 細胞に導入した試料を調製した．導入された

^{2}H/^{13}C/^{15}N-GB1 の細胞内濃度は約 60μM と推定された．BEST-HNCA および BEST-TROSY-HNCA 測定には 0.5 s の繰り返し時間を用いた．これに対して，wfb-HNCA には 1.0 s の繰り返し時間を，また TROSY-HNCA には 1.5 s の繰り返し時間を用いた．それぞれの測定の積算回数は，4 種の 3D NMR の測定時間がほぼ同一となるように設定した．また，4 種の測定とも，nonlinear sampling によって 16 (^{13}C)×12 (^{15}N) のサンプリング空間からランダムに 1/8 のサンプリングポイントを選択した同一のサンプリング・スケージュールを利用した．

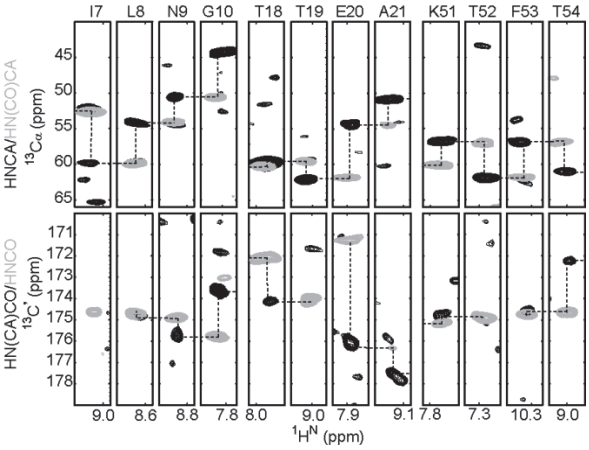


Fig.3. Selected ^{1}H^{N}-^{13}C strips extracted from the 3D TROSY-HNCA (black) and TROSY-HN(CO)CA (grey) spectra (overlaid, upper panel) and the 3D TROSY-HN(CA)CO (black) and TROSY-HNCO (grey) spectra (overlaid lower panel) of ^{2}H/^{13}C/^{15}N-labelled GB1 in HeLa.S3 cells. Each strip corresponds to the ^{15}N frequency of the residue indicated. Sequential connectivities are represented by dashed lines.

4 種の実験とも良好な 3D NMR スペクトルが観測された．ただし，スペクトルの S/N 比を実際に細胞に導入できた蛋白質の細胞内濃度で正規化して解析したところ，^{2}H/^{13}C/^{15}N 標識した GB1 を導入して得られた TROSY-HNCA スペクトルの感度が 1 番良いことが明らかになった（Fig. 2）．一方で，BEST-HNCA では期待された感度上昇が得られなかった．この原因についてはいくつか考えられるが，現在検証実験を計画中である．

以上の結果を受けて，GB1 の主鎖 NMR シグナル帰属のための以降の実験には，^{2}H/^{13}C/^{15}N 標識試料を用いた TROSY 系の測定を用いることとした．そこで，TROSY-HNCA に加えて，TROSY-HN(CO)CA, TROSY-HN(CA)CO, TROSY-HNCO の測定を行い，解析を行った結果，主鎖 ^{1}H/^{13}C/^{15}N シグナルの 95%以上の帰属に成功した（Fig. 3）．真核細胞内蛋白質の主鎖 NMR シグナルは，通常 in vitro の帰属結果から出現位置を指標にしてコピーすることで行われ，三重共鳴 3D NMR を用いた厳密な帰属は，私たちの研究グループが Sf9 細胞中で行ったものが唯一である．したがって，本結果は動物細胞内蛋白質の主鎖 NMR シグナルの厳密な帰属例として世界初の事例となる．

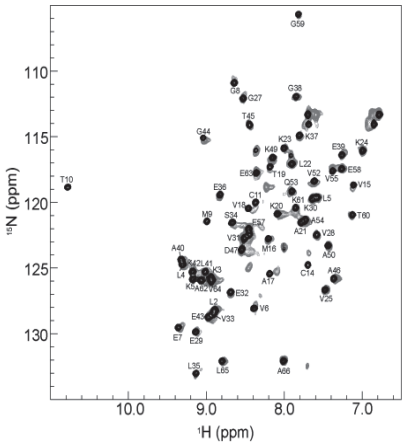


Fig. 4. Overlay of 2D ^{1}H-^{15}N SOFAST-HMQC spectrum of TTHA1718 in HeLa.S3 cells (grey) and 2D ^{1}H-^{15}N HSQC spectrum of TTHA1718 in vitro (black).

TTHA1718 に関しても同様に電気穿孔法の条件検討を行い，1700 V/15 msec/1 pulse の条件で最良な結果を得た（Fig. 4）．この条件を用いて ^{2}H/^{13}C/^{15}N 標識 TTHA1718 を HeLa.S3 細胞に導入し，後述する bioreactor システムを用いて TROSY-HNCA, TROSY-HN(CO)CA, TROSY-HN(CA)CO, TROSY-HNCO の測定を行った結果，in vitro の結果を参考に，80%以上の帰属に成功した（Fig. 5）．

calbindin D_{9k} および ubiquitin L8A/I44A/V70A 変異体に関しても同様の実験を行い，良好な 3D TROSY-HNCO スペクトルの測定に成功した．スペクトルおよび解析結果については紙面上，ポスターで紹介する．

次に，NOE 由来の距離情報の取得を目的として，最適化した細胞内導入条件を用いて ^{15}N 標識した GB1 を HeLa.S3 細胞に導入し，3D ^{15}N-separated NOESY 測定を行った．しかし，良好な 3D NOESY スペクトルの取得には至らなかった．そこで，NMR 試料管内の細胞寿命を延ばし，測定時間のさらなる延長を行うために，bioreactor システムの利用を試みた．Kubo らが報告した bioreactor システ

ムは，メビオールゲルという熱可逆性ハイドロゲルを細胞と懸濁し，表面積を増やすためにコイル状に巻いてNMR試料管の底部に固定する．そしてNMR 試料管内に新鮮な培地を送り続けることで，細胞寿命を著しく伸ばすことに成功している[2]．

しかし，メビオールゲルと細胞を懸濁すると，試料管中の細胞数が顕著に希釈されてしまい，細胞寿命は増大されるものの，NMR 測定感度が損なわれてしまうという問題があった．そこで，メビオールゲルによる細胞の固定を行わないbioreactor システムの可能性を検討した．まずNMR 試料管の設計・試作を行い，具体的には，従来のシゲミ社製 5mm 対称式 NMR 管の底に，シゲミ社製 4mm 対称式 NMR 管を加工した細胞試料容器を導入した．この細胞試料容器の上部には細孔があり，パスツールピペットを挿入して新鮮な培地を供給する．この新しい方法を用いて条件検討を行った結果，流速を従来の 3 mL/hrから0.25 mL/hr に，測定温度を 37℃から 25℃に変えることで，細胞寿命の延命が達成できた（GB1，calbindin D_{9k}，ubiquitin L8A/I44A/V70A 変異体に関しては 24 時間以上，TTHA1718 に関しては 48 時間以上）．

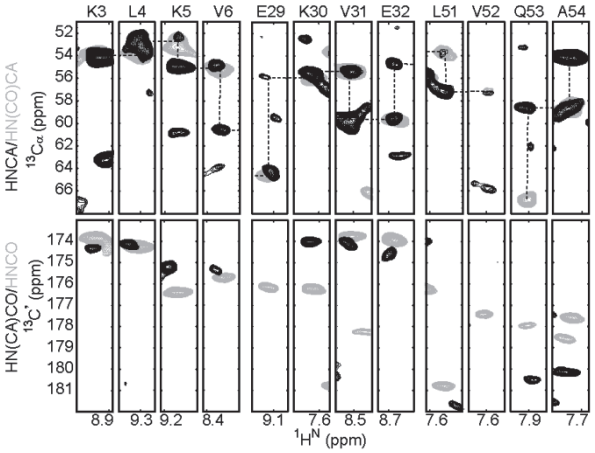


Fig. 5. Selected $^1H^N$-^{13}C strips extracted from the 3D TROSY-HNCA (black) and TROSY-HN(CO)CA (grey) spectra (overlaid, upper panel) and the 3D TROSY-HN(CA)CO (black) and TROSY-HNCO (grey) spectra (overlaid lower panel) of $^2H/^{13}C/^{15}N$-labelled TTHA1718 in HeLa.S3 cells. Each strip corresponds to the ^{15}N frequency of the residue indicated. Sequential connectivities are represented by dashed lines.

この新しいbioreactorシステムを用い，^{15}N標識したGB1をHeLa.S3細胞に導入してin-cell NMR 測定を行った結果，今までは不可能であった，良好な3D ^{15}N-separated NOESYスペクトルの測定に成功した．(Fig. 6) このことは，ヒト培養細胞中の蛋白質について，NOE 由来の距離情報の取得が可能であることを示している．

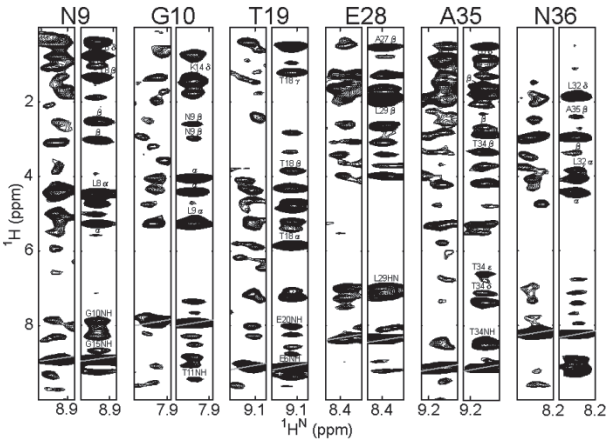


Fig. 6. Selected $^1H^N$-^1H cross-sections extracted from the 3D ^{15}N-separated NOESY spectrum of GB1 in HeLa.S3 cells, which was acquired using the bioreactor system. Each strip corresponds to the ^{15}N frequency of the residue indicated. For comparison, the corresponding strip from the 3D ^{15}N-separated NOESY spectrum of GB1 in vitro is presented on the right side of each in-cell strips.

【展望】

今後は，ヒト培養細胞中の蛋白質の側鎖NMR シグナルの帰属法の確立，3D ^{13}C-separated NOESY の測定などを試み，生きたヒト培養細胞内における蛋白質の立体構造解析の可能性を模索していく予定である．

【参考文献】

[1] Danielsson, J. *et al*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **112**, 12402 (2015)

[2] Kubo, S. *et al*. *Angew. Chem. Int. Ed.* **52**, 1208 (2013).

P81

動物細胞の健全性が細胞内タンパク質のフォールディング状態に与える影響

○猪股晃介[1]，鴨志田一[2]，伊藤隆[2]，木川隆則[1,3]
[1]理化学研究所・生命システム研究センター
[2]首都大学東京・理工学研究科
[3]東京工業大学・情報理工学研究院

Impact of cell healthiness on protein folding state in mammalian cells

○Kohsuke Inomata[1], Hajime Kamoshida[2], Yutaka Ito[3], Takanori Kigawa[1,3]
[1] *RIKEN Quantitative Biology Center (QBiC)*
[2] *Department of Chemistry, Tokyo Metropolitan University*
[3] *School of Computing, Tokyo Institute of Technology*

In-cell NMR spectroscopy is one of the most promising techniques to observe protein structure, interactions, and dynamics at atomic level in living cells. In this presentation, we demonstrate that the folding state in cells is significantly influenced by the cellular healthiness using our advanced in-cell NMR technique. As a model sample, we selected human Adenylate Kinase 1 (hAK1) to investigate the impact of cell healthiness on protein folding state in HeLa cells. hAK1 was denatured in cells under stressful culture conditions, while it remained functional and properly folded in cells continuously supplied with fresh medium. Our finding provides a critical guide to in-cell NMR analyses, not only for protein structural analyses at an atomic level in mammalian cells but also for their potential applications in the future, such as drug candidate screening and molecular diagnoses of biopsy samples.

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(1)。しかしながら多くの場合、本法の試料となる細胞はNMR試料管内で非常に高密度に封入されており、栄養の枯渇等の高度にストレスがかかった状態でNMR計測

in-cell NMR，NMRバイオリアクター，細胞の健全性

○いのまたこうすけ，かもしだはじめ，いとうゆたか，きがわたかのり

を行っている。これを回避するため、最近、バイオリアクターシステムをin-cell NMR方に応用する成果が報告されている[(2), (3)]。ただしこれらの研究では、バイオリアクターシステムの効果として、細胞の生存率の向上や細胞から漏れ出した安定同位体タンパク質の排除について注目しているにとどまり、細胞の健全性がその中で活動するタンパク質のフォールディング状態に与える影響については未だ知見が乏しい。

そこで本発表はでは、モデルタンパク質としてヒトアデニル酸キナーゼ1 (human Adenylate Kinase 1, hAK1)を用い、HeLa細胞の健全性の違いによる本タンパク質のフォールディング状態の差を、in-cell NMR法を駆使して検証した。その結果、ストレスにさらされた細胞内において、hAK1が即座に変性状態に移行するのに対して、バイオリアクターシステムを用いて健全性を保った場合は、機能を持った正しいフォールディングを維持していることが確認された(Figure 1)。このことは、in-cell NMR法を用いてタンパク質の構造・動態を研究する際、NMR計測中の細胞培養条件等を目的に応じて適切に設定し、それを維持しつつ実験を行うことが、対象タンパク質の挙動を正しく理解するための必要不可欠な条件となりうることを示唆している。

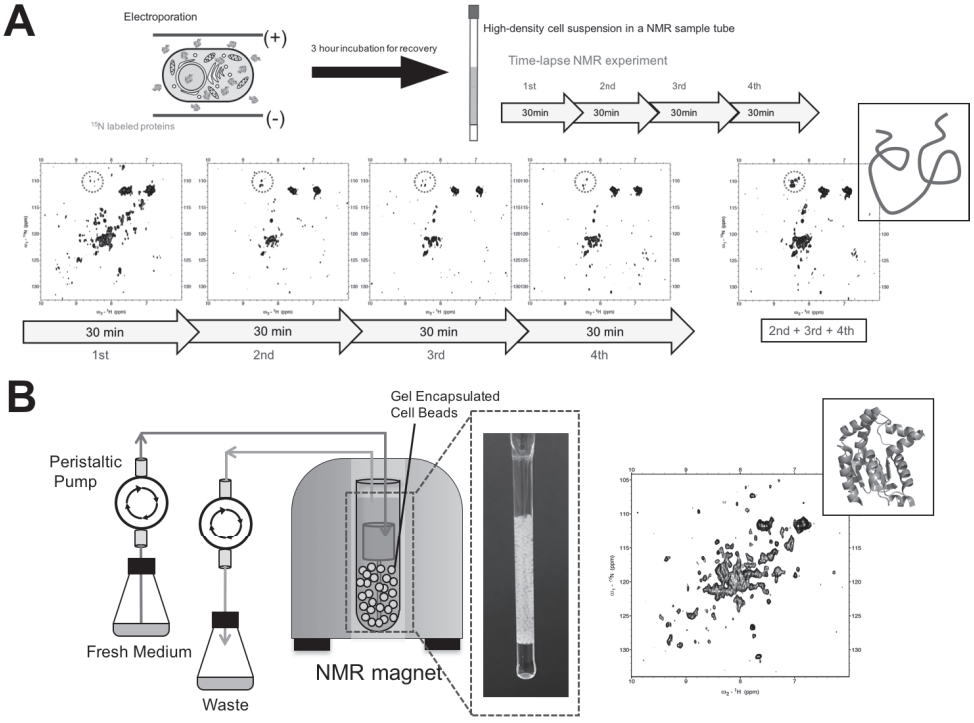


Figure 1; in-cell NMR spectra of hAK1. (A) 15N hAK1 in high-density HeLa cell suspension. (B) 15N hAK1 in gel encapsulated HeLa cell beads with the bioreactor system.

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) 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.

(3) Sharaf N. G., Barnes C. O., Charlton L. M., Young G. B. and Pielak G. J. (2010) A bioreactor for in-cell protein NMR. *J. Magn. Reson.*, 202, 140–146.

P82

In-cell NMR法によるヒト細胞内DNAおよびRNAの観測

○山置佑大[1]，清石彩華[2]，　三宅雅之[2]，加納ふみ[3]，村田昌之[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]京都大学大学院・エネルギー科学研究科
[3]東京工業大学大学院・科学技術創成研究院
[4]東京大学大学院・総合文化研究科

Observation of in-cell NMR signals of DNA and RNA in living human cells

○Yudai Yamaoki[1], Ayaka Kiyoishi[2], Masayuki Miyake[2], Fumi Kano[3], Masayuki Murata[4], Takashi Nagata[1,2], and Masato Katahira[1,2]
[1] *Institute of Advanced Energy, Kyoto University*
[2] *Department of Fundamental Energy Science, Graduate School of Energy Science, Kyoto University*
[3] *Cell Biology Center, Institute of Innovative Research, Tokyo Institute of Technology*
[4] *Department of Life Sciences, Graduate School of Arts and Sciences, The University of Tokyo*

To understand intracellular biological events, information on the structure, dynamics, and interaction between macromolecules, such as of proteins and nucleic acids, in living cells is critically important. In-cell NMR is a promising method to obtain these information. Although NMR spectra of proteins in human cells have been reported, those of DNA and RNA were reported only in *Xenopus laevis* oocytes, i.e., not in human cells. Here, DNA and RNA were introduced into human cells using a pore forming toxin streptolysin O (SLO). Then, NMR signals of nucleic acids were successfully recorded for the first time in living human cells. The observation of the imino proton signals directly indicated the formation of the DNA and RNA hairpin and G-quadruplex structures in living human cells.

【研究背景および本研究の目的】

生細胞内は生体高分子が非常に高密度に詰まった分子込み合い状態である．このような環境下ではタンパク質や核酸の構造や安定性，小分子との相互作用などが*in vitro*の希薄環境下とは異なることが示唆されている．そのため，実際の生細胞中でこれらの情報を得ることが重要となる．In-cell NMR法は，実際に繰り広げられる細胞活動の”現場”で生体高分子を観察可能とする大変強力な手法である．特にタンパク質に関しては，これまで構造安定性，タンパク質-小分子間及びタンパク質-タンパク質間相互作用，翻訳後修飾など，様々な情報がin-cell NMR法によって得られている．また，核酸を対象としたin-cell NMR法も，2009年の最初の報告以来，テロメアDNA構造の*in vitro*との違い，グアニン四重鎖DNAとドラッグの相互作用，四重鎖RNAの高次構造形成などの重要な知見をもたらしてきた．しかしながら，DNAおよびRNAのin-cell NMR法に関するこれらの研究は，いずれもアフリカツメガエルの卵母細胞にマイクロインジェクション法によって核酸を導入したものであり，ヒト細胞を用いたものはこれまで報告がない．本研究において我々は，バクテリア由来毒素ストレプトリシンOを用いることでヒト細胞内に核酸を導入し，ヒト生細胞内のDNAおよびRNAのシグナルをin-cell NMR法によって初めて観測することに成功した．

in-cell NMR，核酸，グアニン四重鎖

○やまおきゆうだい，きよいしあやか，みやけまさゆき，かのうふみ，むらたまさゆき，ながたたかし，かたひらまさと

【実験】

*In vitro*においてヘアピン構造を形成するDNA (5'-G*C*GAAGC-3', *: ホスホロチオエート)とRNA (5'-GGCACUUCGGUGCC-3', 2'-OMe化体), また四重鎖を形成するテロメアDNA (5'-TAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTT-3')をSLO法によってHeLa細胞に導入した. SLOによって表面に可逆的に孔を形成したHeLa細胞と各核酸をインキュベーションし, 拡散により細胞内へ導入した. 導入後, Ca^{2+}を加えることでSLOによる孔をリシールした. このSLO処理後の細胞に対してpercollを用いた密度勾配遠心を行い, 死細胞を除いたものをin-cell NMR測定の試料とした.

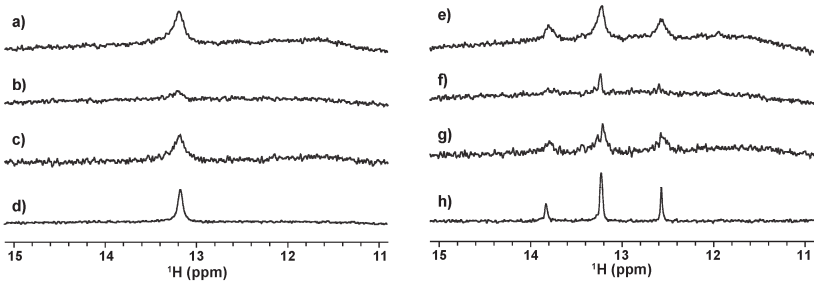


Fig. 1. In-cell NMR spectra of DNA (left) and RNA (right). One-dimensional ^{1}H-NMR spectra of HeLa cells into which DNA (a) and RNA (e) were introduced by the SLO method. (b, f) The spectra of the outer solution of the cell suspension. (c) Difference spectrum between (a) and (b). (g) Difference spectrum between (e) and (f). *In vitro* spectra of DNA (d) and RNA (h).

【結果と考察】

まず, SLO法によって細胞に導入された核酸の細胞内分布を調べるため, FAMで蛍光標識したヘアピンDNA, RNAを用いて共焦点蛍光顕微鏡観察を行った. 導入されたDNA, RNAの大部分はhoechst 33342と同じ分布を示しており, 導入された核酸が核内に局在することが明らかとなった.

SLO法により, ヘアピンDNAおよびRNAを導入したHeLa細胞のNMRスペクトルを測定した. これらのスペクトルにおいて, イミノプロトン領域にそれぞれ1および3本のシグナルが観測された(Fig. 1a, e). SLO処理のみを行い, 核酸を導入していないHeLa細胞ではイミノ領域にシグナルが見られないことから, これらのシグナルは導入した核酸に由来するものであることが分かった. また, 測定後の細胞懸濁液を遠心し, 外液のみを測定した場合, ほとんどシグナルが見られない(Fig. 1b, f)ことから, 得られたシグナルは細胞から漏れ出した核酸ではなく, 細胞内に存在する核酸に由来すると考えられる. 外液の核酸の影響を完全に除くため, 細胞のスペクトルから外液のスペクトルを差し引いた差スペクトルをFig. 1c, gに示した. 核酸のイミノプロトンは溶媒交換性であり, 塩基対などの水素結合を形成することにより, 溶媒との交換が抑えられシグナルが観測または強度が増強される. 今回, 細胞内DNAおよびRNA由来のイミノプロトンシグナルが観測されたことから, これらの核酸が細胞内で塩基対を有し, 構造を形成していることが示された. さらに, 差スペクトルと*in vitro*におけるスペクトル(Fig. 1d, h)が良く一致していることから, ヒト生細胞内においても, これらの核酸は*in vitro*と同様にヘアピン構造を保持していることが示された.

さらに, 四重鎖DNAを細胞に導入し, 同様にin-cell NMRスペクトルの測定, 解析を行った. 四重鎖構造はグアニンに富んだ配列をもつ核酸が形成する非標準構造であり, 様々な生命現象に関わる重要な構造であると考えられている. また, 抗癌剤のターゲットとしても期待されており, 細胞内での挙動が非常に注目されているモチーフである. しかしながら, ヒト生細胞内の四重鎖の存在証明は蛍光などを利用した間接的な方法に限られていた. 今回, 四重鎖DNAを導入した細胞のin-cell NMRスペクトルにおいて, イミノ領域の中でも四重鎖構造に特徴的な領域(10.5 - 12 ppm)にシグナルが見られた. つまり, ヒト生細胞内においてヒトテロメアDNAが四重鎖構造を形成していることが示唆された. NMRによる直接観測によってヒト生細胞内で四重鎖構造の存在を示したのは本研究が初めてである.

P83

可搬型NQR装置の高出力化

大田垣祐衣[1]，　○須崎滉平[1]，宮戸祐治[1]，　赤羽英夫[1]
1大阪大学大学院・基礎工学研究科

Development of a Portable Spectrometer for Nuclear Quadrupole Resonance Using a Class-D Amplifier with Dual Power Supplies

Yui Otagaki[1], ○Kouhei Suzaki[1], Yuji Miyato[1], Hideo Sato-Akaba[1]
[1] *Graduate School of Engineering Science, Osaka University.*

Nuclear Quadrupole Resonance (NQR) is one of the magnetic resonance phenomena for the nucleus whose spin is larger than 1. It is caused by the irradiation of an external AC magnetic field at the particular resonance frequency depending on a target substance. Therefore, NQR is a promising clue to the non-destructive and remote inspection of the target substance such as explosives or illicit drugs. The portable NQR inspection system has been developed by using a class-D amplifier in conjunction with a series resonator antenna. However, the previous system could detect NQR signals only from the substance put at short distance. In this study, the irradiation field intensity was successfully increased by a factor of 2, by using the class-D amplifier with dual power supplies to the portable NQR system. It resulted in improvement of the detectable distance to 9 cm in 20 seconds, for 100 g RDX, which is one of the explosives used for land mines.

【はじめに】核四極共鳴（NQR）とは、核スピンが 1 以上の原子に対して交流磁場を照射することで発生する磁気共鳴現象の一種である。交流磁場で励起した核スピンが、その緩和過程で交流磁場を放出する。その交流磁場の周波数は物質によって固有であり、これを検知することで物質の検知が可能となる。これを利用することで、爆発物や不正薬物の検知が可能となる。我々の研究室では、これまで NQR を利用した地雷探知装置の開発を行ってきた。今までに、我々の研究室で以前開発した大型の地雷探知装置を、同等の性能で小型化することに成功した。しかし、依然として信号取得可能な距離が短いという問題があった。そこで、励起する際の送信磁場強度を上げることで改善を試みた。本研究では、両電源駆動 D 級アンプを用いてアンテナ部分にかかる電圧を上げることで、送信磁場強度を倍増させた。また、従来の小型地雷探知装置に使用していた単電源駆動 D 級アンプと比較した。

【開発した D 級アンプにいて】　開発した両電源駆動 D 級アンプの概略図を Fig.1 に示す。このアンプでは、互いに反転した方形波状の制御信号を FPGA で生成し、それぞれの FET に加えることで、両 FET を交互に ON/OFF させる。すると、制御信号と同じ周波数で、両電源電圧$+V_{\mathrm{DD}}$～$-V_{\mathrm{DD}}$を振幅とする方形波状の出力信号が作られる。この方形波を、送受信切り替え回路を介して、2 つのコンデンサと 1 つのコイルからなる直列共振アンテナに供給することで、NQR 励起信号が送信される。ここで、窒素原子核の NQR 周波数は、およそ 500 kHz ~5 MHz に分布すること、また、送信終了時に 2 つの FET を同時 OFF するため回路に高電圧が発生して FET の出力端子に加わることを考慮し、本研究では、FET には、数 MHz 帯まで高速動作可能、かつ高い耐圧を有する GaN FET を採用した。一方、NQR の受信信号は励起信号に比べ非常に小さいため、励起信号に埋もれないよう、送信終了時のリンギングを極力短くする必要もある。そのため、Fig.1 の A 点において FET 間にダイオード(D_1, D_2)と抵抗(R_1)を入れることで送信終了時にアンテナに残ったエネルギーを素早く消費させる工夫も施した。

【実験結果】　実際の地雷にも使用されている爆発物の一種である RDX に対し、同 NQR 共鳴周波数 3.41MHz に合わせた交流磁場を照射するという条件の下で、従来の単電源駆動 D 級アンプを

核四極共鳴, D級アンプ, 送信

おおたがきゆい，○すざきこうへい，みやとゆうじ，あかばひでお

使用した場合と今回導入した両電源駆動 D 級アンプを使用した場合で、Fig.1 の B-C 間に発生する電圧（アンテナ電圧）を測定・比較した。その結果を Fig.2 に示す。この結果から、従来の単電源駆動 D 級アンプを用いた場合に比べ、約 2 倍のアンテナ電圧を得られており、最大で6 kVppを発生させることができた。また、実際の地雷に使用される爆発物の一種である RDX 100 g に対して、開発したシステムで NQR 信号を計測した結果を Fig.3 に示す。これより、計測時間 20 s、アンテナから 9 cm の距離で、SN 比 1.9 で信号を取得することに成功した。

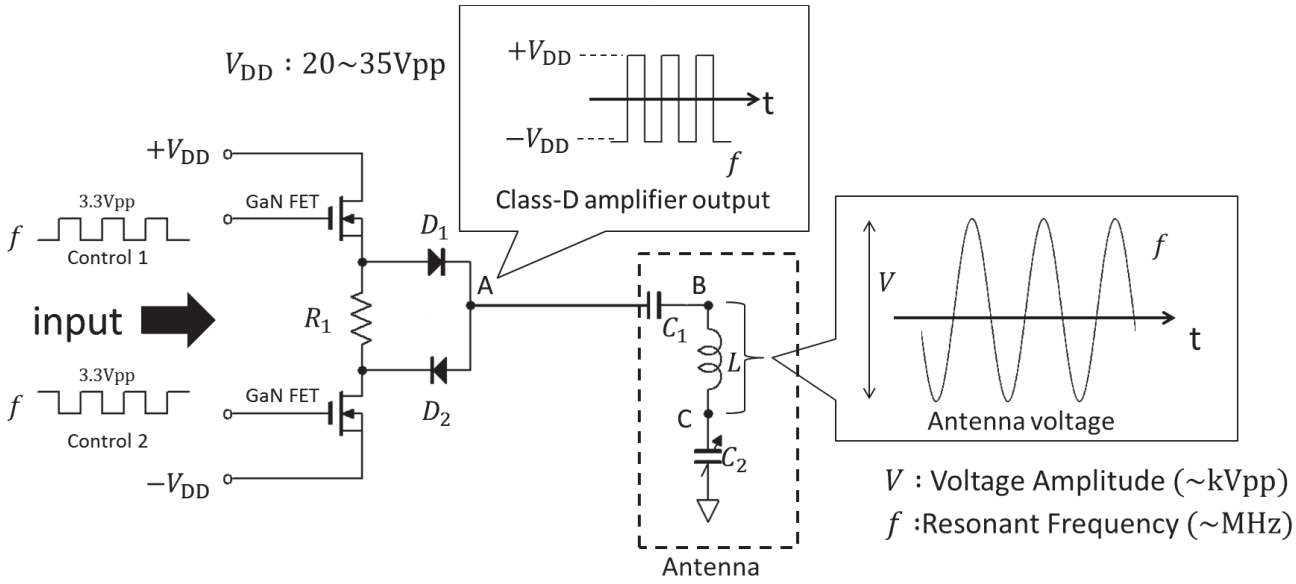


Fig.1 Circuit diagram of a class-D amplifier with dual supplies, connected to the antenna.

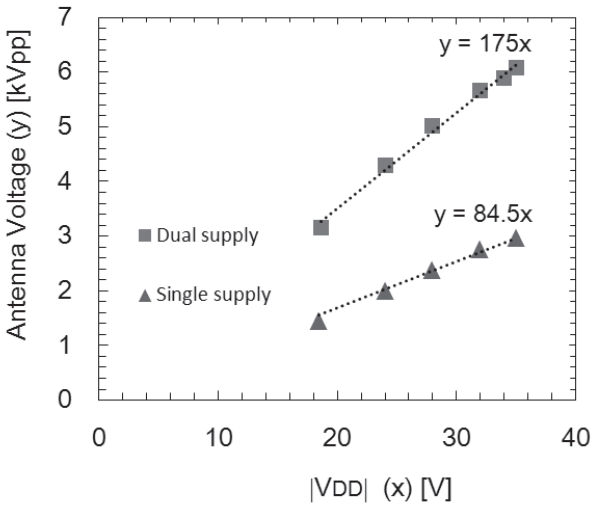


Fig.2 Maximum antenna voltage as a function of V_{DD}. Comparison of Class-D amplifiers（■）with dual power supplies, and（▲）with single power supplies.

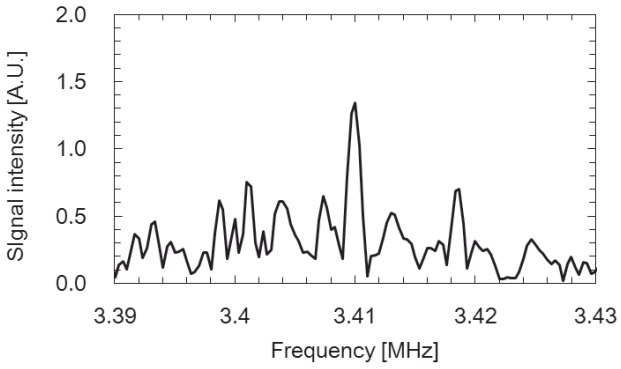


Fig.4 NQR signal（100 g RDX) obtained by the developed system using class-D amplifier with dual power supplies. The distance between the antenna and the sample was 9 cm.

References

[1] 大田垣祐衣、他「ポータブル核四極共鳴装置の開発」第77回応用物理学会周期学術講演会(2016) 15p-P1-7

P84

in-cell NMR 法を用いたライソゾーム病関連酵 Cathepsin D の構造解析

○市村克也[1]，森本大智[1]，白川昌宏[1]，菅瀬謙治[1]
1 京都大学・大学院工学研究科・分子工学専攻

Structural analysis of an LSD-related enzyme Cathepsin D using in-cell NMR spectroscopy

○Katsuya Ichimura[1], Daichi Morimoto[1], Masahiro Shirakawa[1], Kenij Sugase[1]
[1] *Department of Molecular Engineering, Graduate School of Engineering, Kyoto University*

Lysosome is the organelle that degrades unnecessary biomolecules such as saccharides and proteins in cells using approximately sixty kinds of hydrolase enzymes. Dysfunction of the enzymes causes deposition of undegraded substrate inside lysosome and various pathologic symptoms depending on the enzyme, which is called lysosomal storage disorders (LSDs). In most cases, patients of LSD pass away when they are young. Recently, an effective therapy for several LSDs was developed, designated enzyme replacement therapy (ERT), which introduces a normal enzyme inside lysosome from outside via endocytosis. However, it is not clear whether all enzymes introduced by ERT are carried inside lysosome as a mature form processed by other enzymes. In the present study, we focus on Cathepsin D, which is the most abundant lysosomal enzyme as it occupies 10% of all lysosomal proteins, and develop new methodology to analyze its structure in lysosome using in-cell NMR.

ライソゾーム病とはライソゾーム内酵素の欠損ないしは異常により、不要な糖や脂質、タンパク質が分解されず細胞内に蓄積し、細胞の機能低下や機能不全を招く遺伝性疾患である。現在、およそ50種類の酵素による異常疾患が報告されており、対処療法的な治療法が確立されつつあるが、全てのライソゾーム内酵素がその対象とはなっておらず、抜本的な治療法の早期確立が望まれている。ライソゾーム病関連酵素の一つにCathepsin Dと呼ばれるアスパラギン酸プロテアーゼが報告されている。この酵素の欠損により発症する神経変性疾患の神経セロイドリポフスチン症は、進行性の知能悪化や運動悪化などを引き起こし、最終的には早期死亡に至る。

human Cathepsin D (hCTSD)の遺伝子工学的研究はこれまでに数多く報告されているが、酵素補充療法のように欠損酵素を外部から細胞内に導入した際の構造変化に関する知見は乏しい。特に、全ての酵素が細胞内でプロセシングを受けて成熟し、活性を持つか否かは医療の現場における投与量を最適化する上で重要である。そこで本研究では、マンノース-6-リン酸 (M6P) 修飾を必要とせず細胞内導入を可能にするGILT[1]と呼ばれるペプチド性のタグを用いて導入した正常型hCTSDのライソゾーム内での構造をin-cell NMR法により解析することで治療法への応用を試みた。

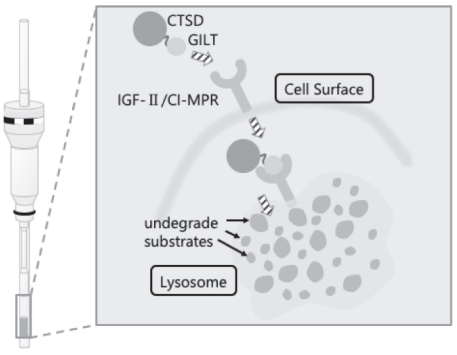


Figure.1 in-cell NMR spectroscopy using the GILT system

Cathepsin D, in-cell NMR, 酵素補充療法

○いちむらかつや，もりもとだいち，しらかわまさひろ，すがせけんじ

hCTSDは大腸菌発現系において封入体を形成するため、その巻き戻しを行った。hCTSDの巻き戻しに関する研究は過去に行われていたが、その手法では正しく巻き戻されないことが確認できたため、段階透析法を用いた巻き戻しの手法を開発した。その結果、hCTSDが正しく折畳まれていることが確認できた。さらに、α-synucleinを基質として用いて酵素活性の有無を調べたところ、時間経過と共にα-synucleinの減少が観察された。この一連の結果より、hCTSDの発現、巻き戻しおよび精製プロトコルの確立に成功したと言える。

細胞中の多くのオルガネラの pH は大方 7.0付近の中性に保たれているが、ライソゾーム内では pH 5.1と酸性に偏っている。エンドサイトーシスによって輸送されたhCTSDはこの輸送の中で構造変化を示すことが知られている[2]。*in vitro*においてエンドサイトーシスによるpH変化を模倣した環境下におけるhCTSDの構造変化を解析するために、hCTSDに含まれるリジン残基中のアミノ基を全て^{13}Cジメチル化し^{1}H-^{13}C HSQCを観測した(Figure.2)。

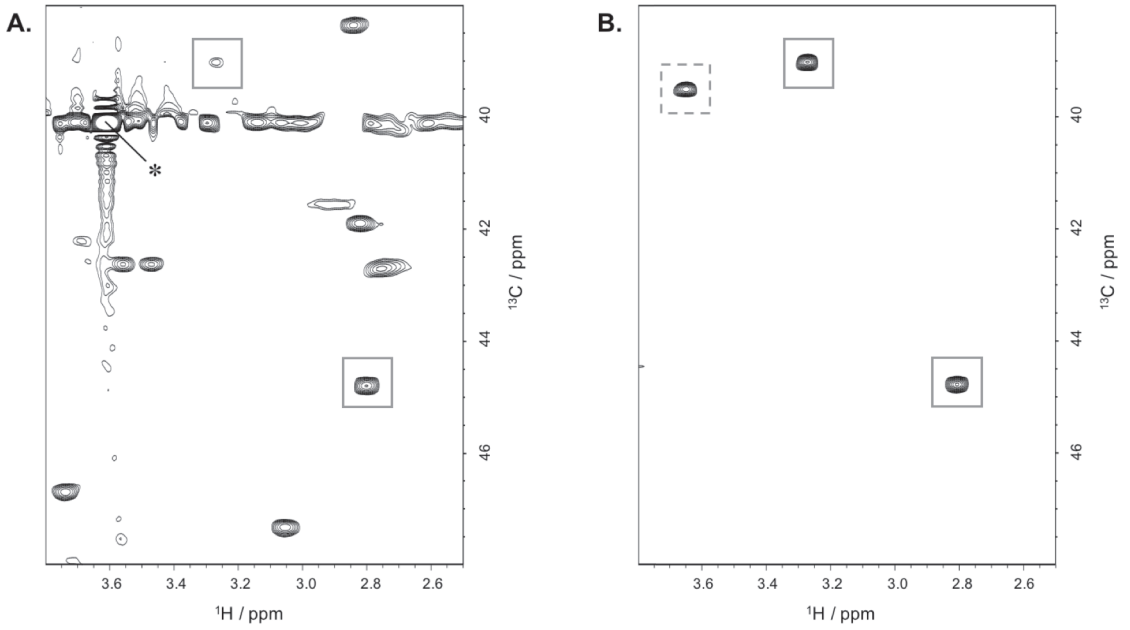


Figure.2 ^{1}H-^{13}C HSQC spectra of ^{13}C-methylated hCTSD in 50 mM Tris-HCl buffer at pH 7.4 (A) and 50 mM acetate buffer at pH 5.1 (B) The asterisk shows the signal of Tris. Two peaks appeared at same positions in both conditions (solid line), but a new peak appeared only under the acidic condition (dashed line).

中性条件では^{13}Cメチル基由来のピークがおよそ9つ現れたのに対して、酸性条件では3つしか現れなかった。また、この3つのピークのうち2つは中性条件においても現れていたが、残りの1つは酸性条件でのみ現れたものであった。これにより、*in vitro*の環境下においてもpH変化に応じて構造変化が生じていることが示唆された。

今後はhCTSD-GILTを細胞内に導入し、in-cell NMR法によって細胞内での構造変化を解析する。その際、バイオリアクターを用いて細胞寿命を延長させることで長時間での測定を可能にし、細胞内挙動を詳細に解明する予定である。

References

[1] LeBowitz, et al. (2004) *Proc. Natl. Acad.* **9**, 3083-3088

[2] Lee et al (1998) *Nat. Struct. Biol.* **5**, 866

P85

二重共鳴NQRによる四極子核-四極子核間の距離および角度相関

○日部雄太[1]，武田和行[1]，竹腰清乃理[1]
[1]京都大学大学院 理学研究科 化学専攻

Distance and angle correlation between quadrupole nuclei by double resonance NQR

○Yuta Hibe[1], Kazuyuki Takeda[1], K. Takegoshi[1]
[1] *Division of Chemistry, Graduate School of Science, Kyoto University*

We explore the possibility of extracting correlation between quadrupolar nuclei in zero field. So far, a lot of papers have been published on field cycling experiments, where quadrupolar nuclei undergo polarization transfer with spin-1/2 nuclei in the intermediate field, whereas only a single report was reported on double resonance between quadrupolar nuclei in pure zero-field. In double quadrupole resonance, the reduction in the intensity of a spin echo of one quadrupolar nucleus was observed upon pulse irradiation on another quadrupolar nucleus in the vicinity. Here, we apply the CPMG method to double quadrupole resonance. Since the envelope of the spin-echo train lasts for much longer time, we expect to observe quadrupolar-spin pair with relatively weak correlation in the echo-intensity reduction. We demonstrate ^{35}Cl-^{39}K double quadrupole resonance experiments in polycrystalline sample of $KClO_3$.

核四極子共鳴(NQR)は固体物質中のスピン量子数1以上の原子核に対して、核四重極相互作用によるエネルギー分裂に対応する高周波磁場を照射し、核からの応答を観測することにより、電場勾配に関する情報を獲得する手法である。核四重極モーメントを持つ核種は周期表の元素の約7割を占める。NQRはゼロ磁場で測定を行うため、強くて均一かつ安定な磁場が必要なNMRより簡便であり、得られたスペクトルからは原子核周りの電子状態など、化学的に有用な情報が得られる。しかし、NQRは同じ原子核でも化合物により共鳴周波数が大きく異なり、測定のたびに目的の共鳴周波数を探索する必要がある。また、これまでに核四重極モーメントを持つ2つの異なる原子核間における距離や相対配向、角度相関といった情報を得る手法が確立されていない。こういった問題から、NQRが未だ普及しておらず、持ちうる可能性を生かし切れていないのが現状である。本研究において我々は、NQRによって四極子核 - 四極子核間の相関情報を取得できる可能性を検討した。

新規情報へのアプローチとして、2つの四極子核に対してSpin Echo Double Resonance(SEDOR)[1]実験を行い、近接四極子からの距離や相対配向が、エコー強度の減衰にどう影響するのか検討を行った。先行研究[1]では1つのエコーを比較していたが、本研究においてはCPMG法を利用し、数ミリ～数十ミリ秒にわたる多数のエコーの減衰を比較するため、対象とする2つの異なる四極子核間の距離が長く、相互作用が比較的弱い場合でも、スペクトルから情報を取得できると期待される。対象の化合物として粉末の塩素酸カリウム($KClO_3$)を用い、^{35}Clを観測核として、^{39}Kの共鳴周波数に対するラジオ波照射の有無における^{35}ClのCPMGエコーの違いを検証した。

二重共鳴NQR，SEDOR，角度相関

○ひべゆうた，たけだかずゆき，たけごしきよのり

^{35}Cl-^{39}K二重共鳴NQRを行うためにプローブを構築した(Fig. 1)。^{39}K NQR用に、内径28.6 mm、外径36.2 mmの多重巻きコイル(L = 159.4 μH) と可変コンデンサを用いて、500-550 kHz帯域の共振回路を構成した。^{39}Kコイルの内側に直交したソレノイドコイル(直径 6 mm、15巻き)を挿入し、^{35}Cl NQR用に28 MHz周辺で共振する回路を作成した。

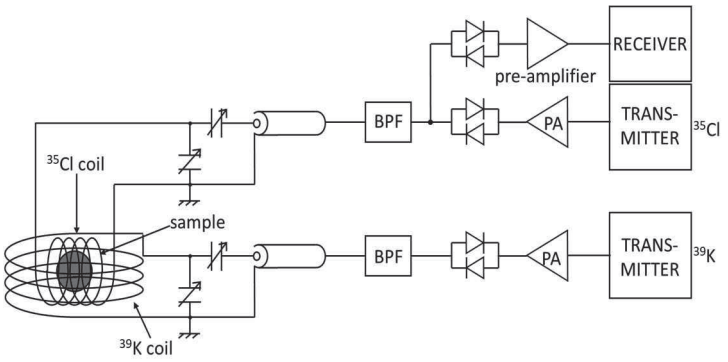


Fig. 1. Circuit diagram for ^{35}Cl-^{39}K double resonance NQR.

^{39}Kの共鳴周波数周辺へのラジオ波照射による、^{35}Clのエコーピーク強度の減衰の様子を示す(Fig. 2)。(a) は543 kHzと548 kHzへ照射した場合のエコートレインを比較している。共鳴周波数へ照射した方がエコーの強度が速く減衰しており、^{39}K-^{35}Cl間の相互作用により減衰が促進されていると考えられる。 (b)は1～40個目(約20msまで) のエコーのピーク強度を足し合わせた値を、548 kHzでの絶対値を1として規格化し、周波数ごとにプロットしたグラフである。共鳴周波数に近づくにつれてピークの減衰が大きくなり、543 kHzにパルスを照射したとき最も顕著なエコーの減衰が観測された。

計算と実験双方によるデータの比較検証を行うことで2つの四極子核間の距離や角度相関に関する情報が得られるようになれば、将来的には様々な物質に対してこの手法を適用して構造解析が可能になると期待できる。

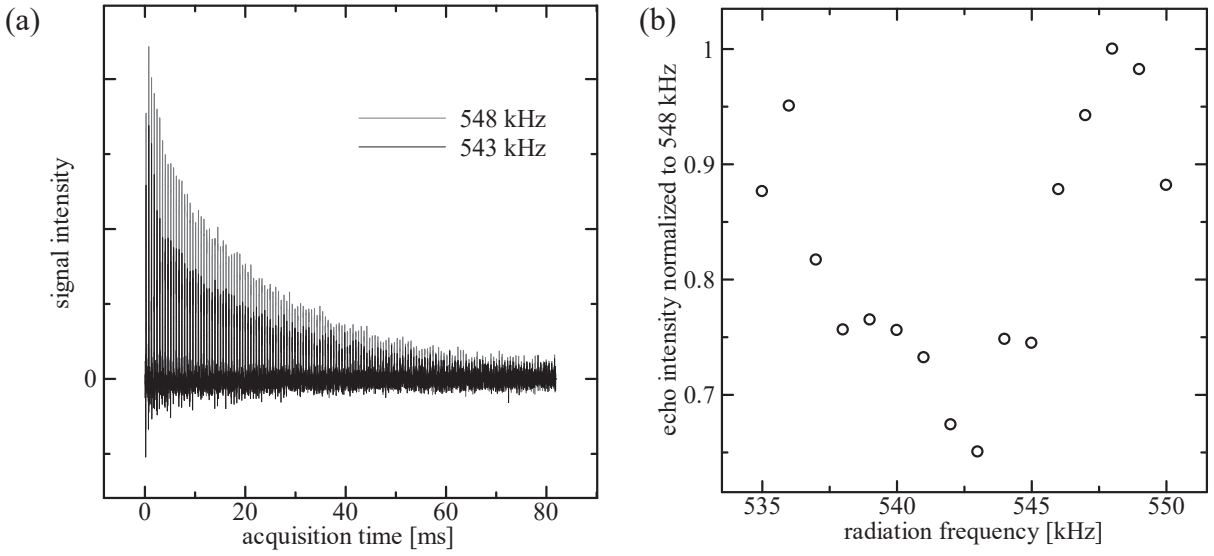


Fig. 2. (a) ^{35}Cl spin echo trains of $KClO_3$ with rf irradiation on 543 kHz (on-resonance for ^{39}K) and 548 kHz (off-resonance). Number of accumulation was 10000. (b) Irradiation-frequency dependence of the echo intensity. Data points were normalized to that of 548 kHz.

Reference

1. M. Emshwiller, E. L. Hahn, and D. Kaplan, *Phys. Rev.* **1960**, *118*, 414-424.

P86

高速定量的シミュレーションによる、分極剤分子間スピン相互作用が高磁場DNP核磁化増大に与える影響の評価

○深澤隼[1]，藤原敏道[1]，松木陽[1]
[1]大阪大学蛋白質研究所

Effect of intermolecular electron spin-spin coupling on high-field solid-state DNP efficiency as analyzed by a fast and quantitative spin dynamics calculation

○Jun Fukazawa[1], Toshimichi Fujiwara[1], and Yoh Matsuki[1]
[1]Institute for Protein Research, Osaka University, Osaka, Japan.

Although the NMR signal enhancement by Dynamic Nuclear Polarization (DNP) is theoretically expected to exceed six hundred times, the ratio between of the electron gyromagnetic ratio and to proton gyromagnetic ratio, actual DNP experiments show less effectiveness. We studied the causes by using the simulation program we have developed, in which we calculate the DNP enhancement by computing only the critical spin dynamics exactly and leaving others approximately, under the electron spin relaxation and magic angle spinning. We considered the effects due to intermolecular electron spin couplings, T_{1e} depending on sample temperature, etc. by the numerical simulation.

【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，特に数十K以上の温度で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手段としては，スピンハミルトニアンを決める常磁性分子など試料系や，照射するESRサブミリ波およびNMRラジオ波の周波数，強度などパルスシークエンスを，スピン系の試料温度依存も考慮して，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，DNP用に設計して合成したバイラジカルや，高出力サブミリ波，極低温での高速試料回転を用いる等の難しさのために，DNP効率向上のための実験的な最適化は容易ではない。そこで我々は，それら実験パラメータや条件のDNPへの影響を検討して核分極を増大させるために，効率的な数値シミュレーション法を前回開発した。

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を必要とする[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Landau-Zener方程式を用いて正確に計算し，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。分極剤分子にはTOTAPOL等のバイラジカルを想定し，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。

前回までのシミュレーションはバイラジカル単分子中の2電子と1核の3スピン系でDNPの素過程に関する計算を行っていたが，通常用いる20mM程度のバイラジカル分子濃度では，特に低温で，分子間の電子スピン間相互作用が影響すると考えられる。今回はその影響を考察するため，近傍バイラジカル中の2電子を加えた5スピン系でシミュレーションを行った。

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における核の分極機構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，これが起こる前後で対象電子の共鳴周波数変化速度が一定であると近似するとLandau-Zener方程式を用いて磁化交換比率を単純な式で求めることが出来る。サブミリ波の照射による電子スピンの飽和および電子間双極子相互作用によるスピン交換も同様に近似可能である。

また今回の近似では分子間の相互作用は電子スピン間双極子相互作用によるスピン交換のみ考慮し，複数分子に跨がる交差効果は無視できるとした。

【結果・考察】

これを用いて計算した2つのTOTAPOL分子から成る系におけるDNP効率をプロットした図をFig.1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。この図はサブミリ波強度700kHz照射を0.71s間行ったときのDNP効率である。図の凡例にあるrは2つのTOTAPOL分子の中心間距離を表す。ここで中心とは2つの分子内不対電子の中点を意味する。24ÅはDNP実験でよく用いられるラジカル分子濃度である20mMの際の最近接分子間距離として最も頻度が高い距離である。この距離のDNP効率は孤立分子のときの約1/5まで低下する。これは交差効果が起こりやすい条件である，低周波数帯のみあるいは高周波数帯のみが飽和されているという状態が近接ラジカルへのスピン拡散を経由することにより破れやすくなるためである。このDNP効率低下は，50K以下の低温でT_{1e}がマジック角回転周期より長くなる時に顕著である。この効果によりDNP効率はバイラジカル分子の濃度に単調増加せず，T_{1e}やMAS周波数，サブミリ波照射強度などに依存する極大値を持つことが示唆される。実際のDNP実験ではこの効果の他に，ラジカル近傍の核が電子スピンとの双極子相互作用により周波数が大きく変化しNMR観測が出来なくなる等の効果も加わり，強度計算は更に複雑になる。

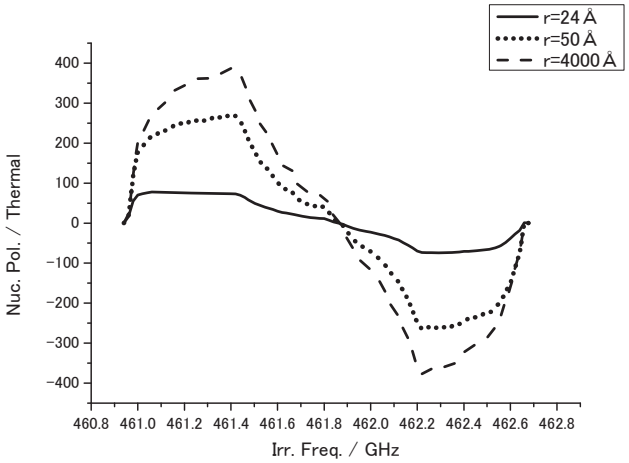


Fig.1. Simulated DNP enhancement profile for a two TOTAPOL molecule system, after a build-up time of 0.71 s almost at a steady state. In this calculation, T_{1e}=3.97 ms, T_{1H}=infinity, $\omega_{MAS}/2\pi$=7 kHz.

この他，温度変化に伴う平衡状態や緩和速度の変化の影響，偏極させる対象^{1}Hの電子核間距離に依存した影響などに関してシミュレーションを用いて考察を行う。

References

[1] K. R. Thurber, R. Tycko, *J. Chem. Phys.*, **137**, 084508 (2012)
[2] T. Mary, et. al., *J. Chem. Phys.* **128**, 052211 (2008)

P87

深層学習を用いた^{19}F-NMRの化学シフト予測

○滝沢剛，半沢宏之
第一三共RDノバーレ株式会社・合成化学研究部

^{19}F-NMR chemical shift prediction with a deep learning

○Takeshi Takizawa, Hiroyuki Hanzawa
Organic Synthesis Department,DAIICHI SANKYO RD NOVARE CO., LTD

A novel strategy for ^{19}F chemical shift prediction with a deep learning is described. The approach is based on a neural graph fingerprint and a neural network. An extension of the original neural graph fingerprint is implemented to take into account the local environment of fluorine. By comparison with a conventional method based on a fluorine fingerprint and a k-nearest neighbors algorithm, our method has better predictive performance on ^{19}F chemical shift prediction.

fragment dased drug discovery (FBDD)のフラグメント探索で^{19}F-NMRを活用し、その後リード化合物が獲得できた報告例が増えている[1)2)]。フッ素原子を含む化合物群に対して、標的タンパク質の非存在下および存在下の^{19}F-NMRスペクトルを測定することにより、化合物の^{19}F-NMR信号変化を指標に、化合物の標的タンパク質との相互作用の有無を容易に判別できる。水素核と比較して、フッ素核は化学シフトの分散がよく、数10化合物混ぜてもそれぞれの化合物に由来する信号を区別できる。^{19}F-NMRを活用したフラグメント探索は、混合物を一度に測定することで、スループットが向上しかつ標的タンパク質の消費量を抑えることができる長所がある。フッ素原子を含む化合物の^{19}F-NMRの化学シフトを正確に予測できれば、多数の化合物同士の信号が重ならないように混合物を設計できる。また、事前にそれぞれの化合物単独で^{19}F-NMRを測定しなくても、混合物中のヒット化合物がどの化合物であるか推定できる。

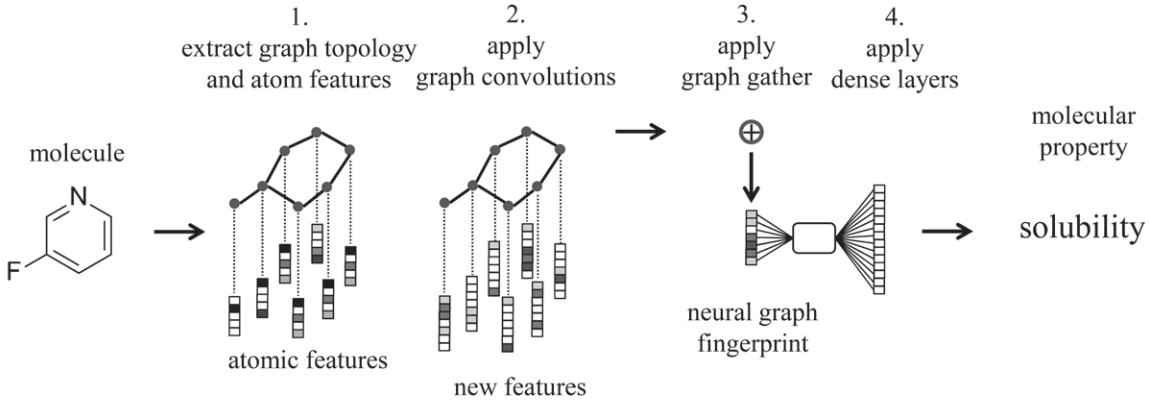


Fig. 1. A schematic representation of the neural graph fingerprint.

^{19}F-NMRの化学シフト予測法は、量子化学計算による手法と機械学習による手法の2つに分類できる。近年、画像認識の分野において、機械学習の１つである深層学習では、畳み込みニューラルネットワーク(CNN)を用いた手法が著しい成果を上げている。創薬の分野においても、化合物

深層学習, ^{19}F-NMR

○たきざわたけし，はんざわひろゆき

記述子にCNNを用いたneural graph fingerprint(Fig. 1)とニューラルネットワーク(NN)を用いることで、化合物の溶解度予測の精度が向上している[3]。そこで、化合物の^{19}F-NMRの化学シフトもneural graph fingerprintを化合物記述子とし、NNを用いることで予測精度が向上すると考え、フッ素原子周辺の環境を考慮した拡張したneural graph fingerprintを実装し(Fig. 2)、NNを用いて予測した。対照として、従来法であるfluorine fingerprintを化合物記述子とし、k-nearest neighbors algorithm(k近傍法)を用いた予測[4]を行った。

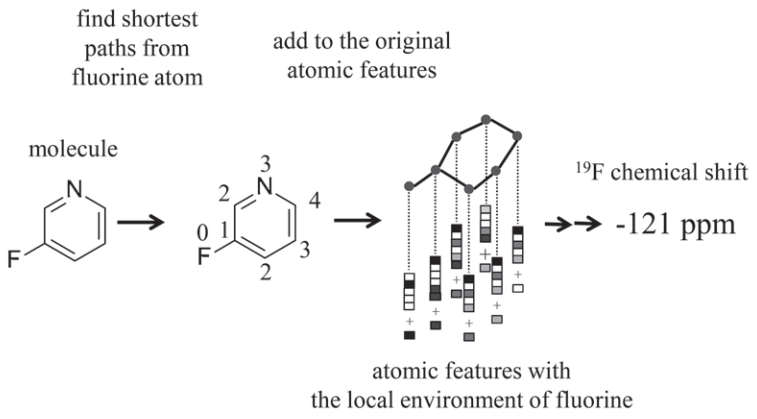


Fig. 2. An extension of the neural graph fingerprint for ^{19}F chemical shift prediction.

従来のk近傍法は局所的な予測モデルに過ぎないため、予測したい化合物と似た化合物がないと予測できない。すべての化合物の予測値を得るためには、k近傍法のsimilarity thresholdを0.1まで小さくする必要があった。この条件で比較すると、拡張したneural graph fingerprintを化合物記述子とし、NNによる予測は、従来のfluorine fingerprintを化合物記述子とし、k近傍法による予測より精度が向上した(Fig. 3)。よって、^{19}F-NMRの化学シフト予測には、化合物記述子としてフッ素原子周辺の環境を考慮するだけでなく、neural graph fingerprintのように深層学習も有効であると考えられる。

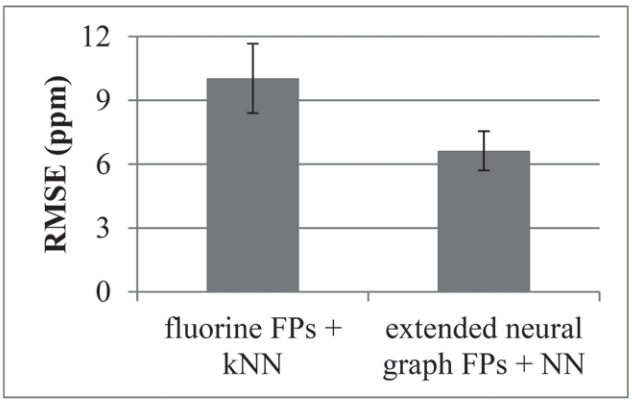


Fig. 3. 5-fold-average RMSE of ^{19}F chemical shift prediction.

References

(1) Jordan, JB. Poppe, L. Xia, X. Cheng, AC. Sun, Y. Michelsen, K. Eastwood, H. Schnier, PD. Nixey, T. Zhong, W. (2012) Fragment based drug discovery: practical implementation based on ^{19}F NMR spectroscopy. J Med Chem. 55, 678-87.

(2) Jordan, JB. Whittington, DA. Bartberger, MD. Sickmier, EA. Chen, K. Cheng, Y. Judd, T. (2016) Fragment-Linking Approach Using ^{19}F NMR Spectroscopy To Obtain Highly Potent and Selective Inhibitors of β-Secretase. J Med Chem 59, 3732-3749.

(3) Duvenaud, D. K. Maclaurin, D. Iparraguirre, J. Bombarell, R. Hirzel, T. Aspuru-Guzik, A. Adams, R. P. (2015) Convolutional networks on graphs for learning molecular fingerprints. Neural Inf. Proc. Sys. (NIPS), 2224−2232.

(4) Vulpetti, A. Landrum, G. Rudisser, S. Erbel, P. Dalvit, C. (2010) ^{19}F NMR chemical shift prediction with fluorine fingerprint descriptor. J Fluor Chem 131, 570-577.

P88

量子化学計算と機械学習を用いた化学シフト予測法の高度化

○伊藤研悟[1,2], 尾渕由佳[2], 近山英輔[1,3], 伊達康博[1,2], 菊地淳[1,2,4]
1理化学研究所 環境資源科学研究センター
2横浜市立大学大学院 生命医科学研究科
3新潟国際情報大学 情報システム学科
4名古屋大学大学院 生命農学研究科

Advanced predictive modeling of chemical shift using quantum chemical calculation and machine learning

○Kengo Ito[1,2], Yuka Obuchi[2], Eisuke Chikayama[1,3], Yasuhiro Date[1,2], Jun Kikuchi[1,2,4]
[1] *RIKEN Center for Sustainable Resource Science*
[2] *Graduate School of Medical Life Science, Yokohama City University*
[3] *Department of Information Systems, Niigata University of International and Information Studies*
[4] *Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University*

Experimental chemical shift database is useful for signal assignment of known metabolites, although, assigning the signal from unknown metabolites is difficult. Quantum chemical calculation is possible to predict and assign the signals without depend on experiment. But, the difference between experimental and theoretical chemical shift is remarkable, improved predictive methodology have been required. So, this study proposes the new predictive method combined with quantum chemistry and machine learning. The effective scaling factors of theoretical chemical shift were explored from chemical information of 150 compounds. From the result, prediction with high accuracy was possible compared with existing empirical and QM method. Also, the usefulness was verified by applying the predictive model to signal assignment of metabolites.

【背景・目的】

NMRは生体試料中の代謝混合物の網羅的な検出が可能であり、多様な検体のプロファイリングを行う上で有用な手法である。特に、この様なNMRを用いたメタボロミクス研究では、検出された代謝物の帰属が重要な作業となる。一般的に、帰属作業は実測化学シフトデータベースを用いられることが多いが、データベースが全ての代謝物を網羅することは困難であることから、未帰属シグナルの存在が多く報告されている。近年、実測値に依存しない代謝物のシグナル帰属支援法として、量子化学計算が多く取り入れられる様になってきた。また、化合物の古典物理学的な計算項に実測データを機械学習させることで、半経験的手法ながらも化学シフトを精度良く予測する手法も開発されている。しかし、実際には様々な要因から予測および実測化学シフトの差が著しいため、代謝混合物中の未帰属シグナルにおいては、さらに正確なシグナル予測技術が必要であるといえる。そこで、我々は代謝物シグナルを高精度に帰属するための新しい化学シフト予測法の開発を試みた。本手法は、量子化学計算と機械学習を組み合わせることによって達成されると考えられた。また、予測モデルは、多様な化合物、化学情報、機械学習法を用いて作成することとした。 さらに、予測モデルの性能は、既存の方法と比較するとともに、代謝物群の実スペクトルの帰属に適用することによって、その有用性を検証することとした (Fig.1a)。

代謝物、立体化学、計算科学

○いとうけんご、おぶちゆか、ちかやまえいすけ、だてやすひろ、きくちじゅん

【実験方法】

本研究における解析戦略をFig.1bに示す。(1) まず、PubChemウェブサイトから150の低分子化合物の立体構造情報を収集した。これらの化合物の水およびメタノール溶媒中のNMRスペクトルは、当研究室で開発されたSpinAssign用のアーカイブに登録されており、化学シフトの実測値と理論値の対応付けが可能なため、化学シフト予測モデル作成のための訓練データとして選択された。(2) 理研のスーパーコンピュータHOKUSAI中のGaussian09プログラムを用いて、構造最適化、化学シフトとスピン結合定数の理論値を算出した。計算レベルは、B3LYP/6-31G*およびB3LYP/6-311++G**を選択し、NMRパラメータの算出にはGIAO法を用いた。また、分極性連続体モデル（PCM）法を用いて、溶質に対する溶媒効果を考慮した。既存の予測方法と本研究の手法の性能を比較するため、Spartanソフトウェア、NMRShiftDBウェブツールおよびMnovaソフトウェアも用いて化学シフトを予測した。 NMRShiftDBでは、3結合先までの部分構造を考慮して化学シフトを予測し、Mnovaでは、機械学習アルゴリズムを採択しているMnova bestにより予測値を算出した。(3) 水およびメタノール溶媒中の150の低分子化合物の各フラグメントの化学シフトの実測値は、NMRデータベースおよびMnovaを用いて帰属し、取得した。(4) 機械学習に使用する項目として、実測値と理論値間の誤差を目的変数*Err.*と定義した。

$$\boldsymbol{Err.} = \boldsymbol{CS(Exp.)} - \boldsymbol{CS(Theo.)}$$

この誤差を予測するため、化学シフトとスピン結合定数の理論値、化学結合先の原子種と数、結合プロトン数、溶媒タイプ、芳香族タイプ、6員環タイプを説明変数とした。これらの学習セットは、Javaプログラムを用いて、量子化学計算の結果ファイルから自動で抽出し、設定した。(5) R言語のcaretライブラリ中の91の機械学習アルゴリズムは、スケーリングファクタ（*SF*）と説明変数の重要度算出に使用された。各機械学習アルゴリズムのパラメータは、3グリッドサーチと10分割交差検証によって最適化した。化学シフトの理論的値は、*SF*を加えることによって補正した。

$$\boldsymbol{Corrected\ CS} = \boldsymbol{CS(Theo.)} + \boldsymbol{SF}$$

(6) 補正された化学シフトの理論値は、実測化学シフトと比較したプロットおよび平均平方二乗誤差（RMSD）によって評価した。他の既存の予測手法も同様に比較することで、本手法の予測性能を評価した。(7) 予測モデルの有効性は、生体試料の実スペクトルの帰属に適用することで検証された。

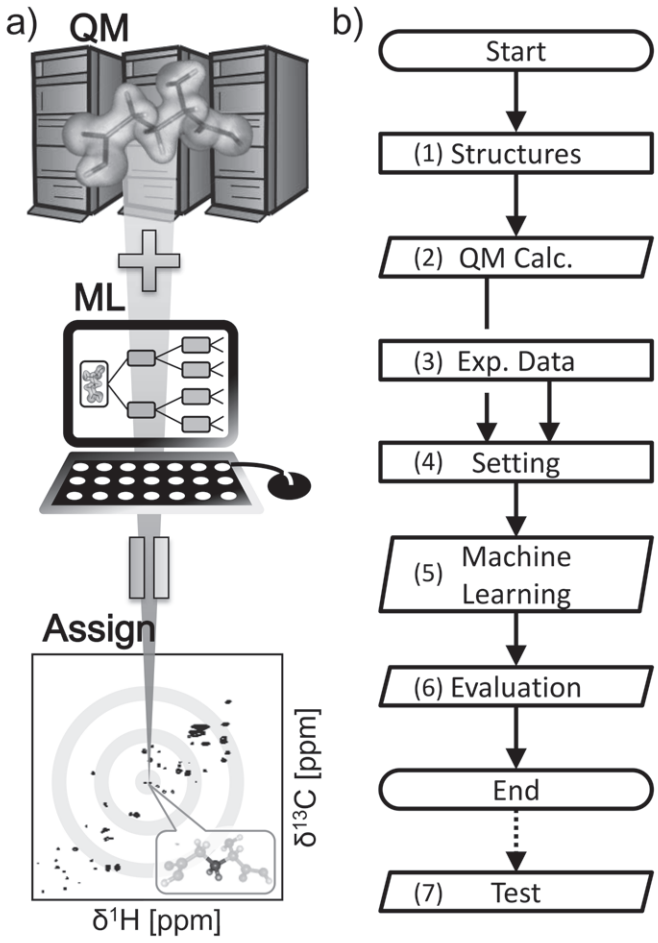


Fig.1 **a)** Concept for assignment of metabolites in this study. **b)** Analytical flow chart from data collection to test of predictive modeling.

【結果・考察】

化学シフト予測のための最良の機械学習法を探索するため、91の機械学習アルゴリズムを用いて、150の低分子化合物の化学シフト（δ^{1}H=1277, δ^{13}C=1078）を予測し、実測値とのRMSDを算出した(Fig.2)。まず、機械学習による補正なしの量子化学計算の結果では、δ^{1}HのRMSDが0.3395ppm、δ^{13}CのRMSDが7.2337ppmとなった。最もRMSDが低くなった機械学習法は、δ^{1}H とδ^{13}Cの両方でExtreme Gradient Boostingであり、RMSDはδ^{1}Hで0.0325ppm、δ^{13}Cで0.3990ppmであった。10分割交差検証を行った際の平均RMSDは、δ^{1}Hで0.1395ppm、δ^{13}Cで2.1994ppmとなった。Random Forest系の手法はRMSDが低い傾向となった。また、一般的に使用される線形回帰の手法では、δ^{1}HのRMSDが0.2242ppm、δ^{13}CのRMSDが3.1102ppmとなった。本研究では、量子化学計算の基底関数を2種類使用したが、RMSDの大きな違いが見られなかったため、計算コストの低い方を選択することが望ましいと考えられた。

次に、既存および本研究の化学シフト予測法を比較し、その性能を評価した(Fig.3)。その結果、本研究による手法は実測値と予測値の誤差が非常に小さく、ばらつきがほとんど見られなかった(Fig.3d, h)。既存の化学シフト予測法で最もRMSDが低かったMnovaの結果(Fig.3c, g)と比較したところ、RMSDはδ^{1}Hおよびδ^{13}Cで1/10程であった。また、補正前の化学シフトの理論値(Fig.3a, e)を補正後と比較すると、RMSDはδ^{1}Hで1/10程、δ^{13}Cで1/20程であった。量子化学計算後にボルツマン分布に基づいた補正を行っているSpartanの結果は、補正をしない結果よりも誤差が小さくなるが、機械学習程の補正効果を得ることが難しいと考えられた。NMRShiftDBを用いたδ^{1}Hの予測結果(Fig.3b)のRMSDは、他の手法と比較して最も大きくなった。実測値が充実している必要があるが、計算で考慮する部分構造の範囲を広げれば、さらに精度を向上させることが期待できる。これらの結果から、量子化学計算と機械学習を組み合わせた化学シフト予測法は、従来の手法に比べて、大幅な予測精度の向上を期待できることが示唆された。

量子化学計算により得られた理論値の補正に関して、どの様なパラメータが寄与しているかを調査するために重要度を算出した(Fig.4)。δ^{1}Hにおいては、2~3結合先のNやCとの相互作用が重要因子であり、δ^{13}Cにおいては、直接結合しているO、CおよびHが重要因子であることが示された。また、δ^{1}Hおよびδ^{13}Cにおいて、遮蔽効果は補正の重要因子であった。結合先の特定の元素種の数は、補正においての重要度は低くなった。

生体試料中の成分の帰属に化学シフト予測モデルを適用することで有効性を検証した。我々が以前に報告した海藻の18の代謝物の実測化学シフト、帰属支援に使用した理論化学シフトおよび本研究の手法から得た理論値補正化学シフトを比較した。本研究で開発した手法は、補正なしの手法（RMSD = 0.3833 (δ^{1}H), 6.7938 (δ^{13}C)）に比べて実測スペクトルに近い疑似シグナル（RMSD = 0.2785 (δ^{1}H), 1.9831 (δ^{13}C)）が得られ、代謝混合物の帰属支援の性能が向上したといえた。

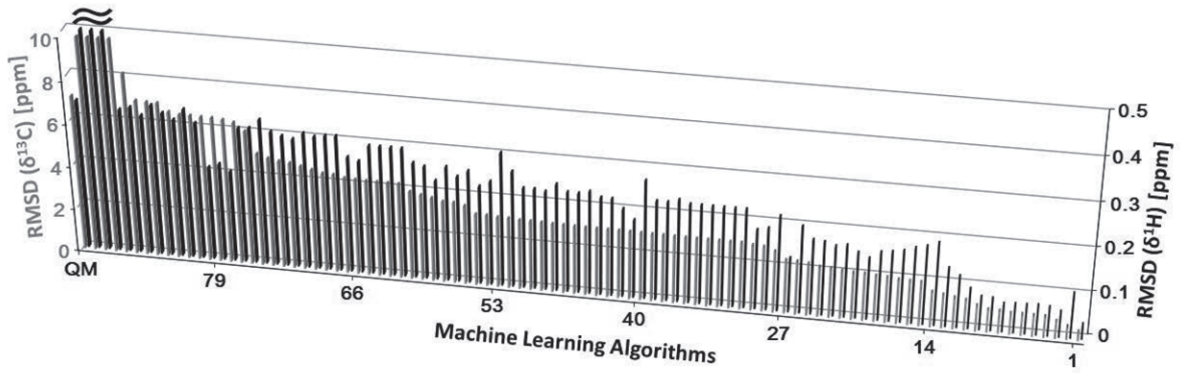


Fig.2 RMSD values between experimental and theoretical/predicted δ^{1}H (black) and δ^{13}C (grey) calculated by 91 machine learning algorithms.

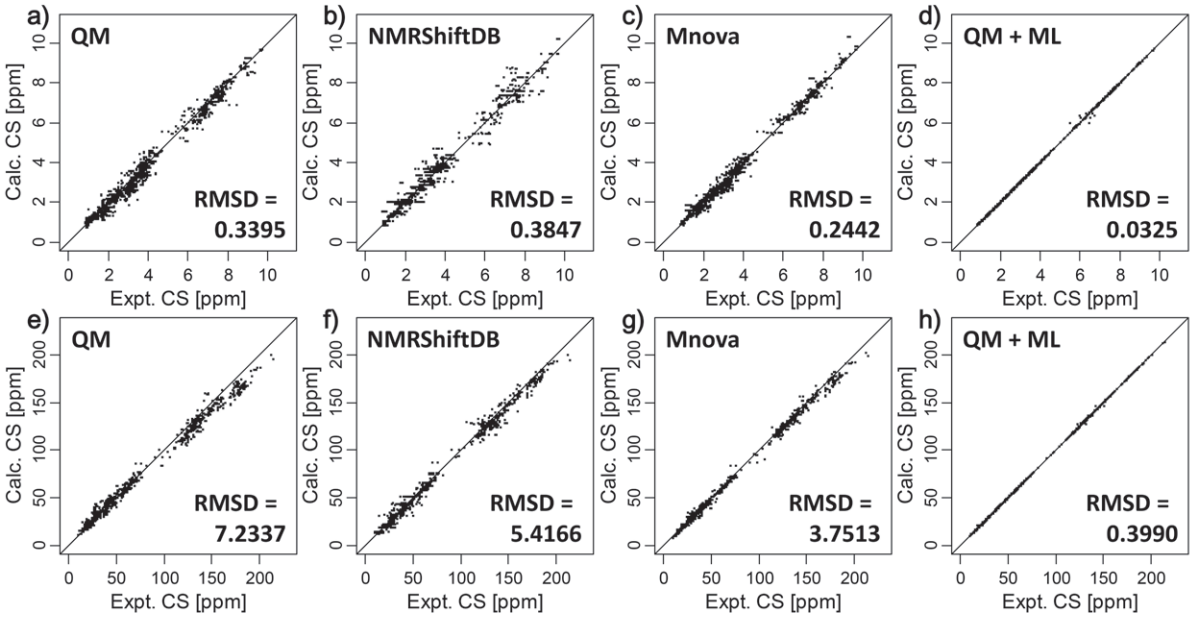


Fig.3 Comparison of **a-c, e-g)** exiting predictive method and **d, h)** this method. Experimental chemical shifts compared with the calculated **a-d)** δ^{1}H and **e-h)** δ^{13}C of 150 compounds in D_2O and MeOD solvent.

本研究では、量子化学計算と機械学習を組み合わせた化学シフト予測法の高度化を試みた。その結果、従来の経験的および非経験的な化学シフト予測法に比べ、高精度に予測が可能であった。また、作成した予測モデル式を代謝混合物のシグナル帰属に適用することで、その有用性が検証された。さらに、学習データセットや説明変数を充実化することで、実測値に匹敵するほどの高精度な化学シフト予測法に改良することが可能であると考えられた。標品の入手や実測値の取得が困難なために帰属を行うことが出来なかったシグナルも、本手法を用いることで、帰属が可能となることが予想された。

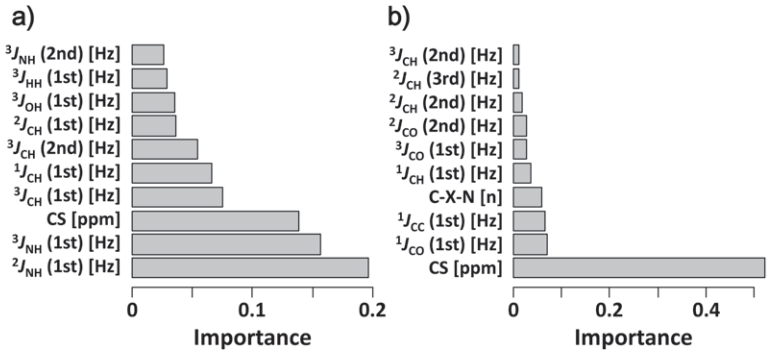


Fig.4 The top 10 of importance of predictive model of **a)** δ^{1}H and **b)** δ^{13}C.

【参考文献】

[1] Ito, K., Sakata, K., Date, Y. and Kikuchi, J., *Anal. Chem.* **86**, 1098–1105 (2014).

[2] **三澤拓真**, **伊藤研悟**, **菊地淳**, ***生物工学会誌*** **92**, 1–7 (2014).

[3] Wei, F., Ito, K., Sakata, K., Date, Y. and Kikuchi, J., *Anal. Chem.* **87**, 2819–2826 (2015).

[4] Ito, K., Tsutsumi, Y., Date, Y. and Kikuchi, J., *ACS Chem. Biol.* **11**, 1030–1038 (2016).

[5] Misawa, T., Komatsu, T., Date, Y. and Kikuchi, J., *Chem. Commun.* **52**, 2964–2967 (2016).

[6] Komatsu, T., Ohishi, R., Shino, A. and Kikuchi, J., *Angew. Chem. Int. Ed.* **55**, 6000–6003 (2016).

[7] Chikayama, E., Shimbo, Y., Komatsu, K. and Kikuchi, J., *J. Phys. Chem. B* **120**, 3479–3487 (2016).

[8] Date, Y., Ito, K. and Kikuchi, J., *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* (invited).

[9] Uchimiya, M., Tsuboi, Y., Ito, K., Date, Y. and Kikuchi, J., *metabolites* (revised).

P89

統合ウェブツールInterSpinの開発に基づく混合物の高・低磁場NMRスペクトル解析

○山田隼嗣[1, 2]，伊藤研悟[2,3]，黒谷篤[2]，山田豊[2]，近山英輔[4]，菊地淳[1, 2, 3]
1名古屋大学大学院・生命農学研究科
2理化学研究所・環境資源科学研究センター
3横浜市立大学大学院・生命医科学研究科
4新潟国際情報大学・情報文化学部

High / low magnetic field NMR spectrum analysis of mixture based on development of integrated web tool InterSpin

○Shunji Yamada[1,2], Kengo Ito[2,3], Atsushi Kurotani[2], Yutaka Yamada[2], Eisuke Chikayama[4], Kikuchi Jun[1,2,3]
[1] *Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University*
[2] *RIKEN Center for Sustainable Resource Sciences*
[3] *Graduate School of Medical and Life Sciences, Yokohama City University*
[4] *Department of Information Systems, Niigata University of International and Information Studies*

We have integrated the mixture analysis system "SpinAssign" based on ^{1}H-^{13}C-HSQC and "SpinCouple" based on 2D-*J*res into LIMS. And we added a function to narrow metabolites. In addition, "Bm-Char" targeting polymers was also released. These analyzes require isolated peaks with high S / N in high field NMR apparatus. Recently, desktop NMR of low magnetic field has been developed. It has low S / N and poor signal separation ability, but it can be applied to quality control. We released "SENSI" for improving S/N. "PKSP" which is a peak separation tool suggests the use of MCR-ALS, Fast ICA, NMF, and further added NNSC. We developed "InterSpin" integrating each web tool.

混合物のNMR解析は様々な場面で用いられる. 低分子を前提としたメタボローム解析はヒトのコフォート研究等で主要手段に位置付けられつつあり，我々もHSQCを前提としたSpinAssign，Jresを前提としたSpinCoupleを報告してきた．さらに藻類，陸上植物や腐食酸等の高分子混合物を前提としたBm-Charを報告してきた．混合代謝物同定システムによる同定機能を向上させるため，^{1}H-^{13}C-HSQCスペクトルに基づくSpinAssignと2D-*J*resスペクトルに基づくSpinCoupleを統合し，各同定結果から代謝物を絞り込む機能を追加した．これらの解析においては，高磁場NMR装置でS/N良く2次元スペクトル上でシグナル分離されたピークを前提としてきた.

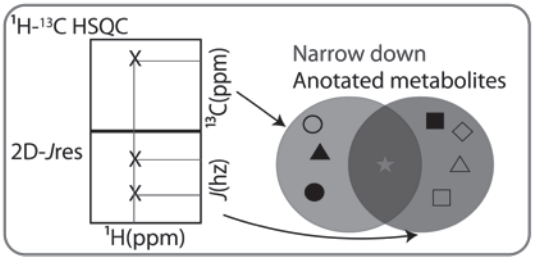


Fig. 1. Function to narrow metabolites.
Based on the results of ^{1}H-^{13}C-HSQC and 2D-*J*res, metabolites are narrowed down.

混合物解析システム，LIMSデータ，卓上NMR

○やまだしゅんじ，いとうけんご，くろたにあつし，やまだゆたか，ちかやまえいすけ，きくちじゅん

最近の高温超電導素材の開発や永久磁石素材の飛躍的な進歩で，NMRは飛躍的に小型化装置が開発され始めてきた．低磁場装置は一般にS/Nが低くシグナル分離能が悪いが，品質管理への応用が期待できる．こうした利用法であれば，毎日のように対象試料をルーチン計測するため，SENSI法によるS/N向上戦略をとることができる．もう一つの弱点であるシグナル分離能に関しては，固体CP-MAS等のブロードなスペクトルを対象としたMCR-ALS，NMFといったアルゴリズムの援用を提案してきた．我々は更にNNSCを加えたPKSPを作成し，各web-toolを統合したInterSpin（http://dmar.riken.jp/interspin/）を開発したので，その利用法を報告する．

品質管理は近代工業に欠かせないプロセスである．しかし農林水産業のような1次産業にも適用できれば，農産物や水産物の肥料／飼料適用の最適化，食品流通や加工過程の効率化，さらには複雑系である農場や養殖場の環境管理が将来は可能となるであろう．一方で生産・流通現場と実験室や分析センターが離れていることは品質管理の致命的な弱点であり，必ずしも分離有機溶媒を必要としない小型NMR装置の普及は，品質管理の在り方を劇的に変革させる可能性もある．当該ツールはソフトウェアが簡便に作成される傾向にある小型装置のユーザーを，取り込める可能性を秘めている．NMRの化学シフトやJ値といったパラメーターは物理量であるが故に，高磁場装置で計測した標品情報を参照することも可能である．今回はSpinLIMSによるクライアントサーバーからの登録システムも開発したため，リクエストに応じたデータベースの充実化も可能となる．

References

(1) Chikayama, E., Sekiyama, E., Okamoto, M., Nakanishi, Y., Tsuboi, Y., Akiyama, K., Saito, K., Shinozaki, K., and Kikuchi, J. Statistical induces for simultaneous large-scale metabolite detections for a single NMR spectrum. Analytical Chemistry, 82(5): 1653-1658, 2010.
(2) Kikuchi, J., Tsuboi, Y., Komatsu, K., Gomi, M., Chikayama, E., and Date, Y. SpinCouple: Development of a Web Tool for Analyzing Metabolite Mixtures via Two-Dimensional J-Resolved NMR Databese. Analytical Chemistry, 88:659-665,2016.
(3) Ogata, Y., Chikayama, E., Morioka, Y., Everroad, R.C., Shino, A., Matsushima, A., Haruna, H., Moriya, S., Toyoda, T., and Kikuchi, J. ECOMICS: A Web-Based Toolkit for Investigating the Biomolecular Web in Ecosystems Using a Trans –omics Approach. PLos ONE, 7(2):e30263, 2012.
(4) Misawa, T., Komatsu, T., Date, Y., Kikushi, J. SENSI: signal enhancement by spectral integration for the analysis of metabolic mixtures. Chem. Commun. 18;52(14):2964-7, 2016.
(5) Wei, F., Ito, K., Sakata, K., Date, Y., and Kikuchi, J. Pretreatment and integrated analysis of spectral data reveal seaweed similarities based on chemical diversity. Anal. Chem. 87, 2819-2826, 2015.

P90

生体分子複雑系を対象とした機械学習によるデータ駆動モデリング

○伊達康博[1,2]，魏菲菲[1]，坂田研二[1]，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

Data-driven modeling based on machine learning for complex biomolecular mixtures

○Yasuhiro Date[1,2], Feifei Wei[1], Kenji Sakata[1], 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*

This study focused on advancement of machine learning approaches in terms of applicability and expandability to metabolomics studies. To this end, we have developed a deep neural network (DNN) algorithm in combination with determination of important variables based on mean decrease accuracy (MDA) by permutation algorithm, called DNN-MDA. The DNN-MDA showed the best classification accuracy for geographical discrimination of fish and enabled to identify important variables. In addition, we have applied machine learning approaches to T_2 relaxation data, resulting that the machine learnings enable to capture characteristic features related to fish species and habitats from T_2 relaxation data.

【背景・目的】

地球上に存在する多様で複雑な生体分子混合物の解析において、従来は分離・精製された均一な分子から構造決定と機能解析を行う天然物化学のアプローチが主流であった。しかしながら、メタボロミクスが普及した現代では、生体分子混合物から特定の分子を分離・精製することなく、複合状態のままで分子群を一斉に検出・解析・評価することも可能となった。これにより、特定の疾患に関わるバイオマーカーの発見や生産地判別技術としての応用等、混合物の組成比やそのバランスの変化に基づく代謝表現型の評価が可能となっている。こうしたメタボロミクス技術の進展は、計測・プロセッシング・解析等を支援する様々なツールやデータベース等の開発に支えられており、我々もSpinAssign [1]やSpinCouple [2]等に代表されるアノテーションツール（データベース）の開発、フラグメント集積法[3]やsignal enhancement by spectral integration (SENSI)法[4]に代表される解析支援技術の開発等、NMRをベースとしたメタボロミクス研究支援技術の発展に大きく貢献してきた。こうした解析支援技術高度化研究の一環として我々は、人工知能ブームの火付け役として飛躍的に進歩している深層学習や機械学習に着目し、NMRメタボロミクス研究への応用や、partial least squares (PLS)等の従来法では解析しきれない“埋もれた情報”を発掘可能なdeep neural network (DNN)に基づく解析アルゴリズムの開発（昨年度の本会で報告）を推進してきた。本年度はDNNアルゴリズムの更なる拡張・開発と、緩和曲線に“埋もれた情報”の機械学習による発掘法（魚種や生息域に関する特徴抽出）、の主に二つの研究成果に関して本会で報告したい。

DNNアルゴリズムの更なる拡張・開発に関する研究では、一般的なDNNや深層学習では判別（回帰）モデルに寄与する重要な変数（すなわち代謝物）を直接的に特定することが出来ないという、メタボロミクス研究における致命的な問題を解決するため、パーミュテーション法をベースとし

machine learning, algorithm, molecular complexity

○だてやすひろ，うぇいふぇいふぇい，さかたけんじ，きくちじゅん

たmean decrease accuracy (MDA)法を導入し、各変数の重要度を算出可能なDNN-MDA法を開発した。また、開発したDNN-MDA法の判別性能とサンプル数の関係性から、汎用性や適用制限についても評価した。一方、緩和曲線に関する研究では、メタボロミクス研究では利用されない緩和情報に対する機械学習の適用可能性や、魚類の生息域に関する特徴抽出能について評価した。

【実験方法】

本研究では、日本各地の河口域からマハゼ1022個体を採集し、筋肉中代謝混合物を2D *J*res NMRにより計測した。得られたskyline projectionスペクトルは数値化・マトリクス化した後、DNN-MDA法の開発用データセットとして供試した。また、日本の沿岸および河口域等から採集した多様な魚類に由来する緩和曲線データは、逆ラプラス変換後、数値化・マトリクス化処理を施し解析に供試した。機械学習による解析は、統計解析ソフトウェア“R”を用いて行い、classyfire [5]、kernlab [6]、muma [7]、mxnet [8]、randomForest [9]等のパッケージを利用した。

【結果・考察】

1. DNN-MDA法の開発

DNN-MDAアルゴリズムはRプラットフォーム上で開発された。開発されたDNN-MDAアルゴリズムは大きく分けて3つのパートから構成されており、最初にクロスバリデーションのためにオリジナルデータをmodeling data (training set)とevaluation data (test set)に分割した(Fig. 1)。次に、分割されたデータはmxnetライブラリーを用いてDNNの計算を行い、分類モデルを構築し、evaluation dataを用いて識別精度を算出した。最後に、パーミュテーション法を用いて各変数の重要度を算出し、構築された分類モデルに寄与する重要な変数（代謝物）の特定を行った。

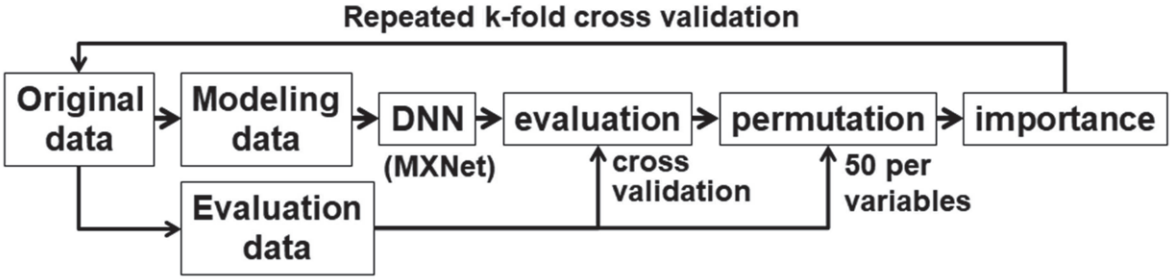


Fig. 1. DNN-MDA algorithm developed in this study.

開発したDNN-MDA法の識別性能を評価するため、日本各地の河口域から採集したマハゼのNMRスペクトルデータから生息地域の違いが判別可能かどうかを検討した。問題を単純化するため、関東地域由来のマハゼ(n=583)とそれ以外の地域由来のマハゼ(n=439)にサンプルを分割し、二群の分類問題における識別性能を評価した結果、開発したDNN-MDA法の識別精度は97.8%と非常に高い数値を示した(Fig. 2)。一方、従来法であるPLSや機械学習手法の一種であるランダムフォレスト(RF)およびサポートベクターマシン(SVM)における識別性能についても同様に評価した結果、識別精度はそれぞれ57.3% (PLS)、95.0% (RF)、95.8% (SVM)であり、DNN-MDA法よりやや劣るものの、RFやSVMはマハゼの地域判別問題において高い識別精度を示した。このことから、従来法(PLS)では正しく判別できない（埋もれた情報を発掘しきれない）ような分類問題に対しても、各種機械学習手法(DNN-MDA、RF、SVM)の適用可能性および有用性が示された。また、最も精度の高かったDNN-MDA法に対して、分類に寄与している重要な変数（重要度）を算出した結果、TMAOやhistidine、phosphatidylcholine、betaine、inosinic acid等の物質が重要な変数として寄与していることが明らかとなった(Fig. 2)。これらの物質は、有意差検定による妥当性評価により、inosinic

acid等の物質は関東地方に生息するマハゼに有意に多く、TMAOやhistidine等の物質は関東地方に生息するマハゼに有意に少ないことがわかり、開発したDNN-MDA法の重要度算出に関する有用性および妥当性を示すことが出来た。

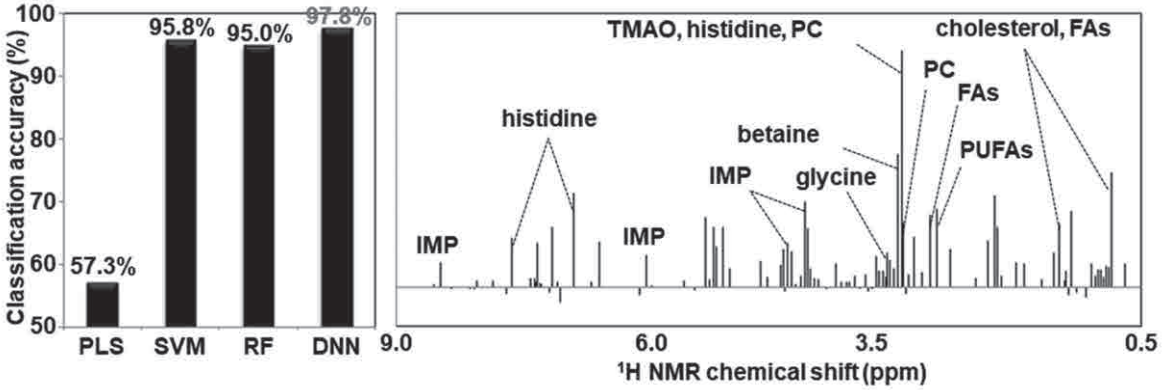


Fig. 2. Classification accuracy and importance evaluated by DNN-MDA algorithm.

2. 機械学習の識別性能とサンプル数の関係性

DNN-MDA法を含む各種機械学習法は、教師情報を基に学習を繰り返して識別モデルを構築するため、そのアルゴリズムの性質上学習に使用するサンプル数が少ないと、“学習不足”により適したモデルが構築できず、結果として識別精度があまり上がらないという問題が起こり得る。そこで本研究では、構築したDNN-MDA法の識別精度とサンプル数の関係性を調べるために、ランダムサンプリングにより元データ（マハゼ1022個体のNMRスペクトル）から任意の数だけサンプルを抜き出し、識別精度の評価を行った(Fig. 3)。この結果から、解析に用いるサンプル数が極端に少ない場合、DNN-MDA法の識別精度も格段に落ちてしまい、バラつきも大きくなる傾向にあることが明らかとなった。以上のことから、サンプル数がある程度用意できる場合においてDNN-MDA法は有用であるが、サンプル数が少ない場合は代替手段(RF、SVM等)検討の必要性が示唆された。

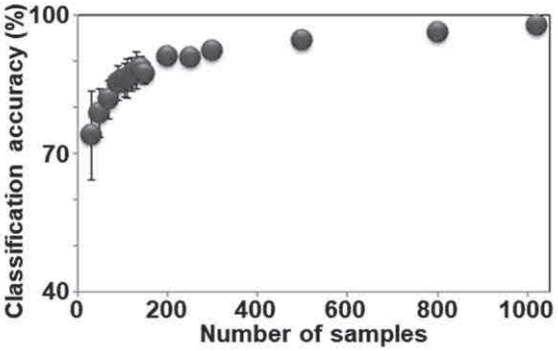


Fig. 3. Relationship between classification performance evaluated by DNN-MDA and number of samples used for the analyses.

3. 機械学習による多様な魚類の緩和曲線解析

NMRメタボロミクスでは、^{1}Hや^{13}C NMRスペクトルを用いて研究を行うのが一般的であるが、NMRによる計測データからは、魚類筋肉中に含まれる化合物の組成や割合のみならず、その高分子タンパク質と水分子の結合や相互作用等の情報も取得可能であることから、これらの情報を有効活用することで魚類の特徴を捉えることが出来るのではないかと考えた。そこで本研究では、緩和曲線に含まれる情報を機械学習を用いてデータマイニングすることにより、魚種や生息域に関する特徴抽出を試みた。多様な魚種の筋肉における^{1}HT_2緩和時間を計測し、逆ラプラス変換処理した緩和曲線データに対して主成分分析(PCA)を行った結果、生息域ごとに特徴的なプロファイルを示す傾向にあることが明らかとなり、特に表層・中層域に生息する魚類はPC2負の方向に、底層域に生息する魚類はPC2正の方向に集まる傾向にあった(Fig. 4)。このデータセットに対して、各種機械学習による底層性魚類と表層・中層性魚類の2群における判別分析を行った結果、RFが最も高い識別精度を示し、その識別に影響を与えた重要変数も特定することが可能であった(Fig. 5)。以上のことから、魚類筋肉中における^{1}Hの緩和時間計測データから、魚種や生息域等に関す

る特徴情報の抽出が可能であった。このことは、通常のメタボロミクス研究と同様に産地識別技術等へと応用できる可能性を示すものであり、また、緩和データはデスクトップNMR（永久磁石の装置）等でも同様に計測することが可能であることから、携帯型装置を用いた現場評価等、今後の展開に期待できると考えている。今回のデータセットでは、サンプル数が比較的少ない（約80サンプル）ことから、各種機械学習による識別精度がやや低い傾向にあったが、この点はサンプル数を増やすことで改善する可能性が高いと考えており、今後検討していきたい。

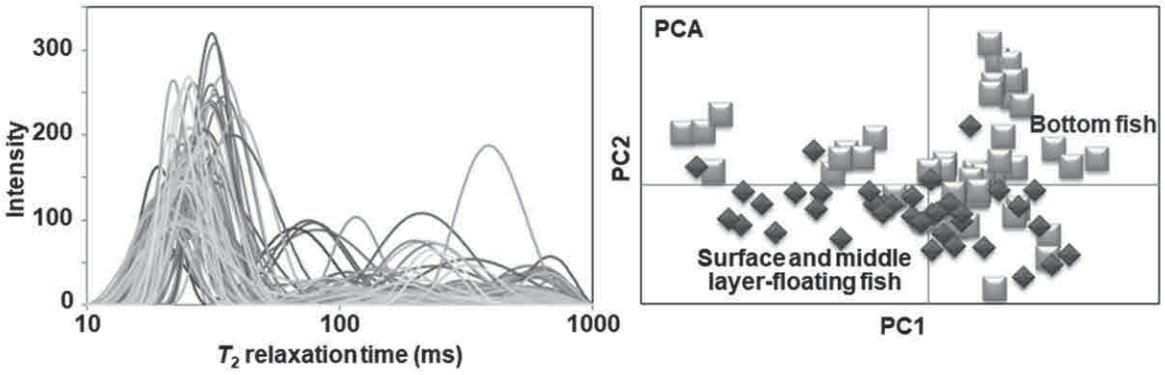


Fig. 4. Inverse Laplace transform and PCA data based on T_2 relaxation time from various fish species.

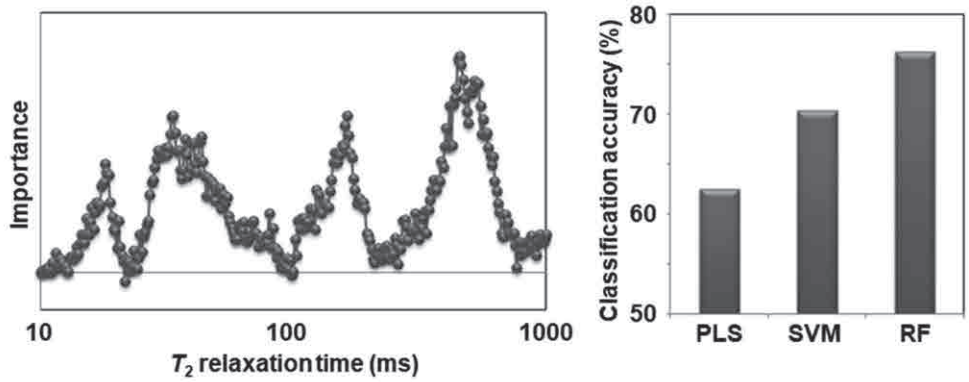


Fig. 5. Classification accuracy and importance based on T_2 relaxation data.

【引用文献】

[1] 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.

[2] Kikuchi, J., Tsuboi, Y., Komatsu, K., Gomi, M., Chikayama, E., and Date, Y. (2016) *Anal. Chem.*, **88**, 659−665.

[3] Ito, Y., Tsutsumi, Y. Date, Y., and Kikuchi, J. (2016) *ACS Chem. Biol.*, **11**, 1030−1038.

[4] Misawa, T., Komatsu, T., Date, Y., and Kikuchi, J. (2016) *Chem. Commun.*, **52**, 2964-2967.

[5] Chatzimichali, E.A., and Bessant, C. (2016) *Metabolomics*, **12**, 16.

[6] Karatzoglou, A., Smola, A., Hornik, K., and Zeileis, A. (2004) *J. Statistical Software*, **11**, 9.

[7] 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.

[8] 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.

[9] 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.

P91

超偏極Xe生成用光ポンピングセル調整方法の研究

○服部峰之[1], 平賀隆[1], 柳町真也[1], 高見澤昭文[1], 池上健[1],
上原大[2], 鈴木孝昭[2]
1国立研究開発法人産業技術総合研究所
2株式会社ミトリカ

Developments of manufacturing process for optical pumping cells continuously generation of hyperpolarized Xe gases

○Mineyuki Hattori [1], Takashi Hiraga [1], Shinya Yanagimachi [1], Akifumi Takamizawa [1], Takeshi Ikegami [1], Masaru Uehara [2], Takaaki Suzuki [2]
[1] *NMIJ, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology （AIST）*
[2] *MITORIKA Co,Ltd.*

Optical Pumping cell generating hyperpolarized ^{129}Xe and ^{3}He are including high-vacuum processes to sustain inside-wall of cells clean. In order to use on continuous-flow type apparatus, we have developed optical pumping cell having two manifolds with vacuum valves. In this report, the newly developed vacuum apparatus for sealing rubidium metal in the cells which could distill alkali metals presented.

【概要】超偏極^{129}Xe及び^{3}Heを生成に用いるガスセルは、高真空により内面を高純度に処理したパイレックスや石英セルに高純度のアルカリ金属を封入する必要がある。連続フロー生成装置に用いるために、ガラス製真空バルブを2個設置した偏極セル(Fig.1)を開発しているが、原料のアルカリ金属を一度真空蒸留した後に高真空下でさらに前処理した偏極用セルに移送する装置を開発した。同装置を用いてRb金属を充填して、超偏極Xe生成の効率について検討した。

【原理と装置】^{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(Fig.2)。NMR計測の飛躍的な高感度化を実現する超偏極を導入するための装置開発を行っている。既存のNMR分析装置や小型MRI装置での^{129}Xeの計測時間の高速化が実現し、数十msから1秒程度の時間分解で、リアルタイム測定が可能になった。多孔質材料に吸着しているXeの^{129}Xe NMRの化学シフトと線幅から、細孔径とXeと細孔との相互作用の解析を行った。従来のNMRが平衡状態にある核スピン磁化を電磁波で操作して生じる信号を解析して分析・定量を行うのに対して、超偏極により誘起される磁化は、熱平衡のものの10万倍といった大きな物ではあるが、非平衡状態であり、磁化の生成についても不確かさに関する考慮が必要になる。簡便なバッチ式の超偏極キセノンガス製造装置[1]があり、連続フロー生成モード[2]での運用も行える(Fig.3)。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[3]を行う。

超偏極、Xe-129、高感度化

○はっとりみねゆき、ひらがたかし、やなぎまちしんや、たかみざわあきふみ、いけがみたかし、うえはらまさる、すずきたかあき

ガスと共存しているRbの吸収線幅は、通常の半導体レーザー(LD)に比較すると20倍程度狭いという状況であり、LD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、また、波長の長時間安定性も定量性に効いてくる。体積グレーティング(VHG)で波長ロックの性能を向上し、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み(794.7nm±0.06nm, 54W，アウレアワークス)定量性を向上させた。

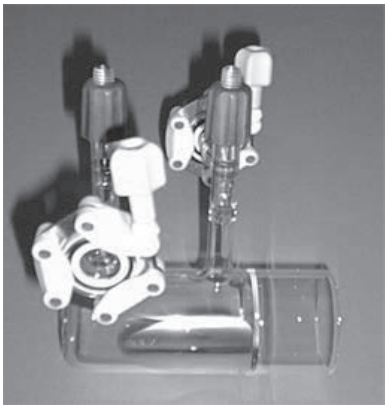


Fig. 1. Rubidium enclosed in a Pyrex glass cell.

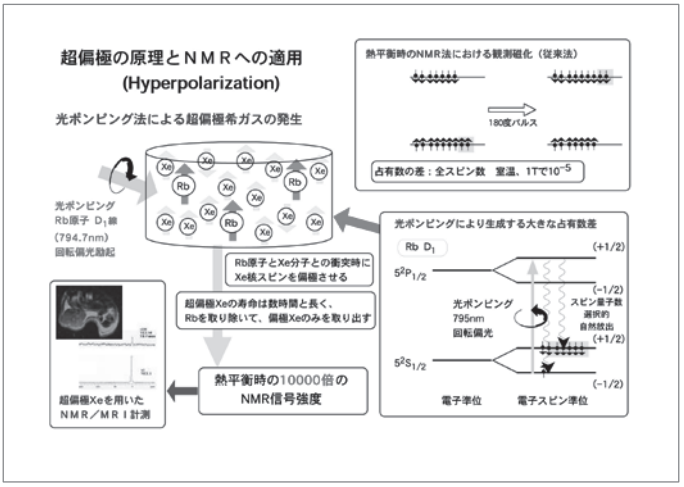


Fig. 2. Principle of hyperpolarization using optical pumping.

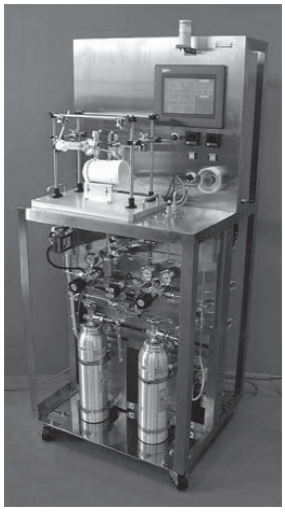


Fig. 3. Practical device for the automated manufacture of hyperpolarized Xe gas.

【参考文献】

[1]大竹紀夫、村山守男、平賀隆、服部峰之、本間一弘，特開2004-262668号；M. Hattori, et. al., Proc. ISMRM, 1264 (2007).

[2]服部峰之、平賀隆、村山守男，特開2003-245263号; M. Hattori, et. al., Proc. ISMRM, 2577 (2010).

[3]服部峰之、平賀隆、浅沼達哉，特開2006-322802号.

P92

フラッシュランプを用いたコンパクトtriplet-DNP装置の開発

○高橋慶伍[1]， 根来誠[1,2]， 鷹峰洸太[1]， 一条直規[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
[2]JST・さきがけ

Compact triplet-DNP instrumentation using a flashlamp

○Keigo Takahashi[1], Makoto Negoro[1,2], Kouta Takamine[1], Naoki Ichijo[1], Akinori Kagawa[1], Masahiro Kitagawa[1]
[1] *Department of Systems Innovation, Graduate School of Engineering Science, Osaka University*
[2] *JST・PRESTO*

Dynamic nuclear polarization using photo-excited triplet electrons (triplet-DNP) is a means of transferring spin polarization from electrons in photo-excited triplet states to nuclear spin by irradiating microwave. High polarization of nuclear spin can be obtained even at room temperature by triplet-DNP. However, expensive and large lasers have been used for photo-excitation. In this study, we have developed compact triplet-DNP instrumentation using a flashlamp, and we have succeeded in achieving a high polarization of ^{1}H spins in powder sample of benzoic acid doped with pentacene. The demonstration of hyperpolarization with compact（ca. 1 m^3）instrumentation is an important step to expand the range of the applications of triplet-DNP.

動的核偏極（DNP）とは不対電子が少量存在するサンプルにマイクロ波を照射して電子スピンの偏極率を移すことで、核スピンの偏極率を高める手法である。従来、電子スピンを高偏極化するために液体窒素温度以下の極低温下で熱平衡化させるため、大型な装置が必要であった。光励起三重項状態を用いた動的核偏極（triplet-DNP）は、ペンタセン分子を少量ドープしたサンプルにおいてその光励起三重項状態の電子を偏極源に用いる（Fig.1）。この電子は磁場や温度によらず高偏極なスピン状態であるため、従来のDNPに比べ、室温でも核スピンの高偏極率を得られるという利点がある。これまで我々は、光励起源としてパルス色素レーザーを使用し、室温下で核スピンの高偏極化に成功してきた [1]。しかし、このような高価で大型なレーザーはtriplet-DNPの応用を広げていく上での制限となっており、安価でコンパクトなtriplet-DNP装置が望まれている。

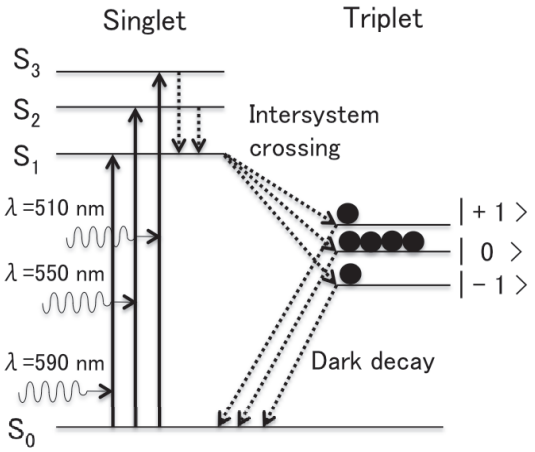


Fig. 1. Energy diagram of pentacene.

本研究では、光励起源として色素レーザ（590nm）の代わりにキセノンフラッシュランプ（200nm～1100nm）を用いたtriplet-DNP装置を開発し、実験を行った。開発したtriplet-DNP装置概形図をFig.2Aに示す。フラッシュランプから出た光はフィルターにより450nm以下をカットされた後、集

動的核偏極　光励起三重項状態　フラッシュランプ

○ たかはしけいご、ねごろまこと、たかみねこうた、いちじょうなおき、かがわあきのり、きたがわまさひろ

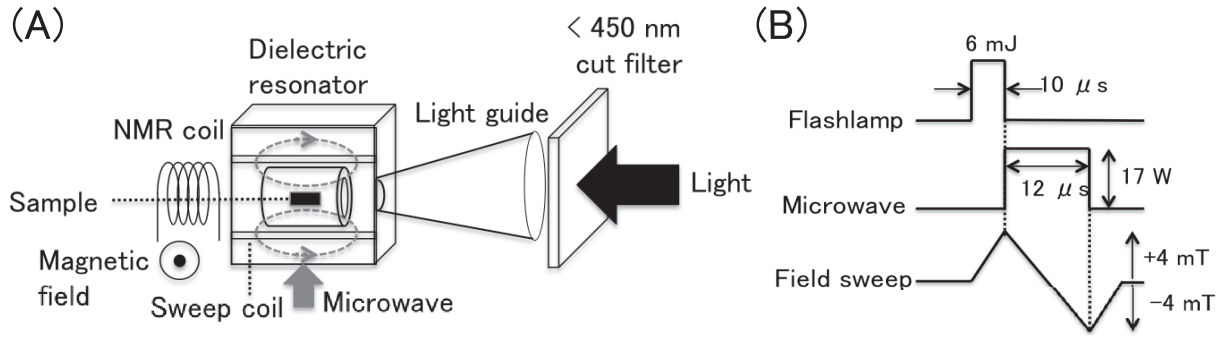


Fig. 2. Triplet-DNP instrumentation (A) and sequence (B).

光管を経てキャビティ内のサンプルへと照射される。その後磁場掃引を行いながらマイクロ波照射を繰り返しすことでDNPを行い（Fig.2B）、サンプルを移動させNMRコイルで観測する。誘電体共振器を用いることで従来よりもキャビティを小型化し、磁極間の狭い永久磁石でもtriplet-DNPを行えるように設計した。このtriplet-DNP装置は1m^{3}程度のスペースしか取らない。サンプルにはペンタセンを0.01mol%ドープした安息香酸粉末を使用した。ペンタセンドープ安息香酸の吸光スペクトルから450nm～600nmにかけて光を吸収することを確認した。

この試料を用いて、キセノンフラッシュランプ励起によるtriplet-DNPを行い、安息香酸粉末の^{1}Hスピンの高偏極化に成功した（Fig.3）。フラッシュランプのパルス幅は10μs、集光管先端での光エネルギーは6mJ/pulseである。静磁場は0.4T、室温にて実験を行った。繰り返し周波数50Hzにおいて到達偏極率は0.036%となり、熱平衡状態に比べ280倍の偏極率を達成した。また比較実験としてパルス幅1μs、10mJ/pulse、590nmの色素レーザーを用いて [1]、繰り返し周波数30Hz、誘電体共振器でtriplet-DNPを行い、0.12%の偏極率が得られた。フラッシュランプ励起による到達偏極率は従来の色素レーザー励起に比べ1/3.5となった。またフラッシュランプの繰り返し周波数を30Hzにしたところ、比は1/4.2となった。フラッシュランプ色素レーザーで励起した際の三重項電子のパルスESR信号強度を測定したところ、その比は1/3.5であった。フラッシュランプと色素レーザーの到達偏極率の差について、また、フラッシュランプでより高い偏極率を達成する手段については当日に議論したい。本研究でフラッシュランプを用いたコンパクトな装置で高偏極化可能であることを示したことは、triplet-DNPの応用を広げる大きな一歩である。

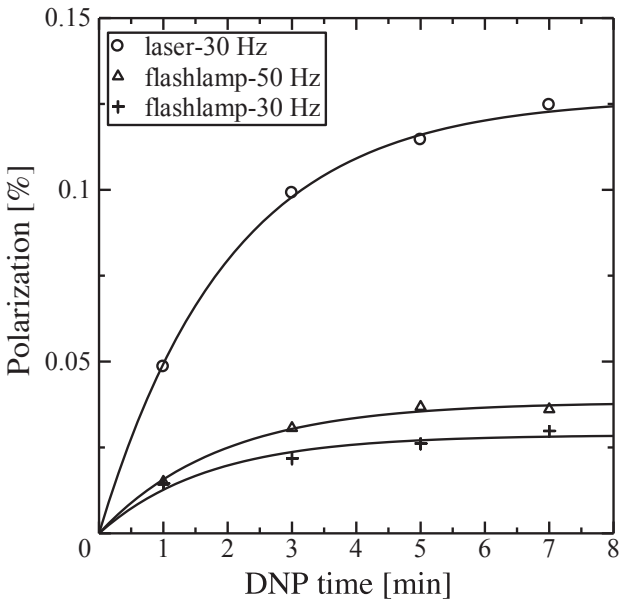


Fig. 3. Polarization buildup curves using laser and flashlamp.

本研究はJST CRESTの支援によって行われた。

References

[1] K. Tateishi, M. Negoro, S. Nishida, A. Kagawa, Y. Morita, and M. Kitagawa, Room temperature hyperpolarization of nuclear spins in bulk, *PNAS* **111**, 7527, (2014)

[2] J. Breeze, K-J. Tan, B. Richards, J. Sathian, M. Oxborrow, N. M. Alford, Enhanced magnetic Purcell effect in room-temperature masers, *Nature communications* **6**, 6215, (2015)

P93

超音波モーターを用いた新たなMATプローブの開発

○松永 達弥[1], 竹腰清乃理[2], 神田 岳文[3], 矢野 貴博[3]
1理化学研究所・ライフサイエンス基盤研究センター
2京都大学大学院・理化学研究科
3岡山大学大学院・自然科学研究科

Development of new Magic-Angle Turning (MAT) probe with use of ultrasonic motor

○Tatsuya Matsunaga1, K. Takegoshi, Takefumi Kanda,
[1] *Department of Chemistry, Graduate School of Science, Tokyo Metropolitan University*
[2] *Department of Physics, Graduate School of Science and Engineering, Tokyo Metropolitan University*

Magic-angle spinning (MAS) is very famous and strong technique for high-resolution solid-state NMR. It uses compressed gas to spin the sample rotor. Then it is hard to measure MAS NMR spectra under extreme condition, such as high vacuum, high pressure, and ultracold. In this study, we developed new NMR probe for magic-angle turning experiment with using an ultrasonic motor to rotate the sample. Because it runs with two alternating current without magnetization, we can use it under high vacuum or high pressure to measure NMR.

固体NMRスペクトルは磁場に対する核スピン相互作用の異方性によって一般に溶液NMRスペクトルに比べて遥かに広い線幅を持っており、ピークが重なってしまうことが多い。この問題に対し、AndrewやLoweが開発したのがMagic-Angle Spinning (MAS)(1)である。MASは粉末試料を磁場に対してマジック角(54.74°)だけ傾いた軸を中心に高速回転させることで核スピン相互作用の異方性を平均化し、スペクトルを高分解能化する。

MASによる効果は試料回転が速いほど大きいため、今日までより速い試料回転を行えるMASモジュールの開発が行われてきた。現在では100 kHzを超える試料回転も可能である(2)。この高速回転を支えているのが空気軸受けと呼ばれる手法である。この手法は試料管を圧縮空気よって浮上させ、管に備え付けられた回転羽に圧縮空気を吹き付ける。そのため、試料管にかかる摩擦力が非常に小さく高速回転が可能である。

そのため、圧縮空気が使えない、または使いにくい環境、例えば超真空や超高圧環境、極低温、特殊なガス雰囲気での測定では密閉された特殊環境の中で

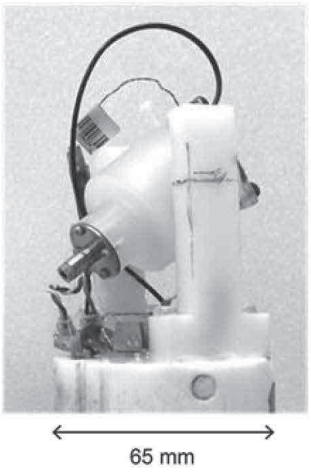


Fig. 1. Picture of double-tune NMR probe head with untrasonic motor.
The left metal is an ultrasonic motor. Sample rotor stays in the center of the white resin part, The metallic body of the ultrasonic motor is made of Titanium for high durability and nonmagnetism.

固体高分解能NMR, Magic-Angle Turning, 極限状況下測定

○まつながたつや, たけごしきよのり, かんだたけふみ, やのたかひろ

圧縮空気を使うため、大掛かりな装置が要となる(3)。逆に言えば圧縮空気を使わない手法を使って試料回転を行えばより単純な装置でより多様な環境下で高分解能測定することも可能となるはずである。

そこで我々は超音波モーターを用いて試料回転を行うMagic-Angle Turning (MAT)プローブを開発した。MATとは試料を数10～数100 Hzで低速回転させながら回転同期パルスを使って試料の化学シフトスペクトルを等方成分と異方成分の2次元で展開する手法である(4)。超音波モーターは超音波振動子の振動を摩擦力によってローターに伝える (5)。そのため高磁場下でも磁場に影響されずに使うことができ、高真空化や極低温下での運用も可能である。また、モーターは2種類の交流電流で駆動するため密閉環境と外部の連絡も容易であり、現在よりも容易に特殊環境下での測定が行えるようになると期待される。

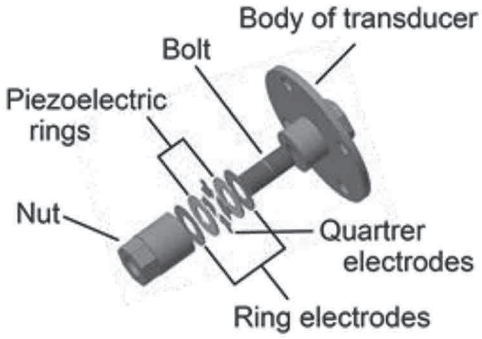


Fig. 1. Picture of NMR probe head with untrasonic motor.
The metallic body of the ultrasonic motor is made of Titanium for high durability and nonmagnetism.

Fig. 1は作成したNMRプローブのヘッド部分であり、金属部分が超音波モーターである。これはFig. 2のような2つのピエゾ素子を持った構造をしており、本体部分は非磁性かつ耐久性のある材料としてチタンを採用した。この超音波モーターによって試料を10 Hzで回転させることができる。我々はこのプローブを使い99%1位置換glycineの^{13}C MATスペクトルを測定した。

References
(1) E.R. Andrew, A. Bradbury and R.G. Eades, (1958) Nature 182 1659,
I.J. Lowe, (1959) Phys. Rev. Lett. 2 285-287.
(2) Y. Nishiyama *et al.*, (2011) J. Magn. Reson. 208 44-48.
(3) P.C. Myhre, G.G. Webb, and C.S. Yannoni, (1990) J. Am. Chem. Soc. 112 8992-8994,
Y. Matsuki, S. Nakamura, S. Fukui, H. Suematsu, and T. Fujiwara, (2915) 259 76-81.
(4) Z. Gan, (1992) J. Am. Soc. 114 8307-8309.
(5) D Yamazaki, *Department of Physics, Graduate School of Science and Engineering, Tokyo Metropolitan University* doctoral dissertation.

P94

オプトメカニクスを用いたNMR信号の光変換実験の最適化

○冨永雄介[1]，長坂健太郎[2]，宇佐見康二[2]，竹腰清乃理[1]，武田和行[1]
[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

Optimization of the conversion of NMR signals to light using optomechanics

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

Electro-mechano-optical (EMO) NMR detection, a scheme for converting NMR signals from radio-frequency to optical regimes, was reported recently. In EMO NMR, a high-tensile, metal-coated silicon nitride membrane interfaces the electrical detection circuit and an optical cavity through the electro-mechanical and the opto-mechanical couplings. The sensitivity of EMO NMR can be higher than that of the conventional electrical NMR detection. So far, however, the sensitivity of experimental EMO NMR was much lower than expected. In this work, we improved the design of the membrane capacitor, built another EMO NMR system from scratch, and successfully acquired signals with such sensitivity that exceeds that of the conventional electric approach.

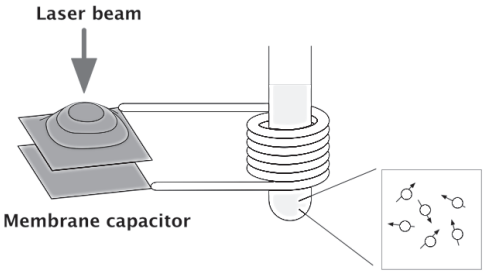


Fig. 1. Conceptual picture of the EMO NMR detection scheme.
The electromotive force due to nuclear induction causes oscillation of the electrode of a membrane capacitor. In turn, the membrane displacement is probed by light.

1. 背景

最近、オプトメカニクスを利用し、ラジオ波であるNMR信号を光に変換するEMO NMR（Electro-mechano-optical NMR）の方法が報告された[1]。光変換は、薄膜振動子に蒸着した金属を、NMR受信共振回路のキャパシタ電極として、かつ光学鏡としても機能させることによって、核磁化による起電力を薄膜の振動に変換し、さらに薄膜の変位を光で読み出すことによって実現する（Fig. 1）。EMO NMRは、従来の電気的なNMR信号検出法よりも高感度を達成できる可能性が示唆されているものの、これまでのところ、感度的な優位性は得られていない。本研究では、従来法を上回る感度の実現と応用を目指し、改良したEMO NMRシステムを構築し、実験を行った。

2. EMO NMRシステムの設計と製作

^{1}H NMR信号の取得を目指して、1 Tの永久磁石を用いてEMO NMRシステムを構築した。その模式図をFig. 2に示す。500 μm角、厚み50 nmの窒化ケイ素薄膜（Norcada社製）上に直径450 μm、厚み50 nmの円形アルミニウム層を蒸着した。ガラス基板上に対向電極パターンを蒸着し、ここに

光検出，薄膜振動子，オプトメカニクス

○とみながゆうすけ，ながさかけんたろう，うさみこうじ，たけごしきよのり，たけだかずゆき

薄膜を800 nmのギャップをあけて乗せて固定してキャパシタを製作した（Fig. 2 (b), (c)）。また同時に、薄膜上のアルミニウム層を平面鏡として用いて、球面凹ミラーと組み合わせて波長1064 nm用のファブリー・ペロー光共振器を構築した。光共振器は、薄膜の大きさに対してレーザーの径が十分小さくなるように集光したうえで、レーザーの波面の曲率が凹ミラーの曲率と一致するように計算を行うことで設計した。組み立てた後もピエゾ素子を用いて共振器長を微調整することができるようにした。空気による薄膜の振動の減衰を防ぐために、薄膜を自作の真空チャンバー内に保持し、ハーメチックコネクタと光学窓を用いて電気的及び光学的に外界と結合できるようにした。薄膜キャパシタをNMR受信共振回路に組み込み、NMR信号の励起のために必要なラジオ波パルスの照射は、受信コイルに直交したサドルコイル（Fig. 2中には見やすくするため非記載）によって行えるようにした。

光共振器に波長1064 nmのレーザー光を照射し、返ってくる光の強度をスペクトル解析することにより、薄膜の固有振動数$\omega_m/2\pi$が435 kHz、Q値が~4000であることを確認した。また、磁場中に設置したコイルに0.1 M硫酸銅水溶液3 mm^{3}が入った試験管を挿入し、通常の（電気的）NMR法により、42.8 MHzで水の^{1}H信号が得られることを確認した。

^{1}Hのラーモア周波数$\omega_0 = 2\pi \cdot 42.8$ MHzと薄膜の固有振動数$\omega_m = 2\pi \cdot 435$ kHzの和もしくは差の周波数$\omega_D = \omega_0 \pm \omega_m$の駆動信号をLC回路に入力することで、電気–機械結合が誘起される。これにより、NMR信号、すなわち横磁化の歳差運動により共振回路に発生する起電力が薄膜振動子のモードを励振する。実験中は常時、光共振器にレーザー光を入射させている。NMR信号の発生

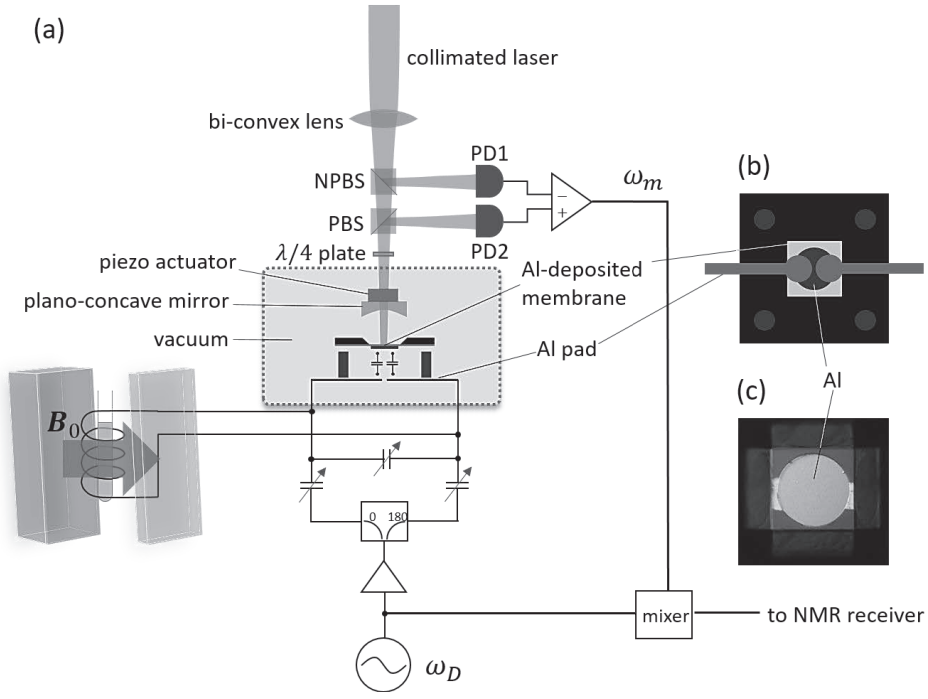


Fig. 2. Experimental setup for EMO NMR signal detection.

(a) The Al-deposited Si_3N_4 membrane oscillator interfaces the electrical part and the optical part of the system. The drive signal, set at frequency $\omega_D = \omega_0 \pm \omega_m$, is applied to induce the electro-mechanical coupling. Optical measurement of the displacement of the membrane, is performed differentially using a pair of photo-detectors. The photo-detected signal is then mixed with a reference signal at the drive frequency, and sent to the receiver of the NMR spectrometer. Abbreviations are as follows; NPBS: non-polarizing beam splitter, PBS: polarizing beam splitter, PD: photo-detector. (b) Schematic drawing and (c) photograph of the membrane capacitor.

に伴い、光共振器からの戻り光の強度が変化する。この信号を、薄膜の固有振動数の周波数の参照信号を用いて直交復調して、回転座標系での核磁化の歳差運動のプロファイルを取得した。

本研究では、先行研究に対して以下の工夫・改良が施されている：

■LC回路の雑音の低減

先行研究[1]では、薄膜上の蒸着金属には金が用いられていた。質量の増加に伴い薄膜の固有振動数が低下するために、金蒸着薄膜の固有振動数は180 kHzと、低かった。そのために駆動信号の周波数がNMR信号の周波数と近く、駆動信号の位相雑音が受信系に混入し、感度の低下を招いていた。本研究では、薄膜に蒸着する金属を金からアルミニウムに変更して軽量化することにより、薄膜の固有振動数が435 kHzに上昇した。従来と比べて、駆動信号とNMR信号の周波数の差が約2.4倍となり、位相雑音の混入を排除することができることを確認した。

■光源の雑音の低減

本研究では、先行研究で用いられていたレーザーよりも狭線幅（約1 kHz）の、波長1064 nmで動作する全固体レーザー（Mephisto S, コヒレント社製）を光源として用いた。光の揺らぎによる雑音を低減するために、無偏光ビームスプリッタ・偏光ビームスプリッタおよび1/4波長板を組み合わせることによって、EMO NMR信号と参照光との差を測定するシステムを構築した。光の古典的雑音がない状態であれば、光子統計により生じる雑音だけがレーザーパワーに比例して残る。そこで、薄膜の固有振動数に近い周波数領域（445 kHz～450 kHz）での光電流の雑音レベルのレーザーパワー依存性を測定した（Fig. 3）。このグラフの傾き（1.0717）が1に近いことから、光検出においては古典的な雑音は取り除かれているといえる。

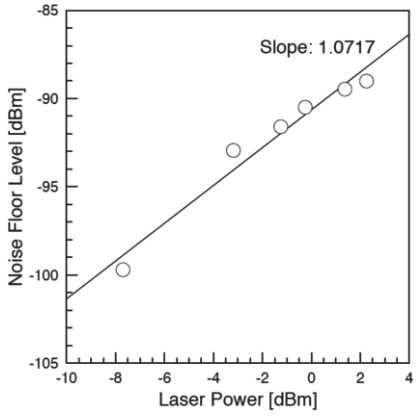


Fig. 3. Laser power dependence of photocurrent noise floor level.

The slope ought to be unity when the sensitivity of *photo-detection* is quantum limited, whereas the slope would be 2 when the classical noise is dominant.

3. 結果と考察

構築したシステムでシングルパルス法を用いて取得した、従来の電気的NMRのスペクトルとEMO NMRのスペクトルをFig. 4に示す。両者ともに試料は同一の硫酸銅水溶液であり、励起条件・横磁化を検出するコイル・積算回数は共通である。Fig. 4 (a)の従来法における^{1}H NMRスペクトルの線幅は主に、永久磁石の磁場の不均一性による。EMO NMRの帯域幅は薄膜の固有振動の帯域幅（~100 Hz）で制限されるために、本来の共鳴線の一部分を切り出した形状のスペクトルが得られている。しかしながらカバーする帯域の範囲内では、従来法を上回る感度を達成できている。

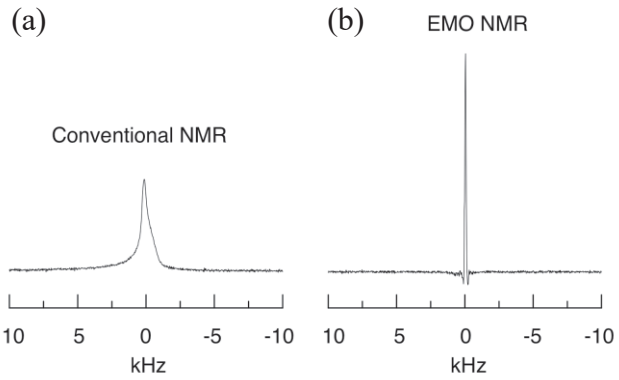


Fig. 4. (a) Conventional NMR spectrum and (b) EMO NMR spectrum of ^{1}H in copper sulfate solution.

Fig. 5に、EMO NMRによって得られた^{1}Hのスピンエコー信号を示す。ここで(a)と(b)はそれぞれ、ピエゾ素子を用いて凹面ミラーの位置を操作して光共振器長を共振条件より赤色側に離調した時、及び、青色側に離調した時に得られた信号である。位相の反転は、薄膜の位置の変化に対する光共振器の応答の正負を反映しており、構築したEMO NMRシステムが意図した通りコヒーレントにラジオ波信号を光に変換していることを示している。

■応答関数の評価

このシステムでNMR信号の代わりにラジオ波パルスを20 ms間入力して、光変換された応答信号を得た（Fig. 6）。このデータから、薄膜の応答関数が時定数$T_m = 3.0$ msで減衰する指数関数で表されることが分かった。ここから得られる薄膜の振動のQ値は$Q = (T_m\ \omega_m)/2 = 4100$となり、薄膜の振動スペクトルから得られたQ値（4000）と一致した。

4. まとめ・展望

EMO NMRにより、薄膜の帯域範囲内においては従来の電気的なNMR検出法を上回る感度を達成できることが分かった。EMO NMRシステムのデザインにはまだ改善の余地があるため、さらに感度を向上できる可能性がある。また、従来法に比べてカバーできる周波数の範囲が限られているため、周波数を固定して磁場を幅広く掃引するNMR分析[2-3]に威力を発揮することが期待できる。

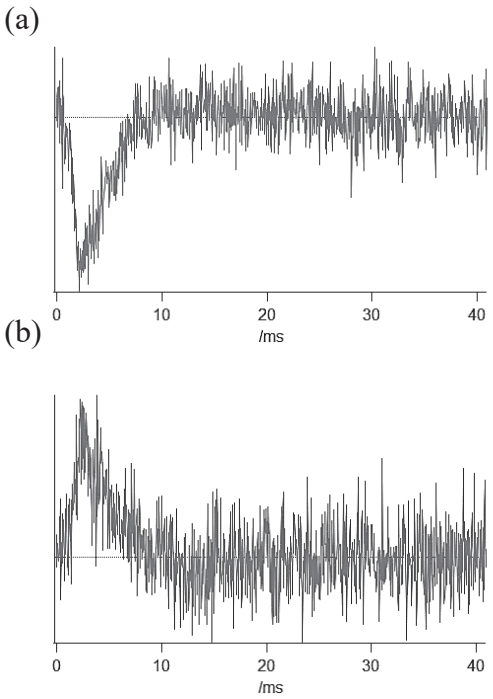


Fig. 5. EMO NMR echo-signals.
(a) The case where cavity length is shifted to red side from the resonance condition.
(b) The case where cavity length is shifted to blue side from the resonance condition.

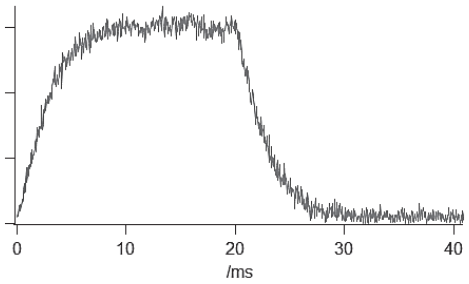


Fig. 6. The response of the EMO NMR system to an input radio-frequency pulse for 20 ms.

謝辞 本研究は、JST先端計測分析技術・機器開発プログラムの支援を受けて行われた。

References

[1] K. Takeda, K. Nagasaka, A. Noguchi, R. Yamazaki, Y. Nakamura, E. Iwase, J. M. Taylor, K. Usami, "Electro-mechano-optical NMR detection", arXiv: 1706.00532 [quant-ph] (2017).

[2] K. Takeda, N. Ichijo, Y. Noda, K. Takegoshi, "Elemental analysis by NMR", J. Magn. Reson. 224, 48 (2012).

[3] K. Yamada, K. Kitagawa, M. Takahashi, "Field-swept ^{33}S NMR study of elemental sulfur", Chem. Phys. Lett. 618, 20 (2015).

P95

TD-NMRによる冷凍野菜の障壁の評価

○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.

The food quality falls due to freezes and thaw. This phenomenon is due to damage of cells in the food formed by generation of freezing ice crystal when freezing. The influence conspicuously shown on vegetables because they have cell walls. It's possible to monitor the degree of perishing and the cause of the food in these freezes and thaw process by observing the difference in the motility of the water in the cell wall by observing the motility of the water and the spread state using pulse NMR.

【序論】

食品は，凍結，解凍よって品質の低下が起こることが知られている．これは凍結時の氷結晶の生成によって細胞がダメージを受けることにより生じる．特に細胞壁を持つ野菜ではその影響が顕著に表れる．パルス NMR をもちいて水の運動性，拡散状態を観測することで細胞壁内での水の運動性の違いを観測することでこの凍結，解凍プロセスにおける食品の品質低下の度合い，原因をモニターすることが可能である．

【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。パルス NMR 装置に磁場勾配ユニットを取り付けることで拡散係数を求めることが可能である．下部のパルス系列を用いることで水の拡散係数を求めた．下図のように，自由に拡散できる状態では水の拡散係数は磁場勾配パルス間隔に対して一定であるが，細胞壁など，運動が制限された状態では拡散係数は減少して観測される．

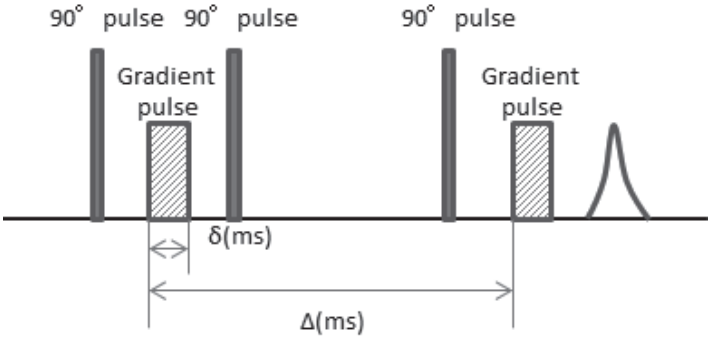


Fig.1 Pulse sequence of stimulated pulse field gradient (PFG)

パルス NMR，**拡散係数**，**食品**

○はら　ひでゆき

Fig.2 Difference of diffusion behavior of restricted and free diffusion (left) and these model (right)

【結果および考察】

3 種類の野菜（にんじん，じゃがいも，たまねぎ）に関して各野菜中の水の拡散係数を求めた．試料は冷蔵庫保存したもの（fresh)および冷凍庫(-15℃）で 2 日間保存し，冷蔵庫で解凍した試料(freeze thawed)を約 5mm 角に裁断し，5℃で測定を行った．運動の制限されていない水の拡散係数を 1 としたときの拡散係数の比をグラフに示した．値が小さくなるほど拡散が制限されていることをしめす．それぞれ，フレッシュの野菜では拡散係数が低く，細胞壁によって水の拡散が制限されていることが示された．特ににんじんでは拡散係数が小さく，冷凍によって細胞壁の損傷が大きいと思われる．

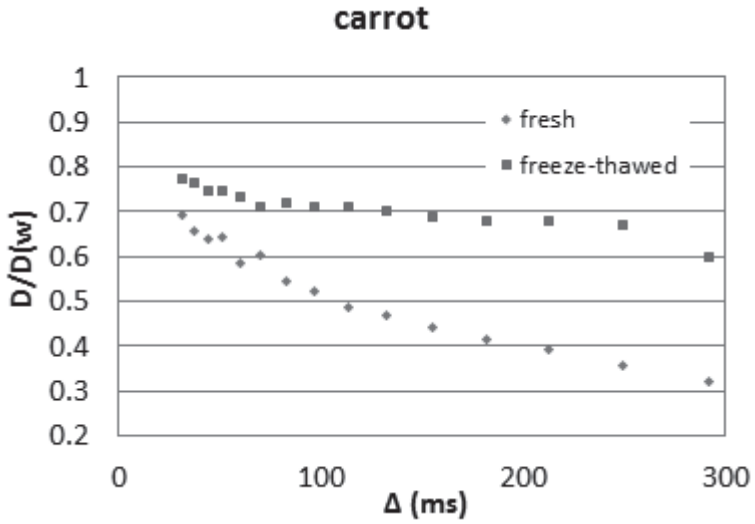


Fig.3 Ratio of Diffusion coefficient in fresh and freeze-thawed carrot

P96

光検出磁気共鳴に基づく超解像イメージング技術

○寺田大紀[1]，外間進悟[2]，五十嵐龍治[1]，原田慶恵[3]　白川昌宏[1]
[1]京都大学大学院　工学研究科
[2]中央研究院原子分子科学研究所
[3]大阪大学大学院　理学研究所

Super-resolution imaging based on optically detected magnetic resonance

○Daiki Terada[1], Shingo Sotoma[1], Ryuji Igarashi[1], Yoshie Harada, Masahiro Shirakawa[1]
[1] Graduate School of Engineering, Kyoto University
[2] Institute of Atomic and Molecular Science, Academia Sinica
[3] Graduate School of Science, Osaka University

Recent development of super-resolution imaging techniques have enabled super-resolution imaging even for a few seconds. However, fluorescent probes such as fluorescent dye and green fluorescent protein used for super-resolution imaging suffer from the need for precise control of the maximum density of fluorophores and the photostability with photobleaching and photoblinking. Then, we payed attention to a color center called nitrogen-vacancy center (NVC) in a nanodiamond to have the excellent photostability and bright with more than 1.5×10^6 photons observed per emitter per second. Here, we report that we applied a 5 nm nanodiamond for super-resolution imaging through optically detected magnetic resonance (ODMR).

光学顕微鏡の分解能は、光の回折限界により近接する輝点をきりわけられないため、可視光を用いた場合約200 nmが限界されてきた。しかしながら、細胞内のタンパク質等の生体分子はほとんどが10 nm以下であり、その分解能限界は生体試料において無視できないほど大きい。そのため、従来の光学顕微鏡の分解能である光の回折限界を超える「超解像イメージング技術」が数々開発されてきた。

その先駆けとなったのが蛍光分子局在化法（PALM）と総称される手法であり、この手法が超解像イメージング技術の発展の火付け役となった。その手法は微弱な紫外光照射により一部の蛍光プローブを確率的にオンにすることで、その蛍光プローブの位置を高精度にわりだし画像化する手法である。蛍光プローブを特定した何千枚、何万枚の画像を再構築することで高分解能な画像が得られる。しかし、多数の蛍光プローブを膨大な画像により位置を特定しなければならいため、高分解能な画像が得られるまでに数分～数十分要する。そのため、生体試料を生きたまま、動態を観察するのに適していない。そこで、これまでに時間分解能向上のため、構造化証明法（SIM）、誘導放出制御法（STED）言われる手法され、～

Diamond、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、はらだよしえ、しらかわまさひろ

50 nmの分解能で数秒の撮影時間で画像化が可能になってきた。

しかしながら、生体試料を生きたまま観察するためにはその他の解決すべき問題がある。一つは、高密度の蛍光プローブを標識することの必要性である。というのも、高分解能に画像取得することは、拡大画像を取得することに等しい。つまり、二倍の拡大画像を得ようとすると、1ピクセル当たりの信号強度は1/4となる。そのため、蛍光プローブの局在化が必要とされる。また、信号強度を上げようとすると、必然的に強い励起光強度を必要とされるが、ここでは蛍光プローブの褪色という避けられない問題がある。

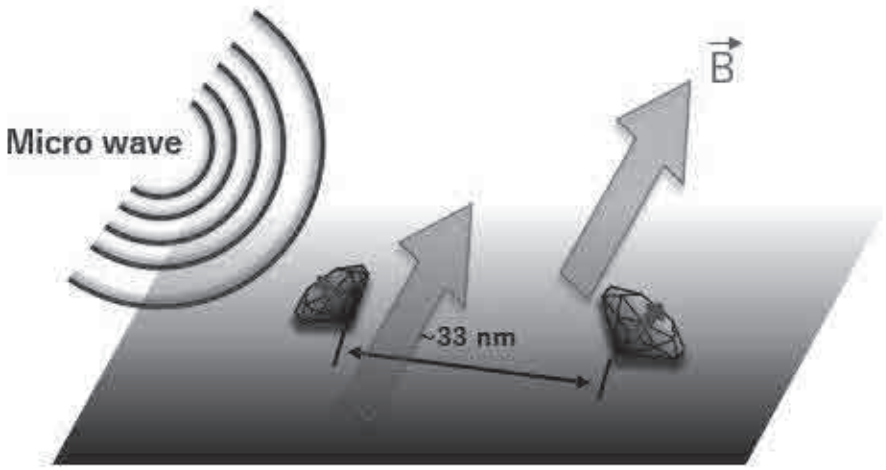


Figure.1: Schematic of simultaneous super-high-resolution.

そこで、これらの問題を改善するプローブとして窒素-空孔中心（NVC）と呼ばれる色中心を有するナノダイヤモンドに注目した。NVCは褪色・明滅をしない蛍光を発し、１つのNVCで一秒間に1.5×10^6の光子を放出する[1]。つまり、従来の蛍光プローブにない高い光学安定性をもつ、高密度な蛍光エミッターとなる可能性を秘めている。また、NVCは電子スピン共鳴（ESR）活性を有するため、光検出磁気共鳴（ODMR）により電子スピン状態を検出することができる。そのNVCに磁場を印加した場合、NVCの軸と磁場の角度によりNVCは、特定のマイクロ波の吸収を示す。その特性および、画像化するアルゴリズムを使用すれば光の回折限界内にあるナノダイヤモンドをきりわけることが可能である。

そこで、本研究では、5 nmのナノダイヤモンドを用いて超解像イメージングの技術に応用した（Figure.1）。加えてナノダイヤモンドの表面修飾によるNVCへの影響、そして、NVCに隣接したC^{13}との超微細構造相互作用による超解像イメージングについての報告を行う。

Reference

1. Chen, E. H., Gaathon, O., Trusheim, M. E. & Englund, D. Wide-Field Multispectral Super-Resolution Imaging Using Spin- Dependent Fluorescence in Nanodiamonds. 1–13 (2013).

P97

The indirect detection of ^{10}B (I = 3) overtone NMR at very fast Magic Angle Spinning

Nghia Tuan Duong[1], Ilya Kuprov[2], and Yusuke Nishiyama[1,3]

[1] *RIKEN CLST-JEOL Collaboration center, RIKEN, Yokohama, Kanagawa 230-0045, Japan*

[2] *Department of Chemistry, University of Southampton, SO17 1BJ, Southampton, United Kingdom*

[3] *JEOL RESONANCE Inc., Musashino, Akishima, Tokyo 196-8558, Japan*

According to the selection rules in Nuclear Magnetic Resonance (NMR), only transition between two adjacent energy levels is allowed. In other words, when the magnetic moment number m of these energy levels is differed by one unit (i.e. $|\Delta m| = 1$), the transition can take place. The frequency of this transition is defined as the fundamental frequency (ω_0). On the other hand, different from fundamental transition, transitions with $|\Delta m| \neq 1$ are forbidden at the first order and not easily acquired in NMR experiments. However, for integer spin nuclei (spin number I is an integer), $|\Delta m| = 2$ transitions possess a major advantage as they are immune to the first-order quadrupolar interaction, thus resulting in narrow NMR signals. Such advantage motivates the acquisition of $|\Delta m| = 2$ transitions. Two different approaches were proposed. One is the double quantum (DQ) NMR and the other is known as the overtone (OT) NMR spectroscopy. There is a significant difference between the two. While for DQ NMR, the excitation of this transition is performed by the radio frequency at ω_0 and the detection is at $2\omega_0$; for OT NMR, both the excitation and detection of this transition are carried out at $2\omega_0$. Different from DQ NMR which is only observed in the indirect dimension, this enables the OT NMR to be *directly acquired*.

The indirect and direct detection of OT NMR and indirect detection of DQ NMR were experimentally verified on ^{14}N (I = 1) nucleus [1,2]. Recent study has demonstrated the proton-detected heteronuclear multi-quantum coherence (HMQC) experiments at very fast Magic Angle Spinning (MAS) significantly facilitated the indirect OT and DQ ^{14}N (I=1) NMR observation [3]. In this study, we further examine the feasibility of OT NMR on another integer quadrupolar nucleus, namely ^{10}B (I=3). However, this is not straightforward owing to the unfavorable properties of ^{10}B nucleus. Firstly, ^{10}B nucleus has a spin number I = 3, leading to numerous energy levels under the Zeeman interaction with the external magnetic field B^o. As shown in Figure 1, there are also different transitions with $|\Delta m| = 2$, interfering the OT NMR detection. Secondly, ^{10}B nucleus has low Larmor frequency, which is one-tenth that of proton nucleus, resulting in low sensitivity. Thirdly, the natural abundance of ^{10}B nucleus is low, approximately 20%. Finally, ^{10}B nucleus possesses large electric quadrupolar moment, which is more than two times that of ^{11}B nucleus.

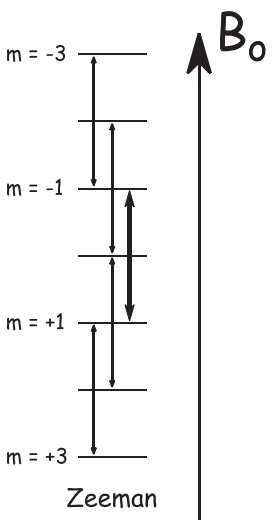


Figure 1. Energy levels ^{10}B nucleus under the Zeeman interaction. Besides OT, there are transitions with $|\Delta m| = 2$

Overtone NMR spectroscopy; Proton-detected HMQC at fast MAS; Integer quadrupolar nucleus ^{10}B (I = 3)

Hence, to overcome the aforementioned difficulties of ^{10}B nucleus, the selection of sample is essential. Perborate monohydrate ($Na_2B_2O_4(OH)_4$) is chosen as the studying sample because (i) it only consists of tetra-coordinated boron, having small quadrupolar product (P_Q). It is worth noting that there is a compromise since too large or too small P_Q, the OT NMR is not feasible. In addition, (ii) surrounding these boron nuclei, there are dense protons networks, ensuring the source of abundant magnetization. Here, for the first time, we present the heteronuclear correlation of $^{10}B^{ot}$ with ^{1}Hs on the perborate monohydrate sample, as shown in Figure 2.

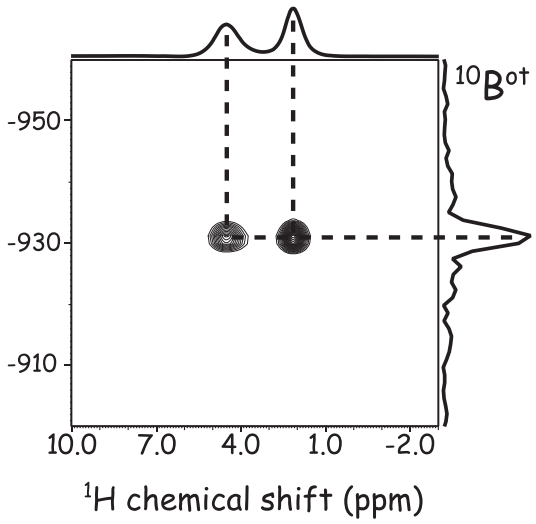


Figure 2. The two-dimensional $^{10}B^{ot}$ – ^{1}H HMQC experiment acquired at very fast MAS of 70 kHz.

Experiments are further performed at different conditions for sensitivity optimization, namely the indirect offset of $^{10}B^{ot}$ is set at different OT spinning sideband. The experimental results are demonstrated in Figure 3a, which is in good agreement with the numerical simulation displayed in Figure 3b. Both the experiment and simulation show that the optimal experimental efficiency is achieved when the radio frequency field is applied at the second OT spinning sideband.

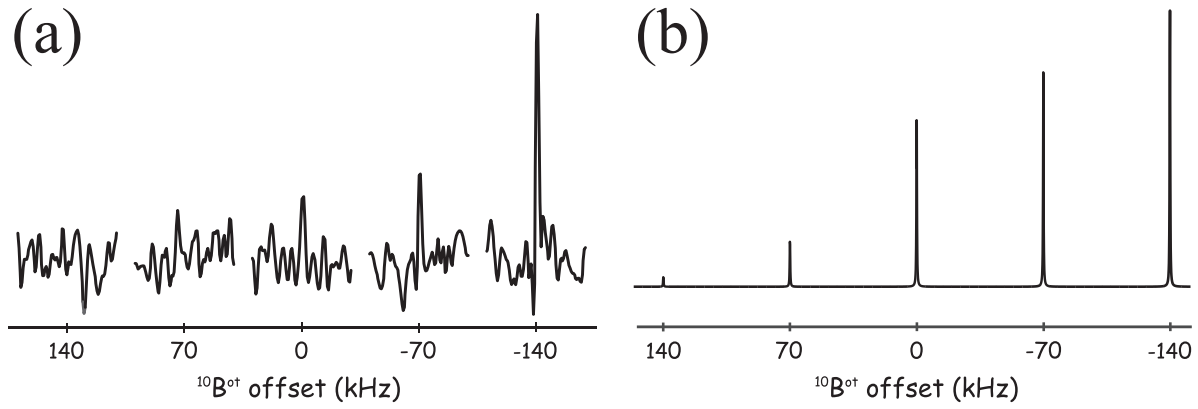


Figure 3. (a) The experimental results for the $^{10}B^{ot}$ signals at different OT spinning sidebands. (b) The numerical simulation is performed at the similar conditions as the experiments.

REFERENCES

1. Tycko, R.; Opella, S. J. Overtone NMR spectroscopy. *J. Chem. Phys.* **1987**, *86*, 1761-1774.
2. O'Dell, L. A.; Ratcliffe, C. I. ^{14}N magic angle spinning overtone NMR spectra. *Chem. Phys. Lett.* **2011**, *514*, 168–173.
3. Nishiyama, Y.; Malon, M.; Gan, Z.; Endo, Y.; Nemoto, T. Proton-nitrogen-14 overtone two-dimensional correlation NMR spectroscopy of solid-sample at very fast magic angle sample spinning. *J. Magn. Reson.* **2013**, *230*, 160–164.

キーワード検索
著者検索

Keyword Index
Author Index

キーワード検索

数字・記号

$^{1\text{-}3}J$(Se, H, C) and 3D structure …… L5-3
^{129}Xe NMR …… P43
^{13}C CP/MAS NMR …… P64
^{13}C direct detection …… P10
^{15}N-^{1}H spin-spin coupling …… P10
19F NMR …… P15
^{19}F-NMR …… P87
^{1}H NMR …… P48
2D ^{1}H-^{13}C HMBC …… P05
^{2}H NMR …… P46, P73
^{2}H-NMR …… P65
^{77}Se-selective HR-HMBC …… L5-3
α_{2A}-アドレナリン受容体 …… P26
β-sheet formation …… P24

アルファベット

A

algorithm …… P90
application …… HL1

B

backbone resonance assignment …… P80
Biomass polymer …… P61
bioreactor system …… P80

C

Ca NMR …… P67
Cathepsin D …… P84
chloroethylene …… P50
chromosome and genome structure …… IL4
constant-time acquisition …… L1-2
CP …… L6-7
CP-VC …… P74
CPMG …… P06
Cross linked structure …… L3-1
cross polarization …… P10
CSA …… L1-5
Curing process …… P61

D

Diamond …… P96
DIRECTION …… P01
Dissolution-DNP …… L4-2
DNP効率 …… P86
DQMAS …… L1-2, P68
Dynamic Nuclear Polarization …… IL2, P86
Dynamic Nuclear Polarization (DNP) …… IL1, L3-2
Dynamics …… SL3
D級アンプ …… P83

E

eIF …… P19
electroporation …… P80
Eukaryotic cell …… SL2
EVOH …… P48

F

Fast MAS …… L1-2
Fish …… P39

G

guanine-nucleotide binding protein …… L6-1
Gタンパク質共役型受容体 …… P26

H

H2A-H2B …… P33
High-Field Condition …… L3-2
History of isotopes in biomolecular NMR …… SL1
homonuclear correlation …… L1-2
Hyperpolarization …… L4-2

I

In-cell NMR …… L6-4, P78, P80
in-cell NMR …… P79, P81, P82, P84
in-situ 光照射固体NMR …… P58
Integer quadrupolar nucleus ^{10}B(I=3) …… P97
intron …… P16
Isotope-aided NMR method …… SL6

J

J-resolved COSY …… P02
J結合定数 …… L1-4

K

Keap1-Nrf2経路 …… P23

L

Labeling strategies …… SL1
LaIT2 …… P38
laminate …… L2-5
LIMSデータ管理 …… P89
Lithium …… L2-5
lncRNA …… P35
long non-coding RNA …… L6-5

M

Machine learning …… P39
machine learning …… P90
Magic-Angle Spinning NMR …… L3-2
Magic-Angle Turning …… P93
materials science …… IL1
MDEC-J-resolved COSY …… P02
MDEC(multi-frequency-homo-decoupling) …… P02
Membrane Proteins …… IL2
Metabolomics …… P39
methyl group …… L6-1
micro-tube, symmetric geometry …… HL1
MOF …… P66
Molecular chaperones …… IL3
molecular complexity …… P90
MRI …… L2-5

multi-domain proteins …… P79
multiple quantum transition …… L6-1
N
NCS analysis …… L1-5
Nitrogen-vacancy center …… P96
NMR …… P42
NMR Diffusometry …… P52
NMRバイオリアクター …… P81
NOESY …… P54
non-coding RNA …… P16
O
Olefin metathesis …… L1-5
Oligosaccharide …… SL2
Optically detected magnetic resonance …… P96
Orf7.5 …… L6-3
Organosulfur compounds …… L3-1
Overtone NMR spectroscopy …… P97
P
paramagnetic NMR …… P79
PGSE-NMR …… P54
pHパルスラベル …… P32
Pin1 …… P21
PMMA …… P43
PMP …… P76
Pradimicin A …… P59
PRE …… L6-6, P08
pre-initiation complex …… P19
protein aggregation …… IL3
protein homeostasis …… IL3
Protein NMR …… SL6
Proton-detected HMQC at fast MAS …… P97
pseudo-contact shift …… P13
Pseudocontact shift …… P28
Q
qNMR …… P04, P50
qNMR/クロマトグラフィー …… P04
R
RFDR …… L1-6
Rheo-NMR …… P17
Rhodopsin …… L4-1
RNA結合タンパク質 …… P12
RNA結合タンパク質 …… P36
rubber …… L3-1
S
SAIL method …… SL6
SAIL法 …… SL4
sample preparation …… P50
secondary structure …… P16
SEDOR …… P85
Seleno-carbohydrates …… L5-3
Sensitivity Enhancement …… L3-2
single cell Hi-C …… IL4
single molecule super resolution imaging …… IL4
Small heat shock protein …… L6-3
Small volume handling …… HL1
SOD1 …… P17
Sodium ion pump …… L4-1
Software for automation …… SL1
solid-state NMR …… IL1
Solid-state NMR …… IL2, L4-1
Spider silk …… P24
Spinophilin …… P26
Stable isotope labeling …… SL2, SL3
Stable isotopes …… SL1
Sulfur NMR …… L3-1
SWIFT画像法 …… L2-6
Synechococcus elongatus PCC 7942 …… L6-3
T
T_2コントラスト …… L2-6
T4リゾチーム …… P08
tau …… P44
Transcriptional regulator …… SL3
translation …… P19
Triplet-DNP …… L4-2
U
unfolded protein …… P24
V
Variable temperature measurement …… P61
vinculin …… P37
W
WaveMaker …… P05
X
Xe …… P49, P76
Xe-129 …… P91

五十音順

あ
藍色細菌 …… P36
アゾベンゼン …… L6-2
圧縮センシング …… L1-1
アミノ酸選択的安定同位体標識法 …… P78
アミロイド …… P09
アミロイド線維形成 …… P17
アラニン選択標識 …… SL5
い
イオン液体 …… P51
イミダゾール …… P73
え
液晶分子 …… P75
エリ蚕絹繊維 …… P64
お
オーバーハウザー効果 …… L5-1

遅い化学交換……P41
オプトメカニクス……P94
オフレゾナンス効果……P06
温度可変NMR……P70
か
外部配位子識別機構……P14
化学結合……P72
化学シフト……P55
化学シフト値計算……P58
核酸……P82
拡散係数……P95
核四極共鳴……P83
角層……L1-6
角度相関……P85
ガス圧NMR……P08
過渡的中間体……P32
ガラス……P68
ガラスマトリックス……P57
緩和時間……L5-2
緩和分散……P06
き
気体拡散係数……P49
気体分離膜……P76
キナーゼ……P27
吸着式ヒートポンプ……P65
共結晶……L3-3
凝集構造……P43
極限状況下測定……P93
く
グアニン四重鎖……P82
クモ糸……L1-3
クライオコイルMASプローブ……P67
け
計算科学……P88
欠陥拡散モデル……P47
結晶構造解析……P77
結晶多形……P74
血清……P25
原子間距離……P74
こ
高圧力NMR……L2-7
高圧力NMR法……P18
高エネルギー状態……P18
高温DNP……P57
高温超電導磁石……L5-4
高感度化……P91
抗菌活性……P38
抗菌ペプチド……P41
交差緩和……P51
構造解析……P18
構造計算アルゴリズム……P13
構造遷移……L5-5
構造相関NMR……L6-2
構造訂正……L2-2
構造変換……L2-3
酵素補充療法……P84
抗体……P25
高分子電解質……P47
高分子膜……P48
高分子量タンパク質……P22
高分子量蛋白質……SL4
酵母発現系……P22
互変異性体……P21
固体NMR……L1-1, L1-3, L1-4, L1-6, P56, P59, P60, P62, P71, P77
固体高分解能NMR……P93
固体プロトン伝導体……P73
ゴム状高分子……P49
混合物解析……P69
混合物解析システム……P89
昆虫細胞発現系……SL5
昆虫特異的毒素……P38
コンホメーション……P74
さ
細胞生物学……L2-8
細胞の健全性……P81
酸化ストレス応答……P23
三重項電子……P66
残余双極子相互作用……L2-1
し
塩……L3-3
シグナル伝達……P27
自己組織化……P62
自動解析……L2-4
磁場勾配NMR……P53
磁場配向NMR……L2-1
シミュレーション……P86
シャペロン……L6-6
重原子……P55
周波数選択……L6-7
常磁性NMR……P13
食品……P95
シンジオタクチックポリスチレン……P77
深層学習……L2-4, P87
す
水素結合……L3-3, P63
水素結合ネットワーク……P21
水和……P71
スクリーニング……P15
ストレス応答……P27
スピン拡散……P01
スピン間距離……P51

スピン分極……P55
せ
静電的相互作用……L5-2
セメント……P71
セルロース……P45
選択励起パルス……P05
そ
相互作用……P25
送信……P83
た
代謝物……P88
大腸菌……L6-4
ダイナミクス……P70
卓上NMR……P89
卓上型NMR……L5-4
多次元測定……L1-1
多糖誘導体……P45
タンパク－タンパク相互作用……P34
タンパク質－RNA相互作用……L5-5
タンパク質-RNA複合体……P12
タンパク質凝集体……P44
蛋白質の構造形成……P32
タンパク複合体……P34
ち
超高磁場NMR装置……SL4
超偏極……P03, P56, P91
て
低温ストレス……P36
定量固体NMR……P72
データベース……L2-2
電子スピン……L2-8
天然変性……P34
天然変性タンパク質……P44
天然変性領域（IDR）……P30
と
統合解析……P69
統合的アンサンブル構造解析……P30
動的核分極（DNP）……P56, P57
動的核偏極……P66, P92
動的構造……P20
動的構造変化……P29
動的平衡……P28
ドメインダイナミクス……P30
な
ナノディスク……SL5
ナフィオン……P47
に
二重共鳴NQR……P85
ぬ
ヌクレオソーム……P33
の
濃度測定……P04
は
バイオマス……P69
バイオミネラリゼーション……P31
配向剤……L2-1
ハイドライドイオン……P70
薄膜振動子……P94
パラ水素……P03
バルク磁石……L5-4
パルスNMR……P95
半導体ナノ粒子……P72
反応……L2-3
ひ
光検出……L2-8, P94
光励起三重項状態……P92
非コードRNA……L5-5
ヒスチジン……P60
非線形帯磁率……L5-1
ヒト脳組織……L2-6
ふ
フォールディング……L6-2
符号化標識法……P78
ブタノール……P46
フッ素－黒鉛層間化合物……L1-4
フラーレン……L5-2
フラッシュランプ……P92
プロトン伝導……P63
プロリン異性化酵素……P21
分子間精密構造……P64
分子間相互作用……P59
糞便……P40
へ
ヘテロクロマチン……P29
ペプチド……P60, P62
ペプチドアプタマー……P31
ヘム電子構造……P14
ほ
ポリアラニン……L1-3
ポリペプチド……P74
ま
マイクロ波加熱……P75
マイクロ波照射NMR……P75
マルチドメインタンパク質……L6-6, P07, P11, P28, P35, P37
み
ミオグロビン……P14
水分子ダイナミクス……P52, P53
密度行列……L5-1
む
無機固体酸塩……P63

め
メタボロミクス……P40, P42
メチル基選択的^{13}C標識 ……P22
も
木材……P53
モデリング……P12
モノマー組成……P45
や
薬剤相互作用……P15
ゆ
誘電分光法……P52
ユビキチン……P20
よ
溶液NMR …… P03, P07, P11, P35, P37
溶液構造……P41
溶液混合…… L2-3
り
リグニン……P46
リチウムイオン二次電池 ……P54
立体化学…… L2-2, P88
リン酸化……P29
リン酸化ユビキチン …… L2-7
る
ルーメン……P42
れ
レアアース……P31
レオロジーNMR ……P09
レチナール……P58

著者検索

アルファベット

A

Abdullah Al Mahin …… P41
Aida Takuzo …… L2-1
Aihara Yuichi …… L2-5
Aizawa Tomoyasu …… P40, P42
Aizu Takahiro …… P37
Amemori Shogo …… P73
Andersen Richard …… L1-5
Ando Hiromune …… L5-3
Aoshima Yu …… L2-7
Aoyama Tsuyoshi …… P52
Arai Souichirou …… P79
Arimura Yasuhiro …… P33
Asakura Taiga …… P39
Asakura Tetsuo …… L1-3, P64
Asano Katsura …… P19
Ayabe Tokiyosh …… P40

B

Banik Manas …… L3-3
Basu Srinjan …… IL4
Batsaikhan Mijiddorj …… P62
Baxter Nichola …… P18
Boucher Wayne …… IL4
Burmann B. M. …… IL3

C

Cao Yang …… IL4
Carninci Piero …… L6-5
Chikayama Eisuke …… P88, P89
Christopher Gordon …… L1-5
Colaux Henri …… L1-2
CopéRet Christophe …… L1-5

D

Daichi Morimoto …… L6-7
Date Yasuhiro …… P39, P88, P90
Demura Makoto …… P40, P42
Desiraju Gautam R. …… L3-3

E

Ebina Yasuo …… L2-1
Eisenstein Odile …… L1-5

F

Fiujiwara Toshimichi …… L3-2
Fujii Moe …… P22
Fujii Yutaka …… L5-1
Fujiki Satoshi …… L2-5
Fujinami Daisuke …… P41
Fujisaku Takahiro …… L2-8, P03
Fujishiro Hiroyuki …… L5-4
Fujito Teruaki …… P75
Fujiwara Saiya …… P66
Fujiwara Toshimichi …… L1-1, L2-4, L6-4, P15, P56, P57, P86
Fukazawa Jun …… P56, P86
Fukizaki Minoru …… P53
Fukui Shigeo …… L3-2
Fukuma Naoki …… P42
Fukuzaki Minoru …… P52
Furihata Kazuo …… P02
Furukawa Ayako …… P29
Fuwa Hiroki …… P73

G

Garwood Michael …… L2-6
Genjo Takuya …… L2-8
Gerez J. A. …… IL3
Glaubitz Clemens …… IL2
Güntert Peter …… L2-4

H

Hagiwara Rika …… L1-4
Haishi Tomoyuki …… L2-5
Hamad Nesreen …… L5-5
Hanzawa Hiroyuki …… P15, P87
Hara Hideyuki …… P95
Harada Yoshie …… P96
Hashikawa Yoshifumi …… L5-2
Hashimoto Yasuhiro …… P54
Hata Koichiro …… P65
Hatanaka Minoru …… L1-6
Hatanaka Takaaki …… P31
Hattori Mineyuki …… P91
Hattori Yoshikazu …… L2-4
Hayakawa Yoshio …… P61
Hayashi Fumiaki …… P31
Hayashi Hidenori …… L6-3, P36
Hayashi Shigenobu …… P63
He L. …… IL3
Hemmi Hikaru …… P14
Hendrich Brian …… IL4
Hibe Yuta …… P85
Higuchi Kae …… P78
Hiller S. …… IL3
Hiraga Takashi …… P91
Hiramatsu Soya …… P28
Hirao Yuuka …… P01
Hiroshige Reina …… P60
Hori Yuki …… P53
Horiike Noriko …… P54
Hosoda Kazuo …… P26
Hosoyamada Masanori …… P66
Hsu Shan-Te Danny …… P30
Huang Jie-Rong …… P30

I
Ichijo Naoki ····· P92
Ichimura Katsuya ····· P84
Ida Tomonori ····· P73
Idehara Toshitaka ····· L3-2
Ideta Keiko ····· P65
Iga Junki ····· L2-7
Igarashi Ryuji ····· L2-8, P96
Ihara Toshihide ····· P04, P50
Ikegami Takahisa ····· P03, P06
Ikegami Takeshi ····· P91
Ikeguchi Mitsunori ····· P33
Ikeya Teppei ····· L2-7, P13, P18, P79, P80
Ilya Kuprov ····· P97
Imae Yasufumi ····· P69
Imai Takao ····· P12
Inamura Yuga ····· P40, P42
Inomata Kohsuke ····· P78, P79, P81
Inoue Jin ····· P23, P79
Inoue Keiichi ····· L4-1
Inouye Masayori ····· L6-4
Ishida Nobuhiro ····· P31
Ishida Yasuhiro ····· L2-1
Ishikawa Natsuko ····· L6-3
Ishimori Koichiro ····· L6-6, P28
Iso Tatsuro ····· P23
Ito Kengo ····· P88, P89
Ito Mika ····· P77
Ito Shota ····· L4-1
Ito Yutaka ··· L6-4, P07, P13, P35, P37, P79, P80, P81
Itoh Yoshitaka ····· L5-4
Iwakawa Naoto ····· P09, P17
Iwaoka Ryo ····· P12
J
Jimura Keiko ····· P63
Joseph Summy ····· L3-3
Juishi Hironori ····· P38
K
Kagawa Akinori ····· L4-2, P92
Kainosho Masatsune ····· SL4, SL6
Kalodimos Charalampos ····· L6-6
Kameda Tomoshi ····· P08, P18
Kametani Shunsuke ····· L1-3
Kamikubo Hironari ····· P10
Kamo Naoki ····· P58
Kamoshida Hajime ····· P79～P81
Kanaba Teppei ····· P05, P07
Kanayama Kozo ····· P61
Kanda Taiji ····· L3-2
Kanda Takefumi ····· P93
Kandori Hideki ····· L4-1
Kanehashi Koji ····· P68, P71
Kaneko Rina ····· L4-1
Kano Fumi ····· P82
Kano Hanho ····· L6-1
Kasai Takuma ····· P78, P79
Katahira Masato ····· L5-5, P12, P82
Katayama Yasushi ····· L1-6
Kato Koichi ····· P25, SL2
Kawagoe Soichiro ····· L6-6
Kawaguchi Tsubasa ····· P52, P53
Kawai Gota ····· P16
Kawamata Yuki ····· P46
Kawamura Izuru ····· L4-1, P58, P60, P62, P75
Kawasaki Ryosuke ····· P30
Khaled M Elsayed ····· P41
Kidou Akihiro ····· P07
Kigawa Takanori ····· P78, P79, P81
Kikuchi Jun ····· P39, P69, P88, P89, P90
Kikukawa Takashi ····· P40, P42
Kil Hyun-Sig ····· P65
Kimizuka Nobuo ····· P66
Kimura Hideaki ····· P74
Kimura Ken-Ichi ····· L2-2
Kita Rio ····· P52, P53
Kitada Naoya ····· P40, P42
Kitagawa Masahiro ····· L4-2, P92
Kitahara Ryo ····· L2-7, P08, P18
Kitazawa Soichiro ····· L2-7, P18
Kiyoishi Ayaka ····· P82
Kiyosawa Hidenori ····· P16
Klenerman Dave ····· IL4
Kobashigwa Yoshihiro ····· P15
Kobayashi Ayaho ····· P35
Kobayashi Genki ····· P70
Kobayashi Naoharu ····· L2-6
Kobayashi Naohiro ····· L2-4, P12
Kobayashi Takeshi ····· IL1
Kobayashi Yasuo ····· P42
Kohda Daisuke ····· P41
Koichi Shungo ····· L2-2
Koike Satoshi ····· P42
Kojima Chojiro ····· L2-4, L6-4, P15
Kono Hiroyuki ····· P45
Koshiba Seizo ····· P23
Koshino Hiroyuki ····· L2-2
Koyama Yoshihito ····· P46
Kudou Takumi ····· P07
Kumagai Hiromu ····· P46
Kumaki Yasuhiro ····· P40, P42
Kumeta Hiroyuki ····· L6-6, P28, P40, P42
Kurihara Takuya ····· P70, P72

Kurima Akihiro ····· P54
Kurisawa Naoaki ····· L2-2
Kurita Junichi ····· P01, P29, P33
Kurokawa Riki ····· L5-5
Kurotani Atsushi ····· P89
Kurumizaka Hitoshi ····· P33
Kuwahara ····· P51
Kuwahara Daisuke ····· P55

L

Lando David ····· IL4
Laue Ernest D. ····· IL4
Lee Steven F. ····· IL4
Lee Yun-Tzai Cloud ····· P30
Liao Wei-Chih ····· L1-5

M

Makino Yoshiteru ····· P58, P75
Markley John L. ····· SL1
Masaki Mishima ····· P11
Mase Yoko ····· L6-1
Mashima Tsukasa ····· L5-5
Masuda Haruchika ····· P52
Masuda Takao ····· P46
Matsugami Akimasa ····· P31
Matsuki Yoh ····· L3-2, P56, P57, P86
Matsumoto Kana ····· P44
Matsumoto Kazuhiko ····· L1-4
Matsunaga Tatsuya ····· P93
Matsuo Yoshiaki ····· L1-4
Matsuo Yuta ····· P60
Matsushita Haruka ····· P48
Mijiddorj Batsaikhan ····· P60
Mikawa Tsutomu ····· P13
Miki Tsunehisa ····· P61
Mishima Masaki ····· P07, P35, P37, P79, P80
Mitsumori Fumiyuki ····· L2-6
Miyagawa Hisashi ····· P38
Miyagawa Toshifumi ····· P46
Miyake Masayuki ····· P82
Miyanoiri Yohei ····· SL4
Miyashiro Asami ····· P49
Miyashita Masahiro ····· P38
Miyashita Yumi ····· P26
Miyato Yuuji ····· P83
Miyawaki Jin ····· P65
Mizuno Motohiro ····· P73
Mizuno Takashi ····· P67
Mochida Tomoyuki ····· P51
Mogami Yuuki ····· P67
Mori Masaki ····· P22
Morimoto Daichi ····· P09, P17, P20, P84
Morita Hayato ····· L6-3, P36, P38
Moriwaki Yoshihito ····· P33
Mulder Frans A. A. ····· P10, P08
Murakami Miwa ····· L1-4
Muramatsu Aki ····· P23
Murata Masayuki ····· P82
Murata Michihisa ····· L5-2
Murata Yasujiro ····· L5-2
Murazumi Yuki ····· P42

N

Nagadoi Aritaka ····· P06
Nagai Kan ····· P35, P37
Nagao Jun-Ichi ····· P41
Nagasaka Kentaro ····· P94
Nagashima Toshio ····· L6-2
Nagata Takashi ····· L2-4, L5-5, P12, P19, P82
Naito Akira ····· P58, P62, P75
Naitou Tomoyuki ····· L5-4
Nakagawa Naoya ····· P55
Nakagawa Yu ····· P59
Nakamoto Hitoshi ····· L6-3
Nakamura Kiminori ····· P40
Nakamura Satoe ····· P04
Nakamura Shinji ····· L3-2
Nakamura Takashi ····· L5-4
Nakasaka Yuta ····· P46
Nakayama Junichi ····· P29
Needham Lisa-Maria ····· IL4
Negoro Makoto ····· L4-2, P92
Nemoto Takahiro ····· P67
Neya Saburo ····· P14
Nghia Tuan Duong ····· P97
Nishida Masakazu ····· P61
Nishiguchi Eriko ····· P43
Nishimura Akio ····· P64
Nishimura Chiaki ····· P32
Nishimura Ryu ····· P14
Nishimura Yoshifumi ····· P01, P29, P33, P34
Nishiyama Yusuke ····· L1-2, L3-3
Nishizaki Yuzo ····· P04
Noda Yasuto ····· P59, P70, P72
Nojiri Eri ····· P13
Nomura Yusuke ····· P76
Numata Keiji ····· P24
Numata Masahiko ····· P04

O

Obayashi Eiji ····· P19
Obuchi Yuka ····· P88
Ohki Izuru ····· L2-8, P03
Ohtomo Hideaki ····· P33
Ohyama Takako ····· L6-5
Oikawa Itaru ····· P70

Okada Mayu ····· P13
Okada Ryouei ····· P55
Okano Hideyuki ····· P12
Okitsu Takashi ····· L4-1, P58
Oktaviani Nur Alia ·····P10, P24
Okuda Masahiko ····· P34
Okuda Sanshiro ····· P08
Okuyama Chieko ····· L2-3
Omiya Nagayuki ····· L6-3
Onishi Yuki ····· P42
Ootagaki Yui ····· P83
Osawa Masanori ····· L6-1
Ozawa Shunsuke ····· L5-5
Ozawa Yumi ····· P62

P

Pandey Manoj Kumar ····· L3-3

R

Rajesh Sundaresan ····· P13
Rajput Lalit ····· L3-3
Raynaud Christophe ····· L1-5
Riek R. ····· IL3
Roumestand Christian····· P18
Rüdiger S. G.····· IL3

S

Sahara Naruhiko ····· P44
Saio Tomohide ····· L6-6, P28
Saito Naoki ····· P50
Saito Tetsuya····· P52
Sakakura Masayoshi ····· P22
Sakata Kenji ····· P90
Sakuraba Shun ····· P08
Sasaki Takayoshi ····· L2-1
Sato Hisako ····· P62
Sato Naoki ····· P36
Sato Takehiro ····· L1-3
Sato-Akaba Hideo····· P83
Satoh Hiroko ····· L2-2
Scheler Ulrich ····· P09
Shah Devina ····· IL4
Shibata Tomokazu ····· P14
Shigeta Arisu····· L4-1
Shimabukuro Junpei ····· L5-3
Shimada Ichio ····· L6-1, P27, SL3, SL5
Shimazaki Akiko ····· P26
Shimizu Kazumi ····· P28
Shimizu Tadashi ····· P67
Shimizu Yu ····· P40
Shimojo Hideaki ····· P29
Shinya Shoko ····· L2-4, P15
Shinyashiki Naoki ·····P52, P53
Shirakawa Masahiro ····· L2-8, L6-7, P03, P09, P17, P20, P84, P96
Shoji Akira····· P74
Sirigiri Jagadishwar ····· L3-2
Sonoki Yoshihiko ····· L1-6
Sonomoto Kenji ····· P41
Sotoma Shingo ····· L2-8, P96
Stevens Tim J. ····· IL4
Sudo Akino ····· P59
Sudo Seiichi ····· P53
Sudo Yuki ····· P58
Suematsu Hiroto ····· L2-3, L3-2
Suemoto Yusuke ····· P79
Sugahara Jun-Ichi ····· L1-3
Sugase Kenji ····· L6-7, P09, P17, P20, P84
Sugiki Toshihiko ····· L6-4
Sugimoto Naoki ····· P04
Sugishita Tomoaki ····· P56
Suzaki Kouhei ····· P83
Suzuki Akihiro ····· P14
Suzuki Rika ····· P22
Suzuki Takaaki ····· P91
Suzuki Takafumi ····· P23
Suzuki Tatsuya ····· L5-3
Suzuki Youki ····· P53
Suzumura Takuma ····· P16

T

Taguchi Kotaro····· P14
Takahashi Hazuki····· L6-5
Takahashi Hideo ·····P22, P27
Takahashi Keigo ····· L4-2, P92
Takahashi Masaharu ····· L2-3
Takahashi Naoya ····· P55
Takahashi Seizo ····· HL1
Takahashi Takafumi ····· P71
Takamine Kouta ····· P92
Takamizawa Akifumi ····· P91
Takamura Hitoshi ····· P70
Takashima Shingo ····· P20
Takeda Kazuyuki ·····P85, P94
Takeda Mitsuhiro····· SL4
Takegoshi Kiyonori ····· P59, P67, P70, P72, P85, P93, P94
Takeuchi Koh ·····P27, SL3
Takishita Shumpei ····· P28
Takizawa Takeshi·····P15, P87
Takumi Kudo ····· P11
Tamaki Hajime ····· L1-1
Tamura Maiki ····· P38
Tanabe Ryotaro ····· L2-8
Tanaka Naoki ····· L6-3
Tanaka Ryoji ····· L2-3

Tanaka Tomoko ····· P61
Tanaka Yoshiki ····· L4-2
Tanaka Yuuki ····· P36
Tasei Yugo ····· L1-3, P75
Tashiro Mitsuru ····· P02
Tate Naoko ····· P21
Tate Shin-Ichi ····· P21, P30
Tateishi Kenichiro ····· L4-2, P66
Tei Chikai ····· P51
Terada Daiki ····· L2-8, P96
Terauchi Tsutomu ····· SL4
Terawaki Shin-Ichi ····· P26
Tochio Hidehito ····· L2-8
Tochio Naoya ····· P21, P30
Toda Mitsuru ····· L5-1, P67
Tokunaga Yuji ····· P27
Tominaga Yusuke ····· P94
Torisawa Marin ····· P14
Toyama Yuki ····· L6-1
Tsuboi Yuuri ····· P69
Tsuda Kengo ····· P12
Tsukamoto Takashi ····· P40, P42
Tsutsumi Yu ····· P05, P74

U

Uchida Noriyuki ····· L2-1
Uchihashi Takayuki ····· L5-5
Ueda Kazuyoshi ····· P58, P60
Ueda Keisuke ····· L6-2
Ueda Takumi ····· SL5
Uehara Masaru ····· P91
Uesaka Tomohiro ····· P66
Une Ryota ····· P73
Unzai Satoru ····· P19
Urano Takeshi ····· P19
Urano Tomoko ····· P26
Usami Koji ····· P94
Utsumi Hiroaki ····· L5-4
Uzawa Jun ····· L5-3

W

Wada Akimori ····· P58, L4-1
Wakamatsu Kaori ····· P26
Wakamiya Atsushi ····· L5-2
Wakamoto Takuro ····· P18
Walinda Erik ····· L6-7, P09, P17, P20
Wang Jing ····· P21
Watanabe Hiroki ····· L5-5
Watanabe Miho ····· P14
Watanabe Yasunori ····· P59
Wei Feifei ····· P90
Williamson Mike ····· P18
Wohlfahrt Kai J. ····· IL4
Würz Julia ····· L2-4

X

Xue Mengjun ····· P08

Y

Yagi Hirokazu ····· P25, P52
Yagihara Shin ····· P53
Yamada Kazuhiko ····· L3-1
Yamada Kazuya ····· P57
Yamada Shunji ····· P89
Yamada Yutaka ····· P89
Yamaguchi Makoto ····· P47
Yamaguchi Yoshihiro ····· L6-4
Yamaguchi Yoshiki ····· L2-1, L5-3, P44
Yamamoto Akihiko ····· P09
Yamamoto Keishi ····· L1-5
Yamamoto Masayuki ····· P23
Yamamoto Yasuhiko ····· P14
Yamane Tsutomu ····· P33
Yamano Megumi ····· P40, P42
Yamaoki Yudai ····· P82
Yamasaki Kazuhiko ····· L2-3
Yamasaki Tomoko ····· L2-3
Yamazaki Taichi ····· P04
Yamazaki Toshio ····· L6-2, L6-5, P25
Yanagi Yousuke ····· L5-4
Yanagimachi Shinya ····· P91
Yanai Nobuhiro ····· P66
Yanaka Saeko ····· P25
Yano Takahiro ····· P93
Yarava Jayasubba Reddy ····· L3-3
Yogo Rina ····· P25
Yokogawa Mariko ····· L6-1
Yokoyama Takumi ····· P55
Yoneda Ryoma ····· L5-5
Yonezawa Kento ····· P10
Yoon Seong-Ho ····· P65
Yoshidai Hisashi ····· P19
Yoshikawa Takuya ····· P46
Yoshimizu Hiroaki ····· P43, P48, P49, P76, P77
Yoshimura Yuichi ····· P10
Yoshinari Yosuke ····· L2-8
Yuasa Tomohiro ····· L4-2
Yusuke Nishiyama ····· P97
Yutaka Ito ····· P11

Z

Zendo Takeshi ····· P41

五十音順

あ

相沢　智康 ····· P40, P42
相田　卓三 ····· L2-1

会津　貴大……P37
相原　雄一……L2-5
青島　佑……L2-7
青山　剛志……P52
赤羽　英夫……P83
朝倉　大河……P39
朝倉　哲郎……L1-3, P64
浅野　桂……P19
アブドゥルアル　マヒン……P41
雨森　翔悟……P73
綾部　時芳……
新井崇一郎……P79
有村　泰宏……P33
安藤　弘宗……L5-3

い

伊賀　惇記……L2-7
五十嵐　龍治……L2-8, P96
池上　健……P91
池上　貴久……P03, P06
池口　満徳……P33
池谷　鉄兵……L2-7, P13, P18, P79, P80
石川　南都子……L6-3
石田　亘広……P31
石田　康博……L2-1
石森　浩一郎……L6-6, P28
磯　達朗……P23
井田　朋智……P73
一条　直規……P92
市村　克也……P84
出田　圭子……P65
出原　敏孝……L3-2
伊藤　研悟……P88, P89
伊藤　奨太……L4-1
伊藤　美翔……P77
伊藤　隆…　L6-4, P07, P11, P13, P35, P37, P79～P81
伊藤　佳孝……L5-4
稲村　勇雅……P40, P42
井上　圭一……L4-1
井上　仁……P23, P79
井上　正順……L6-4
猪股　晃介……P78, P79, P81
井原　俊英……P04, P50
今井　貴雄……P12
今榮　康文……P69
岩岡　諒……P12
岩川　直都……P09, P17

う

ヴァリンダ　エリック……L6-7, P09, P17, P20
ウィリアムソン　マイク……P18
魏　菲菲……P90
ウェイチー　リャオ……L1-5
上坂　友洋……P66
上田　一義……P58, P60
植田　啓介……L6-2
上田　卓見……SL5
上原　大……P91
宇佐見　康二……P94
鵜澤　洵……L5-3
内田　紀之……L2-1
内橋　貴之……L5-5
内海　博明……L5-4
畝　亮太……P73
浦野　健……P19
浦野　智子……P26
雲財　悟……P19

え

海老名　保男……L2-1

お

及川　格……P70
大木　出……L2-8, P03
大澤　匡範……L6-1
大田垣　祐衣……P83
大友　秀明……P33
大西　裕季……P42
大宮　永行……L6-3
大山　貴子……L6-5
岡田　真由……P13
岡田　瞭英……P55
岡野　栄之……P12
沖津　貴志……L4-1, P58
奥田　三四郎……P08
奥田　昌彦……P34
奥山　千枝子……L2-3
小澤　駿介……L5-5
尾澤　夢実……P62
オディール　アイゼンシュタイン……L1-5
尾林　栄治……P19
尾渕　由佳……P88

か

ガーウッド　マイケル……L2-6
甲斐荘　正恒……SL4, SL6
香川　晃徳……L4-2, P92
葛西　卓磨……P78, P79
片平　正人……L5-5, P12, P82
片山　靖……L1-6
加藤　晃一……P25, SL2
金場　哲平……P05, P07
金山　公三……P61
金子　莉奈……L4-1
金橋　康二……P68, P71
加納　花穂……L6-1

加納　ふみ…… P82
上久保　裕生…… P10
亀田　倫史……P08, P18
亀谷　俊輔…… L1-3
加茂　直樹…… P58
鴨志田　一…… P79～P81
カルニンチ　ピエロ …… L6-5
カレイド　エルサイード …… P41
カロディモス　チャラランポス …… L6-6
河合　剛太…… P16
川口　翼……P52, P53
川越　総一郎…… L6-6
川嵜　亮祐…… P30
川又　勇来…… P46
川村　出……L4-1, P58, P60, P62, P75
神田　岳文…… P93
神取　秀樹…… L4-1

き

木川　隆則…… P78, P79, P81
菊川　峰志……P40, P42
菊地　淳…… P39, P69, P88, P89, P90
喜多　理王……P52, P53
北川　勝浩…… L4-2, P92
北沢　創一郎…… L2-7, P18
北田　直也……P40, P42
北原　亮…… L2-7, P08, P18
貴堂　晃弘…… P07
君塚　信夫…… P66
木村　賢一…… L2-2
木村　英昭…… P74
ギュンタート　ピーター …… L2-4
清石　彩華…… P82
清澤　秀孔…… P16
吉　鉉植…… P65

く

工藤　工……P07, P11
熊谷　洸…… P46
熊木　康裕……P40, P42
久米田　博之…… L6-6, P28, P40, P42
栗澤　尚暎…… L2-2
クリストフ　コペレット …… L1-5
クリストフ　レイナウド …… L1-5
栗田　順一…… P01, P29, P33
栗原　拓也……P70, P72
栗間　昭宏…… P54
胡桃坂　仁志…… P33
黒川　理樹…… L5-5
黒谷　篤之 …… P89
桑原　大介……P51, P55

け

源城　拓哉…… L2-8

こ

小池　聡…… P42
小市　俊悟…… L2-2
神田　大輔…… P41
甲野　裕之…… P45
ゴードン　クリストフ …… L1-5
越野　広雪…… L2-2
小柴　生造…… P23
児嶋　長次郎……L2-4, L6-4, P15
小橋川　敬博…… P15
小林　彩保…… P35
小林　玄器…… P70
コバヤシ　タケシ …… IL1
小林　尚玄…… L2-6
小林　直宏…… L2-4, P12
小林　康男…… P42
小山　啓人…… P46

さ

斉尾　智英…… L6-6
齋尾　智英…… P28
齋藤　徹哉…… P52
斎藤　直樹…… P50
坂倉　正義…… P22
坂田　研二…… P90
桜庭　俊…… P08
佐々木　高義…… L2-1
佐藤　健大…… L1-3
佐藤　直樹…… P36
佐藤　久子…… P62
佐藤　寛子…… L2-2
佐原　成彦…… P44

し

シェラー　ウルリッヒ …… P09
重田　安里寿…… L4-1
柴田　友和…… P14
島崎　安希子…… P26
嶋田　一夫…… L6-1, P27, SL3, SL5
島袋　隼平…… L5-3
清水　和美…… P28
清水　禎…… P67
清水　由宇…… P40
治村　圭子…… P63
下條　秀朗…… P29
シュー　メンジュン …… P08
十一　浩典…… P38
荘司　顯…… P74
ジョセフ　サミー …… L3-3
白川　昌宏… L2-8, L6-7, P03, P09, P17, P20, P8, P96
シリジリ　ジャガディシュワー …… L3-2
新家　粧子…… L2-4, P15
新屋敷　直木……P52, P53

す
徐　尚徳……P30
末松　浩人……L2-3, L3-2
末元　雄介……P79
菅瀬　謙治……L6-7, P09, P17, P20, P84
菅原　潤一……L1-3
杉木　俊彦……L6-4
杉下　友晃……P56
杉本　直樹……P04
須崎　滉平……P83
鈴木　秋弘……P14
鈴木　孝昭……P91
鈴木　隆史……P23
鈴木　達哉……L5-3
鈴木　養樹……P53
鈴木　里佳……P22
鈴村　拓馬……P16
須藤　亜紀乃……P59
須藤　誠一……P53
須藤　雄気……P58
せ
善藤　威史……P41
そ
外間　進悟……L2-8
外間　進吾……P96
蘇木　佳彦……L1-6
園元　謙二……P41
た
高嶋　真吾……P20
高橋　慶伍……L4-2, P92
高橋　征三……HL1
高橋　貴文……P71
高橋　直哉……P55
高橋　葉月……L6-5
高橋　栄夫……P22, P27
高橋　正春……L2-3
高見澤　昭文……P91
鷹峰　洸太……P92
高村　仁……P70
滝沢　剛……P15, P87
瀧下　俊平……P28
田口　耕太朗……P14
竹内　恒……P27, SL3
竹腰　清乃理……P59, P67, P70, P72, P85, P93, P94
武田　和行……P85, P94
武田　光広……SL4
田代　充……P02
田制　侑悟……L1-3, P75
楯　真一……P21, P30
楯　直子……P21
伊達　康博……P39, P88, P90
立石　健一郎……L4-2, P66
田中　智子……P61
田中　直樹……L6-3
田中　邑樹……P36
田中　良樹……L4-2
田中　良二……L2-3
田辺　竜太郎……L2-8
田巻　初……L1-1
田村　真生……P38
ち
近山　英輔……P88, P89
つ
塚本　卓……P40, P42
津田　健吾……P12
堤　遊……P05, P74
坪井　裕理……P69
て
鄭　智海……P51
デジラジュ　ゴータム……L3-3
出村　誠……P40, P42
寺内　勉……SL4
寺田　大紀……L2-8, P96
寺脇　慎一……P26
と
徳永　裕二……P27
戸田　充……L5-1, P67
栃尾　尚哉……P21, P30
杤尾　豪人……L2-8
冨永　雄介……P94
外山　侑樹……L6-1
鳥澤　真鈴……P14
な
内藤　晶……P58, P62, P75
内藤　智之……L5-4
永井　敢……P35, P37
永尾　潤一……P41
中川　直哉……P55
中川　優……P59
長坂　健太郎……P94
中坂　佑太……P46
長島　敏雄……L6-2
永田　崇……L2-4, L5-5, P12, P19, P82
長土居　有隆……P06
中村　公則……P40
中村　哲枝……P04
中村　新治……L3-2
仲村　髙志……L5-4
仲本　準……L6-3
中山　潤一……P29
に
西口　枝里子……P43

西﨑　雄三……P04
西田　雅一……P61
西村　明生……P64
西村　千秋……P32
西村　善文……P01, P29, P33, P34
西村　龍……P14
西山　裕介……P97, L1-2, L3-3

ぬ

沼田　雅彦……P04

ね

根来　誠……L4-2, P92
根本　貴宏……P67
根矢　三郎……P14

の

野尻　英里……P13
野田　泰斗……P59, P70, P72
野村　優友……P76

は

拝師　智之……L2-5
萩原　理加……L1-4
バクスター　ニコラ……P18
橋川　祥史……L5-2
橋本　康博……P54
秦　弘一郎……P65
畠中　孝彰……P31
畑中　稔……L1-6
服部　峰之……P91
服部　良一……L2-4
バトサイハン　ミジドルジ……P62
バニック　マナス……L3-3
ハマッド　ネスリン……L5-5
早川　由夫……P61
林　繁信……P63
林　秀則……L6-3, P36
林　文晶……P31
原　英之……P95
原田　慶恵……P96
半沢　宏之……P15, P87
パンディ　マノジクマール……L3-3

ひ

樋口　佳恵……P78
日部　雄太……P85
平尾　優佳……P01
平賀　隆……P91
平松　蒼野……P28
廣重　玲奈……P60

ふ

黄　介嶸……P30
深澤　隼……P56, P86
福居　滋夫……L3-2
福崎　稔……P52, P53
福間　直希……P42
藤井　萌……P22
藤井　裕……L5-1
藤木　聡……L2-5
藤咲　貴大……L2-8, P03
藤代　博之……L5-4
藤戸　輝昭……P75
藤浪　大輔……P41
藤原　才也……P66
藤原　敏道……L1-1, L2-4, L3-2, L6-4, P15, P56, P57, P86
降旗　一夫……P02
古川　亜矢子……P29
ブルツ　ジュリア……L2-4
不破　寛規……P73

へ

逸見　光……P14

ほ

細田　和夫……P26
細山田　将士……P66
堀　雄貴……P53
堀池　則子……P54

ま

槇野　義輝……P58, P75
真嶋　司……L5-5
増田　隆夫……P46
増田　治史……P52
間瀬　瑶子……L6-1
松尾　雄大……P60
松尾　吉晃……L1-4
松上　明正……P31
松木　陽……L3-2, P56, P57, P86
松下　晴香……P48
松永　達弥……P93
松本　一彦……L1-4
松本　加奈……P44

み

美川　務……P13
三木　恒久……P61
ミジドルジ　バトサイハン……P60
三島　正規……P07, P11, P35, P37, P79, P80
水野　敬……P67
水野　元博……P73
三森　文行……L2-6
宮川　利文……P46
宮川　恒……P38
三宅　雅之……P82
宮下　正弘……P38
宮下　祐美……P26
宮代　亜紗美……P49
宮戸　祐治……P83

宮ノ入　洋平……SL4
宮脇　仁……P65
む
村上　美和……L1-4
村住　侑毅……P42
村田　昌之……P82
村田　理尚……L5-2
村田　靖次郎……L5-2
村松　亜紀……P23
ムルダー　フランス……P08
も
最上　祐貴……P67
持田　智行……P51
森　雅樹……P22
森田　勇人……L6-3, P36, P38
森本　大智……L6-7, P09, P17, P20, P84
森脇　義仁……P33
や
矢木　宏和……P25
八木原　晋……P52, P53
楊井　伸浩……P66
谷中　冴子……P25
柳　陽介……L5-4
柳町　真也……P91
矢野　貴博……P93
山置　佑大……P82
山口　真……P47
山口　芳樹……L2-1, L5-3, P44
山口　良弘……L6-4
山崎　和彦……L2-3
山﨑　太一……P04
山崎　俊夫……L6-2, L6-5, P25
山崎　智子……L2-3
山田　和彦……L3-1
山田　和哉……P57
山田　隼嗣……P89
山田　豊……P89
山根　努……P33
山野　めぐみ……P40, P42
山本　昭彦……P09
山元　啓司……L1-5
山本　雅之……P23
山本　泰彦……P14
ヤラバ　ジャヤスッバレディー……L3-3
ゆ
湯浅　知宏……L4-2
尹　聖昊……P65
よ
與語　理那……P25
横川　真梨子……L6-1
横山　拓海……P55
吉川　琢也……P46
吉田　尚史……P19
吉成　洋祐……L2-8
吉水　広明……P43, P48, P49, P76, P77
吉村　優一……P10
米澤　健人……P10
米田　竜馬……L5-5
ら
ラジェシュ　スンダレサン……P13
ラジプット　ラリット……L3-3
り
李　耘在……P30
リチャード　アンダーソン……L1-5
る
ルーメスタンド　クリスティアン……P18
わ
若松　馨……P26
若宮　淳志……L5-2
若本　拓朗……P18
和田　昭盛……L4-1, P58
渡辺　大輝……L5-5
渡邉　美帆……P14
渡邉　泰典……P59
ワン　ジン……P21

（無断で複製・転載を禁じます）
Copyright© 2017 The Nuclear Magnetic Resonance Society of Japan

2017年11月14日発行
Published on 14th November 2017

第56回NMR討論会（2017）

会　期：2017年11月14日（火）～ 16日（木）
14-16 November 2017
会　場：首都大学東京・南大沢キャンパス
Tokyo Metropolitan University, Minami-Osawa Campus
〒192-0397　東京都八王子市南大沢1-1

編集・発行：56th 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：nmr56@kuba.jp

協賛企業（五十音順）

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

尾崎理化株式会社

株式会社シゲミ

株式会社システムプラス／Mestrelab Research,S.L.

株式会社十條合成化学研究所

昭光サイエンス株式会社

大陽日酸株式会社

株式会社東京インスツルメンツ

東邦酸素工業株式会社

中山商事株式会社

日本電子株式会社

ブルカー・バイオスピン株式会社

株式会社和科盛商会

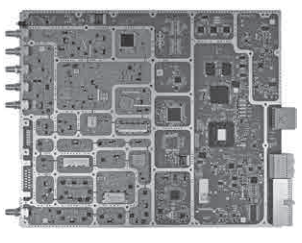
BRUKER

最先端NMR技術の結晶

AVANCE NEO
核磁気共鳴分光計

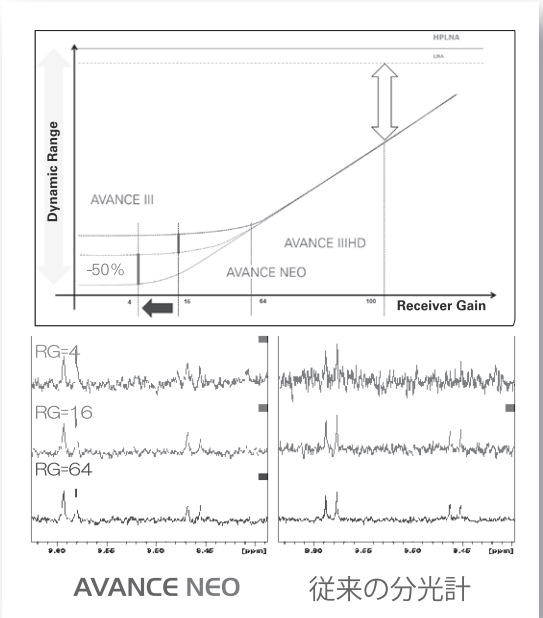
最新のエレクトロニクスで進化を遂げた Bruker Biospinの核磁気共鳴分光計

Bruker BioSpin の最新の核磁気共鳴（NMR）分光計 **AVANCE NEO** は従来の Avance 型分光計の伝統を受け継ぎつつ、最新のエレクトロニクスを導入した新世代の分光計です。RF 送受信系の性能強化により、感度の上昇とより複雑なパルスシーケンスの実装を可能とする自由度が加えられています。最先端の研究の現場からルーチン的な分析にいたるまで、大きな変革をもたらすポテンシャルをもつ **AVANCE NEO** をぜひ体験してください。



大幅に強化されたトランシーバ性能

- 送受信系 1 対が 1 つのボードに実装されたコンパクト設計
- ノイズを低減する 1.852 GHz IF
- 960 MSPS の RF デジタル出力
- 240 MSPS 16 bit ADC
- ダイナミックレンジの 50% 改善
- 12.5 ns 分解能の任意 RF 変調
- 波形生成用 FIFO メモリを 1GB 搭載



AVANCE NEO ではダイナミックレンジが大幅に改善され、今まで観測できなかったような微弱な信号も捕らえることができます。このような改善は分析対象中の微量な成分や不純物を分析する上で重要となってきます。

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
ウェブサイト：www.bruker.com

AVANCE NEOの詳細情報はこちら
https ://www.bruker.com/products/mr/avance-neo.html

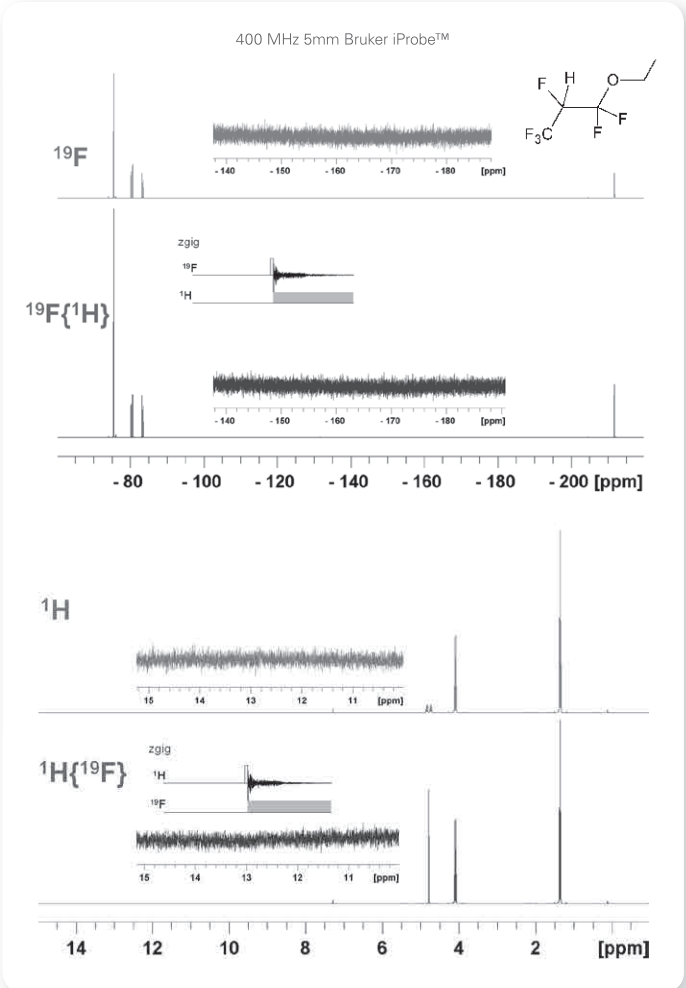
Bruker BioSpin iProbe

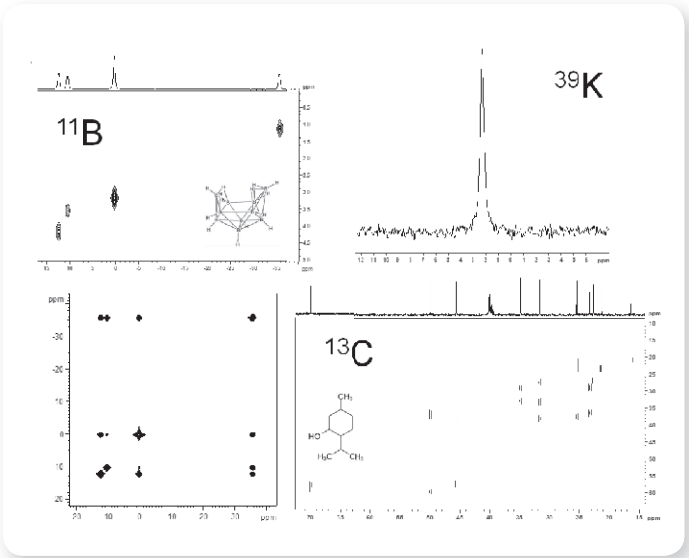
AVANCE NEOにあわせて進化した新しいSmartProbe

Bruker BioSpin の SmartProbe は長年にわたり業界最高水準のルーチン用 NMR プローブとして皆様に愛されてきました。BBO 型のプローブでありながら、X{^{1}H} の測定だけではなく ^{1}H{X} の測定でも最高の感度を発揮し、さらに X 核は ^{109}Ag から ^{17}O および ^{199}Hg から ^{19}F という広範囲に及びました。またすべて核種の組み合わせが全自動チューニングに対応し、堅牢でありながら簡単に使えるまさに理想のオートメーション NMR プローブを体現していました。そしてこの度 Bruker BioSpin が世に送り出す iProbe は SmartProbe をさらに進化させ、業界最高水準をさらに押し広げます。

SmartProbe は新しく iProbe 設計となることで性能を向上させるのみならずさまざまなアプリケーションで使われることを想定した使いやすさを追求しています。

- RF フィルタの最適化による感度の向上
- 50 G/cm@10A グラジェント
- 高速オートチューニングを実現する第二世代 ATMA
- プローブパラメータの自動認識
- 使いやすいインターフェース設計
- 新設計の VT アダプタ
- 取り外しが簡単な新型プローブマウント





400 MHz iProbe型SmartProbeの多核測定データ。1% Decaboraneの^{1}H-^{11}B HMQCスペクトル（左上）と^{1}Hデカップル^{11}B COSYスペクトル（左下）。KClの1次元 ^{39}Kスペクトル（右上）。MentholのINADEQUATEスペクトル（右下）。

フッ素化合物の自動測定例。^{19}F{^{1}H}のデータでも^{1}H{^{19}F}のデータでも、デカップリングなしのスペクトルと比べてデカップリングノイズによるS/Nの低下がみられない。新しいiProbe型のSmartProbeではプローブ内部でのRFのアイソレーションを上げることで外付けのフィルタなしで^{1}Hと^{19}Fという近い周波数での相互的なデカップリングを可能としている。

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
ウェブサイト：www.bruker.com

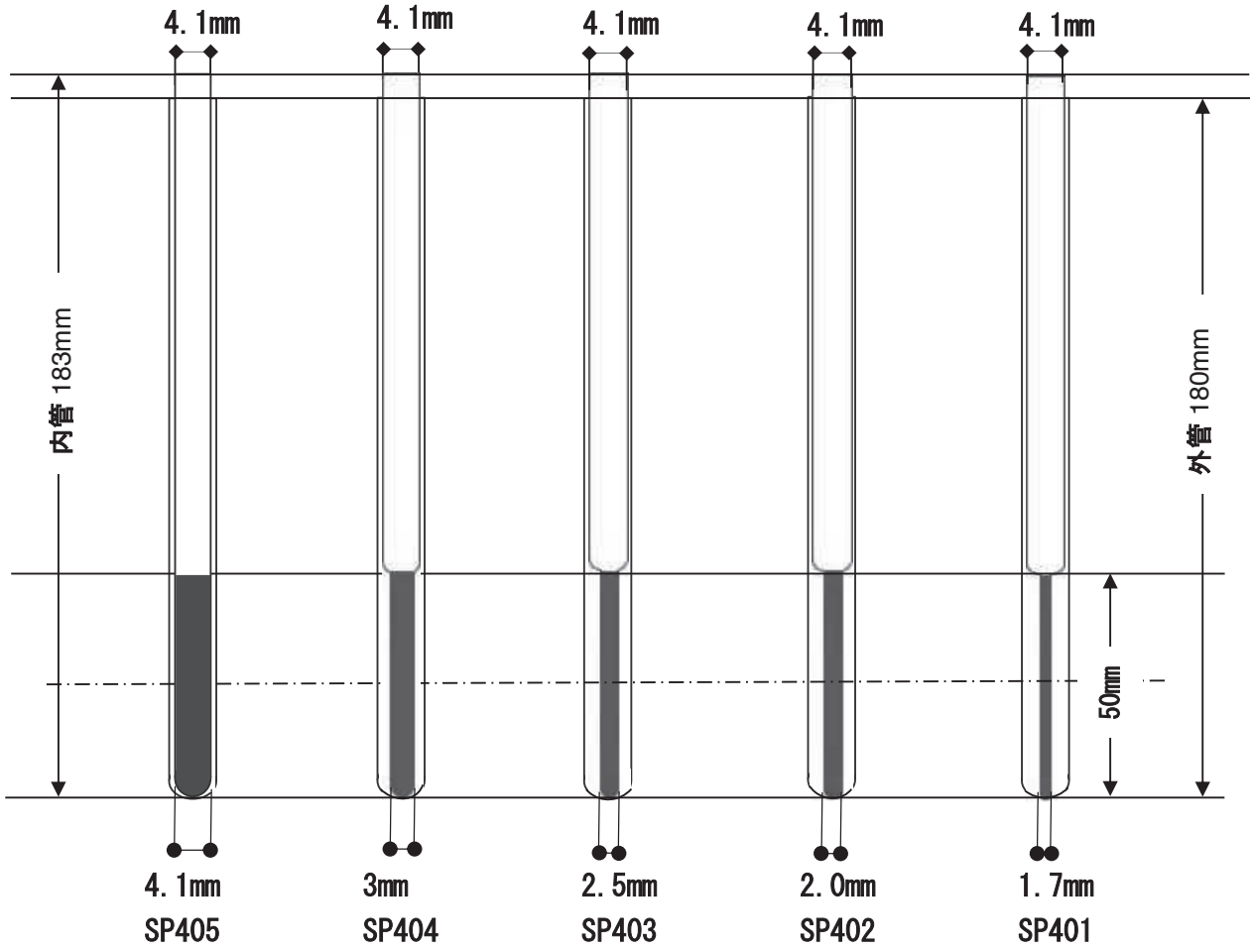
Bruker BioSpinのプローブに関するの詳細情報はこちら
https://www.bruker.com/products/mr/nmr/probes/probes.html

5㎜φ同軸ＮＭＲチューブセット

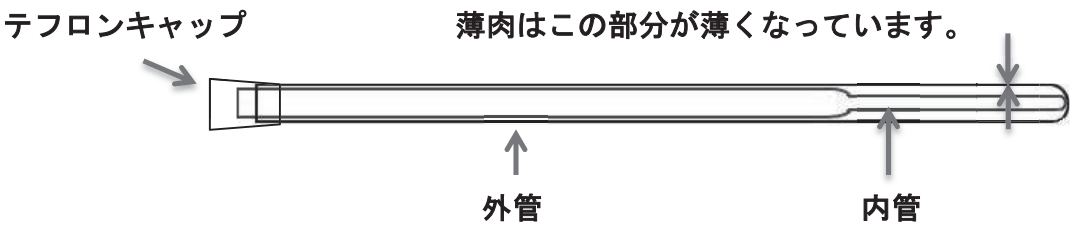
サンプルとロック溶媒を混合できないなどで、別々のガラスに分けて測定したい場合、同軸試料管を使用するとサンプルの出し入れなどで、煩わしさがありましたが、本セットを使用することで、パスツールが入れやすくなりました。また、スペーサは必要なく、5㎜φ用のキャップをかぶせることができます。

通常の 5㎜ 管との組み合わせの他に、薄肉タイプの 5㎜ 管と組み合わせ外管内のボリュームを上げることができます。

セット販売にいたしましたので、別々に購入する煩わしさがございません。



☆内管・5㎜ 外管・テフロンキャップで１セットです。



☆他メーカーの外管との挿入は内径寸法・公差が違うため保証いたしません。

☎ 042-624-2207(9 時～16 時)
FAX 042-622-0937
株式会社 シゲミ
http://www.shigemi.co.jp

無細胞タンパク質合成キット
Cell-Free Protein Expression Kit

理化学研究所の高度な無細胞タンパク質合成技術をキット化いたしました。
大腸菌抽出液を用いており、抗体や膜タンパク質などをはじめ各種タンパク質を迅速・簡便に大量合成し、高効率に安定同位体標識できます。

無細胞くん® SI SS

安定同位体標識タンパク質合成キット
無細胞® SS くん SI

■ 特徴
SS結合を持つ抗体やサイトカインなどの分泌系タンパク質合成専用キットです。任意の酸化条件を選択可能で、シスルフィドイソメラーゼを含みます。

製品番号	製品名	数量	保存温度	希望納入価格（円）
A89-0126	無細胞くんSI SS	1キット（1mL反応×1回分）	−80℃	65,000

無細胞くん® SI

安定同位体標識タンパク質合成キット
無細胞® くん SI

■ 特徴
各種安定同位体標識アミノ酸（別売）と組み合わせてご使用いただくことで安定同位体標識タンパク質を合成するキットです。16時間でCATタンパク質を1キットにつき最大5mg合成できます。

製品番号	製品名	数量	保存温度	希望納入価格（円）
A29-0059	無細胞くんSI	1キット（1mL反応×1回分）	−80℃	55,000

■ ご使用方法：テンプレートDNAとしては、T7プロモーターとリボソーム結合部位を含む市販のベクターに目的タンパク質の遺伝子をクローニングしたものを用います。
また、PCRで調製した直鎖状DNAもご使用いただけます。詳しくは弊社までお問合せください。

科学技術振興機構「産学共同シーズイノベーション化事業」の支援を受け、開発された製品です。

無細胞くん用 安定同位体標識アミノ酸

New!

■SAIL メチル・芳香族選択標識

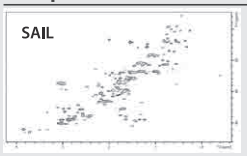
製品番号	製品名	数量	希望納入価格（円）
SAT2001	SAIL アミノ酸混合物水溶液	1mL	220,000
G07-0226	[δ2-13CH3;2H]Leu＋ [γ1-13CH3;2H]Val ＋18種重水素標識アミノ酸	1mL	120,000

■各種安定同位体標識アミノ酸

製品番号	製品名	数量	希望納入価格（円）
A107-0144	アミノ酸混合物水溶液-UL-d	1mL	25,000
A39-0072	アミノ酸混合物水溶液-UL-^{15}N	1mL	15,000
A41-0074	アミノ酸混合物水溶液-UL-^{15}N,d	1mL	18,000
A40-0073	アミノ酸混合物水溶液-UL-^{13}C,^{15}N	1mL	30,000
A42-0075	アミノ酸混合物水溶液-UL-^{13}C,^{15}N,d	1mL	35,000
A91-0128	アミノ酸混合物水溶液-Lys,Arg-UL-^{13}C,^{15}N	1mL	20,000
A92-0129	アミノ酸混合物水溶液-Lys,Leu-UL-^{13}C,^{15}N	1mL	20,000
A108-0145	アミノ酸混合物水溶液-SeMet	1mL	12,000
20種類のアミノ酸を含有しております。			

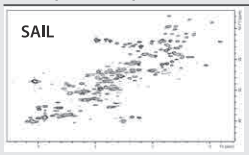
NMRスペクトル

Ubiquitin (8.5 kDa)



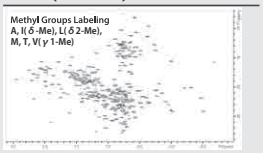
^{1}H-^{13}C ct-HSQC spectrum (400 MHz)

RAS (22 kDa)



^{1}H-^{13}C ct-HSQC spectrum (400 MHz)

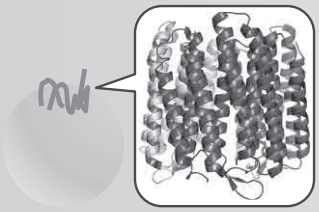
MSG (82 kDa)



^{1}H-^{13}C HMQC spectrum (900 MHz)

Sample Prepared by 1 Cell-Free kit

New! 無細胞くん用 膜タンパク質合成用試薬

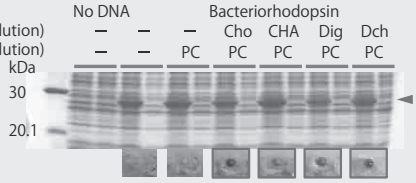


■ 特徴
膜タンパク質を発現しプロテオリポソームを形成するための界面活性剤・脂質サプリメントです。

製品名	数量	希望納入価格（円）
膜タンパク質合成用脂質溶液	1キット	30,000

発現例

Bacteriorhodopsin



Purplish brown color represents proper folding of Bacteriorhodopsin.
PC,L-α-Phosphatidylcholine; Cho, Cholate; CHA, CHAPS; Dig, Digitonin; Dch, Deoxycholate; Left lanes, total; Right lanes, supernatant

大陽日酸 The Gas Professionals

大陽日酸株式会社 SI事業部
〒142-8558 東京都品川区小山1-3-26 東洋Bldg.
Tel.03-5788-8550（代表） Fax.03-5788-8710
●資料のご請求は、大陽日酸までお気軽にご用命ください。
メールアドレス Isotope.TNS@tn-sanso.co.jp
ホームページアドレス https://stableisotope.tn-sanso.co.jp

ISOTEC™ A MEMBER OF THE SIGMA-ALDRICH FAMILY

SAIL TECHNOLOGIES

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

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.
ご支援賜りましたこと，心より御礼申し上げます.