第58回 NMR討論会(2019)
(NMR討論会・SEST2019連合大会)

The 58th Annual Meeting of the Nuclear Magnetic Resonance Society of Japan (2019)
(Joint Annual Meeting of the 58th NMRJ & the 58th SEST)

講演要旨集

Abstracts

会　期：**2019年11月7日 (木)～9日 (土)**
7-9 November 2019

会　場：**川崎市コンベンションホール**
Kawasaki Convention Hall
〒211-0063　神奈川県川崎市中原区小杉町2丁目276番地1
パークシティ武蔵小杉 ザ ガーデン タワーズ イースト2階

主　催：日本核磁気共鳴学会

協賛・後援：高分子学会，日本材料科学会，日本磁気共鳴医学会，日本生化学会，
日本生物物理学会，日本蛋白質科学会

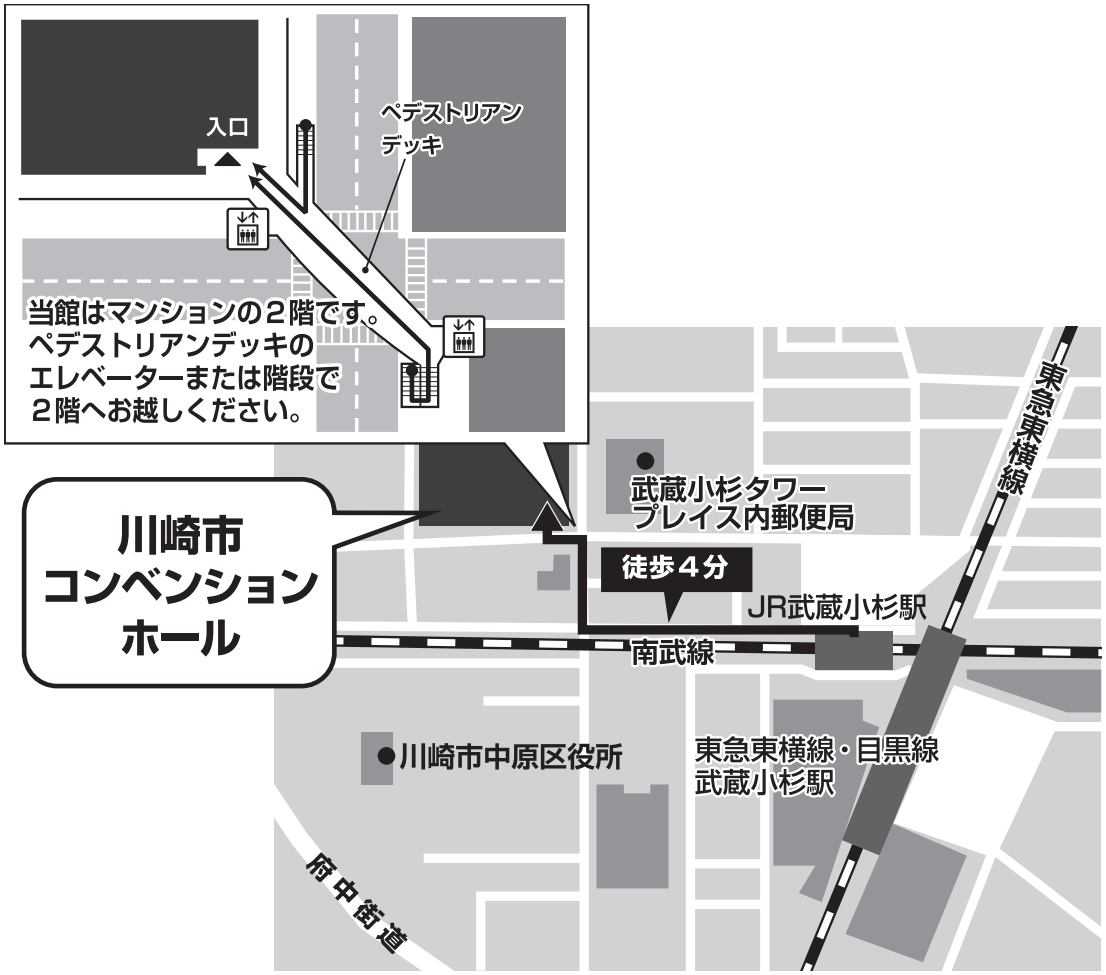
第58回NMR討論会（2019）プログラム委員会

木川　隆則（理化学研究所）［委員長］
池上　貴久（横浜市立大学）
児嶋長次郎（横浜国立大学）
高橋　栄夫（横浜市立大学）
堤　　遊（ブルカージャパン株式会社）
栃尾　尚哉（理化学研究所）
仲村　高志（理化学研究所）
山口　秀幸（味の素株式会社）
山崎　俊夫（理化学研究所）
八木　宏昌（理化学研究所）　＊チュートリアル担当

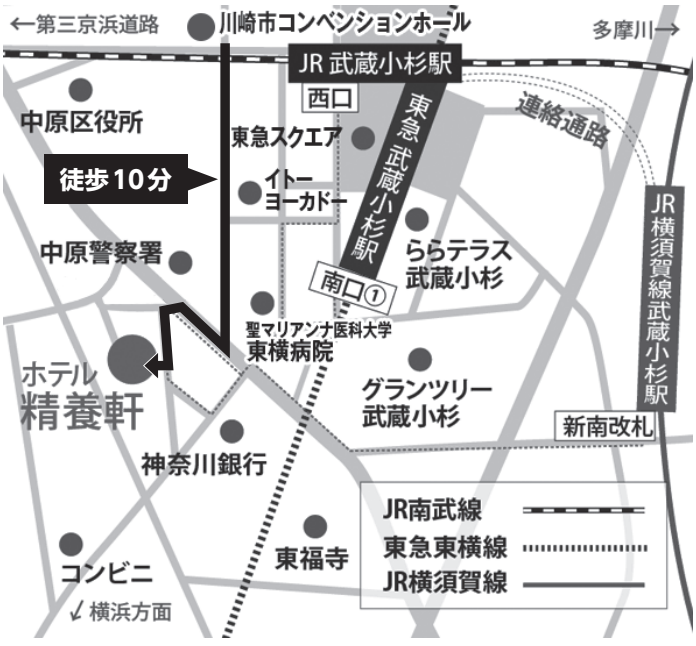
会場（川崎市コンベンションホール）への交通案内

川崎市コンベンションホール

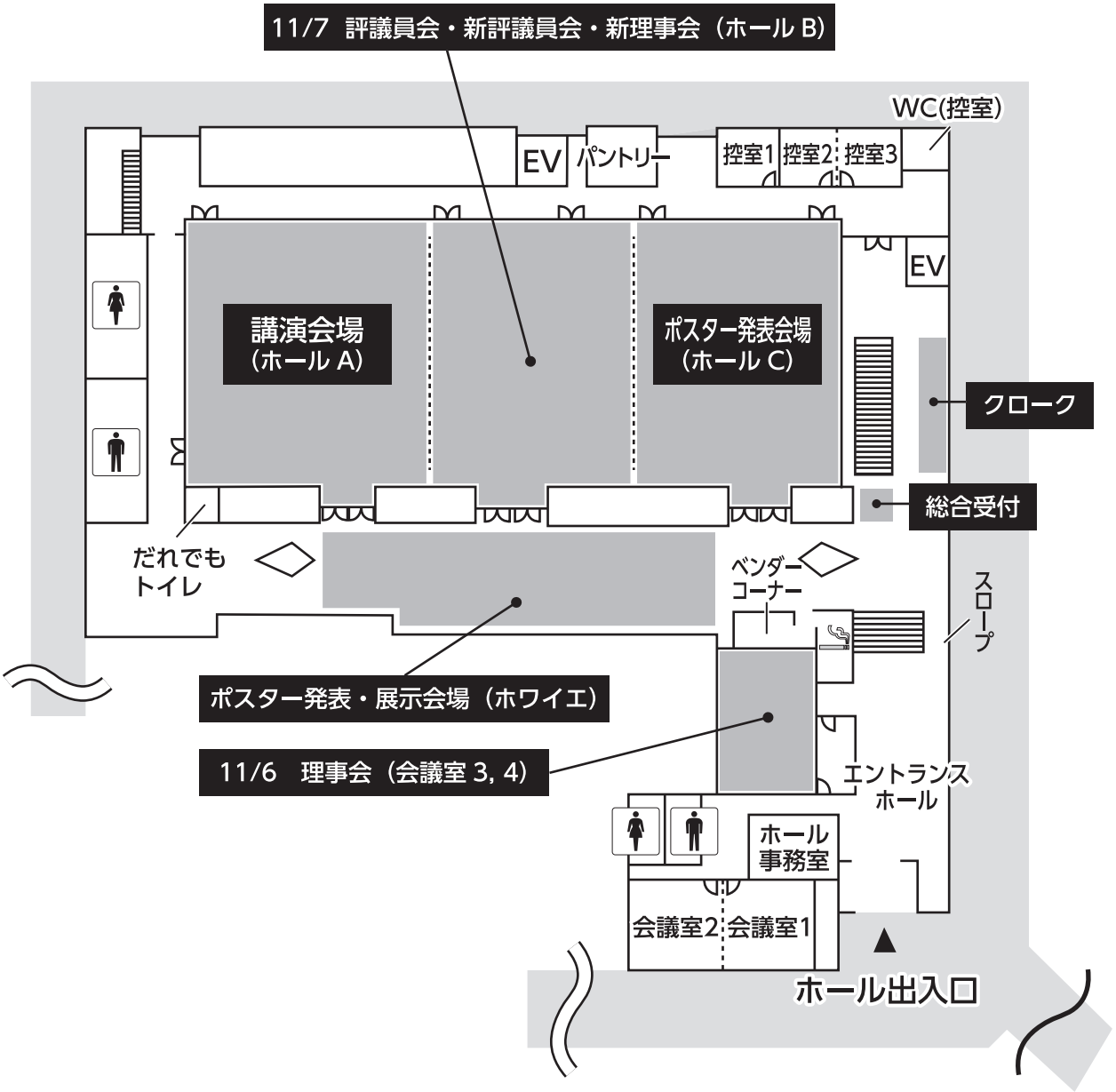
パークシティ武蔵小杉 ザ ガーデン タワーズイースト 2階



懇親会会場：ホテル精養軒



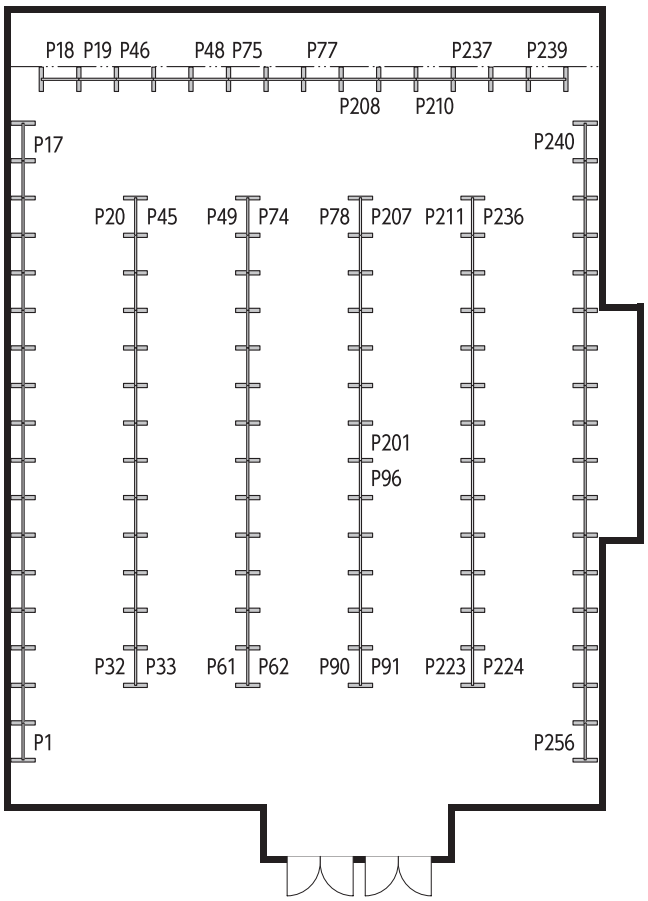
会場の案内図


11/7　評議員会・新評議員会・新理事会（ホール B）
WC(控室)
EV
パントリー
控室1
控室2
控室3
EV
講演会場
（ホール A）
ポスター発表会場
（ホール C）
クローク
総合受付
だれでも
トイレ
ベンダー
コーナー
スロープ
ポスター発表・展示会場（ホワイエ）
11/6　理事会（会議室 3, 4）
エントランス
ホール
ホール
事務室
会議室2
会議室1
ホール出入口

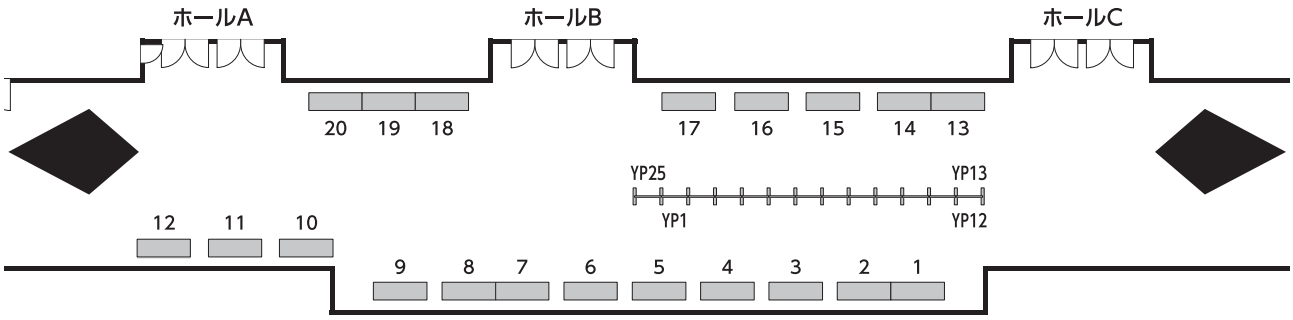
ポスター・展示会場詳細図

川崎市コンベンションホール

ホールC



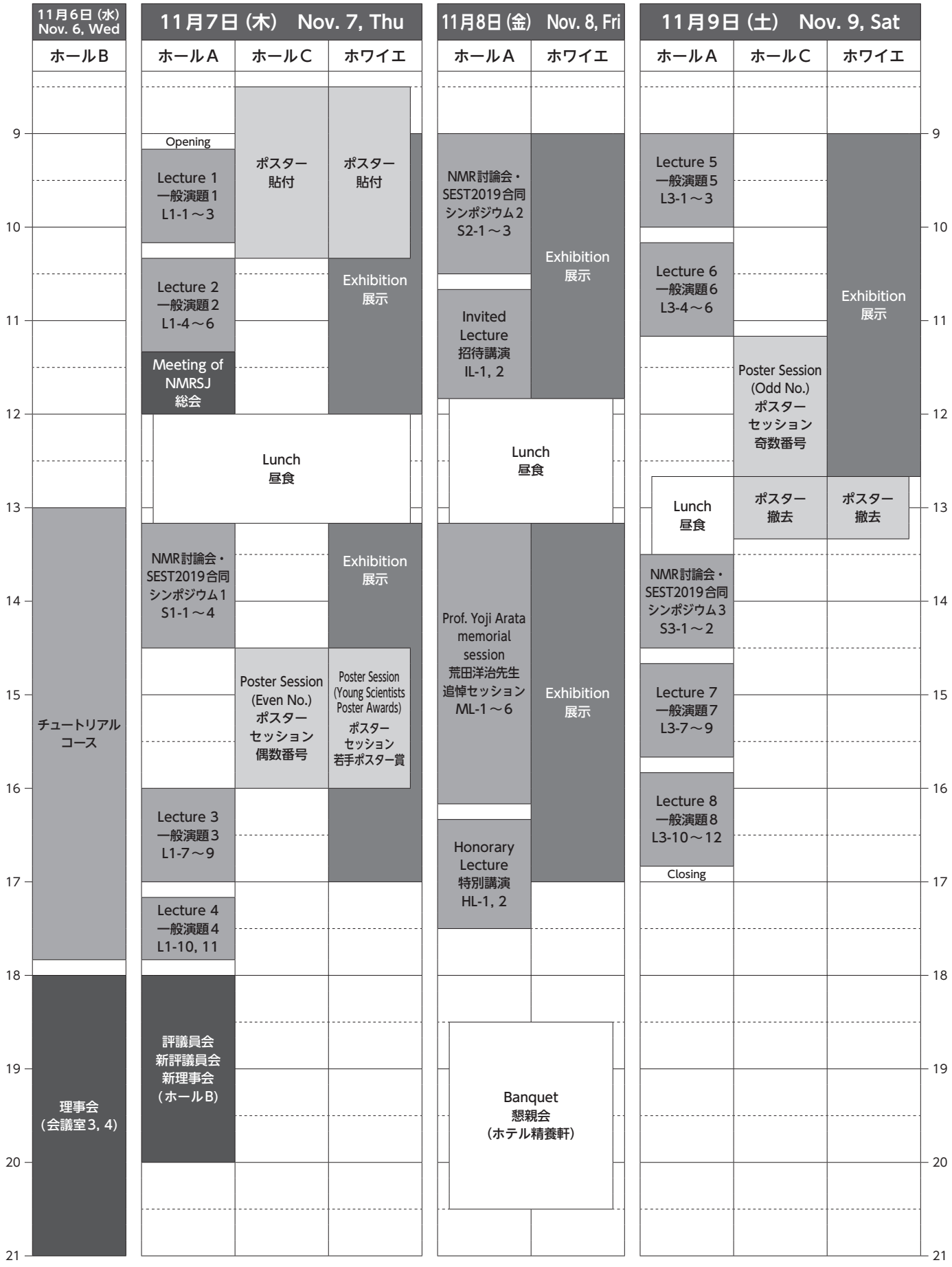
ホワイエ



1・2	NMR共用プラットフォーム
3	株式会社リアクト
4	京都スピンラボ株式会社（SEST2019協賛企業）
5	株式会社エルエイシステムズ
6	ジャスコインタナショナル株式会社
7・8	大陽日酸株式会社
9	株式会社シゲミ
10	株式会社エムアールテクノロジー

11	Wavefunction, Inc. 日本支店/ 株式会社アフィニティサイエンス
12	日本サーマルエンジニアリング株式会社
13	日本電子株式会社
14	日本電子株式会社（SEST2019協賛企業）
15	株式会社バイオネット研究所
16	昭光サイエンス株式会社
17	AMPLITUDE JAPAN合同会社（SEST2019協賛企業）
18・19	ブルカージャパン株式会社
20	ブルカージャパン株式会社（SEST2019協賛企業）

討論会日程表


11月6日 (水) Nov. 6, Wed
ホールB
チュートリアルコース
理事会 (会議室3, 4)
11月7日 (木) Nov. 7, Thu
ホールA
ホールC
ホワイエ
Opening
Lecture 1 一般演題1 L1-1～3
Meeting of NMRSJ 総会
Lecture 2 一般演題2 L1-4～6
NMR討論会・SEST2019合同シンポジウム1 S1-1～4
Lecture 3 一般演題3 L1-7～9
Lecture 4 一般演題4 L1-10, 11
評議員会 新評議員会 新理事会 (ホールB)
ポスター貼付
Poster Session (Even No.) ポスターセッション 偶数番号
ポスター貼付
Exhibition 展示
Exhibition 展示
Poster Session (Young Scientists Poster Awards) ポスターセッション 若手ポスター賞
Lunch 昼食
11月8日 (金) Nov. 8, Fri
ホールA
ホワイエ
NMR討論会・SEST2019合同シンポジウム2 S2-1～3
Invited Lecture 招待講演 IL-1, 2
Prof. Yoji Arata memorial session 荒田洋治先生追悼セッション ML-1～6
Honorary Lecture 特別講演 HL-1, 2
Exhibition 展示
Exhibition 展示
Lunch 昼食
Banquet 懇親会 (ホテル精養軒)
11月9日 (土) Nov. 9, Sat
ホールA
ホールC
ホワイエ
Lecture 5 一般演題5 L3-1～3
Lecture 6 一般演題6 L3-4～6
NMR討論会・SEST2019合同シンポジウム3 S3-1～2
Lecture 7 一般演題7 L3-7～9
Lecture 8 一般演題8 L3-10～12
Closing
Poster Session (Odd No.) ポスターセッション 奇数番号
Exhibition 展示
Lunch 昼食
ポスター撤去
ポスター撤去
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21

参加者へのご案内

1. 受付と参加登録

◇受付

受付は入り口正面（エントランスホール奥）に設けます。

受付時間：11月7日（木） 8:30～17:00

11月8日（金） 8:30～17:00

11月9日（土） 8:30～16:00

・事前登録ならびに参加費の支払をお済ませの方は、会場での受付は不要です。事前に送りました参加証（名札）をご着用のうえ会場にお進みください。

・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円	2,000円	13,000円	7,000円
懇親会費	7,000円	5,000円	7,000円	5,000円

◇参加証（名札）

大会会場内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。

懇親会にご参加の方は、懇親会会場でも参加証を必ずご着用ください。

◇領収証の発行

参加証に添付されている領収証をお使いください。それ以外の領収書が必要な方は、参加証および参加証に添付されている領収証を持参して受付デスクへお越しください。

◇講演要旨集

講演要旨集は日本核磁気共鳴学会会員ならびに非会員の事前登録者に事前送付しています。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いたします。要旨集本文は第58回NMR討論会ホームページ（http://www.nmr2019.jp/）で公開します。

◇学会費の支払いと入会手続き

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

なお、日本核磁気共鳴学会の受付は1日目（11/7）のみとなります。

2. 会場内のサービス・施設

◇クローク

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。懇親会の際には懇親会会場に荷物置き場を設置いたしますので、そちらをご利用ください。

利用時間：11月7日（木） 8:30～18:30
11月8日（金） 8:30～18:00
11月9日（土） 8:30～17:30

◇インターネット

学会では、無料でご利用いただけるインターネット接続サービスは用意しておりません。

◇呼び出し

会場内での呼び出しは、緊急の場合を除き、原則おこないません。

3. 禁止事項

◇飲食・喫煙

喫煙は館内の喫煙所をご利用ください。喫煙所以外は禁煙となります。

会場内でのご飲食は可能です。

◇携帯電話

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

4. 第58回NMR討論会についてのお問い合わせ

◇会期中

総合受付

〒211-0063 神奈川県川崎市中原区小杉町2丁目276番地1
パークシティ武蔵小杉 ザ ガーデン タワーズ イースト2階

川崎市コンベンションホール

会期中の連絡先 044-455-6340

◇会期外

第58回NMR討論会事務局

〒230-0045 神奈川県横浜市鶴見区末広町1-7-22 国立研究開発法人理化学研究所内

Tel: 045-503-9203 E-mail: 58nmr2019@ml.riken.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、ホールA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：進行は座長へ一任いたします。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HDMIもしくはD-sub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、動作確認の試写をおこなうことができます。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、一般演題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とおりです。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
一般演題（日本語または英語）	13分	15分	20分
NMR討論会・SEST合同シンポジウム	※	※	※
荒田洋治先生追悼セッション	※	※	※

※特別講演には質疑の時間はありません。

※NMR討論会・SEST合同シンポジウム、荒田洋治先生追悼セッションは、座長にお任せしております。

◇ポスター発表の方へ

作成要領：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：ポスター会場はホールCおよびホワイエ（若手ポスター賞登録者）です。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7日（木）8：30～10:20の間に掲示し、11月9日（土）12:40～13:20の間に取り外してください。ポスター撤去時刻を過ぎても取り外されないポスターは事務局で撤去します。

ポスター発表時間：若手ポスター賞登録者（YP1, YP2, …）およびポスター番号が偶数番号（P2, P4, …）の方は、11月7日（木）14:30～16:00の間にポスター討論をおこなってください。

奇数番号（P1, P3, …）の方は、11月9日（土）11:10～12:40にポスター討論をおこなってください。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ください。

6. 2019年度日本核磁気共鳴学会通常総会開催通知

日時：2019年11月7日（木） 11:20～12:00
場所：ホールA

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6日（水）18:00より	会議室3、4
評議員会	11月7日（木）18:00より	ホールB
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。

※いずれも食事の用意はございません。

チュートリアルコース

日　時：11月6日（水）／November 6 (Wed) 13:00～17:50（受付開始：12:30～）
会　場：川崎市コンベンションホール　ホールB

13:00～14:30

「測定の不確かさ評価についての初歩」

田中　秀幸　先生（産業技術総合研究所　計量標準総合センター）

近年試験所認定の拡大とともに、不確かさ評価の重要性が増してきております。また，海外の論文誌では測定結果とともに不確かさも表記するように、との指摘がされることも増えてまいりました。そこで本講演では、なぜ不確かさが必要となったのか、不確かさとは何か、誤差との違いということから不確かさ評価の概要を説明し、定量NMRの測定の不確かさについて簡単に解説いたします。

14:40～16:10

「錯体結晶の固体NMR」

犬飼　宗弘　先生（徳島大学大学院　社会産業理工学研究部）

近年、金属イオンと有機配位子から組み上がる無限骨格構造を持つ錯体結晶（配位高分子や金属有機骨格体とも呼ばれる）は、ガスの分離・貯蔵材料やイオン伝導体として優れた機能を有しており、次世代の機能性材料として注目されています。本講演では、結晶性固体の固体NMR測定に興味があるNMR初心者を対象に、錯体結晶の固体NMR解析例を紹介します。一般的な錯体結晶の構造解析の方法として、単結晶X線回折が挙げられます。しかし、X線解析によって得られる結晶構造は、あくまでモデルであり、かつ平均構造です。固体NMR解析によって得られた結晶骨格の運動挙動や局所構造の変化に関する情報を、結晶構造に付け加えることにより、動的な結晶構造の解析が可能となります。X線回折やX線吸収微細構造などのオーソドックスの分光法と固体NMR分光法を組み合わせた動的な結晶構造の解析例、およびそれら動的な結晶構造が引き起こすプロトン伝導や二酸化炭素貯蔵能の機構解明の研究例を話します。

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、一昨年に引き続きBlochとPurcellに先立ってNMRを試みたRabiとGorterについて話す。

Professor Yoji Arata memorial session

Date: November 8 (Fri) 13:10 ~ 16:10
Venue: Hall A, Kawasaki Convention Hall



Professor Yoji Arata

An honorary member
and
the first president
of
the NMR society of Japan

Prof. Yoji Arata passed away on March 2019 at the age of 84. Prof. Arata was born on March 27, 1934 in Okayama, Japan. He graduated from the University of Tokyo in 1956 and obtained the Ph. D. degree in 1963. In 1960, he was an assistant professor at University of Electro-Communications. From 1965, he was at the University of Tokyo as an assistant professor, a lecturer and an associate professor.

Prof. Arata was appointed a Full Professor of the Graduate School of Pharmaceutical Sciences, the University of Tokyo, in 1986. He became a director of the Water Research Institute after his retirement of the University of Tokyo in 1994 and then an advisor of RIKEN Genomic Sciences Research Complex in 2000.

Prof. Arata greatly contributed to the pioneering and the development of the magnetic resonance in biological systems in Japan. He served as the first president of the NMR Society of Japan from 2002 to 2004 and became the first honorary member of the NMR society of Japan in 2004.

Session organizers Masatsune Kainosho, Hideo Akutsu, and Ichio Shimada

ML-1 Prof. Yoji Arata – A passionate academic scholar with a singular sense of humor

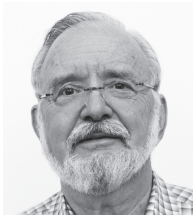


○Masatsune Kainosho (Tokyo Metropolitan University, Japan)

Soon after our first encounter in 1964 at the 4th NMR Symposium in Tokyo, Yoji became a most respected friend and mentor of mine. We helped each other overcome the extremely harsh circumstances during the early days of biological NMR research in Japan. Some of my work reminiscent of that period will be mentioned to commemorate him.

ML-2 NMR studies of the biosynthesis of iron-sulfur proteins in human mitochondria

○John L. Markley (University of Wisconsin-Madison, USA)



I met Yoji Arata first in 1971, when he was a postdoc with Oleg Jardetzky at Stanford and I was a postdoc at University of California, Berkeley, with Mel Klein. We became co-authors on a 1972 publication on NMR studies of pH-induced reversible unfolding of the protein staphylococcal nuclease. He and I met again at many NMR meetings over the years, and I particularly remember hanging out with him on the beach at 1984 ICMRBS meeting in Goa. His studies of immunoglobulin G set a new standard for NMR studies of larger proteins. He was a friend whose passing is mourned.

ML-3 Lessons Learned from Antibody NMR



○Koichi Kato (National Institute of Natural Sciences, Japan)

I cannot express my sentiment to the memory of our mentor, Yoji Arata Sensei, in a few sentences. Through the antibody NMR saga, we could not only acquired NMR skill and knowledge but also inherit his research spirit, which we would impart to the next generation.

ML-4 Memories of Professor Arata and the Water Research Institute (機能水研究所)

○William S. Price (Western Sydney University, Australia)



Prof. Yoji Arata was one of the giants of Japanese NMR. He was an extremely intellectual gentleman with a very deep and broad knowledge of NMR as well as many other interests. He was very generous of his time in assisting and encouraging other researchers. I was very privileged to have Prof. Arata as my boss, wonderful scientific mentor and, most of all, very close friend. My time spent working in the Water Research Institute (機能水研究所) in Tsukuba was one of the most enjoyable and productive periods of my life. Many times I have recounted to friends and colleagues the great time I spent in Japan and also of Prof. Arata's wonderful sense of humour.

ML-5 NMR for high-molecular-weight proteins.



○Ichio Shimada (University of Tokyo, Japan)

The main research target of the late Prof. Arata was antibodies with molecular weight of 150K, which were very huge proteins for NMR at that time. During my time at his lab., I have learned various things to tackle with high-molecular-weight proteins. In my presentation, I will talk about our recent studies of membrane proteins.

ML-6 Prof. Yoji Arata and Biomolecular NMR in Japan and Elsewhere around the World

○Kurt Wüthrich (ETH Zürich, Switzerland, and The Scripps Research Institute, USA)



第58回NMR討論会（2019）

The 58th Annual Meeting of the Nuclear Magnetic Resonance Society of Japan (2019)

会期：2019年11月7日（木）～11月9日（土）
November 7 (Thu) - 11 (Sat)

会場：川崎市コンベンションホール
Kawasaki Convention Hall
〒211-0063　神奈川県川崎市中原区小杉町2丁目276番地1
パークシティ武蔵小杉 ザ ガーデン タワーズ イースト2階

第1日目　11月7日（木）／Day 1 (Nov. 7, Thu)

E：英語発表

9:00～9:10　開会の挨拶　加藤 晃一（日本核磁気共鳴学会会長）
Opening remarks: Koichi Kato
(President of the Nuclear Magnetic Resonance Society of Japan)

一般演題1［会場：ホールA］

9:10～10:10　座長：木川 隆則

9:10～9:30
L1-1　常磁性ランタノイドイオンを用いたNMRとEPRによるマルチドメインタンパク質の構造解析
○斉尾智英[1,2,4]，平松蒼野[2]，浅田瑞枝[3]，瀧下俊平[2]，齋藤彦太[4]，中村敏和[3]，石森浩一郎[1,2,4]（[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]分子科学研究所，[4]北海道大学 理学部）

9:30～9:50
L1-2　水素結合のNMRによる観測
高田夢人，小泉大貴，中島弘稀，伊藤隆，○三島正規（首都大学東京大学院　理学研究科）

9:50～10:10
L1-3　構造平衡制御によるタンパク質のドラッガビリティの改善
○竹内恒[1]，水越弓子[2]，徳永裕二[1]，滝沢剛[3]，半沢宏之[3]，嶋田一夫[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]第一三共RDノバーレ，[4]東京大学大学院薬学系研究科）

10:10～10:20　休憩

一般演題2［会場：ホールA］

10:20～11:20　座長：出村 誠

10:20～10:40
L1-4　E　Direct Observation of Spontaneous Polarization in Freestanding GaN Substrate
○Susumu Sasaki[1,2], Yusuke Mori[3,4], Maki Kushimoto[5], Hiroshi Amano[4], Kenji Shiraishi[4] ([1]Faculty of Engineering, Niigata University, [2]Japan Agency for Medical Research and Development, AMED SENTAN, [3]Graduate School of Engineering, Osaka University, [4]IMaSS, Nagoya University, [5]Graduate School of Engineering, Nagoya University)

10:40～11:00

L1-5　NMR信号の高効率な光変換のための小型薄膜モジュールの開発

○冨永雄介[1]，松川陽亮[1]，Wern Ng[1,2]，武田和行[1]（[1]京都大学大学院 理学研究科，[2]インペリアル・カレッジ・ロンドン 材料工学科）

11:00～11:20

L1-6　CdSe及びAgマジックサイズクラスターの固体NMRによる研究

○野田泰斗，栗原拓也，竹腰清乃理（京都大学大学院理学研究科）

11:20～12:00　Meeting of NMRSJ総会

12:00～13:10　Lunch

NMR討論会・SEST2019合同シンポジウム1［会場：ホールA］

（このシンポジウムは、理研シンポジウムの一環として行われています）

13:10～14:30　座長：立石 健一郎（S1-1～2），熊田 高之（S1-3～4）

13:10～13:30

S1-1　高磁場極低温DNPによる超分極の空間分布定量法とメソスケール分子ドメイン選択観測法

○松木陽，杉下友晃，藤原敏道（大阪大学蛋白質研究所）

13:30～13:50

S1-2　偏極中性子と水素核偏極試料を用いた複合材料の構造研究

○熊田高之（原子力機構　物質セ）

13:50～14:10

S1-3　超偏極^{13}C MRI代謝イメージングと抗がん治療評価

○松元慎吾[1]，Murali C. Krishna[2]（[1]北海道大学 大学院情報科学研究院，[2]米国立がん研究所 放射線生物学部門）

14:10～14:30

S1-4　光励起電子スピンを用いた動的核偏極－超偏極溶液NMRに向けて

○立石健一郎[1,2]，上坂友洋[1,2]（[1]理化学研究所・開拓研究本部，[2]理化学研究所・仁科加速器科学研究センター）

ポスターセッション［会場：ホールC］

14:30～16:00　ポスターセッション（偶数番号）
Poster Session（even numbers）

ポスターセッション（若手ポスター賞）［会場：ホワイエ］

14:30～16:00　ポスターセッション（若手ポスター賞）
Poster Session（Young Scientists Poster Awards）

一般演題３［会場：ホールA］

16:00～17:00　　座長：松木 陽

16:00～16:20

L1-7　　ダイヤモンドNV中心を使ったナノスケールの溶液NMR

○大木出[1]，森田航希[1]，藤原正規[1]，森下弘樹[1]，白川昌宏[2,3]，水落憲和[1]（[1]京都大学　化学研究所，[2]京都大学大学院　工学研究科，[3]量子科学技術研究開発機構（QST））

16:20～16:40

L1-8　　高磁場における溶解トリプレットDNP実験

○宮西孝一郎[1]，一条直規[1]，本山誠[1]，香川晃徳[1,2,3]，根来誠[1,2,3]，中村祐士[4]，江野澤英穂[4]，村田剛志[4]，森田靖[4]，北川勝浩[1,2]（[1]大阪大学大学院　基礎工学研究科，[2]大阪大学先導的学際研究機構　量子情報・量子生命研究部門，[3]さきがけ，[4]愛知工業大学　工学部）

16:40～17:00

L1-9　　セレノメチオニン標識蛋白質の^{77}Se-NMR

○杉木俊彦[1]，Vladimír Sychrovský[2]，原田健一[1]，平岡万里菜[3]，藤原敏道[1]，児嶋長次郎[1,3]（[1]大阪大学蛋白質研究所，[2]Inst. Org. Chem. and Biochem., Acad. Sci. Czech Rep.，[3]横浜国立大学大学院　理工学府）

17:00～17:10　　休憩

一般演題４［会場：ホールA］

17:10～17:50　　座長：池上 貴久

17:10～17:30

L1-10 E **Structural characterization of deoxyribozyme possessing heme**

○Yasuhiko Yamamoto[1,2,3], Yasuhito Suzuki[1], Yusuke Nakajima[1], Tomokazu Shibata[1], Atsuya Momotake[1], Saburo Neya[4], Akihiro Suzuki[5] ([1]Department of Chemistry, University of Tsukuba, [2]Tsukuba Research Center for Energy Materials Science (TREMS), University of Tsukuba, [3]Life Science Center for Survival Dynamics, Tsukuba Advanced Research Alliance (TARA), University of Tsukuba, [4]Department of Physical Chemistry, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba University, [5]Department of Materials Engineering, National Institute of Technology, Nagaoka College)

17:30～17:50

L1-11　　Zn^{2+}依存的な新規DNAzymeの立体構造解析

○山崎和彦，猪股梨華，山崎智子，Jing Zhao，久保田智巳，宮岸真（産業技術総合研究所　バイオメディカル研究部門）

18:00～20:00　　評議員会，新評議員会，新理事会

第2日目　11月8日（金）／Day 2 (Nov. 8, Fri)

E：英語発表

NMR討論会・SEST2019合同シンポジウム2［会場：ホールA］

9:00～10:30　座長：河合 明雄

9:00～9:30

S2-1 E **Radical pairs in proteins**

○Kiminori Maeda (Department of Chemistry, Graduate School of Science and Engineering, Saitama University.)

9:30～10:00

S2-2 E **Observation of Singlet fisson in Ordered Thin Films of Pentacene in *p*-Terphenyl at Room Temperature**

○Christopher W. M. Kay[1,2] ([1]Department of Chemistry, University of Saarland, Saarbücken, Germany., [2]London Centre for Nanotechnology, University College London, London, UK.)

10:00～10:30

S2-3 E **Exploiting Radical Triplet Pair Hyperpolarization for Sensitivity Enhancement in Solution-State NMR**

Matthew W. Dale[1], Daniel Cheney[2], ○Christopher J. Wedge[2] ([1]Department of Physics, University of Warwick, Coventry, UK., [2]School of Applied Sciences, University of Huddersfield, Huddersfield, UK.)

10:30～10:40　休憩

招待講演［会場：ホールA］

10:40～11:50　座長：木川 隆則

10:40～11:15

IL-1 E **Alpha-Deuteration makes kinases more amenable to NMR studies**

GHOUIL Rania[1], BOUGUECHTOULI Chafiaa[1], ROCHE Maxime[2], ○THEILLET Francois-Xavier[1] ([1]Institute for Integrative Biology of the Cell, CNRS/CEA/Univ. Paris Saclay, Gif-sur-Yvette, France., [2]Cortecnet, Gif-sur-Yvette, France.)

11:15～11:50

IL-2 E **Integrated NMR and cryo-EM atomic-resolution structure determination of a half-megadalton enzyme complex**

○A. Favier[1], Diego F. Gauto[1], Leandro F. Estrozi[1], Charles D. Schwieters[2], Gregory Effantin[1], Pavel Macek[1,6], Remy Sounier[1,7], Astrid C. Sivertsen[1], Elena Schmidt[3], Rime Kerfah[1,5], Guillaume Mas[1,8], Jacques-Philippe Colletier[1], Peter Güntert[3,4,5], Guy Schoehn[1], Jerome Boisbouvier[1], Paul Schanda[1] ([1]Univ. Grenoble Alpes, CEA, CNRS, Institut de Biologie Structurale (IBS), Grenoble, France., [2]Center for Information Technology, National Institutes of Health, Bethesda, USA., [3]Institute of Biophysical Chemistry, Goethe University Frankfurt am Main, Frankfurt, Germany., [4]Laboratory of Physical Chemistry, ETH Zurich, Zurich, Switzerland., [5]Graduate School of Science, Tokyo Metropolitan University, Tokyo, Japan., [6]NMR-Bio, Grenoble, France., [7]Institut de Génomique Fonctionnelle, University of Montpellier, Montpellier, France, [8]Biozentrum University of Basel, Basel, Switzerland.)

11:50～13:10　Lunch

Prof. Yoji Arata memorial session [会場：ホールA]

13:10～16:10　座長：嶋田 一夫 (ML-1～3)，甲斐荘 正恒 (ML-4～6)

13:10～13:35
ML-1 E **Prof. Yoji Arata – A passionate academic scholar with a singular sense of humor**
○Masatsune Kainosho (Tokyo Metropolitan University, Japan)

13:35～14:10
ML-2 E **NMR studies of the biosynthesis of iron-sulfur proteins in human mitochondria**
○John L. Markley (University of Wisconsin-Madison, USA)

14:10～14:35
ML-3 E **Lessons Learned from Antibody NMR**
○Koichi Kato (National Institute of Natural Sciences, Japan)

14:35～14:45　休憩/Break

14:45～15:10
ML-4 E **Memories of Professor Arata and the Water Research Institute (機能水研究所)**
○William S. Price (Western Sydney University, Australia)

15:10～15:35
ML-5 E **NMR for high-molecular-weight proteins.**
○Ichio Shimada (University of Tokyo, Japan)

15:35～16:10
ML-6 E **Prof. Yoji Arata and Biomolecular NMR in Japan and Elsewhere around the World**
○Kurt Wüthrich (ETH Zürich, Switzerland, and The Scripps Research Institute, USA)

16:10～16:20　休憩/Break

特別講演 [会場：ホールA]

16:20～17:30　座長：西村 善文 (HL-1)，加藤 晃一 (HL-2)

16:20～16:55
HL-1 E **Can NMR help cure cancer?**
○Mitsuhiko Ikura (Princess Margaret Cancer Centre, University of Toronto, Canada)

16:55～17:30
HL-2 E **Reflections upon my Research on Biological Spectroscopy**
○Hideo Akutsu[1,2] ([1]Osaka University, Suita, Japan., [2]Yokohama City University, Yokohama, Japan.)

17:30～17:40　名誉会員証授与式

18:30～20:30　懇親会 (ホテル精養軒) /Banquet

第3日目　11月9日（土）／Day 3 (Nov. 9, Sat)

E：英語発表

一般演題5［会場：ホールA］

9:00～10:00　　座長：西山 裕介

9:00～9:20
L3-1　頑強で持続可能な超偏極キセノンガス生成供給装置の開発と応用
○藤原英明[1,2]，今井宏彦[3]，木村敦臣[1]（[1]大阪大学大学院医学系研究科，[2]MRメドケム研究所合同会社，[3]京都大学大学院情報学研究科）

9:20～9:40
L3-2　ゴム材料中の気体のNMR情報からわかる構造と物性
○吉水広明[1]，高橋雅人[2]，堤遊[3]（[1]名古屋工業大学大学院　工学研究科，[2]理化学研究所 放射光科学研究センター NMR研究開発部門，[3]ブルカージャパン株式会社 バイオスピン事業部）

9:40～10:00
L3-3　残余双極子カップリング測定における配向力、温度安定性、有機溶媒耐性を兼ね備えた新規配向剤
○内田紀之[1]，山口芳樹[2]，海老名保男[3]，佐々木高義[3]，石田康博[1]（[1]理化学研究所，[2]東北医科薬科大，[3]物質・材料研究機構）

10:00～10:10　　休憩

一般演題6［会場：ホールA］

10:10～11:10　　座長：川村 出

10:10～10:30
L3-4　ガングリオシド膜上におけるアミロイドβの固体NMR解析
○矢木真穂[1,2,3]，西村勝之[2]，加藤晃一[1,2,3]（[1]生命創成探究センター、自然科学研究機構，[2]分子科学研究所、自然科学研究機構，[3]名古屋市立大学、大学院薬学研究科）

10:30～10:50
L3-5　β2-microglobulinアミロイド線維のex vivo立体構造解析
○田巻初，宗正智，川本晃大，後藤祐児，藤原敏道，松木陽（大阪大学 蛋白質研究所）

10:50～11:10
L3-6　E　Unexpected Prion-like Cross Talk between Ab42 and Aβ40 studied by solid-state NMR
○Yoshitaka Ishii[1,2], Yiling Xiao[3], Brian Yoo[3], Isamu Matsuda[1], Dan McElheny[3] ([1]School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology, [2]RIKEN RSC NMR Science & Development Division, [3]Department of Chemistry, University of Illinois at Chicago)

ポスターセッション［会場：ホールC］

11:10～12:40　　ポスターセッション（奇数番号）
Poster Session (odd numbers)

12:40～13:30　　Lunch

NMR討論会・SEST2019合同シンポジウム３［会場：ホールA］

13:30～14:30　座長：生駒 忠昭（S3-1），竹内 恒（S3-2）

13:30～14:00

S3-1　パルスESR法を用いたタンパク質間相互作用及び反応中心の解明

○三野広幸（名古屋大学・理学研究科）

14:00～14:30

S3-2　常磁性効果による遠距離構造情報を利用したタンパク質multi-state立体構造解析

○池谷鉄兵[1]，立石泰[1]，岡田真由[1]，Peter Güntert[1,2,3]，伊藤隆[1]（[1]首都大学東京大学院・理学研究科化学専攻，[2]ドイツ フランクフルトゲーテ大学，[3]スイス連邦工科大学チューリッヒ校）

14:30～14:40　休憩

一般演題７［会場：ホールA］

14:40～15:40　座長：伊藤 隆

14:40～15:00

L3-7　区分標識法の拡張とタンパク質の動的構造解析への応用

○岩井秀夫，Kornelia M. Mikula，Hannes M. Beyer，O.H. Samui Ollila（ヘルシンキ大学,バイオテクノロジー研究所）

15:00～15:20

L3-8　核緩和機構最適化アミノ酸を利用した高分子量蛋白質の動態構造解析法の開発

○宮ノ入洋平[1,2]，武田光広[2,3]，寺内勉[4,5]，甲斐荘正恒[2,4]（[1]大阪大学　蛋白質研究所，[2]名古屋大学大学院理学研究科附属構造生物学研究センター，[3]熊本大学大学院　生命科学研究部，[4]首都大学東京大学院理工学研究科，[5]SAILテクノロジーズ株式会社）

15:20～15:40

L3-9　重複NMRシグナルの分離・解析を可能にするアミノ酸符号化安定同位体標識とテンソル分解法

○葛西卓磨[1,2]，小野峻佑[2,3]，田中利幸[4]，池田思朗[5]，木川隆則[1,3]（[1]理化学研究所 生命機能科学研究センター，[2]科学技術振興機構 さきがけ，[3]東京工業大学 情報理工学院，[4]京都大学大学院 情報学研究科，[5]統計数理研究所）

15:40～15:50　休憩

一般演題８［会場：ホールA］

15:50～16:50　座長：竹腰 清乃理

15:50～16:10

L3-10　磁場掃引法を活用した半整数四極子核固体NMR法の開発

○山田和彦（高知大学総合科学系複合領域科学部門）

16:10～16:30

L3-11 E　electron and NMR crystallography for pharmaceutical applications

○Yusuke Nishiyama[1,2,3]（[1]JEOL RESONANCE Inc.，[2]RIKEN-JEOL Collaboration Center，[3]RIKEN SPring-8 Center）

16:30～16:50

L3-12　1.3GHz NMRに向けて：高温超電導体の超電導接合を用いた永久電流400MHz NMR

○山崎俊夫[1]，柳澤吉紀[1]，朴任中[1]，末富佑[1,2]，山岸風摩[1,3]，高橋雅人[1]，高尾智明[3]，大木康太郎[4]，山口高史[4]，永石竜起[4]，三好康之[5]，吉川正敏[5]，濵田衛[5]，斉藤一功[5]，北口仁[6]，蜂谷健一[7]，石井佳誉[1,8]，前田秀明[1,9]（[1]理化学研究所，[2]千葉大学大学院，[3]上智大学，[4]住友電気工業株式会社，[5]ジャパンスーパーコンダクタテクノロジー株式会社，[6]物質・材料研究機構，[7]株式会社JEOL RESONANCE，[8]東京工業大学，[9]科学技術振興機構）

16:50～17:00　閉会の挨拶（世話人）

若手ポスター賞発表／Young Scientists Poster Awards [ホワイエ]

1日目 (2019/11/7　14:30～16:00)

YP1　Development of the overexpression system of recombinant small peptides for NMR research used calmodulin for the stabilization

○谷昊[1], 大沼幸暉[1], 石田博昭[2], 熊木康裕[1], 塚本卓[1,3], 菊川峰志[1,3], 出村誠[1,3], Hans J Vogel[2], 相沢智康[1,3] ([1]北海道大学 大学院生命科学院, [2]カルガリー大学 生命科学学科, [3]北海道大学 国際連携研究教育局)

YP2　免疫抑制剤結合タンパク質FKBP12の薬剤認識における動的構造解析

○平河卓也, 岩川直都, 森本大智, 菅瀬謙治 (京都大学大学院　工学研究科)

YP3　免疫応答に関与するHOIL-1Lによる直鎖型ダイユビキチンの認識機構

○石井公貴[1], ヴァリンダ エリック[2], 岩川直都[1], 森本大智[1], 菅瀬謙治[1], 白川昌宏[1] ([1]京都大学大学院　工学研究科, [2]京都大学大学院　医学研究科)

YP4　Structural Basis for the Concerted Action of Trigger Factor and ClpX Chaperones in Protein Unwinding

○朱浩傑[1], 斉尾智英[1,2], A. Houry Waild[3], 石森浩一郎[1,2] ([1]北海道大学総合化学院, [2]北海道大学理学部, [3]トロント大学生物化学部門)

YP5　VAP結合蛋白質群が持つVAP認識モチーフのNMR解析

○平岡万里菜[1], 古板恭子[2], 藤原敏道[2], 児嶋長次郎[1,2] ([1]横浜国立大学大学院　理工学府, [2]大阪大学　蛋白質研究所)

YP6　プロテイン・ドロップレットのNMR解析

○吉岡賢一[1], 長谷颯士[2], 政喜優[3], 青木大将[2,4], 吉村優一[1], 梅原崇史[4], 木村英昭[5], 楯真一[1,2,6] ([1]広島大学大学院　統合生命科学研究科, [2]広島大学大学院　理学研究科　数理分子生命理学専攻, [3]広島大学　理学部　化学科, [4]理化学研究所　生命機能科学研究センター, [5]ブルカージャパン株式会社, [6]広島大学　クロマチン動態数理研究拠点)

YP7　マウス脳より発見された低分子non-coding RNAの二次構造解析

○小林ひなの[1], 鈴村拓馬[2], 清澤秀孔[1,2], 河合剛太[1,2] ([1]千葉工業大学・先進工学部, [2]千葉工業大学・大学院工学研究科)

YP8　ヒト便試料の保存条件とメタボローム変動のNMR解析

○宋子豪[1], 包克非[1], 北田直也[1], 熊木康裕[3], 大西裕季[3], 塚本卓[1,2,3], 菊川峰志[1,2,3], 出村誠[1,2,3], 中村公則[2], 綾部時芳[2], 山村凌大[4], 中村幸志[5], 玉腰暁子[5], 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]北海道大学・国際連携研究教育局, [4]北海道大学・大学院医学院, [5]北海道大学・大学院医学研究院)

YP9　NMRを用いた定量的なグルタミン分解速度の解析

○小倉立己[1,2], 若山正隆[1], 曽我朋義[1], 冨田勝[1] ([1]慶應義塾大学　先端生命科学研究所, [2](公財)庄内地域産業振興センター)

YP10　^{19}F-NMRを用いた高溶解度フォーカスドライブラリーの構築とフラグメントベースの薬剤探索

○小篭蒼[1], 新家粧子[2], 藤原敏道[2], 児嶋長次郎[1,2] ([1]横浜国立大学･大学院理工学府, [2]大阪大学･蛋白質研究所)

YP11　半整数四極子核のDNP-NMR信号取得の高速化

○永島裕樹[1], Julien Trebosc[2,3], 今喜裕[1], 佐藤一彦[1], Olivier Lafon[2,4], Jean-Paul Amoureux[2,5,6] ([1]産業技術総合研究所　触媒化学融合研究センター, [2]リール大学, CNRS, Central Lille, ENSCL, Univ. Artois, UMR 8181, UCCS, [3]リール大学, CNRS,-2638, Federation Chevreul, [4]Institut Universitaire de France, [5]ブルカーバイオスピン, [6]理研 NMR研究開発部門)

YP12　微結晶の三次元磁場配向機構を備えたin situ固体NMRプローブの開発

○門間啓[1]，久住亮介[1]，和田昌久[1]，木村恒久[1]，武田和行[2]（[1]京都大学大学院　農学研究科，[2]京都大学大学院理学研究科）

YP13　Field-swept Nuclear Integrated Cross Polarization

○日部雄太，竹腰清乃理，武田和行（京都大学大学院　理学研究科　化学専攻）

YP14　高速MAS固体NMR下でのスピンロック緩和の最適化による高効率CPの実現

○松永達弥[1]，松田勇[2]，山崎俊夫[1]，石井佳誉[1,2]（[1]理化学研究所　放射光科学研究センター，[2]東京工業大学生命理工学院）

YP15　多次元固体MAS NMRによる光駆動型Na^+ポンプロドプシンKR2の構造解析

○金子莉奈[1]，重田安里寿[2]，長島敏雄[3]，山崎俊夫[3]，井上圭一[4,5]，神取秀樹[5]，川村出[1,2]（[1]横浜国立大学　大学院理工学府，[2]横浜国立大学　大学院工学府，[3]理研，[4]東京大学，[5]名古屋工業大学）

YP16　多次元固体NMRによるヘリオロドプシンの構造解析

○鈴木しぶき[1]，長島敏雄[2]，金子莉奈[1]，沖津貴志[3]，和田昭盛[3]，小林直宏[2]，山崎俊夫[2]，吉住玲[4]，井上圭一[5]，神取秀樹[4]，川村出[1]（[1]横浜国立大学大学院　理工学府，[2]理研　RSC，[3]神戸薬科大学，[4]名古屋工業大学，[5]東京大学）

YP17　Structural characterization of Aβ(1-42) fibrils in nano-mole scale by ^{1}H-detected SSNMR under UFMAS

○Ayesha Wickramasinghe[1,2,3]，Yiling Xiao[3]，小林直宏[2]，石井佳誉[1,2,3]（[1]東京工業大学　生命理工学院，[2]理化学研究所　放射光科学研究センター，[3]イリノイ大学）

YP18　固体DNP-NMRによる高分子材料の構造解析

○田中真司，小川敦子，中島裕美子，佐藤一彦（産業技術総合研究所 触媒化学融合研究センター）

YP19　医薬製剤に含まれる薬物の結晶状態評価を目的としたT_1およびT_2緩和の解析

○岡田康太郎[1]，林祥弘[2]，熊田俊吾[2]，大貫義則[1]（[1]富山大学　大学院医学薬学研究部，[2]日医工株式会社）

YP20　多孔性金属錯体中で集積制御されたアセン化合物におけるスピン偏極生成

○折橋佳奈[1]，藤原才也[1]，立石健一郎[4]，上坂友洋[4]，君塚信夫[1,2]，楊井伸浩[1,2,3]（[1]九州大学大学院　工学府，[2]九州大学分子システム科学センター，[3]JST-さきがけ，[4]理化学研究所・仁科加速器研究センター）

YP21　磁場掃引を用いたSWIFT法

○小林洋太，竹腰清乃理，武田和行（京都大学大学院　理学研究科）

YP22　深度・運動性・化学シフトの3次元CSIのパルス系列及び疑似スペクトル画像法の開発

○伊藤研悟[1,2]，坪井裕理[1]，菊地淳[1,2,3]（[1]理化学研究所 環境資源科学研究センター，[2]横浜市立大学大学院 生命医科学研究科，[3]名古屋大学大学院 生命農学研究科）

YP23　テンソル分解と圧縮センシングによる超偏極13C代謝MRIの高速撮像の検討

○辻野正之介，Neil Stewart，平田拓，松元慎吾（北海道大学大学院　情報科学研究科）

YP24　パラ水素誘起偏極法による磁場サイクル型^{13}C励起装置の開発

○福江優香[1]，内尾佳貴[2]，ジェイ スチュワート ニール[2]，平田拓[2]，松元慎吾[2]（[1]北海道大学大学院　情報科学院　生体情報工学コース，[2]北海道大学大学院　情報科学研究院　生命人間情報科学部門）

YP25　^{31}Pスピンの高偏極化のための極低温DNP装置開発

○土井徹[1]，香川晃徳[1,2,3]，根来誠[2,3]，北川勝浩[1,2]（[1]大阪大学大学院　基礎工学研究科，[2]大阪大学先導的学際研究機構　量子情報・量子生命部門，[3]JST さきがけ）

一般ポスター発表／Poster presentation [ホールC]

偶数番号：1日目 (2019/11/7　14:30～16:00)
奇数番号：3日目 (2019/11/9　11:10～12:40)

P1　マルチレシーブ実験によるNOESYとHOESYの同時観測
○金場哲平 (ブルカージャパン株式会社バイオスピン事業部)

P2　異種核間スピン拡散を利用したファーマコフォア解析の試み
○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)

P3　^{13}C直接観測測定の高感度化法の開発
○古板恭子[1], 服部良一[1,2], 杉木俊彦[1], 池上貴久[1,3], 藤原敏道[1], 児嶋長次郎[1,4] ([1]大阪大学　蛋白質研究所, [2]徳島文理大学　薬学部, [3]横浜市立大学　生命医科学研究科, [4]横浜国立大学　大学院工学研究院)

P4　^{19}F核とアミド間の水素結合への14N核デカップリングHOESYの適用
○蓮見景子, 内海博明, 笹川拡明 (株式会社JEOL RESONANCE)

P5　高感度Rheo-NMRによるタンパク質の不安定化機構および凝集機構の解析
○菅瀬謙治 (京都大学大学院　工学研究科)

P6　COSY法の新しい応用測定--Selective-HR-COSY法について
○降旗一夫[1], 田代充[2] ([1]東京大学大学院、農学生命科学研究科, [2]明星大学、理工学部)

P7　パルス不完全性を補償する ^{15}N/^{13}C-CPMG-HSQC パルス系列の開発
○池上貴久[1], 小沼剛[1], 栗田順一[1], 長土居有隆[2] ([1]横浜市立大学　生命医科学研究科, [2]ブルカージャパン株式会社)

P8　軽水中の化合物の定量NMR (内標準法)
○松村雄輝[1], 中野隆行[1], 川口謙[2] ([1](株) 東レリサーチセンター　バイオメディカル分析研究部, [2](株) 東レリサーチセンター　品質保証部)

P9　多様なユビキチン鎖のロバストな合成法とNMR法への応用
○鈴木拓巳, 高田夢人, 伊藤隆, 三島正規 (首都大学東京・大学院・理学研究科)

P10　PEGを付加したアプタマーのNMR解析
○坂本泰一 (千葉工業大学　先進工学部　生命科学科)

P11　常磁性緩和促進 (PRE) 法を用いたタンパク質変性中間体の立体構造研究：ボレリア菌表層タンパク質OspAの圧力変性と温度変性
若本拓朗[1], 北沢創一郎[2], ○北原亮[1,2] ([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)

P12　分子クラウディング環境下の蛋白質の緩和解析
○田岸亮馬, 田中孝, 三島正規, 池谷鉄兵, 伊藤隆 (首都大学東京大学院　理学研究科　化学専攻)

P13　高圧下におけるユビキチンの水-アミド水素交換反応:H/D Exchange & CLEANEX-PM NMR
○北沢創一郎[1], 若本拓朗[2], 北原亮[1,2] ([1]立命館大学　薬学部, [2]立命館大学大学院　生命科学研究科)

P14　基質の特異的結合を介したMAPキナーゼp38αのアロステリック活性制御の動的構造基盤
○徳永裕二[1], 竹内恒[1], 嶋田一夫[1,2] ([1]国立研究開発法人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)

P15　ヘテロクロマチンタンパク質HP1αと染色体パッセンジャー複合体因子INCENPとの相互作用

○古川亜矢子[1]，迫洸佑[2]，栗田順一[1]，広田亨[2]，西村善文[1]（[1]横浜市立大学大学院　生命医科学研究科，[2]公益財団法人がん研究会）

P16　PRE,PCSを用いた蛋白質立体構造解析のための常磁性金属タグの性能評価

○田端真彩子[1]，池谷鉄兵[1]，彦根佑哉[1]，岡田真由[1]，田岸亮馬[1]，八木宏昌[2]，木川隆則[2]，三島正規[1]，伊藤隆[1]（[1]首都大学東京大学院　理学研究科，[2]理化学研究所　生命機能科学研究センター）

P17　花成ホルモン蛋白質のNMR解析および^{19}F-NMRスクリーニング

○安澤すあい[1]，新家粧子[2]，古板恭子[2]，小篭蒼[1]，田岡健一郎[3]，辻寛之[3]，藤原敏道[2]，児嶋長次郎[1,2]（[1]横浜国立大学　理工学府，[2]大阪大学　蛋白質研究所，[3]横浜市立大学　木原生物学研究所）

P18　常磁性緩和干渉法（PRI）を用いたTauタンパク質の過渡的構造解析

○川嵜亮祐[1]，楯真一[1,2,3]（[1]広島大学大学院 理学研究科 数理分子生命理学専攻，[2]広島大学大学院 統合生命科学研究科，[3]広島大学 クロマチン動態数理研究拠点）

P19　抗体のNMR解析のための安定同位体標識法の開発と応用

○谷中冴子[1,2]，與語理那[1,2]，山崎俊夫[3]，宮ノ入洋平[4]，矢木宏和[2]，加藤晃一[1,2]（[1]自然科学研究機構　生命創成探究センター/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　放射光科学研究センター，[4]大阪大学　蛋白質研究所）

P20　光構造スイッチ型抗菌ペプチドGF-17の活性と構造

○長島敏雄，山崎俊夫，石井佳誉（理化学研究所　放射光科学研究センター）

P21　α－シヌクレイン変異体の残存構造のNMR解析

○西村千秋（帝京平成大学　薬学部）

P22　ヒストンシャペロンNAP1の酸性領域とヒストンH2A-H2Bとの結合様式

○大友秀明，栗田順一，森脇義仁，津中康央，西村善文（横浜市立大学　生命医科学研究科）

P23　常磁性NMRを用いたYeast Ubiquitin hydrolase 1（YUH1）の構造決定及びダイナミクス解析

○立石泰[1]，池谷鉄兵[1]，岡田真由[1]，三島正規[1]，美川務[1,2]，八木宏昌[2]，河野俊之[3]，木川隆則[2]，伊藤隆[1,2]（[1]首都大学東京・理学部化学科，大学院理学研究科化学専攻，[2]理化学研究所・生命機能科学研究センター，[3]北里大学・医学部）

P24　NMRによる種々の水素結合の検出

○高田夢人，伊藤隆，三島正規（首都大学東京・理学研究科）

P25　シアノバクテリア由来GAFドメインのNMRによる構造解析

○小泉太貴[1]，会津貴大[1]，伊藤隆[1]，広瀬侑[2]，三島正規[1]（[1]首都大学東京大学院 理学研究科，[2]豊橋技術科学大学 大学院工学研究科）

P26　フェレドキシンタンパク質の水素結合の直接観測

○中島弘稀[1]，小泉太貴[1]，伊藤豊[1]，海野昌喜[2]，三島正規[1]（[1]首都大学東京理学研究科，[2]茨城大学大学院理工学研究科）

P27　溶液NMR法を用いた界面活性剤ミセル中における膜タンパク質の比較構造解析

○鈴木里佳[1]，吉田真帆子[1]，廣畑雅史[1]，村田武士[2]，小島慧一[3]，須藤雄気[3]，高橋栄夫[1]（[1]横浜市立大学大学院生命医科学研究科，[2]千葉大学大学院　理学研究院，[3]岡山大学大学院　医歯薬総合研究科　薬学系）

P28　アドレナリン受容体細胞内第三ループとGPCRモジュレーターspinophilinとの相互作用解析

○黒川優香[1]，葛貫絵梨奈[1]，浦野智子[1]，島崎安希子[1]，河野俊之[2]，細田和男[1]，寺脇慎一[1]，若松馨[1]（[1]群馬大学大学院　理工学府，[2]北里大学大学院　医療系研究科）

P29　非常に高い活性を有する抗プリオンRNAアプタマーの構造機能相関

真嶋司[1,2], Joon-Hwa Lee[3], 鎌足雄司[4], 林智彦[1], 木下正弘[1,2], 桑田一夫[5], ○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]Department of Chemistry and Research Institute of Natural Science, Gyeongsang National University, [4]岐阜大学　科学研究基盤センター, [5]岐阜大学大学院　連合創薬医療情報研究科)

P30　腸球菌のバンコマイシン耐性の原因蛋白質 VanX の二量体構造の解析

○土屋智恵子[1], 小沼剛[1], 西田真之[1], 長土居有隆[2], 池上貴久[1] ([1]横浜市立大学大学院 生命医科学研究科 生命医科学専攻, [2]ブルカージャパン株式会社)

P31　分子混雑環境下のRas蛋白質の動態解析

○亀井駿[1], 池谷鉄兵[1], 田仲加代子[2], 伊藤隆[1] ([1]首都大学東京大学院　理学研究科, [2]Department of Molecular and Cell Biology, University of Leicester)

P32　Structural comparion of RNA binding domains between RbpD and other Rbps from cyanobacterium *Anabaena variabilis*

○森田勇人[1], 杉木俊彦[2], 児嶋長次郎[2,3], 林秀則[4], 佐藤直樹[5] ([1]城西大学理学部, [2]大阪大学蛋白質研究所, [3]横浜国立大学大学院工学研究院, [4]愛媛大学大学院理工学研究科, [5]東京大学大学院総合文化研究科)

P33　創薬のための生物物理学的アプローチ

○鎌足雄司[1,2] ([1]岐阜大学 研究推進・社会連携機構 科学研究基盤センター 機器分析分野, [2]岐阜大学 大学院連合創薬医療情報研究科 創薬科学専攻)

P34　溶液NMRを用いたATP-タンパク質相互作用の解析

○西澤茉由[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)

P35　排水処理膜のファウリング予測に寄与する重要因子探索

○横山大稀[1], 朝倉大河[1], 松本朋子[1], 菊地淳[1,2,3] ([1]理化学研究所環境資源科学研究センター, [2]横浜市立大学大学院生命医科学研究科, [3]名古屋大学大学院生命農学研究科)

P36　魚類における入出力代謝応答の評価系構築

○藤村哲平[1], 坂田研二[2], 菊地淳[1,2,3] ([1]横浜市立大学大学院 生命医科学研究科, [2]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, [3]名古屋大学大学院 生命農学研究科)

P37　データサイエンスによる肉質と魚類共生系の関係性探索

○村田泉[1], 朝倉大河[2], 菊地淳[1,2,3] ([1]横浜市立大学大学院　生命医科学研究科, [2]理化学研究所CSRS, [3]名古屋大学大学院　生命農学研究科)

P38　成分・物性のNMR情報因子を駆使した水産餌料の最適化戦略

○朝倉大河[1], 伊藤研悟[1], 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)

P39　1D-MRIと疑似スペクトル画像法による魚肉の多変量解析

○魏菲菲[1], 伊藤研悟[1], 坂田研二[1], 朝倉大河[1], 菊地淳[1,2,3] ([1]理研CSRS, [2]横市大院・生命医, [3]名大院・生命農)

P40　NMRスペクトルを指標としたアミロイドβ42凝集阻害物質の探索

今前田大朗[1], 久米田博之[2,3], 久保研二[4], 渡邉輝[4], 倉賀野正弘[4], 相沢智康[2,3], 関千草[4], 中野博人[4], 徳樂清孝[4], ○上井幸司[4] ([1]室蘭工業大学応用理化学系学科, [2]北海道大学大学院　先端生命科学院, [3]北海道大学大学院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, [4]室蘭工業大学大学院工学研究科)

P41　完全重水素化シクロデキストリンの化学酵素合成と糖脂質のNMR解析

○山口芳樹[1,2], 眞鍋史乃[1], Peter Greimel[1], 伊藤幸成[1] ([1]理研, [2]東北医科薬科大)

P42　^{31}P-NMRを用いたナノディスクの組成解析

○中村光咲[1], 杉木俊彦[2], 藤原敏道[2], 児嶋長次郎[1,2] ([1]横浜国立大学大学院　理工学府, [2]大阪大学　蛋白質研究所)

P43　水溶液中の重原子イオンの希釈-濃縮シフトに影響を及ぼす相対論的効果の研究
○佐藤立樹，田崎健太，横山拓海，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）

P44　NMRによる濃厚電解液の溶液状態の解析
○木村一雄，青木靖仁，松田景子（株式会社 東レリサーチセンター）

P45　重原子を配位したキレート化合物中の原子に現れる相対論的効果の検討
○朝倉由光，富岡優充，中谷幸人，桑原大介，中川直哉（電気通信大学大学院情報理工学研究科）

P46　NMRマイクロプローブとスピントラッピングESRを用いた酸化チタンの光反応解析
○金折賢二，住吉政則，會見宗平，三宅祐輔，田嶋邦彦（京都工芸繊維大学　分子化学系）

P47　半整数四極子核の固体高分解能MQMASとSTMAS測定におけるSPAM法の活用
○佐々木彬子[1]，堤遊[1]，Jean-Paul Amoureux[2]（[1]ブルカージャパン株式会社，[2]リール大学）

P48　三次元拘束磁場下にある微結晶懸濁体のin situ固体NMR
○久住亮介[1]，門間啓[1]，和田昌久[1]，木村恒久[1]，武田和行[2]（[1]京都大学大学院　農学研究科，[2]京都大学大学院理学研究科）

P49　高磁場MAS-DNP固体NMRによる核偏極の空間的不均一性を反映する超偏極率測定法の開発
○杉下友晃[1]，松木陽[1,2]，藤原敏道[1,2]（[1]大阪大学　蛋白質研究所，[2]大阪大学先導的学際研究機構　量子情報・量子生命研究部門）

P50　Accurate ^{1}H–^{14}N distance measurements by phase-modulated RESPDOR at very fast MAS of 70 kHz
○Nghia Tuan Duong[1], Federica Rossi[2], Maria Makrinich[3], Amir Goldbourt[3], Michele R. Chierotti[2], Roberto Gobetto[2], Yusuke Nishiyama[1,4] ([1]NMR Science and Development Division, RIKEN SPring-8 Center, and Nano- Crystallography Unit, RIKEN-JEOL Collaboration Center, [2]Department of Chemistry and NIS Centre, University of Torino, [3]School of Chemistry, Raymond and Beverly Sackler Faculty of Exact Sciences, Tel Aviv University, [4]JEOL RESONANCE Inc.)

P51　固体NMR測定におけるAdiabatic Pulseを用いた溶媒信号抑制パルスの開発
松永達弥[1]，○岡部遼太郎[2]，石井佳誉[1,2]（[1]理化学研究所放射光科学研究センター NMR研究開発部門，[2]東京工業大学生命理工学院）

P52　New Progress toward High-Dimensional Biomolecular SSNMR
○高橋涼[1]，松永達弥[2]，神原孝之[1]，石井佳誉[1,2]（[1]東京工業大学生命理工学院，[2]理化学研究所放射光科学研究センターNMR研究開発部門）

P53　In situ光照射固体NMRによるレチナール結合光受容膜タンパク質（SRII, SRI, bR）の中間体の観測と光反応サイクルの解明
○内藤晶[1]，槙野義輝[2]，重田安里寿[2]，川村出[1]（[1]横浜国立大学　大学院工学研究院，[2]横浜国立大学　大学院工学府）

P54　水和脂質膜中での高度不飽和脂肪酸脂質の運動性解析
○大田英和，梅川雄一，花島慎弥，土川博史，村田道雄（大阪大学大学院　理学研究科）

P55　固体NMRによるフェニルアラニンジペプチドの自己組織化ファイバーの構造解析
○川村出[1,2]，尾澤夢実[2]，Mijiddorj Batsaikhan[2,3]，茅野洋平[1]，佐藤久子[4]，上田一義[2]，内藤晶[2]（[1]横浜国立大学大学院理工学府，[2]横浜国立大学 大学院工学府，[3]モンゴル国立大学，[4]愛媛大学）

P56　Practical study of protein measurement by ^{1}H detection MAS solid-state NMR
○張欣，田巻初，藤原敏道（大阪大学蛋白質研究所）

P57　好熱菌H+-ATP合成酵素サブユニットcリングの膜内構造の精密化

○戸所泰人[1]，姜秀珍[2,3]，鈴木俊治[4]，吉田賢右[4,5]，池上貴久[6]，藤原敏道[3]，阿久津秀雄[3,6]（[1]阪大・理，[2]ソウル大，[3]阪大・蛋白研，[4]東工大，[5]京産大，[6]横市大・生命医科学）

P58　固体NMRを用いたAβ(1-42)線維へのEGCG添加による構造変化の検出

○藤田健太郎[1]，松田勇[1]，石黒貴也[1]，石井佳誉[1,2]（[1]東京工業大学　生命理工学院，[2]理化学研究所　放射光科学研究センター　NMR研究開発部門）

P59　タンパク質の固体NMR分解能向上のための側鎖選択的重水素標識法の開発

○宮崎勇輝[1]，高橋涼[1]，松田勇[1]，山崎俊夫[2]，石井佳誉[1,2]（[1]東京工業大学生命理工学院，[2]理研RSC NMR部門）

P60　固体NMRによる異種Aβ間相互作用の解析

○石黒貴也[1]，松田勇[1]，石井佳誉[1,2]（[1]東京工業大学　生命理工学院，[2]理化学研究所　放射光科学研究センター）

P61　Towards in-cell DNP MAS NMR spectroscopy of α-synuclein

○Jaka Kragelj[1], Julita Chlebowicz[2], Rupam Ghosh[1], Yiling Xiao[1], Barbara Stopschinski[2], Marc Diamond[2], Kendra Frederick[1] ([1]Department of Biophysics, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, USA, [2]Center for Alzheimer's and Neurodegenerative Diseases, University of Texas, Southwestern Medical Center, Dallas, USA）

P62　固体NMRによるポリビニルピロリドン中の水の状態分析

○石田宏之，中田克，古島圭智，松田景子（株式会社東レリサーチセンター）

P63　分子性ナノ細孔によって安定化された人工Xeハイドレートにおける Xe吸蔵挙動

○中山連太朗，今泉卓，鈴木陽，亀渕萌，田所誠（東京理科大学理学部第一部化学科）

P64　β-グルカンの無秩序ー秩序構造転移の解明

○甲野裕之[1]，近藤修啓[2]，平林克樹[2]，尾形慎[3]（[1]苫小牧工業高等専門学校，[2]伊藤忠製糖株式会社，[3]福島工業高等専門学校）

P65　木綿布に存在する水とセルロースの分子運動性解析

○笹原久武，五十嵐崇子，中村浩一（花王株式会社）

P66　リコンビナントクモ糸の産業化に果たすNMRの役割

○朝倉哲郎[1]，松田裕生[1]，内藤晶[1]，佐藤健大[2]，安部佑之介[2]，菅原潤一[2]（[1]東京農工大学大学院　工学研究科，[2]スパイバー（株））

P67　^{19}F 固体NMRによるタイソナイト型フッ化物のイオン伝導の研究

○村上美和[1]，嶺重温[2]（[1]京都大学　産官学連携本部，[2]兵庫県立大学大学院　工学研究科）

P68　親水性ナノ細孔で安定化されたCO_2ハイドレートの ^{13}C-NMR スペクトル解析

○今泉卓，中山連太朗，鈴木陽，亀渕萌，田所誠（東京理科大学 理学部第一部化学科）

P69　高圧環境下における配位高分子内部の二酸化炭素の運動

○犬飼宗弘[1]，栗原拓也[2]，野田泰斗[2]，中村浩一[1]（[1]徳島大学大学院　社会産業理工学研究部，[2]京都大学大学院理学研究科）

P70　ガラス溶解によって生じる表面変質層の多核固体NMRによる解析

○古谷健太，大窪貴洋（千葉大学大学院　融合理工学府）

P71　石炭の固体NMR線形分離のための多変量解析法の応用

○奥下慶子[1]，畑友輝[1]，杉本義一[2]，高橋貴文[1]，金橋康二[1]（[1]日本製鉄株式会社，[2]産業技術総合研究所）

P72　生分解性ポリマーの構造・物性データサイエンス

○山脇涼[1]，坪井裕理[2]，鄭章代[2]，伊藤研悟[1,2]，菊地淳[1,2,3]（[1]横浜市立大学大学院 生命医科学研究科，[2]理化学研究所 環境資源科学研究センター，[3]名古屋大学大学院 生命農学研究科）

P73　重水素NMRによる細孔径の異なる活性炭素繊維へ吸着挙動の検討

○出田圭子[1]，下林佑輝[2]，中林康治[1,2]，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府）

P74　超高速MASのLIB正極材解析への応用－NMR、XRD、TEMを相補的に用いた構造およびサイクル劣化挙動解析－

○矢澤宏次[1]，佐々木義和[2]，田渕光春[3]（[1]（株）JEOL RESONANCE，[2]日本電子（株），[3]産業技術総合研究所）

P75　固体NMRによるC-S-Hおよび水和aliteの構造解析

○高橋貴文（日本製鉄株式会社　先端技術研究所）

P76　Agマジックサイズクラスターの^{109}Ag CP/MAS NMR シグナルの帰属

○木下誠志[1]，室和希[1]，藏重亘[2]，川脇徳久[2]，根岸雄一[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]東京理科大学　理学部）

P77　水素―金属原子間距離と1H NMRスペクトルの相関

○俣野晃広[1]，青山拓也[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]東北大院理）

P78　結晶多形をとるジシラン化合物の固体NMRスペクトル

○服部峰之[1]，治村圭子[1]，林繁信[1]，西尾正樹[2]，尾本賢一郎[2]，島田真樹[2]，前田啓明[2]，宮地麻里子[2]，山野井慶徳[2]，西原寛[2]（[1]産業技術総合研究所　計量標準，[2]東京大学大学院理学系研究科化学専攻）

P79　*in situ* NMR法によるリチウムイオン電池炭素負極の過充電挙動の解析

○山上登夢[1]，米谷雛[1]，後藤和馬[1]，端健二郎[2]，清水禎[2]，大山貴志[3]，石田祐之[1]（[1]岡山大学大学院　自然科学研究科，[2]国立研究開発法人物質・材料研究機構，[3]オーティス株式会社）

P80　固体NMR測定と量子科学計算によるポーラスカーボンの構造モデリング

○柏原功典[1]，石井佳誉[1,2]，Rodney Ruoff[3]（[1]東京工業大学　生命理工学院，[2]理化学研究所　放射光科学研究センター　NMR研究開発部門，[3]Ulsan National Institute of Science & Technology（UNIST），蔚山、韓国）

P81　^{1}Hおよび^{2}H NMRによるMg共挿入エチレンジアミンの黒鉛層間での運動状態解析

○橋本一樹[1]，後藤和馬[1]，水野元博[2]，堂ノ下将希[3]，北川宏[3]，石田祐之[1]（[1]岡山大学大学院　自然科学研究科，[2]金沢大学大学院　自然科学研究科，[3]京都大学大学院　理学研究科）

P82　化学交換飽和移動（CEST）-MRIプローブとしての新規ホスホリルセリンポリマーの合成と機能評価

○村上知広[1]，山田久嗣[2]，今井宏彦[3]，青山安宏[4]，木村裕[1]，近藤輝幸[1]（[1]京都大学大学院　工学研究科，[2]徳島大学大学院　社会産業理工学研究部，[3]京都大学大学院　情報学研究科，[4]京都大学）

P83　超偏極^{13}CMRIの高速撮像法の開発

○菅井秀斗，松元慎吾（北海道大学大学院　情報科学研究科　生命人間情報科学専攻 磁気共鳴工学研究室）

P84　ラミネートLi全固体電池の低磁場1TeslaによるNMR/MRI計測

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）

P85　9.4Tesla-MRIを用いて生体マウス腎の^{23}Naナトリウム分布を可視化する

○拝師智之[1]，悴田亮平[2]，成田一衛[3]，佐々木進[3]（[1]株式会社エム・アール・テクノロジー（つくば市），[2]新潟大学大学院医歯学総合研究科，[3]新潟大学工学部）

P86　周期的刺激と独立成分解析を用いたマウス嗅覚応答の機能的MRI研究

○武田光広，林芙優，杠直哉，吉永壮佐，寺沢宏明（熊本大学大学院　生命科学研究部）

P87　In-cell NMR法を用いたヒト生細胞内のDNAおよびRNAの構造安定性評価

○山置佑大[1]，永田崇[1,2]，高見昇平[2]，阪本知樹[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）

P88 **Toward automatic metabolite identification by machine learning of observed and simulated NMR spectra**

○張金哲[1,2]，寺山慧[2,3,4]，隅田真人[2]，伊藤研悟[5]，菊地淳[5]，津田宏治[1,2,6]（[1]東京大学大学院新領域創成科学研究科，[2]理化学研究所　革新知能統合研究センター，[3]理化学研究所　メディカルイノベーションハブ，[4]京都大学大学院　医学研究科，[5]理化学研究所　環境資源科学研究センター，[6]物質・材料研究機構）

P89 **粘土鉱物に吸着したCsのケミカルシフトと構造の関係**

○武井滉洋[1]，大窪貴洋[1]，舘幸男[2]，深津勇太[2]（[1]千葉大学大学院　融合理工学府，[2]日本原子力研究開発機構　核燃料サイクル工学研究所）

P90 **分極剤濃度が高磁場DNP効率に与える影響のスピン拡散を考慮した高速定量的シミュレーションによる評価**

○深澤隼，藤原敏道，松木陽（大阪大学　蛋白質研究所）

P91 **Nearly complete assignments for 23kDa membrane protein by solid-state NMR using MagRO system assisted by Graph_Robot based on finite automaton theory.**

○小林直宏，長島敏雄，山崎俊夫（理化学研究所 放射光科学研究センター）

P92 **PHIP-SAH法を用いた腫瘍における超偏極^{13}Cピルビン酸の代謝MRI技術の開発**

○加瀬優希[1]，Neil J Stewart[2]，平田拓[2]，松元慎吾[2]（[1]北海道大学大学院　情報科学研究科　情報科学専攻　生体情報工学コース，[2]北海道大学大学院　情報科学研究科　生命人間情報科学専攻）

P93 **バルク超伝導磁石のためのパッシブシムの検討**

○仲村高志[1]，高橋雅人[1]，井上夏希[2]，岡徹雄[2]（[1]理化学研究所　RSC NMR研究開発部門，[2]芝浦工業大学工学部材料工学科）

P94 **片側開放型NMRを用いたマグロ肉の脂質の非侵襲計測**

○中島善人（産業技術総合研究所 地圏資源環境研究部門）

P95 **磁気共鳴法によるゴムの架橋評価**

○原英之（ブルカージャパン株式会社　バイオスピン事業部）

P96 **パラ水素誘起偏極法によるINEPT型^{13}C NMR計測手法の開発**

○友広潤志，J.Neil Stewart，平田拓，松元慎吾（北海道大学大学院　情報科学研究科　生命人間情報科学専攻）

第58回電子スピンサイエンス学会年会（SEST2019）プログラム

11月7日(木)

口頭会場（ホールB） 講演者	口頭会場（ホールB） 座長	ポスター会場（ホールC）
開会	稲波修 北海道大	ポスター展示
J1-1 佐藤将也 東京大		
J1-2 岩田菜々 埼玉大		
J1-3 薛 冬 筑波大		
J1-4 山田 瑛葉 新潟大		
休憩（10分）		
B1-1 田中秀数 東工大	太田仁 神戸大	
B1-2 金子 侑樹 筑波大		
B1-3 齋藤 佑 神戸大	田中秀数 東工大	
B1-4 中村敏和 分子研		
昼休み		
S1-1 松本 陽 大阪大	立石健一郎 理研	ポスター展示
S1-2 熊田 高之 原研		
S1-3 松元慎吾 北海道大	熊田高之 原研	
S1-4 立石 健一郎 理研		
		ポスター 発表
B1-5 中川公一 弘前大	安井博宣 北海道大	ポスター展示
B1-6 堀谷正樹 佐賀大		
B1-7 山本久美子 北海道大	山田健一 九州大	
B1-8 田嶋邦彦 京都工繊大		
B1-9 田中滉大 大阪市大		
理事会（NMR討論会）		

11月8日(金)

口頭会場（ホールB） 講演者	口頭会場（ホールB） 座長	ポスター会場（ホールC）
S2-1 Kiminori Maeda Saitama Univ.	河合明雄 神奈川大	ポスター展示
S2-2 Christopher W. M. Kay Univ. of Saarland		
S2-3 Christopher J. Wedge Univ. of Huddersfield		
休憩（10分）		
I2-1 Hirona Takahashi Okayama Univ. of Science	三浦智明 新潟大	
I2-2 Jonathan R. Woodward The Univ. of Tokyo		
B2-1 Tomoaki Miura Niigata Univ.	J. R. Woodward 東京大	
B2-2 矢後友暁 Saitama Univ.		
昼休み		
会員集会・授賞式		ポスター展示
休憩（5分）		
Y2-1 荒田敏昭 大阪市大	三野広幸 名古屋大	
Y2-2 藤原敏道 大阪大	藤井裕 福井大	
休憩（65分）		
Y2-3 杉﨑研司 大阪市大	工位武治 大阪市大	
Y2-4 高橋英幸 神戸大	大道英二 神戸大	
Y2-5 三宅祐輔 京都工繊大	河合明雄 神奈川大	

11月9日(土)

口頭会場（ホールB） 講演者	口頭会場（ホールB） 座長	ポスター会場（ホールC）
B3-1 松岡秀人 大阪市大	矢後友暁 埼玉大	ポスター展示
B3-2 松尾太亮 埼玉大		
B3-3 脇川祐介 静理工大		
休憩（10分）		
B3-4 河村佳歩 筑波大	脇川祐介 静理工大	
B3-5 杉山佑樹 大阪大		
B3-6 岩崎義己 大阪府大	中村敏和 分子研	
B3-7 栗田伸之 東工大		
B3-8 Takuma Sato Univ. of Tsukuba		
休憩（10分）		
B3-9 小林正 大分大	平田拓 北海道大	
B3-10 藤井泰範 国立天文台		
B3-11 房 知輝 北海道大	浅田瑞枝 分子研	
B3-12 荒田敏昭 大阪市大		
昼休み		
S3-1 三野広幸 名古屋大	生駒忠昭 新潟大	
S3-2 池谷鉄兵 首都大	竹内恒 産総研	
休憩（10分）		
B3-13 加藤賢 大阪市大	三宅祐輔 京都工繊大	
B3-14 小林広和 昭和大		
B3-15 櫻井康博 京都工繊大	前田公憲 埼玉大	
B3-16 杉﨑研司 大阪市大		
B3-17 本橋 真優 筑波大		

役員会18：00～20：00（会議室3,4）
若手の会18：00～20：00（会議室1,2）

懇親会18：30～ ホテル精養軒

口頭発表

11 月 7 日（木） SEST 会場（ホール B）

9:05 開会

【優秀講演賞エントリー講演】

9:10 一般講演（座長：稲波修）

J1-1 **蛍光顕微鏡と TROA 顕微鏡による任意波形パルス RYDMR 法の確立**
○佐藤将也[1], 前田公憲[2], 菅原道彦[3], ウッドワード ジョナサン[1]
[1]東京大学大学院総合文化研究科, [2]埼玉大学理工学研究科, [3]慶應義塾大学理工学部化学科

J1-2 **バインディングポケット内部で生成するラジカル対のダイナミクス**
○岩田菜々[1], 前田公憲[1]
[1]埼大院理工

J1-3 **PTzBT:ITIC:PCBM 高分子太陽電池の電荷状態と素子特性劣化機構の光誘起 ESR 分光研究**
○薛 冬[1]・斎藤 慎彦[2]・尾坂 格[2]・丸本 一弘[1,3]
[1]筑波大数物・[2]広島大院工・[3]筑波大エネ物質科学セ

J1-4 **Perylene diimide をドープした Poly(*N*–vinylcarbazole)薄膜における光伝導に対する磁場効果**
○山田 瑛葉, 三浦 智明, 生駒 忠昭
新潟大院自然

休憩（10:30～10:40）

【固体電子物性】

10:40 一般講演（座長：太田仁）

B1-1 **量子スピンダイマー磁性体 $Ba_2NiSi_2O_6Cl_2$ の多周波 ESR**
○田中秀数[1], 小池暢人[1], 栗田伸之[1], 渡邉正理[1],赤木暢[2], 奥谷顕[2], 萩原政幸[2]
[1]東工大理・[2]阪大先端強磁場

B1-2 **発光性有機高分子を用いたトランジスタにおける電荷状態の ESR 分光研究**
○金子 侑樹[1]・山添 昌人[1]・勝俣 潤哉[1]・丸本 一弘[1,2]
[1]筑波大数物・[2]筑波大エネ物質科学セ

11:20 一般講演（座長：田中秀数）

B1-3 **ペロブスカイト化合物 $YTiO_3$ の X–バンド ESR 測定：Ti-3d^1 軌道とその方向依存性**
○齋藤 佑[1], 大久保 晋[2], 鬼頭 俊介[3,4], 有馬 孝尚[5], 田口 康次郎[5], 澤 博[3], 太田 仁[2]
[1] 神戸大 研究基盤セ・[2] 神戸大 分子フォトセ・[3] 名古屋大院工 応用物理・[4] 分子研 物質分子科研・[5] 理研 創発物性科研セ

B1-4 **$[DM\text{-}MeDH\text{-}TTP]_2X$ 系の示す異常な ESR 挙動**
○中村敏和[1], 江幡健太[2], 宮本尚[2], 西川浩之[2]
[1]分子研・[2]茨城大院理工

昼休み（11:52～13:10）

【合同セッション: 電子スピンと核スピンの協奏 －動的核偏極(DNP)を中心に】
（理研シンポジウムとの共催）

13:10 招待講演（座長：立石健一郎）

S1-1 **高磁場極低温 DNP による超分極の空間分布定量法と**
メソスケール分子ドメイン選択観測法
○松木 陽，杉下友晃，藤原敏道
大阪大学蛋白質研究所

S1-2 **偏極中性子と水素核偏極試料を用いた複合材料の構造研究**
○熊田 高之
原子力機構 物質セ

13:50 招待講演（座長：熊田高之）

S1-3 **超偏極 ^{13}C MRI 代謝イメージングと抗がん治療評価**
○松元慎吾 [1]， Murali C. Krishna[2]
[1] 北海道大学 大学院情報科学研究院
[2] 米国立がん研究所 放射線生物学部門

S1-4 **光励起電子スピンを用いた動的核偏極－超偏極溶液 NMR に向けて**
○立石 健一郎 [1,2]，上坂 友洋 [1,2]
[1] 理化学研究所・開拓研究本部
[2] 理化学研究所・仁科加速器科学研究センター

ポスター発表（14:30～16:00）

【ESR を用いた生化学】

16:00 一般講演（座長：安井博宣）

B1-5 **電子スピン共鳴法による基底細胞がんの研究**
○中川公一 [1,i]・皆川智子 [2]・澤村大輔 [2]
弘前大院保健 [1]・弘前大院医 [2]

B1-6 **好冷細菌由来無機ピロフォスファーゼの低温適応機構**
○堀谷正樹 [1]，楠林和貴 [1]，大嶋杏佳 [1]，杉本宏 [2]，渡邉啓一 [1]
[1] 佐賀大学農学部・[2] 理化学研究所播磨研究所

16:40 一般講演（座長：山田健一）

B1-7 **ESR 法を用いた培養細胞における細胞外 pH 評価法の開発**
○山本久美子 [1]，安井博宣 [1]，藤本政毅 [1]，房知輝 [1]，Valery V. Khramtsov [2]，
平田拓 [3]，稲波修 [1]
[1] 北大院獣・[2]West Virginia Univ.・[3] 北大院情報

B1-8 **スーパーオキシドラジカルとフェノール誘導体の 2 次反応速度定数の**
pH 依存性と酸化還元反応機構
○田嶋邦彦、山下智之、盧 瑶、櫻井康博、三宅祐輔、金折賢二
京工繊大

B1-9 **フェロセン置換型 1.3-ジアゼチジン-2.4-ジイミンで架橋された**
ニトロキシドビラジカルの酸化状態
○田中滉大 [1]，杉崎研司 [1]，松岡秀人 [1]，Irina Bagryanskaya [2,3]，
Larisa Gurskaya [2,3]，Evgeny Tretyakov [2,3]，工位武治 [1]，佐藤和信 [1]
[1] 阪市大院理・[2] ノボシビルスク有機化学研・[3] ノボシビルスク大

11 月 8 日（金） SEST 会場（ホール B）

【合同セッション: 光を用いたスピン偏極生成と磁気共鳴計測】

9:00 招待講演（座長：河合明雄）

S2-1 **Radical pairs in proteins**

Kiminori Maeda

Department of Chemistry, Graduate School of Science and Engineering, Saitama University.

S2-2 **Observation of Singlet fisson in Ordered Thin Films of Pentacene in *p*-Terphenyl at Room Temperature**

Christopher W. M. Kay[1,2]

[1]Department of Chemistry, University of Saarland, Saarbücken, Germany.

[2]London Centre for Nanotechnology, University College London, London, UK.

S2-3 **Exploiting Radical Triplet Pair Hyperpolarization for Sensitivity Enhancement in Solution-State NMR**

Matthew W. Dale[1], Daniel Cheney[2] and Christopher J. Wedge[2]

[1] Department of Physics, University of Warwick, Coventry, UK.

[2] School of Applied Sciences, University of Huddersfield, Huddersfield, UK.

休憩（10:30～10:40）

【スピン対動力学】

10:40 招待講演（座長：三浦智明）

I2-1 **Photoinduced Dynamic Electron Polarization Generated by the Interaction between Excited Triplet States of Xanthene Dyes and Nitroxide**

Hirona Takahashi,[1] Toshihiro Tamura,[2] Keisuke Yokoyama,[2] and Akio Kawai[3]

[1]Department of Chemistry, Okayama University of Science, Japan; [2]Department of Chemistry, Tokyo Institute of Technology, Japan; [3]Department of Chemistry, Kanagawa University, Japan

I2-2 **Can and should we study spin effects on single radical pairs?**

Jonathan R. Woodward[1], Noboru Ikeya[1]

Graduate School of Arts and Sciences, The University of Tokyo, Tokyo, Japan

11:20 一般講演（座長：Jonathan R. Woodward）

B2-1 **Simultaneous Measurement of Transient Photocurrent and Optical Absorption of Organic Semiconductor Thin Films**

Tomoaki Miura, Ryoya Akiyama, Akiha Yamada, So Kobayashi, Naoya Muramatsu, and Tadaaki Ikoma

Graduate School of Science and Technology, Niigata University, Japan

B2-2 **Low Magnetic Field Effects on Triplet Pairs**

Tomoaki Yago

Grad. Sch. of Sci. Eng., Saitama Univ.

昼休み（12:00～13:00）

13:00 会員集会、授賞式

休憩（14:00～14:05）

14:05 学会賞受賞講演（座長：三野広幸）

Y2-1 **先端的スピンラベル ESR 法によるタンパク質作動原理の探究**

○荒田敏昭
大阪市立大院理

14:45 学会賞受賞講演（座長：藤井裕）

Y2-2 **電子スピン分極を利用する高磁場動的核分極による高感度高分解能固体核磁気共鳴実験法の開発**

○藤原敏道 [1]
[1] 阪大蛋白研

休憩（15:25～16:30）

16:30 奨励賞受賞講演（座長：工位武治）

Y2-3 **高スピン開殻系の磁気的性質の量子化学計算手法及び量子コンピュータ量子アルゴリズムの開発**

○杉﨑研司
阪市大院理

16:50 奨励賞受賞講演（座長：大道英二）

Y2-4 **ナノメンブランを用いたテラヘルツ領域における力検出電子スピン共鳴法の開発**

○高橋 英幸 [1,2]
[1] 神戸大学分子フォトサイエンス研究センター・[2]JST さきがけ C

17:10 奨励賞受賞講演（座長：河合明雄）

Y2-5 **ESR 分光法による機能分子の物性および生成機構の分子論的研究**

○三宅祐輔
京都工繊大 分子化学

11 月 9 日（土） SEST 会場（ホール B）

【励起状態と再結合】

9:00 一般講演（座長：矢後友暁）

B3-1 **りん光性有機 EL 発光体の開発に向けたフェナジン誘導体の励起状態研究**
○松岡秀人[1], 松井大樹[1], 秋元郁子[2]
[1]阪市大院理・[2]和大システム工

B3-2 **磁場スイッチング実験による低磁場効果の解析**
○松尾太亮[1], 前田公憲[1]
[1]埼玉大院理工

B3-3 **光電流検出磁気共鳴による有機単膜ダイオードの電荷再結合研究**
○脇川祐介[1], 生駒忠昭[2]
[1]静理工大先端機分セ・[2]新潟大院自然

休憩（10:00～10:10）

【機能性材料】

10:10 一般講演（座長：脇川祐介）

B3-4 **逆構造有機発光ダイオードの ESR 分光研究**
○河村佳歩[1], 祐本晋太郎[1], 勝俣潤哉[1], 神谷晨平[1], 金子侑樹[1], 丸本一弘[1,2]
[1]筑波大数物・[2]筑波大工ネ物質科学セ

B3-5 **液晶中の光磁気効果**
○杉山佑樹, 秋田拓也, 清原大知, 内田幸明, 西山憲和
阪大院基礎工

10:34 一般講演（座長：中村敏和）

B3-6 **ハニカム格子をベースとした特異なスピンモデルの磁場誘起量子物性**
○岩崎義己[1], 細越裕子[1], 川上貴資[2], 木田孝則[3], 萩原政幸[3], 山口博則[1]
[1]阪府大院理・[2]阪大院理・[3]阪大先端強磁場

B3-7 **蜂の巣格子量子磁性体 α-$RuCl_3$ の集団励起**
○栗田伸之[1]・竹田竜二[1]・野尻浩之[2]・田中秀数[1]
[1]東工大理学院・[2]東北大金研

B3-8 **Investigation of paramagnetic defects in $BaSi_2$ by ELDOR-detected NMR**
Takuma Sato,[1,2] Takashi Suemasu[1] and Serge Gambarelli[2]
[1] Institute of Applied Physics, University of Tsukuba, Tsukuba, Japan;
[2] Université Grenoble Alpes, CEA, CNRS, IRIG, SyMMES, Grenoble, France

休憩（11:10～11:20）

【装置開発と医生物学応用】

11:20 一般講演（座長：平田拓）

B3-9 **電磁ホーン型 ESR 装置の開発と応用**
○小林正[1],金沢誠司[1],戸高孝[1],上田徹[1], 鵜澤佳徳[2],藤井泰範[2]
[1]大分大・[2]国立天文台

B3-10 **電磁ホーン型ＥＳＲ：透過測定再挑戦**

○藤井泰範[1], 鵜澤佳徳[1], 上田徹[2], 小林正[2]
[1]国立天文台・[2]大分大学

11:52 一般講演（座長：浅田瑞枝）

B3-11 **次世代近赤外光免疫療法に用いられる水溶性フタロシアニン誘導体 IR700 のアニオンラジカル形成機構**

房 知輝[1], 平岡 和佳子[2]、後藤 悠人[3], 高倉 栄男[3], 小川 美香子[3]、○稲波 修[1]
[1]北海道大学大学院獣医・ [2]明治大学理工、[3]北海道大学大学院薬学

B3-12 **スピンラベルＥＳＲによるヘテロクロマチンタンパク質ＨＰ１の動的構造の研究：アイソフォーム特異性とリン酸化**

○荒田敏昭[3,4],佐藤和信[5],中澤重顕[5],三島優一[4],工位武治[5],川上徹[4],北條裕信[4],藤原敏道[4],宮田真人[3],末武勲[1,2,4]
[1]甲子園大,[2]阪大ツインリサーチセンター,[3]阪市大院理生物,[4]阪大蛋白研,[5]阪市大院理化学

昼休み（12:32～13:30）

【合同セッション: タンパク質の立体構造解析 ～ESR と NMR～】

13:30 招待講演（座長：生駒忠昭）

S3-1 **パルス ESR 法を用いたタンパク質間相互作用及び反応中心の解明**

○三野 広幸[1]
[1]名古屋大学・理学研究科

14:00 招待講演（座長：竹内恒）

S3-2 **常磁性効果による遠距離構造情報を利用したタンパク質 multi-state 立体構造解析**

○池谷 鉄兵[1], 立石 泰[1], 岡田真由[1], Peter Güntert[1,2,3], 伊藤 隆[1]
[1]首都大学東京大学院・理学研究科化学専攻
[2]ドイツ フランクフルトゲーテ大学
[3]スイス連邦工科大学チューリッヒ校

休憩（14:30～14:40）

【電子状態と反応機構】

14:40 一般講演（座長：三宅祐輔）

B3-13 **TIPS-ペンタセンおよびペンタセンラジカル誘導体の光電流挙動と電気的検出磁気共鳴測定**

○加藤賢・清水章皓・手木芳男
阪市大院理

B3-14 **PMMA マトリクス中の nitronylnitroxide および iminonitroxide ラジカルの ESR 測定**

○小林広和[1], 秋庭健人[2], 岩堀史靖[3]
[1]昭和大教・[2]日大院総合基礎科学・[3]日大文理

15:20 一般講演（座長：前田公憲）

B3-15 **流通型 ESR 法による大気圧プラズマに由来するラジカルの生成機構解明**

○櫻井康博[1], 山本直子[2], 藪田勇気[2], 亀井龍一郎[2],
三宅祐輔[1], 金折賢二[1], 田嶋邦彦[1]
[1]京都工繊大・[2]誠南工業(株)

B3-16 **量子コンピュータによる量子化学計算：スピン演算子による波動関数の時間発展量子シミュレーション**

○杉﨑研司, 中澤重顕[†], 豊田和男, 佐藤和信, 塩見大輔, 工位武治
阪市大院理

B3-17 **スズペロブスカイト太陽電池材料における電荷状態の ESR 分光研究**

○本橋 真優[1]・木全 晴[1]・浅井 遥香[1]・薛 冬[1]・尾崎 雅司[2]・中村 智也[2]・若宮 淳志[2]・丸本 一弘[1,3]
[1]筑波大数物・[2]京大化研・[3]筑波大エネ物質科学セ

ポスター発表

11 月 7 日（木） ポスター会場（ホール C）

14:30～16:00

P201 **新規正孔輸送材料を用いた鉛ペロブスカイト太陽電池の ESR 研究**
○鄒 湘涛[1], 渡邊 孝弘[1], 木全 晴[1], 薛 冬[1], 嶋﨑 愛[2], 中村 智也[2],
若宮 淳志[2], 丸本 一弘[1,3]
[1]筑波大数物・[2]京大化研・[3]筑波大エネ物質科学セ

P202 **フェルダジル系金属錯体が形成する正方格子モデルの低温磁気状態**
○上本菜央[1], 山口博則[1], 河野洋平[1], 橘高俊一郎[2], 榊原俊郎[2], 萩原政幸[3],
細越裕子[1]
[1]阪府大院理・[2]東大物性研・[3]阪大先端強磁場

P203 **混合ハロゲンスズペロブスカイト太陽電池材料の電荷移動の ESR 分光研究**
○王 奕璜[1], 本橋 真優[1], 鄒 湘涛[1], 木全 晴[1], 薛 冬[1],佐伯 昭紀[2], 中村 智也[3],
若宮 淳志[3], 丸本 一弘[1,4]
[1]筑波大数物・[2]阪大院工・[3]京大化研・[4]筑波大エネ物質科学セ

P204 **移動度の実時間観測による P3HT:PCBM 薄膜のキャリアダイナミクスの研究**
○小林奏[1], 三浦智明[1], 生駒忠昭[1]
[1]新潟大院自然

P205 **Rapid-scan 法による NV^- センターESR 信号の高効率測定**
○牧 祐介[1], 松岡 秀人[2], 秋元 郁子[1]
[1]和大院シス工・[2]阪市大院理

P206 **P3HT 正孔輸送材料を用いた順構造ペロブスカイト太陽電池の ESR 分光研究**
○戴 文超[1], 鄒 湘涛[1], 木全 晴[1], 本橋 真優[1], 薛 冬[1], 中村 智也[2],
若宮 淳志[2], 丸本 一弘[1,3]
[1]筑波大数物・[2]京大化研・[3]筑波大エネ物質科学セ

P207 **極低温・ミリ波帯の電気検出型磁気共鳴測定装置の開発**
○大見謝恒宙[1], 笈田智輝[1], 石川裕也[1], 藤井裕[1], 福田昭[2], 光藤誠太郎[1]
[1]福井大学遠赤外領域開発研究センター・[2]兵庫医科大物理

P208 **高強度マイクロ波パルス照射下における逆スピンホール効果**
○鐘本勝一[1,2], 中橋健太[1],鈴木 貴之[3]
[1]大阪市大院理・[2]南部研 B・[3]（株）JEOL RESONANCE

P209 **ESR を使用した一重項酸素測定法に関する基礎的検討**
○高城徳子, 栗原義暢, 岩瀬弘大, 土田和徳, 安西和紀
日本薬科大学

P210 **Q-band ESR 装置を用いた光キャリアのサイクロトロン共鳴**
○秋元郁子[1], 中暢子[2], 松岡秀人[3]
[1]和歌山大シス工・[2]京大院理・[3]大阪市大院理

P211 **スピンコントラスト粉末結晶構造解析法の開発**
○三浦大輔[1], 熊田高之[2], 岩田高広[1], 宮地義之[1], 元川竜平[2], 関根由梨奈[2],
中川洋[2], 大場洋次郎[2], 大原高志[2], 高田慎一[2], 廣井孝介[2], 森川利明[3],
河村幸彦[3], 大石一城[3]
[1]山形大理・[2]日本原子力開発機構・[3]CROSS 東海

P212 **電気検出磁気共鳴(EDMR)イメージング**
○原英之
Bruker Japan K.K.

P213 **プリオンペプチド銅錯体のレドックスポテンシャル**

○村上周平，平岡和佳子
明治大学大学院理工学研究科

P214 **植物 PSII の初期光電荷分離による立体配置と電荷再結合に対する温度効果**

○尾崎恭佑[1]，長嶋宏樹[2]，尾山真也[1]，三野広幸[3]，立川貴士[1,2]，小堀康博[1,2]，
[1]神戸大院理・[2]神戸大分子フォト・[3]名大院理

P215 **光合成酸素発生系高スピン S_2 状態の起源**

○三野 広幸 1、長嶋宏樹[2]
[1]名大院理・[2]神戸大分子フォト

P216 **154 GHz ジャイロトロンを用いた希釈 BDPA ラジカルの FID 信号の測定と解析**

○堂野壱暉，林哉汰，石川裕也，佐藤丈賀，藤井裕，古屋岳，光藤誠太郎
福井大学遠赤外領域開発研究センター

P217 **非フラーレンアクセプターを用いたブレンド膜の時間分解 EPR**

○岡村芽衣水[1]，濱田守彦[2]，小堀康博[1,2]
[1]神戸大理・[2]神戸大分子フォト

P218 **スピントラップ法によるポリメタクリル酸メチルの劣化反応機構の解明**

○一瀬翔太[1]，木梨憲司[2]，坂井亙[2]，堤直人[2]，前中佑太[3]，新井彩子[3]
[1]京工繊大院・[2]京工繊大材化・[3]三菱ケミカル

P219 **AWG-RYDMR 法によるラジカル対系の反応制御**

○増澤健太[1]，菅原道彦[2]，前田公憲[1]
[1]埼玉大学理工学研究科・[2]慶應義塾大学量子コンピューティングセンター

P220 **8-アミノキノリンを導入したフェノキシルラジカルを配位子に持つ**
コバルト 4 核錯体の電子状態

○芝野 祐樹[1]、杉﨑 研司[1]、松岡 秀人[1]、豊田 和男[1]、塩見 大輔[1]、
Nico M. Bonanno[2]、Alan. J. Lough[3]、Martin T. Lemaire[2]、佐藤 和信[1]、
工位 武治[1]
[1]阪市大院理、[2] Brock University、[3]University of Toronto

P221 **ナフタレンジイミド誘導体の励起状態のダイナミクス**

○芝野祐樹[1]・神崎祐貴[1]・秋元郁子[2]・松岡秀人[1]
[1]阪市大院理、[2]和大システム工

P222 **磁場スイッチング(SEMF)法による FAD 分子のアミノ酸による**
クエンチング反応測定

○佐藤太一[1]，坂下哲弘[1]，Lewis M. Antill[1]，前田公憲[1]
[1]埼玉大院理工

P223 **時間分解 EPR 法による一重項励起子分裂により生成した多重励起子解離機構の解明**

○松田紗季[1]，尾山真也[1]，立川貴士[1,2]，小堀康博[1,2]
[1]神戸大院理・[2]神戸大分子フォト

P224 **スピントラップ法によるポリビニルアルコールの熱劣化反応機構の解析**

○林 知輝[1]，木梨憲司[2]，坂井 亙[2]，堤 直人[2]，藤井彩花[3]・稲田誠亮[3]
[1]京工繊大院工芸科，[2]京工繊大材化，[3]クラレ

P225 **放射線照射により糖類から生成するラジカル量の評価（１）**

○中川清子
都産技研

P226 **塩基性水溶液中での安定ニトロキシドラジカルと Trolox との反応**

○中島暉[1]，長野文子[2]，櫻井康博[3]，田嶋邦彦[3]
[1]宮崎大学フロンティア・[2]宮崎大学医学部・[3]京都工芸繊維大学

P227 **ストップトフローESR 法および光吸収法によるスーパーオキシドラジカルと**
ガロカテキン誘導体の酸化還元反応機構の研究

○中野涼汰、太田 宇、桑原慶子、櫻井康博、三宅祐輔、金折賢二、田嶋邦彦
京都工繊大

P228 **TIPS ペンタセン薄膜の一重項分裂による室温での時間分解 EPR**
○長友敬晃[1]・松田紗季[2]・濱田守彦[3]・小堀康博[1,3]
[1]神戸大理・[2]神戸大院理・[3]神戸大分子フォト

P229 **ゴム材料におけるイオウ架橋構造が示す劣化反応のラジカル解析**
○齊藤桐吾[1]，木梨憲司[2]，坂井亙[2]，堤直人[2]
[1]京工繊大院・[2]京工繊大材化

P230 **時間分解 EPR 法を用いた P3HT：$PC_{70}BM$ ブレンド膜における光誘起電荷ダイナミクスの解明**
○尾山真也[1]，長嶋宏樹[2]，濱田守彦[2]，梅山有和[3]，立川貴士[1,2]，今堀博[3]，小堀康博[1,2]
[1]神戸大院理・[2]神戸大分子フォト・[3]京都大院工

P231 **ヘテロレプティックな二核 Cu(I)錯体の時間分解 EPR スペクトル**
○橋本 祥[1]，浅野素子[1]，兒玉 健[2]，西川道弘[3]，坪村太郎[3]，竹田浩之[4]，石谷 治[5]
[1]群大院理工・[2]首都大院理・[3]成蹊大理工・[4]阪市大 ReCAP・[5]東工大理

P232 **スピントラップ法によるポリウレタンの劣化反応機構の解析**
○藤浪正季[1]，木梨憲司[2]，坂井 亙[2]，堤 直人[2]
[1]京工繊大院工芸科，[2]京工繊大材化

P233 **動的核分極 NMR を用いたリン脂質表面の局所的水和環境解析のためのプローブ合成**
○李ギョレ[1]・景山義之[2]・武田定[2]
1 北大院総化、2 北大院理

P234 **トリプレットフュージョンの 10 T までの磁場効果測定の検討**
○篠原優太，矢後友暁，若狭雅信
埼玉大院理工学研究科

P235 **スピン局在型ニトロキシドを縮環した金属フタロシアニン類縁体の合成と物理化学的性質**
○石原 瞭，土屋 遼，三浦 洋平，吉岡 直樹
慶應大理工

P236 **フッ素系樹脂の熱劣化および変色における分光分析**
○山口陽司・沢井隆利・徳岡麻里子・熊沢亮一
（株）東レリサーチセンター

P237 **偏光励起による五重項状態の効率的形成に関する研究**
○長嶋宏樹[1]，松井康哲[2,3]，河岡秀平[2]，秋本誠志[4]，立川貴士[1,4]，池田浩[2,3]，小堀康博[1,4]
[1]神戸大分子フォト・[2]大阪府大院工・[3]大阪府大 RIMED ・[4]神戸大院理

P238 **フェルダジルをスピン中心とするオリゴラジカルの電子状態**
○関口 亮子，佐藤 拓歩，大島 陸，三浦 洋平，吉岡 直樹
慶應大理工

P239 **塗膜中の光安定剤（HALS）の機能発現と反応機構**
○駒口健治[1]，河邉光祥[2]，湊允哉[2]，早川慎二郎[1]
[1]広島大院工・[2]マツダ㈱技術研究所

P240 **SQUID 磁束計での静磁化検出による Q-バンド円偏波 ESR**
○塩見大輔，佐藤和信，工位武治
阪市大院理

P241 **スピン分極したラジカルの Inversion Recovery 観測を利用したラジカル付加反応速度の新規測定法の開発**
○平野弘樹[1]，高橋広奈[2]，河合明雄[1]
[1]神奈川大学大学院理，[2]岡山理科大学理

P242 **スピントラップ法による高分子材料の光劣化反応機構の解明**
○宇野航平[1]，木梨憲司[2]，坂井亙[2]，堤直人[2]
[1]京工繊大院・[2]京工繊大材化

P243 **高活性 TiO_2 光触媒におけるアナターゼ-ルチル結晶相間の電荷移動反応**
○長谷滉平[1], 高渕翔太[1], 駒口健治[1], 早川慎二郎[1], 井出裕介[2]
[1]広島大院工・[2]MANA

P244 **キサンテン系色素三重項の TEMPO ラジカルによる消光過程と電子スピン分極発生における溶媒依存性**
○寺岡龍哉[1], 高橋広奈[2], 河合明雄[1]
[1]神奈川大院理・[2]岡山理科大学

P245 **ESR 法によるマウス細胞の体積測定法の検討**
○沢井隆利, 中田克, 山口陽司
株式会社東レリサーチセンター

P246 **DSS 誘発大腸炎マウスの大腸における亜硫酸由来ラジカルの産生**
○安川圭司[1], 佐藤泰樹[1], 松尾幸汰[1], 岩﨑将紘[1], トンシン[2],小山 進[1]
[1]第一薬大薬・[2]九大生医研

P247 **CW-EPR による pH/pO_2 同時イメージング法の開発**
○田口 晃裕[1], Stephen De Vience[2], Benoit Driesschaert[2], Valery V. Khramtsov[2], 平田 拓[1]
[1]北大情報科学・[2]ウエストバージニア大医

P248 **紫外線照射によりケトプロフェンが惹起するリポソーム膜傷害の検出**
○岡崎 祥子、宮瀬 のぞみ、有田 瑠名、山田 瑠依、竹下 啓蔵
崇城大薬

P249 **非アルコール性脂肪肝炎の DNP-MRI を用いたレドックス代謝イメージングと代謝反応のレドックス解析**
○兵藤文紀[1]、庄田真一[1]、森崇[2]、高須正規[2]、江藤比奈子[3]、中路睦子[4]、長沼辰弥[4]、富田弘之[1]、村田正治[3]、松尾政之[1]
[1]岐大医・[2]岐大獣医・[3]九大先端医イノベ・[4]日本レドックス

P250 **750-MHz CW-EPR による圧縮センシング再構成画像の評価**
○木村洸太, 平田拓
北大院情報科学

P251 **色素性植物種子の内因性ラジカルに関する研究**
○中川公一[1,i]
弘前大院保健[1]

P252 **EPR 分光のための 750 MHz チューナブル共振器雑音特性の解明**
○中岡梨々子・平田拓
北大情報科学

P253 **L バンド･ラピッドスキャン EPR デジタル分光器の開発**
〇大槻智也, 辻健太郎, 赤羽英夫
阪大院基礎工

P254 **ミリ波二重磁気共鳴測定のための平面型 NMR コイルの最適化**
○笈田智輝[1], 大見謝恒宙[1], 大浦拓実[1], 石川裕也[1], 藤井裕[1], 光藤誠太郎[1], 小林英一[2], 菊池彦光[3]
[1]福井大遠赤セ・[2]福井大工技術部・[3]福井大工

P255 **EPR 生体イメージング用静磁場マグネットの設計**
○岡田侑樹, 辻健太郎, 赤羽英夫
阪大基礎工

P256 **OMRI 可視化範囲拡大のための多チャンネル EPR 励起コイルアレイの開発**
○榎本彩乃[1], 市川和洋[1]
[1]長崎国際大学薬学部

NMR討論会・SEST2019
合同シンポジウム

Joint symposium

S1-1

高磁場極低温DNPによる超分極の空間分布定量法とメソスケール分子ドメイン選択観測法

○松木 陽，杉下友晃，藤原敏道
大阪大学蛋白質研究所

Methods for Quantifying and for Confining Hyperpolarization – 460 GHz/700 MHz DNP MAS NMR using Closed-Cycle He MAS and Double Gyrotron Setup

○Yoh Matsuki, Tomoaki Sugishita, and Toshimichi Fujiwara
Institute for Protein Research, Osaka University

Sensitivity of magic-angle spinning (MAS) solid-state NMR has been dramatically improved by the advent of high-field dynamic nuclear polarization (DNP) techniques and by numerous discussions and breakthroughs made in the past decades for improving the signal enhancement factor. Beyond the discussions on the sensitivity gain, we here propose two new methods to pursuit hitherto under-explored curiosity: a method that enables quantitation of absolute ^{1}H polarization amplitude and its spatial distribution, and a method to confine hyperpolarization for spatially selective observation of mesoscale molecular domains. The former method relies on observation of the high-order spin-correlated term ($2I_zS_z$) intrinsic to a hyperpolarized spin system, separately from the lowest-order Zeeman term (S_z). The latter utilizes our unique double-gyrotron setup and its ability to switch the microwave frequency back and forth over the range of 0.7 GHz in synchrony with the RF pulses. The latest DNP results in these methods will be presented.

動的核分極(DNP)法は電子スピンの高い分極を核スピンに移すことで NMR の感度を二桁程度向上できる発展途上の技術である。マジック角試料回転(MAS)条件下で行う高分解能 DNP MAS NMR 法は、この 20 年ほどで方法論と装置の両面で急速な発展を遂げ、9.4T(^{1}H 周波数で 400 MHz)程の磁場強度、液体窒素を用いて得られる 100K 程度の低温条件において、化学、材料科学、および構造生物学分野で広く利用される技術となった。一方、より高磁場の条件では DNP 効率が急激に悪化する問題があり、改善の余地が大きかった。ここに我々は (i)ヘリウムガスを用いる極低温(~20 K)MAS DNP プローブシステム[3]、(ii)2 台のジャイロトロンから発振する周波数の異なる波を合成して DNP 測定に利用する新規マイクロ波照射システム[2]を開発、世界的にも類を見ない進歩的な DNP NMR 装置を構築した。その他、分極剤の開発などをも含め多角的アプローチで取り組んできたが、これらの結果、DNP による信号増強と試料冷却によるキュリー磁化の増大をあわせた総合感度利得は現状、外部磁場 B_0=16.4 T(同 700MHz，電子スピン共鳴周波数 460GHz)の条件で約 1000 倍を達成するに至った。

本発表では、上記の個性的な DNP 装置を用いることで開かれる新たな応用可能性について議論したい。つまり NMR の感度向上という DNP の最も基礎的な要求の「その先」にある可能性である。具体的には次のような 2 つの新手法を開発中である。(a)分極剤周辺の分極絶対値の空間分布を計測する方法、(b) 超分極を局所的に蓄積して、メソスケール(10-50nm)の分子ドメインを選択的に観測する方法。

動的核分極（DNP）法、高磁場条件、ヘリウム温度、マジック角試料回転(MAS)
○まつきよう、すぎしたともあき、ふじわらとしみち

(a) スピン分極の空間分布定量法

ヘリウム温度DNPによって信号強度が従来の室温NMRの1000倍になったとき、次の興味は「では^{1}Hの絶対分極値は何%なのか」だろう。分極値は分極剤の周りに不均一に分布していると考えられるから、これに正確に答えるのは結構厄介である。試料全体の平均値ではなく局所的に分極値を測る方法が必要になるからである。ここに我々はサブミリ波照射下、高分極化に伴って密度行列内に成長するスピン相関項($2I_zS_z$) のスペクトルと、最低次のゼーマン項 (S_z)のスペクトルを分離して観測できるパルス列を開発した[1]。理論的に両者の強度比(Tr($2I_zS_z$)/Tr(S_z))がIスピンの分極値となる(実験ではI, Sはそれぞれ^{1}H, ^{13}C) 。言ってみれば高温近似の破れ具合を定量し、そこから分極値を逆算する方法である。スピンオーダー$2I_zS_z$は、Iスピン、Sスピンのゼーマンオーダー強度の相乗的な関数として成長するから、空間コントラストを得るのにゼーマンオーダーの空間分布がスピンオーダーのそれにそのまま対応する性質を利用できる。具体的には^{1}Hスピン拡散とe-^{13}C常磁性緩和促進(PRE)効果を組み合わせてナノスペース(<3nm)、メソスペース(<10nm)、ディープメソスペース(<20nm)における分極値を分けて測定することができた(Fig. 1)[1]。

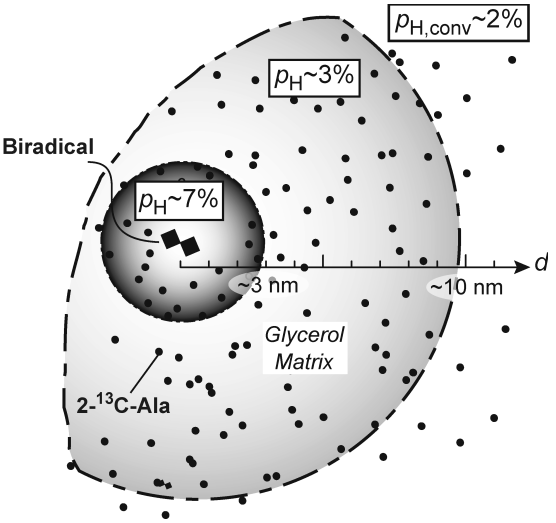


Fig. 1. 計測された ^{1}H 分極の絶対値は分極剤分子から <3nm, <10nm, <20nm の空間で、およそ 7%、3%、2%であった。DNP 試料は重水素化グリセロールマトリクスに溶解した 2-^{13}C-アラニン。分極剤は 20mM AMUPol。T = 45 K, ν_R = 6 kHz, f_{MW}=460.0 GHz。

(b) ^{1}H超分極の局所蓄積によるメソスケール分子ドメイン選択観測法

上述したダブルジャイロトロンシステムを分光計から直接制御し、周波数を~460GHz の周りに ^{1}H 共鳴周波数 0.7 GHz 程度上下しながら、マイクロ波パルスを RF パルスに同期して発振できる様にした。2 つのマイクロ波周波数をそれぞれ正または負の DNP を励起する様に設定し、分極の立ち上がり期間中にこの周波数スイッチングを繰り返すと、分極剤分子周囲の空間に上向き、下向きに増強した超分極がさざ波のように広がる「分極波」を生成できる。正負の分極はスピン拡散の”diffusive”な挙動のせいで、分極剤分子から離れた空間ではランダムに打ち消し合うが、分極剤の極近辺(<10nm)だけは打ち消される前に ^{1}H-^{13}C 交差分極によって ^{13}C スピン分極に足し込み、蓄積できる。この原理でメソスペース選択的な高感度観測が可能になることを示した。

発表では上記二つの手法について、最新の進捗を紹介する。

[文献]

[1] T. Sugishita, Y. Matsuki and T. Fujiwara, *SSNMR* **99**, 20-26, (2019); [2] Y. Matsuki et al., *J. Magn. Reson.* **264**, 107-111, (2016); [3] Y. Matsuki et al., *J. Magn. Reson.* **259**, 76-86, (2015)

[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 先端研究基盤共用促進事業による援助を受けて行われた。

S1-2 偏極中性子と水素核偏極試料を用いた複合材料の構造研究

○熊田　高之

原子力機構　物質セ

Structural study of composite materials using neutron and proton polarization

○Takayuki Kumada

Mat. Sci. Res. Ctr., Japan Atomic Energy Agency

Scattering power of a thermal neutron against proton remarkably depends on their relative spin directions. Thus, scattering patterns of polarized neutrons strongly vary as a function of proton polarization of samples, giving fruitful structural information which cannot be obtained from unpolarized measurements. Structural study using the polarized neutrons and polarized protons was initiated in 1989, but was not extended much due to difficulty of proton polarization at that time. We have refocused on this technique since 2005, built up compact modern DNP systems, and applied them to small-angle scattering, reflectometry, and diffractometry.

機能性材料開発の現場では、物理・化学的性質が異なる複数の素材をナノレベルで混合させることで互いの短所を補い長所を引き出した複合材料の開発が繰り広げられている。その開発においては、成分間の相互作用を決定づける絡み合い構造の最適化がカギとなる。我々が取り組むスピンコントラスト法は、中性子の水素核に対する散乱能がスピンに強く依存する性質を生かした複合材料の構造解析手法である。水素核の偏極度によって異なる複数の偏極中性子散乱パターンから、他の測定法では難しい複合材料における成分毎の構造とそれらの絡み合いを決定することができる(Fig. 1)。

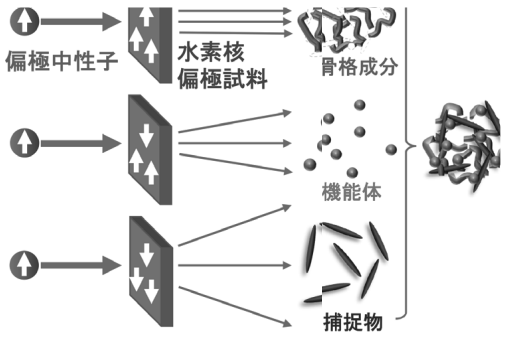


Fig. 1
Spin contrast variation neutron scattering

スピンコントラスト法は、同位体ラベルのように試料を作り直すことなく特定成分の構造を決定できる優れた手法である。しかしながら、Stuhrmannら[1]がはじめて原理実証した1989年当時は核偏極技術が未熟だったこともあり、それ以降スピンコントラスト法の利用は極めて限定されていた。それに対して我々は、近年急速な進歩を遂げている最新のDNP技術を研究用原子炉(JRR-3)および大強度陽子加速器施設(J-PARC)の中性子散乱実験施設に展開することで、スピンコントラスト法を有用かつ実用的な構造解析手法として確立することを目指している。以下に各分光法と組み合わせた進捗を紹介する。

中性子散乱、複合材料の構造解析、スピンコントラスト法

○著者氏名　くまだたかゆき

小角散乱

これまでのスピンコントラスト法を用いた研究のほとんどは、中性子小角散乱法と組合せて行われてきた。我々も、同手法を用いて自動車用タイヤにおけるシリカ微粒子の分散状態の研究[2]などを行ってきた。最近では、土壌有機物などの環境科学の研究にも用いている。

反射率[3]

反射率法は膜状試料に対する反射率の波数Q(入射角および波長依存性)から膜厚や表面・界面の粗さなどを調べる手法である。特に中性子反射率法は中性子の物質透過能の高さを生かして多層膜内部における“隠れた界面”を見る能力に優れている。一方、従来の反射率法では一つの試料に対して原則一つの反射率曲線しか求まらず、そこから複数の表面・界面を持つ多層膜試料の構造を決定することは非常に難しい。そこで我々は、スピンコントラスト法を中性子反射率測定に展開した。

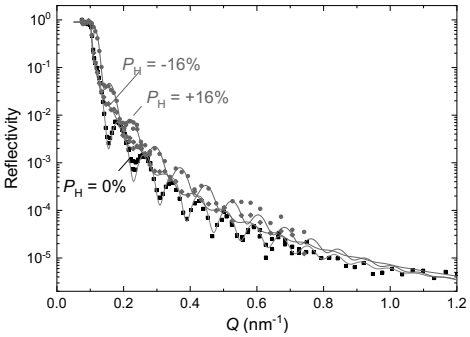


Fig. 2　Neutron reflectivity of proton-polarized polystyrene film [3]

Fig. 2は、J-PARC MLF BL17で測定した70 nm厚ポリスチレン単層膜の中性子反射率曲線である。反射率曲線はポリスチレン膜の核偏極度P_Hとともに実線の理論予測どおりに変化している。本結果は、スピンコントラスト中性子反射率測定において必須となる表面・界面を含めた試料の核偏極の均一性を保証するものである。現在は、信頼性が担保された同手法を用いてより複雑な薄膜構造決定に挑戦している。

結晶構造解析

中性子散乱のような波数軸に対する信号強度変化を得る測定法は、結晶のような高い周期対称性を持つ物質の構造解析をもっとも得意とする。しかしながら、これまでスピンコントラスト法は結晶構造解析とは無縁であった。なぜなら、Fig. 3(a) のように、結晶試料は成長時に偏極媒体となるフリーラジカルを析出してしまうため、核偏極させることはできないためである。それに対し、山形大の三浦ら[4]は微粒子化した結晶に対してTEMPOラジカルを溶解した非晶質溶媒を含浸させることで、結晶にTEMPOラジカルを疑似的に溶解した状態を作り核偏極させるメカニカルドーピング法(Fig. 3(b))の開発に成功した。我々は、今年度から山形大と共同でスピンコントラスト結晶構造解析法の開発に取り組み、良好な結果を得ている。

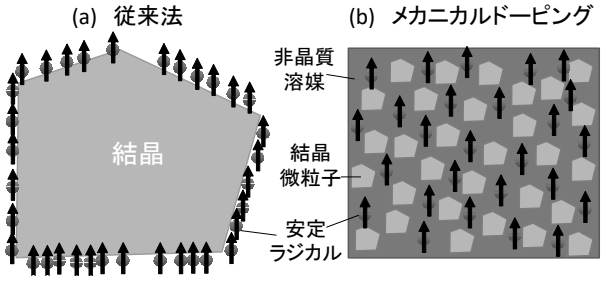


Fig. 3　Mechanical doping method for DNP of crystalline samples

[1] W. Knop, H. J. Stuhrmann *et al*., J. Appl. Cryst. 22, 352 (1989).

[2] Y. Noda, T. Kumada *et al*., J. Appl. Cryst. 49, 2036 (2016).

[3] T. Kumada *et al*., J. Appl. Cryst. https://doi.org/10.1107/S1600576719010616.

[4] D.Miura *et al*., Prog. Theor. Exp. Phys., 033D01 (2019).

S1-3

超偏極^{13}C MRI代謝イメージングと抗がん治療評価

○松元慎吾[1], Murali C. Krishna[2]
1北海道大学 大学院情報科学研究院
2米国立がん研究所 放射線生物学部門

Hyperpolarized ^{13}C Metabolic MRI for Evaluating Cancer Treatment Outcome.

○Shingo Matsumoto [1], Murali C. Krishna [2]
1Faculty of Information Science and Technology, Hokkaido University
2Radiation Biology Branch, National Cancer Institute, NIH

Malignant tumor is characterized by hypoxic niches that lead to treatment resistance. Since hypoxic cancerous cells exhibit metabolic shift from oxidative phosphorylation to glycolysis, non-invasively available metabolic profiling should contribute to improved treatment strategies. Hyperpolarization is a phenomenon or its induction technique to overcome intrinsic low sensitivity of heteronuclear NMR/MRI, where NMR signal intensity of ^{13}C labeled biomolecules can be enhanced more than 10,000 times, making non-invasive trance and imaging of their metabolism feasible. Here, we demonstrate that hyperpolarized ^{13}C metabolic MRI of [1-^{13}C] pyruvate and other ^{13}C labeled metabolic tracers can provide useful insight into evaluating and predicting the treatment efficacy of chemotherapy, radiotherapy, and molecular targeted treatments.

無秩序な細胞増殖による酸素消費量の増加と異常血管新生に伴う血流低下により、悪性腫瘍には低酸素領域が形成される。低酸素下にあるがん細胞は放射線治療や多くの化学療法に耐性を示し、予後不良の主因となる。一方で、低酸素誘導因子（Hypoxia inducible factor：HIF）として知られる転写因子の活性化は、様々な遺伝子発現を介して酸化的リン酸化から解糖系への代謝変容をもたらす。従って、非侵襲的に腫瘍の詳細な代謝プロファイルが得られれば、腫瘍の悪性度が推定され、個別の患者の治療戦略に有用な知見を与える。

超偏極^{13}C 核磁気共鳴画像（Magnetic Resonance Imaging: MRI）は、^{13}C標識した任意の化合物の^{13}C NMR信号を一時的に数万倍に増幅することで、その代謝反応をリアルタイムに可視化するMRIの先端技術である。例えば、ピルビン酸はグルコース代謝のちょうど分岐点に位置する代謝物であり、正常組織ではミトコンドリアのTCA回路で水と二酸化炭素に代謝されるが、悪性腫瘍ではこの酸化的リン酸化の代謝フラックスが低下すると共に解糖系が亢進し、ピルビン酸は主に乳酸へと代謝される。このがん組織に特徴的な代謝変容を利用した、超偏極[1-^{13}C]ピルビン酸の代謝MRI撮像によるがん診断は、既に世界10ヶ所以上の施設において、前立腺癌、乳癌、脳腫瘍などを含む殆ど臓器で臨床試験が実施されている。近年では、糖尿病患者におけるピルビン酸脱水素酵素の代謝フラックス低下が、糖尿病性心疾患の早期バイオマーカーとなることが報告され、超偏極^{13}Cピルビン酸代謝MRIの心疾患への臨床応用も広がりを見せている。

動的核偏極、超偏極^{13}C MRI、代謝イメージング

○まつもと しんご、むらーり くりしゅな

演者らの研究グループでは、2007年末より動的核偏極（Dynamic Nuclear Polarization: DNP）を用いた超偏極^{13}C MRI研究を独自に立ち上げ、これまでに腫瘍内酸素濃度と代謝変容の相関性、放射線治療および分子標的薬による抗がん治療効果の早期検出、代謝情報に基づく抗がん治療効果の事前予測などに関する多くの研究成果を報告してきた。一例として図１に３種類のヒト膵管癌モデルにおいて、超偏極^{13}C MRIによるピルビン酸代謝イメージングから算出したLDH活性と免疫ブロットで測定したLDH発現量の相関及びこれらの担癌モデルの放射線治療及び低酸素標的薬TH302に対する治療応答性の違いを示す（参考文献6より）。

本講演では、これらの知見に加え、最近の^{13}C励起装置の進歩や臨床試験の動向、日本国内の動向など、超偏極MRIを取り巻く現状について広く紹介する。

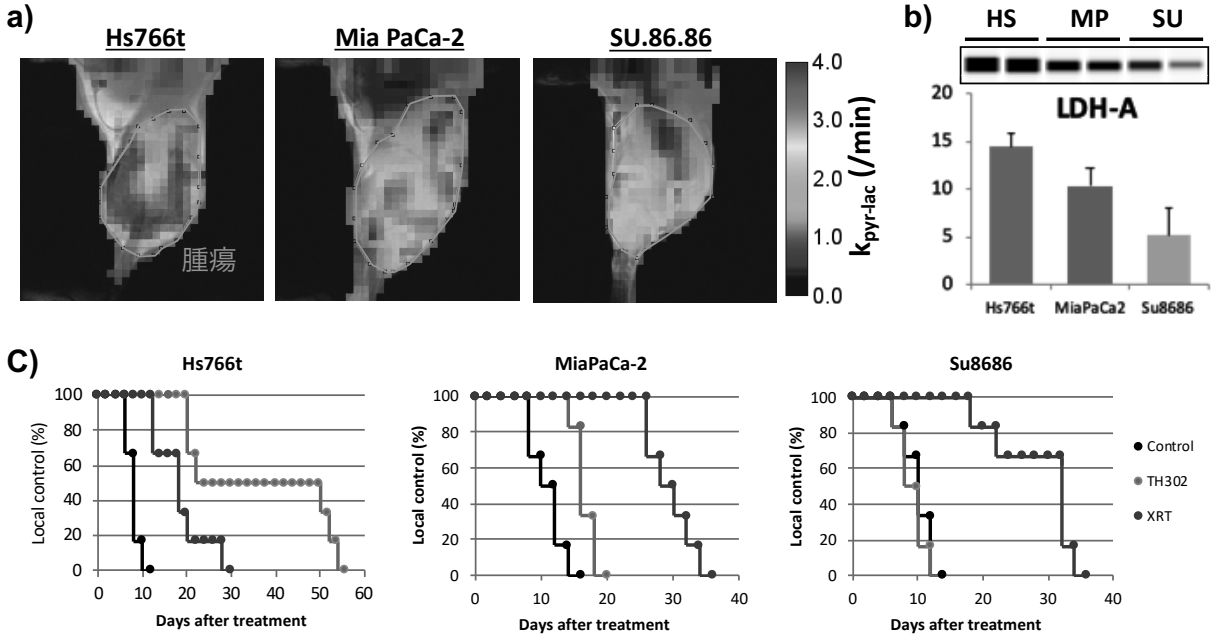


図１ 超偏極^{13}C MRI代謝イメージングと抗がん治療効果　(a) ３種のヒト由来膵管癌モデルにおける超偏極^{13}C MRIから得たLDH活性マップ,　(b) 免疫ブロットによるLDH発現量,　(c) 放射線治療および低酸素標的薬TH302の治療効果.

参考文献

1) Matsumoto S, Saito K, Krishna MC et al. ***Magn Reson Med***. 2013;69(5):1443-50.
2) Matsumoto S, Saito K, Krishna MC et al. ***Antioxid Redox Signal***. 2014;21(8):1145-55.
3) Sourbier C, Ricketts CJ, Matsumoto S et al. ***Cancer Cell***. 2014;26(6):840-850.
4) Saito K, Matsumoto S, Krishna MC et al. ***Clin Cancer Res***. 2015; 21(22):5073-81.
5) Wojtkowiak JW, Cornnell HC, Matsumoto S et al. ***Cancer Metab***. 2015; 3(1):2.
6) Matsumoto S, Kishimoto S, Krishna MC et al. ***Cancer Res***. 2018;78(14):3783-3792.
7) Kishimoto S, Oshima N, Yamamoto K et al. ***Free Radic Biol Med***. 2018;116:1-10.
8) Kishimoto S, Brender JR, Matsumoto S et al. ***Elife***. 2019 Aug 13;8. pii: e46312.
9) Saito K, Sail D, Matsumoto S et al. ***Free Radic Biol Med***. 2019;131:18-26.
10) Stewart NJ, Kumeta H, Matsumoto s et al. ***J Magn Reson.*** 2018;296:85-92

S1-4 光励起電子スピンを用いた動的核偏極－超偏極溶液NMRに向けて

○立石　健一郎[1,2]，上坂　友洋[1,2]
[1] 理化学研究所・開拓研究本部
[2] 理化学研究所・仁科加速器科学研究センター

Dynamic nuclear polarization using photo-excited triplet electron – toward a hyperpolarized solution NMR

○Kenichiro Tateishi[1,2], Tomohiro Uesaka[1,2]
[1] *Cluster for Pioneering Research, RIKEN*
[2] *Nishina Center for Accelerator-Based Science, RIKEN*

Dynamic nuclear polarization with photo-excited triplet electron (Triplet-DNP) has two strong advantages over DNP with radicals. First, it enables the production of nuclear hyperpolarization at a relatively higher temperature. Second, paramagnetic species are not present without laser irradiation. For the former, using a single crystal of *p*-terphenyl doped with pentacene, we have achieved ^{1}H polarization of 34% at room temperature and in 0.4 T, which corresponded to the enhancement factor of 250,000. The latter allows us free from a spectral broadening caused by electron spins. We will propose a new scheme for hyperpolarized solution NMR. For the purpose, new polarizing agents for Triplet-DNP were also explored using time-resolved ESR.

NMRの最大の弱点である低感度の問題を克服するため、動的核偏極（Dynamic Nuclear Polarization: DNP）が盛んに研究されている。DNPとは、電子スピン偏極をマイクロ波照射を用いて、核スピンへ移す手法である。ラジカルなどの熱平衡電子を用いたDNPは、近年急速な発展を遂げ、分析化学や医療など様々な分野へ応用されている。しかしながら、低温装置やサブテラヘルツシステムの使用など、導入へのハードルは非常に高く、普及の足枷となっている。我々は、非平衡電子を偏極源に用いることで、従来DNPでは達成困難な環境や試料の高偏極化に取り組んでいる。

光励起三重項電子を用いたDNP(トリプレットDNP)は、従来DNPと比べて２つの利点がある。（１）電子偏極率は三重項状態への遷移確率のみで決まり、温度・磁場に依存しない。（２）偏極移行を行うのに必要な三重項電子は、有限の寿命を持ち、レーザー照射時のみ試料中に存在する。ペンタセンの励起三重項状態は、70%を越える偏極率と20 μs程度の寿命を持ち、トリプレットDNPの偏極源として用いられている。我々は、ペンタセンをドープしたp-ターフェニルの単結晶を用いて、室温・0.4 T下で^{1}Hスピンの偏極率34%を達成した[1]。これは、信号増大比25万倍に相当する。

本発表では、後者の特性を生かした超偏極溶液NMRに向けた最近の取り組みを中心に議論する。電子スピンが試料中に多数存在すると、溶液NMRでは致命的な分解能の低下が引き起こされるが、有限の寿命を持つ三重項電子を偏極源に用いることでこの問題を回避することができる。

動的核偏極、溶液NMR、時間分解ESR、光励起三重項電子

○たていし　けんいちろう，うえさか　ともひろ

（ⅰ）超偏極溶液NMRに向けて

これまで*p*-ターフェニルといった化学分析用溶媒とはかけ離れたマトリックスを用いてきた我々にとって、トリプレットDNPを溶液NMRに適用するのは大きな挑戦となった。まず、トリプレットDNPをNMR溶媒中で行うところから実験はスタートした。6,13-ジフェニルペンタセンを新たな偏極源とし、エタノール-d_4と水の混合液を0.67 T, 90 Kにおいて、^{1}H偏極率を80倍増大させることに成功した(Fig. 1)。また、溶液試料では「スピン拡散」が抑制されるため、偏極源と測定対象をバラバラに溶解させる従来のスキームでは、偏極効率は非常に悪い。我々はこの問題を解決すべく、新スキームの開発に取り組んでいる。詳細は発表にて述べる。

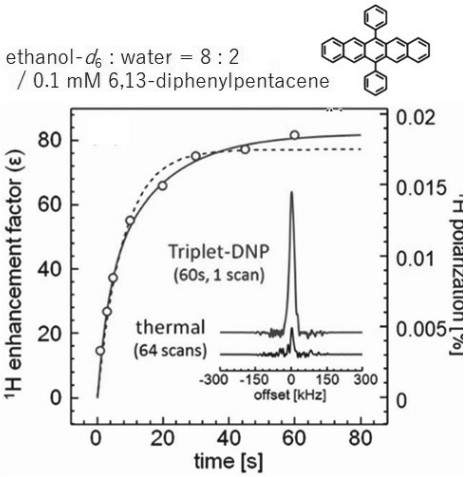


Fig. 1. 6,13-ジフェニルペンタセンをドープしたエタノール-d_4:水= 8:2 wt%のビルドアップ。

（ⅱ）時間分解ESRを用いた新規偏極源探索

トリプレットDNPの唯一の偏極源としてペンタセンが[illegible]重のパラメーターは理想的なのに対し、化学的には非常に不安定な分子である。トリプレットDNPを溶液NMRに応用するにあたり、偏極源分子の化学的性質が問題となることが容易に想像される。そこで、時間分解ESRを用いて、新たな偏極源の探索を行った。

ペンタセン・テトラセン骨格に窒素を導入した、6,13-ジアザペンタセン・5,12-ジアザテトラセンを新たな偏極源分子候補として合成した[2]。これらはペンタセンと比べて、有機溶媒への高い溶解性と安定性を示した。これらの分子を*p*-ターフェニルにドープした粉末試料において、三重項偏極率・寿命を測定し(Fig. 2)、トリプレットDNPにてペンタセンと同程度の信号増大が得られることを示した。発表では、他の分子についても紹介する。

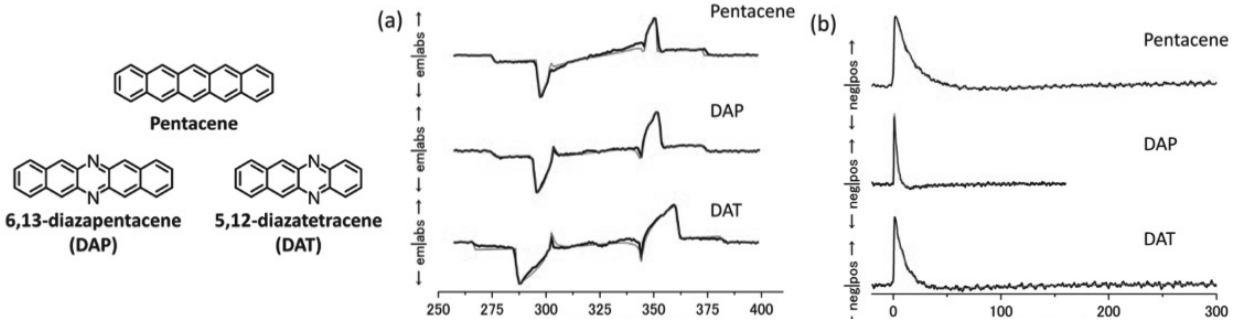


Fig. 2. (a) ペンタセン、6,13-ジアザペンタセン、5,12-ジアザテトラセンの時間分解 ESR スペクトル。(b) ESR 信号の時間減衰。測定はそれぞれ 349, 352, 359 mT にて行った。

本研究は、理化学研究所・独創的研究課題「Dynamic Structural Biology」の助成を受けて行われた。

References

[1] K. Tateishi, et. al., *Proc. Nat. Acad. Sci.* **2014**, 111 7527-7530.

[2] K. Tateishi, et. al., **2019**, DOI: 10.1039/C9CP00977A.

[3] H. Kouno, et. al., *J. Phys. Chem. Lett.* **2019**, 10, 2208-2213.

S2-1

Radical pairs in proteins

Kiminori Maeda

Department of Chemistry, Graduate School of Science and Engineering, Saitama University.

In the present talk, the author is reviewing the photochemically produced radical pair (RP) on the surface and inside of proteins and its application for the analysis of molecular structure and dynamics. Photochemical reaction of pigments or dyes with aromatic residues on the surface of proteins produces RPs. Radical pair mechanism (RPM), which is based on the transient spin dynamics in RPs, is the source of electron and nuclear spin polarizations, and magnetic field effect (MFE) on the chemical reactions and widely used for the analysis of the molecular motion on the surface of proteins.

For the several decades, the RP formations were used for probing protein surface. Chemically Induced Dynamic Nuclear Polarization (CIDNP)[1] is able to detect the surface exposed aromatic residue selectively. This selectivity had been advantageous in rather conventional 1 or 2D NMR of proteins. However, the role for the structural determination of proteins has been overtaken by the developed multi-dimensional NMR techniques. Nevertheless, from the high sensitivity, CIDNP has been developed for the rather short time events such as real-time measurement of protein folding[2-3]. The solid state CIDNP is also developed for the photochemical process in photochemical reaction centre[4] and blue light receptor protein systems.[5]

RPM is considered as the most sensitive mechanism of MFEs on chemical reaction and is attracted as the candidate mechanism for the magnetoreception for animal navigations because it works in the smallest magnetic field. For a long time, the author and co-workers has been studying the MFE detected by transient absorption (TA) techniques. Previously the author and co-workers observed unexpectedly large MFEs on the reaction of 2,6-AQDS (2,6 anthraquinone disulfonate)[6] or flavin mononucleotide (FMN)[7] and HEWL (hen egg white lysozyme). In these reactions, the MFEs can be rationalized by RPM and is boosted in the presence of Coulomb force on the protein surface. In contrast 2,6-AQDS and BSA(Bovine Serum Albumin) produce a radical pair embedded in the non-exposed binding pocket.[8] This system also shows large MFEs. In the 1:1 condition of AQDS and BSA, TA and its MFE signal disappeared within a few microseconds after laser flash photolysis. This fact indicates that the radical pair is deeply bound inside of the protein molecule and the fraction of the escaped free radical is very small. In addition, thanks to the very stable measurements by recently developed set up, the clear low field effects (LFE) were observed. It contrasts with the fact that no LFE has been observed in the radical pairs composed of same radicals but produced on the surface of HEWL (Hen Egg White Lysozyme). This fact suggests the LFE is quite sensitive to the molecular dynamic of RPs. This radical pair in BSA would be a model of the electron transfer reaction of substrates and enzyme.

References

1. Kaptein, R.; Dijkstra, K.; Nicolay, K., Laser *Nature* **1978,** *274* (5668), 293-294.
2. Maeda, K.; Lyon, C. E.; Lopez, J. J.; Cemazar, M.; Dobson, C. M.; Hore, P. J., *J Biomol Nmr* **2000,** *16* (3), 235-244.
3. Hore, P. J.; Winder, S. L.; Roberts, C. H.; Dobson, C. M., *J Am Chem Soc* **1997,** *119* (21), 5049-5050.
4. Matysik, J.; Schulten, E.; Alia; Gast, P.; Raap, J.; Lugtenburg, J.; Hoff, AJ; de Groot, HJM,, *Biol. Chem.* **2001,** 382, 1271-1276.
5. Richter, G.; Weber, S.; Römisch, W.; Bacher, A.; Fischer, M.; Eisenreich, W., *J. Am. Chem. Soc.* **2005,** 127, 17245–17252
6. Maeda, K.; Robinson, A. J.; Henbest, K. B.; Dell, E. J.; Timmel, C. R., *J Am Chem Soc* **2010,** *132* (5), 1466-1467.
7. Miura, T.; Maeda, K.; Arai, T., *J Phys Chem B* **2003,** *107* (26), 6474-6478.
8. Kobori, Y.; Norris, J. R., *J Am Chem Soc* **2006,** *128* (1), 4-5.

CIDNP, Magnetic field effect, Protein

S2-2

Observation of Singlet fisson in Ordered Thin Films of Pentacene in *p*-Terphenyl at Room Temperature

Christopher W. M. Kay[1,2],
[1]*Department of Chemistry, University of Saarland, Saarbücken, Germany.*
[2]*London Centre for Nanotechnology, University College London, London, UK.*

Building efficient triplet-harvesting layers for photovoltaic applications requires a deep understanding of the microscopic properties of the components involved and their dynamics. Singlet fission is a particularly appealing mechanism as it generates two excitons from a single photon. However, the pathways of the coupled triplets into free species, and their dependence on the intermolecular geometry, has not been fully explored. In this work, we produce highly ordered dilute pentacene films with distinct parallel and herringbone dimers and aggregates [1,2].

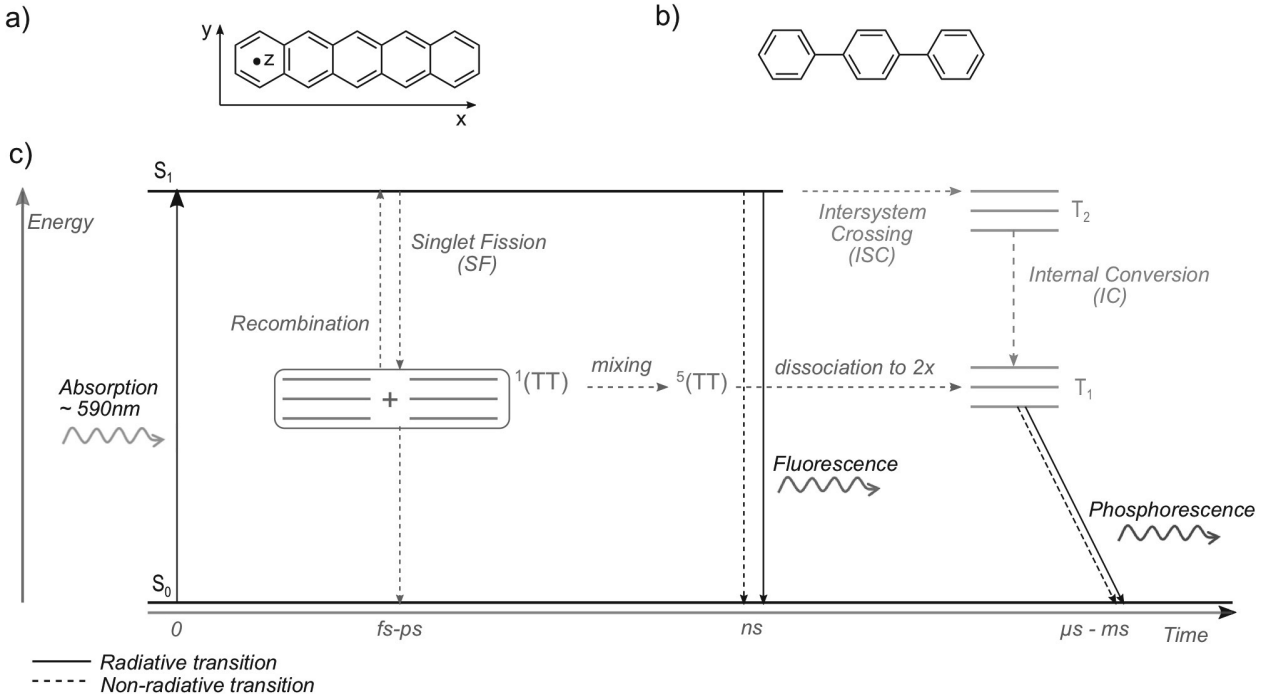


Figure 1. Molecular structures and Jablonski diagram with timescale. a) Molecular structure of pentacene with corresponding zfs axes. b) molecular structure of p-terphenyl. c) As a result of photoexcitation, pentacene generates triplets via two distinct mechanisms. Coupled pentacene molecules undergo very fast (fs-ps) SF leading to two strongly coupled 1(TT) states which can then populate the quintet state. These can recombine or ultimately dissociate into free triplets. Alternatively, individual pentacene molecules can transition to triplet states via ISC, which is energetically less favourable due the required spin-flip and therefore occurs on slower timescales (ns).

Singlet Fisson 1, Pentacene 2, EPR Spectroscopy 3

Using electron paramagnetic resonance spectroscopy, we provide compelling evidence for the formation of distinct quintet excitons in ambient conditions, with intrinsically distinctive electronic and kinetic properties. We find that the ability of quintets to separate into free triplets is promoted in the parallel dimers and this provides molecular design rules to control the triplets, favouring either enhanced photovoltaic efficiency (parallel) or strongly bound pairs that could be exploited for logic applications (herringbone).

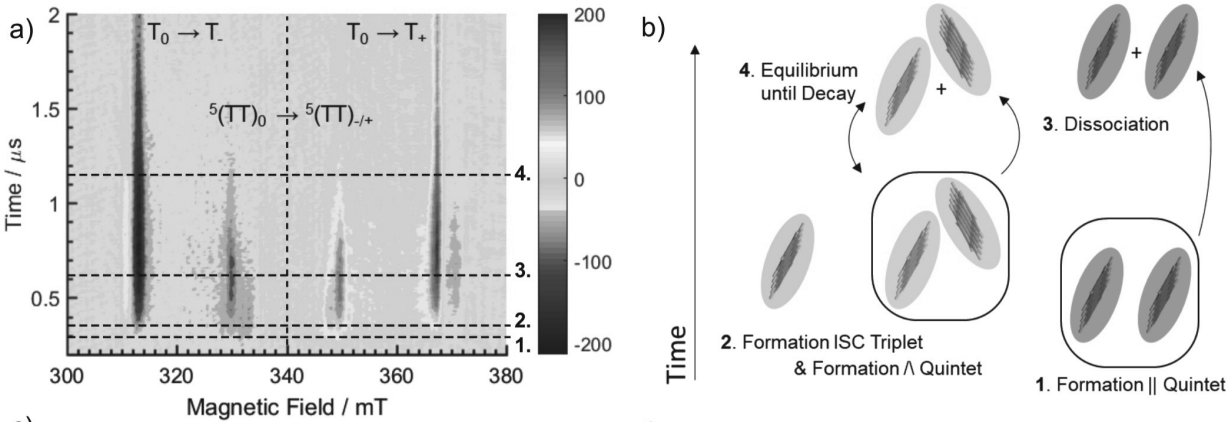


Figure 7. Dynamics of the triplet and quintet states. a) Time-resolved electron paramagnetic resonance (tr-EPR) of the 10% pentacene in p-terphenyl 1μm film. The innermost peaks from the centre-field belong to strongly-coupled triplets from parallel dimers, 5(TT)||, with the next pair of peaks originating from strongly-coupled triplets with a herringbone geometry, $5(TT)_{\wedge}$. The penultimate and strongest pair of peaks belong to dissociated parallel triplets and isolated ISC crossing triplets, (T). Finally, the outermost peaks are the dissociated triplets from the herringbone quintet. Timescales for the formation and dissociation of spin species are labelled 1-4 on the right-hand side. b) Schematic of the triplet and quintet kinetics: i) formation of 5(TT)||, ii) formation of ISC (T) and of the $5(TT)_{\wedge}$, iii) dissociation of the quintets into triplets, iv) equilibrium state between $(TT)_{\wedge} \rightleftharpoons T+T$, forming a trap-state, whilst $(TT)|| \longrightarrow T+T$ forms long-lived triplets.

[1] Daphné Lubert-Perquel, Enrico Salvadori, Matthew Dyson, Paul N. Stavrinou, Riccardo Montis, Hiroki Nagashima, Yasuhiro Kobori, Sandrine Heutz and Christopher W. M. Kay, *Nature Communications,* **2018**, *9*, 4222.

[2] Daphné Lubert-Perquel, Kuk Kim Dong, Peter Robaschik, Christopher W. M. Kay and Sandrine Heutz, *Journal of Materials Chemistry C,* **2019**, *7*, 289-296.

S2-3

Exploiting Radical Triplet Pair Hyperpolarization for Sensitivity Enhancement in Solution-State NMR

Matthew W. Dale[1], Daniel Cheney[2] and Christopher J. Wedge[2]

[1] *Department of Physics, University of Warwick, Coventry, UK.*

[2] *School of Applied Sciences, University of Huddersfield, Huddersfield, UK.*

Liquid-state NMR is an immensely powerful analytical technique yet suffers from a major limitation in the form of low inherent sensitivity arising from the weak thermal polarization of the nuclear spin states. Step changes in NMR sensitivity have been afforded through developments such as high-field superconducting magnets, Fourier transform techniques and most recently cryogenically cooled probes. The need for greater sensitivity still persists however, be this for application of advanced multidimensional techniques to volume limited samples or to enable greater utility of intermediate field compact instruments for routine high-throughput analysis. Electron Paramagnetic Resonance (EPR) is intrinsically more sensitive than NMR due to the comparatively high thermal spin polarization of the unpaired electron resulting from its large gyromagnetic ratio ($\gamma_e/\gamma_H \approx 660$). Now over 65 years since Overhauser first suggested that by saturating EPR transitions this electronic polarization could be transferred to nuclei to enhance NMR signals in a so-called Dynamic Nuclear Polarization (DNP) experiment [1], it is possible to achieve impressive enhancements in solid-state NMR with high-power gyrotron sources, yet progress in the liquid-state lags behind. A significant challenge is that the dipolar cross-relaxation transferring polarization to nuclei becomes inefficient at fields of 1 T or more, so while at low-field enhancements close to the theoretical limit have been achieved, higher fields are needed to avoid compromising resolution. To tackle this problem a sample may be polarized at low field (~0.3T) for which DNP is efficient and shuttled to higher field for measurement, but the DNP enhancement when using thermally polarized electrons is almost entirely wiped out by the Boltzmann factor penalty arising from the lower initial nuclear polarization. An appealing solution is to apply optical pumping to achieve an initial electron polarization far in excess of the Boltzmann equilibrium value, increasing the magnitude of the DNP effect before sample shuttling [2].

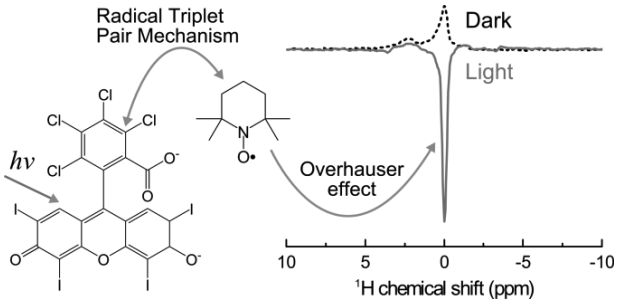


Figure 1. Optical pumping of a xanthene dye to the triplet state hyperpolarizes a stable radical which in turn generates nuclear hyperpolarization of water.

We present our recent results which show for the first time that the large electron spin-polarization generated optically through the radical-triplet pair mechanism (RTPM) can be used to generate nuclear polarization, enhancing the ^{1}H NMR signal of the aqueous solvent [3]. This method offers a new route to DNP, replacing microwave saturation of EPR transitions with optical pumping to drive the electron spin bath away from equilibrium, and the resultant cross-relaxation generating nuclear hyperpolarization (Figure. 1). Crucially from the many spin chemical polarization mechanisms known the RTPM is unique in being able to generate electron polarization on a persistent radical, meaning that polarization transfer to nuclei is not in competition with decay of the radical species. Alongside our proof of principle demonstration of this route to nuclear hyperpolarization we present theoretical and experimental work to maximize the observed NMR enhancement and discuss the challenges that must be overcome in order to outperform existing microwave DNP methods.

Hyperpolarization, Radical Triplet Pair Mechanism, Dynamic Nuclear Polarization

Acknowledgements: We thank the Engineering and Physical Sciences Research Council (UK) for financial support (EP/N007875/1), and Bruker UK for an equipment loan.

[1] A.W. Overhauser, *Phys. Rev.*, 1953, **92,** 411–415.
[2] C. Griesinger, M. Bennati, H. M. Vieth, C. Luchinat, G. Parigi, P. Ho¨fer, F. Engelke, S. J. Glaser, V. Denysenkov and T. F. Prisner, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, 2012, **64**, 4–28.
[3] M. W. Dale and C. J. Wedge, *Chem. Commun.*, 2016, **52**, 13221–13224.

S3-1

パルスESR法を用いたタンパク質間相互作用及び反応中心の解明

○三野　広幸[1]
[1]名古屋大学・理学研究科

Analysis of Protein-Protein interaction and Reaction center using Pulsed ESR

○Hiroyuki Mino [1]
[1]*Graduate School of Science, Nagoya University*

PELDOR (DEER) is one of the powerful methods to detect magnetic interaction between electron spins in the range of 20-100 Å. It gives the oligomeric structure of the proteins and spin structure of the inside reaction center. In this talk, I will introduce the application to the photosynthetic reaction center and Photozipper protein, including the detection of the electron-nuclear interactions in the range of <10 Å using pulsed EPR (pulsed ENDOR, HYSCORE).

同じ磁気共鳴法であるESRとNMR法の手法の違いはエネルギーの大きさの違いに由来している。スピン間の相互作用の有効な到達距離はNMRでは10 Å程度であるのに対しESRでは100 Å程度まで及ぶ。NMRの情報量は少ないともいえるが、タンパク質の構造解析では隣接分子間の相互作用のみの選択的にとらえられるため、NMR解析手法は強力な応用手法として成立している。他方、ESRの場合には情報量は多いが、必要な情報は埋もれがちであり、情報をとりだすための各種の技術が必須となる。本講演ではESR法を用いたタンパク質の構造機能解析を、これまでの演者が行ってきた研究をとおして議論する。

PELDOR(DEER)法を用いたタンパク質反応中心および複合体構造の解明

PELDOR(DEER)法は10-100Åの電子スピン間の相互作用を検出するパルスESRの手法の一つである。感度も高く精度も高いため電子スピン間の距離測定に用いられる。この手法は2種類の周波数の異なるマイクロ波を用いた二重共鳴法である。ESR手法の中ではタンパク質研究への応用に対して非常に有用な手法であると思われる。

PELDOR法の光合成光化学系IIへの応用

光化学系IIは水を分解し酸素を発生する機能をもつタンパク質複合体である。酸素発生は光化学系II中のマンガン錯体によって行われる。酸素発生機構の解明は光合成研究では最も大きな課題の一つである。近年のX線結晶構造の解明によって構造が明らかになってきているが、ESR法による測定は構造と機能の橋渡しをおこなう相補的な手法として主要な手法の一つとなっている。光化学系II中には多くの電子移動中間体が存在し、また安定なアミノ酸ラジカルY_Dが存在している。光化学系IIには主要な反応を担う二量体の他にも表在性タンパク質と呼ばれるタンパク質が結合する巨大分子であり、酸素発生機能には必須となっている。PELDOR法を用いてタイプの異なる以下のような解析を

PELDOR、ENDOR. HYSOCORE, Photosystem II、Photozipper
○みの ひろゆき

行った。

1.表在性タンパク質PsbPと光化学系II本体との結合状態を観測した。PsbP数か所にスピンラベルをつけ、Y_Dラジカルとの相互作用を観測することによりタンパク質間の結合状態を明らかにした[1]。

2.Y_Dとマンガン錯体間のPELDOR法によって相互作用を検出し、マンガン錯体上のマンガン上のスピン構造を明らかにした[2]。

3.酸素発生系マンガン錯体は光照射によって構造を構築することができる。特別のマンガン結合サイトが存在することが知られている。PELDOR法を用いて構築の起点となるマンガン位置を明らかにした[3] 。

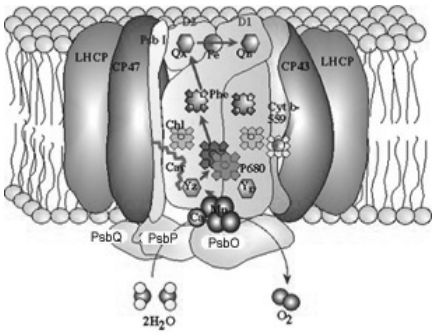


Fig.1. 光合成光化学系Ⅱの構造

PELDOR法の光制御型転写因子Photozipperへの応用

PhotozipperはbzipドメインとLOVドメインからなる機能モジュールであり、光によってDNAを制御する分子ツールとしての役割が期待されている。Photozipperの反応は、LOVドメイン上のフラビン分子が光励起されることより始まり、２量体化をおこし転写因子としての機能をもっていると考えられている(Fig.2)。これまで３つのグループにより異なった会合状態のX線結晶構造が報告されている。２量体化したPhotozipperに対してPELDOR法を適用することによって2量体間の構造をとらえることができた。この構造から、既知の結晶構造に対応する構造を見出すことができた[4]。

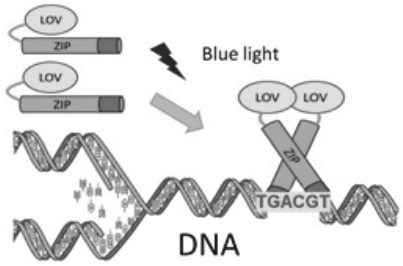


Fig.2. Photozipper の反応モデル

タンパク質反応中心の構造解明

ESR信号に内包するNMR信号は電子スピン近傍の反応中心の構造解明には主要な情報である。ENDOR法は二重共鳴法として最初に開発された手法であり、ESR強度でNMR信号を検出する手法である。長い歴史をもつものの測定条件が厳しくタンパク質の研究に十分広く用いられてきたとはいいがたい。しかしパルス法の発展により多くの制約は解消されている。本講演ではパルスENDOR法を用いた光合成タンパク質とHYSOCRE法による鉄硫黄タンパク質の反応中心構造を解析した(Fig.3) [5]。また、パルスELDOR法によるNMR信号の検出を紹介し、今後の展望を議論する。

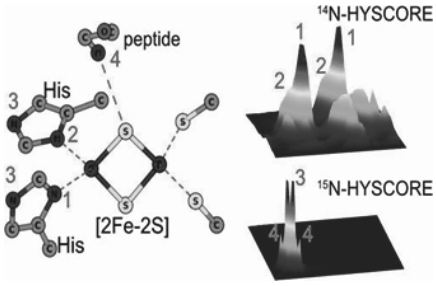


Fig.3. HYSCORE による Rieske タンパク質の鉄硫黄クラスター周辺分子配置

Reference [1] Asada, M.et al. **Biochim. Biophys. Acta**, (2018) 1859, 394-399.

[2] Asada, M.et al.,**Biochim. Biophys. Acta** (2013) 1827, 438-445.

[3] Asada, M and Mino, H., **J. Phys. Chem. B.**, (2015) 119 (32), 10139-10144.

[4] Ozeki, K.et al., **Biochemistry** (2018) 57,494-497.

[5] Nagashima, H.et al., **J. Phys.Chem. B**, (2017) 121, 2543-2553.

S3-2

常磁性効果による遠距離構造情報を利用したタンパク質multi-state立体構造解析

○池谷 鉄兵[1]，立石 泰[1]，岡田真由[1]，Peter Güntert[1,2,3]，伊藤 隆[1]
[1]首都大学東京大学院・理学研究科化学専攻
[2]ドイツ フランクフルトゲーテ大学
[3]スイス連邦工科大学チューリッヒ校

Multi-state protein structural analysis using long-range distance information from paramagnetic effects

○Teppei Ikeya[1], Yutaka Tateishi[1], Mayu Okada[1], Peter Güntert[1,2,3], and Yutaka Ito[1]
[1]*Department of Chemistry, Tokyo Metropolitan University*
[2]*Institute of Biophysical Chemistry and Center for Biomolecular Magnetic Resonance, Goethe University Frankfurt, Germany*
[3]*Laboratory of Physical Chemistry, ETH Zürich, Switzerland*

Paramagnetic effects, such as paramagnetic relaxation enhancement (PRE), pseudocontact shift (PCS), and residual dipolar coupling (RDC), are essential structural data for modern NMR analysis of large biomacromolecules. These provide substantially long-range distance and orientation information, up to ~40 Å. Lanthanide-binding tags (LBTs) have been developed for the acquisition of PRE, PCS, and RDC, allowing to obtain more accurate structural information and determine structures of larger or complicated proteins even inside living cells. Computational progress in the standard software, such as CYANA, also enables us to perform protein structure calculation with the paramagnetic data efficiently. Recently, we developed a method of the integrated NMR data analysis for proteins having multi-conformations. Here, we demonstrate its performance of the multi-state structure determination using a model protein, YUH1 (236 residues), and discuss further applications including protein structural analysis in living cells.

【序論】

溶液NMRを用いたタンパク質の立体構造解析においては，主要な構造情報は現在もNOE由来の近距離情報であるが，近年，residual dipolar coupling (RDC), pseudo-contact shift (PCS), paramagnetic relaxation enhancement (PRE)などの遠距離情報も積極的に活用されるようになっている．タンパク質構造解析に対するRDC，PCS，PREの有効性が示されてから既に20年近く経つが，最近，様々な常磁性金属結合タグ(LBT)が開発されたことなどによって，より正確な空間情報がより簡便に得られるようになった．その結果として，これらの手法の利用の幅はさらに広がり，再び注目を集めている．データ解析のためのソフトウェアが整備されてきていることも，利用者の敷居を下げている．例えば，立体構造計算プログラムCYANAでは，RDCやPCSの解析に必要な配向・磁化率テンソルの決定のために，立体構造計算と組み合わせた再帰的自動解析機能が実装されている．こうした技術発展の蓄積は，化学シフトからの2面角情報，NOE，RDC，PCS，PREなど

Multi-state conformations，protein structure determination，paramagnetic effects，in-cell NMR

○いけや てっぺい，たていし ゆたか，おかだ まゆ，ぎゅんたーと ぺーたー，いとう ゆたか

のNMRデータをすべて用いた統合的な立体構造計算を可能にしている．常磁性効果等から得られる遠距離情報は，NOE解析ではとらえることができなかったタンパク質の大きな運動を直接的な空間情報として解析することができる．また，生細胞内の還元環境下や分子混雑環境下においても使用可能なリンカー部を持つ常磁性タグの開発により，ヒト培養細胞においても直接的な遠距離の構造情報の取得に成功した例も報告している[1]．こうして，溶液NMRによる立体構造解析の最も際立った特徴である「より自然な環境」下での，タンパク質立体構造とダイナミクス解析が汎用的な技術へ確実に近づいている．

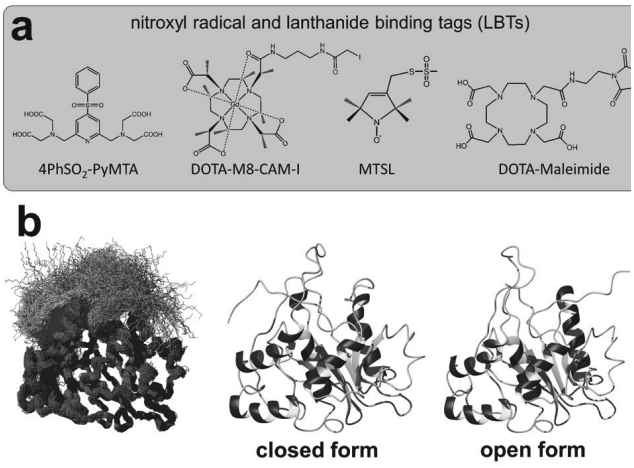
本発表では，最近の我々の研究成果として，常磁性効果などの遠距離情報と従来のNOEや化学シフト由来の近距離情報を統合的に解析し，大きなダイナミクスを持つタンパク質を複数コンフォメーションの存在を仮定して解析する手法(multi-state立体構造計算)について報告する．モデルタンパク質としては酵母由来の脱ユビキチン(Ub)化酵素 yeast ubiquitin hydrolase 1 (YUH1, 236残基) を用いた．また，ヒト培養細胞(HeLa)を用いたin-cell NMRでの，PCS, PRE計測から今後の細胞内立体構造解析への展開についても議論する．

【実験】

内在性の Cys を Ser に置き換え, 新たに Cys を一カ所導入した 4 種類の変異体を調製し, MTSL, $4PhSO_2$-PyMTA, Maleimide-DOTA, DOTA-M8-SPy の LBT を導入し(Fig.1a), PRE, PCS 計測を行った．RDC 測定は，Pfl phage を用いて配向させた試料について IPAP-HSQC 測定を行って求めた．上記により得られた距離・角度情報に加え，NOE 由来の近距離情報，および TALOS-N から推定された二面角拘束を利用し，CYANA に実装した multi-state 立体構造計算を行った．細胞内常磁性計測では，細胞内還元環境においても安定してタンパク質に結合できる DOTA-M8-CAM-I タグを新たに開発し，大きな PCS 計測に成功した．

【結果と考察】

YUH1についての主鎖^{15}N核T_1,T_2緩和解析からは，活性中心を覆うクロスオーバーループ（146-164残基)と，活性中心の側面に位置するN末端領域(1-13残基)に，非常に大きなダイナミクスが示された．YUH1-Ub複合体(結晶構造)[2]中では，温度因子の値が小さく運動性は低いと推定されていたが，本研究によってYUH1単体構造では異なる運動性を持つことが示唆された．



integrated analysis of PREs, PCSs, RDCs, NOEs, and chemical shifts. (**a**) Nitroxyl radical and lanthanide binding tags used for the PCS, PRE measurements. (**b**) YUH1 ensemble structures calculated by multi-state structure calculation. The conformations were obtained by assuming two-state model.

さらに，複数のLBTsと，複数の金属，および異なる結合サイトからのPRE，PCS計測より，様々な遠距離の情報を得ることに成功した．これらデータと，RDC，NOE，化学シフトのデータを統合解析し，multi-state立体構造計算を行[illegible]端領域に特に広い構造分布を持つアンサンブル構造を得た(Fig.1b)．この活性中心付近の大きな運動性の観測からYUH1の新たな分子認識機構が示唆される．

細胞内での常磁性効果計測では，DOTA-M8-CAM-Iタグを用いることで，大きなPCS値の観測に成功し，生きた細胞内においても運動性の大きなタンパク質の構造解析への展開が可能となった．

【参考文献】

1. Hikone, Y. et al, *J. Biomol. NMR* 2016, 66, 99-110
2. Johnston, S. C. et al., *EMBO J.* 1999, 18, 3877-3887

第1日目
11月7日（木）
一般演題

Day 1（Nov. 7, Thu）

L1-1

常磁性ランタノイドイオンを用いたNMRとEPRによるマルチドメインタンパク質の構造解析

○斉尾 智英[1,2,4]，平松 蒼野[2]，浅田 瑞枝[3]，瀧下 俊平[2]，齋藤 彦太[4]，中村 敏和[3]，石森 浩一郎[1,2,4]
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分子科学研究所
4北海道大学 理学部

Combined use of NMR and EPR in the structural study of a multidomain protein MurD

○Tomohide Saio[1,2,4], Soya Hiramatsu[2], Mizue Asada[3], Shunpei Takishita[2], Genta Saito[4], Toshikazu Nakamura[3], Koichiro Ishimori[1,2,4]
1Faculty of Science, Hokkaido University
2Graduate School of Chemical Sciences and Engineering, Hokkaido University
3Institute for Molecular Science
4School of Science, Hokkaido University

Despite the fact that multi-domain proteins are abundant and play important roles in the cell, lack of the structural information often obscures the detailed mechanism. Although long-range structural information obtained by NMR using paramagnetic lanthanide ion is useful in the structural analysis, the information is sometimes hindered due to conformational exchanges that average the resonances from each of the states. To overcome the averaging issue, we have exploited distance measurement by EPR. Ensemble analysis with combined use of paramagnetic NMR and inter-metal distance distribution from EPR succeeded in resolving multiple conformational states of a multi-domain protein.

［背景］

複数のドメインから構成され，その相対配置を大きく変化させることによって機能するマルチドメインタンパク質の作用機序を明らかにするためには，その動的な立体構造と変化をバイアスなく観測することが重要である．しかし，マルチドメインタンパク質の立体構造を正確に捉えることは容易ではない．NMRによるタンパク質の立体構造解析においては，ドメイン間の相対配置などといった全体構造についての情報を取得することが困難である場合も多い．さらに，複数のコンフォメーションが存在し，それらが速い交換によって平衡状態にある場合，NMR信号の平均化によって，それぞれのコンフォメーション状態を評価することが困難になる．

本研究では，常磁性ランタノイドイオンを用いたNMRとEPRによるマルチドメインタンパク質の構造解析に取り組んだ．NMRにおいては，タンパク質に固定したランタノイドイオンから誘起されるpseudocontact shift (PCS) など常磁性効果より，~40 Åという広範囲から立体構造情報を取得することが可能になる[1]．このような長距離情報によ

常磁性ランタノイドイオン，マルチドメインタンパク質，構造分布

○さいお ともひで, ひらまつ そうや, あさだ みずえ, たきした しゅんぺい, さいとう げんた, なかむら としかず，いしもり こういちろう

って，タンパク質の全体構造についての情報を取得することが可能である．さらに，常磁性ランタノイドイオン，特にGd^{3+}はEPR測定においても有用である．タンパク質の2箇所にGd^{3+}を固定し，double electron-electron resonance (DEER) 測定を行うことにより，~80 Åの範囲内でタンパク質の2点間の距離と存在比 (距離分布) を取得することが可能である．DEER測定から得られる距離分布の情報は，タンパク質が複数のコンフォメーション状態として存在する場合に特に有益である．本発表においては，3つのドメインから構成される50 kDaタンパク質MurDを対象とした解析結果を報告し，本手法の有用性と課題について議論する．

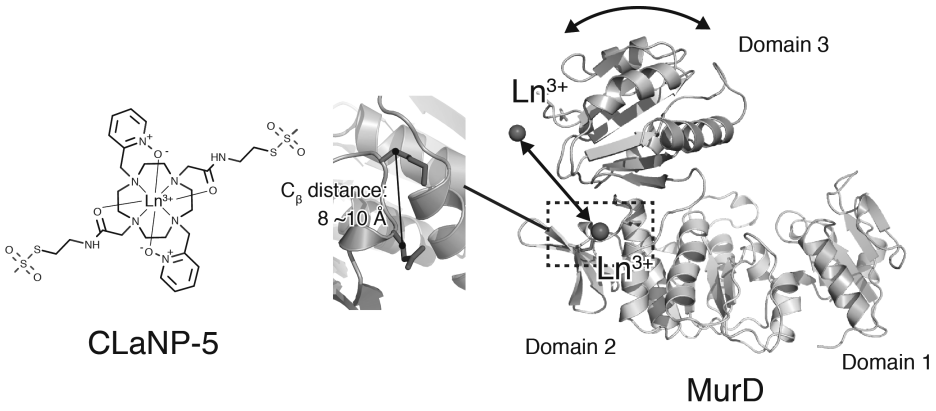


Figure: Attachment of the lanthanide ion to MurD by CLaNP-5 tag.

[方法]

MurDのコンフォメーションを追跡するために，システイン変異を導入したMurD発現コンストラクトを作成し，ジスルフィド結合2点によってCLaNP-5タグ[2]を固定し，ランタノイドイオンを固定した (Figure)．NMRによるPCS観測のためには，domain 1またはdomain 2のそれぞれ1箇所にCLaNP-5を導入しランタノイドイオンを固定した試料を調製した．EPR DEER測定のためには，domain 2とdomain 3にガドリニウムイオン (Gd^{3+}) を固定した．DEER測定はQ-band装置にて10 Kの凍結試料に対して測定した．

[結果・考察]

PCS観測からは，リガンド結合に伴うMurDの立体構造変化が観測され，阻害剤などの結合によって，結晶構造解析で観測されたclosed状態 (PDB code: 3uag) をとることが示された．一方で，apo状態のMurDについて観測されたPCSからは，apo MurDが複数の構造状態間の平衡として存在することが示唆された．EPR DEER測定によって，domain 2とdomain 3に固定したGd^{3+}間の距離分布を計測した結果，複数の距離成分が検出された．PCSとDEER測定によって得られた距離分布に基づいたアンサンブル解析を行った結果，apo MurDのコンフォメーション平衡を構成する主要な成分が明らかになった．

[引用文献]

(1) Saio, T.; Ogura, K.; Kumeta, H.; Kobashigawa, Y.; Shimizu, K.; Yokochi, M.; Kodama, K.; Yamaguchi, H.; Tsujishita, H.; Inagaki, F. *Sci. Rep.* 2015, 5, 16685.

(2) Keizers, P. H. J.; Saragliadis, A.; Hiruma, Y.; Overhand, M.; Ubbink, M. *J. Am. Chem. Soc*. 2008, 130 (44), 14802.

L1-2

水素結合のNMRによる観測

高田　夢人、小泉　太貴、中島　弘稀、伊藤　隆、○三島　正規
首都大学東京　理学研究科

Identification of hydrogen bonds by heteronuclear NMR

Yumeto Takada, Taiki Koizumi, Hiroki Nakajima, Yutaka Ito, ○Masaki Mishima
Graduate School of Science, Tokyo Metropolitan University

Hydrogen bonds plays a pivotal roles in structure and function of bio-macromolecules. Scalar spin couplings (*J* couplings) via hydrogen bonds were reported in 1998. The use of *J* couplings via hydrogen bonds is attractive since they provides unambiguous identification of a pair of donor and acceptor of a hydrogen bond. However, they are generally quite small. For example, 0.1-0.9 Hz in size for hydrogen bonds between amide and carbonyl groups in proteins. Here, we reports a large scalar spin coupling via a hydrogen bond (~7 Hz in size) between the backbone amide and the nitrogen of side chain of histidine in a protein (N-H--N). In addition, we succeeded in measuring the signals via *J* couplings across a “bifurcated hydrogen bond”. We are currently measuring the *J* couplings quantitatively. We will discuss the values in combination with a neutron crystallographic and a high-resolution X-ray crystallographic studies.

背景

水素結合は指向性を有し、特定の結合角や結合長をもった結合を形成する。またその結合が弱いために解離と再結合を行うことができる。水素結合はこれらの特徴的な性質のため、生体高分子の構造形成・機能発現に極めて重要な役割を果たしている。1998年に水素結合を介した*J*カップリングの存在が報告されており、これは水素結合の存在を直接示すことができる点で大変意義深い[1)2)]。また、多次元NMR法を用いることで、水素結合のドナー原子とアクセプター原子の間で、水素結合を介した*J*カップリングによる相関を得ることができる、即ち、水素結合の直接観測ができる点で極めて有用である。しかし、その大きさは、タンパク質主鎖のNH--O=Cタイプの水素結合で、0.1-0.9 Hz[1)2)]と非常に小さく、その測定感度の低さから、研究報告は必ずしも多くない。

本会では、タンパク質の主鎖NHから、隣接するヒスチジン側鎖へのNH--Nタイプの水素結合における大きな*J*値の観測について報告する。発表者らは以前、タンパク質とヌクレオチドの間の数Hzに及ぶ大きな*J*カップリングを報告しているが[3)]、これら大きな*J*について知見を蓄積することは、構造研究等におけるその利用を考えるうえで有用であろう。さらに、アスパラギン側鎖のカルボキシル基内の１つの酸素原子に対して、２つの残基の主鎖アミド基が、枝分かれ型の水素結合を形成している場合における、水素結合経由の*J*カップリングの観測等についても報告する。近年の中性子線結晶構造解析に進展により、実験的に決定された水素原子の座標も利用できるようになっていることから、実験的に決定された水素の位置に基づいた水素結合のジオメトリと、*J*値の関係についても解析を進めている。

水素結合、スピン結合（*J*カップリング）

たかだゆめと、こいずみたいき、なかじまひろき、いとうゆたか、○みしま　まさき

１．タンパク質内のNH--Nタイプの水素結合

核酸の塩基対における水素結合（NH--N）では数Hzの大きさの水素結合を介した*J*カップリングが存在することが知られていたが、タンパク質内でも主鎖アミドからヒスチジン側鎖のインドール環の窒素原子に対する水素結合を介して数Hz(~ 5 Hz)の大きな*J*カップリングが存在することが2015年に報告された[4]。一方､我々は分裂酵母のRACK1ホモログであるCpC2タンパク質（314残基）の構造生物学的研究を進めるなかで、^{1}H-^{15}N TROSYスペクトル上でのF65の主鎖の信号のプロトンの化学シフトが、11.4 ppmと極めて低磁場に存在し、^{15}N軸側で約7 Hzという非常に大きな分裂を示すことに気づいた。並行して行った結晶構造から、F65の主鎖アミドとH64側鎖の水素結合の存在が推定されたことから、次に、この水素結合経由の$^{h2}J_{NN}$を観測するために、HNN-COSYを測定したところ、F65の主鎖のNHに関して、H64側鎖のNδの$^{h2}J_{NN}$由来と考えられるクロスピークを観測することに成功した。現在、Spin-echo diffrenceタイプの測定によって、$^{h2}J_{NN}$の定量的な解析を進めている。TROSYでの分裂幅から推定されたように実際に7 Hz程度の大きさのスピン結合であるとすれば、先行して報告されている$^{h2}J_{NN}$の値~5 Hz [4]よりも大きい。X線結晶構造解析にも成功していることから、水素結合のジオメトリと$^{h2}J_{NN}$ 値の関係についても解析を進めている。

２．二股のNH--O=Cタイプの水素結合

Bacillus thermoproteolyticus Ferredoxin (*Bt*Fd)は、高分解能のX線結晶構造解析と、中性子結晶構造解析が行われている。これらの座標から、I43，V44 の主鎖の２つのアミド基がD38の側鎖カルボキシル基の酸素原子へ形成しているNH--O=C型の枝分かれ水素結合の存在が確認できる。この枝分かれ水素結合を、水素結合経由の*J*カップリングを用いて観測に成功したので報告する。現在、この枝分かれ水素結合についてspin-echo differenceタイプの測定を行い、定量的な$^{h3}J_{NC'}$値の解析を進めており、中性子線結晶構造に基づく正確な水素の位置を用いて、水素結合距離、角度の関係を併せて本会で議論したい。

３．水素結合ジオメトリと*J*カップリングの関連、実際の検出

水素結合経由の*J*カップリングの大きさと、水素結合のジオメトリには強い関連があることはすでに明らかにされているが[2)3)]、水素の座標が利用できる構造解析の報告が蓄積した現在、さらに精密な解析結果と蓄積することは重要であろう。そこで、前述の*Bt*Fdの中性子線結晶構造を用いた解析に加えて、Phycocyanobilin:ferredoxin oxidoreductase (PcyA) (246残基)についても、主鎖アミド・カルボニル間での水素結合を対象に定量的な解析を進めており、すでに報告されているPcyAの中性子線結晶構造から得られる水素結合の座標と合わせて、議論したい。

また、水素結合経由の*J*カップリングの大きさと、水素結合のジオメトリに強い関連があり、アクセプターとプロトンに関して直線性からずれの大きな水素結合では*J*カップリングも減弱するが、実際の構造研究においては、そのような水素結合の情報が必要なことも多い。そこで、減弱した*J*カップリングの代替として、リン酸に関連した水素結合に関して、残余双極子相互作用によるドナーとアクセプターのペアの検出を試みたので報告する。

【文献】1) Dingley, AJ. and Grzesiek, S. (1998) *J. Am. Chem. Soc.* 120，8293-8297， 2) Cordier, F. *et al* (2008) *Nat. Protocol* 3,235-241, 3) Mishima, M. *et al* (2001) *J. Am. Chem. Soc.*, 122, 5883-5884 4) Preimesberger MR. *et al*, (2015) *J. Am. Chem. Soc* 137 1008-1011

【謝辞】多次元 NMR 測定の一部は、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)、^{31}P 関連の測定は、蛋白研拠点事業 NMR 共同利用研究（超高磁場）の支援を受けました。

L1-3

構造平衡制御によるタンパク質のドラッガビリティの改善

○竹内恒[1], 水越弓子[1,2], 德永裕二[1], 滝沢剛[3], 半沢 宏之[3]、嶋田一夫[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. 第一三共RDノバーレ
4. 東京大学大学院薬学系研究科

NMR-based strategy to improve the druggability of proteins by controlling the conformational equilibrium

○[1]Koh Takeuchi, [1,2]Yumiko Mizukoshi, [1]Yuji Tokunaga, [3]Takeshi Takizawa, [3]Hiroyuki Hanzawa, and [4]Ichio Shimada
1. National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Molecular Profiling Research Center for Drug Discovery
2. The Japan Biological Informatics Consortium
3. Daiichi-Sankyo RD NOVARE
4. The University of Tokyo, Graduate School of Pharmaceutical Sciences

In drug-developments, ligands often bind to pockets that are not evident in the unligated state to improve the affinity and specificity. These pockets are called *cryptic sites* and the presence of the cryptic sites usually becomes evident only after the serendipitous finding of the ligands. By using solution NMR, we showed that the cryptic site already exists in the conformational equilibrium of unligated BclxL, a target of PPI inhibitors. We quantified that ~1% of the unligated BclxL has the cryptic site with an open conformation. An allosteric mutation that stabilizes the cryptic site was developed based the NMR chemical shift information and was successfully improved the hit rate of an initial screening. These results indicate that the draggability of proteins can be rationally improved by controlling the population of cryptic site in the conformational equilibrium.

タンパク質 - タンパク質相互作用（PPI）は薬剤の標的として魅力的であるが、PPI 阻害剤の設計の難易度が高いことが知られている。設計が難しい理由の一つは、PPI が浅く広い相互作用面を持っており、薬剤の標的になりやすい酵素などの深く狭いポケットとは異なって、低分子薬剤が結合しにくいことにある。そのため、PPI 阻害剤の構築を行うために、低分子と比べ広い結合面をカバーしうる中分子の活用など、様々なアプローチが試みられている。その結果、PPI 阻害剤の一部が臨床試験に入るなど、一定の成功が見られるようになった。しかしながら、PPI 阻害剤の構築には、未だ多大な労力を要するのが現状であり、これまでに確立された戦略を活かす形で、新たな方法論を開拓する必要がある。

PPI の親和性と特異性において、タンパク質の柔軟な構造変化は重要な役割を果たすことが知られている。特に、非結合状態の標的構造においては明確でなく、薬剤が結合したときに見出される薬剤結合サイトは、クリプトサイトと呼ばれる。クリプトサイトの多くは、偶然見つかったリガンドと標的の複合体構造解析により発見されてきた。しかしながら、PPI の約半数がクリプト

構造平衡、ドラッガビリティ、タンパク質 - タンパク質相互作用
○たけうちこう、みずこしゆみこ、とくながゆうじ、たきざわたけし、はんざわひろゆき、しまだいちお

サイトを有するという試算もあり、クリプトサイトの活用は、創薬標的の枯渇を解決する手段の一つとして期待されている。

本研究において我々は、リガンドが結合していない状態の標的構造においてクリプトサイトを同定し、同定したクリプトサイトを、リガンド非存在下で安定に存在させる変異体を構築することで、PPI 阻害剤の構築を容易にする新たな戦略を確立することを目的として研究を行った。

研究対象としては、抗がん活性を持つ PPI 阻害剤 ABT-737 の標的であり、クリプトサイトが見出されている抗アポトーシスタンパク質 Bcl-xL を用いた。ABT-737 は、Bcl-xL の α3/α4 ヘリックスの間に形成されるクリプトサイトに結合する（図 1）。

非結合状態における温度依存性解析や緩和分散解析を行ったところ、Bcl-xL は薬剤が結合していない状態でもクリプトサイトが閉じた構造と開いた構造との平衡にあり、約 1%の割合で開いた構造を取ることが明らかとなった。

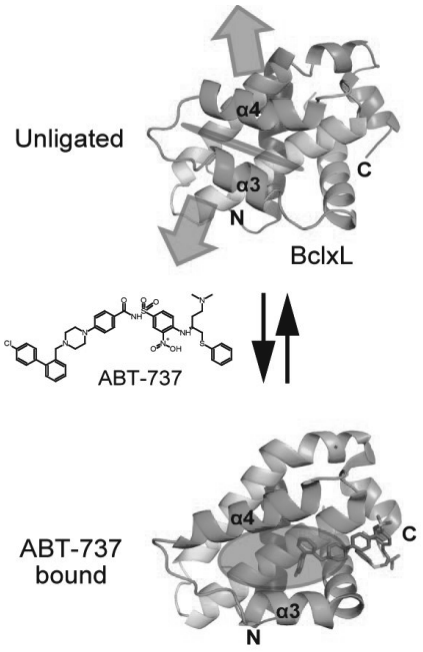


Fig. 1 ABT-737 binds to cryptic site between α3 and α4 helix of Bcl-xL.

また、クリプトサイトの開口にともないアロステリックな化学シフト変化を示した α5/α6 ヘリックス間の残基に着目し、変異導入に伴う化学シフト変化を指標に、クリプトサイトを開口状態に安定化するアロステリック変異体を見出した。見出された変異体は、構造平衡におけるクリプトサイトが開いた状態の構造の割合が、10 倍以上増大していた。また等温滴定カロリメトリー（ITC）実験を行った結果、ABT-737 に対する結合親和性は増大する一方、結合の熱力学的特性は保持されていた。よって、クリプトサイト安定化変異体は、クリプトサイトが開いた構造の割合が増えた一方、結合面自体の構造や阻害剤との相互作用様式は変化していないと考えられる。

そこで、さらにクリプトサイト安定化変異体を用いることで、クリプトサイトに結合するリガンドのスクリーニングを効率化できると考え、ファージディスプレー法による検討を行った。その結果、変異体を用いると野生型より結合活性を示すクローンが高頻度で見出され（図 2A）、スクリーニング効率が向上することが確認できた。また得られたペプチドリガンドは、変異型だけでなく、野生型の Bcl-xL にも結合した（図 2B, C）。さらにペプチドの結合に伴う化学シフト変化は、ABT-737 の結合に伴うアロステリック化学シフト変化と相関しており、ペプチドはクリプトサイトが開いた構造に結合していることが示唆された（図 2D）。このことは、NMR 法を用いた構造平衡の制御により、タンパク質のドラッガビリティを改善できることを示している。本研究において確立した戦略は、PPI 阻害剤の構築に広く資するものである。

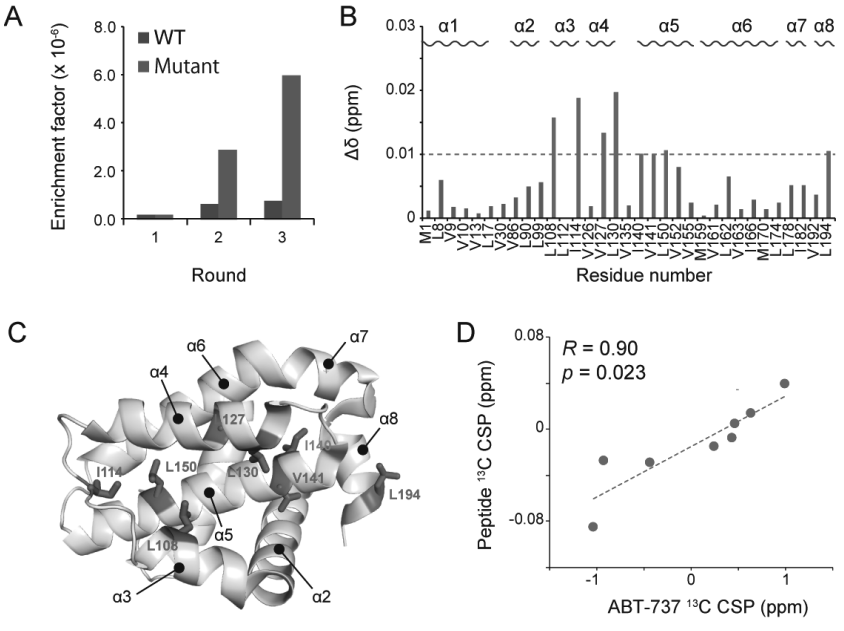


Fig. 2 Efficient screening of peptide ligand by cryptic site open mutant.

L1-4

Ga-NMR による GaN 結晶中の自発分極の直接観察

○佐々木　進[1,2]，森勇介[3,4]，
久志本真希[5]，天野浩[4]，白石賢二[4]
1 新潟大学工学部
2 日本医療研究開発機構AMED先端計測
3 大阪大学工学研究科
4 名古屋大学IMaSS
5 名古屋大学工学研究科

Direct Observation of Spontaneous Polarization in Freestanding GaN Substrate

○Susumu Sasaki[1,2], Yusuke Mori[3,4], Maki Kushimoto[5], Hiroshi Amano[4], Kenji Shiraishi[4]

1 Niigata University, Faculty of Engineering
2 Japan Agency for Medical Research and Development (AMED), SENTAN
3 Osaka University, Graduate School of Engineering
4 Nagoya University, IMaSS
5 Nagoya University, Graduate School of Engineering

We have directly observed spontaneous polarization in freestanding *c*- and *m*-GaN crystal through Ga nuclear magnetic resonance (NMR). We also clarified that the polarization lies in the *c*-direction (in the in-plane direction) for the *c*-GaN (*m*-GaN).

1. Introduction

In GaN, it has been widely believed that, due to strong ionic bonding, there should exist spontaneous polarization. To the best of our knowledge, however, no direct observation has been reported.

Nuclear magnetic resonance (NMR) is a powerful method to observe internal electronic states of various materials, since the nuclei that constitute the material are used to probe the surrounding electronic states in atomic-scale. Indeed, NMR has been contributing a great deal to clarify the microscopic electronic states in various materials such as superconductors [1] and magnetic materials. Mainly due to technological difficulties, however, NMR has not been fully employed to the study of semiconductors [2].

Here, using home-built and customized NMR spectrometer, we have succeeded in direct observation of spontaneous polarization in *c*-GaN and *m*-GaN through Ga-NMR. We also found that the polarization lies in the c-direction (in-plane direction) for the *c*-GaN (*m*-GaN). The present result is well reproduced by the first-principle calculations.

2. Experiments, Results and Discussions

For this study, we used two types of freestanding GaN substrate. One is HPVE *c*-GaN and the other is *m*-GaN.

If spontaneous polarization exists, it should be observed as splitting of NMR frequency spectra through the interaction between Ga nuclei and the electric field gradient (EFG) at the Ga-sites.

(a) *c*-GaN : This is exactly observed in Figure 1 whereθ(the angle between the c-axis and the magnetic field) is zero. As is seen in Fig. 1, the splitting between the right-hand satellite and the left one is equally divided by the center peak with the interval of 1.36 MHz. From other experiments, we have confirmed that the interval is completely attributed to the EFG at the Ga-sites.

GaN結晶，自発分極，直接観察，Ga-NMR
○佐々木進（ささき　すすむ）もりゆうすけ　くしもとまき　あまのひろし　しらいしけんじ

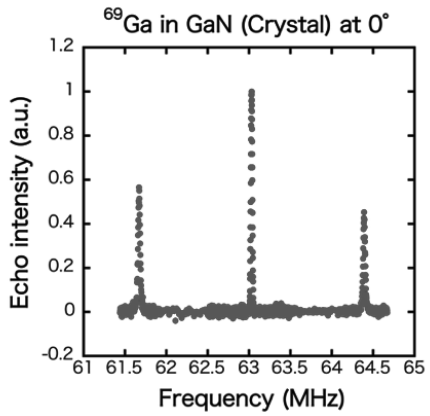


Figure 1. Ga-NMR spectrum for *c*-GaN with θ =0 under the magnetic field of 6.16 tesla.

Moreover, we found that the interval depends on θ as $(3\cos^2\theta-1)$ [3], which is clearly seen in Fig. 2.

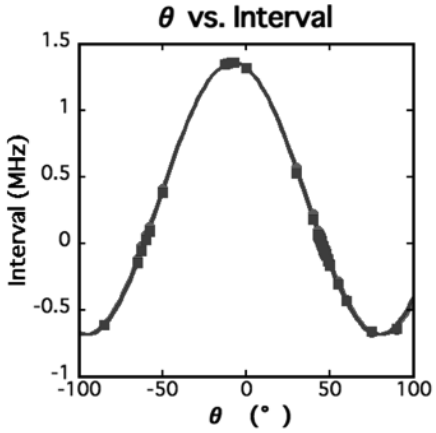


Figure 2. θ -dependence of the interval of Ga-NMR spectra for *c*-GaN. The shift of the peak angle from 0° is confirmed to come from canted setting of the *c*-GaN sample.

These results indicate that there exists surely spontaneous polarization in *c*-GaN and the direction is parallel to *c*-axis.

(b) *m*-GaN

For *m*-GaN, we also observed splitting of the Ga-NMR spectra which are confirmed to come from the EFG at the Ga-sites. Compared to the results of *c*-GaN, however, the angular dependence is totally different. The upper panel of Fig. 3 shows the Ga-NMR spectrum in the case that the m-surface is parallel to the magnetic field. In contrast, the lower panel is the spectrum when the m-surface is placed perpendicular to the magnetic field. These results can be understood only when

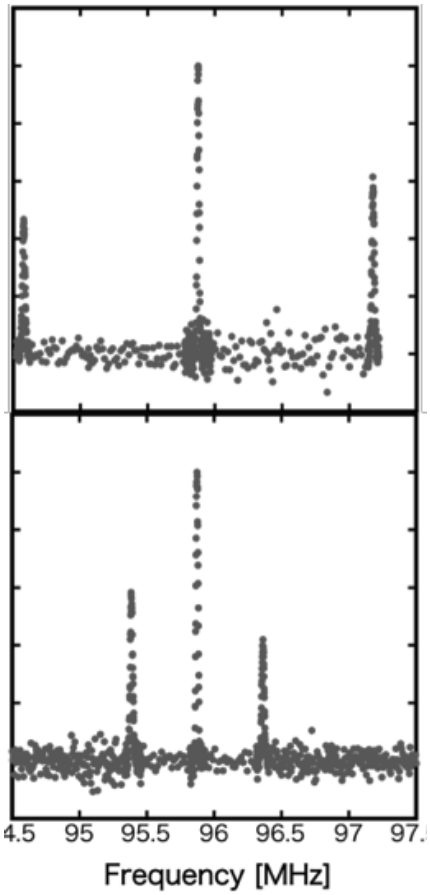


Figure 3. Ga-NMR spectra for *m*-GaN under the magnetic field of 9.4 tesla. Upper: The *m*-surface is placed parallel to the magnetic field. Lower: The *m*-surface is placed perpendicular to the magnetic field. These results indicate that, for *m*-GaN, the spontaneous polarization lies in the *m*-surface.

the polarization lies in the in-plane direction for *m*-GaN, as expected.

3. Conclusions

Through Ga-NMR spectra, we have directly observed the spontaneous polarization in both *c*-GaN and *m*-GaN. From the angular dependence, the polarization in *c*-GaN is perpendicular to the *c*-surface, whereas the polarization in *m*-GaN lies in the *m*-surface.

References

[1] L. C. Hebel, C. P. Slichter, *Phys.Rev*. **113**, 1504 (1959).
[2] S. Watanabe, S. Sasaki, S. Sato, N. Isogai, Y. Matsumoto, *Appl. Phys. Lett.* **92** 253116. 1 - 253116. 3, (2008).
[3] C. P. Slichter, *Principles of magnetic resonance*, Solid-State Sciences 1, Springer (1990).

L1-5

NMR 信号の高効率な光変換のための小型薄膜モジュールの開発

◯ 冨永雄介 [1]，松川陽亮 [1]，Ng Wern[1,2]，武田和行 [1]
[1] 京都大学大学院 理学研究科
[2] インペリアル・カレッジ・ロンドン，材料工学科

Development of a compact rf-to-light transducer for electro-mechano-optical NMR

◯Yusuke Tominaga[1], Takaaki Matsukawa[1], Ng Wern[1,2], Kazuyuki Takeda[1]
[1] Graduate School of Science, Kyoto University
[2] Department of Materials, Imperial College London

Recently, we reported on proof-of-principle demonstrations of Electro-Mechano-Optical (EMO) NMR, in which radio-frequency signals are up-converted to the optical regime through electromechanical and optomechanical couplings. However, the sensitivity of EMO NMR still remains less than ideal. Towards realization of practical EMO NMR, we present here the design and fabrication of a high-performance compact rf-to-light transducer that can be installed inside the body of an NMR probe. The main body of the module is a palmtop vacuum chamber equipped with hermetically sealed SMA ports and an optical window. Inside the chamber is installed a metal-coated SiN membrane oscillator serving as both a capacitor electrode and a mirror of an optical cavity, so that the oscillating metal layer transcribes the profile of NMR signals onto the optical carrier.

1 Introduction

機械振動子が光や電気と相互作用しているオプトメカ・エレクトロメカ結合系を用いることにより，ラジオ波信号を光学領域の信号へと変換できることが示された [1]．我々はこの原理を応用して，NMR 信号を光変換する Electro-Mechano-Optical (EMO) NMR の原理実証に成功した [2, 3]．現時点では EMO NMR の感度は通常の方法に劣るものの，将来的には低雑音での NMR 測定が実現できると考えられている．ここでは，これまでの原理実証的な実験からさらに実用的な NMR 測定へと発展させるため新たに開発した小型の EMO NMR 装置を報告する．

2 Design & Fabrication

Figure 1 のように，EMO NMR での信号の変換はエレクトロメカ結合とオプトメカ結合の 2 つの結合を介して達成されるが，一方でノイズ（機械振動子の熱振動）はオプトメカ結合のみを通して光に変換される．したがって，信号をロスすることなくエレクトロメカ結合によって増幅することができれば，相対的に雑音の寄与を小さくすることができる [2, 3]．その実現のために，新たに作成した EMO NMR 装置では，次の点でこれまでの EMO NMR 装置に比べて改良されている．

1. 機械振動の空気による減衰を防ぐための真空チャンバーを小型化し NMR プローブに組み込めるように設計した（Fig. 2a）．超伝導磁場のボア内に収まり，測定試料のすぐ近くに機械振動子（ここでは窒化ケイ素薄膜）を設置できるため，信号のロスが少なくなる．
2. 薄膜振動子に最短の配線で電気的にアクセスできるように，Fig. 2b のようなハーメチック

Electro-Mechano-Optical (EMO) NMR，電気-機械-光結合，光変換
◯ とみながゆうすけ，まつかわたかあき，あんわーん，たけだかずゆき

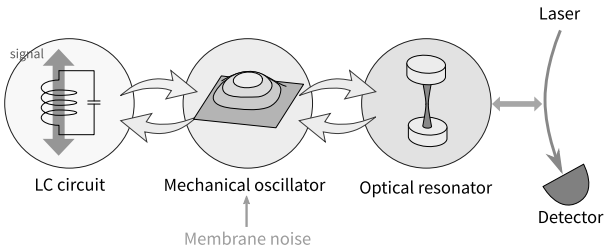
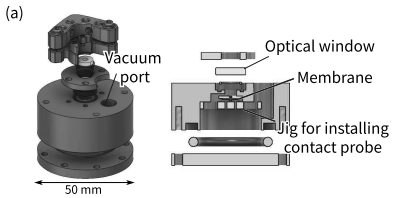


Fig. 1　In EMO NMR, the signal is transduced in two steps, whereas the noise due to the thermal fluctuation of the membrane is transduced only in a single step.



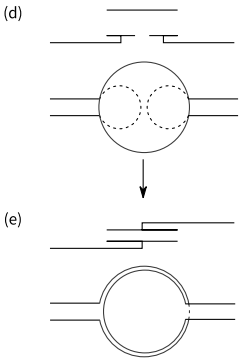


Fig. 2　(a) Design of vacuum chamber, (b) picture of harmetic contact probe, (c) picture of vacuum chamber viewed from a side with harmetic ports, (d) previous design and (e) new design of parallel-plate membrane capacitor.

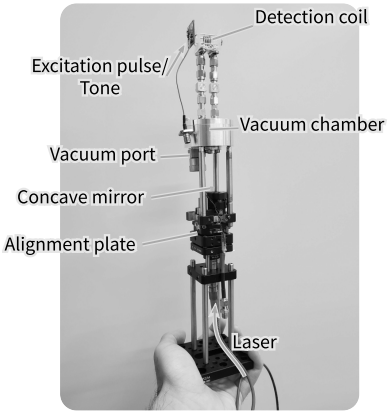


Fig. 3　Fabricated EMO system

コンタクトプローブと呼ぶものを開発した．Figure 2c のようにチャンバーの蓋を閉めるだけで薄膜に電気的にアクセスすることができる．

3. エレクトロメカ結合を実現するための薄膜キャパシタのデザインを改良し，キャパシタ電極間のギャップは小さく，電極間の重なり面積は大きくなるようにした（Fig. 2d, e）．これによりエレクトロメカ結合が大きくなることが期待される．

Figure 3 は，作製した EMO NMR 装置全体の写真である．上部に信号検出用コイルがあり，すぐ下に真空チャンバーが設置されている．アライメント機構を備えた光学系を設計・作製し小型真空チャンバーに取り付けており，レーザーは下から光学窓を通じて真空チャンバー内の薄膜と凹面鏡からなる Fabry–Pérot 光共振器に対して入射される．真空チャンバー内に置かれた薄膜がキャパシタ電極かつ鏡として働くため，NMR 信号は光信号に転写されて検出される．

References

[1] Bagci, T., Simonsen, A., Schmid, S., Villanueva, L. G., Zeuthen, E., Appel, J., Taylor, J. M., Sørensen, A., Usami, K., Schliesser, A., and Polzik, E. S. Optical detection of radio waves through a nanomechanical transducer. *Nature 507*, 7490 (2014), 81.

[2] Takeda, K., Nagasaka, K., Noguchi, A., Yamazaki, R., Nakamura, Y., Iwase, E., Taylor, J. M., and Usami, K. Electro-mechano-optical detection of nuclear magnetic resonance. *Optica 5*, 2 (2018), 152–158.

[3] Tominaga, Y., Nagasaka, K., Usami, K., and Takeda, K. Studies on nmr-signal up-conversion from radio-frequency to optical regimes using a lightweight nanomembrane transducer. *Journal of Magnetic Resonance 298* (2019), 6–15.

L1-6

CdSe及びAgマジックサイズクラスターの固体NMRによる研究

○野田泰斗[1]，栗原拓也[1]，竹腰清乃理
[1]京都大学大学院理学研究科

Solid-State NMR of CdSe and Ag Magic-Sized Clusters

○Yasuto Noda[1], Takuya Kurihara[2], and Kiyonori Takegoshi
[1]*Graduate School of Science, Kyoto University*

Clusters, where most of the constituent atoms occupy at or near the surface, show unique properties and structure due to strong effects from the surface/interface. Moreover, the properties and stability depend on the number of the constituent atoms. A cluster which is stable at a particular number of the constituent atoms is called magic-number cluster (MSC). Here, we report on the results of solid-state NMR analysis of CdSe and Ag MSCs, which results have been conducted to for the purpose of clarifying the static/dynamic structures of these MSCs.

【序論】

クラスターは数個から数十個の原子の凝縮体である。構成するほぼ全ての原子が表面とその近傍を占めている、いわば表面（あるいは界面）だらけの物質であり、物性や安定性は表面・界面状態に強く影響される。さらに、クラスターの物性や安定性は表面・界面だけではなく構成原子数に対しても依存している。ある環境下に置かれたクラスターは特定の構成原子数で選択的に安定化し、そのようなクラスターはマジックサイズクラスター（以下、MSC）とよばれている。近年、適切に界面活性剤を選定することにより溶液中にMSCを大量に精密合成し分取する技術が発達し、物性や機能を構造と結びつけて議論されてきている。一方で、多くのMSCは単結晶が得ることが難しいため構造が不明であり、MSCの統一的な理解の妨げとなっている。発表者はそのようなMSCに対し固体NMRを導入し構造解析を行ってきた。本講演では、CdSeとAgのMSCについて最近発表者のグループで得られた固体NMRの結果について報告する。

【CdSe MSC】

CdSeは質量分析から$(CdSe)_{13}$, $(CdSe)_{19}$, $(CdSe)_{34}$のMSCを形成することが知られている。我々はL-Cysteineを保護基として用いて水中に$(CdSe)_{34}$を大量合成し非破壊に固体化し、界面に存在するシステインの静的構造を固体高分解能NMRを用いて調べた。

アミンの結合状態を定量的に調べるために、J相関NMRと双極子相関NMRを組み合わせて用いる新規解析手法を編み出した。その結果、まず、アミノ基の窒素がCdSeコア表面のカドミウムと結合していることを分光学的に初めて明らかにした。さらにシステインの割合とその結合長を定量的に求めたところ、CdSeコアに結合しているアミンの割合は43%で結合長は約2.4 Åであると解明した。また、結合を持たず表面付近に存在するアミノ基も11%程度ほど存在することが明らかとなった。[1]

マジックサイズクラスター、表面・界面、固体NMR

○のだやすと，くりはらたくや，たけごしきよのり

アミノ基の状態が判明したので、次はシステイン全ての官能基の状態をIRやXPSといった他の方法も用いて解析した。その結果、すべてのチオール基がMSC表面のカドミウムとS-Cd 結合を形成していることが示唆された。XPSと^{23}Na MAS NMR測定やIR スペクトルの解析、カチオン交換した試料の^{13}C CP/MAS NMR測定から、カルボキシル基はMSCの保護に関与しておらず、固体状態の CdSe-Cys ではカウンターイオンとして取り込まれたアルカリ金属イオンと結合していることが明らかとなった。まとめると、SとN が結合を持つ二座配位のシステイン(~43%)とSのみが結合を持つ一座配位のシステイン(~57%)によって CdSe MSCが安定に形成されていることが明らかとなった。[2]

ここまで報告した静的構造に加え、クラスターの機能には動的構造も関与していることが金属クラスターの研究で示唆されている。CdSe MSCの静的構造を調べている際に保護機であるシステインが運動性を有していることが示唆された。そこでCH_2の軽水素を重水素で置換した3,3-d_2システインを用いてCdSe MSCを合成し、可変温度^{2}H NMRによりダイナミクスを調べた。その結果、^{2}H NMRスペクトルは主に2成分を示し、片方は温度に対してほぼ普遍のペークダブレットを示し、もう片方は温度上昇により線幅が細くなった。前者は二座配位のシステインと帰属し、後者を異方性を取り入れた4サイトジャンプモデルで解析したところ、活性化エネルギー0.2 eVで異方的な回転をしている一座配位のシステインと帰属した。[3]

【Ag MSC】

貨幣金属、特に金のMSCは旺盛に研究されてきたが、最近になり銀や合金化した金のMSCの研究が増えてきている。合金化MSCの構造決定は議論が多くいまだ決着していないものもある。そこでNMR活性な109Agに着目し、合金化MSC解析の足がかりとして、まずは最も単純な銀MSCである$Ag_{13}(Ag_2(SR)_3)_6$の固体高分解能NMRをCP/MASを用いて測定した。結果として、3つの信号が得られ、接触時間と信号強度からAg_{13}コア表面の銀とリガンドサイトの銀、そして不純物として残っている銀チオラートの信号と帰属した。この結果はDFT計算の結果と定性的に一致した。詳細はポスター発表する予定である。

クラスターが安定化するのは有機分子の保護基に覆われたときばかりではない。最近、ポリ酸中に銀イオンが取り込まれることが判明した。その銀は上記のようにCPが使えないため感度低下が免れないが、Cryocoil MASプローブを用いることで銀クラスターの状態を解析した。[4]

【謝辞】

本研究はJSPS科研費JP16H06440と18J11973、19K22168の助成を受けて実施された。京都大学化学研究所のスーパーコンピュータを用いてDFT計算を行った。

【References】

[1] T. Kurihara, Y. Noda, and K. Takegoshi, *J. Phys. Chem. Lett.* **81** (2017) 22555—2559.

[2] T. Kurihara, Y. Noda, and K. Takegoshi, *ACS Omega* **4** (2019) 3476—3483.

[3] T. Kurihara, A. Matano, Y. Noda, and K. Takegoshi, *J. Phys. Chem. C* **123** (2019) 14993—14998.

[4] S. Uchida, T. Okunaga, Y. Harada, S. Magira, Y. Noda, T. Mizuno and T. Tachikawa, *Nanoscale* **11** (2019) 5460—5466.

L1-7

ダイヤモンドNV中心を使ったナノスケールの溶液NMR

○大木出[1]，森田航希[1]，藤原正規[1]，森下弘樹[1]，白川昌宏[23]，水落憲和[1]，
1京都大学・化学研究所
2京都大学大学院・工学研究科
3量子科学技術研究開発機構 (QST)

Nanoscale solution NMR spectroscopy using Nitrogen-Vacancy centers in diamond

○Izuru Ohki[1], Koki Morita[1], Masanori Fujiwara[1], Hiroki Morishita[1], Masahiro Shirakawa[2,3] and Norikazu Mizuochi[1]
[1] *Institute for Chemical Research, Kyoto University*
[2] *Graduate School of Engineering, Kyoto University*
[3] *National Institutes for Quantum and Radiological Science and Technology (QST)*

One of the major challenges of life science is to investigate and understand the molecular structure, interaction, and dynamics of living molecules in living cells as they are. NMR is one of the few techniques that makes it possible, but it requires a huge number of molecules and cells to observe, making it difficult to examine individual molecules. However, with the progress of nanoscale photo-detection NMR method using diamond NV center in recent years, the limitation is being removed. Using this technique, We are aiming for NMR detection of several molecules of protein in a single cell, and have already succeeded in measuring proton NMR of 1000 or less organic molecules *in vitro*. In this presentation, we would like to discuss the progress of NV-NMR and its application to biological systems.

生きた細胞や生体内の分子の構造や相互作用・動的変化をありのままの状態で個々に調べ、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、観測には膨大な数の分子や細胞（核スピン数で10^{15}個以上）が必要であった。しかし、この数年のダイヤモンド窒素-空孔中心（NV中心）を用いたナノスケールNMRの進展によって、個々の生体分子を調べていく事が可能となりつつある。

ダイヤモンドNV中心を用いたナノスケールNMR

ダイヤモンドのNV中心には1個の三重項電子が常温で安定に存在しており、レーザーとマイクロ波を使った光検出磁気共鳴法（ODMR : optically detected magnetic resonance）により、そのスピン状態を蛍光強度として顕微鏡観測が可能である事が知られている。またNV中心の電子スピンは磁場環境に極めて敏感であり、感度は1 nT/√Hzを超える。例えば、5 nm離れた1個の核スピンからの磁場強度が10 nTである事から、理論上は単一核スピンの検出が可能である[1]。この高感度な磁気センサーである単一NV中心をNMR検出器として用いる事で、近傍に存在する核スピンを測定するナノメートルスケールのNMRが実現する（図1）。ただ、近傍5 nm^3体積中に存在する10^4個の^{1}H核スピンの検出[2]などNMRシグナル自体の測定には成功していたが、検出器として用いているNV中心電子スピンのT2緩和時間が短い（< 1 ms）ためにNMRスペクトルの周波数分解能が制限

溶液NMR、ダイヤモンドNV中心、手法開発

○おおきいずる、もりたこうき、ふじわらまさのり、もりしたひろき、しらかわまさひろ、みずおちのりかず

（>1 kHz）され、分子の詳細な解析を行うのは難しかった。しかし、2017年になってQ-dyneあるいはCASRと呼ばれる新たな測定法が報告され[3,4,5,6]、T2に依存せず長時間にわたって核スピンとのコヒーレンスを保つ事が可能となり、通常の溶液NMR装置と変わらない1Hz以下の分解能でナノNMRスペクトルを得られるようになってきた。これにより、測定法の難しさから現時点ではまだ1次元であるが、有機低分子を使った高分解能 ^{1}H NMRスペクトルが得られている[6]。

本研究では、このQdyneを用いたナノNMR技術を異種核多次元NMR測定が可能となるよう改良し、さらに本研究室が開発した世界最高磁気感度を持つNV中心ダイヤモンド[7]を利用する事で、少数分子の蛋白質の溶液NMR測定と立体構造解析の実現を目指している。また、ナノダイヤモンド中のNV中心を用いて、単一細胞内の蛋白質数分子のNMR検出を目指した研究も進めている。既に*in vitro*においては10^{3}個の有機分子の^{1}H ナノNMR測定に成功している（図1,2）。発表では手法の進展と生体系への応用、また少数スピンをNMR観測する際に生じる問題点（Statistical polarization状態にある分子の測定等）についても討論したい。

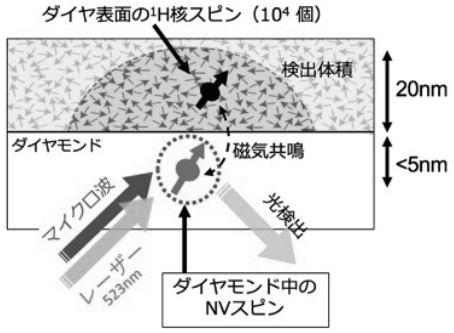


図1. NVスピンから核スピンの検出
（ナノNMR）

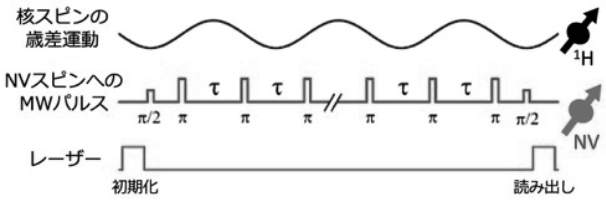


図2. 核スピンの測定法 (XY8)

NVスピンへのMWパルス(XY8 Echoシーケンス)が核スピンのラーモア周波数と一致したときに共鳴が起こる

[References]

1. Cujia *et al*., F Tracking the precession of single nuclear spins by weak measurements, *Nature 571*, 230-233 (2019).
2. Staudacher *et al*., Nuclear magnetic resonance spectroscopy on a (5nm)^{3} sample volume. *Science* 339, 561–563 (2013).
3. Schmitt *et al*., Sub mHz magnetic spectroscopy performed with a nanoscale quantum sensor. *Science* 356, 832–837 (2017).
4. Boss *et al*., Quantum sensing with arbitrary frequency resolution. *Science* 356, 837–840 (2017).
5. Aslam *et al*., Nanoscale nuclear magnetic resonance with chemical resolution. *Science* 357, 67–71 (2017).
6. Glenn *et al*., High-resolution magnetic resonance spectroscopy using a solid-state spin sensor. *Nature* 555, 351–354 (2018).
7. Herbschleb *et al*., Ultra-long coherence times amongst room-temperature solid-state spins, *Nature Comm*. (2019) *in press*

[謝辞] 本研究は科学研究費(JSPS)基盤研究(A) 16H02088及び、光・量子飛躍フラッグシッププログラム（Q-LEAP）JPMXS0118067395の支援を受けて行われた

L1-8

高磁場における溶解トリプレットDNP実験

○宮西　孝一郎[1], 一条　直規[1], 本山　誠[1], 香川　晃徳[1,2,3], 根来　誠[1,2,3], 中村 祐士[4], 江野澤 英穂[4], 村田 剛志[4], 森田　靖[4], 北川　勝浩[1,2]

1 大阪大学大学院基礎工学研究科
2 大阪大学先導的学際研究機構　量子情報・量子生命研究部門
3 JST さきがけ
4 愛知工業大学 工学部

Dissolution Dynamic Nuclear Polarization using Photoexcited Triplet Electron Spins For Solution NMR in a high magnetic field

○Miyanishi Koichiro[1], Ichijo Naoki, Motoyama Makoto, Kagawa Akinori, Negoro Makoto, Nakamura Yushi, Enozawa Hideo, Murata Tsuyoshi, Morita Yasushi, Kitagawa Masahiro

1 Graduate School of Engineering Science, Osaka University
2 Quantum Information and Quantum Biology Division, Institute for Open and Transdisciplinary Research Initiatives, Osaka University
3 JST, PRESTO
4 Faculty of Engineering, Aichi Institute of Technology

Dissolution Dynamic Nuclear Polarization (DNP) has been implemented for various biomedical applications. The conventional DNP requires a cryogenic instrument and a superconducting magnet to obtain high nuclear polarizations. In this study, we construct DNP using photo-excited triplet electron spins (triplet-DNP) apparatus combined with dissolution apparatus for solution NMR in a high magnetic field. After triplet-DNP at room temperature, a polarized sample in the solid state is transferred to a superconducting magnet and dissolved by injecting aqueous solvents for solution NMR. For carboxyl-^{13}C benzoic acid in solution, the enhancement factor of 220 has been obtained in 11.7 T at room temperature. We have also created a long-lived state with hyperpolarized nuclear spins in solution.

溶解DNPによりリアルタイムなNMR測定が可能になり、新規なNMR応用が実現されている[1,2]。我々は従来のDNP法と比較すると低磁場、高温で実験が可能なトリプレットDNPの研究を行っている。これまでトリプレットDNPでは高磁場、高均一な磁場下での液体NMR実験は行われていない。そこで我々は、低磁場でのトリプレットDNP後に試料を高磁場に移動し、溶解する系を構築した。その結果、安息香酸の^{13}Cスピンにおいて11.7 T、室温に対して220倍の信号強度を得た。またトリプレットDNPによって高偏極化されたパラクロロ安息香酸の^{1}Hスピンをシングレット状態へ符号化し、高偏極状態の長寿命化が可能であることを示した。

今回作成した実験装置の全体像をFig. 1に示す。トリプレットDNP用の電磁石(0.39 T)と、溶解後のNMR測定用の超伝導磁石(11.7 T)を用いた。トリプレットDNPで用いたISEシーケンス及び装置はこれまで我々のグループで用いてきたものと同じである[3]。トリプレットDNPによっ

溶解 DNP、トリプレット DNP、シングレット状態

○みやにしこういちろう、いちじょうなおき、もとやままこと、かがわあきのり、ねごろまこと、なかむらゆうし、えのざわひでお、むらたつよし、もりたやすし、きたがわまさひろ

て高偏極化されたサンプルは、5秒以内に固体のまま超伝導磁石内のプローブに転送される。プローブは、サドルコイルを用いており、^{1}H(500 MHz)と^{13}C(125 MHz)の二重共振プローブとなっている。転送後、0.5 Mの水酸化ナトリウム水溶液よってサンプルを溶解した。100℃程度に熱した水酸化ナトリウム水溶液を、0.1 MPaの圧縮空気によってテフロンチューブを通って転送した。転送による水溶液の温度の低下を防ぐために、テフロンチューブは熱水を循環したシリコンチューブ中を通している。

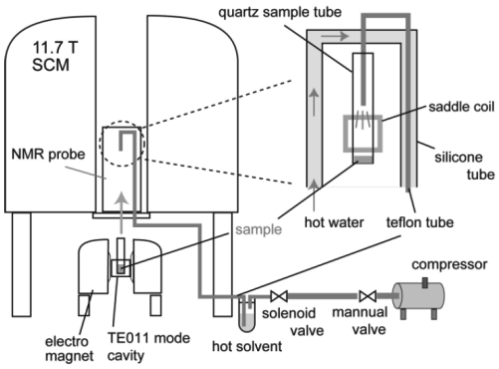


Fig 1. Schematic diagram of our dissolution Triplet-DNP system.

安息香酸中のカルボキシル基の炭素を^{13}Cに、水素を重水素に置換したサンプルで溶解トリプレットDNP実験を行った。その結果、熱平衡状態の信号に対して、220倍の信号強度の増大が得られ、偏極率は0.22%であった。Fig. 2(a)に5秒ごとに30°パルスで測定した結果を示した。これらの結果から、我々の実験装置を用いたリアルタイムなNMR測定が可能であることを示した。

次に、トリプレットDNPによって高偏極化された核スピン偏極の長寿命化へ向けた実験を行った。DNPの代謝イメージングへの応用において長寿命化は重要である。溶液中では分子のランダムな回転や振動によって高偏極状態が縦緩和時間で失われてしまうが、最近接2スピン間の双極子相互作用が緩和の主な原因となっている場合は、シングレット状態に符号化することで緩和に耐性を持たせることができる[4]。本実験では対称性の高いパラクロロ安息香酸の^{1}Hスピン用いて実験を行った。シングレット状態の符号化にはSarkerらのパルスシーケンスを用いた[5]。その結果、縦緩和時間7.4±0.7 秒に対して、シングレット状態に符号化した状態の緩和時定数は18±2 秒となり、2倍以上の高偏極状態の長寿命化に成功した（Fig. 2(b)）。

本研究は、戦略的創造研究推進機構（CREST）、科学技術振興機構（JST）の支援を受けて行われた。

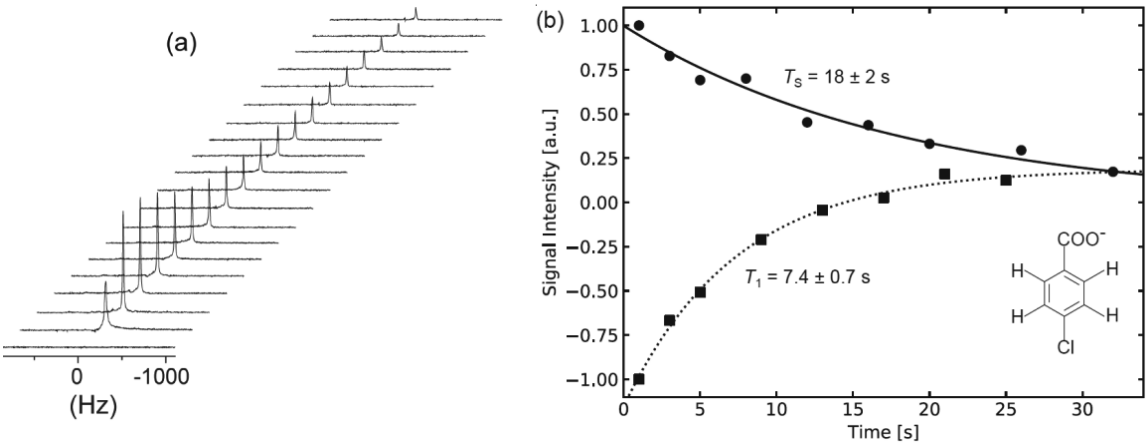


Fig 2. (a) Liquid ^{13}C-NMR spectra of benzoic acid in 11.7 T. The spectra were acquired with a ttime interval of 5 s using a 30° pulse (b) The relaxation curve of the signal from aromatic protons hyperpolarized by triplet-DNP.

[1] Keshari, K. R. and Wilson, D. M. Chem. Soc. Rev. **43**, 1627 (2014).

[2] Golman, K., Zandt, R. I. and Thaning, M. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **103,** 11270 (2006).

[3] Tateishi, K. *et al.,* Proc. Natl. Acad. Sci. USA **111**, 7257 (2014).

[4] Levitt, M. H. Annu. Rev. Phys. Chem. **63**, 89 (2012).

[5] Sarker, R. *et al.,* J. Am. Chem. Soc. **129**, 328 (2007).

L1-9

セレノメチオニン標識蛋白質の^{77}Se-NMR

○杉木俊彦[1]，Vladimír Sychrovský[2]，原田健一[1]，平岡万里菜[3]，藤原敏道[1]，児嶋長次郎[1,3]
1大阪大学・蛋白質研究所
2 Inst. Org. Chem. and Biochem., Acad. Sci. Czech Rep.
3横浜国立大学大学院・理工学府

^{77}Se-NMR for selenomethionine-labeled proteins

○Toshihiko Sugiki [1], Vladimír Sychrovský [2], Kenichi Harada [1], Marina Hiraoka [3], Toshimichi Fujiwara [1], Chojiro Kojima [1,3]
1Institute for Protein Research, Osaka University
2Inst.Org. Chem. and Biochem., Acad. Sci. Czech Rep.
3Graduate School of Engineering Science, Yokohama National University

Methionine and cysteine residues play important and unique roles in regulation of structure or biological function of the proteins, such as post-translational oxidation and electron transfer, due to the chemically reactive sulfur atoms. In addition, methyl group of methionine residue, which is separated from other carbon and proton atoms by the sulfur, can be sensitive probe for protein NMR studies. By substituting the sulfur to selenium, the chemical environmental changes of the sulfur, which is reactive center in various function of the methionine residue, can be directly analyzed by ^{77}Se NMR in an atomic resolution. In this study, we developed several applications of ^{77}Se NMR for structural and functional studies of proteins by using selenomethionine-labeled proteins: (1) post-translational oxidation of desired methionine residue can be sensitively observed. (2) ^{1}H, ^{13}C signals of the methyl group of methionine residue can be assigned without mutagenesis.

蛋白質中のメチオニンおよびシステイン残基は、反応性に富む硫黄原子により、酸化修飾や電子伝達など蛋白質の構造変化・機能発現・制御において重要かつ特徴的な役割を担う。蛋白質の機能における様々な反応を担う硫黄原子(^{33}S)のNMR観測は、蛋白質の構造・機能を調べるうえで有用であると思われるが、I=3/2で核四極子モーメントを持ち、かつ低い天然存在比(0.76%)と低い共鳴周波数(^{1}H:^{33}S=100:7.67)のため容易ではない。

^{33}Sに比べて、セレン(^{77}Se)はI=1/2で天然存在比も共鳴周波数も比較的高く(それぞれ7.6%, ^{1}H:^{77}Se=100:19.07)、硫黄原子と同族原子で化学的性質も似ている。そこで、メチオニン残基の硫黄原子をセレン原子に置換してセレノメチオニンとする事で、当該硫黄原子の化学的環境の変化を^{77}Se-NMRで高感度に観測することが可能であると考えられる。本研究では、セレノメチオニン標識した蛋白質を用いて、蛋白質のメチオニン残基の構造・機能のNMR解析に有用な^{77}Se-NMR実験法の開発を行った。

77セレニウム、セレノメチオニン、タンパク質

○すぎき としひこ，ぶらじーみる しくろふすきー，はらだ けんいち，ひらおか まりな，ふじわら としみち，こじま ちょうじろう

【実験】

大腸菌発現系を用い、目的蛋白質の発現誘導開始30分前にセレノメチオニン50mg/Lを培養液に添加することにより、目的蛋白質のメチオニン残基をセレノメチオニンに置換した。全てのNMR測定は多核種クライオプローブを装着した500MHz NMR装置 (AVANCE III HD, Bruker) にて行い、データ処理はTopSpin3.6 (Bruker)およびNMRPipeにて行った。

【結果・考察】

(1) セレノメチオニンおよびセレノメチオニン標識GB1蛋白質をモデル試料として用い、^{1}H-^{77}Se long-range HSQC, ^{1}H-^{77}Se HSQMBC測定(共鳴周波数: ^{1}H=500.13MHz, ^{77}Se=95.382MHz)によりセレノメチオニン残基内の^{1}H-^{77}Se相関シグナルを検出する方法を確立した。他の様々な蛋白質(MBP, GF14c, VAP-Aなど)でも^{1}H-^{77}Se測定を行ってみたところ、natural abundance ^{77}Se (蛋白質濃度が1mMの場合^{77}Seは76μM) であるが高感度に観測可能であった。また、^{77}Seは^{1}H-^{13}C相関シグナルに比べて化学シフトの分散が良好であった。

(2) (1)の$^{2}J_{(1H\text{-}77Se)}$の相関シグナルを利用することで、セレノメチオニン残基内の^{1}Hγシグナルと^{1}Hεシグナルの化学シフト値を連結することが可能となった (Fig. 1)。これにより、メチオニン残基のメチル基の^{1}Hシグナルを、^{1}Hε-^{77}Se-^{1}Hγのassignment walkにより帰属することが可能となった (Fig. 1)。メチオニン残基のメチル基の^{1}H-^{13}C相関シグナルは高感度であるため分子間相互作用のNMR検出のプローブとしても有用であるが、帰属するには目的蛋白質のメチオニン残基を他のアミノ酸に置換するのが一般的である。今回、^{77}Se-NMR法により、メチオニン残基のメチル基のNMRシグナルの帰属を、変異体の作製が不要で且つ高い信頼性で可能にする新規手法を開発することが出来た。

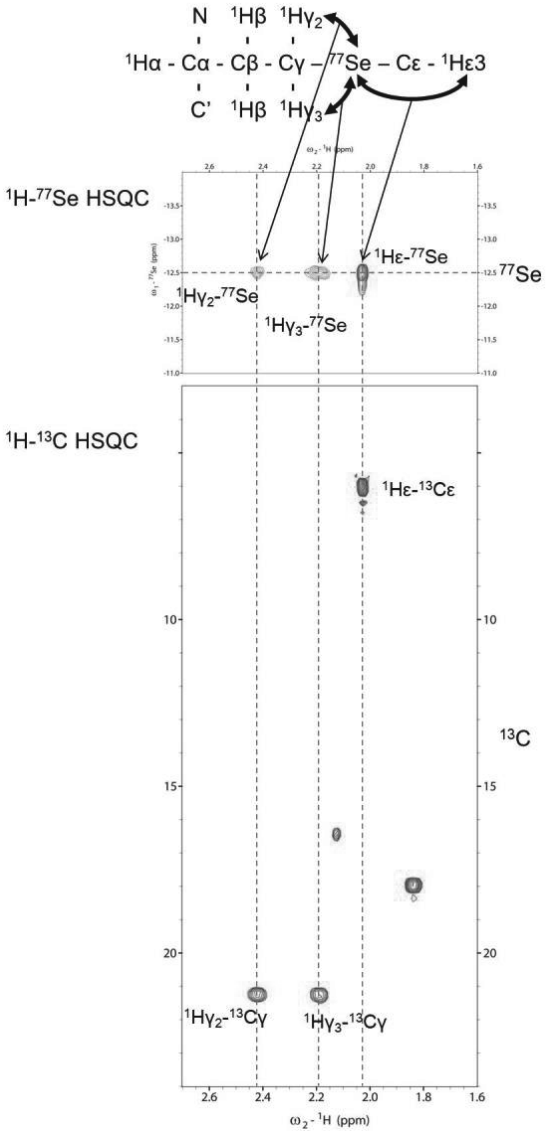


Fig. 1. Assignment of NMR signal of methyl group ^{1}H, ^{13}C of selenomethionine residues by assignment-walking of ^{1}Hε-^{77}Se-^{1}Hγ correlation.

(3) 酸化ストレス暴露時、蛋白質によってはメチオニン残基の硫黄原子が翻訳後修飾的に酸化修飾を受け、当該蛋白質の構造・機能がmodulationを受けることが知られている。この硫黄原子をセレン原子に置換した場合も、そのセレン原子が硫黄原子と同様に酸化修飾を受けることが知られている。したがってセレノメチオニン標識した蛋白質の^{77}Se-NMRは、蛋白質のメチオニン残基の酸化修飾をほぼ直接的に検出できる方法となりうる。発表者らは^{1}H-^{77}Se SOFAST-HMQC測定などにより、目的蛋白質のセレノメチオニン残基の酸化修飾を原子分解能・高感度・リアルタイムに測定する新規手法を開発した。これについても当日の発表で議論する予定である。

[謝辞] 本研究は、AMED創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業 創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム (BINDS) (課題番号JP19am0101001) の支援を受けました。

L1-10

Structural characterization of deoxyribozyme possessing heme

○Yasuhiko Yamamoto[1-3], Yasuhito Suzuki[1], Yusuke Nakajima[1], Tomokazu Shibata[1], Atsuya Momotake[1], Saburo Neya[4], and Akihiro Suzuki[5]
[1]*Department of Chemistry, University of Tsukuba, Tsukuba 305-8571, Japan*
[2]*Tsukuba Research Center for Energy Materials Science (TREMS), University of Tsukuba, Tsukuba 305-8571, Japan*
[3]*Life Science Center for Survival Dynamics, Tsukuba Advanced Research Alliance (TARA), University of Tsukuba, Tsukuba 305-8577, Japan*
[4]*Department of Physical Chemistry, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba University, Chuoh-Inohana, Chiba 260-8675, Japan*
[5]*Department of Materials Engineering, National Institute of Technology, Nagaoka College, Nagaoka 940-8532, Japan*

Heme-bound nucleic acid has been shown to exhibit catalytic activities such as peroxidase one, and hence the complex between heme and DNA could be regarded as a prototype for redox-catalyzing ribozyme in the primordial RNA world. We found that heme selectively binds to the 3'-terminal G-quartet of an all parallel-stranded G-quadruplex DNA to form a stable heme-DNA complex which exhibits peroxidase activity. In the complex, a water molecule, sandwiched between the heme and the G-quartet planes, is coordinated to the Fe atom as an axial ligand (axial H_2O). The axial H_2O is possibly responsible for the catalytic activity of the heme-DNA complex.

Introduction G-quartet[1] is formed from four guanine bases that are cyclically associated through Hoogsteen hydrogen-bonding (Fig. 1A). Heme derivatives (Fig. 1B) bind to G-quadruplex DNAs to form complexes which exhibit various catalytic activities.[2] A single repeat sequence of the human telomere, d(TTAGGG), forms an all parallel-stranded tetrameric G-quadruplex DNA, i.e., $(d(TTAGGG))_4$, in the presence of an appropriate K^+ concentration (Fig. 1C), and a complex between heme and $(d(TTAGGG))_4$ (heme-DNA complex (Fig. 1C)) exhibits peroxidase activity.[3] Imidazole (Im) and carbon monoxide (CO) bind, as exogenous ligands, to the heme(Fe^{3+})-DNA and heme(Fe^{2+})-DNA complexes, respectively. In this study, we characterized structures of Im and CO adducts of the complexes to elucidate molecular mechanism responsible for the catalytic activities of the complex.

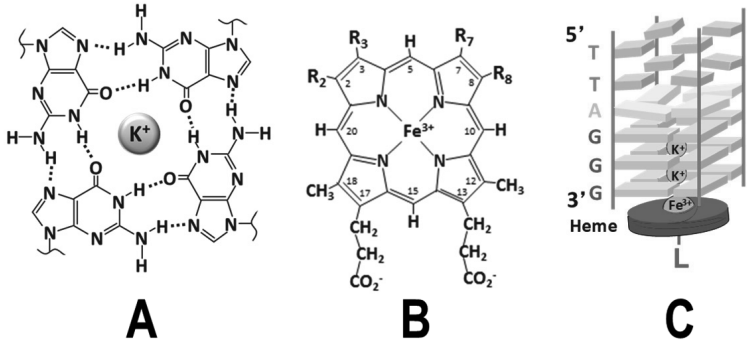


Fig. 1. Molecular structure of G-quartet (A), structure and numbering system for Proto(Fe^{3+}) ($R_2 = R_7 = CH_3$, $R_3 = R_8 = CHCH_2$), Meso(Fe^{3+}) ($R_2 = R_7 = CH_3$, $R_3 = R_8 = CH_2CH_3$), 3,8-DMD(Fe^{3+}) ($R_2 = R_3 = R_7 = R_8 = CH_3$), 7-PF($Fe^{3+}$) ($R_2 = CH_3$, $R_7 = CF_3$ $R_3 = R_8 = CH_2CH_3$), and 2,8-DPF(Fe^{3+}) ($R_2 = R_8 = CF_3$, $R_3 = R_7 = CH_3$) (B), and schematic representation of a complex between heme and an all parallel-stranded tetrameric G-quadruplex DNA of d(TTAGGG). In C, L represents an axial ligand coordinated to heme Fe atom.

Results and Discussion ^{1}H NMR spectrum of a solution mixture of Proto(Fe^{3+}), $(d(TTAGGG)_4)$, and Im in a ratio of 0.75:1:200 at pH 10.0 and 25 ºC, together with that of $(d(TTAGGG)_4)$, is shown in Fig. 2.[4] G4-G6 imino proton signals of the Im adduct of the complex ($G4_c$-$G6_c$) were downfield shifted relative to the corresponding ones of the free DNA due to paramagnetic effect, because the Proto(Fe^{3+}) of the complex predominantly adopts a ferric low-spin configuration with $S = 1/2$. In NMR studies of paramagnetic heme

ＤＮＡ、ヘム、デオキシリボザイム

○ やまもと やすひこ、すずき　やすひと、なかじま　ゆうすけ、しばた ともかず、
ももたけ あつや、ねや　さぶろう、すずき　あきひろ

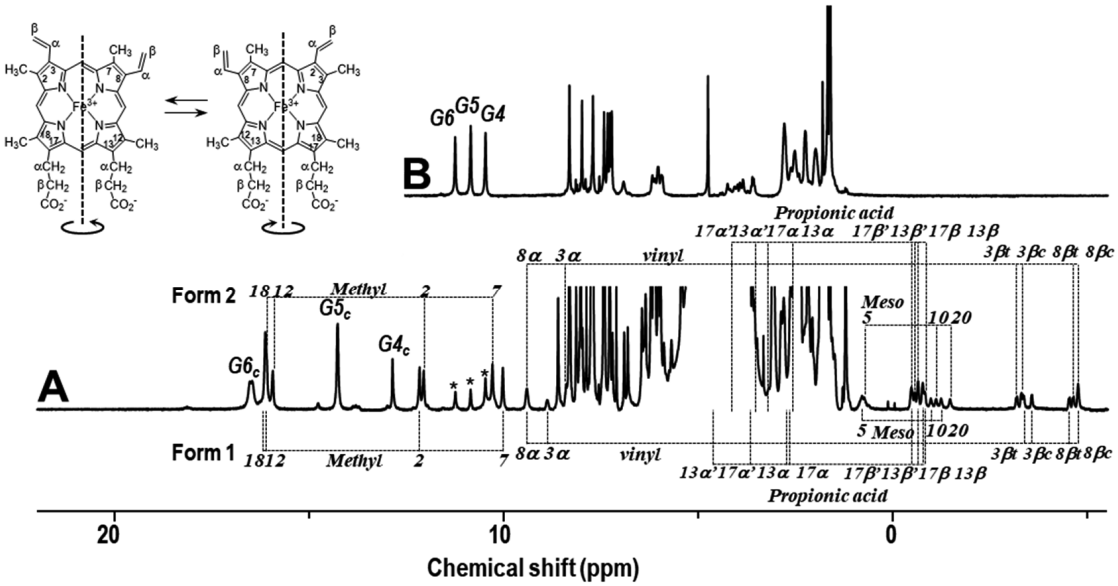


Fig. 2. 600 MHz ^{1}H NMR spectra of an Im adduct of the Proto(Fe^{3+})-DNA complex (A) and G-quadruplex DNA (d(TTAGGG)$_4$) (B) in 90% H_2O/10% ^2H_2O with 300 mM KCl and 50 mM potassium phosphate buffer, pH 10.0, at 25 °C.[4] The two heme orientations differing by 180° about the 5-H-15-H axis, with respect to the DNA, are illustrated in the inset. The signal assignments of most heme protons, and G4, G5, and G6 imino NH ones ($G4_c$, $G5_c$, and $G6_c$) of the complex are given with the spectra. Form 1 and Form 2 only indicate the discrimination of the signals due to the two Proto(Fe^{3+}) orientations, and hence the two sets of signals have not been assigned to specific Proto(Fe^{3+}) orientations. Peaks denoted by * in A are due to the DNA remaining in the sample. Small peaks appearing throughout the chemical shift range in A were not identified and could be due to impurities.

complexes, a CO adduct of the Proto(Fe^{2+}) possessing a ferrous low-spin configuration with $S = 0$ is often used as an appropriate diamagnetic reference complex. Comparison between the spectra of the Im and CO adducts of the complexes yielded paramagnetic shifts (δ_{para}) of +1.66, +3.94, and ~+7.9 ppm for $G4_c$, $G5_c$, and $G6_c$ signals, respectively, and an analysis of the δ_{para}s indicated that Proto(Fe^{3+}) stacks onto the 3'-terminal G-quartet (G6 G-quartet) of the DNA, ~0.4 nm apart. Each of the Proto(Fe^{3+}) proton and $G6_c$ signals of the Im adduct of the complex split into two peaks with an intensity ratio of ~1:1, due to the stacking of pseudo-C_2 symmetric Proto(Fe^{3+}) onto the G6 G-quartet with two different orientations, i.e., heme orientations differing by 180° about the pseudo-C_2 axis, with respect to the DNA, and only a single set of signals was observed in the C_2 symmetric 2,8-DPF (Fig. 1B) system (result not shown).

We also found that, from studies of the CO adduct of the complex, a water molecule sandwiched between the Proto(Fe^{2+}) and G6 G-quartet planes is coordinated to the Fe atom as an axial ligand (axial H_2O), *trans* to axial CO, and that the axial H_2O is hydrogen-bonded to the carbonyl oxygen atoms of G6 bases.[5] Theoretical study indicated that the polarization of the axial H_2O is considerably greater than that of an ordinary one.[5] In fact, we demonstrated that the axial H_2O in the complex is capable of being an electron-donating ligand which increases the Lewis basicity of the heme Fe atom to activate Fe-bound H_2O_2 for the peroxidase catalytic cycle of the heme-DNA complex.[6]

References
1. D. Sen and W. Gilbert, *Nature*, **1988**, *334*, 364-366.
2. P. Travascio *et al.*, *Chem. Biol.*, **1998**, *5*, 505-517.
3. R. Shinomiya *et al.*, *Biochemistry*, **2018**, *57*, 5930-5937. Y. Yamamoto *et al.*, *ibid.,* **2018**, *57*, 5938-5948.
4. Y. Suzuki *et al.*, *J. Porphyrins Phtalocyanines*, **2014**, *08-09*, 741-751.
5. Y. Yamamoto *et al.*, *Biochemistry,* **2015**, *54*, 7168-7177.
6. R. Shinomiya *et al.*, *Bull. Chem. Soc. Jpn.,* **2019**, *in press.*

Acknowledgements This work was financially supported by JSPS KAKENHI (Nos. 16KT0048 and 19H02824) and Bilateral Open Partnership Joint Research Project (No. BBD29011). Some of the ^{1}H NMR spectra were recorded on a Bruker AVANCE-600 spectrometer at the Chemical Analysis Center, University of Tsukuba.

L1-11

Zn^{2+}依存的な新規 DNAzyme の立体構造解析

○山崎 和彦、猪股 梨華、山崎 智子、Zhao Jing、久保田 智巳、宮岸 真
産業技術総合研究所　バイオメディカル研究部門

Structure determination of a novel Zn^{2+}-dependent DNAzyme

○Kazuhiko Yamasaki, Rika Inomata, Tomoko Yamasaki, Jing Zhao, Tomomi Kubota, and Makoto Miyagishi
Biomedical Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Tsukuba, Japan.

We determined the three-dimensional structure of a newly developed Zn^{2+}-dependent compact DNAzyme by NMR spectroscopy. The molecule is indeed a chimera of DNA and RNA, where the dominant DNA moiety catalyzes hydrolytic cleavage of the short RNA moiety. It showed a hairpin structure with an internal loop region, where the base pairs are tightly stacked to make the RNA loop protrude out. The bond to be digested is located at the end of this loop, to which a G-base of DNA is oriented. We suggest that the Zn^{2+} is connected to this base, which allowed us to propose a catalytic mechanism.

【序論】

DNA や RNA などの核酸は、低分子や抗体に続く創薬材料として注目されている。私たちは、創薬開発を視野に入れ、機能を有する核酸の新規取得および作用機構に関する解析を行ってきた（文献 1,2）。今回、二価金属イオン依存的に核酸を切断する核酸触媒（DNAzyme, RNAzyme）の開発を進める中で、Zn^{2+}依存的に RNA 切断を行うコンパクトな新規 DNAzyme を *in vitro* selection 法によって得た。この DNAzyme は両側に基質鎖と二本鎖を形成するアーム鎖を持ち、数塩基の触媒コアを有する非常にコンパクトな構造をし、基質 RNA を Zn^{2+}イオン依存的に速やかに切断することができる。また、他の Mg^{2+}、Ca^{2+}、Mn^{2+}などの二価金属イオンの存在下では切断活性を持たず、Zn^{2+}イオン依存性が高いことが分かっている。

二価金属イオン依存的な核酸触媒としては、Zn^{2+}および Mn^{2+}に依存的に DNA を切断する DNAzyme（文献 3）や Pb^{2+}依存的な RNAzyme である leadzyme（文献 4）などが知られている。前者については、立体構造解析がなされておらず、触媒機構が不明であるのに対し、後者については、X 線結晶解析（文献 5, 6）が行われ、活性中心の Pb^{2+}（実験上は Sr^{2+}）の位置が決定され、触媒機構が原子レベルで解明されている。本研究では、新規取得した Zn^{2+}依存的 DNAzyme の触媒機構を明らかにする目的で、NMR 分光法による立体構造解析を行った。

【方法】

DNAzyme の調製は、カスタム合成（北海道システムサイエンス）により、行った。切断部位の RNA ヌクレオシドに対して、2'-*O*-methyl 修飾を行って保護した。0.44 mM の濃度で、10 mM d_{11}-Tris (7.0)（ISOTEC）、1 mM $ZnCl_2$ 溶液に溶解し、Avance III HD 900 分光計（Bruker）を用い、298 K で、NOESY、TOCSY、DQF-COSY、^{1}H–^{13}C HSQC の 2D NMR 測定を行った。スペクトル解析は Felix により、構造計算は CNS ver1.3 により行った。

核酸触媒、金属イオン、立体構造

○やまさきかずひこ、いのまたりか、やまさきともこ、ちゃおじん、くぼたともみ、みやぎしまこと

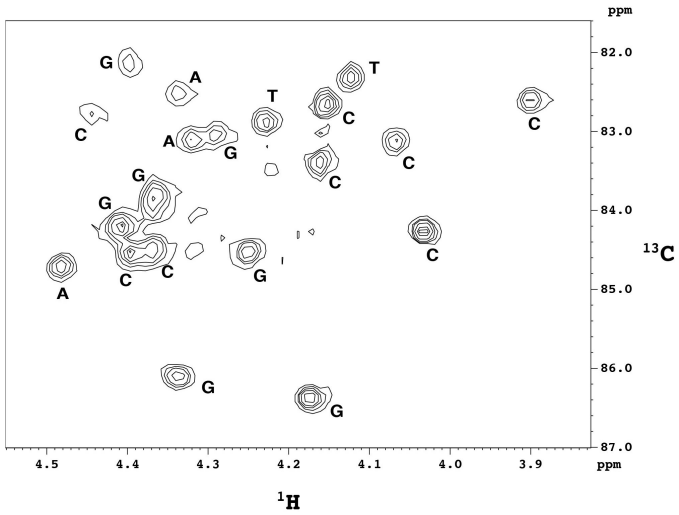


Fig. 1: ^{1}H–^{13}C HSQC spectrum (H4'/C4' rgion) of the Zn^{2+}-dependent DNAzyme recoderded on a 900-MHz NMR spectrometer at 298 K.

【結果および考察】

2D ^{1}Hスペクトルにより、シグナル帰属を行った。試料に対して安定同位体の標識を行っていないが、良好な^{1}H–^{13}C HSQCスペクトル（Fig. 1）が得られたので、シグナル帰属の確認に用いた。特に、糖のH4'とH5'/ H5"は重なる傾向が強いため、これらの区別には、非常に有効であった。

NOESYスペクトルの解析から、同一塩基内および糖内を除く400以上のNOE距離情報を得て、立体構造決定を行った。全体としては、internal loop領域を有するhairpin構造を形成する（Fig. 2）。Loop部の両側は二重鎖DNAであり、それぞれB型DNAのコンフォーメーションをとるが、それらがloop領域をスキップする形でbase stackingにより接合している。その結果、internal loopは突出する形となり、特に切断部位を含むRNAからなるloop（切断部位は根元に位置する）の運動性が高くなっている様子が見える。切断部位に対しては、G-baseの1つが配向しており、ここにZn^{2+}イオンが結合すると推量している。そのモデルにもとづく触媒機構について議論したい。



Fig. 2: NMR solution structure of the Zn^{2+}-dependent DNAzyme. Schematic model of the overall structure (left) and aligned 10 structures of the NMR ensemble in a stereo view (right) are shown. The arrows indicate the cleavage site.

【謝辞】

Avance III HD 900分光計の利用にあたって、理研NMR施設・外部共用事業（成果非占有課題）の支援を得た。

【引用文献】

1) Zhao, J., Katsube, S., Yamamoto, J., Yamasaki, K., Miyagishi, M., and Iwai, S. *Analyst.* **140**, 5881–5884, 2015.
2) Murakami, K., Zhao, J., Yamasaki, K., and Miyagishi, M. *Biomed. Rep.* **6**, 615–626, 2017.
3) Chandra, C., Sachdeva, A., and Silverman, S. K. *Nat Chem. Biol.* **5**, 718–720, 2009.
4) Pan, T., and Uhlenbeck, O. C. *Nature* **358**, 560–563, 1992.
5) Wedekind, J. E., and McKay, D. B. *Nat Struct. Biol.* **6**, 261–269, 1999.
6) Wedekind, J. E., and McKay, D. B. *Biochemistry* **42**, 9554–9563, 2003.

第2日目
11月8日（金）
招待講演・特別講演
Day 2 (Nov. 8, Fri)

IL-1

Alpha-Deuteration makes kinases more amenable to NMR studies

GHOUIL Rania[1], BOUGUECHTOULI Chafiaa[1], ROCHE Maxime[2], THEILLET Francois-Xavier[1]

[1]*Institute for Integrative Biology of the Cell, CNRS/CEA/Univ. Paris Saclay, Gif-sur-Yvette, France.*

[2]*Cortecnet, Gif-sur-Yvette, France.*

Kinases are effectors of cell signaling and drive cell fate to a large extent, from cell cycle progression, proliferation, differentiation etc.. They are important drug targets with no doubts. However, they are not always easily amenable to structural investigations because of their dynamic, multi-conformational behavior. Regarding NMR studies, they are relatively large proteins of ~35-40kDa, which calls for advanced labeling strategies.

In this context, we have explored the potential benefits of alpha-deuterated amino acid labeling. Alpha-protons are responsible for about half of dipolar relaxation. Homogeneous deuteration is beneficial but generates longer T1-relaxation, hence long interscan delays and low signal-to-noise per experimental time. Selective alpha-deuteration would thus be attractive, but is subject to enzymatic back protonation during recombinant expression in living organisms.

Using ^{15}N-amino acids alpha-deuterated and an *E.coli* cell-free expression system, we have produced ^{2}Dα/^{15}N-Ala/Ser/Leu labeled 40 kDa MAP-kinases. These samples generate exploitable ^{1}H-^{15}N SOFAST-HMQC spectra (with ~30% slower T2(^{1}H)) that require 10-20 times less recording time than standard TROSY-HSQC approaches. This permits to distinguish kinases conformations and to detect drug interactions using protein quantities as low as 2.5 nmol, i.e. 100 µg, in 1 hour of spectrometer time (600 MHz). We expect this experimental approach should be helpful for pharmacological investigations.

Keywords: Kinases, Selective Isotope Labeling, Cell-Free Expression

IL-2

Integrated NMR and cryo-EM atomic-resolution structure determination of a half-megadalton enzyme complex

A. Favier[1], Diego F. Gauto[1], Leandro F. Estrozi[1], Charles D. Schwieters[2], Gregory Effantin[1], Pavel Macek[1,6], Remy Sounier[1,7], Astrid C. Sivertsen[1], Elena Schmidt[3], Rime Kerfah[1,5], Guillaume Mas[1,8], Jacques-Philippe Colletier[1], Peter Guntert[3,4,5], Guy Schoehn[1], Jerome Boisbouvier[1] & Paul Schanda[1]

[1]*Univ. Grenoble Alpes, CEA, CNRS, Institut de Biologie Structurale (IBS), Grenoble, France.*

[2]*Center for Information Technology, National Institutes of Health, Bethesda, USA.*

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

[4]*Laboratory of Physical Chemistry, ETH Zurich, Zurich, Switzerland.*

[5]*Graduate School of Science, Tokyo Metropolitan University, Tokyo, Japan.*

[6]*NMR-Bio, Grenoble, France.*

[7]*Institut de Génomique Fonctionnelle, University of Montpellier, Montpellier, France*

[8]*Biozentrum University of Basel, Basel, Switzerland.*

Atomic-resolution structure determination is the key requirement for understanding protein function. Cryo-EM and NMR spectroscopy both provide structural information, but currently cryo-EM does not routinely give access to atomic-level structural data, and, generally, NMR structure determination is restricted to small (<30 kDa) proteins. We introduce an integrated structure determination approach[1] that simultaneously uses NMR and EM data to overcome the limits of each of these methods. The approach enabled determination of the high-resolution structure of the 468 kDa large dodecameric aminopeptidase TET2 to a precision and accuracy below 1 Angstrom by combining secondary-structure information obtained from near-complete magic-angle-spinning NMR assignments of the 39 kDa-large subunits, distance restraints from backbone amides and specifically labelled methyl groups, and a 4.1 Angstrom resolution EM map. The resulting structure exceeds current standards of NMR and EM structure determination in terms of molecular weight and precision. Importantly, the approach is successful even in cases where only medium-resolution (up to 8 Angstroms) cryo-EM data are available, thus paving avenues for the structure determination of challenging biological assemblies.

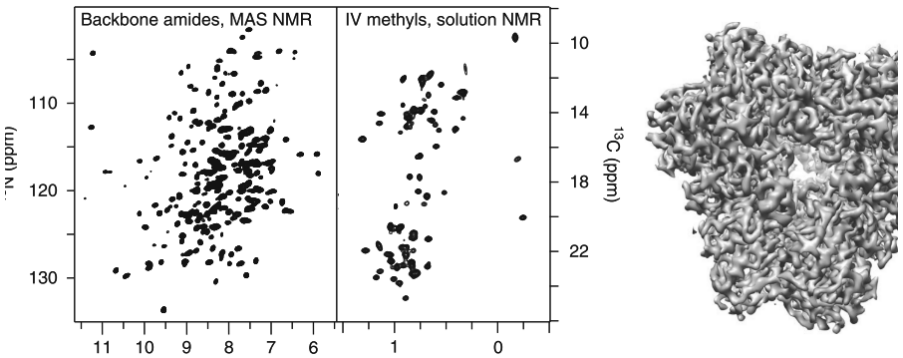


Figure 1. Experimental NMR and EM data of the 468 kDa TET2 assembly. a MAS NMR and b solution-NMR spectra of TET2, showing high resolution despite the large subunit size. c Experimental 4.1 Å

resolution cryo-EM electron-density map.

Cryo-EM, NMR, Structure calculation

HL-1

Can NMR help cure cancer?

Mitsuhiko Ikura

Princess Margaret Cancer Centre, University of Toronto, Canada

Over the forty years of my research career, I have been enjoying being closely associated with NMR spectroscopy and its research community, especially in Japan. I started my research training in Sapporo in 1978 and studied polysaccharides and their paramagnetic metal interactions using C13-NMR. Quite ironically, I am still using paramagnetic relaxation to study more complex macromolecules. My laboratory currently investigates mechanistic and structural aspects of tumourigenesis, and one of our major focus is the oncoproteim KRAS, the central hub of the EGFR/RAS/MAPK signaling pathway.

RAS proteins are frequently mutated in cancer (~30% of all human tumours) and an estimated world-wide death pole of RAS-associated cancers exceeds 2 million/yr. Despite of enormous efforts in the RAS research over three decades, there is no clinically approved RAS inhibitor and the RAS protein remains to be a challenging target for cancer therapy development. In order to overcome this challenge, we ought to better understand how RAS functions under physiological conditions and alters related signaling pathways in the mutant RAS-driven tumours. Fully-matured protein K-RAS4B is prenylated and methylated at the carboxy-terminus, which enables K-RAS4B to anchor to the plasma membrane where it receives an upstream signal and transmits the signal to a number of downsteam pathways. Unfortunately, There is a large gap in our understanding of how the matured K-RAS4B protein functions at the surface of the plasma membrane. To this end, we have been extensively employing isotope-aided NMR spectroscopy and have developed new conformational and functional assays for the RAS protein on lipid bilayers using the nanodisc platform developed by Sligar et al. We elucidated how the membrane environment dictates the conformation of K-RAS4B and how oncogenic mutations influences the membrane-dependent conformational states of the protein (Mazhab-Jafari et al. PNAS 2015). More recently, we have been investigating multiple aspects of K-RAS4B functions and I will discuss (i) how the biological membrane influences K-RAS4B interaction with a binding domain of RAF kinases and (ii) how we could inhibit K-RAS4B at the membrane surface by small molecules (Fang et al. Cell Chem Biol 2018) and an engineered protein. I believe that these efforts should eventually lead to a successful development of a cancer therapy for KRAS-driven cancer patients.

Supported by CCS, CIHR, CFI & PMCF.

NMR, proteins, RAS, oncoprotein, GTPase, paramagnetic relaxation enhancement

HL-2

Reflections upon my Research on Biological Spectroscopy

Hideo Akutsu[1, 2]

[1]*Osaka University, Suita, Japan.*

[2]*Yokohama City University, Yokohama, Japan.*

I have been interested in the molecular mechanism of life throughout my research. When I entered university in 1963, impact of the double helical DNA structure discovered by Drs. Watson and Click on biological science was still obvious. I thought that spectroscopy might be useful for elucidating structure and function of biological molecules. Since Prof. M. Tsuboi was active in that field, I joined his group when I became a graduate student. My research interest moved from nucleic acids to biological membranes during the master course. Prof. Tsuboi suggested me analysis of built-up films of lipids by vibrational spectroscopy.

Vibrational spectroscopy enjoys reasonably high sensitivity and provides structural information on the basis of vibrational coupling and relatively well-defined directions of local transition moments. Although water was a major obstacle of infrared (IR) spectroscopy at that time, Raman scattering could avoid this problem. In collaboration with Prof. K. Fukuda I carried out structural analysis of phosphatidylethanolamine bilayers in built-up films using IR dichroism[1] under instruction of late Prof. Y. Kyogoku. He moved to Institute for Protein Research (IPR), Osaka University from the University of Tokyo in 1971. He also moved to the NMR field on this occasion, recognizing its rising influence. Since he invited me to join his group and I shared his view on NMR, I took NMR as the major spectroscopic method in my research. Thus, I explored the structural analysis of phospholipid bilayers not only by vibrational spectroscopy but also by NMR at IPR.

From 1978 to 1980, I worked with Prof. J. Seelig as a postdoctoral fellow at Biocentre, Basel University. During my stay in Basel, I was convinced that the solid-state NMR was one of major methods for structural analysis of membrane systems. Actually, we succeeded in determining the polar group structure of phosphatidylcholine bilayers in the liquid-crystalline state by solid-state NMR with specific ^{2}H-labeling and a restriction from Raman spectroscopy[2]. In contrast to vibrational spectroscopy, NMR could provide well defined information of structure and dynamics. The structure was determined analytically (not by simulation) using their powder pattern spectra. Phospholipid miscibility in membranes could be also analyzed by ssNMR.

I should indicate a great influence of late Prof. Y. Arata on my research. He was an advocator of biological NMR throughout his life. When he proposed a correlation NMR spectroscopy system after Dr. J. Dadok in 1976, we also modified our PS-100 (JEOL) NMR spectrometer to set up a correlation NMR spectroscopy with a water signal subtracting system at IPR. Unfortunately, it was only used for producing publication data. I also felt affection on his claim to work on large molecular systems, since I was interested in biomembranes. Actually, we investigated really large systems such as intact viruses[3] and whole cells by introducing a ssNMR attachment to FX-100 (JEOL) spectrometer. Arata also encouraged me on important occasions in my life.

Prof. K. Niki at Yokohama National University offered me a position of associate professor to work on tetraheme-cytochrome c_3. Since this protein was involved in an energy transduction system of sulfate-reducing bacterium, a strict anaerobe, this was also a membrane-related molecule for me. We investigated tetraheme-cytochromes employing solution NMR. However, specific isotope-labeling was difficult with this bacterium of ancient origin. Our isotope-labeling efforts brought us serendipity, namely, discovery of a completely new heme-synthesis pathway in anaerobic bacteria[4]. Furthermore, to make gene-engineering

---

vibrational spectroscopy, solid-state NMR, biomembrane systems, BioMagResBank

applicable, a new and very-efficient expression system for multiheme *c*-type cytochromes was developed using *Shewanella oneidensys* (host cell) and *E. coli* plasmids.

I was inspired by the dipolar recoupling works developed by Profs. R. G. Griffin and J. Schaefer, since we used powder patter NMR. When I had my own group, I invited Dr. T. Fujiwara as an associate professor to boost our high-resolution solid-state NMR technology. I could luckily join the team of Grant-in-Aids for Specifically Promoted Research led by Kyogoku together with Prof. M. Kainosho, which provided us a CMX400 solid-state NMR spectrometer. We could completely assign ^{13}C and ^{15}N signals of solid adenosine uniformly labeled by Kainosho under magic angle spinning. The methodology was further developed by Fujiwara using membrane-bound mastoparan-X. I also planned to work on H^+-ATP synthase, a huge membrane protein involved in the energy transduction, in collaboration with Prof. M. Yoshida.

Moving back to IPR in 2000, we intensely worked on F_1-ATPase (a soluble part of H^+-ATP synthase) using 950 MHz solution NMR in collaboration with Prof. T. Yamazaki, focusing on the β subunit (52 kD). Dr. H. Yagi, the major player in this project, found that the β monomer performed a piston-like conformational change on binding ADP or ATP similar as in the F_1-ATPase complex[5]. He also successfully elucidated the molecular mechanism underlying this conformational change. Eventually, he could analyze the whole F_1 (360 kD), focusing on the β subunit. I tried to set up ssNMR facilities and technologies for biological investigations at IPR in collaboration with Fujiwara. They facilitated such works as structure determination of membrane-bound mastoparan-X, amyloid protofilaments of β2-microglobulin fragment (Prof. Y. Goto), light-harvesting bacteriochlorophyll *c* assembly in chlorosomes[6], H^+-ATP synthase subunit *c*-ring active site in lipid membranes, and others.

From a viewpoint of contribution to the NMR community, BioMagResBank (BMRB) Osaka site was established in Protein Data Bank Japan (PDBj) in collaboration with Profs. J. L. Markley and H. Nakamura to support the accumulation of NMR data and NMR structures. They were heavily produced during the time of national project "Protein 3000". Since the chemical shift data used for structure determination by RIKEN (about 1300 structures registered in PDB) were not deposited to BMRB, we made special efforts to retrieve them. Eventually, we could collect almost half of them in five years in collaboration with Drs. S. Yokoyama and N. Kobayashi[7]. Data entry from the Osaka site was 31.5% of the whole deposition to BMRB in 2010.

Although much is left to be done, I have tried to make serious contribution to the biological NMR spectroscopy as well as to the NMR Society of Japan.

References

1. H. Akutsu, Y. Kyogoku, H. Nakahara and K. Fukuda (1975) Conformational analysis of phosphatidylethanolamine in multilayers by infrared dichroism. *Chem. Phys. Lipids*, **15**, 222-242.
2. H. Akutsu and T. Nagamori (1991) Conformational analysis of the polar head group in phosphatidylcholine bilayers: A structural change induced by cations. *Biochemistry,* **30,** 4510-4516.
3. H. Akutsu, H. Satake and R. M. Franklin (1980) Phosphorus nuclear magnetic resonance studies on the lipid-containing bacteriophage PM2. *Biochemistry*, **19**, 5264-5270.
4. H. Akutsu, J.-S. Park and S. Sano (1993) L-Methionine methyl is specifically incorporated into the C-2 and C-7 positions of the porphyrin of cytochrome c_3 in a strictly anaerobic bacterium, *Desulfovibrio vulgaris*. *J. Am. Chem. Soc.,* **115**, 12185-12186.
5. H. Yagi, T. Tsujimoto, T. Yamazaki, M. Yoshida, and H. Akutsu (2004) A conformational change of H^+-ATPase β monomer revealed on segmental isotope labeling NMR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.,* **126**, 16632-16638.
6. A. Egawa, T. Fujiwara, T. Mizoguchi, Y. Kakitani, Y. Koyama, and H. Akutsu (2007) Structure of the light-harvesting bacteriochlorophyll *c* assembly in chlorosomes from *Chlorobium limicola* determined by solid-state NMR. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 790-795.
7. N. Kobayashi, Y. Harano, N. Tochio, E. Nakatani, T. Kigawa, S. Yokoyama, S. Mading, E.L. Ulrich, J.L. Markley, H. Akutsu, and T. Fujiwara (2012) An automated system designed for large scale NMR data deposition and annotation: Application to over 600 assigned chemical shift data entries to the BioMagResBank from the Riken Structural Genomics/Proteomics Initiative internal database. *J. Biomol. NMR*, **53**, 311-320.

第3日目
11月9日（土）

一般演題

Day 3（Nov. 9, Sat）

L3-1

頑強で持続可能な超偏極キセノンガス生成供給装置の開発と応用

○藤原英明[1、2]、今井宏彦[3]、木村敦臣[1]
1 大阪大学大学院医学系研究科、2 ＭＲメドケム研究所合同会社
3 京都大学大学院情報学研究科

Development and Application of a Robust and Sustainable System for the Production of Hyperpolarized ^{129}Xe Gas

Hideaki Fujiwara[1,2], Hirohiko Imai[3], Atsuomi Kimura[1]
1 Graduate School of Medicine, Osaka University, 2 MR MedChem Research, LLC, 3 Graduate School of Informatics, Kyoto University

The hyperpolarized noble gas NMR/MRI, in which ^{129}Xe has now become a main target spin for research and development, can be easily accessed for basic studies compared to other several methods of using hyperpolarized nuclei for sensitivity enhancement: it does not cost much in establishing and maintaining a basic equipment, and any special difficulties are usually not encountered in treating the experimental data. However, it has not found widespread applicability in different fields such as chemistry, materials sciences, biology, and medicine. In the present study, aiming to be a trigger of overcoming such a situation, robust and sustainable hyperpolarizing system is developed by improving our hyperpolarizing system hitherto reported. Application to industrial samples of polymers and fibers is also presented.

【序】 超偏極^{129}Xe NMR/MRIは医学や化学の分野で強力な診断および分析ツールとして興味が広がっている[1]が、幅広く利用が進むには汎用的な装置へのアクセシビリティーの改善が必須な状況にある。本発表では、安定した性能で容易に広く利用可能な、「頑強で持続可能な」、超偏極キセノンガス生成供給装置の開発を報告すると共に、その新用途開拓のための応用例を幾つか取り上げる。

Xeガスの消費量を減らす目的では循環型装置を利用し、一度試料に暴露させた超偏極Xeガスを、大気放出するのでなく、オンラインで循環させ再利用するのが非常に有効である。但し、循環型では配管途中や試料から発生する極微量の湿気や酸素等の妨害ガスが光ポンピングプロセスの要であるアルカリ金属Rbを腐食させるので、徹底した妨害ガス対策が必要となる。我々は昨年の本討論会でこの目的にかなった装置の開発に着手したことを発表した[2]。今回はその具体的な内容を報告すると共に、新用途開発を意図した幾つかの応用例を提示する。さらに、動物実験等のように循環型装置の適用が難しい場合のXeガス再利用の方法についても取り上げる。

超偏極、^{129}Xe、頑強で持続可能な装置

○ふじわら　ひであき、　いまい　ひろひこ、　きむら　あつおみ

【装置の改良点】

Rbの劣化を避け偏極セル内のRb蒸気密度を一定に維持するために、偏極セルと離れた別室にRbを充填し常時攪拌した（Fig.1、[3]）。Rb攪拌の効果を定量的に検証するため、NMR信号の減衰定数を測定した（Fig.２；●と▼はRbを攪拌、■と▲は攪拌無し。サンプルは、●と■がHFカプセル（食品用カプセル）、▲と▼は空サンプル）。攪拌により減衰定数は約1/3に低減した。その結果、偏極セルの有効利用時間は約3倍に延長し、最高100時間程度まで可能となった。

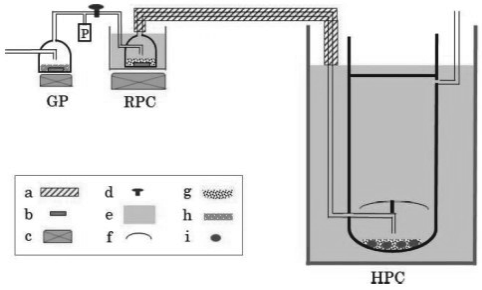


Fig. 1. A separated chamber of Rb (RPC) attached to the hyperpolarizing cell (HPC).

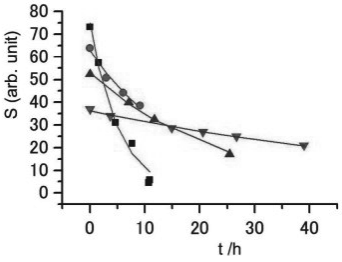


Fig. 2. ^{129}Xe decay curves to obtain the decay constant for HP cell.

【循環型装置で長時間積算する際の有効性：超偏極磁化と熱平衡磁化の比較】

超偏極キセノンの長時間積算実験でのガス消費量増大の問題は、循環型装置の改良により解決されたが、偏極セルの減衰定数に起因して長時間積算の実効性が時間と共に低下する問題が残る。これを通常の熱平衡磁化の積算と比較してみる。超偏極磁化の場合、n回積算後のSN比を$SN^{(n)}$とすると次式を得る[2]。

$$SN^{(n)} = \frac{SN^0}{\sqrt{n}} e^{-a} \frac{1-e^{-na}}{1-e^{-a}} \qquad (1)$$

ここで、SN^0は積算開始時のSN比であり、aは偏極セルの減衰定数である。この式は、aが１に比べ非常に小さいことから、e^a=1+aが成り立つことを考慮すると、

$$SN^{(n)} = \frac{SN^0}{\sqrt{n}} e^{-a} \frac{1-e^{-na}}{1-e^{-a}} = \frac{SN^0}{\sqrt{n}} \frac{1-e^{-na}}{e^a-1} = SN^0\sqrt{n}\frac{1-e^{-na}}{na} \qquad (2)$$

となる。ここで、$SN^0\sqrt{n}$ は熱平衡磁化の積算時のSN比改善に相当するので、超偏極磁化の積算では、熱平衡磁化の積算と比べ、$(1-e^{-na})/na$の係数が入ることとなる。この係数は、SN比が最高となる時がna=1.2565に相当する[2]ことから、0.57となる。即ち、偏極セルの減衰定数の長時間積算に及ぼす影響は、43％のSN比減少であることが分かる。結論として、SN比が最高に達する積算回数nの範囲内であれば、通常の積算の57％以上の積算効率で超偏極磁化が積算できることが分かる。一例として、a=0.165×10^{-4}の場合[2]、n=76,000となり、SN比の改善は157倍となる（熱平衡では276倍）。

【動物実験のように循環型の適用が困難な場合のためのXeガス回収再利用の方法】

循環型装置の適用が困難な場合には、Xeガス消費量の削減のためには、回収再利用も考えられる。動物実験に用いた超偏極Xeガスは、酸素を20％程度含むと共に、水分や炭酸ガスを含む。このようなガスの回収精製再利用は、ガスメーカー等に任せるの

が最終的な解決策であるが、ガス消費量が工業的規模に達しない段階では実現は難しい。小規模（研究室単位程度）での利用には簡易型の精製器が有効と考えられる。Fig.3,4に一例を示す。Fig.3では、回収Xeガスをドライアイス浴DMとモレキュラーシーブMSを通して水分や炭酸ガスを除き、液体窒素浴LNでXeを固化させる。酸素や窒素はロータリーポンプRPで吸引される。固化した粗精製のXeはバッグTB（右側）に回収する。この粗精製XeガスはFig.4でモレキュラーシーブとアルカリ金属合金MAにより最終精製される。固化させたXeの気化の際は、液体酸素の残留に注意が必要である。Xe固化の際に混合ガス中の酸素分圧が高いと固化するXeの空隙に液体酸素が取り込まれ、その後、真空ポンプVPで吸引しても酸素が完全には取り除かれない恐れがある。このため、動物実験に用いたガスの精製では、Fig.3の配管内圧力を0.5気圧以下に維持することが肝要となる。

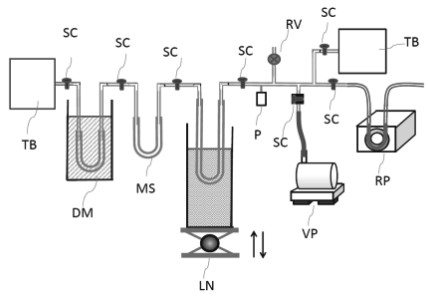


Fig. 3. First stage of purification for the recovered Xe gas.

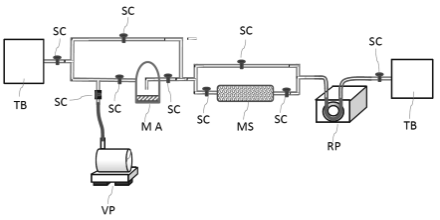


Fig. 4. Second stage of purification for the recovered Xe gas.

【種々の繊維・高分子への適用】

超偏極装置の安定性向上により長時間積算の実効性が上がると、過去の装置では観察出来なかった信号が観察も可能となる。Fig. 5にその例を掲げる[3]。標準パルス系列では検出不能だったスペクトル（Fig.5, a), 積算回数ct= 47,070）は、いわゆる溶媒消去のパルス系列binomに依っても検出不能であった（Fig.5, b), ct= 64,496）。しかし、今回の改良により190 ppmに半値幅72 ppmの非常に広幅の信号として観察が可能となった（Fig.5, c), ct=10,816）。超広幅となることにより、ピーク高さが低くなり、信号観察が非常に困難となっていたことが分かる。

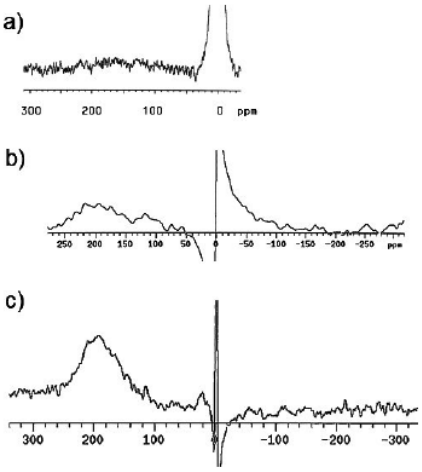


Fig. 5. ^{129}Xe NMR spectra of Nano Fiber. ^{129}Xe=110.6 MHz.

ここで用いた試料のNano Fiberはポリエステル系の超極細繊維（帝人フロンティア（株））であり、繊維径700nmの長繊維・合撚糸のPOY(Partially Oriented Yarn, 255 dtex/48Filaments)である。比較のため、同じポリエステル系の他の繊維製品について行った測定結果は以下の通りである。

Clover ミシン糸60番（クロバー（株））、生成(403)、0.241g（長さ8m）について、193と186ppmに2本のピークが観察された（Fig.6, ct= 11,936）。186 ppmの信号は、繊維表面を有機溶剤を浸み込ませたガーゼで拭くことにより強度が約40%減少することから（Fig.7, ct= 8,032）、繊維表面の処理剤に由来するXe信号と考えられる。

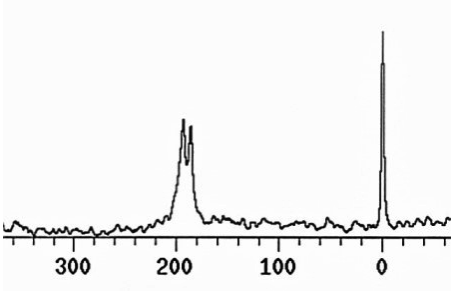


Fig. 6. ^{129}Xe NMR spectrum. Clover machine thread (Unbleahed).

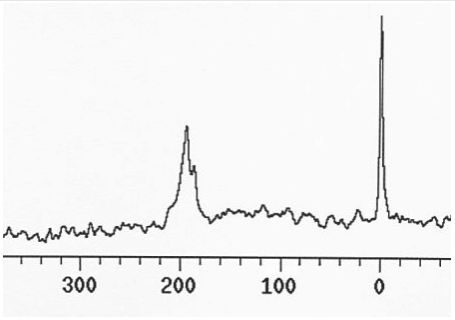


Fig. 7. ^{129}Xe NMR spectrum. Clover machine thread (Unbleached); surface wiped with organic solvent.

Clover ミシン糸60番、白(401)、0.251g（繊維長 8m）については、192.9と184.7ppmに2本のピークが観察された（Fig.8, ct=1,408）。184.7 ppmの弱い信号は、繊維表面を有機溶剤を浸み込ませたガーゼで拭くことにより完全に消失した（Fig.9, ct= 960）。従って、このピークは繊維表面の処理剤に由来するXe信号と考えられる。
同様に、Cloverミシン糸60番、黒(402)では193.2ppmの横に約1/4の高さのピークが184.9 ppmに観察され、184.9ppmは有機溶剤処理で消失した。

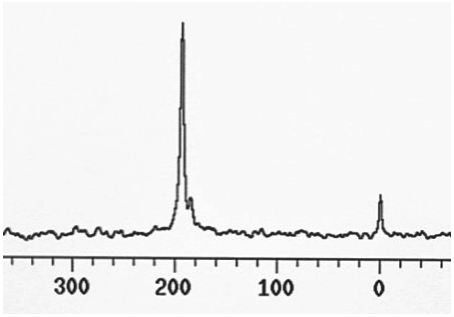


Fig. 8. ^{129}Xe NMR spectrum. Clover machine thread (White) .

以上の結果から、Nano Fiberで見られた非常に幅広いピークはポリエステル系に固有の193ppmの信号が、繊維化のプロセス（合撚、延伸その他）で表面状態の多様な変化を受けたためではないかと推察される。但し、最終結論にはさらに詳細な実験が必要である。

結論として、超偏極キセノンNMRは繊維・高分子の物性研究や処理過程の解析に有効と予想でき、今後の応用研究が期待できる。

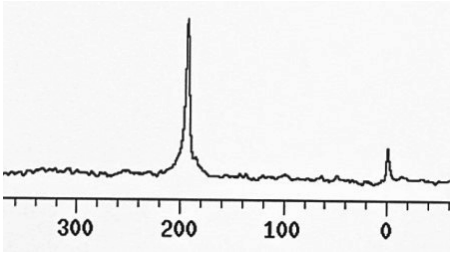


Fig. 9. ^{129}Xe NMR spectrum. Clover machine thread (White); surface wiped with organic solvent .

謝辞

Nano Fiberの提供と情報に関して、帝人フロンティア（株）の小林美一氏に深謝いたします。

文献

[1] A. Kimura, H. Imai, and H. Fujiwara, *in:* T. Meersmann and E. Brunner, eds., *Hyperpolarized Xenon-129 Magnetic Resonance*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, Chap.17, pp.301-316 (2015).
[2] 藤原英明 他、第57回NMR討論会、要旨集 p.310 (2018).
[3] H. Fujiwara, H. Imai, and A. Kimura, *Anal. Sci.*, **2019**, *35*, 869-873.

L3-2

ゴム材料中の気体のNMR情報からわかる構造と物性

○吉水 広明[1], 高橋 雅人[2], 堤 遊[3]
1 名古屋工業大学大学院工学研究科,
2 理化学研究所 放射光科学研究センター NMR研究開発部門,
3 ブルカージャパン株式会社 バイオスピン事業部

Structure and physical properties from NMR of the gases in rubbery polymers

○Hiroaki YOSHIMIZU [1], Masato TAKAHASHI [2], Yu TSUTSUMI [3]
1 Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology,
2 RIKEN RSC NMR Science & Development Division,
3 BioSpin Division, Bruker Japan K.K.

Structural features of rubbery materials were estimated through NMR observations of the sorption gases in the materials. The NMR data of sorption process and diffusion coefficient of Xe in the materials were corresponding to dimeter of that. Further, the NMR peak width of Xe as a sorption gas was roughly corresponding to the segmental motions of the rubbery materials.

【緒言】 エネルギー源が, 石炭(固体)→石油(液体)→天然ガス(気体)と変遷している事実に加え, メタンハイドレートや水素など有効利用が真剣に検討されている今日である。また, 炭酸ガス回収技術や NMR をはじめとする様々な分野における種々の液化ガス利用技術の進展も望まれている。したがって, 各種材料に対して気体の絡んだ諸性質・構造解析は今後ますます重要となる。これまでに, 材料の気体輸送特性(材料中への溶解及び拡散特性, 気体透過特性などを総称してこう呼ぶ。)を見極める一つの有効手段として, NMR 法の応用を検討してきた。NMR 法が高分子の構造解析に有用であることは周知の事実であるが, 共存する気体の観察も可能であるという利点を活かし, 新規で有効な解析手法の確立を目指している。本発表では, 種々の NMR テクニックを駆使して高分子材料の気体拡散特性評価を行う方法をいくつか提案し, それぞれの特長を組み合わせることによって得られる構造情報について検討した結果を報告する。試料には古典的拡散方程式でその気体輸送特性が解析可能なゴム状高分子を用いた。

【実験】 ブタジエンゴム(BR)及びアクリロニトリル-ブタジエン共重合体ゴム(NBRXX; XXにはアクリロニトリル含有率 [mol %]の数字が入る)は, JSR(株)より提供されたものを用いた。シリコンゴム試料はひも状に成形された市販品を用いた。圧縮気体共存下での測定を行うため, テフロン製バルブキャップが付いた耐圧NMR試料管を使用した。^{129}Xe NMR測定は主にJEOL ECZ700分光計を用い, 約193 MHzにて室温下でシングルパル法を適用して観測した。特定ピークのみを消失させる選択照射実験や, 自己拡散係数決定に常用されている磁場勾配パルス(PFG)実験等も行った。

気体のNMR, 緩和時間測定, ゴム材料
○よしみず ひろあき, たかはし まさと, つつみ ゆう

【結果と考察】 高分子材料の気体輸送特性について論じる上で重要なポイントの一つは，気体分子が系の内外で動き続けていることである。つまり，十分な時間が経過すれば材料中の気体と系外の気体が入れ替わる。したがって，観測のタイムスケールと注目する物性との相性を念頭に考察をしなければならない。具体例の一つは，T_1とT_2である。気体キセノンのT_1は数分に及ぶ。材料中のキセノンのそれは拡散特性に応じて極端に短くなる場合もあるが，拡散性の高いシリコンゴムでは気体キセノンの値に近い。よって，T_1緩和挙動観察時に系内外のキセノンの交換現象が加わってくるから，正確な値を求められない。一方，T_2は数桁以上短いのでこの“交換現象”を考慮しなくてもよい場合がほとんどといえる。Fig. 1に，積算回数4回（15 sで一つのスペクトルを得る条件）で，収着キセノンに帰属されるピークの相対強度を，約7気圧のXeを導入した時刻からの経過時間に対してプロットした。この結果を，円柱状試料への収着過程を近似した式で解析した結果，他の方法で得られたものとほぼ同じ拡散係数が得られた。T_1値を考慮すると，非常に短い繰り返し時間を設定したにもかかわらず，比較的定量性のある結果が得られた事実は，このデータに“交換現象”が反映されてないことを意味していると考えている。

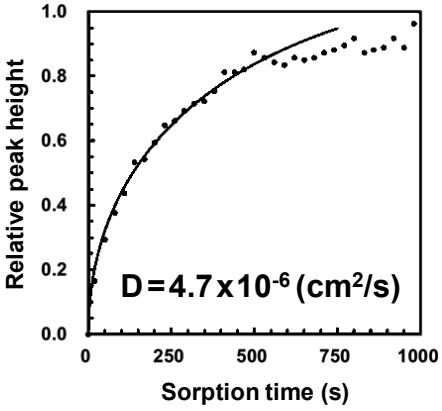


Fig. 1. Sorption curve obtained by NMR method using silicon rod with a dimeter of 2 mm.

本研究で行っている測定では固体様試料片と圧縮気体を耐圧試料管に封入しているから，磁場ロックやシム調整は行えないし，試料管のスピニングは無意味である。すなわち，測定試料調製の段階で正確なT_2値を求めることは不可能な操作をしている。とはいえ，得られるスペクトルの線幅は，定性的には拡散特性に依存して変化しているような結果が多数得られている。これを検証するため，いくつかのゴム材料を用いて温度可変測定を行った(Fig. 2)にまとめた。温度低下にともない線幅(FWHM)が増大する傾向がいずれの試料においても観測された。なお，Fig. 2では温度を各試料のガラス転移温度で整理してあるが，ゴム状高分子中に収着したXeが示すNMRピークのFWHM値が一つのマスターカーブで表現できる結果となり，拡散特性の高低の判定に加え，高分子鎖の運動性にも言及できる可能性が指摘される。

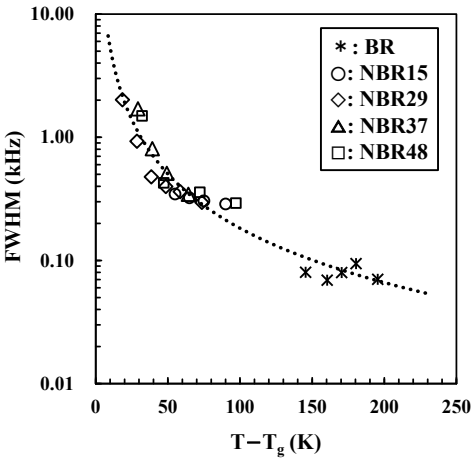


Fig. 2 Plot of FWHMs as a function of the difference between observation (T) and glass transition (T_g) temperatures.

これらは収着気体のNMR観察から，高分子材料の構造情報に関する様々な議論が展開可能なことを示している。

L3-3

残余双極子カップリング測定における配向力、温度安定性、有機溶媒耐性を兼ね備えた新規配向剤

○内田紀之[1]，山口芳樹[2]，海老名保男[3]，佐々木高義[3]，石田康博[1]
1理化学研究所 創発物性科学研究センター
2東北医科薬科大
3物質・材料研究機構

Titanium oxide nanosheet-based ultimate aligner for RDC analysis

○Noriyuki Uchida[1], Yoshiki Yamaguchi[2], Yasuo Ebina[3], Takayoshi Sasaki[3], Yasuhiro Ishida[1]
[1]*RIKEN*
[2]*Tohoku Medical and Pharmaceutical University*
[3]*NIMS*

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, tolerance in organic solvents 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左)を用いることで、配向力、温度安定性、表面改質容易性、有機溶媒耐性、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。

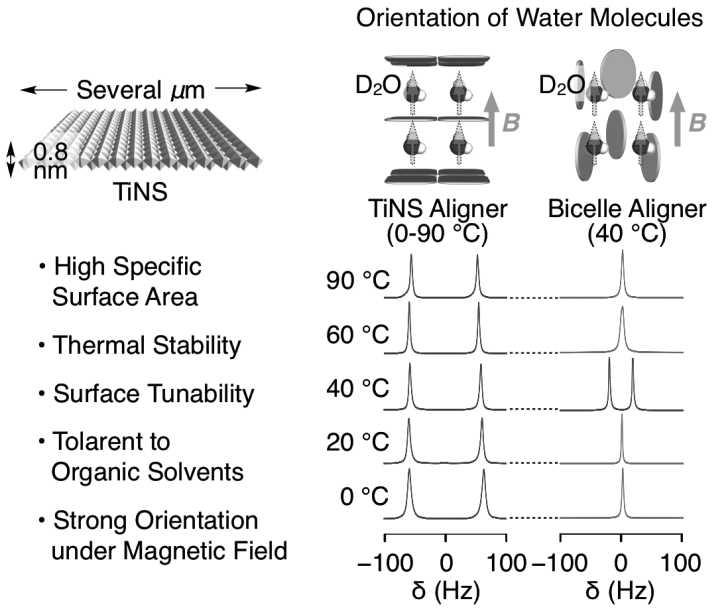


Fig. 1. Aligner of TiNS with high specific surface area, high stability, surface tunability, and strong orientation capability.

磁場配向NMR，残余双極子相互作用，配向剤
○うちだのりゆき，やまぐちよしき、えびなやすお、ささきたかよし、いしだやすひろ

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. 1右)。比較例として汎用的に用いられる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。また、この酸化チタンナノシートをタンパク質で表面修飾を行なったところ、水だけでなくDMF、メタノール、DMSOなどの有機溶媒中においても分散し、小分子のRDC測定においても広く応用可能であることが明らかになった(Fig. 2)。

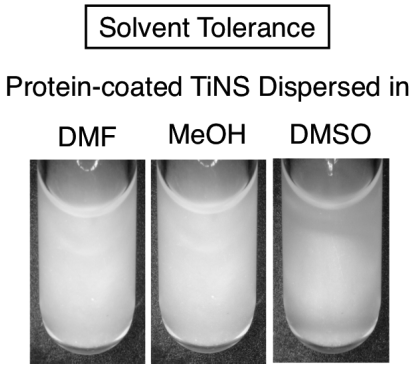


Fig. 2. Solvent tolerance of protein-coated TiNSs.

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のに対し、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 (Fig. 3)。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。

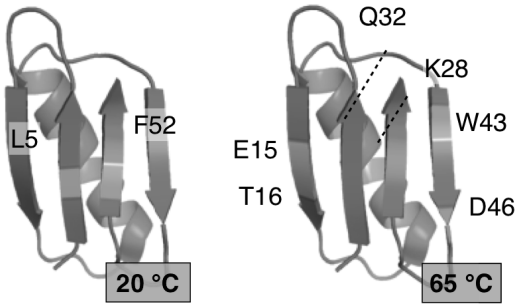


Fig. 3. Structural change of ^{15}N-GB1 upon cooling and heating.

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).

L3-4

ガングリオシド膜上におけるアミロイドβの固体ＮＭＲ構造解析

○矢木真穂[1,2,3]，西村勝之[2]，加藤晃一[1,2,3]，
1生命創成探究センター、自然科学研究機構
2分子科学研究所、自然科学研究機構
3名古屋市立大学、大学院薬学研究科

Assembling State of Amyloid-β on Ganglioside Membrane as Studied by Solid-state NMR Spectroscopy

○Maho Yagi-Utsumi[1,2,3], Katsuyuki Nishimura[2], Koichi Kato[1,2,3]
1Exploratory Research Center on Life and Living Systems (ExCELLS), National Institutes of Natural Sciences
2 Institute for Molecular Science (IMS), National Institutes of Natural Sciences
3Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University

Growing evidence has recently demonstrated that gangliosides on neuronal cell membranes can be interaction targets for various amyloidogenic proteins that are associated with neurodegenerative disorders exemplified by amyloid β (Aβ) in Alzheimer's disease. To understand the conformational effects of the ganglioside membrane on protein oligomerization at the atomic level, we performed NMR experiments and molecular dynamics simulations for an Aβ monomer in the presence and absence of the hydrophilic/hydrophobic interface. Furthermore, our solid-state NMR data obtained by employing GM1 ganglioside-containing DMPC vesicles as model membrane system have elucidated the membrane-induced conformation of Aβ. These data provide insights into the mechanisms underlying the α-to-β conformational transition of Aβ on ganglioside clusters, which promote nucleation processes in Aβ fibrillization in the membrane environments.

アルツハイマー病やパーキンソン病に代表される神経変性疾患の発症には、アミロイドβ（Aβ）やαシヌクレインといったタンパク質の神経組織における異常な凝集・蓄積がそれぞれ関与している。そのようなタンパク質の構造変換は、神経細胞膜上に存在する糖脂質クラスターという特異な相互作用場において誘起され、しかもそうした分子過程は、膜の組成や構成要素によって様々に影響され得ることが明らかとなってきた。

私たちはこれまで、NMR分光法を基軸とした分子科学的アプローチにより、タンパク質と糖脂質からなる超分子複合体を対象に、細胞表層における分子間相互作用を原子レベルの分解能で解明することを目指し、それらが関与する疾患の発症メカニズムを分子構造論的に理解することを目的とした研究を展開してきた。Aβの異常会合は、神経系に豊富に存在する糖脂質であるGM1ガングリオシドとAβの複合体形成を契機として促進されることが知られている。これまでに溶液NMR解析を通じて、ガングリオシドクラスターは親水性/疎水性境界面において、本来特定の2次構造を持たないAβ分子のαヘリックス構造への転移を誘起するとともに、その空間配置を規定していることを明らかとしてきた。また、Aβが高密度に存在する条件下では特異的な分子間相互作

アミロイドβ1、ガングリオシド2、固体NMR3

○やぎまほ、にしむらかつゆき、かとうこういち

用が促され、AβのC末端領域においてβストランド様構造が形成していることを示してきた。そこで本研究では、その先にある構造変化、すなわち、GM1膜上においてAβがαヘリックス構造の膜結合状態からβシート状のアミロイド線維へと至る構造転移のメカニズムを解明することを目的とし、溶液NMR法、固体NMR法、分子動力学計算を組み合わせた構造解析を試みた。

一次元^{13}C NMR解析の結果から、GM1膜上において形成されたAβ(1-40)の2つのαヘリックス構造のうち、分子中央付近に位置する1つめのαヘリックスの方がC末端に位置する2つめのαヘリックスよりも不安定化されていることが判明した。スピンラベルをC末に付加したAβ(1-40)を調製し、常磁性効果を利用した解析を行った結果、AβのC末端が、N末端および1つめのαヘリックス近傍に位置するような分子内相互作用をしていることが判明した。親水性/疎水性界面に全長のAβ(1-40)ペプチドを配置した分子動力学シミュレーションを行ったところ、各アミノ酸残基の界面からの距離およびαヘリックス形成率はNMRの結果と良く一致していた。さらに、分子動力学シミュレーションの結果より、Aβの2つのαヘリックスが界面上を移動して接近し、βシート構造の形成とカップルしてβヘアピン構造が形成されることが、膜上におけるAβ重合の核形成に重要であると考えられる。

一方、固体NMR解析においては、U-[^{13}C, ^{15}N]Aβ(1-40)を調製し、GM1を組み込んだ1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine（DMPC）ベシクルと混合した後、超遠心分離により沈殿画分を回収し、NMR計測に供した。CC-COSY、NCO、NCA、DARR計測を実施し、帰属を行い、GM1-DMPC膜上で形成されたAβの中間体構造を決定した。

発表では、これらの一連のAβの中間体構造をもとに、膜上におけるAβの構造転移および分子間相互作用の実体について議論したい。

参考文献

[1] M. Utsumi, Y. Yamaguchi, H. Sasakawa, N. Yamamoto, K. Yanagisawa, K. Kato, *Glycoconj. J*. 26, 999-1006 (2009).
[2] M. Yagi-Utsumi, T. Kameda, Y. Yamaguchi, K. Kato, *FEBS Lett*. 584, 831-836 (2010).
[3] M. Yagi-Utsumi, K. Matsuo, K. Yanagisawa, K. Gekko, K. Kato, *Int. J. Alzheimers Dis*. 2011, 925073 (2010).
[4] M. Yagi-Utsumi, C. M. Dobson, *Biol. Pharm. Bull*. 38, 1668-1672 (2015).
[5] M. Yagi-Utsumi, K. Nishimura, K. Kato, *PLoS One* 11, e0146405 (2016).
[6] S.G. Itoh, M. Yagi-Utsumi, K. Kato, H. Okumura, *J. Phys. Chem. B* 123, 160-169 (2019).
[7] M. Yagi-Utsumi, *Biol. Pharm. Bull*. 42, 867-872 (2019).

L3-5

β2-microglobulinアミロイド線維のex vivo立体構造解析

○田巻初[1]，宗正智[1]，川本晃大[1]，後藤祐児[1]，藤原敏道[1]，松木陽[1]
1大阪大学 蛋白質研究所

Ex vivo structural analysis of β2-microglobulin amyloid fibril

○Hajime Tamaki [1], Masatomo So [1], Akihiro Kawamoto [1], Yuji Goto [1], Toshimichi Fujiwara [1], Yoh Matsuki [1]
1 Institute for Protein Research, Osaka University

Amyloid fibril of β2-microgloblin (β2m) causes dialysis-related amyloidosis (DRA). Although the structure of *in vitro* fibrils of β2m has been reported, the structure and fibril forming mechanisms in human body are still unclear. We successfully prepared homogeneous β2m amyloid fibril samples by seeding of a clinical sample obtained from a DRA patient. Using MAS solid-state NMR, inter-molecular ^{13}C-^{15}N and intra-molecular ^{13}C-^{13}C atomic contacts were analyzed. The inter-molecular correlations clearly show β2m monomers are assembled into the fibrils as parallel-in-register structure in human body. From the ^{13}C-^{13}C PDSD and PAR spectra, hundreds of distance restraints were obtained. In addition, we obtained fine Cryo-EM micrographs and tomographs. We will discuss details of them and result of hybrid modeling combined data from MAS solid-state NMR and Cryo-EM experiments.

アミロイド線維はタンパク質の凝集体であり、神経変性疾患などの疾病やペプチドホルモンの貯蔵等に関与する。β2-microglobulin（β2m）は、長期間の人工透析によってアミロイド線維を形成し、手根管症候群などの透析アミロイドーシス（DRA）を引き起こす。β2mは*in vitro*では酸性条件で容易に線維化するが、中性条件では線維化が難しいということが知られている[1]。これまでに*in vitro*・酸性条件で調製した線維については立体構造解析も行なわれてきたが[2]、中性である人体でどのように線維化が進行するのかは、いまだ謎に包まれている。また近年、アルツハイマー病と関連があるAβについて、その症状と線維形態に相関が見られることが明らかとなった[3]。これらは*in vivo*で生じたアミロイド線維の立体構造解析が重要であることを示している。

タンパク質の立体構造解析では一般にmgオーダーの試料が必要であり、さらにNMR法では事実上同位体標識が不可欠である。よって*in vivo*試料を直接解析できない。しかし、アミロイド線維は微量の線維断片をタンパク質溶液に加えるシーディングにより、同一構造をもつ線維を増幅できる。この性質を利用し、我々はDRA患者の組織から得たβ2mアミロイド線維を増幅し、MAS固体NMR法とクライオ電子顕微鏡（Cryo-EM）を用いて*ex vivo*立体構造解析を行なった。

β2-microglobulin、アミロイド線維、立体構造解析

○たまきはじめ，そうまさとも，かわもとあきひろ，ごとうゆうじ，ふじわらとしみち，まつきよう

■実験方法

MAS固体NMR・Cryo-EM実験に用いた試料は、DRA患者の組織から抽出されたβ$_2$mアミロイド線維をシーディング法により増幅・継代することで得た。

固体NMR試料は、シーディング溶液に大腸菌発現系で得た^{13}C, ^{15}N均一標識体や[1,3-^{13}C]-および[2-^{13}C]-グリセロールを炭素源に用いたスパース標識体、さらにこれらの試料を[100% ^{15}N, ^{1}H^{N}, ^{2}H, ^{12}C]-標識体で希釈したものも用い線維化することで調製した。測定はT3-HXY 3.2 mm MASプローブ（Varian）を搭載したECA-II 600 MHz （JEOL RESONANCE）で行なった。MAS速度とプローブ温度は、パルスシーケンスに応じてそれぞれ12.5 ~ 14.6 kHz, -20 ~ -10°Cに設定した。

Cryo-EM試料は固体NMR試料の余剰サンプルで調製した。撮影には電子線直接検出型カメラK3 Summit（Gatan）を搭載したTitan Krios（Thermo Fisher Scientific）を用いた。

■結果

固体NMR実験では、3D-NCACXとNCOCX, CANCOスペクトルを用い、H/D交換実験により決定された線維コア領域[4,5,6]のほとんどの^{13}C, ^{15}N原子を帰属した。続いて、分子内・分子間の原子コンタクトの解析を行なった。^{1}H, ^{13}C標識体と^{2}H, ^{15}N標識体を混合した線維のNHHCスペクトルを測定・解析し、プロトフィラメントが並進対称性をもつparallel-in-register構造をとることを明らかにした。また、各種^{13}C標識体でPDSDやPARを用いた^{13}C-^{13}C相関測定を行い、これまでにアミノ酸配列上で5残基以上離れているロングレンジの相関を26個含む405個の分子内^{13}C-^{13}C相関ピークを帰属した（Fig. 1）。

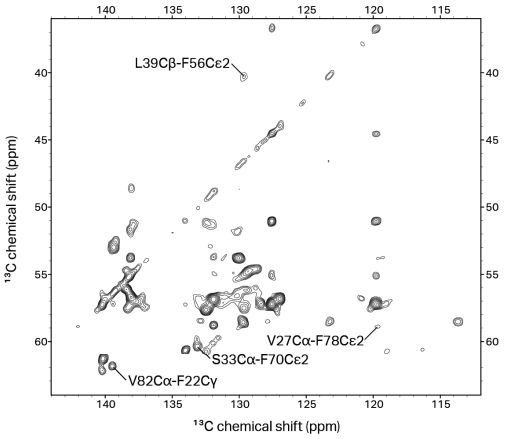


Fig. 1. Aliphatic-aromatic correlation region of the 2D PDSD spectrum collected mixing time of 250 ms on [2-^{13}C]-β$_2$m. Only the long-range correlations are labeled.

Cryo-EM実験では、通常のTEM画像を用いた単粒子解析に加え、様々な試料ステージ傾斜角で得られた同一分子の撮影データから三次元データを構築するトモグラフィ法による解析も行なった。両者ともに良好な撮影結果を得ており、特に単粒子解析では、平均粒子像で明確なβストランドのピッチが確認されている（Fig. 2）。すなわち少なくとも5Å以上の分解能を持つデータが得られたことを示している。

現在、我々は固体NMRとCryo-EMのデータを用いたハイブリッドモデリングによる立体構造モデルの構築を進めている。討論会では、上記実験を含めてそれらの詳細を発表する予定である。

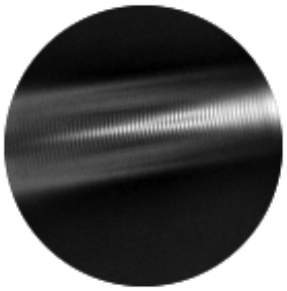


Fig. 2. An average of fibril segments from the cryo-EM micrographs

[1]McParland et al., *Biochemistry* 2000, 8735-8746
[2]Iadanza et al., *Nat. Commun.* 2018, 4517
[3]Qiang et al., *Nature* 541, 217-221 (2017)
[4]Hoshino et al., *Nat. Struct. Biol.* 2002, 332-336
[5]Yamaguchi et al., *J. Mol. Biol.* 2004, 559-571
[6]Skora et al., *ChemBioChem* 2010, 1829-1832

L3-6

Unexpected Prion-like Cross Talk between Aβ42 and Aβ40 studied by solid-state NMR

○石井　佳誉[1,2], Yiling Xiao[3], Brian Yoo[3], 松田　勇,[1] Dan McElheny[3]
1東京工業大学　生命理工学院
2理化学研究所　RSC　NMR研究開発部門
3イリノイ大学シカゴ校　化学科

○ Yoshitaka Ishii[1,2], Yiling Xiao[3], Brian Yoo[3], Isamu Matsuda,[1] Dan McElheny[32]
1 School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology
2 RIKEN RSC NMR Science & Development Division
3 Department of Chemistry, University of Illinois at Chicago

Cross-seeding of misfolded amyloids is believed to induce cross-species infection of prion diseases. Despite increasing evidence that misfolded beta-amyloid (Aβ) mimics prions, interactions of misfolded 42-residue Aβ42 with more abundant Aβ40 in AD are elusive. Through ^{13}C SSNMR and other experiments, this study demonstrates that an E22G pathogenic ("Arctic") mutation of Aβ40 can enhance misfolding via cross-seeding from WT Aβ42 fibril, suggesting unexpected cross talk of Ab isoforms that may promote early onset of AD. Other data on Ab cross seeding and amyloid assemblies will be presented.

Amyloid diseases, including AD, Parkinson's and prion diseases, are commonly characterized by misfolded fibrillar aggregates of disease-specific amyloid proteins.[1] These amyloid fibrils catalyze self-replication as a "seed" or template by recruiting monomeric proteins into a template-dependent polymerization. Increasing *in-vitro* and *in-vivo* evidence suggests that fibril from one amyloid protein can promote misfolding of another amyloid protein via cross-seeding/propagation.[2] In yeast prions exposure to a misfolded form of a Sup35 prion domain originated from one yeast strain was shown to prompt misfolding of another Sup35 prion domain from a divergent strain through a cross-species barrier.[3] It is believed that such cross-seeding of prions is essential in cross-species transmission of mammalian prion diseases.[4] However, cross-seeding mechanisms at a molecular level are poorly defined for prions and other amyloid proteins.

AD is an amyloid disease that is linked with misfolding of 39- to 43-residue β-amyloid (Aβ) protein. Aβ is a primary component of the amyloid plaque, a hallmark of AD. Among the Aβ species in AD, 42-residue Aβ (Aβ42) is considered to be the more pathogenic species since it is both more aggregation-prone and toxic than most abundant 40-residue Aβ (Aβ40).[1] Furthermore, a lower ratio of Aβ42 to Aβ40 in the plasma is an indicator of AD;[5] thus, selective misfolding of Aβ42 may trigger initial amyloid plaque deposition. Although early studies reported some degree of cross-seeding on Aβ40 misfolding by Aβ42 fibril seed, recent studies using improved protocols to prepare fibrils consistently showed negligible or poor enhancement of misfolding of Aβ40 via cross-seeding with Aβ42 fibril seed.[6-8] Recent kinetic studies indicated that cross-seeding effects between Aβ42 and Aβ40 may be explained by non-specific surface-catalysis rather than structure-specific template nucleation.[7] Thus, unlike prion proteins, cross-seeding effects between the Aβ isoforms have largely been neglected in AD.

SSNMR, cross-seeding, amyloid-beta

○いしい　よしたか　Yiling Xiao, Brian Yoo, まつだ　いさむ　Dan McElheny

In this study, we re-examined the impact of cross-seeding in familial AD (FAD) using an *in-vitro* model by investigating co-aggregation of WT Aβ species and a pathogenic mutant of Aβ using the E22G Aβ40 associated with "Arctic" FAD. Unlike many pathogenic mutants of Aβ linked with FAD, which generally promote amyloid fibril formation, the E22G mutation was reported to promote the formation of sub-fibrillar diffusible aggregates rather than fibril.[9] Here, we present an alternate hypothesis that explains how this E22G mutant and possibly other pathogenic mutants of Aβ can modulate a misfolding pathway of Aβ in FAD via cross-seeding between the mutant and wild-type (WT) Aβ isoforms. Our results suggest that a pathogenic mutation on Aβ can render more abundant Aβ40 prone to aggregation by enhancing interactions between Aβ42 and Aβ40 via cross-seeding. We also introduce SSNMR as a structural tool for investigating cross-seeded amyloids for the first time. Other data on Aβ cross seeding and amyloid assemblies as well as SSNMR method development efforts in our group may be presented.

References

1 Selkoe, D. J. Cell biology of protein misfolding: The examples of Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Nat. Cell. Biol.* **6**, 1054-1061 (2004).

2 Morales, R., Callegari, K. & Soto, C. Prion-like features of misfolded A beta and tau aggregates. *Virus Res.* **207**, 106-112 (2015).

3 Tanaka, M., Chien, P., Yonekura, K. & Weissman, J. S. Mechanism of cross-species prion transmission: An infectious conformation compatible with two highly divergent yeast prion proteins. *Cell* **121**, 49-62 (2005).

4 Prusiner, S. B. Prions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 13363-13383 (1998).

5 Graff-Radford, N. R. *et al.* Association of low plasma A beta 42/A beta 40 ratios with increased imminent risk for mild cognitive impairment and Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* **64**, 354-362, (2007).

6 Pauwels, K. *et al.* Structural Basis for Increased Toxicity of Pathological A beta(42):A beta(40) Ratios in Alzheimer Disease. *J. Biol. Chem.* **287**, 5650-5660 (2012).

7 Cukalevski, R. *et al.* The A beta 40 and A beta 42 peptides self-assemble into separate homomolecular fibrils in binary mixtures but cross-react during primary nucleation. *Chem. Sci.* **6**, 4215-4233 (2015).

8 Xiao, Y. *et al.* Aβ(1–42) fibril structure illuminates self-recognition and replication of amyloid in Alzheimer's disease. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **22**, 499-505 (2015).

9 Nilsberth, C. *et al.* The 'Arctic' APP mutation (E693G) causes Alzheimer's disease by enhanced A beta protofibril formation. *Nat. Neurosci.* **4**, 887-893 (2001).

L3-7

区分標識法の拡張とタンパク質の動的構造解析への応用

○岩井秀夫[1]，Kornelia M. Mikula[1], Hannes M. Beyer[1], and O.H. Samui Ollila[1]
[1]ヘルシンキ大学, バイオテクノロジー研究所

Expanding the segmental labeling toolbox for larger proteins and its applications for studying protein dynamics

○ Hideo Iwaï[1], Kornelia M. Mikula[1], Hannes, M. Beyer[1], and Samui H. Ollila [1]
[1] *Institute of Biotechnology, University of Helsinki, Helsinki, Finland*

Segmental isotopic labeling facilitates NMR studies of large proteins, multi-domain proteins, and proteins with repetitive sequences by alleviating signal overlaps. Segmental isotopic labeling also makes it possible to investigate an individual domain in the context of a full-length protein by NMR. Several established methods are currently available for segmental isotopic labeling such as intein-mediated ligation and enzymatic ligation. However, each method has specific requirements and limitations. Here we present the recent expansion of the segmental isotopic labeling toolbox to overcome the current bottlenecks of segmental isotopic labeling by complementing the existing methods and used for investigating a protein with low complexity regions.

高分子量タンパク質のNMR解析はシグナルの縮重が大きな課題である。区分標識法は特定区間領域を安定同位体によって標識、観測するため、巨大分子量タンパク質、マルチドメインタンパク質、繰り返し配列を持つタンパク質を解析する上できわめて有効な手法である。特に全長タンパク質内の特定ドメインを網羅的に観測しながら、他のドメインのシグナルを除去することが可能となり、単離ドメインだけでは分からなかった複数のドメインによる協奏的な作用様式を解析することが可能になる。

これまで、発現タンパク質ライゲーション、タンパク質組み継ぎ反応、ソルターゼ等を用いた酵素法等、様々なプロテインライゲーション手法が区分標識法に使われてきた(Fig. 1)。

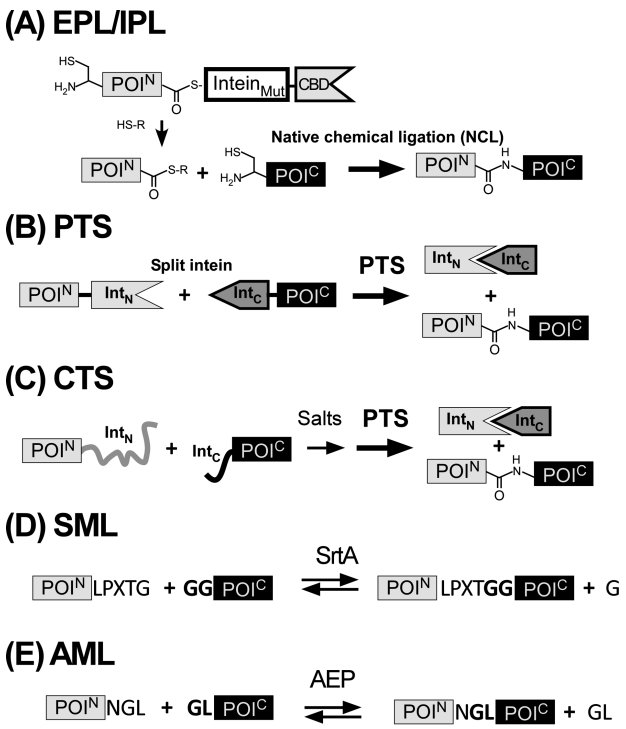


Fig. 1. Methods for segmental isotopic labeling

区分標識法、プロテインライゲーション、Protein Dynamics

○いわい　ひでお、コーネリア　ミクラ、ハネス　バイヤー、サムリ　オリラ

しかしながら、それぞれの方法に固有な欠点があり、現時点において唯一の汎用性の高い手法というものは、存在しない。我々は区分標識法の応用範囲を広げるために、対象タンパク質の性質に合わせて、より簡便に区分標識法が導入できるためのツールを開発してきた。塩濃度に依存した条件的タンパク質の組み継ぎ反応（conditional protein splicingやアスパラギンエンドペプチダーゼ（AEP）なども区分標識法には有効に活用できることを示してきた(1-3)。特に生理的条件に近い状態でのNMR解析を可能にするために、最終的に区分標識されたタンパク質が全くアミノ酸配列の改変を含むことなく、なおかつ簡便に調製できることを目指している。低複雑度領域が存在するタンパク質にアミノ酸配列の改変を伴わない区分標識法を用い、NMRシグナルの縮重が顕著な低複雑度領域の存在下で単離されていない球状ドメインの帰属および^{15}N核を用いた動的構造解析を行った（Fig. 2)。これにより単離されたドメインとの詳細な比較が可能になり、低複雑度領域が球状ドメインの動的構造に及ぼす影響を解析した。更に、分子動力学法による^{15}N核の緩和時間のシュミレーション値と実験値との比較を行うことで低複雑度領域のより正確な動的構造情報を引き出すことを試みた(4)。

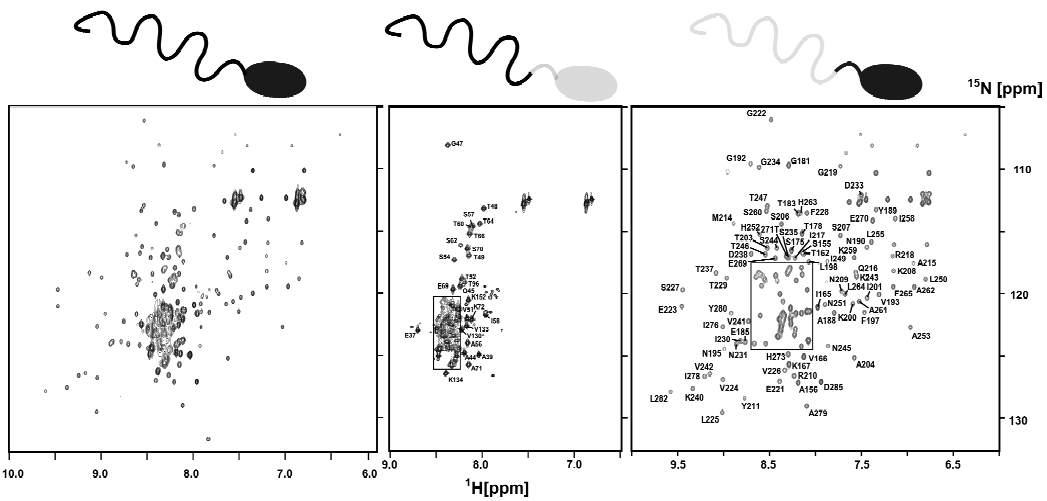


Fig. 2. Segmental isotopic labeling by salt-inducible protein *trans*-splicing

References

1. Ciragan, A., Aranko, A.S., Tascon, I. & Iwaï, H. (2016) Salt-inducible protein splicing in cis and trans by inteins from extremely halophilic archaea as a novel protein-engineering tool. J. Mol. Biol 428: 4573-4588.
2. Mikula, K.M., Tascón, I., Tommila, J.J., & Iwaï. H. (2017) Segmental isotopic labeling of a single-domain globular protein without any refolding step by an asparaginyl endopeptidase. FEBS lett. 591:1285-1294.
3. Mikula, K.M., Krumwiede, L., Plückthun, A., & Iwaï, H. (2018) Segmental isotopic labeling by asparaginyl endopeptidase-mediated protein ligation. J. Biomol. NMR, 71: 225-235.
4. Ollila, O.H.S., Heikkinen, H.A. & Iwaï H. (2018) Rotational dynamics of proteins from spin relaxation times and molecular dynamics simulations. J. Phys. Chem. B, 122: 6559–6569.

L3-8

核緩和機構最適化アミノ酸を利用した高分子量蛋白質の動態構造解析法の開発

○宮ノ入　洋平[1,2]，武田　光広[2,3]，寺内　勉[4,5]，甲斐荘　正恒[2,4]
1 大阪大学　蛋白質研究所；2 名古屋大学大学院　理学研究科附属構造生物学研究センター；3 熊本大学大学院　生命科学研究部
4 首都大学東京大学院　理工学研究科；5 SAILテクノロジーズ株式会社

Structural dynamics analysis of high molecular weight proteins using new transverse relaxation optimized SAIL amino acids.

○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 Sciences, Nagoya University,3 Faculty of Life Sciences, Kumamoto University,4 Graduate School of Science, Tokyo Metropolitan University,5 SAIL Technologies,Inc.

We have been developing the stereo-array isotope labeling (SAIL) method, to observe the highly sensitive NMR signals for various proteins larger than 50 kDa. By using the SAIL amino acids with transverse relaxation-optimized isotope labeling patterns, we succeeded in observing the extremely narrow aromatic / aliphatic ^{13}C-^{1}H signals and conducting the precise intra / inter-residue NOE signal assignments for the 82 kDa malate synthase G (MSG) protein. We also developed cost-effective cellular expression system using various amino acid auxotrophic *E. coli* strains, to prepare SAIL labeled proteins such as antibody-antigen complexes and membrane proteins. To expand the versatility of our SAIL-NMR method, we have further improved the SAIL amino acid. We will present the latest data on the structures and dynamics of 80-900 kDa proteins obtained under various conditions, including high-pressure and low temperature.

［序論］

溶液NMR法は、蛋白質をはじめとする生体高分子について、さまざまな時間域に渡る構造動態情報を原子分解能で捉えることができる優れた手法である。しかしながら、分子量50 kDaを超える高分子量蛋白質については、シグナルの縮重や核緩和の影響によるシグナルの低感度化が顕著となる。そのため、高分子量蛋白質について、高次な生命機能を解明するうえで必要な構造動態情報を得ることは、困難を極めていた。
我々は、高分子量蛋白質のNMR構造決定法として独自に開発した立体整列同位体標識(Stereo-array isotope labeling; SAIL)法を基盤として、高分子量蛋白質の構造動態を捉える手法の開発を進めてきた。その結果、横緩和過程をより最適化したSAILアミノ酸を利用することにより、分子量80kDaに及ぶ高分子量蛋白質に関しても、芳香環や脂肪族NMRシグナルを高感度に観測し、配列特異的なシグナル帰属および残基内/残基間のNOEシグナルを高精度に帰属できることを立証してきた[1)]。また、並行して取り組んできた蛋白質試料調製法の多様化により、アミノ酸要求性大腸菌株や大腸菌無細胞発現系を用いて、観測目的とするアミノ酸残基のみを選択的にSAILアミノ酸標識し他

SAIL法、高分子量蛋白質、蛋白質動態

○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

の残基を完全重水素化した蛋白質を簡便かつ効率的に調製する技術を確立した。このことから、抗体や膜蛋白質、高分子量酵素複合体といった様々な試料を対象としたSAIL-NMR法の利用が展開されている[2)]。現在、更なる巨大蛋白質複合体を対象とした構造動態解析や微量蛋白質の高感度観測を目指し、SAIL-NMR法の改良を進めている。本年会では、最近の進展について報告する。

［方法］

これまでに紹介してきた核緩和最適型のSAILアミノ酸は、基本的に観測対象を^{13}C-^{1}H対としている。そこで、位置・立体選択的に導入した^{13}C-^{1}Hに隣接する炭素は、全て重水素のみを持つ^{12}Cにし、核スピンネットワークから孤立するように設計されている(Figure 1a)。さらなる核緩和最適化として、観測対象を^{1}Hに絞り、直接結合する炭素をも^{12}Cとした(Figure 1c)。このように核緩和機構を極限まで排除したアミノ酸を用いて、目的蛋白質を調製した。試料は、主としてRutgers Univ. 井上研究室で作成されたアミノ酸要求性BL21 (DE3) 株を用いた大腸菌発現系で、重水素化M9最少培地を利用して調製した[3)]。

［結果と考察］

従来の核緩和最適型SAILアミノ酸を用いることで、高分子量蛋白質中の様々なアミノ酸残基の^{13}C-^{1}Hシグナルを高感度かつ位置・立体選択的に観測できることが示されてきた(Figure 1b)。一方で、1MDaに及ぶ巨大蛋白質複合体や、大量調製が困難な試料については、構造動態研究を展開するうえで十分な感度を得ることには至っていなかった。今回、核緩和機構を極限まで排除した改良型アミノ酸を用いることで、観測対象の^{1}Hシグナルを、短時間で高感度に捉えることに成功した(Figure 1d)。さらに、圧力可変実験や極低温実験においても、高感度にNMR信号を検出できることも明らかにした。この結果は、溶液NMR法の観測対象を大幅に拡大するだけでなく、アミノ酸残基側鎖の配座交換運動や芳香環反転運動といった構造動態解析法を拡張するものであり、様々な生体高分子が有する高次な生命機能の解明に大きく貢献することが期待できる。

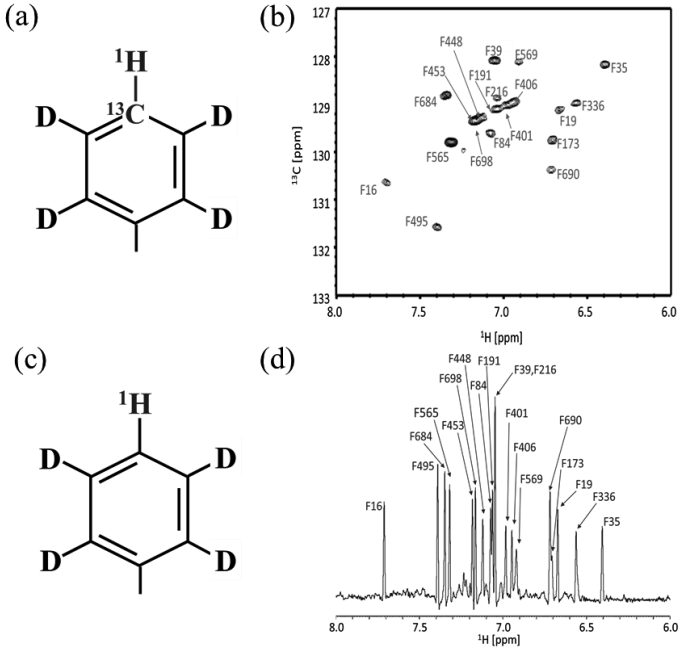


Figure 1. New transverse relaxation optimized (RO) SAIL amino acid for studying large molecular proteins:

Structure of RO-SAIL ζ-Phe (a) and New RO-SAIL ζ-Phe (c). (b) aromatic CH TROSY HSQC spectrum of RO-SAIL ζ-Phe labeled MSG. (d) ^{1}H 1D spectrum of New RO- SAIL ζ-Phe labeled MSG.

［謝辞］

本研究の一部は科学研究費補助金基盤研究(C) および新学術領域「動的構造生命」の支援により実施された。

［文献］

1) M. Kainosho, *et al.* (2018), *J. Biomol. NMR* **71**, 119-127.

2) D. Gauto, *et al.* (2019), *J. Am. Chem. Soc.* **141**, 11183-11195.

3) Y. Miyanoiri, *et al.* (2016), *J. Biomol. NMR* **65**, 109-119.

L3-9

重複NMRシグナルの分離・解析を可能にするアミノ酸符号化安定同位体標識とテンソル分解法

○葛西 卓磨[1,2]，小野 峻佑[2,3]，田中 利幸[4]，池田 思朗[5]，木川 隆則[1,3]
1 理化学研究所 生命機能科学研究センター
2 科学技術振興機構 さきがけ
3 東京工業大学 情報理工学院
4 京都大学大学院 情報学研究科
5 統計数理研究所

Resolving signal overlapping by isotope labeling and tensor decomposition for protein NMR analysis

○Takuma Kasai[1,2], Shunsuke Ono[2,3], Toshiyuki Tanaka[4], Shiro Ikeda[5], Takanori Kigawa[1,3]
1 RIKEN Center for Biosystems Dynamics Research
2 PRESTO, JST
3 School of Computing, Tokyo Institute of Technology
4 Graduate School of Informatics, Kyoto University
5 The Institute of Statistical Mathematics

Signal overlapping is one of major bottlenecks for protein NMR analysis. We propose a novel method, SiPex (Stable-isotope assisted Parameter extraction) to solve the problem. SiPex is based on our previously reported amino-acid selective isotope labeling method, SiCode (Stable isotope encoding). In SiCode, amino acid information is encoded in isotope labeling ratios of multiple samples and decoded from the spectra. In SiPex, the isotope labeling ratios are also utilized as a clue for resolving overlapping signals by tensor decomposition. The introduction of tensor decomposition also enabled us to integrate other NMR experiments for protein characterization such as ^{15}N relaxation measurements. Moreover, direct analysis of non-uniformly sampled time-domain NMR data without spectral reconstruction reduces the measurement time. Resolving overlapping signals and extraction of amino-acid information and protein characteristics with the help of isotope labeling should expand NMR applications to difficult target proteins.

シグナルの重複はタンパク質のNMR解析にとって問題である。例えば、主鎖アミドシグナルを用いる^{15}N緩和測定では、^{1}H-^{15}N 2次元NMRを用いるのが一般的であるが、シグナルが重なってしまうと正しい強度を得ることができず、緩和情報を得ることが困難となる。3次元HNCOを用いるなど展開次元を増やす方法もあるが、測定時間が大幅に増えることが難点である。本発表では、シグナル重複の問題を解消するため、アミノ酸選択的安定同位体標識とテンソル分解を組み合わせるSiPex（Stable-isotope assisted Parameter extraction）を提案する。

SiPexは、発表者らが以前考案したアミノ酸選択的安定同位体標識法であるSiCode[1]（Stable isotope encoding）をもとにしている。SiCodeでは、「アミノ酸の情報を同位体標識率に符号化し、観測されたシグナル強度から復号する」というコンセプトに基づき、各アミノ酸を同位体標識率の組み合わせであらわし、2次元^{15}N-HSQCとHN(CO)スペクトルの強度から、設定した標識率と照らし合わせて各残基のi位・i-1位アミノ酸の情報を得る（Fig.1）。

アミノ酸選択的安定同位体標識法、符号化標識法、シグナル分離

○かさいたくま、おのしゅんすけ、たなかとしゆき、いけだしろう、きがわたかのり

シグナル強度パターンは、アミノ酸情報に変換できるだけでなく、重複シグナルの分離の手がかりとすることもできる。テンソル分解法のひとつであるpolyadic decompositionでは、テンソルを、ベクトルの直積の和であらわす。HSQC、HN(CO)、^{15}N-R_1-HSQC、^{15}N-R_2-HSQC、^{15}N-{^{1}H}-heteronuclear NOE HSQCの各2次元スペクトルを並べ、^{1}H、^{15}N、SiCode、緩和の4軸をもつ4階テンソルとみなすと、このテンソルは各成分に対応するベクトルの直積の和であらわせる（Fig. 2）。polyadic decompositionによって分解すると、SiCode軸のベクトルからはi位・i-1位のアミノ酸の情報が、緩和軸のベクトルからはR_1, R_2, heteronuclear NOEの情報がそれぞれ得られる。従来法では、2次元スペクトル上で重なったシグナルについてはそれぞれの正しい強度が得られないため、SiCodeによるアミノ酸決定も緩和測定も成り立たないが、SiPexは、まずシグナルを分離してそれぞれの強度を得ることで、これらを可能にしている（Fig. 2）。

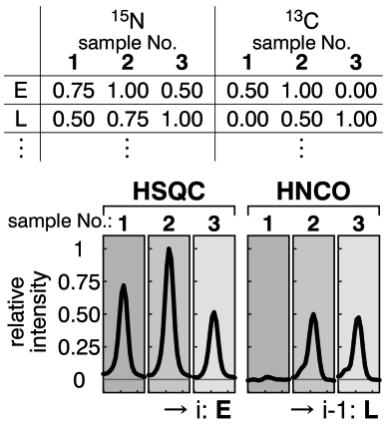


Fig. 1. Excerpt of SiCode labeling pattern and intensities of (L)E51 signal from Ubiquitin 3A mutant protein

類似の先行研究であるMUNIN[2]は、均一標識体を用いて、^{1}H方向の線形・^{15}N方向の線形・緩和の3軸のベクトルの違いを頼りにシグナル分離をおこなうものであるが、polyadic decompositionの数学的な性質として、分離には、少なくとも3軸のベクトルの実質的な差が必要で、1軸でもほぼ同一であると分離は困難である。SiPexでは、同一の強度パターンになりにくいSiCodeが加わって4軸となり、より安定してシグナル分離ができる。

また、SiPexでは、分離された成分それぞれについて、i位・i-1位のアミノ酸と緩和の情報が紐づいた状態で得られる。デュアル選択標識[3]と同様に、あるアミノ酸の並びが配列中に1度しか現れなければ、アミノ酸情報のみで一意に帰属できるので、これらの残基については、「化学シフトを決定する」という従来型のシグナル帰属の工程を経ずに、緩和解析をおこなうことができる。MUNINとSiPexに共通の特徴として、non-uniform samplingによる時間軸データであってもスペクトル推定を経ずに直接解析できる点がある。SiPexでは、上記のように化学シフトに依存しない解析も可能であることから、この利点をより活かすことができる。

従来型のシグナル帰属工程を経ない解析や、重複シグナルの分離を可能にするSiPexは、これまでNMR解析が困難であったさまざまなタンパク質の解析への活用が期待される。

[1] T. Kasai *et al.*, *J. Biomol. NMR*, 2015, **63**:213-221. [2] D. M. Korzhnev *et al.*, *J. Biomol. NMR*, 2001, **21**:263-268. [3] M. Kainosho and T. Tsuji, *Biochemistry*, 1982, **21**:6273-6279.

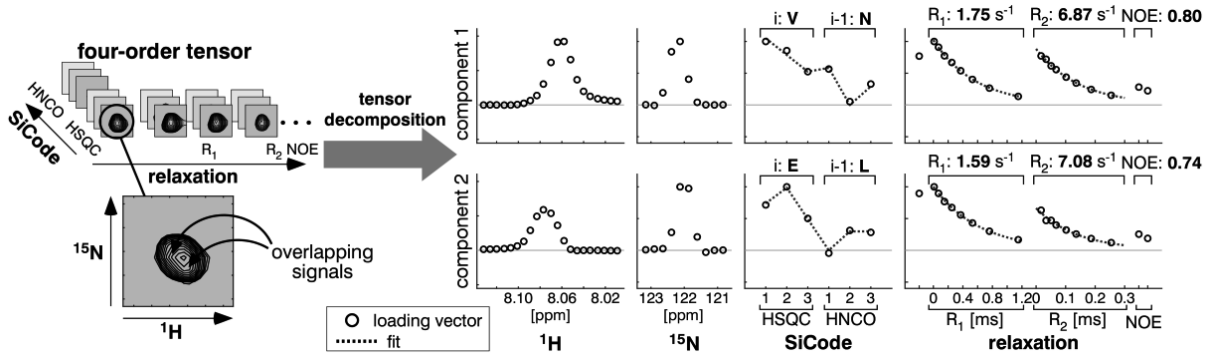


Fig. 2. Decomposition of overlapping signals, (L)E16 and (N)V26, and extraction of amino-acid and relaxation information

L3-10

磁場掃引法を活用した半整数四極子核固体NMR法の開発

○山田　和彦[1]
1高知大学総合科学系複合領域科学部門

Development of Field-stepwise-swept QCPMG-MAS NMR of half-integer quadrupolar nuclei

○Kazuhiko Yamada[1]
[1]*Interdisciplinary Science Unit, Multidisciplinary Sciences Cluster, Research and Education Faculty, Kochi University*

Field-stepwise-swept solid-state nuclear magnetic resonance (NMR) of half-integer quadrupolar nuclei, combined with a rotor-synchronized Quadrupolar Carr-Purcell-Mei boom-Gill (QCPMG) magic-angle spinning (MAS) experiment, is presented. QCPMG experiments provide a gain in signal intensity, and MAS can completely or partially average out the first-order nuclear spin interactions such as dipole-dipole interactions and chemical shift anisotropy. One of the practical advantages is to make it possible to determine the adequate step size of field-stepwise-swept solid-state NMR, *i.e.*, the multiple of the spikelet separation, prior to measurements.

［緒言］

周期表の大半の元素は四極子核（核スピン量子数＞1/2）を有しているが、四極子相互作用による線幅の増加やNMR信号の強度不足などの影響を受けて、理論上NMR測定が可能であるにも拘わらず、ほとんどの四極子核は手付かずのままである。NMRスペクトルの線幅が広い場合の対処策として、外部磁場を固定し照射周波数を掃引する方法（Frequency-swept NMR）と、照射周波数を固定し外部磁場を掃引する方法（Field-swept NMR）が用いられてきた。近年、主に高磁場条件下において広域な周波数領域を照射でき、かつ、高感度化が期待されるWURST-QCPMG法を使用した前者が注目をされており、欧米を中心に数多くの研究成果が発表されている。一方、我々の研究グループでは、NMR信号を光に変換するオプトメカニクス法や高Q値を示す高温超伝導素材を活用した受信コイルなど最新の超高感度化手法を組み合わせることが可能な後者に着目し、従来法では観測することが困難であった核種でも測定可能な次世代型NMRシステムの開発研究を進めている。本発表では、磁場掃引法を活用した実践例として、QCPMG-MAS法や複数サイトの分離法などの新規測定手法を紹介し、それら有用性について議論する。

［実験］

本研究では、無冷媒超伝導磁石（仁木工芸株式会社製）の底部からhome-made MAS NMRプローブ(3.2 mm ϕ)を挿入・固定した状態で固体NMR測定を実施した。励磁用電源（SMR-1004S-NK, シグマ電子）と直流電圧/電流源（GS200, YOKOGAWA）を組み

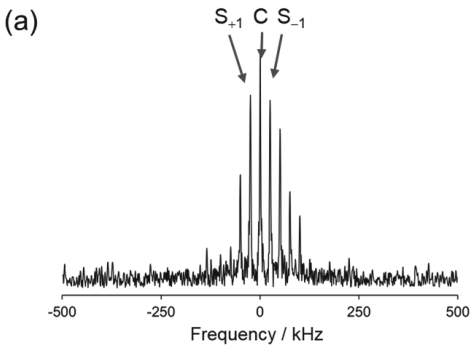
Quadrupolar nuclei

○やまだ　かずひこ

合わせて、外部磁場強度を精密に制御した。RFパルス照射とNMR信号の受信はSpinCore Technologies社製ボードを使用した。測定条件に応じてNMR用電力増幅器、送受信切替器、前置増幅器（全て株式会社サムウエイ社製）を適宜変更した。得られたNMRスペクトルはMATLAB（The MathWorks, Inc.）を用いて解析した。

[結果と考察]

本研究における‘磁場掃引NMR法’は、古典的なCW法とは異なりフーリエ変換型パルスNMR法を使用している。一般的な磁場掃引法では、積算中も含め、磁場強度を継続的に可変する。電子スピンや四極子核の影響を受けた超広幅なNMRスペクトルを観測することができる反面、化学者にとって重要な化学シフト値やJ結合定数など、小さな核スピン相互作用を観測することは困難である。我々は、磁場掃引NMR法を化学分析に応用することを念頭に、磁場強度を段階的に可変することで（積算時間も含めて）FID信号を静磁場下で検出できるField-stepwise-swept NMR法を提唱した。本手法の肝は、ドライブモード（外部電源と超伝導磁石が通電している状態）においても高デジタル分解能を保持することである。Field-stepwise-swept NMR法の一例として、ここではQCPMG-MAS法について述べる。Figure 1(a)に、7.221148 T（ドライブモード）における有機臭素化合物のrotor-synchronized QCPMG-MAS ^{79}BrNMRスペクトルを示す。Spikeletの幅はQCPMG法における観測時間（τ_{ACQ}）に依存する。Figure 1 (b)に、上記測定条件下において磁場強度を6.8 Tから7.4 Tまで掃引した結果を示す。縦軸（周波数軸）に沿ったスライスが磁場掃引NMRスペクトルに相当する。Figure 2に、同試料の(a)静止状態と(b)QCPMG-MASの磁場掃引^{79}BrNMRスペクトルをそれぞれ示す。QCPMG法を活用することで積算効率は向上する。更には複数のスライス、Figure 1のCと$S_{\pm1}$、を合算することでもSN比は飛躍的に向上する。また、Field-stepwise-swept NMR法における磁場可変量をτ_{ACQ}（もしくはMAS回転数）と同期させることで、NMRスペクトルにおける横軸（磁場）のポイント数（つまり測定時間）を大幅に削減することが可能になる。発表当日は、半整数四極子核を測定対象とする新規磁場掃引固体NMR法として、MAS法の活用、複数サイトの分離方法、超高感度化手法を組み合わせた実験結果などを発表する。



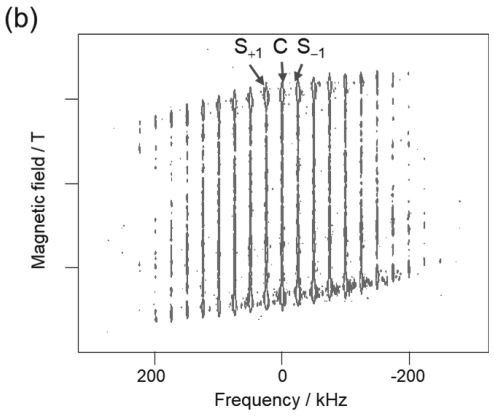


Figure 1. (a) rotor-synchronized QCPMG ^{79}Br MAS NMR spectrum, (b) experimental 2D field-stepwise-swept QCPMG-MAS NMR spectrum, observed at 76.00 MHz between 6.8 and 7.4 T.

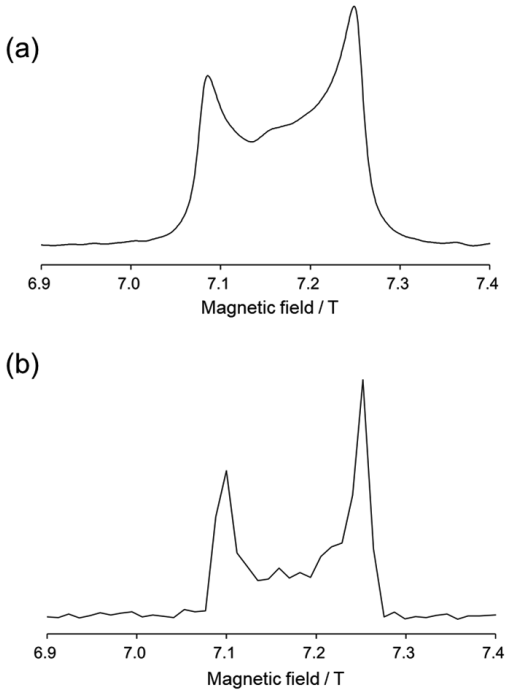


Figure 2. (a) Simulated field-swept stationary and (b) experimental field-stepwise-swept QCPMG-MAS ^{79}Br NMR spectra

L3-11

Electron and NMR Crystallography for Pharmaceutical applications [1]

○Yusuke Nishiyama[1, 2, 3]

1 JEOL RESONANCE Inc.,

2 RIKEN-JEOL Collaboration Center,

3 RIKEN-SPring8 Center

Determining the crystal structure of chemical compounds and biological molecules, by defining the precise spatial arrangements of their atoms in a crystalline state, is crucial to understanding their function and reactivity. In addition to crystalline structure, analyzing the hydrogen bonding strength between hydrogen and electronegative atoms is vital in applications such as medicine, engineering, materials science and pharmaceutical research. This is due to the influence of hydrogen bond strength on molecular function and inter- and intra-molecular packing stability. Elucidating the structure of molecular crystals at atomic resolution and defining the position of hydrogen atoms is critical to understanding their complex hydrogen-bonding networks.

Single-crystal X-ray diffraction (SCXRD) is a fundamental technique for determining the structure of large single crystals (>10-100 μm) and their hydrogen-bonding networks. However, smaller crystals rarely produce enough diffraction spots for structural elucidation. In addition, the hydrogen atoms are poorly located by SCXRD. So, although SSNMR provides chemical shift values and information on the proximity between hydrogen atoms and internuclear distance measurements (^{1}H-X [X=^{13}C, ^{15}N]), its combination with XRD and quantum computation is required to gain a comprehensive understanding of crystal structures and hydrogen-bonding networks of unknown compounds.

In this combined approach, termed NMR crystallography, XRD is used to determine the position of every atom in a crystal except hydrogen. Quantum computation then places the hydrogen atoms in rational positions to be verified using SSNMR, which directly measures nitrogen and carbon atoms and assures atomic assignments.

However, elucidation of the structure and hydrogen-bonding network are still challenging for active pharmaceutical ingredients (APIs) which forms nano- and microcrystals that are too small for SCXRD. Although electron diffraction (ED) or electron 3D crystallography are quite recently proved to be able to determine the structures of such nanocrystals owing to their strong scattering power, these techniques still lead to ambiguities in the hydrogen atom positions and misassignments of atoms with similar atomic numbers such as carbon, nitrogen, and oxygen. Here, we propose a technique combining electron diffraction (ED), solid-state NMR (SSNMR), and first-principles quantum calculations to overcome these limitations.

The rotational ED method is first used to determine the positions of the non-hydrogen atoms of L-histidine as a demonstration. A set of ED patterns under the uniaxial rotation was collected (Fig 1a). ED patterns from three different crystals were merged for structural solution. The initial structure was solved by the direct method. However, carbon, nitrogen and

Electron Diffraction, microED, NMR Crystallography

○にしやま　ゆうすけ

oxygen atoms are wrongly assigned and, in addition, hydrogen positions are poorly located (Fig 1b). Finally, four candidate structures were assigned with the chemical knowledge of L-histidine and ^{1}H-^{14}N correlation NMR spectra [2] (Fig 1c). Bond lengths were then determined by measuring ^{1}H-X dipolar interactions using 2D inversely proton-detected cross-polarization with variable contact time (invCP-VC), and structures were finally refined with these bond lengths using SSNMR. To identify the correct structure, gauge-including projected augmented wave (GIPAW) calculations and SSNMR were combined in the NMR crystallography workflow. GIPAW optimizes a crystal structure by relaxing the atomic positions to local minima of the energy surface in addition to providing NMR parameters, such as isotropic chemical shifts and quadrupolar couplings. The results showed the LH1 structure to be the most energetically favorable, a finding which was ratified by root-mean-square deviation (RMSD) calculations. (Fig 1d)

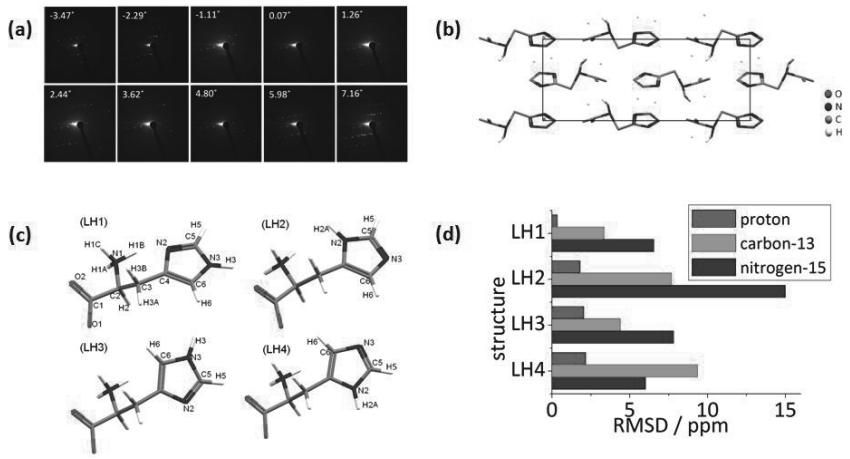


Fig 1. (a) A set of ED patterns of L-histidne at various rotation angles. (b) Initial structure solved by the direct method. (c) Four plausible candidates. (d) RMSD comparison of calculated and experimental NMR chemical shifts.

We have also successfully solved the unknown structure of cimetidine ($C_{10}H_{16}N_6S$) by the current method. Cimetidine is a histamine H2 receptor antagonist that inhibits stomach acid production, used primarily in treating heartburn and peptic ulcers. It is known to take various crystal forms (A, B, C and D/Z) and the monohydrates (M1, M2 and M3). The needle-like structure of CB in its crystal form makes it challenging to produce a single crystal for XRD analysis, and it often crystallizes in a mixed state with crystal form C, limiting PXRD use.

References:

[1] C. Guzmán-Afonso, Y.-l. Hong, H. Colaux, H. Iijima, A. Saitow, T. Fukumura, Y. Aoyama, S. Motoki, T. Oikawa, T. Yamazaki, K. Yonekura, Y. Nishiyama*, Understanding hydrogen-bonding structures of molecular crystals via electron and NMR nanocrystallography, Nat. Commun. 10 (2019) 3537. DOI: 10.1038/s41467-019-11469-2.

[2] T. Oikawa, M. Okumura, T. Kimura and Y. Nishiyama*, Solid-state NMR meets electron diffraction: Determination of crystalline polymorphs of small organic microcrystalline samples, Acta Cryst. C73 (2017) 219–228. DOI: 10.1107/S2053229617003084

L3-12

1.3GHz NMRに向けて：高温超電導体の超電導接合を用いた永久電流400MHz NMR

○山崎 俊夫[1]，柳澤 吉紀[1]，朴 任中[1]，末富 佑[2,1]，山岸 風摩[3,1]，高橋 雅人[1]，高尾 智明[3]，大木 康太郎[4]，山口 高史[4]，永石 竜起[4]，三好 康之[5]，吉川 正敏[5]，濵田 衞[5]，斉藤 一功[5]，北口 仁[6]，蜂谷 健一[7]，石井 佳誉[8,1]，前田 秀明[9,1]

1理化学研究所，2千葉大学大学院，3上智大学，4住友電気工業株式会社，5ジャパンスーパーコンダクタテクノロジー株式会社，6物質・材料研究機構，7株式会社JEOL RESONANCE，8東京工業大学，9科学技術振興機構

Towards 1.3 GHz NMR: A Persistent 400 MHz NMR with Superconducting Joints for High-Temperature Superconductors

○T. Yamazaki[1], Y. Yanagisawa[1], R.Piao[1], Y. Suetomi[2,1], K. Yamagishi[3,1], M. Takahashi[1], T. Takao[3], K. Ohki[4], T. Yamaguchi[4], T. Nagaishi[4], Y. Miyoshi[5], M. Yoshikawa[5], M. Hamada[5], K. Saito[5], H. Kitaguchi[6], K. Hachitani[7], Y. Ishii[8,1], and H. Maeda[9,1]

1 RIKEN, 2 Chiba University, 3 Sophia University, 4 Sumitomo Electric Industries, Ltd., 5 Japan Superconductor Technology, Inc., 6 National Institute for Materials Science, 7 JEOL RESONANCE Inc., 8 Tokyo Institute of Technology, 9 Japan Science and Technology Agency

The world's first persistent NMR installing superconducting joints between high-temperature superconductors (HTS) is presented. To develop a persistent-mode 1.3 GHz NMR, many superconducting joints between HTS must be installed. Towards this goal, we demonstrate the persistent operation of a 400 MHz LTS/HTS NMR with superconducting joints, in which HTS layers were atomically connected. The magnet provided a very stable magnetic field with a drift rate of +0.84 ppb/h without decay. Months later, the field became completely flat within the measurement accuracy. We succeeded in obtaining high-resolution NMR spectra, including 3D data for a protein.

Introduction: Superconducting joints of high-temperature superconductor (HTS) are a key technology to develop an NMR magnet that operates at ^{1}H NMR frequency higher than 1 GHz in a persistent mode (i.e. without a power supply). In 2015, we developed a 1.02 GHz NMR using HTS innermost coil, which was the world's first high-resolution GHz NMR system[(1)]. However, the magnet operated in the power-supply-driven mode because a practical technology to implement superconducting joint between HTSs or that between HTS and low-temperature superconductor (LTS) was not developed. In the end of 2017, we started a 10-year new project to develop a 1.3 GHz NMR operated in the persistent mode, as presented at the Ultra-high-field NMR Workshop at the last ENC[(2)].

高温超電導、超電導接続、永久電流

○やまざき としお、やなぎさわ よしのり、ぼく にんちゅう、すえとみ ゆう、やまぎし かざま、たかはし まさと、たかお ともあき、おおき こうたろう、やまぐち たかし、ながいし たつおき、みよし やすゆき、よしかわ まさとし、はまだ まもる、さいとう かずよし、きたぐち ひとし、はちたに けんいち、いしい よしたか、まえだ ひであき

To make the magnet reasonably compact, we have employed a design concept to generate major part of the magnetic field by HTS inner coils in combination with LTS outer coils. The biggest technical challenge is to operate the magnet in the persistent mode. Such a magnet requires several tens of *superconducting* joints between HTSs. Here, we demonstrate the first NMR equipped with superconducting joints between REBCO-type HTSs.

Experimental Procedure: We fabricated a REBCO inner coil and a persistent current switch (PCS), and connected them with intermediate grown superconducting (iGS) joints[(3)]. The joint, 1 cm in length, provided an outstanding high-current-transport property in magnetic fields, achieving a low joint resistance of $< 10^{-12}$ Ω. We installed the HTS inner coil in a LTS outer coil (**Fig. 1**) that operated individually in the persistent mode in a liquid He bath.

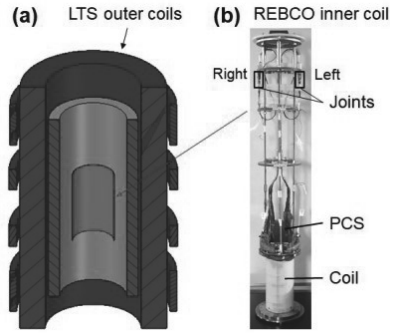


Fig. 1. Conceptual diagram of the persistent 400 MHz

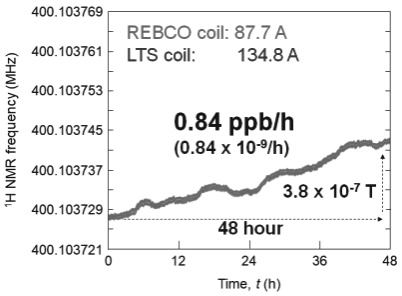


Fig. 2. A drift of the magnetic field at 400 MHz

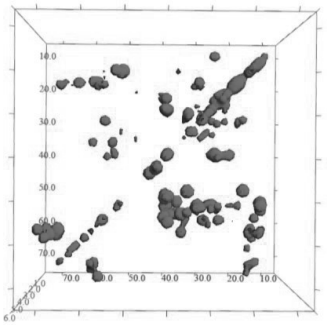


Fig. 3. 3D (H)CCH-TOCSY spectrum of ^{15}N,^{13}C-labeled 0.1 mM GB1 protein

Results and Discussion: A drift of the magnetic field showed excellent stability 1 month after the charge to 400 MHz (**Fig. 2**). The field did not "decay" and slightly increased with a drift rate of 0.84 ppb/h over 48 h. This positive drift was due to the relaxation of screening currents in the wide REBCO tape[(4)]. The field homogeneity after RT-shimming provided linewidth of < 0.5 Hz for chloroform sample (no sample spinning). With regular shim-tracking, the field was stably uniform for > 1 week. The 3D (H)CCH-TOCSY spectrum on GB1 (protein G - B1 domain, 56 amino-acid residues in D_2O PO_4 buffer). (**Fig. 3**) was essentially perfect and no field distortions or instability was observed. The increasing drift disappeared in additional several months. The magnetic field is flat within the measurement accuracy. These results show that the superconducting joints for HTSs fully functioned in a real high-resolution NMR system, which gives a promising prospect of a persistent 1.3 GHz NMR. Other interesting findings will be discussed.

References: (1) Hashi et al., *J. Mag. Res.* **256**, 30-33, 2015. (2) Maeda et al., presented in ENC2018. (3) Ohki et al, *Super. Sci. Tech.* **30**, 115017, 2017. (4) Maeda et al., *eMagRes* **5**, 1109-1120, 2016.
Acknowledgements: The present project is supported by the JST Mirai-Program Grant Number JPMJMI17A2.

ポスター発表要旨
(若手ポスター賞)

Poster Abstracts
(Young Scientists Poster Awards)

YP1

カルモジュリンのペプチド結合能を応用した組換えペプチド安定化大量発現法の開発と NMR 解析

○谷 昊[1]，大沼 幸暉[1]，石田 博昭[2]，熊木 康裕[1]，塚本 卓[1,3]，菊川 峰志[1,3]，出村 誠[1,3]，Vogel Hans J.[2]，相沢 智康[1,3]
1北海道大学 大学院生命科学院
2カルガリー大学 生命科学学科
3北海道大学 国際連携研究教育局

Development of the overexpression system of recombinant small peptides for NMR research used calmodulin for the stabilization

Gu Hao[1], Onuma Koki[1], Ishida Hiroaki[2], Kumaki Yasuhiro[1], Tsukamoto Takashi[1,3], Kikukawa Takashi[1,3], Demura Makoto[1,3], Vogel Hans J.[2], Aizawa Tomoyasu[1,3]
1 Graduate School of Life Science, Hokkaido University
2 Department of Biological Sciences, University of Calgary
3 Global Institution for Collaborative Research and Education, Hokkaido University

Recently, kinds of cationic peptides with powerful antimicrobial activity have become an impressive subject for researchers around the world called antimicrobial peptides (AMPs). To support more detail research about AMPs, a high-yield and high-activity method to produce stable isotopic labelled AMPs is needed. The normal recombinant expression system by *Escherichia coli* (*E. coli*) has outcomes on the production of various AMPs, as degradation by proteases from hosts and toxicity from production to hosts. To solve these problems and to establish a relatively general overexpression system, in previous work, a novel fusion expression system applying calmodulin (CaM), which has a high affinity for AMPs as a fusion partner, was invented [1]. Thanks to it, most stable labelled AMPs can be produced on a large scale except a kind of AMPs derived from chicken, fowlicidin-1 (Fow). In this research, we used many strategies to gain a large amount of intact and active Fow with the stable isotopic label by a novel CaM overexpression system for NMR research.

Changing the cleavage site to avoid undesired glycine on N-terminal

In the previous system, DNA of target AMPs was introduced into a vector as a His-tagged CaM fusion protein under control of the T7lac promoter and *E. coli* strain BL21(DE3) was transformed with it. In addition, for purification, a Tobacco Etch Virus (TEV) cleavage site was used to remove fusion CaM. However, it led to an undesirable N-terminal glycine probably influencing the characteristic of Fow. To get rid of it, I changed the TEV site to Enterokinase (EK) cleavage site. The latter had no such worries (**Fig. 1** CaM-EK-Fow).

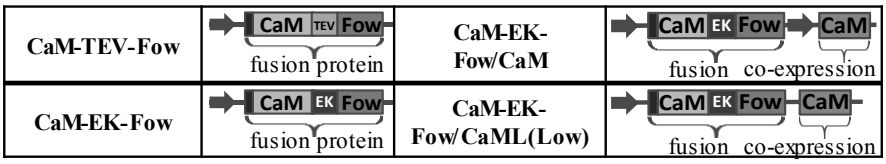


Fig. 1 Constructions utilized in this research

antimicrobial peptides、calmodulin、stable isotopic label

○こく こう，おおぬま こうき，いしだ ひろあき，くまき やすひろ，つかもと たかし，きくかわ たかし，でむら まこと，ぼげる はんす じぇ，あいざわ ともやす

Introducing more CaM as a co-expression partner to reduce the toxicity of Fow

We speculated that the source of toxicity was from free Fow which could not be covered by CaM. On the one hand, the fusion CaM has the possibility to bind other peptides or proteins of hosts. On the other hand, the cleavage site of fusion may be digested by proteases of hosts, which releases free Fow to exert its toxicity. To ensure all Fow can be covered totally by CaM, more CaM as a co-expression partner was introduced into CaM-EK-Fow (**Fig. 1** CaM-EK-Fow/CaM). Consequently, in the case of the growth curve (**Fig. 2**), CaM-EK-Fow/CaM increased smoothly after induction, which revealed the co-expression CaM displayed a stronger ability to restrict the toxicity of Fow. Therefore, the band of fusion of CaM-EK-Fow/CaM was much higher than CaM-EK-Fow.

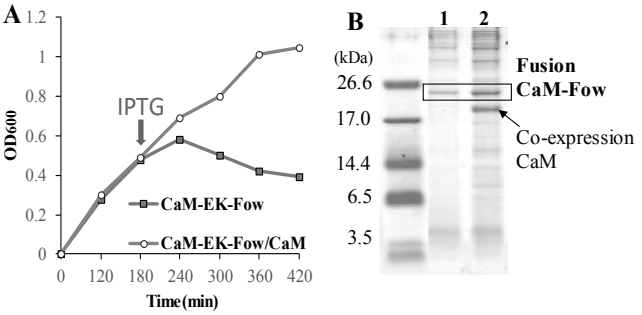


Fig. 2 (A) Growth curve, (B) Tricine-SDS-PAGE: Lane1: CaM-EK-Fow, Lane2: CaM-EK-Fow/CaM

Optimization on co-expression system of CaM to increase the yield

Furthermore, the amount of ribosome of *E. coli* cell is limited. In order to increase the yield of the fusion part, we tried to recede the expression of co-expression CaM. We removed the second T7lac promoter (**Fig. 1** CaM-EK-Fow/CaML). Therefore, the CaM-EK-Fow/CaML group was able to control the toxicity of Fow possessing an uptrend growth curve (**Fig. 3**). And the scale of co-expression CaM decreased, accompanied by an increase of fusion protein.

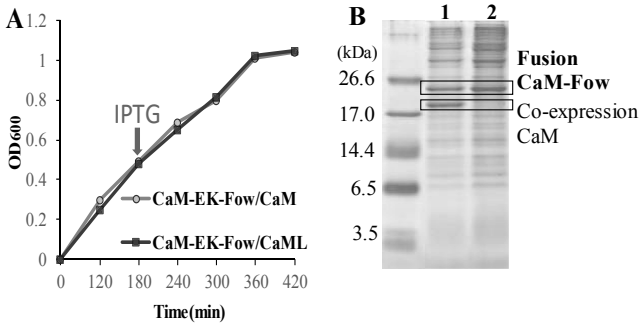


Fig. 3 (A) Growth curve, (B) Tricine-SDS-PAGE: Lane1: CaM-EK-Fow/CaM, Lane2: CaM-EK-Fow/CaML

After purification by immobilized metal affinity chromatography (IMAC), EK digestion and reverse-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC), 2.5 mg Fow was obtained from 1L LB medium. It was almost 25 times larger than previous work [1]. For further structure research, enough stable isotope-labelled Fow was produced to support NMR research. From 1L M9 medium, 1.8 mg ^{15}N labeled Fow and 1.3 mg ^{15}N, ^{13}C labeled Fow was obtained. Figure 4 shows ^{1}H-^{15}N HSQC NMR spectra measured in different environments.

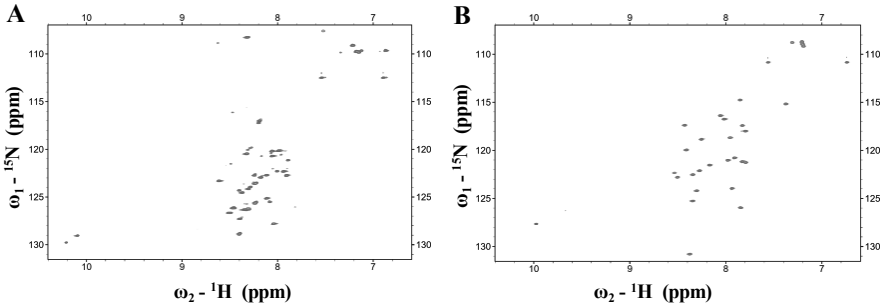


Fig. 4 (A) ^{1}H-^{15}N HSQC in aqueous environment, (B) ^{1}H-^{15}N HSQC in 30% TFE membrane mimic environment

【References】

[1] Ishida *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 2016, 138, 11318−11326

YP2

免疫抑制剤結合タンパク質FKBP12の薬剤認識における動的構造解析

○平河卓也[1]，岩川直都[1]，森本大智[1]，菅瀬謙治[1]，白川昌宏[1]
[1]京都大学大学院・工学研究科

Structural dynamic analysis of FKBP12 in the recognition of immunosuppressive drug

○Takuya Hirakawa[1], Naoto Iwakawa[1], Daichi Morimoto[1], Kenji Sugase[1], and Masahiro Shirakawa[1]
[1]*Graduate School of Engineering, Kyoto University*

In the drug recognition, proteins are in the equilibrium between the free and bound states. Relaxation dispersion NMR spectroscopy is the method of choice to detect and quantify such conformational exchange dynamics on a timescale from microseconds to milliseconds in which proteins bind to drugs. To date, the drug recognition has been well-studied in the dilute conditions. By contrast, the intracellular environment where drugs are expected to function is highly crowded with macromolecules and the crowded environment can affect physical and chemical properties of the drug binding. In this study, we quantitatively analyzed the effects of crowded environment on the interaction between the immunosuppressant pimecrolimus and its target protein FKBP12 by using R_2 relaxation dispersion NMR. There was no significant difference in k_{off} (dissociation rate constant) for the binding of pimecrolimus to FKBP12 between the dilute and crowded conditions; on the other hand, k_{on} (association rate constant) decreased in the crowded condition.

【緒言】

タンパク質と薬剤の結合は一般的に可逆的であり、タンパク質は薬剤結合型と遊離型の平衡状態となる。NMR緩和分散法を用いると、このような二分子間の相互作用に伴う構造変化を定量的に解析できる。本研究で用いた緩和分散法の一つであるR_2 relaxation dispersion法は、リガンド結合による構造変化の速度領域であるマイクロ秒―ミリ秒オーダーの構造変化を検出する測定法であり、存在比がわずか１％の状態でも構造情報を得ることができる。

これまでタンパク質の動的構造解析の研究の多くは希薄条件下である試験管内で行われている。しかし、実際にタンパク質が存在する生細胞内は数百g/Lもの生体高分子が存在しており、試験管内と比べ非常に混雑している。このような混雑環境が細胞内の物理化学現象へ影響を与えるのではないかと指摘されているが、定量的な知見は乏しい。本研究では、タンパク質クラウダーを用いることで細胞内混雑環境を模倣し、混雑環境が免疫抑制剤であるピメクロリムスとその標的タンパク質であるFKBP12の相互作用に与える影響を定量的に解析した。

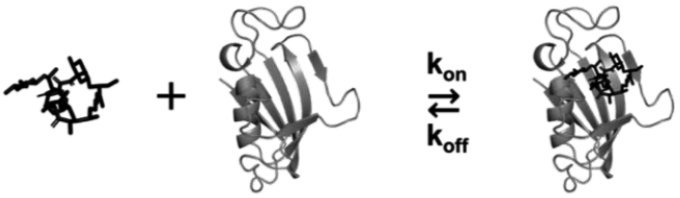


Fig. 1 Schematic diagram of the equilibrium between free and bound states of FKBP12.

FKBP12、薬剤―タンパク質間相互作用、細胞内混雑環境

○ひらかわたくや、いわかわなおと、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】

ピメクロリムスとFKBP12の相互作用解析

^{15}N標識したFKBP12にピメクロリムスを滴下し、^{1}H-^{15}N HSQC測定を行なった。ピメクロリムスを加えることで、多くの残基において、slow exchange regimeで化学シフトが変化した(Fig. 2a)。変化のあった残基はFKBP12が他の免疫抑制剤と相互作用する結合ポケットに集中していた(Fig. 2b)。従って、ピメクロリムスも他の免疫抑制剤と同じ部位に結合することがわかった。以下、これらの中でも特に化学シフト変化が大きいアミノ酸残基に着目し、部位特異的な解析を行った。

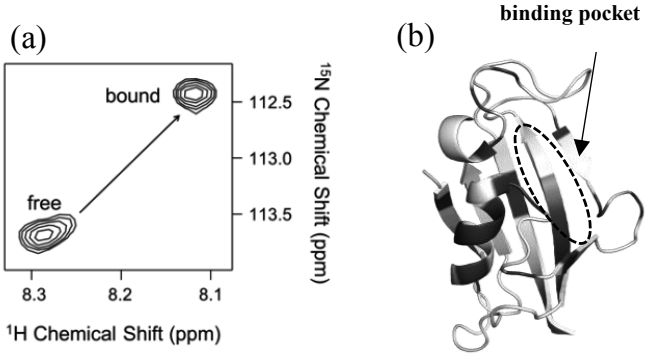


Fig. 2 Interaction between FKBP12 and pimecrolimus

混雑環境が薬剤―タンパク質相互作用に及ぼす影響

まず、通常の緩衝溶液中（希薄条件）およびBSA（牛血清アルブミン）を高濃度で共存させた混雑環境下において滴定実験を行った。薬剤結合型と遊離型のピーク強度比からそれぞれの濃度比を算出し、そこから解離定数K_dを定量した。次に、希薄条件および混雑環境下において、^{15}N R_2緩和分散測定を行うことでk_{on}'(=[pimecrolimus]k_{on})とk_{off}を部位特異的に定量した。なお、k_{on}については、NMR滴定実験で定量したK_dとR_2緩和分散法で求めたk_{off}の値を用いて、$K_d = k_{off}/k_{on}$の関係より算出した。

希薄条件および混雑環境下において、NMR滴定実験とR_2緩和分散法により算出した各パラメータを比較すると、混雑環境下でK_dが増大し、k_{on}が減少していた(Table 1)。一般的に混雑環境下では、排除体積効果により分子同士の複合体形成が熱力学的に安定化すると考えられている[1]。タンパク質の薬剤結合においても複合体形成が熱力学的に安定化し、K_dが減少することが予想されたが、それに反する結果となった。k_{on}が約半分に減少していることから、熱力学的な排除体積効果よりも、k_{on}を減少させる速度論的な効果の方がより支配的で、その結果 K_d (=k_{off}/k_{on})が増大したと考えられる。このk_{on}を減少させる速度論的な効果について、本研究では「混み合い分子がタンパク質の結合部位に非特異的に相互作用することにより、薬剤との結合を阻害する」という仮説を立てた（Fig. 3）。実際、BSAとFKBP12との非特異的相互作用は、BSA存在下におけるFKBP12のNMRシグナルの広幅化としてすでに観測している。

Table 1. Parameters with and without BSA

	without BSA	With BSA
K_D (μM)	19 ± 5	33 ± 9
k_{on} (10^5s^{-1}M^{-1})	4 ± 1	2.5 ± 0.7
k_{off} (s^{-1})	7.8 ± 0.4	8.3 ± 0.8

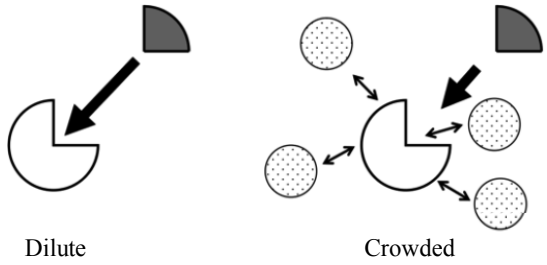


Fig. 3 Kinetic effects by crowded environment

参考文献

1. Zhou HX *et al.* Macromolecular crowding and confinement: biochemical, biophysical, and potential physiological consequences. *Annu Rev Biophys,* 2008.

YP3

免疫応答に関与するHOIL-1Lによる直鎖型ダイユビキチンの認識機構

○石井公貴[1]，ヴァリンダエリック[2]，岩川直都[1]，森本大智[1]，菅瀬謙治[1]，
白川昌宏[1]
[1]京都大学大学院　工学研究科
[2]京都大学大学院　医学研究科

Recognition mechanism of linear di-ubiquitin by HOIL-1L in immune responses

○Naoki Ishii [1], Erik Walinda[2], Naoto Iwakawa[1], Daichi Morimoto[1], Kenji Sugase[1],
and Masahiro Shirakawa[1]
[1]*Graduate School of Engineering, Kyoto University.*
[2]*Graduate School of Medicine, Kyoto University.*

Nuclear factor-κB (NF-κB) activation is crucial for immunity and inflammation. In the activation pathway, linear polyubiquitin chains conjugated by the linear ubiquitin chain assembly complex (LUBAC) are specifically recognized by Npl4 zinc finger (NZF) domain of HOIL-1L and the specific recognition is critical for the NF-κB activation. Recently, the crystal structure of the NZF domain/linear di-ubiquitin (M1-Ub_2) complex has been reported; however, to understand the recognition mechanism in detail, it is necessary to obtain structural properties of the NZF domain in solution. In this study, we determined the solution structure of the free NZF domain by using NOE and RDC restraints. Also, the relaxation dispersion experiments showed that Distal-Ub of M1-Ub_2 primarily binds the NZF domain and Proximal-Ub of M1-Ub_2 subsequently binds the NZF domain.

【緒言】

ユビキチンと呼ばれるタンパク質は、単量体同士が結合することでポリユビキチンを形成する。さらに、ポリユビキチンは単量体間の結合様式によって8種類に分類され、その種類によってタンパク質分解やDNA修復、シグナル伝達など、関わる生理機能が異なる。その中でも直鎖型ポリユビキチンは、E3酵素(LUBAC)のサブユニットであるHOIL-1LのNZFドメインと特異的に結合することで、NF-κBという転写因子を活性化させる。NF-κBは免疫応答やアポトーシスなどの多様な生命現象に関与している転写因子であり、その活性の異常が生じると、自己免疫疾患やガンをはじめとする様々な疾患が起こることが知られており、創薬のターゲットとして注目されている。これまでにX線結晶構造解析によって、NZFドメインによる直鎖型ダイユビキチン(以後、M1-Ub_2と略す)による複合体の結晶構造が報告され、M1-Ub_2は、2つのユビキチンユニット(Distal-Ub

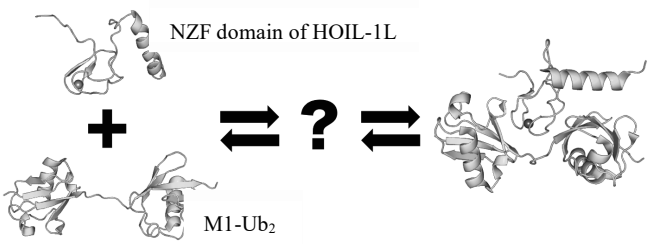


Fig.1 Specific recognition mechanism between the NZF domain and M1-Ub_2.

NF-κB、直鎖型ユビキチン鎖、タンパク質間相互作用

○いしいなおき、ヴぁりんだえりっく、いわかわなおと、もりもとだいち、すがせけんじ、しらかわまさひろ

及びProximal-Ub)を用いてNZFドメインと結合することが明らかになった(Sato et al, 2011)。しかし、その分子認識の詳細な過程は明らかになっていない。そこで本研究では溶液中でのNZFドメインによるM1-Ub_2の認識機構を原子レベルで解明することを目指す(Fig.1)。溶液NMR法を用いて遊離型NZFドメインのNMRシグナルの帰属を行い、各オーバーハウザー効果(NOE)ならびに残余双極子カップリング(RDC)データにより溶液構造を決定した。また、NMR緩和分散法の結果から、M1-Ub_2のユビキチンユニットごとにNZFドメインとの結合選択性が異なることが示唆された。

【実験・結果】

(1)遊離型NZFドメインの溶液構造解析

はじめに、連鎖帰属法により遊離型NZFドメインのNMRシグナルの帰属を行い、その帰属結果とNOE及びRDCから得られた距離・角度制限情報を元に、CYANAを用いて、遊離型NZFドメインの構造決定を行なった。その結果、Proximal-Ubとの結合に関与するαヘリックス領域が、NZFドメインとの結合によって構造変化を起こすことが示唆された(Fig.2)。

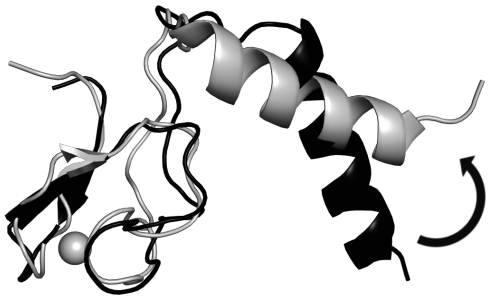


Fig.2 Conformational change from free (black) to bound (gray) form of the NZF domain.

(2)M1-Ub_2とNZFドメインの結合の速度論的解析

次に、NMR緩和分散法によって、M1-Ub_2とNZFドメインの結合を速度論的に解析した(Fig.3)。等温滴定型カロリメトリー(ITC)によって決定した解離定数を元にNMR緩和分散法によって得られたパラメータを解析すると、Distal-Ubの方がProximal-Ubよりも解離速度定数が小さく、NZFドメインとより選択的に結合することが示唆された。したがって、NZFドメインは結合選択性を利用することで、同一のタンパク質から成る2つのユビキチンユニットを区別しながら、M1-Ub_2を認識していると考えられる。

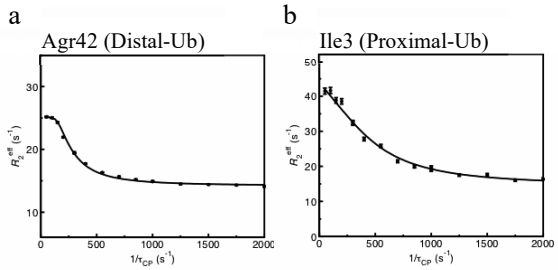


Fig.3 ^{15}N R_2 relaxation dispersion profiles for (a) Arg42 of Distal-Ub and (b) Ile3 of Proximal-Ub.

(3)M1-Ub_2とNZFドメインの特異的認識モデル

今回の結果から、以下のような認識モデルを提案する。まず、M1-Ub_2のDistal-UbのみがNZFドメインと結合する過渡的な中間構造を形成する。そして、NZFドメインの構造変化に伴い、Proximal-UbがNZFドメインと結合し、最終的な結合状態に至ると考える(Fig.4)。

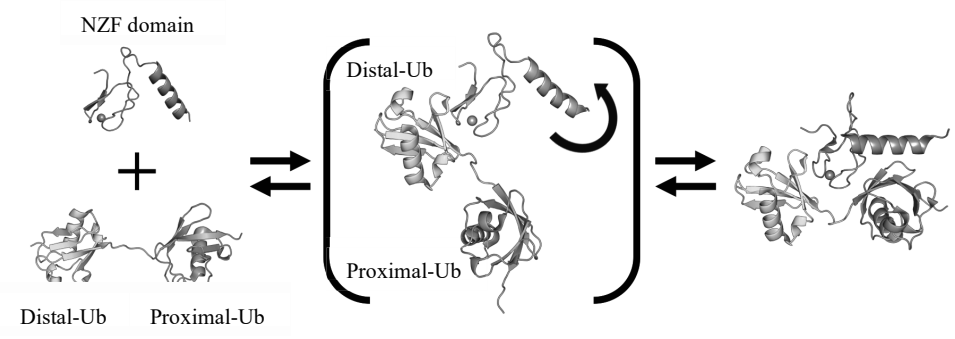


Fig.4 Recognition mechanism between M1-Ub_2 and NZF domain.

Reference

Sato, Y. *et al.* Specific recognition of linear ubiquitin chains by the Npl4 zinc finger (NZF) domain of the HOIL-1L subunit of the linear ubiquitin chain assembly complex. PNAS. (2011)

YP4

Structural Basis for the Concerted Action of Trigger Factor and ClpX Chaperones in Protein Unwinding

○Haojie Zhu[1], Tomohide Saio[1, 2], WalidA Houry[3], Koichiro Ishimori[1, 2]

1.Graduate School of Chemical Sciences and Engineering, Hokkaido University,

2.Department of Chemistry, Faculty of Science, Hokkaido University,

3. Department of Biochemistry University of Toronto

The trigger factor (TF) chaperone plays key roles in protein folding, but it also promotes the ClpX-mediated protein unfolding. To understand the mechanism of protein unwinding as mediated by TF and ClpX, we used NMR to monitor the interactions between TF and ClpX. Our data indicated that TF and ClpX use multiple sites for the interaction and the ClpX-binding sites on TF overlap with the substrates-binding sites, which allows us to propose a possible substrate-handover model of the TF-ClpX concerted action in protein unwinding.

[Background]

In *Escherichia coli* (*E.coli*), a molecular chaperone, TF, consisting of three domains (**Fig. 1A**), ribosome-binding domain (TF^{RBD}), proline peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase domain (TF^{PPD}), and a discontinuous substrate-binding domain (TF^{SBD}), is a ribosome-associated chaperone and plays important roles in the protein synthesis, facilitating folding and translocation of the newly-synthesized proteins [1]. On the other hand, misfolded or denatured proteins are unfolded by an ATP-dependent chaperone ClpX and, then degraded by ClpP protease [2]. ClpX consists of an ATPases associated with diverse cellular activities domain ($ClpX^{AAA}$) and a zinc-binding domain ($ClpX^{ZBD}$). The previous crystallographic studies [2, 3] have revealed that ClpX forms to a hexamer whose four subunits are in the nucleotide-bound states and the other two are in the nucleotide-free states (**Fig. 1B**). The conformational changes during the cycle of ATP binding, hydrolysis and nucleotide release contribute to unwinding the substrate protein [2]. Recently, the unfoldase activity of ClpX is found to be modified by the direct interactions with TF, whereas the mechanism of protein unfolding mediated by TF and ClpX remains unknown. Herein we focus on the interaction between TF and ClpX to unveil the mechanism of protein unwinding mediated by the concerted action of TF and ClpX.

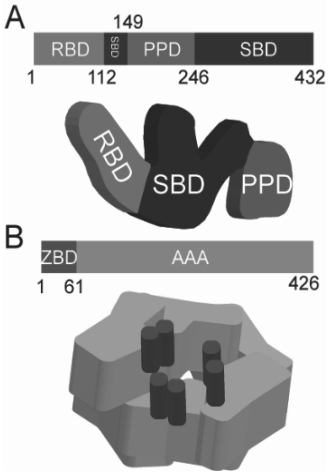


Fig. 1 A) Domain architecture of TF. B) Domain architecture of ClpX. Four nucleotide-bound $ClpX^{AAA}$ subunits are colored as orange. Two nucleotide-free $ClpX^{AAA}$ subunits are colored as gray.

Molecular Chaperone, trigger factor, ClpX, interaction, NMR
シュコウケツ　サイオトモヒデ　Walid A. Houry　イシモリコウイチロウ

[Experimental Procedure]

We exploited solution NMR to investigate the interaction between TF and ClpX. Due to the large molecular weight of the system, we used methyl-selective isotope-labeling in which the methyl groups of Ile, Leu, Val, Met, and Ala are specifically protonated and ^{13}C-labeled in the deuterated background [4]. Then a series of NMR titration experiments were performed, where ClpX or its domains, ClpX^{AAA} and ClpX^{ZBD}, were titrated into isotopically labeled TF domains, TF^{PPDSBD} and TF^{RBD}. To illustrate the interaction of the TF-ClpX complex, the structural information was collected by a series of NOE experiments, such as ^{15}N- or ^{13}C-NOSEY and HMQC-NOESY-HMQC.

[Results and Discussion]

Our NMR titration experiments showed that some signals of TF^{PPDSBD} or ClpX^{ZBD} were significantly perturbed (Fig. **2A** and **B**), indicating the specific interaction between TF and ClpX. The mapping of the perturbed resonances on TF or ClpX^{ZBD} indicated that TF and ClpX use multiple sites for the interaction (Fig. **2C** and **D**). All of the three domains of TF, TF^{PPD}, TF^{SBD}, and TF^{RBD}, and both of the two domains of ClpX, ClpX^{ZBD} and ClpX^{AAA}, are involved in the interaction sites. The binding sites on both TF^{PPDSBD} and ClpX^{ZBD} are composed of hydrophobic residues, suggesting that the TF-ClpX complex is mainly mediated by hydrophobic interactions. The preliminary structure of the TF-ClpX complex showed that the ClpX-binding sites on TF overlap with the substrate-binding sites for the recognition of the unfolded substrate proteins [5], which implies that TF and ClpX compete for the substrate-binding sites and thus TF releases the substrate upon binding to ClpX. Thus, these structural data led us to establish a possible model of protein unwinding by concerted action of TF-ClpX complex, which will be discussed in detail in the presentation.

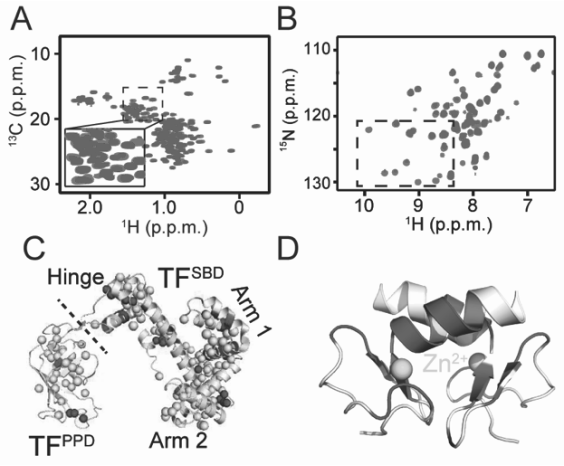


Fig. 2 A) The spectra of TF^{PPDSBD} in the absence (green) and presence of ClpX^{AAA} (red). B) The spectra of ClpX^{ZBD} in the absence (green) and presence of TF^{PPDSBD} (red). C) The mapping of the perturbed resonances onTF^{PPDSBD} by the addition of ClpX^{AAA} (red). The methyl groups are shown as spheres. D) The mapping of the perturbed resonances on ClpX^{ZBD} by the addition of TF^{PPDSBD} (red). Zn^{2+} ions are shown as yellow spheres.

References

[1] Hoffmann, et al., *Molecular Cell Research*, 1803.6, 650-661 (2010), [2] Glynn, et al., *Cell*, 139.4, 744-756 (2009), [3] Stinson, et al., *Cell*, 153.3, 628-639 (2013), [4] Tugarinov, et al., *Nature protocols*, 1.2, 749 (2006), [5] Saio, et al., *Science*, 344, 1250494 (2014).

YP5

VAP結合蛋白質群が持つVAP認識モチーフのNMR解析

○平岡万里菜[1]，古板恭子[2]，藤原敏道[2]，児嶋長次郎[1,2]
1横浜国大・理工
2阪大・蛋白研

NMR analysis of VAP recognition motifs of VAP-binding proteins

○Marina Hiraoka [1], Kyoko Furuita[2], Toshimichi Fujiwara[2], Chojiro Kojima[1,2]
1Graduate School of Engineering Science, Yokohama National University
2Institute for Protein Research, Osaka University

VAP protein is known as a scaffold protein that localizes in the endoplasmic reticulum and interacts with lipid transport proteins. VAP-binding proteins often have a region with many acidic residues in the vicinity of two phenylalanine residues called FFAT motifs. A sequence similar to the FFAT region is also present in bacteria and viruses, and it has been shown that it interacts with VAP to regulate viral membrane-endoplasmic reticulum membrane contact sites and regulate intracellular virus growth. In order to elucidate the structural basis of the interaction between various proteins with FFAT-like regions and VAP, we performed comprehensive interaction analysis using NMR. The details of the interaction will be reported in the presentation.

【背景と目的】

VAP蛋白質は小胞体に局在し、様々な細胞小器官局在蛋白質と相互作用することによって、脂質輸送、膜輸送、神経伝達物質の放出、およびオートファジーの調節等に関係することが報告されている[1][2][3]。多くのVAP結合蛋白質はFFATモチーフという2つのフェニルアラニン残基の近傍に複数の酸性残基を持つ領域を用いてVAPと相互作用している。典型的なFFATモチーフは「EFFDAxE」というコンセンサス配列を持ち、VAPとの相互作用様式がよく知られている[4]。しかし近年、これとは配列が異なる非標準FFATモチーフもVAPと相互作用することが明らかとなってきた。非標準FFATモチーフは細菌やウイルスにも存在し、VAPとの相互作用によって細菌膜-小胞体膜接部位の形成や細胞内ウイルス増殖の調節に関係することが明らかとなっている[5][6]。しかし、VAPと非標準FFATモチーフとの相互作用の詳細はまだ解明されていない。我々は非標準FFATモチーフを持つ様々な蛋白質群とVAPとの相互作用の構造的基盤を解明するため、溶液NMRを用いた網羅的な相互作用解析を行った。

【方法】

① VAPとクラミジア菌蛋白質IncV、マウスノロウイルス蛋白質NS1/2との相互作用解析

大腸菌発現系を用いて^{15}Nラベルしたヒト VAP(h-VAP)とマウスVAP(m-VAP)、非標識のFFATモチーフを含むIncVとNS1/2由来のペプチド(IncV(250-283)及びNS1/2(34-67))をそれぞれ調製した。h-VAPとIncVペプチド、m-VAPとNS1/2ペプチドを相互作用させ、溶液NMRを用いてVAPのシグナル解析を行った。^{15}NラベルしたNS1/2ペプチドと非標識m-VAPも調製し、溶液NMRを用いてNS1/2のシグナル解析も行った。

VAP、FFATモチーフ、蛋白質

○ひらおか　まりな，ふるいた　きょうこ，ふじわら　としみち，こじま　ちょうじろう

②VAPとその他蛋白質群との相互作用解析

大腸菌発現系を用いて^{15}Nラベルしたh-VAPを調製し、非標準FFATモチーフを含む非標識の8つのペプチド（オートファジー蛋白質FIP200、ULK1、生体膜に存在する電位依存性K+チャネルKv2.1、Kv2.2、レトロマーサブユニットSNX2.1、SNX2.2、ミトコンドリア蛋白質PTPIP51.1、PTPIP51.2）（GenScript）とそれぞれ相互作用させ、溶液NMRを用いてh-VAPのシグナル解析を行った。

【結果と考察】

h-VAPとIncVについて、NMRの信号変化はあまりなかったがピーク強度比が0.8以下になる部位が数か所あり、それらの部位とVAPのFFAT結合部位だと考えられている部位はほぼ一致した。しかしFFATモチーフ結合部位の裏側にもピーク強度変化があり、VAPの他の部位にもIncVが結合している可能性がある。

m-VAPとNS1/2について、NMRの信号が消失・変化したり、ピーク強度比が0.5以下になる部位が数か所あり、h-VAPとIncVよりも変化が大きかった。それらの部位にはVAPのFFAT結合部位だと考えられている部位は含まれているが、こちらもFFATモチーフ結合部位の裏側や周辺にも信号変化が見られ、複数箇所にNS1/2が結合している可能性がある。

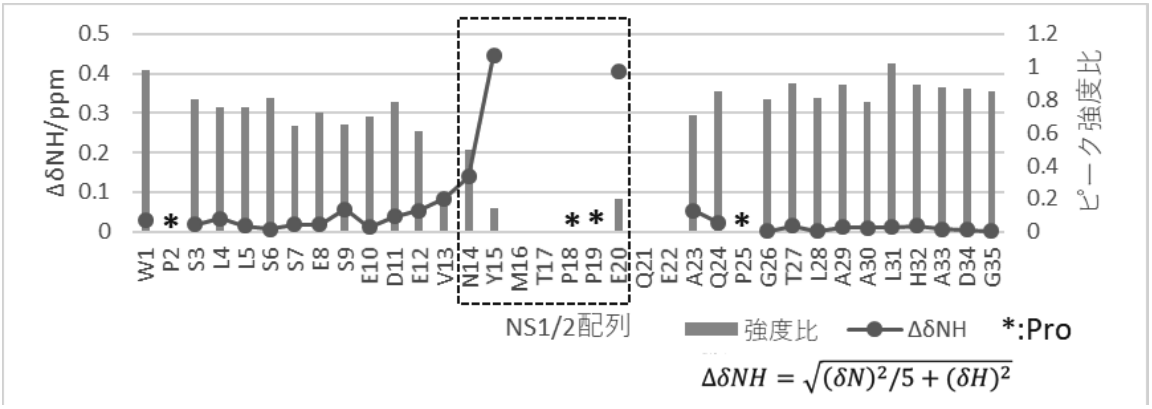


Fig.1 m-VAPとの相互作用によるNS1/2の化学シフト変化

Fig.1はm-VAPとNS1/2の相互作用に関して、NS1/2側から見た化学シフト変化とピーク強度変化をアミノ酸配列ごとに示したものである。点線で囲まれた部分がNS1/2のFFAT様モチーフとされている部分である。信号消失部位がM16、T17、Q21、E22、信号変化が0.15 ppm以上である部位がY15、E20、0.10 ppm以上0.15未満である部位がN14、ピーク強度比が0.5以下である部位がV13、N14、Y15、E20であった。これらの部位はFFAT様モチーフとされている部位およびそれら周辺とおよそ一致する。よって、NS1/2はFFAT様モチーフでm-VAPと相互作用していると考えられる。この結果は、構造を持つ領域を含むより長いNS1/2（NS1/2（28-114））で報告された結果[6]と一致しており、今回調製したペプチドはNS1/2タンパク質中と同様の様式でVAPと結合していると考えられる。

その他のFFAT様モチーフを持つ蛋白質群とh-VAPとの相互作用についてもこれらのようなFFATモチーフ結合部位での信号変化を観測できた。これらの詳細な解析結果については本発表で議論したい。

References

[1]Sugiki, et al, J. Biol. Chem, 2012, 33706-33718[2]Ben Johnson, et al, PNAs, 2018, vol.115 no.31 E7331-E7340[3]Rui Dong, et al, Cell, 2016, 166 408-423[4]Kyoko furuita, et al, J. Biol. Chem, 2010, 12961-12970[5]Rebecca Stanhope, et al, PNAs, 2017, vol.114 no.45 12039-12044[6]Broc T. McCune, et al, mBio, 2017, vol.8 Issue4 e00668-17

YP6

プロテイン・ドロップレットのＮＭＲ解析

○吉岡 賢一[1]，長谷 颯士[2]，政喜 優[3]，青木 大将[2,4]，吉村 優一[1]，
梅原 崇史[4]，木村 英昭[5]，楯 真一[1,2,6]
[1]広島大学大学院・統合生命科学研究科
[2]広島大学大学院・理学研究科・数理分子生命理学専攻
[3]広島大学・理学部化学科
[4]理化学研究所・生命機能科学研究センター
[5]ブルカージャパン株式会社
[6]広島大学クロマチン動態数理研究拠点

NMR analysis of protein droplets

○Ken-ichi Yoshioka[1], Hayato Nagatani[2], Yu Masaki[3], Daisuke Aoki[2,4], Yuichi Yoshimura[1], Takashi Umehara[4], Hideaki Kimura[5], Shin-ichi Tate[1,2,6]
[1]*Graduate School of Integrated Sciences for Life, Hiroshima University*
[2]*Department of Mathematical and Life Sciences, Graduate School of Science, Hiroshima University*
[3]*Department of Chemistry, School of Science, Hiroshima University*
[4]*Center for Biosystems Dynamics Research, RIKEN*
[5]*Bruker Japan*
[6]*RcMcD, Hiroshima University*

Intrinsically disordered regions (IDRs) constitute 50% segments in the proteins expressed in mammalian cells, which achieve the functions that have never been found in the folded proteins ever. Some IDRs have found to gain the physicochemical property to show the liquid-liquid phase transition to mediate various types of granule formations within the living cells. T-cell Intracellular Antigen-1 (TIA-1) is the major component in the stress granules: the IDR in TIA-1 is revealed to have the central role in the granule formation. The isolated IDR in TIA-1 *per se* forms a hydrogel in the test tube, which is also named as ‘protein droplet.’ This work aims to explore how TIA-1 form a droplet through the IDR interactions by the combinatorial use of liquid and solid-state NMRs. In particular, this poster presents the basic physicochemical properties of the droplets formed in different chemical conditions and the NMR spectral characteristics of each of the droplet.

細胞は外部からの刺激に応じて適時的に膜を持たない様々な細胞内小器官を形成する．よく知られた膜を持たない細胞内小器官としてストレス顆粒（Stress Granules, SGs）がある．細胞毒あるいは熱などの細胞ストレス刺激に応答してSGは形成される．しかし，ストレス刺激が解消されると，SGは直ちに消滅するという可逆性をもつ．またSGは細胞内でも液性を保っており，SGどうしが細胞内で融合することも観測される[1]．この状態をドロップレットと呼ぶ．SGが細胞内に長時間滞留すると，SGは徐々に液性を失いドロップレットからハイドロゲル状態へと移行する．

protein droplet, phase separation, 13C-detection

○よしおか けんいち，ながたに はやと，まさき ゆう，あおき だいすけ，よしむら ゆういち，うめはら たかし，きむら ひであき，たて しんいち

SGの形成・消滅は、顆粒を構成するタンパク質に含まれる天然変性領域（Intrinsically disordered region, IDR）を介して行われる[2]．本研究では，SGの主要構成タンパク質であるTIA-1を対象とする．TIA-1は，3つのRNA結合ドメイン(RRM)とC末側に長いLow Complexity Sequence (LCS)と呼ばれるIDRをもつ.

3番目のRNA結合ドメインとLCSのみを含むフラグメント（RRM3-LCS）を用いて，タンパク質濃度・イオン強度に応じたTIA-1フラグメントの状態変化を観測した(Fig.1)．この実験から，イオン強度とタンパク質濃度により，ドロップレット状態からハイドロゲル状態までの様々な試料が調製できることを確認した（Fig.2））．

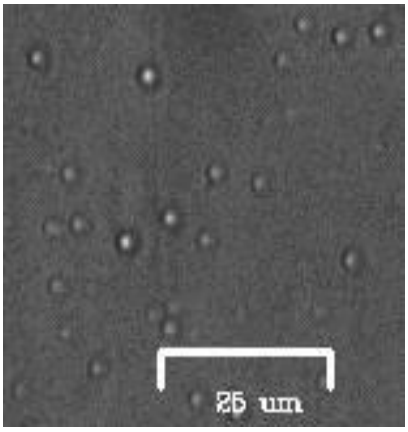


Figure 1: TIA-1 (RRM3-LCS) forms protein droplets

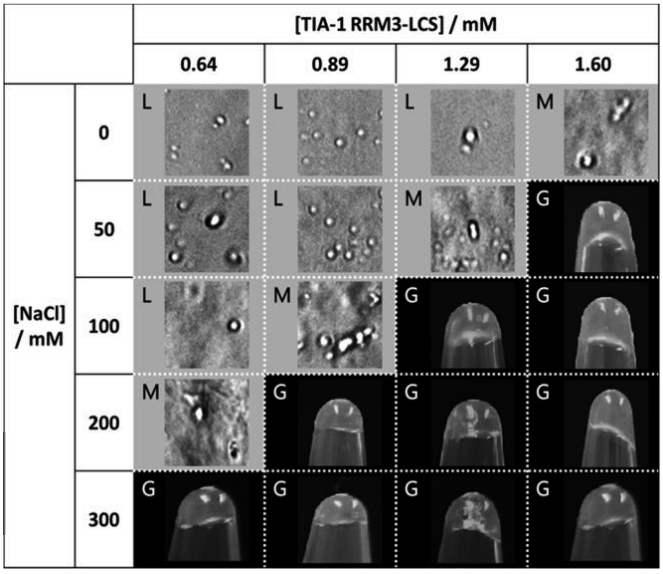


Figure 2: Phase state change of TIA-1 RRM3-LCS depends on TIA-1 and salt concentration (L; liquid state, M; mixture, G; Hydrogel state)

この実験結果に基づいて，ドロップレットからハイドロゲルに到るまでの様々な状態のNMRスペクトルを観測して，状態の違いに伴うタンパク質間相互作用の違いを明らかにすることを目指す.

発表では，溶液NMRおよび固体NMRを併用して観測されたNMRスペクトルの比較を通して，ドロップレット中あるいはハイドロゲル中におけるTIA-1の存在状態の違いについて議論する.

References

[1] Ian, R., Mackenzie, et al., TIA1 Mutations in Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Dementia Promote Phase Separation and Alter Stress Granule Dynamics. Neuron, 2017. 95(4): p. 808-16

[2] Masato, Kato, et al., Cell-free Formation of RNA Granules Low Complexity Sequence Domains Form Dynamic Fibers within Hydrogels. Cell, 2012. 149(4); p. 753-67

YP7

マウス脳より発見された低分子non-coding RNAの二次構造解析

○小林ひなの[1], 鈴村拓馬[2], 清澤秀孔[1,2], 河合剛太[1,2]
[1]千葉工業大学・先進工学部, [2]千葉工業大学・大学院工学研究科

Secondary structure analysis of a small non-coding RNA found in mouse brain

○Hinano Kobayashi[1],Takuma Suzumura[2], Hidenori Kiyosawa[2], Gota Kawai[1,2]
[1] *Chiba Institute of Technology, Faculty of Advanced Engineering*
[2] *Chiba Institute of Technology, Graduate School of 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 around 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, several RNA fragments were designed and their imino proton signals were analyzed. It was found that MsncR-10 consists of 3 stem-loops.

序論

私たちは, 大規模配列解析によってマウス脳から16個の新規低分子RNAを発見し, その構造と機能の解析を進めている[1, 2]. 今回はその一つである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, 二次構造の解析を進めた. MsncR-10の配列は哺乳類ゲノムで保存されていることから, このRNAは高次生命現象に関与している可能性がある. MsncR-10の全体構造として2つの二次構造が予測されていたが, これまでの解析でmodel 2に近い構造が形成されていることが分かっている[3] (Fig. 1). 今回は, まだ二次構造が決定できていなかった部分構造であるSL_A'の領域について二次構造解析を行なった.

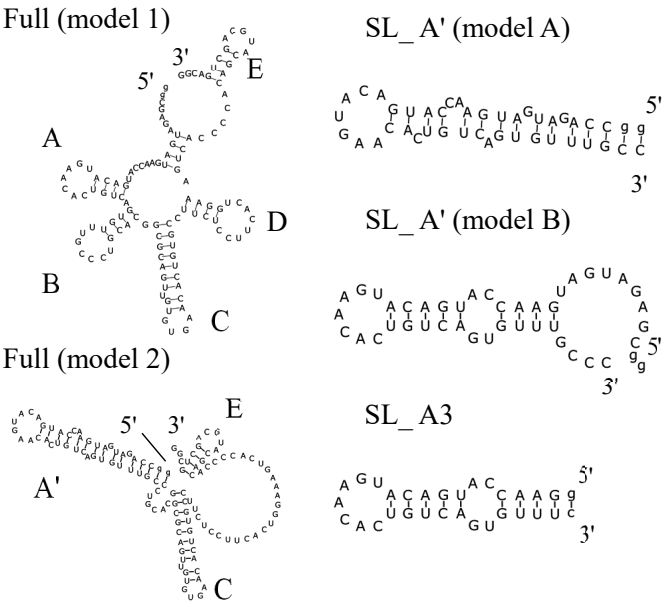


Fig. 1 Possible secondary structures of MsncR-10 and its fragments used for the structural analysis
The G residues added to increase the transcription yield were shown in lowercase letters.

方法

二次構造予測にはvsfold5を用いた. RNAは, 試験管内転写法によって調製した. 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. 20残基以下のRNA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.

50 mM塩化ナトリウムを含む20 mMリン酸緩衝液(pH 6.5)を用い, 288および298 Kにおいて, AVANCE600(BRUKER社)を用いてNMRスペクトルを測定した.

non-coding RNA, secondary structure, RNA
○こばやしひなの, すずむらたくま, きよさわひでのり, かわいごうた

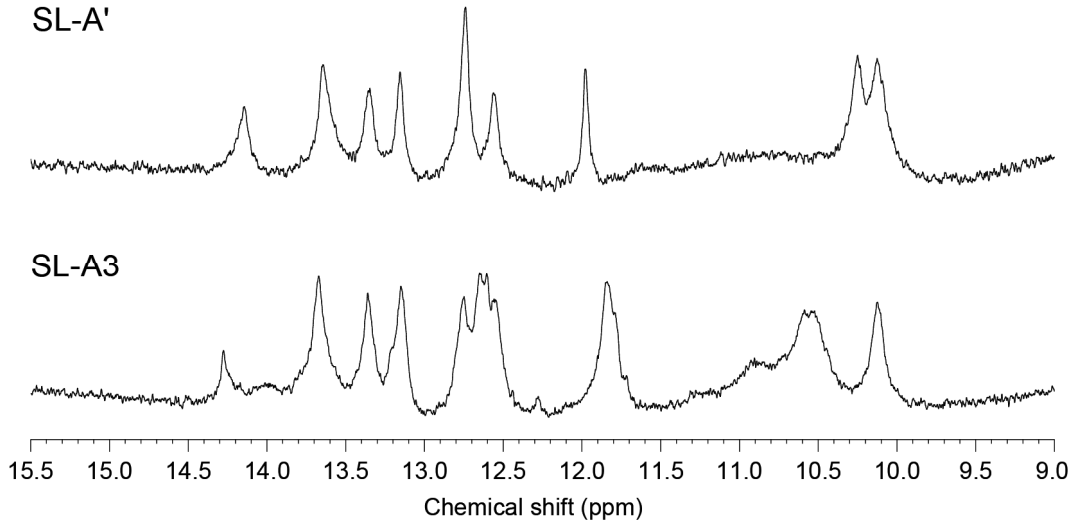


Fig. 2 Imino proton spectra of SL-A' and SL-A3

結果

【解析用断片の設計】

SL_A'の二次構造は2種類の可能性があった（Fig. 1, model AおよびB）. そこで, model Bの二次構造を確実に形成するRNAとしてSL-A3を設計した. さらに, SL-A3の二次構造の確認を行うために, その部分構造をもつ2つのRNAを設計した. また, model Bにおいて一本鎖となっている5′側の11残基の断片も設計し, それらのNMRシグナルを比較した.

【NMRスペクトルの解析】

SL_A′およびSL_A3のイミノプロトン領域のNMRスペクトルを比較したところ, 多くのシグナルの化学シフトが一致した. したがって, SL_A'とSL_A3の二次構造が共通であることが示された. 全長のmodel 2においてSL_A'の領域はmodel Aの二次構造として予測されていたが, 今回の解析によってmodel Bの二次構造が形成されていることが示唆された. そこで, 二次構造を確定させるために, まずSL_A3の2つのステムをそれぞれ含むように2つに分割した断片を調製し, イミノプロトンスペクトルを比較したところ, 部分的にではあるが, 共通のシグナルが観測されており, model Bで予測されている2つのステムが形成されていることが支持された. 現在, SL_A'の5'側の11残基の断片を含め, 各断片のNMRシグナルの帰属を進めており, SL_A'の二次構造の確定をめざしている.

考察

これまでの結果から, MsncR-10 は model 2 に近い二次構造を形成し, さらに SL_A'は model B を形成していることが示唆された. これらのことから, MsncR-10 は, A', C および E の 3 つのステムループからなる RNA であることがわかった. 今後は, MsncR-10 の二次構造を確定させ, さらに立体構造を解析することを計画している. また, 同様な二次構造を形成する RNA の探索あるいは, dock9 遺伝子の MsncR-10 の領域における哺乳類での二次構造の保存性についての解析を行ない, その機能の解明を行いたいと考えている.

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.
3) 鈴村拓馬, 清澤秀孔, 河合剛太, 第56回NMR討論会（東京）.

YP8

ヒト便試料の保存条件とメタボローム変動のNMR解析

○宋　子豪[1]，包　克非[1]，北田　直也[1]，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]，中村　公則[2]，綾部　時芳[2]，山村　凌大[4]，中村　幸志[5]，玉腰　暁子[5]，　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 北海道大学・国際連携研究教育局，4 北海道大学・大学院医学院，5 北海道大学・大学院医学研究院

Studies on sample storage conditions for human fecal metabolomics by using NMR

○ Zihao Song[1], Kefei Bao[1], Naoya Kitada[1], Yasuhiro Kumaki[2], Yuki Ohnishi[2], Takashi Tsukamoto[1, 2, 3], Takashi Kikukawa[1, 2, 3], Makoto Demura[1, 2, 3], Kiminori Nakamura[2], Tokiyoshi Ayabe[2], Ryota Yamamura[4], Koshi Nakamura[5], Akiko Tamakoshi[5], Tomoyasu Aizawa[1, 2, 3].

1 Graduate School of Life Science, Hokkaido University.

2 Faculty of Advanced Life Science, Hokkaido University.

3 Soft-Mater Global Station, GI-CoRE, Hokkaido University.

4 Graduate school of Medicine, Hokkaido University.

5 Faculty of Medicine, Hokkaido University.

We investigated and evaluated the effects of human fecal sample storage conditions on metabolome by ^{1}H NMR. After preservation in different storage conditions (room temperature, chilled and frozen), alternation of metabolites in the extracted water-soluble fraction of fecal samples was analyzed. Even in the case of fecal samples stored at frozen condition also exhibited metabolomic alternation after storage because of the disruption of microbes in the sample after thawing for extraction. These results suggest interpretation metabolomics data of fecal samples should be discussed with the storage condition of the samples.

【背景】近年、腸内細菌叢が宿主の生理作用、疾患に及ぼす影響が急激に明らかになりはじめており、ヒト糞便代謝産物群（メタボローム）を対象とした多くの研究が精力的に進められている。ヒト糞便試料には、腸内細菌と宿主であるヒト腸管細胞、さらには食物残留物に由来する多数の化合物が含まれ、さらに代謝産物の変動の原因となる可能性のある酵素等も含まれるため、採取後の糞便に含まれるメタボロームを信頼性高く測定可能な試料処理のプロトコールの確立は重要な課題である。しかしながら、腸内でのメタボロームを良く反映すると考えられる排便直後のヒト新鮮糞便試料と、その後の保存条件と試料調製等によるメタボロームへの影響に関する研究例は極めて少ない。

そこで本研究では、^{1}H NMR メタボロミクスにより、試料保存条件がヒト糞便中のメタボロームの変化に与える影響の基礎的な検討を行った。

NMR、メタボローム、ヒト糞便

〇そんずはお、ばおかあふぇ、きただなおや、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、なかむらきみのり、あやべときよし、やまむらりょうた、なかむらこうし、たまこしあきこ、あいざわともやす

【方法】 健常ボランティアから提供を受けたヒト新鮮糞便試料を対象として、迅速に均等な分注をおこない、そのうちの１つに対してリン酸緩衝液を加え、振盪攪拌を行うことで、水溶性代謝産物を抽出した。その後、遠心分離により上清を回収し一次元 ^{1}H NMR 測定を行い、排便直後の便中の代謝産物を反映する標準試料とした。測定には Bruker Avance III HD, 600 MHz、noesypr1D パルスを使用した。また、ヒト新鮮便から分注した試料に対しては、温度（室温、冷蔵、冷凍）、時間、再凍結の有無等が異なる条件での保存条件を経た後、標準と同様の抽出、測定を行った。また、得られた NMR スペクトルに対してソフトウェア Chenomx 8.4 を用いてスペクトルのバケット積分及び代謝物の同定と定量を行い、その後各種の多変量解析を行った。

【結果】 リン酸緩衝液により抽出した水溶性の代謝産物のNMRスペクトルから約30種類の代謝物の同定、定量に成功した(Fig. 1)。この結果をもとに、種々の保存条件がこれらの代謝産物の変化に与える影響を検討するため主成分解析（PCA）を行った(Fig. 2)。試料Aに代表されるように、多くの試料においては室温での保存が最も顕著な代謝産物の変動を示した。しかしながら、冷凍での変動が他の保存条件より顕著な試料（試料B）や、何れの保存条件においても代謝産物の変動が極めて小さい試料（試料C）があることも明らかになった。

これらの結果の詳細な分析により、冷凍での代謝産物の変動が顕著な試料では、解凍により糞便試料中に含まれる腸内細菌の細胞が壊れ、その細胞内の代謝産物が漏出することが変動に大きく寄与していると推定された。これに対して、室温での保存では、腸内細菌細胞内の代謝産物の漏出に加え、細菌の代謝及び酵素反応によると考えられる化合物の増減と推定される複雑な要因が変動の原因と推定された。

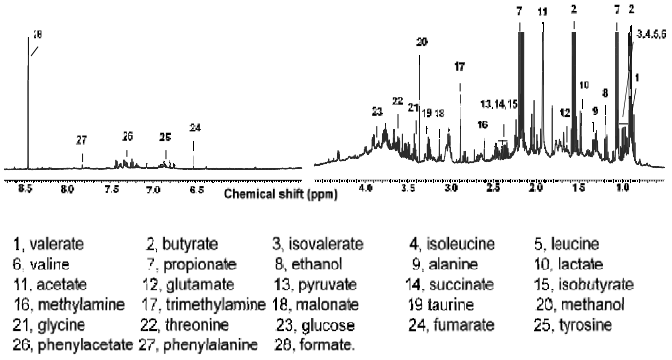


Figure 1. ^{1}H NMR spectra of fecal extraction.

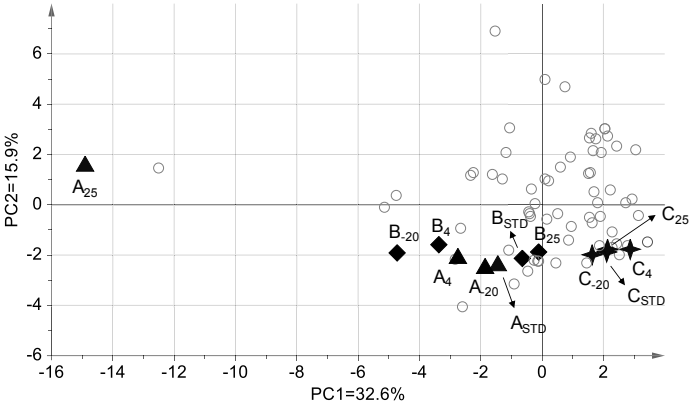


Figure 2 PCA score plots of 19 samples on 3 storage conditions. Shapes are distinctive examples of three sample patterns. Attached subscripts showed each sample storage condition.

以上の結果は、ヒト糞便試料中の代謝産物の変動に与える影響は、試料に含まれる腸内細菌にも大きく依存し、採取後の即時冷凍保存試料であってもその解析結果の解釈には注意が必要であることを示唆している。現在、各試料内の菌叢解析を進めることで、代謝産物の変動に影響を与えた腸内細菌の特徴を検討している。

YP9

ＮＭＲを用いた定量的なグルタミン分解速度の解析

○小倉　立己[1, 2]，若山　正隆[1]，曽我　朋義[1]，冨田　勝[1]
1慶應義塾大学　先端生命科学研究所
2（公財）庄内地域産業振興センター

Quantitative analysis of Glutamine degradation using NMR

○Tatsuki Ogura [1, 2], Masataka Wakayama [1], Tomoyoshi Soga [1], Masaru Tomita [1]
1 Institute of Advanced Biosciences, Keio University
2 Shonai Regional Industry Promotion Center

Glutamine (Gln) is known as an unstable compound and converts to pyroglutamate (pGlu) in water solvent. Gln degradation speed is depended on temperature, pH, and ion strength. However, quantitative analysis of Gln degradation was little information. In this study, we investigated the quantitative analysis of Gln degradation using ^{1}H nuclear magnetic resonance (^{1}H-NMR). 100 mM Gln solution dissolved in 600 μL of 10 mM DSS-d_6 / D_2O solution was prepared, and acquired to ^{1}H-NMR and ^{1}H-^{1}H COSY using 600 MHz NMR at 25, 30, 35, 40 °C for 10 days. Gln degradation and pGlu production speeds became faster at 40 °C compared to 25 °C. In opened NMR tube condition; air exchanging condition, Gln degradation was two times speed up compared to pGlu production speed. It is suggested that air exchanging affects to Gln degradation speed.

【序論】近年の分析技術の向上により、核磁気共鳴（NMR）や質量分析計（MS）を用いた微量成分の分析が実施できるようになり、生体内における多くの代謝系について定性的・定量的な変動解析が可能となった。グルタミン（Gln）は生体反応の重要な窒素源となるアミノ酸であり、多くの代謝系に関与していることが知られている[1]。しかしGlnは溶液状態では不安定な物質であり、アミノ基が脱離してピログルタミン酸（pGlu）へと変化してしまうため、規格の定められた試薬の販売がなく、定量分析を行うには都度試薬調整を行う必要がある[2]。Gln分解は温度やpHによってその速度が変化することが知られているが[3]、pGlu生成速度や気相変動との関係性を評価した研究はほとんど報告されていない。本研究では定量NMR法を用い、温度を変化させたGln溶液の分解反応の定量解析を行い、Gln分解に関与するファクターの解析を実施した。また気相変動による影響を調べるため、NMR管上部を開孔状態にしたGln分解反応の評価も行った。

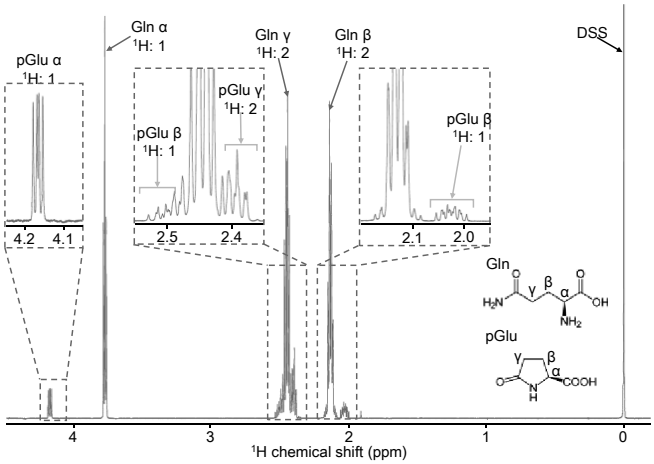


図 1. Gln および pGlu の ^{1}H-NMR

定量NMR、ピログルタミン酸、温度安定性

○おぐら　たつき、わかやま　まさたか、そが　ともよし、とみた　まさる

【方法】富士フィルム和光純薬から Gln 試薬を購入し、600 µL の 10 mM DSS-d$_6$/D_2O 溶液に 8.77 mg 溶解させ 100 mM の Gln 溶液を作成した。作成した Gln 溶液を φ 5 mm NMR 管へと充填し、Jeol 製 600 MHz NMR にセットし、10 日間 ^{13}C デカップリング ^{1}H-NMR 測定を行った。測定は装置内温度を 25、30、35、40°C にセットした状態にし、緩和時間 60 秒、積算 8 回の条件で約 13 時間ごとに測定を行った。開孔状態のサンプルは、NMR 管のキャップに φ 1 mm の穴を開けた状態で測定を行った。また各測定において同時に ^{1}H-^{1}H COSY 測定を行い、ピークの同定に用いた。得られたデータは Delta（ver. 5.2.1, Jeol 製）を用いて解析し、各ピークの積分値から定量 NMR 法を用いた定量分析を行った。

【結果と考察】^{1}H-^{1}H COSY測定からGlnおよびpGluのピークの同定を行った結果、Glnは2.17, 2.46, 3.77 ppmが、pGluは2.02, 2.39, 2.58, 4.17 ppmが対応するピークだった。また ^{1}H-NMRピークの分裂状態とHMDBのデータから、各ピークと分子構造の対応付けを行った（図1）。異なる温度条件におけるGln及びpGlu濃度の経時変化を解析した結果、Gln減少速度とpGlu生成速度は温度が高くなるに従い速くなる傾向が確認され、1 : 1の割合で変化していた（図2）。25 °Cにおける開孔、未開孔サンプルの経時変化を確認した結果、未開孔サンプルはGln分解速度 : pGlu生成速度＝1 : 1であったのに対し、開孔サンプルはGln分解速度 : pGlu生成速度＝2 : 1となっていた。上記の結果から、気相の交換が起こる条件ではGlnの分解動態は変化し、pGlu以外の成分が生成されているのではないかと考えた。

本会では、気相・液相比の変化によるGln分解動態への影響評価についても併せて議論する予定である。

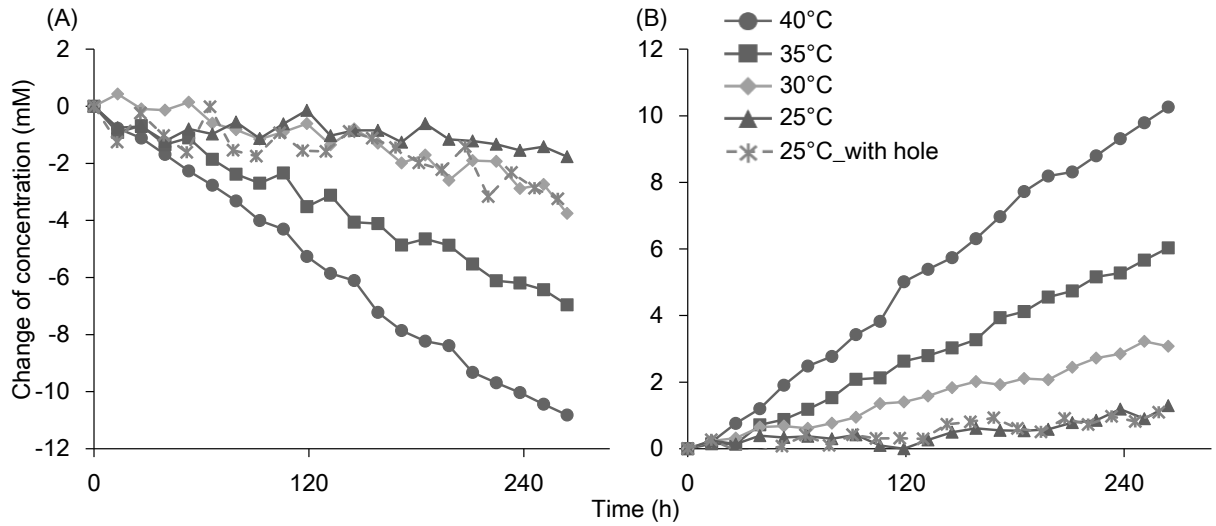


図 2. Gln 分解及び pGlu 生成の経時変化量解析。(A)Gln 分解，(B)pGlu 生成。
各ピークの定量値を平均し、初期濃度からの変化量を算出。

参考文献

1. Labow et. al., World Journal of Surgery, 24, 1503-1513 (2000)
2. Purwaha et. al., Analytical Chemistry, 86, 5633-5637 (2014)
3. Arii et. al., European Journal of Pharmaceutical Sciences, 9, 75-78 (1999)

YP10

^{19}F-NMRを用いた高溶解度フォーカスドライブラリーの構築とフラグメントベースの薬剤探索

○小篭蒼[1]，新家粧子[2]，藤原敏道[2]，児嶋長次郎[1,2]
1横浜国立大学・大学院理工学府
2大阪大学・蛋白質研究所

Solubility Focused Library for ^{19}F-NMR and Fragment-Based Drug Discovery

○Aoi Kokago[1], Shoko Shinya[2], Toshimichi Fujiwara[2], Chojiro Kojima[1,2]
1 Graduate School of Science and Engineering, Yokohama National University
2 Institute for Protein Research, Osaka University

The solution NMR is useful for observing weak intermolecular interactions between proteins and chemical fragments, and thus, suitable for Fragment Based Drug Discovery (FBDD). Chemical shift range of ^{19}F-NMR is wide and its signal is sharp. ^{19}F-NMR is one of the most efficient screening methods for fluorine containing chemical fragments, although fluorine nucleus is hydrophobic. In this study, we developed solubility focused library consisting of fluorine containing chemical fragments, and applied to ^{19}F-NMR screening. ^{19}F-NMR traceability in aqueous medium is also investigated.

［序論］

溶液NMR法は、弱い分子間相互作用の観測を得意とし、Fragment Based Drug Discovery（ FBDD ）で利用される、蛋白質との個々の相互作用が弱いような低分子フラグメントの探索に適している[1]。特に ^{19}F-NMR では ^{19}F 核が疎水的である性質はあるものの、ケミカルシフト範囲が広く、信号がシャープであり、溶媒などによるピークの混み合いが生じにくいなどの点から効率的にスクリーニングを行うことができる。本研究では、^{19}F-NMR を用いた水溶媒中への定量性のトレース、^{19}F 含有高溶解度フォーカスドライブラリーの構築、^{19}F 含有化合物ライブラリーからスクリーニングによるヒット化合物の探索に成功したので報告する。

［実験］

水溶媒中で ^{19}F-NMR を用いた定量を行うために、市販の定量NMR用標準物質（^{1}H, ^{19}F）である3,5-ビス（トリフルオロメチル）安息香酸を用いて、水溶媒中で高い溶解度を有する化合物Aを ^{1}H-NMR, ^{19}F-NMR それぞれの手法で定量し、3,5-ビス（トリフルオロメチル）安息香酸および定量性をトレースした化合物Aを用いて、トリフルオロ酢酸(TFA)のストック溶液を ^{19}F-NMR によって定量し、その純度を求めた[2]。続いて、^{19}F 含有化合物ライブラリーに含まれる化合物の中から高い溶解度を有するものを選出するため、化合物濃度が 1 mM の条件で、基準物質の TFA に対する信号強度と線幅の確認を行い、本条件において溶解量が担保されている化合物を高溶解度化合物として選定した。最後に、幾つかの薬剤探索の標的に対して、^{19}F 含有化合物ライブラリーを用いてスクリーニングを行った。

[結果・考察]

3,5-ビス（トリフルオロメチル）安息香酸および定量性をトレースした化合物Aを用いて、TFA

^{19}F-NMR、Fragment Based Drug Discovery（ FBDD ）

○こかごあおい、しんやしょうこ、ふじわらとしみち、こじまちょうじろう

の定量を行ったところ、TFAのストック溶液の純度はいずれも99%であったことを示し、水溶媒中に十分溶解する化合物に対して、定量性をトレースすることに成功した（Fig. 1）。

高溶解度化合物の選出において、確かな信号強度が観測された化合物の数は560化合物であり、これらの化合物を高溶解度フォーカスド(HSF)ライブラリーとしてまとめた。Dropout 化合物の構造を見たところ、特定の類似化合物群に偏っているというような傾向は見受けられなかった。指標として、タニモト係数を用いた類似度比較結果のk平均法 (k=5) によるクラスタリングを２次元の主成分分析にかけ、選抜の結果を重ね合わせたところ、Dropout 化合物が一部のクラスタのみに偏在するというような傾向はやはり見られなかった（Fig. 2）。

薬剤探索の標的（キナーゼ）に対するスクリーニングでは、多数のヒット化合物を得た。^{19}F 含有化合物+標的蛋白質の溶液（Gray）と^{19}F 含有化合物のみの溶液（Black）の ^{19}F-NMR スペクトル（T_2 filtered）の一例を Fig. 3 に示す。矢印で示した信号は著しく強度が低下しており、このような強度の低下が見られた化合物をヒット化合物として選定した。信号強度（$I_{\mathrm{Protein+}}/I_{\mathrm{Protein-}}$）とケミカルシフト変化（$\delta_{\mathrm{Protein+}} - \delta_{\mathrm{Protein-}}$）をまとめた解析結果の一例を Fig. 4 に示す。ATP に類似した構造を有する化合物が多く見られた一方で、異なる構造を有するものも同定された。これらのヒット化合物の相互作用様式を詳しく解析していくことで、有用な薬剤の手がかりを得ることができると考えられる。

[まとめ]

本研究では、高溶解度ライブラリーを構築することで、高濃度サンプルを必要とする高度なNMR実験手法が適用可能なヒット化合物の探索が可能になった。医薬品候補化合物は水溶性の乏しい化合物になりやすいため、フラグメントヒット化合物の水溶性は重要である。高溶解度ライブラリーを活用することで、今後、FBDDにおいてNMRがより重要な役割を果たしてゆくと期待される。

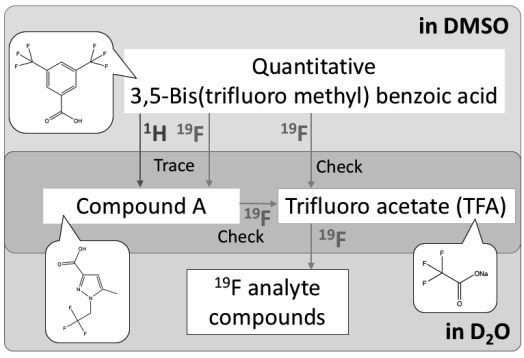


Fig. 1. Traceability chains for the purity determination of ^{19}F-NMR

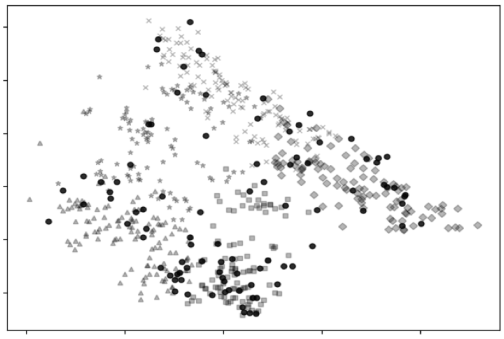


Fig. 2. Principal component analysis (●:Dropout compounds)

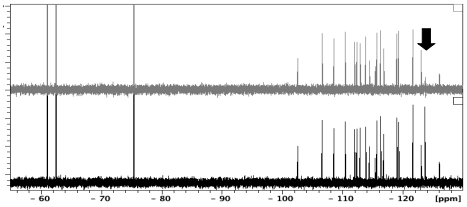


Fig. 3. ^{19}F-NMR spectrum (T_2 filtered)
(Gray : ^{19}F containing compounds + Protein
Black : ^{19}F containing compounds)

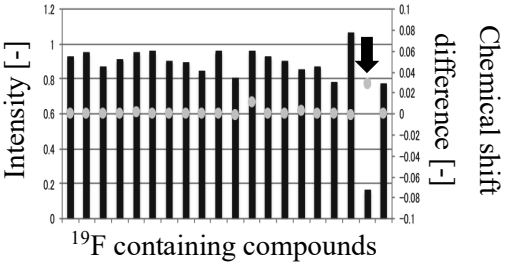


Fig. 4. Screening analysis
(Intensity: Bar graph (Black)
Chemical shift difference: point (Gray))

[参考文献]

[1] Erlanson, D. A., et al. Nat. Rev. Drug Discov. 2016, 15, 605-619
[2] Michael Weber, et al. Anal Bioanal Chem. 2015, 407, 3115–3123

YP11

半整数四極子核のDNP-NMR信号取得の高速化

○永島裕樹[1*]，Julien Trébosc [2,3]，今喜裕[1]，佐藤一彦[1], Olivier, Lafon[2,4*], Jean-Paul Amoureux[2,5,6*]

1 産業技術総合研究所　触媒化学融合研究センター

2 リール大学, CNRS, Central Lille, ENSCL, Univ. Artois, UMR 8181, UCCS

3 リール大学, CNRS,-2638, Fédération Chevreul

4 Institut Universitaire de France

5 ブルカーバイオスピン

6 理研 NMR研究開発部門

Speeding up DNP acquisition of half integer quadrupolar nuclei

○Hiroki Nagashima[1*], Julien Trébosc[2,3], Yoshihiro Kon[1], Kazuhiko Sato[1], Olivier Lafon[2,4*], Jean-Paul Amoureux[2,5,6*]

1 Interdisciplinary Research Center for Catalytic Chemistry, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)

2 Univ. Lille, CNRS, Centrale Lille, ENSCL, Univ. Artois, UMR 8181, UCCS

3 Univ. Lille, CNRS-2638, Fédération Chevreul

4 Institut Universitaire de France

5 Bruker Biospin

6 Riken NMR Science and Development Division

We have optimized the transfer of magnetization from ^{1}H to quadrupolar nuclei for indirect DNP experiments. Three different sequences for such a transfer exist presently: CPMAS, PRESTO and *D*-RINEPT-SR4$^{2}_{1}$. *D*-RINEPT-SR4$^{2}_{1}$ works well at ultra-fast MAS, but not at the moderate spinning speeds encountered with DNP (ν_R = 10-15 kHz). This small efficiency is mainly associated to the large losses related to ^{1}H-^{1}H interactions. We have introduced three changes in this *D*-RINEPT scheme that resulted in 16-fold improvement in its efficiency for ^{27}Al of γ-alumina. In the case of transfers with long-distances and/or low-γ nuclei, the new sequence is also much more efficient than PRESTO and direct DNP: as an example, it multiplies by 3.9 the signal of ^{17}O for Al-O-Al species of γ-alumina and by 5.5 that of ^{95}Mo for MoO_3 supported on TiO_2 with respect to PRESTO sequence. On this unlabeled sample, we have analyzed in details its surface structure using DNP-enhanced NMR ^{17}O, ^{95}Mo and ^{47,49}Ti data.

動的核偏極 (Dynamic Nuclear Polarization, DNP) 法はNMRの感度向上手法の中で最も有力な手法の一つであり、低温の試料回転 (LT-MAS) により達成するMAS-DNPは現在最も実用的に成功している[1]。これまで^{13}C、^{15}N、^{29}Siなどのスピン1/2核に多く適用されてきたMAS-DNPであるが、四極子相互作用を有する (S > 1/2) 原子核 (四極子核) に対して、汎用的に使用されているとは言えない。しかしながら、周期表の73%が四極子核であり、多くの重要な材料に含まれる。四極子核は感度が低いものが多く、MAS-DNPの適用が望まれる。

固体DNP-NMR、半整数四極子核、D-RINEPT

○ながしま ひろき，とれぼすく じゅりあん，こん よしひろ，さとう かずひこ
らふぉん おりびえ，あむるー じゃんぽーる

分極移動法の課題

MAS-DNPでは^{1}Hから観測核に分極移動をして信号を取得するIndirect DNP法で達成されることがほとんどである。四極子核の場合、CPMASを実施するためには、低RF磁場が必要になるため、R^3（$\nu_1 = n*\nu_R$, n = 1 or 2）の条件を避けなければならない。また、励起帯域が狭くなってしまうこと、スペクトルの形状が歪むこと、そもそもC_Qが大きくなるとスピンロックが困難になるなどの不利な点がある。そのため、四極子核のDNP測定は観測しやすい^{27}Alなどに制限されてきた。一方で、スピンロックの必要がないPRESTOが提案されているが[2]、低周波数核や^{1}Hと観測核との距離が長いと分極移動効率が大幅に低下する。

本研究では同じくスピンロックの必要のないD-RINEPTに着目した[3]。D-RINEPTに使用されるRecoupling パルスの$SR4_1^2$はRF磁場の不均一性、RF offset、CSAにロバストであり、Dipolar truncationが生じない利点がある。しかしながら、$SR4_1^2$のRF磁場条件は$\nu_1 = 2*\nu_R$と低く、Recouplingと同時に^{1}H-^{1}H decouplingをよく達成するには、高速回転($\nu_R \geqq 40$ kHz) が必要であった。また、D-RINEPTでは化学シフト、CSAの発展を再収束させるために、Recouplingパルス間に90度、180度パルスとDelayを設けなければならず、このDelayの間に^{1}H-^{1}H dipolar couplingの影響によって信号が減衰してしまう。MAS-DNPでは高速回転を達成することは低温測定の制約 (約100 K) により厳しいため、汎用の3.2mm DNP プローブでの12.5 kHz以下の試料回転でシーケンスが機能することが必要となる。

新規 D−RINEPT の開発

$SR4_1^2$のR element をTanh/Tanパルスに変更し、A(adiabatic) $SR4_1^2$とすることで、RF磁場条件の制約をなくし、より大きなRF磁場を使用可能にした[4]。これにより低速回転 (ν_R = 12.5 kHz) での^{1}H-^{1}H decouplingの性能を大幅に改良することに成功した。一方、Recouplingパルス間のDelayにはCW decouplingを照射することで、^{1}H-^{1}H dipolar coupling による信号の減衰を抑えることに成功した。CW decouplingの位相は、^{1}Hへの90、180度パルスと$ASR4_1^2$により生み出されたHeteronucler dipolar couplingによる密度演算子の発展を阻害しないように設定しなければならない。

^{27}Al , ^{17}O (γ-Al_2O_3) と ^{17}O, ^{95}Mo , ^{47,49}Ti (MoO_3-TiO_2) の観測

γ-Al_2O_3 の ^{27}Al の信号を用いて新規 D-RINEPT の性能を確認した。旧 D-RINEPT からは 16 倍もの感度向上が確認された。さらに低周波数核の場合において、新規 D-RINEPT の性能を確認するため、γ-Al_2O_3 の ^{17}O (Al-O-Al の信号) と、10%wt MoO_3-TiO_2 の ^{95}Mo の測定を実施した。上記の信号取得は Indirect-DNP 法としては初めてである。実際の信号検出は分極移動後に QCPMG を組み込んで達成された。結果、新規 D-RINEPT は PRESTO-III と比較して、γ-Al_2O_3 の ^{17}O (Al-O-A の信号) に対して 3.9 倍、10%wt MoO_3-TiO_2 の ^{95}Mo に対して 5.5 倍の感度で信号を取得することができた。これは Heteronucler dipolar coupling が小さくなるほど、新規 D-RINEPT は優位であることを示している。また、^{17}O Direct DNP と比較しても、およそ 6.7 倍の感度で信号が得られた。さらに発表では同じく新規 D-RINEPT によって、MoO_3-TiO_2 の ^{17}O, ^{47,49}Ti のスペクトルを得ることに成功したので報告する。

References

[1] A. G. M. Rankin, et al, *Solid. State Nucl. Magn. Reson.* 101, 116 (2019)

[2] F A. Perras, et al, *J. Am. Chem. Soc. 137* (26), 8336–8339 (2015)

[3] R. Giovine, et al, *J. Magn. Reson.* 299, 109-123 (2019)

[4] H. Nagashima. et al, *Solid. State Nucl. Magn. Reson.* 94, 7 (2018)

謝辞

本研究はNEDO (Grant No. P16010)の助成を受けて実施されました。

YP12

微結晶の三次元磁場配向機構を備えた in situ 固体 NMR プローブの開発

○門間 啓[1]，久住 亮介[1]，和田 昌久[1]，木村 恒久[1]，武田 和行[2]
1 京都大学大学院　農学研究科
2 京都大学大学院　理学研究科

In situ solid-state NMR probe for three-dimensional orientation of microcrystals in a liquid medium

○Hiroshi Kadoma [1], Ryosuke Kusumi [1], Masahisa Wada[1], Tsunehisa Kimura [1], Kazuyuki Takeda [2]
1 Graduate School of Agriculture, Kyoto University, Kyoto, Japan
2 Graduate School of Science, Kyoto University, Kyoto, Japan

A probe for measuring solid-state NMR of a Magnetically Oriented Microcrystal Suspension (MOMS) was developed. In this probe, the sample tube is rotated slowly (≤100 rpm) about an axis perpendicular to the static magnetic field ($\boldsymbol{B}_0$). Under such a rotating magnetic field, microcrystals in a liquid medium are *aligned* by a torque arising from the anisotropic bulk magnetic susceptibility of the crystal. When the rotation is modulated, e.g., temporally stopped at the $\boldsymbol{B}_0$ direction every 180° rotation, three-dimensional orientation of the microcrystals is achieved (3D-MOMS). Single-crystal rotation patterns were obtained from the 3D-MOMS of L-alanine microcrystals by solid-state CP measurements triggered in synchronous with the sample-tube rotation. The process of three-dimensional magnetic alignment was also studied by monitoring the spectral changes during continuous application of the modulated sample rotation.

1. 緒言

固体NMRでは，一般にMASにより共鳴ピークを先鋭化させて測定する．しかしながら，MAS下では化学シフトの異方性が平均化されるため，化学シフトテンソルを完全な形で抽出し精密なレベルでの局所構造解析に応用することは困難である．化学シフトテンソルの決定手法として単結晶NMR法[1–3]があるが，数mmサイズの巨大な単結晶が得られない物質には適用が困難である．我々はこれまでに，微結晶の三次元磁場配向体(擬単結晶，Magnetically Oriented Microcrystal Array (MOMA))[4]に単結晶NMR法を適用し，微結晶粉末から化学シフトテンソルを決定する手法を提案してきた[5]．しかしながら，この擬単結晶法では測定試料を配向固定用の媒体(紫外線硬化モノマーなど)に均一に分散させるプロセスが不可欠であるため，凝集しやすいナノサイズの結晶や損傷を受けやすいタンパク質・生体化合物などへの応用が困難であった．

そこで本研究では，固体NMRの強磁場を活用して微結晶懸濁体の三次元磁場配向を達成しつつ，媒体を固化させることなくそのままの状態での固体NMR測定が可能な磁場配向プローブを設計・作製した．作製したプローブにより磁場配向微結晶懸濁体(Magnetically Oriented Microcrystal Suspension (MOMS))のin situ固体NMR測定を行うとともに，微結晶の三次元磁場配向の進行に伴う固体NMRスペクトルの形状変化を観測した．

三次元磁場配向、異方性相互作用、固体NMRプローブ開発

○かどま ひろし[1]，くすみ りょうすけ[1]，わだ まさひさ[1]，きむら つねひさ[1]，たけだ かずゆき[2]

2. 実験

磁場配向プローブは，微結晶の三次元磁場配向を達成するため，試料管の長軸を静磁場と直交させた状態で変調回転させる機構とした．変調回転の駆動はステッピングモーターにより行なうこととした．超電導磁石(300 MHz, 7.05 T)およびrfパルス照射のためのパワーアンプにはJEOL CMX300 Infinityのものを使用し，測定はFPGA集約型OPENCORE NMR分光計[6]を用いて行った．試料管に封入したL-アラニン微結晶(<20 μm)の懸濁液(20 wt%)をプローブ内にセットし，間欠型の変調回転(15 rpmで180°回転させ, $\boldsymbol{B}_0$方向で1 s停止)を施しながら固体^{13}C CP測定を行なった．CPのコンタクトタイムおよび待ち時間はそれぞれ1 msおよび6 sとし，積算回数は2048とした．三次元配向した微結晶は試料管に追随して回転しているため，光センサーにより試料管の回転とパルスシーケンスを同期させて特定のタイミングで rfパルスを照射し，B_0と磁化容易軸(χ_1)方向(回転開始時における静磁場方向)のなす角が異なる一連のスペクトルを収集した．また，カルボキシル炭素を^{13}Cラベル化したL-アラニンの微結晶懸濁液を用いて積算回数1回の条件で同様の実験を行い，変調回転下にて微結晶の三次元配向化が進行する過程をリアルタイムで観測した．

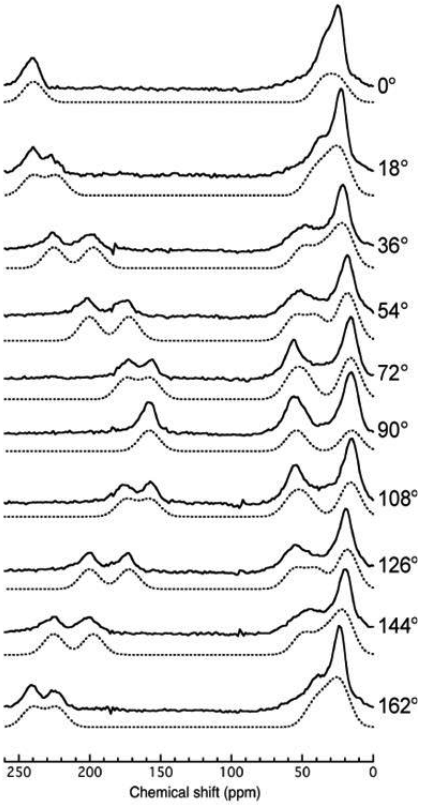


Fig. 1 ^{13}C CP spectra of L-alanine microcrystals in a suspension under the modulated rotating magnetic field. The spectra simulated from the single-crystal data[3] are also shown as dashed lines.

3. 結果・考察

Fig. 1に，変調回転下で得られたL-アラニン微結晶懸濁体の^{13}C CPスペクトルを示す．rfパルスの照射のタイミングを変化させるにつれて各共鳴ピークの発現位置が連続的に変化しており，その変化のパターンはシミュレーションの結果(点線)と良く一致した．この結果は，通常はmmサイズの単結晶でのみ得られる振動パターンが，磁場配向プローブを用いることで, 液状媒体中にある数十μmサイズの微結晶からでも観測可能になったことを示している．Fig. 2には，微結晶の三次元磁場配向化が進行する過程をシングルスキャンで観測し得られた一連のスペクトルを示してある. 静磁場下で一軸配向していた微結晶が, 変調回転磁場の印加時間が経過するにつれて三次元配向が進行し，スペクトルパターンが変化する様子が分かる．この結果から，L-アラニン微結晶では概ね10分程度で三次元配向化が完了することが分かった．

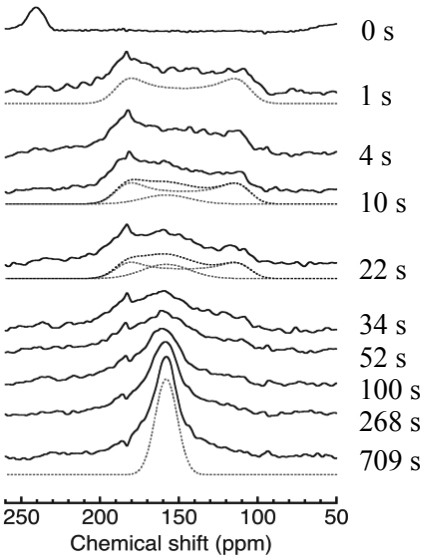


Fig. 2 ^{13}C CP spectra of L-alanine microcrystals being oriented in a suspension under the modulated rotating magnetic field.

参考文献

[1] C. A. Fyfe, *Solid State NMR for Chemists* (1983).
[2] D.L. Sastry et al., *Carbohydr. Res.* **165**, 161 (1987).
[3] A. Naito et al., *J. Chem. Phys.* **74**, 3190 (1981).
[4] T. Kimura et al., *Langmuir* **22**, 3464 (2006).
[5] R. Kusumi et al, *J. Magn. Reson.* **223**, 68 (2012).
[6] K. Takeda, *J. Magn. Reson.* **192**, 218 (2008).

YP13

Field-Swept Nuclear Integrated Cross Polarization

○日部雄太[1]，竹腰清乃理[1]，武田和行[1]
[1]京都大学大学院 理学研究科 化学専攻

Field-Swept Nuclear Integrated Cross Polarization

○Yuta Hibe[1], K. Takegoshi[1], Kazuyuki Takeda[1]
[1] *Division of Chemistry, Graduate School of Science, Kyoto University*

Nuclear integrated cross polarization (NICP) is an efficient method for cross polarization (CP), in which adiabatic sweep is applied to the source spin from far off-resonance toward on resonance. In the original NICP using frequency sweep, the sweep range is limited by the bandwidth of the resonant circuit. Here, we report a variant of NICP, in which field sweep is adopted instead of frequency sweep. Since the frequency is fixed, this approach is compatible with a probe with a very high Q factor of resonant circuit or such quadrupolar nuclei that yield very wide spectral width. We demonstrate field swept NICP by implementing a field-sweep coil to a CP/MAS probe. The sweep is applied to both nuclei, and the sweep width is proportional to the gyromagnetic ratio. Thus, this approach can be regarded as a field swept version of simultaneous adiabatic sweep (SADIS) CP.

1. 序論

交差分極(Cross Polarization: CP)法は固体NMRにおいて、^{13}Cや^{15}Nなどの磁気回転比の小さな核の感度を増強させる手法として広く用いられている。中でも、Nuclear Integrated Cross Polarization (NICP)法[1]は簡便かつ効率的なCPの手法である。NICPでは偏極源となる核に対して最初のπ/2パルスを照射せずに、オフレゾナンスからオンレゾナンスへ断熱的な周波数掃引を行う。これにより分布しているすべてのスピンパケットをロックすることが出来る。更に、有効磁場強度が変化することによりHartmann-Hahn条件のミスマッチも補償する。また対象の異種核両方に対して周波数掃引を行うSimultaneous Adiabatic Sweep CP (SADIS CP)[2]も報告され、より効率の良い偏極移動を可能とした。しかしこれらの実験は周波数掃引を行うため、回路のQ値が非常に高く共振周波数の帯域幅が狭い場合や、四極子相互作用などにより非常に広幅なスペクトルを持つ核種を対象とする場合は適用が難しい。

本研究で我々は、周波数掃引の代わりに磁場掃引を用いたNICP (Field-swept NICP)について報告する。磁場掃引であるためプローブ共振回路の帯域幅が限られていてもNICPによる偏極移動を行うことが可能であり、四極子核を含む様々な核種に対しても適用可能である。このアプローチでは磁場掃引によって両者の核に対して断熱掃引が行われ、その幅は磁気回転比に比例するため、SADIS CPの磁場掃引版とみなすこともできる。

Nuclear Integrated Cross Polarization (NICP), Field-swept NICP, Simultaneous adiabatic sweep CP

○ひべゆうた，たけごしきよのり，たけだかずゆき

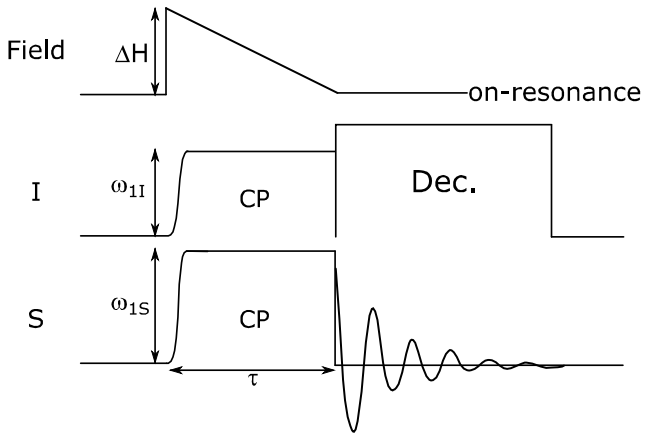


Fig. 1. A pulse sequence for field-swept NICP.

2. 理論

Field-swept NICP のパルスシーケンスを Fig. 1 に示す。ここでは核種I, Sのスピン量子数が 1/2 であるスピン系に対し、磁場をオフレゾナンスから線形にオンレゾナンスに掃引する場合を考える。Field-swept NICP 中の回転座標系におけるハミルトニアンは、磁場掃引幅をΔH、磁場掃引の時間幅をτとおくと

$$\mathcal{H} = \Delta\omega_S(t)S_z + \omega_{1S}S_x + \Delta\omega_I(t)I_z + \omega_{1I}I_x + D(t)I_zS_z \tag{1}$$

$$\Delta\omega_{I,S}(t) = \gamma_{I,S}\Delta H\left(1 - \frac{t}{\tau}\right) \tag{2}$$

と表される。ここでω_{1I}とω_{1S}は rf 磁場の照射強度、$D(t)$は Magic Angle Spinning (MAS)下での双極子相互作用の強度であり、

$$D(t) = d_{IS}[G_1\cos(\omega_r t) + G_2\cos(2\omega_r t)] \tag{3}$$

と与えられる。d_{IS}は双極子相互作用の強度、G_1, G_2はローターに固定した軸に対する核間ベクトルの方向に依存する量、ω_rはスピニング周波数を表す。

次に、有効磁場の方向が z 軸であるような tilted rotating frame を考える。有効磁場の大きさと、静磁場に対する角度をそれぞれ

$$\left[\omega_{\text{eff}}^{I,S}(t)\right]^2 = \left[\Delta\omega_{I,S}(t)\right]^2 + \omega_{1I,S}^2 \tag{4}$$

$$\alpha_{I,S}(t) = \tan^{-1}\left[\frac{\omega_{1I,S}}{\Delta\omega_{I,S}(t)}\right] \tag{5}$$

とすると、tilted rotating frame におけるハミルトニアンは

$$\mathcal{H}^{TR} = \mathcal{H}_Z + \mathcal{H}_D = \left[\omega_{\text{eff}}^S(t)S_z + \omega_{\text{eff}}^I(t)I_z\right] + \left[D(t)(S_z\cos\alpha_S + S_x\sin\alpha_S)(I_z\cos\alpha_I + I_x\sin\alpha_I)\right] \tag{6}$$

で与えられる。磁場掃引中の系の時間推進演算子$U(t)$は次のように表される。

$$U(t) = U_0(t)U_1(t) \tag{7}$$

$$U_0(t) = \exp(-it\mathcal{H}_Z), \quad U_1(t) = T\exp\left[-i\int_0^t dt'\widetilde{\mathcal{H}}_D\right] \tag{8}$$

$$\widetilde{\mathcal{H}}_D = U_0^{-1}(t)\mathcal{H}_D U_0(t) \tag{9}$$

MAS 下における Hartmann-Hahn 条件

$$\omega_{\text{eff}}^I(t) - \omega_{\text{eff}}^S(t) = n\omega_r \quad (n = \pm1, \pm2) \tag{10}$$

を満たせば、双極子相互作用の平均ハミルトニアンは

$$\bar{\widetilde{\mathcal{H}}}_D = \frac{1}{8}d_{IS}G_n\sin\alpha_S\sin\alpha_I\,(I_+S_- + I_-S_+) \tag{11}$$

と導かれる。つまりこのフリップフロップ項によってI核とS核間の偏極移動が起こる。

断熱的な磁場掃引を行うには

$$\frac{|\gamma_{I,S}|\Delta H}{\tau} \ll \frac{\omega_{\mathrm{eff}}^{I,S}(t)}{\sin\alpha_{I,S}(t)} \tag{12}$$

という条件を磁場掃引中に満たさなければならない。また磁場掃引中に Hartmann-Hahn 条件を満たすためには、それぞれの核に対する有効磁場の大小関係が磁場掃引前と掃引後で逆転している必要がある。この条件は、磁気回転比が$|\gamma_I| > |\gamma_S|$ならば、

$$\omega_{1I} < \omega_{1S} \tag{13}$$

とすることで満たすことができる。

3. 実験・結果

^{1}H–^{13}C 二重共鳴 5 mm MAS プローブを用いて Field-swept NICP 実験を可能とするために、磁場掃引用のコイル(直径 70 mm、長さ 50 mm、巻き数約 80)を作製し、試料がコイルの中心に位置するよう、またコイルの軸が静磁場に対して平行となるように取り付けた(Fig. 2)。スロープ電流を分光計から増幅器を経由してコイルに対して送り込み、静磁場に平行な磁場を発生させることで磁場掃引を行った。

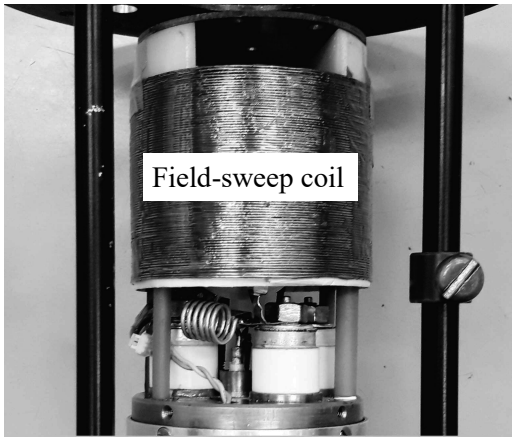


Fig. 2. A probe for field-swept NICP.

7 T 超伝導磁場、室温下でアダマンタンを用いて通常の ^{1}H–^{13}C CP/MAS 実験および Field-swept NICP 実験を行った。^{13}C 核に対する rf 磁場の強度を 25 kHz に固定し、^{1}H 核に対する強度を 10–40 kHz まで変えて ^{13}C NMR 信号を観測した。Field-swept NICP における磁場の掃引幅を 1.2 mT、掃引の時間幅(コンタクトタイム)を 6 ms とした。CP/MAS と Field-swept NICP における信号のピーク面積によって CP 効率の比較を行った。

式(4)、(5)、(12)から、rf 磁場の強度が弱くなるほど、また磁場掃引幅が大きくなったり掃引の時間が短くなるほど断熱条件を満たすことが難しくなり、磁場がオンレゾナンスへ戻る瞬間が最も条件が厳しくなる。本実験では磁気回転比の大きい ^{1}H 核の方が ^{13}C 核よりも条件が厳しい。今回の実験条件では、例えば ^{1}H への磁場強度が 20 kHz だった場合、磁場掃引終了時において式(12)の(右辺)/(左辺)で表される断熱係数は

$$\left(\frac{\omega_{\mathrm{eff}}^{I,S}(t)}{\sin\alpha_{I,S}(t)}\right) / \left(\frac{\gamma_{1\mathrm{H}}\Delta H}{\tau}\right) \sim 3.0\times10^{2} \gg 1$$

であるから、断熱条件は満たしている。

実験により得られた結果を Fig. 3 に示す。通常の CP/MAS では MAS 速度に対応して CP 効率が悪くなる谷があるのに対し、Field-swept NICP では CP 効率の谷がなく、良い CP 効率を得られる範囲が CP/MAS より広いことから、Hartmann-Hahn 条件のミスマッチが補償されていることが分かる。

Field-swept NICP の CP 効率の ^{1}H への rf 磁場強度依存性を見ると、$\omega_{1,1\mathrm{H}}$が 13 kHz 以下になると CP 効率が落ち始めている。式(12)より、$\omega_{1,1\mathrm{H}}$~13 kHz で断熱係数がちょうど 2 桁ほどになり、これを下回るほど rf 磁場強度が弱くなると、断熱条件が徐々に破れて行ってしまうために CP 効率が低下していると考えられる。また$\omega_{1,1\mathrm{H}} > \omega_{1,13\mathrm{C}}$となる 25 kHz あたりから CP 効率が落ち始めており、この結果は式(13)を満たさなければ有効磁場の大小関係が逆転せず、Hartmann-Hahn 条件を満たすことが出来なくなることを反

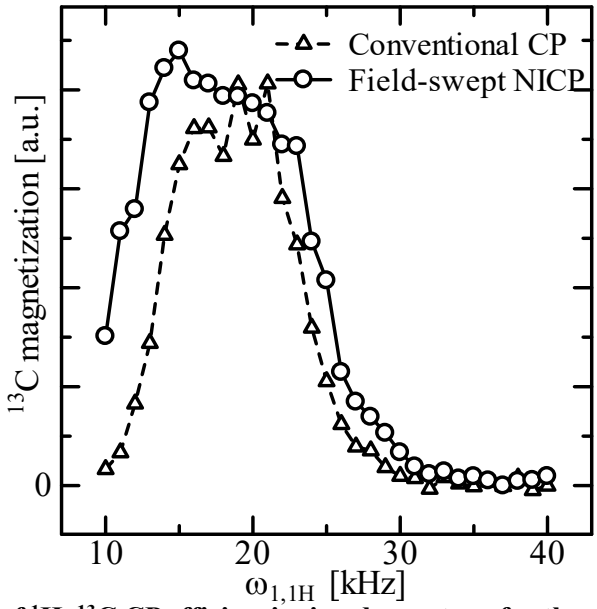


Fig. 3. $\omega_{1,1H}$ dependence of ^{1}H–^{13}C CP efficiencies in adamantane for the conventional CP (triangles) and field-swept NICP (circles) schemes. These experiments were carried out in 7 T at room temperature with 2 kHz MAS frequency. $\omega_{1,13C}$ was fixed to 25 kHz. The CP contact time (field-sweeping time) was 6 ms and field sweeping width was 1.2 mT.

映している。以上から、今回の Field-swept NICP 実験により得られた結果は妥当であり、磁場掃引を用いた NICP が実現可能であることが実証された。

4. 結論

本研究において我々は、二重共鳴 MAS プローブに対して磁場掃引用コイルを実装することで field-swept NICP 実験を行い、得られた結果から磁場掃引によっても NICP が行えることを実証した。コイルの巻き数を増やして可能な磁場掃引幅を大きくしたり、磁場掃引を線形でなくより断熱的な掃引となる関数形にすることで、更に効率の良い CP を達成し、四極子相互作用などによる幅広なピークを持つ核種に対しての適用可能性が期待される。

References

[1] W. K. Peng, K. Takeda and M. Kitagawa, *Chem. Phys. Lett.* 417 (2006), 58–62.

[2] W. K. Peng and K. Takeda, *J. Magn. Reson.* 188 (2007), 267–274.

YP14

高速MAS下でのスピンロック緩和の最適化による高効率CPの実現

○松永　達弥[1]，松田　勇[2]，山崎　俊夫[1]，石井　佳誉[1,2]
1理化学研究所　放射光科学研究センター
2東京工業大学　生命理工学院

Development of high-efficient CP with optimization of spin-lock relaxation under fast MAS

○Tatsuya Matsunaga[1], Isao Matsuda[2], Toshio Yamazaki[1], Yohsitaka Ishii[1,2]
1 RIKEN SPring-8 Center
2 School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology

High-resolution solid-state NMR (SSNMR) using ultra-fast magic-angle (UFMAS) at spinning speed of 60 kHz or higher improved ^{1}H spectral resolution and drastic sensitivity enhancement by ^{1}H-detected SSNMR. However, limited efficiency of polarization transfer using cross-polarization (CP) in UFMAS has still restricted the sensitivity and multi-dimensional applications of SSNMR. We propose a new approach to improve the efficiency of CP between ^{1}H and other rare nuclei such as ^{13}C by incorporating off-resonance irradiation to ^{1}H spin. In the UFMAS, life time of spin-locked ^{1}H polarization can be notably prolonged with such an RF irradiation with moderately large offset frequency, and it caused sensitivity enhancement of 1D ^{13}C CPMAS spectra by 1.1–1.4-fold comparing with traditional CP method. We call it *relaxation optimized tilted-angle CP* (ROTA CP). In this scheme, for a spin-lock pulse for CP on rare spin such as ^{13}C a traditional scheme like adiabatic CP[2] can be also adopted to improve sensitivity further. We demonstrate notably improved sensitivity of ^{13}C- and ^{1}H-detected SSNMR experiment by ROTA-CP on 56-resicue β1 immunoglobulin binding domain of protein G (GB1) and N-formyl-Met-Leu-Phe-OH (f-MLF) in UFMAS conditions.

60 kHz以上の高速試料回転(ultrafast magic-angle spinning, UFMAS)[1]は非常に高分解能な^{1}H観測固体NMRを可能とし、材料や生体分子のNMR測定に広く使われている。それでもなお効率的なCross Polarization (CP)は重要な技術である。例えば、adiabatic CP[2]はCPパルスの照射強度を変調させる事で高効率なCPを実現している。

一般的なCPでは、パルス照射によるコイルへのダメージや試料温度の上昇を防ぐため、CPパルスの照射強度は100 kHz前後が限界となる。効率的なCPを行うには、この制限の下でHartman-Hahn条件[3]を満たす必要があり、CPパルスと試料回転の干渉によるrecouplingに気を付けなくてはならない。特に^{1}Hは同種核間dipolar interactionが大きく、CPパルス照射による^{1}Hスピンロック信号の緩和はUFMASにおけるCP効率低下の一因となっている。

そこで我々は^{1}H off-resonance照射を用いた新しい高効率CP手法を開発した。オフセット周波数Ω_Hを持つoff-resonance照射は、回転座標系においてz軸から角度θだけ傾いた

Cross Polarization, Fast MAS, CP, 固体NMR

○まつなが　たつや、まつだ　いさお、やまざ　きとしお、いしいよしたか

磁場ω_{eff}に対する磁化の回転をもたらす（Fig. 1a）。UFMAS下でのこのような磁場による^{1}Hスピンロックは、on-resonance照射を使った通常のスピンロックに比べて磁化の持続時間が長くなる。これをCPに使う事で高効率CPが可能である。このoff-resonance照射を使ったCPを*relaxation optimized tilted-angle CP* (ROTA CP)と呼ぶ事とする。ROTA CPは^{13}Cのような低γ核側に従来のCP手法を適用できるため、これによる信号増強も同時に得られる。Fig. 1bはROTA CPのパルスシーケンスである。本研究では^{1}H側CP磁場の角度θ = 30°とし、^{13}C側CPパルスに既存のadiabatic CP[2]と同じ強度変調パルスを使った。

Fig.2は^{13}C, ^{15}N均一ラベルの56-resicue β1 immunoglobulin binding domain of protein G (GB1)の^{13}C CPMASスペクトル(C$_{\alpha}$領域)である。測定はJEOL 0.75-mm ^{1}H/^{13}C/^{15}N3重共鳴プローブ、Bruker Avance III HD分光計を使った。^{1}Hの共鳴周波数は900 MHz、試料回転速度は90 kHzである。C$_{\alpha}$領域のROTA CPによる信号増加は^{13}C 90°パルス励起信号に対して平均3.4倍と高い効率が見られた。一方、adiabatic CPによる信号増加は平均2.5倍であった。従ってROTA CPはAdiabatic CPに対して約1.3倍の感度向上が得られた。これは同じSNRを得るのに必要な測定時間が約1/1.8倍となる事に相当する。

当日の発表ではこれらの結果に加え、ROTA CPを使ったGB1のHCH 2D CPMAS NMRの感度向上や、より硬い物質としてN-formyl-Met-Leu-Phe-OH (f-MLF)へのROTA CP適用の結果を紹介する。

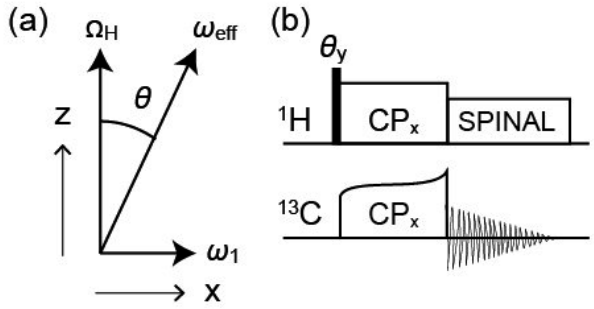


Fig. 1. (a) Relationship between the rf offset (Ω_H), rf field amplitude (ω_1), and the effective field (ω_{eff}). (b) Pulse sequence of ROTA CP. Black square represent a hard pulse with indicated flip angle of θ. θ is set to 30° in this work.

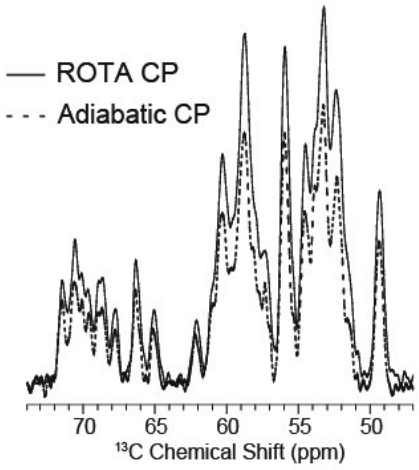


Fig. 2. ^{13}C CPMAS spectra of C$_{\alpha}$ region of uniformly ^{13}C-, ^{15}N-labeled GB1. They were measured with the sequence shown in Fig. 1b.

Reference

[1] Wickramasinghe, A.; Wang, S.; Matsuda, I.; Nishiyama, Y.; Nemoto, T.; Endo, Y.; Ishii, Y. *Solid State Nucl. Magn. Reson.* **2015**, *72*, 9–16.

[2] Hediger, S.; Meier, B. H.; Ernst, R. R. *Chem. Phys. Lett.* **1995**, *240* (5–6), 449–456.

[3] Wind, R. A.; Dec, S. F.; Lock, H.; Maciel, G. E. 13C CP/MAS and High-Speed Magic-Angle Spinning. J. Magn. Reson. 1988, 79 (1), 136–139.

YP15

多次元固体MAS NMRによる光駆動型Na^+ポンプロドプシンKR2の構造解析

○金子莉奈[1]，重田安里寿[2]，長島敏雄[3]，山崎俊夫[3]，井上圭一[4,5]，
神取秀樹[5]，川村出[1,2]
1 横浜国立大学　大学院理工学府，　2 横浜国立大学　大学院工学府，
3 理研，　4 東京大学，　5 名古屋工業大学

Structural analysis of light-driven Na^+ pump rhodopsin KR2 by multidimensional solid-state MAS NMR

○Rina Kaneko [1], Arisu Shigeta[2], Toshio Nagashima[3], Toshio Yamazaki[3], Keiichi Inoue[4,5], Hideki Kandori[5], Izuru Kawamura[1,2]
1. Graduate School of Science and Engineering, Yokohama National University,
2. Graduate School of Engineering, Yokohama National University,
3. RIKEN RSC NMR, 4. University of Tokyo, 5. Nagoya Institute of Technology.

Krokinobacter rhodopsin 2 (KR2), a light-driven Na^+ pump, has characteristic non-transported Na^+ at the extracellular side. Here, we investigated the effects of substitution of alkali metal ions on KR2 in POPE/POPG membrane by multi-dimensional solid-state MAS NMR. We observed significantly peak shifts of protonated Schiff base and several residues depending on the alkali metal ions in the buffer solution. Especially, the peak shifts of in Thr83 and Thr87 (Na^+-binding site), Ile14 and Ala16 (N-helix), His30 Nδ1 (A-helix), Arg109 Nε (B-helix) occurred. It suggests the presence of long-distance interactions between the retinal chromophore and extracellular Na^+ binding site. But, separated Nη peaks of Arg109 was kept on any alkali metal ion conditions (slow chemical exchange). It is indicated that Arg109, which plays a crucial role of Na^+ pump process, keeps basically strong hydrogen bonding with specific residues. Therefore, we have demonstrated hydrogen bonding network between the retinal-binding pocket and extracellular Na^+ binding site.

【序論】クロキノバクターロドプシン2 (*Krokinobacter* rhodopsin 2; KR2)は、海洋性真正細菌*Krokinobacter eikastus*由来の7本膜貫通型光受容膜タンパク質である[1]。KR2が保持する発色団レチナールの光異性化により、Na^+を細胞内から細胞外へ輸送する光駆動型Na^+ポンプ機能を持つ。結晶構造や高速AFMからKR2は細胞膜中で五量体を形成し、その細胞外側の分子界面にイオン輸送に直接関係のないNa^+を結合していることが明らかになっており[2,3]、タンパク質の安定性や光反応に影響があると考えられている[1]。また我々の研究において、Na^+結合サイトと活性中心であるレチナールの間に長距離的な相互作用の存在を示唆していた[4]。

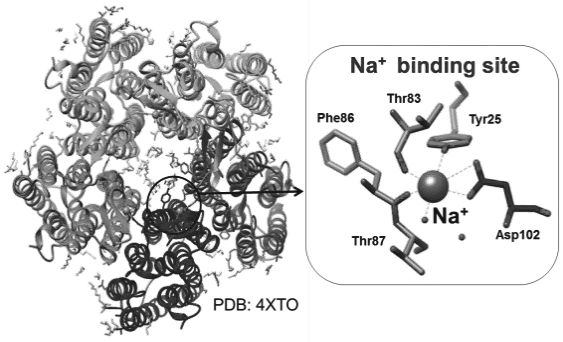


Fig. 1. Oligomeric structure of KR2 and extracellular Na^+-binding site.

固体NMR、膜タンパク質、遅い化学交換

○かねこりな、しげたありす、ながしまとしお、やまざきとしお、いのうえけいいち、かんどりひでき、かわむらいずる

本研究では野生型KR2の、Na^+結合サイトからレチナール結合ポケット間の水素結合ネットワークを明らかにするために、細胞膜に再構成したKR2についてNaCl及びLiCl, CsCl条件下での多次元固体NMRスペクトルを観測した。

【実験方法】KR2のプラスミドDNAを導入した大腸菌C41(DE3)株を用いて、U-^{13}C標識グルコース, $^{15}NH_4Cl$および[14, 20-^{13}C]レチナールを含むM9最少培地で培養し、発現させたタンパク質をHis-tag精製することで[Uniform-^{13}C, ^{15}N], [14, 20-^{13}C] retinal標識WT-KR2を得た。このタンパク質をPOPE:POPG=3:1の脂質膜に、タンパク質:脂質=1:20(モル比)の割合で再構成した。この試料を100 mM NaCl (またはLiCl, CsCl)(pH=8.0)で十分に懸濁したものを用いて測定を行った。NMR測定は、Bruker 600 MHzおよび700 MHzの固体NMR分光計を使用し、温度は278K、MASの回転速度はそれぞれ10 kHz, 15.75 kHzで測定を行った。多次元NMRでは2次元^{13}C-^{13}C 相関のDARRとDREAM、および3次元CANCO, NCOCX, NCACXなどの測定によりタンパク質主鎖の化学シフト値からアミノ酸残基の連鎖帰属情報を得た。また、^{13}C-^{15}N相関のNCO、NCAからアルカリ金属イオン依存的な信号のシフトを観測した。

【結果・考察】測定した2D NMRスペクトルからいくつかのアミノ酸残基の信号がアルカリ金属イオン依存的にシフトしていることを観測した。特に2D NCOスペクトルで観測されたArg領域での信号のシフトに注目した。アルカリ金属イオン依存的な信号のシフトが見られるピークは、R109K変異体のスペクトルよりArg109と帰属した。Arg109はレチナール近傍に位置し、Na^+輸送に関与すると示唆されている。Fig. 2より、Arg109NεとCεの信号が顕著にシフトしていることが観測された。特に、Arg109Nεの信号はCsCl条件下で高磁場シフトしており、Arg109Nεと水素結合しているGln78(B-helix)との相互作用が弱まったことが示唆される。一方で、Arg109の2つのNηのピークは10 ppmほど分離した”wing peaks”として観測された。通常、Argの側鎖の回転によって2つのNη信号は平均化され1つの信号が観測されるが、このArg109 $N\eta_1$と$N\eta_2$によるwing peaksは遅い化学交換に支配されていることが考えられる。つまり、Arg109 Nη部位はAsp251及びGln244と強い水素結合を形成し、この影響からピークの分離が起きていると考えられ、また、Nηのピークにはアルカリ金属イオン依存的な大きなシフトは見られなかったことから、Nηが関与する相互作用にはNa+結合サイトへの直接的な影響は少ない。これらの結果から、Na^+結合サイトの影響によりB-helixのゆらぎが誘起され、特にArg109 NεとGln78との水素結合に変化が生じたと考えられる。

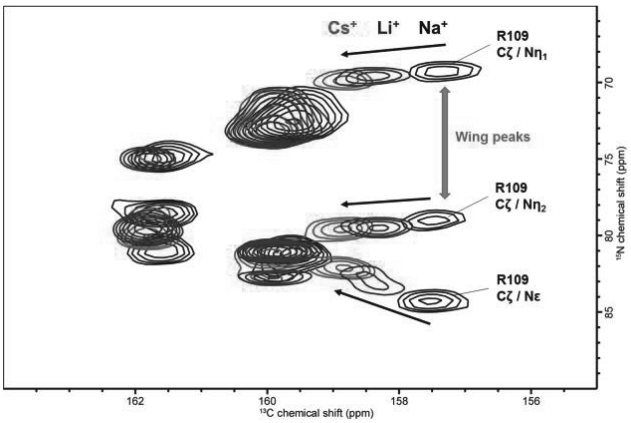


Fig. 2. NCO correlations of Arg signals (NaCl, LiCl, CsCl)

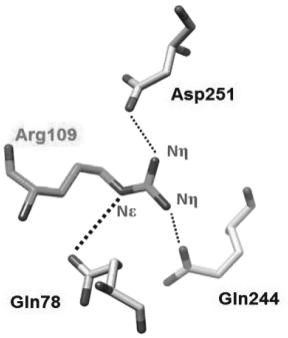


Fig. 3. A view of Arg109 and the surrounding residues.

このことからCsClおよびLiCl条件下では、100 mMのイオン濃度であっても結合サイトにCs^+やLi^+イオンが安定に保持することができず、結合サイトの構造がイオン非結合型に変化し、それがレチナールやArg109周辺の水素結合ネットワークの一部を乱していることが考えられる。

【参考文献】

[1] K. Inoue et al. (2013) *Nat. Commun.*, 4, 1678., [2] I. Gushchin et al. (2015) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 22, 390-395., [3] M. Shibata et al. (2018) *Sci. Rep.,* 8, 8262., [4] A. Shigeta et al. (2018) *PCCP.* 20, 8450-8455.

YP16

多次元固体NMRによるヘリオロドプシンの構造解析

○鈴木しぶき[1]，長島敏雄[2]，金子莉奈[1]，沖津貴志[3]，和田昭盛[3]，小林直宏[2]，山崎俊夫[2]，吉住玲[4]，井上圭一[5]，神取秀樹[4]，川村出[1]
1．横浜国立大学大学院　理工学府，2．理研　RSC，3．神戸薬科大学，4．名古屋工業大学，5．東京大学

Structural analysis of Heliorhodopsin by multidimensional solid-state NMR

○Shibuki Suzuki[1], Toshio Nagashima[2], Rina Kaneko[1], Takashi Okitsu[3], Akimori Wada[3], Naohiro Kobayashi[2], Toshio Yamazaki[2], Rei Abe-Yoshizumi[4], Keiichi Inoue[5], Hideki Kandori[4], Izuru Kawamura[1],
1. Graduate School of Engineering Science, Yokohama National University, 2. RIKEN RSC, 3. Kobe Pharmaceutical University, 4. Nagoya Institute of Technology, 5. University of Tokyo,

Heliorhodopsin is a transmembrane protein with a retinal chromophore that constitutes a new rhodopsin family different from type-1 and type-2 rhodopsin in views of sequence homology, membrane protein topology and function [1]. We performed multidimensional solid-state NMR experiments of a HeR. As a comparison of ^{13}C and ^{15}N NMR signals of the retinal chromophore in HeR with those of other microbial rhodopsins, we have identified the more twisted 13-*trans*, 15-*anti* configuration in HeR. Furthermore, multidimensional chemical shift correlations with MagRO NMR view resulted in the backbone assignments of over 60 amino acid residues.

【序論】ヘリオロドプシン(HeR)はレチナール発色団を有する膜貫通タンパク質であり、配列相同性、膜タンパク質トポロジー及び機能の観点からこれまで発見されてきた微生物型及び動物型ロドプシンとは異なる新しいロドプシンファミリーに属している[1]。レチナールの配座や吸収，細胞膜中でのトポロジー，光反応サイクル、イオン輸送能の有無などが調査されたが，ヘリオロドプシンの機能は現在のところわかっていない。そのため反応中心のレチナール結合部位だけでなく、タンパク質の立体構造の理解はヘリオロドプシンの機能-構造相関を考える上で重要である[1]。固体NMR分光法は脂質二重膜中における膜タンパク質の構造解析に有効であるため、本研究ではヘリオロドプシンの一つである古細菌*Thermoplasmatales archaeon*由来のTaHeRのレチナール及びタンパク質の立体構造の解明を目的とし、1.レチナール発色団(Fig. 1)の^{13}Cと^{15}Nの化学シフト値の他のロドプシンと比較、2.多次元固体NMR測定による細胞膜中でのHeRの構造解析を進めて、ヘリオロドプシンの構造の特徴を調べた。

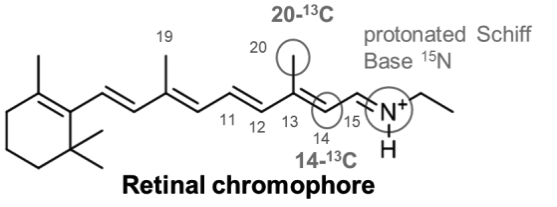


Fig.1 Stable isotope-labeled retinal chromophore in HeR is for C14, C20, and Schiff base nitrogen atoms in this work.

膜タンパク質、固体NMR、ヘリオロドプシン

○すずきしぶき、ながしまとしお、かねこりな、おきつたかし、わだあきもり、こばやしなおひろ、やまざきとしお、よしずみれい、いのうえけいいち、かんどりひでき、かわむらいずる

【実験方法】TaHeRのアミノ酸配列をコードしたプラスミドDNAを大腸菌BL21株に形質転換し, ^{13}C標識グルコース, ^{15}N標識塩化アンモニウムを加えたM9培地で培養した。IPTGを用いた発現誘導後に安定同位体標識all-*trans*型レチナールを加えて培養することで均一^{13}C, ^{15}N標識, 14, 20位-^{13}Cレチナール標識TaHeRを大量発現させた。大腸菌の破砕, 界面活性剤によるタンパク質の可溶化, Ni^{+}-NTAアガロースによる精製後, 吸収スペクトルで定量し, 鮮やかな紫色を呈したタンパク質を得た。このHeRをPOPE:POPG=3:1のリポソームにタンパク質と脂質のモル比1:20で再構成した。水和率をおよそ300%に調整し, 固体NMR試料管にパッキングした。同様にHILVWYとHILVFMKのアミノ酸をそれぞれ非標識にしたリバースラベル標識体も準備した。固体NMR測定はBruker 600 MHz分光計と4.0 mm径試料管用の^{1}H-^{13}C-^{15}N三重共鳴プローブを用い, ^{13}Cと^{15}Nの化学シフト基準物質はDSS, NH_4Clを用いた。マジック角回転MAS条件で^{13}Cおよび^{15}N CP-MAS、2次元^{13}C-^{13}C相関PDSD測定を行い, 主にレチナールの構造を解析した。また, 3.2 mmの３重共鳴プローブとBruker 700 MHzの固体NMR分光計を用いて3次元NMRによるアミノ酸残基の連鎖帰属を試みた。

【結果・考察】**-レチナールの構造-** レチナールの14位-^{13}Cと20位-^{13}Cはそれぞれ15-*syn/anti*, 13-*cis/trans*配座に敏感な信号であるため(Fig. 1), ^{13}C-^{13}C相関PDSD法でTaHeRのスペクトルを測定した結果、13-*trans,* 15-*anti*型の配座であることが確認された。また, ^{15}N CP-MAS法によりTaHeRのスペクトルを測定したところ, レチナールのプロトン化シッフ塩基の^{15}Nの化学シフト値は178.9 ppmであった。これらの化学シフト値を他の微生物型ロドプシンの値と比較したところ、レチナールの^{13}C化学シフト値に有意な差が見られ、Fig. 2の^{15}N化学シフト値と極大吸収波長との相関関係に示されるように、HeRの実験データはモデル化合物の関係から大きく離れたところに位置する。そのためHeRのレチナールの平面性が他のロドプシンとは大きく異なることが判明した。これらの結果より、TaHeRのレチナールは、微生物型ロドプシンと同様の13-*trans,* 15-*anti*型配座であるが、バクテリオロドプシンよりねじれた構造を有すると同定した。これは, 周囲のアミノ酸残基との相互作用が異なることが考えられ, 特にレチナールの20位の炭素は立体障害の影響を受けやすいため、この周囲のアミノ酸残基が影響していると推測する。

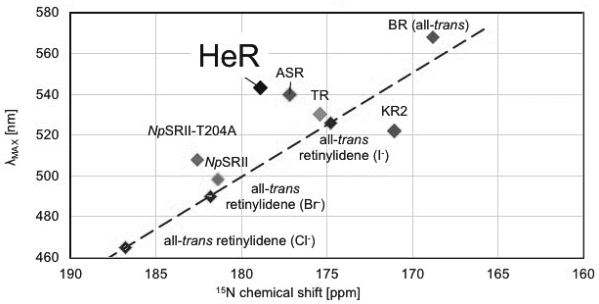


Fig. 2 The relationship with λmax (nm) and ^{15}N chemical shifts of the Schiff base.

-3次元NMR- Fig. 3にはHILVWYリバース標識サンプルの^{13}C-^{13}CのDARRスペクトルを示す。Ala, Ser, Thrなどの分離がなんとか観測された。また、Glu残基の中で側鎖の$^{13}COO^{-}$が極端に低磁場側で現れる信号を同定しており、現在、この信号がレチナールのシッフ塩基の対イオンかどうかを調べている。3次元NMR測定データを用いた連鎖帰属はMagRO-NMR view[2]を利用して進め、現在のところ60アミノ酸残基を超える帰属を達成した。討論会では、他の帰属情報も含めて発表する予定である。

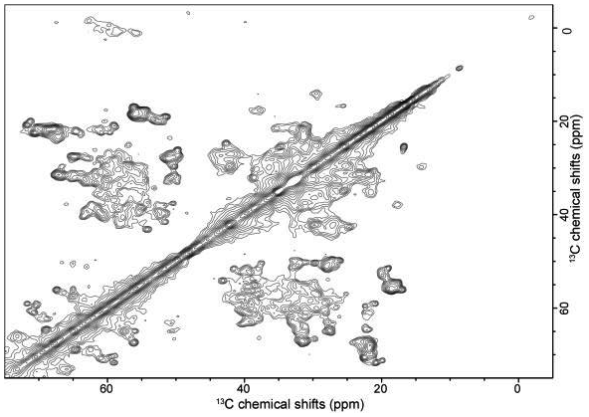


Fig.3 ^{13}C-^{13}C DARR of reverse-labeled HeR at mixing time 20 ms.

【参考文献】

[1] A. Pushkarev et al. (2018) *Nature*, **558,** 595-599.

[2] N. Kobayashi et al. (2012) *J. Biomol. NMR,* **53**, 311-320.

YP17

Structural characterization of Aβ(1-42) fibril in nano-mole scale by ^{1}H-detected SSNMR under UFMAS

Ayesha Wickramasinghe[1,2,3], Yiling Xiao[3], Naohiro Kobayashi[2], Yoshitaka Ishii[1,2,3]

[1]*Department of Life Science, Tokyo Institute of Technology, Yokohama, Japan*

[2]*Advanced NMR Application and Platform Team, RIKEN SPring-8 Center, Yokohama, Japan*

[3]*Department of Chemistry, University of Illinois at Chicago, Chicago, USA*

Misfolded amyloid-beta (Aβ) is a hallmark in AD.[1] Among the different Aβ species present in AD brain, 42-residue Aβ (Aβ(1-42)) fibril is considered as the most pathogenic species since it exhibits higher neurotoxicity and aggregation propensity. Therefore, structural characterization of Aβ(1-42) fibril is crucial for a profound understanding of AD. However, due to its insoluble and non-crystalline nature, it has been difficult to characterize Aβ(1-42) and other amyloid fibrils by conventional structural tools such as solution NMR and X-ray crystallography. SSNMR spectroscopy has proven to be a powerful tool for determining the atomic level structure of Aβ fibrils.[2-4] Nevertheless, structural heterogeneity of these fibrils greatly challenges the preparation of samples suited for SSNMR analysis. Also, previous studies on structure elucidation of Aβ(1-42) by SSNMR relied on ^{13}C-detected SSNMR,[2-5] which generally requires a large amount of sample.

In this work, we discuss a novel approach of sequential assignment for Aβ(1-42) fibril by ^{1}H-detected SSNMR under ultra-fast MAS (UFMAS) at 90 kHz and automated assignment software called MagRo-NMRView (upgraded version of Kujira, a package of integrated tools for NMR analysis[6]). A new protocol has been established in our lab to produce conformationally homogeneous ^{13}C-and ^{15}N-uniformly labeled Aβ(1-42) fibril using bacterial protein expression incorporated with a seeding method for an efficient structural characterization.

Dramatic enhancement of ^{1}H resolution by UFMAS at 90 kHz and excellent sensitivity by ^{1}H-detected SSNMR permitted us to assign most of the resonances in both protein backbone and side chains using only ~60 nmol (300 μg) of fibril sample. We recorded CANH, CA(CO)NH and CA(CON)CAH 3D experiments to assign chemical shifts of backbone $^{13}C_{\alpha}$, ^{15}N, $^{1}H_{N}$ and $^{1}H_{\alpha}$ nuclei of Aβ(1-42) fibril. Here, we were able to assign 93% of $^{13}C_{\alpha}$, ^{15}N and $^{1}H_{N}$ resonances and, 90% of $^{1}H_{\alpha}$ resonances of the structured region. Additionally, side chain chemical shifts were assigned using a combined analysis of CCH and CX(CA)NH 3D experiments and, C-C correlation 2D experiment. Spectral data allowed us to identify 73% of ^{13}C and 51% of ^{1}H signals from the side chains.

Moreover, secondary chemical shift analysis performed from the assigned $^{13}C_{\alpha}$ and $^{13}C_{\beta}$ chemical shifts to identify the secondary structural elements shows the Aβ(1-42) fibril analyzed here was composed of 4 β-strands in the residues 10-15, 18-21, 26-28 and 39-42. A comparison of the assigned resonances and the locations of the β-strands suggest that the structure of the Aβ(1-42) fibril studied here is likely distinct from previously reported Aβ(1-42) fibril structures.[2-5] We also discuss an approach to elucidate distance constraints for the sample by ^{1}H-detected SSNMR.

Aβ fibrils, SSNMR, Ultra-fast MAS

References

1. Alzheimer's Association, *Alzheimer's & Dement.* (2019) 15, 321-387
2. Y. Xiao, B. Ma, D. McElheny, S. Parthasarathy, F. Long, M. Hoshi, R. Nussinov, Y. Ishii, *Nat. Struct. Mol. Biol.* (2015) 22, 499-505
3. M. T. Colvin, R. Silvers, Q. Z. Ni, T. V. Can, I. Sergeyev, M. Rosay, K. J. Donovan, B. Michael, J. Walls, S. Linse, R. G. Griffin, *J. Am. Chem. Soc.* (2016) 138, 9663-9674
4. M. A. Walti, F. Ravotti, H. Arai, C. G. Glabe, J. S. Wall, A. Bockmann, P. Guntert, B. H. Meier, R. Riek, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (2016) 113, E4976-E4984
5. L. Gremer, D. Scholzel, C. Schenk, E. Reinartz, J. Labahn, R. B. G. Ravelli, M. Tusche, C. Lopez-Iglesias, W. Hoyer, H. Heise, D. Willbold, G. F. Schroder, *Nat. Struct. Biol.* (2017) 358, 116-119
6. N. Kobayashi, J. Iwahara, S. Koshiba, T. Tomizawa, N. Tochio, P. Guntert, T. Kigawa and S. Yokoyama, *J. Biomol. NMR* (2007) 39(1), 31-52.

YP18

固体DNP-NMRによる高分子材料の構造解析

○田中 真司[1]，小川 敦子[1]，中島 裕美子[1]，佐藤 一彦[1]
1産業技術総合研究所 触媒化学融合研究センター

DNP-enhanced solid-state NMR spectroscopy for structural characterization of organic polymer materials

○Shinji Tanaka [1], Atsuko Ogawa [1], Yumiko Nakajima [1], Kazuhiko Sato [1]
1 Interdisciplinary Research Center for Catalytic Chemistry, AIST

Solid-state nuclear magnetic resonance (SSNMR) spectroscopy has been a powerful tool to provide structural information of solid materials at the molecular level, yet the key challenge to its broader applications has been the low sensitivity. In recent decades, dynamic nuclear polarization (DNP) enhanced SSNMR spectroscopy has enabled the detailed structural characterizations of inorganic and organic materials. Cross-linked organic polymers are useful solid materials for a variety of applications, and a representative one is a support of solid-phase organic synthesis and catalysis. While SSNMR has been particularly useful to investigate cross-linked organic polymers, the application of DNP enhanced SSNMR to those has been scarce so far. Herein we developed the guideline for DNP-NMR spectroscopy of cross-linked organic polymers. The developed guideline allowed us to perform the characterization of polystyrene-supported ammonium salt catalysts by ^{15}N NMR using natural abundance (0.37%) samples.

固体 NMR は、高分子材料の局所構造や運動性を明らかにする手段として極めて有用である。しかし、NMR の原理的な感度の低さから、材料中に含まれる微量の化学種の解析には長時間の積算を必要としていた。近年、動的核分極 (Dynamic Nuclear Polarization; DNP) を駆使する固体 NMR が、固体材料の高感度解析手法として注目されている [1]。DNP-NMR では、適切なラジカル化合物共存下、マイクロ波照射により電子スピンから原子核への分極移動を引き起こすことで、^{1}H 核において最大で 660 倍の感度向上が見込まれる。NO ラジカルを適切な距離で有するビラジカル化合物 (Figure 1a) を分極剤とした DNP-NMR が、様々な材料を対象とし

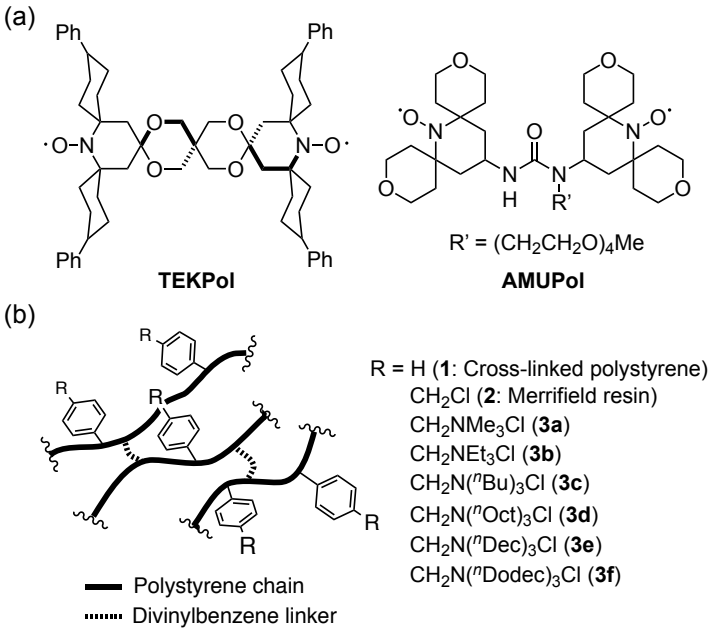


Figure 1. Structure of polarizing agents (a) and model structure of cross-linked polystyrenes (b)

DNP-NMR、高分子材料、膨潤度

○たなかしんじ、おがわあつこ、なかじまゆみこ、さとうかずひこ

て研究されてきた。シリカ等の無機材料においては、効率的な感度向上 (~200 倍) が達成されているものの、高分子材料を対象とする研究例は少なく[2]、特に固体 NMR の研究対象として重要な架橋型の不溶性ポリマーは未開拓であった。我々は、架橋ポリスチレン (PS) 担持型触媒 (Figure 1b) の開発を進めてきたが[3]、従来の触媒分析手法 (元素分析、赤外分光法など) では触媒活性点の解析が困難であり、新たな分析手法の確立が課題となっていた。今回、不溶性ポリマーに適用可能な DNP-NMR 測定法を確立し、量子化学計算を組み合わせることで、活性点であるアンモニウム塩の精密なコンホメーション解析に成功したので報告する。

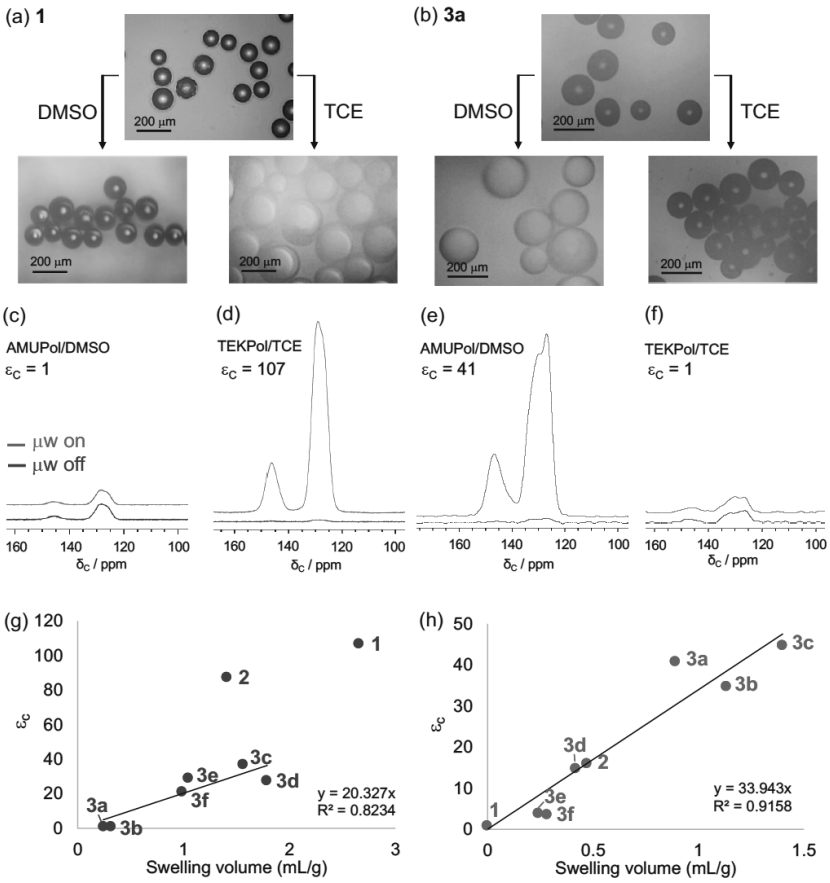


Figure 2. Photographs of polymer beads before and after the swelling (a, b), DNP-enhanced ^{13}C CPMAS NMR spectra of **1** (c, d) and **3a** (e, f) recorded with AMUPol/DMSO and TEKPol/TCE, and plots of DNP-enhancement (ε_C) versus swelling volume of polymers with TCE (g) and DMSO (h)

不溶性ポリマーの DNP-NMR 測定にあたり、分極剤がポリマー全体に均一に分散するサンプル調製法が重要となる。我々は、サンプル調製の指針としてポリマーの膨潤特性に合わせた分極剤溶液の選択が鍵となると考えた。DNP-NMR 測定においては、TEKPol/1,1,2,2-tetrachloroethan (TCE) 溶液や AMUPol/dimethylsulfoxide (DMSO) 溶液が分極剤溶液として用いられる。そこで、まずポリマーの TCE と DMSO に対する膨潤度を調べた。非修飾 PS (**1**) が DMSO に比べて TCE 中で膨潤するのに対し、NMe_3Cl 修飾 PS (**3a**) は逆の膨潤特性を示した (Figure 2a, b)。それぞれのポリマーにおいて、TEKPol/TCE、AMUPol/DMSO を分極剤として ^{13}C 核での DNP 効果 (ε_C) を測定したところ、膨潤しやすい分極剤溶液を用いた場合に高いε_C が得られた (Figure 2c-f)。種々のポリマー (**1**, **2**, **3a-f**) について、ε_C と膨潤度の関係をプロットしたところ、高い膨潤度を示す場合に高いε_C を示す傾向が見られた (Figure 2g, h)。TEKPol/TCE ではアンモニウム塩により置換されたポリスチレン **3a-f** で直線関係が得られ、非修飾 PS (**1**) やクロロメチル化 PS (**2**) ではこれらより高い値が得られた。この知見をもとに、様々なアルキルアンモニウム塩修飾 PS の、天然存在比での ^{15}N NMR による構造解析を行った。アルキル基の炭素数が 2 以上のポリマー (**3b-f**) では二種類の ^{15}N シグナルが観測された。これらのシグナルは DFT 法によるケミカルシフト計算値と比較することで、4 級窒素周りのアルキル基のコンホメーションの異なる異性体に由来することがわかった[4]。

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) の委託業務 (P16010) の結果得られたものです。

1. Griffin, R. G. *et al. J. Chem. Phys.* **2008**, *128*. 052211. 2. Viel, S. *et al. ACS Macro. Lett.* **2013**, *2*, 715-719. 3. 産業技術総合研究所、特開2017-155001. 4. Naudin, C. et al. *J. Raman Spectrosc.* **2000**, *31*, 979-985.

YP19

医薬製剤に含まれる薬物の結晶状態評価を目的とした T_1およびT_2緩和の解析

○岡田康太郎[1]，林 祥弘[2]，熊田俊吾[2]，大貫義則[1]
1　富山大学　大学院医学薬学研究部
2　日医工株式会社

Analysis of T_1 and T_2 relaxation for evaluating the crystalline state of drugs in pharmaceutical formulations

○Kotaro Okada[1], Yoshihiro Hayashi[2], Shungo Kumada[2], Yoshinori Onuki[1]
1 *Graduate school of Medicine and Pharmaceutical Sciences, University of Toyama*
2 *Nichi-Iko Pharmaceutical Co., Ltd.*

The purpose of this study is to demonstrate the usefulness of T_1 and T_2 relaxation measured by time domain NMR (TD-NMR) method for characterization of the crystalline state of drugs in pharmaceutical formulations. First, this study measured the ^{1}H T_1 and ^{1}H T_2 relaxation of crystalline and amorphous indomethacin (IMC). From the result, we confirmed that both the T_1 and T_2 relaxation times measured by TD-NMR were effective parameters to distinguish between crystalline and amorphous states in IMC powders. In the next phase, this study examined the physical mixture of IMC with polyvinylpyrrolidone (PVP) and their solid dispersion. The result clarified that T_1 relaxation enables evaluation of not only the crystalline form of IMC but also the miscibility of IMC and polymers.

【序論】

錠剤に代表される固形製剤の開発において、難水溶性の薬物の割合が増加しており、溶解性を向上させるため、さまざまな手法が利用されている。たとえば、薬物の非晶質化は、薬物の溶解性を向上させる代表的な製剤技術であり、その結晶状態の評価は重要な検討項目である。

近年、医薬品の製造において、リアルタイムに製品の品質を保証するシステムが必須となりつつあり、迅速な分析手法が求められている[1)]。従来の結晶状態の分析方法として、粉末X線回折法（PXRD）や近赤外分光法などが挙げられ、製薬業界で利用されている。しかし、それぞれ、定量下限やモデルの複雑さといった課題があり、相補的な評価方法が求められている。そこで本研究では、固形成分であっても短時間で分析できる緩和を利用して、固形製剤に含まれる薬物の結晶状態を評価した。

【方法】

難溶性薬物のインドメタシン（IMC）をモデル薬物、ポリビニルピロリドン（PVP）を添加剤として選択し、IMCの結晶および非晶質粉末の^{1}H T_1および^{1}H T_2緩和を時間領域NMR（minispec mq20；Bruker）にて測定した。非晶質粉末は溶融急冷法にて作成し、PXRDにて非晶質状態を確認した。

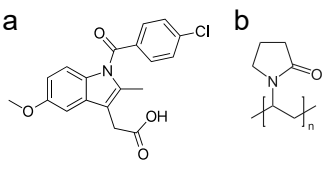


Figure 1. Chemical structure of indomethacin (a) and polyvinylpyrrolidone (b).

緩和、医薬品、結晶形

○おかだこうたろう，はやしよしひろ，くまだしゅんご，おおぬきよしのり

【結果・考察】

T_1およびT_2緩和時間を算出した結果、いずれのパラメータも結晶形を区別するのに有効であった。特にT_1緩和挙動では、結晶および非晶質に大きな差が認められ、結晶のT_1は非晶質のそれと比べて著しく延長した[2)]。一方で、T_2緩和挙動では、わずかな差であるものの、結晶のT_2は非晶質のそれと比べて有意に短縮した[3)]。

続いて、非晶質IMCを任意の割合でPVPに配合した物理混合物（physical mixture；PM）および固体分散体（solid dispersion；SD）を調製し、それらの固形製剤に含まれる薬物の結晶状態を評価した。T_1緩和の場合、PMはIMCとPVPの緩和曲線を重ね合わせた二相性の挙動を示した（Fig. 2a）。一方で、SDは試料の組成によって変化したものの、PMとは異なり、単相性の挙動を示した（Fig.2b）[2)]。

非晶質IMCとPVPの混和性を議論するために、式（1）を用いて、スピン拡散の最大拡散距離を考慮すると、T_1緩和挙動では、PM中のIMCとPVP粒子は別々のドメインとして区別されるのに対し、SD中のIMCとPVPはナノメートルレベルで均一に混和し、SDは単一の構造物と見なされることが明らかになった。

$$L = \sqrt{6DT_1} \tag{1}$$

ここでLは最大拡散距離、Dは拡散係数、T_1はT_1緩和時間を示す。一方で、T_2緩和挙動の場合、PMおよびSDのどちらの試料も単相性を示した（Fig. 3c, d）[3)]。

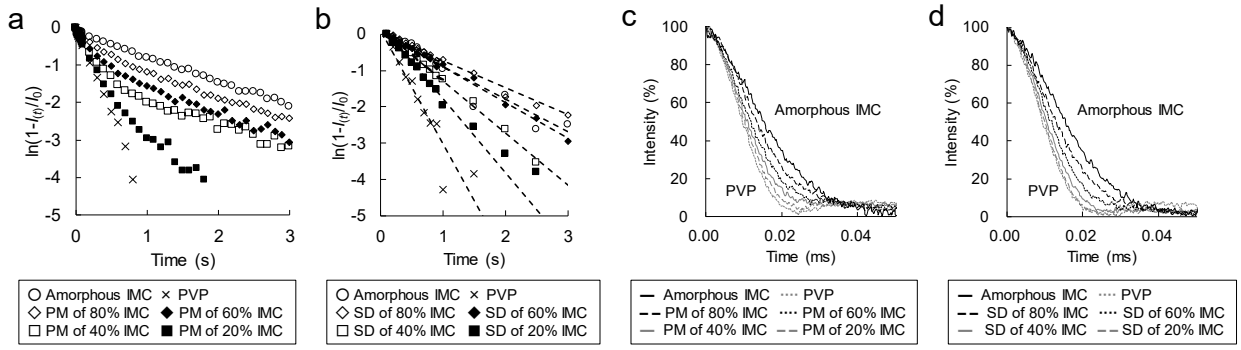


Figure 2. T_1 relaxation (a and b) and T_2 relaxation (c and d) of indomethacin (IMC) mixtures. For the preparation of physical mixture (PM; a and c) and solid dispersion (SD; b and d), indomethacin was mixed with polyvinylpyrrolidone (PVP) in arbitrary weight ratios.

以上の結果から、T_1およびT_2緩和では観測する領域のサイズが異なり、T_1緩和のほうが、より狭い領域の分子状態を観測することが示された。すなわち、T_1緩和からは製剤に含まれる薬物と添加剤の混和性に関する情報が得られる。一方で、T_2緩和を用いれば、構成物の粒子サイズや混合度合いに関わらず、結晶状態を評価できることが示唆された。当日は、T_2緩和を利用した固形製剤に含まれる結晶多形の定量方法について、併せて評価結果を報告する。

【参考文献】

1) U.S. Food and Drug Administration. Guidance for Industry PAT — A Framework for Innovative Pharmaceutical Development, Manufacturing, and Quality Assurance. (2004).
2) Okada K., Hirai D., Kumada S., Kosugi A., Hayashi Y., Onuki Y. *J. Pharm. Sci.*, **108**, 451–456 (2019).
3) Okada K., Hirai D., Hayashi Y., Kumada S., Kosugi A., Onuki Y. *Chem. Pharm. Bull.*, **67**, 580-586 (2019).

YP20

多孔性金属錯体中に高濃度集積したアセン化合物におけるスピン偏極生成

○折橋佳奈[1], 藤原才也[1], 立石健一郎[4], 上坂友洋[4], 君塚信夫[1,2], 楊井伸浩[1,2,3]
[1]九大院工, [2]九大 CMS, [3]JST さきがけ, 4 理研・仁科セ

Generation of spin polarization with orientation controlled acene derivatives in MOF

○Kana Orihashi[1], Saiya Fujiwara[1], Kenichiro Tateishi[4], Tomohiro Uesaka[4], Nobuo Kimizuka[1 2], Nobuhiro Yanai[1 2 3],
[1] *Dept. Chemistry and Biochemistry., Kyushu Univ.,* [2] *CMS, Kyushu Univ.,* [3] *JST-PRESTO,*
[4] *RIKEN Nishina Center for Accelerator-Based Science*

Triplet dynamic nuclear polarization (triplet-DNP), which is a technique that transfers polarization of photoexcited triplet electrons to nuclei, can enhance sensitibity of NMR or MRI at room temperature. Conventional triplet-DNP systems, however, have been limited to organic crystals or glasses doped with very small amount of polarizing agents. This is because of the spin-lattice relaxation caused by aggregation of the polarizing agents and their varied molecular orientations occurring at high doping ratio. In this work, we avoid the electron spin-lattice relaxation by controlling the orientation of polarizing agent in the crystalline lattices of metal-organic frameworks (MOF) and investigated spin polarization behaviors in the MOFs.

【緒言】

電子スピンの高偏極状態を移行することで核スピンを高偏極化する動的核偏極法(DNP)はNMRやMRIの感度を飛躍的に向上させる技術であり、なかでも三重項電子の偏極を利用するtriplet-DNP法は室温かつ低磁場で高偏極化が達成できる手法として近年注目を集めている。triplet-DNPにおいては、これまでに有機結晶[1]やガラス中[2]、多孔性金属錯体(MOF)中などに偏極源を少量ドープし、マトリックスを高偏極化した例が報告されているが、凝集により配向の異なる偏極源同士が近接すると電子偏極の緩和が生じるため、偏極源を高濃度に配置した系については未だ報告されていない。

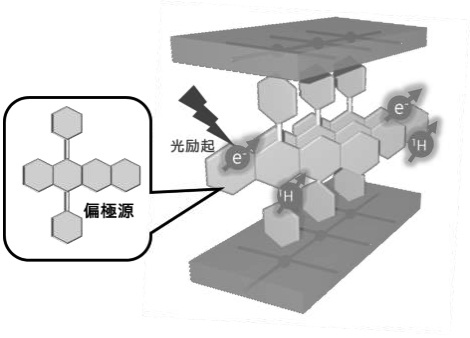


Fig.1 Schematic image of aligned polarization agent in a MOF.

本研究は金属イオンと有機配位子からなるMOFを用いて偏極源の配向制御を行い、偏極源を高濃度に配置した系における偏極緩和の抑制を目指しており、今回、MOF骨格中に組み込まれ配向の揃ったジアザテトラセン誘導体DPyDATにおけるスピン偏極の評価を行ったので報告する。

三重項電子　スピン偏極　MOF

○おりはしかな, ふじわらさいや, 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, やないのぶひろ

【実験】

DPyDAT (Fig. 2) を配位子、4,4'-bibenzoic acid (BPDC)を補助配位子として用いた MOF ($\{[Zn_2(BPDC)_2(DPyDAT)]_3\}_n$)を合成し、X 線単結晶構造解析によって構造の評価を行った。励起光として波長 532 nm のパルスレーザーを用いた Ar 雰囲気下・室温条件での時間分解 ESR 測定によって励起三重項状態の評価を行った。

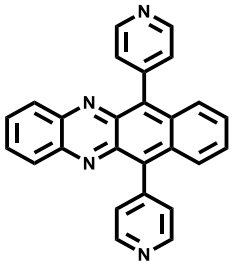


Fig.2 Chemical structure of DPyDAT.

【結果と考察】

単結晶構造解析を行った結果、結晶中でジアザテトラセン部分が一方向に配向していることが確認された(Fig. 3)。

時間分解 ESR 測定の結果、DPyDAT が独立して存在する状態(toluene , 120 K)と同様に、非熱平衡状態にある励起三重項に特有な形状の ESR スペクトルが得られ (Fig. 4a)、353 mT 付近のピークの減衰がマイクロ秒オーダーであったことから (Fig. 4b)、MOF 中に DPyDAT の偏極した励起三重項が生成し、密な構造内でも偏極が失われていないことが示唆された。当日は DPyDAT の配向が異なる複数の MOF について同様の評価を行った結果に関しても発表する予定である。

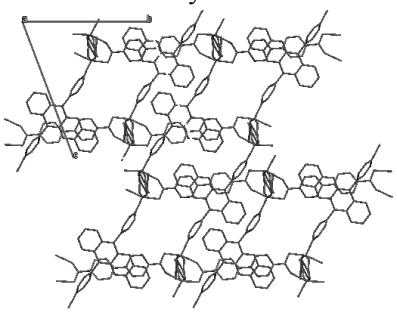


Fig.3 Crystal structure of the MOF.

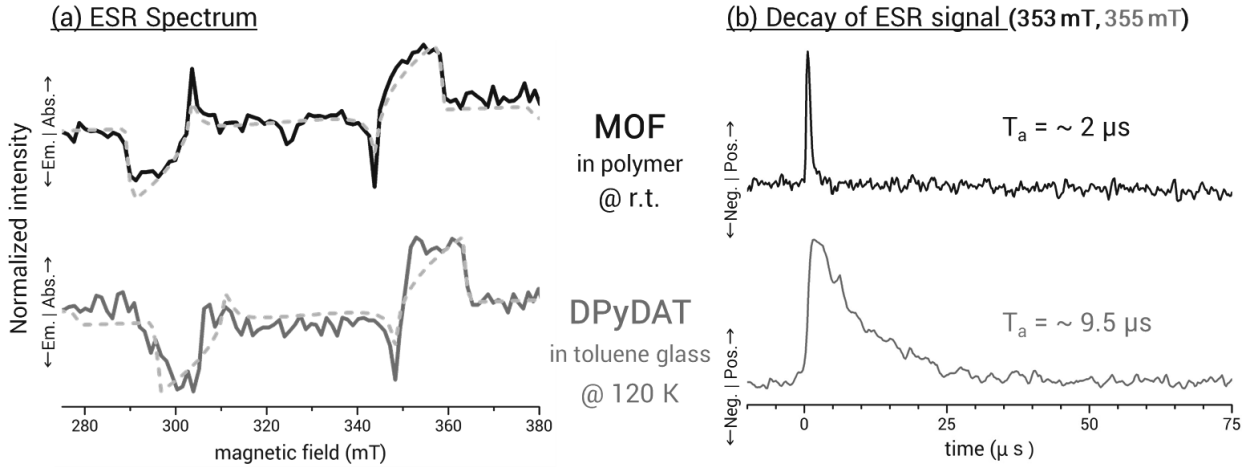


Fig.4 Time-resolved ESR spectra (a) and (b) ESR signal decay of the MOF and DPyDAT.

References

1. K. Tateishi, M. Negoro, A.Kagawa, and M. Kitagawa., *PNAS*, **2014**, *111*, 7529.
2. K. Tateishi, M. Negoro, S. Nishida, A.Kagawa, Y.Morita, and M. Kitagawa. *Angew. Chem. Int. Ed*. **2013**, 52, 13307.
3. S.Bayliss, F.Kraffert, R.Wang, C. Zhang, R.Bittl, and J. Behrends. *J. Phys. Chem. Lett.*, **2019**, *10*, 1908.

YP21

磁場掃引を用いたSWIFT法

○小林洋太，竹腰清乃理，武田和行
京都大学大学院 理学研究科 化学専攻

Sweep Imaging with Fourier Transformation (SWIFT) implemented by magnetic-field sweep

○Youta Kobayashi, K. Takegoshi, and Kazuyuki Takeda
Division of Chemistry, Graduate School of Science, Kyoto University

SWIFT (SWeep Imaging with Fourier Transformation) is an MRI technique with unique features such as fast and quiet imaging, and compatibility with nuclei having short T_2. In SWIFT, rf irradiation is applied in such a way that the resonance of the spins is swept over in the presence of stationary magnetic-field gradient. Here, we report a variant of the SWIFT method, in which the magnetic field is swept over by employing an extra coil, whereas in original SWIFT, the frequency of the excitation signal is swept. Since the frequency is fixed throughout the measurement, the proposed approach is compatible with highly sensitive signal detectors with a limited bandwidth. Examples of such include a cryogenically cooled probe and Electro-mechano-optical (EMO) NMR.

【背景】

MRI 撮像法の一つである Sweep Imaging with Fourier Transformation (SWIFT)[1]は、T_2 が短くエコー法では困難な系でも適用でき、また撮像が高速かつ騒音が少ないといった利点を持っている。SWIFT 法 (Fig. 1(a)) では、照射するパルスの振幅と周波数を共に変調させながら断続的に励起と観測を行うが、照射ラジオ波の周波数を掃引するため、共振回路の周波数特性による影響や、帯域幅の制限を受ける。本研究では、励起パルスの周波数ではなく、静磁場を掃引する SWIFT 法 (Fig. 1(b)) を提案する。これにより、極低温の高 Q 値プローブや、Electro-mechano-optical (EMO) NMR[2]のような、高感度が期待されるが狭帯域の観測法を用いても、傾斜磁場コイルと、静磁場掃引コイルを実装することにより MRI 撮像が可能になる。

【磁場掃引 SWIFT の理論】

磁場掃引 SWIFT において励起はラジオ波強度 $\omega(t)$ と磁場オフセット $\Delta B(t)$ の 2 関数によって特徴付けられる。ΔB の効果を位相に押し込めると、励起は

$$x(t) = \omega(t) \cdot \exp\left[i \int \left(-\gamma \Delta B(t)\right) \mathrm{d}t\right] \tag{1}$$

と単一の関数で表せる。励起に対応する回転座標系、すなわち回転速度が可変な回転座標系でのスピンの応答 $r(t)$ は、

$$r(t) = h(t) \otimes x(t) \tag{2}$$

MRI、SWIFT、Electro-mechano-optical (EMO) NMR

○こばやしようた、たけごしきよのり、たけだかずゆき

となる。ここで、$h(t)$ はパルス NMR における FID、すなわち回転速度が一定の回転座標系での応答に相当し、$\otimes$ は convolution を表す。式(2) をフーリエ変換することにより、convolution は積になる。

$$R(\omega) = H(\omega)X(\omega) \tag{3}$$

ここで $R(\omega)$、$H(\omega)$、および $X(\omega)$ はそれぞれ $r(t)$、$h(t)$、および $x(t)$ にフーリエ変換をほどこした関数である。ここからスペクトル $H(\omega)$ が

$$H(\omega) = \frac{R(\omega)}{X(\omega)} = \frac{R(\omega)X^*(\omega)}{|X(\omega)|^2} \tag{4}$$

により得られる。

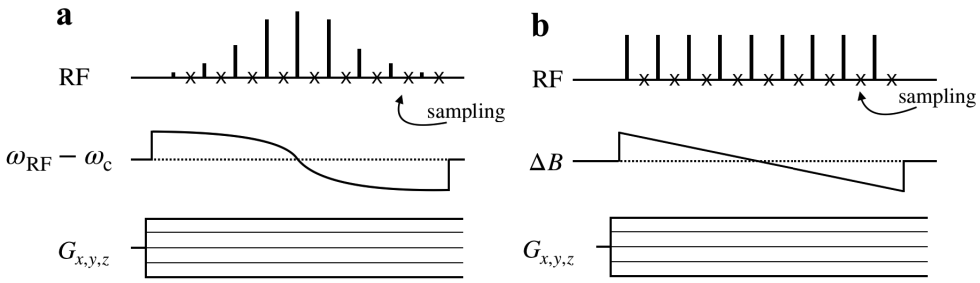


Fig. 1. Sequences for **a.** the original version of SWIFT, and **b.** field-swept SWIFT

磁場掃引 SWIFT におけるデータ処理の一連の流れを Fig. 2 に示す数値計算により得た図を用いて説明する。スピン系が線幅 100 Hz のローレンツ型共鳴線を示す場合、12.8 ms の間に磁場をオフセット 0.185 ～ −0.185 mT の範囲で線形に掃引しながら強度一定のラジオ波で励起を行うと、Fig. 2(a) のような信号 $s(t)$ が得られる。$x(t)$ に対する応答 $r(t)$ は、

$$r(t) = s(t) \cdot \exp\left[-i \int \left(-\gamma \Delta B(t)\right) \mathrm{d}t\right] \tag{5}$$

によって求められる (Fig. 2(b))。この $r(t)$ をフーリエ変換した $R(\omega)$ (Fig. 2(c)) を、さらに $X(\omega)$ で除算すれば、$H(\omega)$ に相当するスペクトル (Fig. 2(d)) が得られる。

この手法をイメージングに応用するためには、従来の SWIFT 法と同様に、様々な組み合わせの x、y、z の 3 方向の傾斜磁場の存在下で測定を行い、back-projection 法などによって画像の再構成を行えばよい。

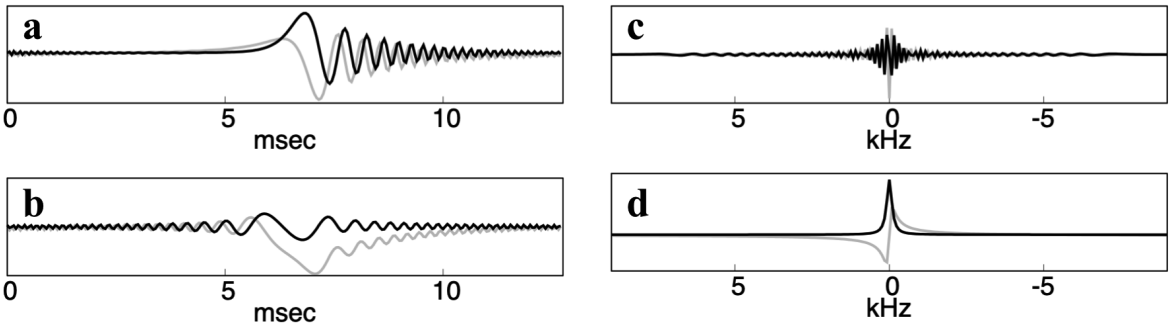


Fig. 2. a. Calculated response $s(t)$ of a ^{1}H spin system having a Lorentzian resonance line with a width of 100 Hz to an rf excitation with a constant amplitude in the presence of a linear field sweep over 0.37 mT during 12.8 ms. **b**. $r(t)$ calculated from Eq. (5), and **c**. its Fourier transformation $R(\omega)$. **d.** The spectrum $H(\omega)$ obtained using Eq. (4). Dark and light lines represent the in-phase and quadrature components of the complex signals.

【MRI プローブの製作と MRI 画像】



Fig. 3. A homemade MRI probe equipped with x, y, z-field gradient coils and an additional field-sweep coil.

直径 18 mm、長さ 12 mm のソレノイドコイルを用いて 200 MHz で共振する LC 回路を製作した。そこに 3 方向に勾配磁場をかけるためのコイルと z 方向に磁場掃引を行うためのコイルを円筒に巻きつけ、ワイドボア超伝導マグネットに挿入可能なプローブを製作した(Fig. 3)。

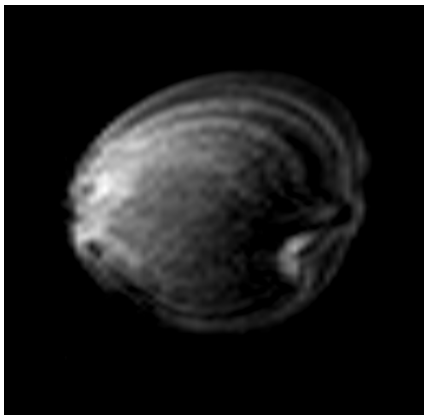


Fig. 4. ^{1}H image of a delaware grape obtained with the conventional spin echo imaging sequence.

この自作の MRI プローブと自作の分光計を用いて、200 MHz の静磁場で通常の MRI 測定に用いられるスピンエコーイメージングを行った。 Fig. 4 は選択励起パルスによってデラウェアぶどうの厚み 0.6 mm を撮像したものである。自作プローブとシステムが正常に動作していることが確認できた。

【磁場掃引 SWIFT の予備実験と結果】

内径 9 mm のガラス球に入れた 0.1 mol/L 硫酸銅水溶液に対し、Fig. 1(b) に示すシーケンスを傾斜磁場をかけずに、0.37 mT の範囲を 12.8 ms で磁場掃引して行ったところ、Fig. 5(a) に示す信号 $s(t)$ が得られた。これを前述の手順でデータ処理することで Fig. 5(b) に示すスペクトル $H(\omega)$ を得た。これは、1-pulse NMR 実験によって得られたスペクトル (Fig. 5(c)) に相当する。線幅が太いのは磁場掃引に用いる磁場の不均一性のためであり、磁場掃引用コイルを適切にデザインすることで解決可能である。以上から、提案する磁場掃引型励起法により信号取得が適切にできることが実証された。

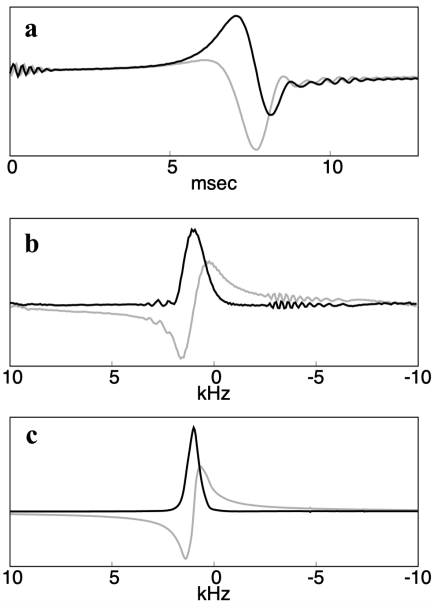


Fig. 5. a. Response $s(t)$ of ^{1}H spins in 0.1 mol/L aqueous solution of $CuSO_4$. **b.** The spectrum $H(\omega)$ obtained from the response. **c.** A spectrum obtained from a 1-pulse experiment. Dark and light lines represent the in-phase and quadrature components of the complex signals.

次に、一方向にさまざまな強度の傾斜磁場を与えたまま、同様の測定を行った (Fig. 6(a))。これらの信号から得られたスペクトル (Fig. 6(b)) は傾斜磁場方向のスピンの分布の投影を表している。またスペクトルを逆フーリエ変換して得られた時間領域の信号 (Fig. 6(c)) は

$$h(t) = \int M(\vec{r}) \exp\left(i\gamma \vec{G} \cdot \vec{r}t\right) \mathrm{d}t = \int M(\vec{r}) \exp\left(i\vec{k} \cdot \vec{r}\right) \mathrm{d}t \tag{6}$$

で表される。ここで $M(\vec{r})$ は撮像する物体の核磁化分布である。三方向の傾斜磁場 $\vec{G}$ をさまざまに組み合わせてデータを取得することで、極座標系において k 空間を放射状に充填し、それを直交座標系に再配置し、多次元フーリエ変換を行うことで、もとの $M(\vec{r})$ を反映した画像を得ることができる。

従来の周波数掃引型の SWIFT で Fig. 6 と同等のデータを取得するためには、10 kHz 程度の帯域幅が必要となる。一方、今回の磁場掃引型の実験において要求される検出系の帯域幅は 10 kHz よりずっと狭い。[2] で報告された、ラジオ周波数の信号を光に変換する EMO NMR の検出帯域幅は約 100 Hz であり、従来の MRI 手法に適用することが困難であるが、磁場掃引型 SWIFT は EMO NMR との親和性が高いことが期待できる。

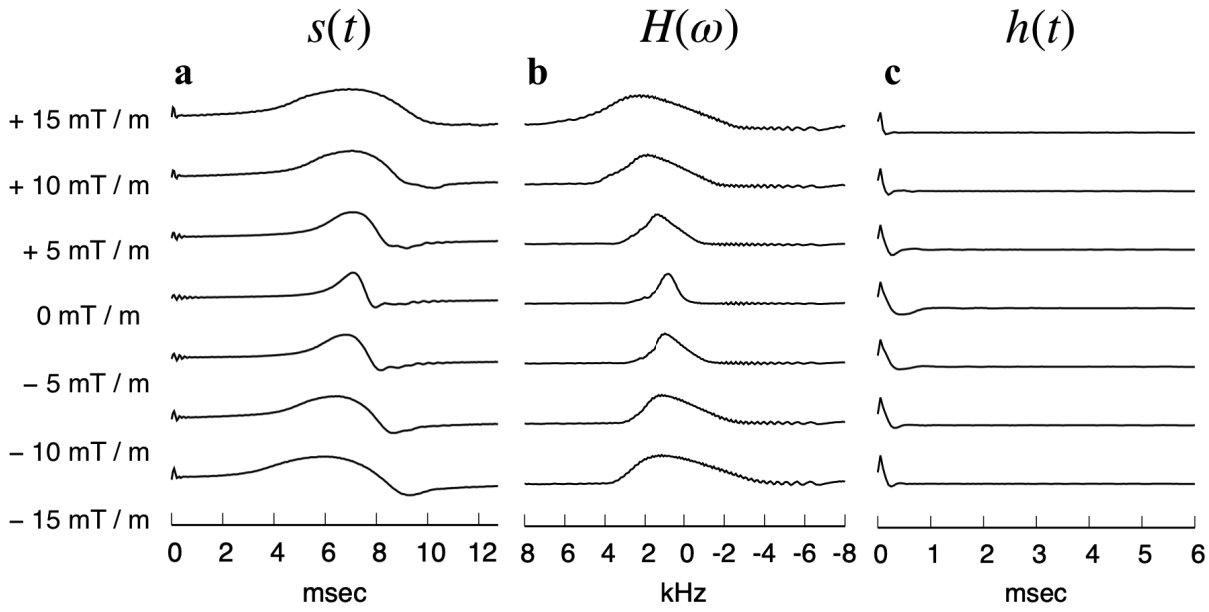


Fig. 6. a. Responses $s(t)$ of ^{1}H spins in aqueous solution of $CuSO_4$ in a spherical glass with an inner diameter of 9 mm under application of magnetic-field gradient along the coil axis for various strengths, whence the spectrum $H(\omega)$ and the FID $h(t)$ were calculated, as shown in **b** and **c**.

【謝辞】

本研究は JSPS 科研費 基盤研究(A)「光検出磁気共鳴イメージング」(18H04165)の助成を受けて実施された。

References

[1] D. Idiyatullin, C. Corum, J.-Y. Park, M. Garwood, *J. Magn. Reson.* **181** (2006) 342–349.

[2] K. Takeda, K. Nagasaka, A. Noguchi, R. Yamazaki, Y. Nakamura, E. Iwase, J.M. Taylor, K. Usami, *Optica* **5** (2018) 152–158.

YP22

深度・運動性・化学シフトの3次元CSIのパルス系列及び疑似スペクトル画像法の開発

○伊藤研悟[1,2], 坪井裕理[1], 菊地淳[1,2,3]
[1]理化学研究所 環境資源科学研究センター
[2]横浜市立大学大学院 生命医科学研究科
[3]名古屋大学大学院 生命農学研究科

Development of the 3D CSI Pulse Sequences for the Depth-Motility-Chemical Shift Correlation Spectra and Pseudo 2D Spectral Imaging Method

○Kengo Ito[1,2], Yuuri Tsuboi[1], Jun Kikuchi[1,2,3]
[1]RIKEN CSRS, [2]Grad. Sch. Med. Life Sci., Yokohama City Univ., [3]Grad. Sch. Bioagri. Sci., Nagoya Univ.

We have developed a technique for comprehensively evaluating the chemical structures and mobility of complex metabolites from the position, composition, and mobility correlation spectra of intact samples. This three-dimensional (3D) high-resolution (HR) spatial mobility ordered spectroscopy (SMOOSY) combines chemical shift imaging (CSI) and mobility ordered spectroscopy (MOSY). In this study, a small intact shrimp was used as an example of biological sample to evaluate the methodology. The shrimp was inserted into an HR magic angle spinning (HR-MAS) rotor, and our SMOOSY experiment was used to noninvasively observe the chemical compositions and mobility of metabolites at each *z*-position in the shrimp's body. The mobility information was mapped onto 2D CSI spectra by pseudo spectral imaging method using a processing tool named SMOOSY processor developed for the purpose. From the resulting pseudo 2D HR-SMOOSY spectral image, it was possible to assess the different mobilities of the metabolites at each *z*-position of the shrimp's body. Principal component analysis (PCA) was used to characterize the mobility of metabolites at each *z*-position of the body.

【背景・目的】

磁気共鳴法の応用範囲は広範で、溶液NMRは化学構造解析やメタボロミクス分野で重要な役割を果たしている[1,2]。また、代謝物群の複雑なNMRシグナルは、データベースの実測値や演繹・帰納的に算出した理論値との比較で同定が可能である[3-5]。さらに、DOSYやROSY実験は、代謝物群の拡散及び磁気緩和の評価や運動性の違いによるシグナル分離に有用である[6,7]。一方で、MRIはサンプルの空間的な^{1}H密度や運動性、MRSは空間的な組成の非侵襲的な評価に広く使用されているが、サンプルの磁化率の不均一性と双極子相互作用によるシグナルの低分解能・低感度の問題がある[8]。この問題は、MASを用いることにより抑制されることが知られており、HR-CSI実験によりインタクトな生体試料の空間・化学シフトの高分解能相関スペクトルを得ることが可能となった[9,10]。近年、CSIとDOSY実験を組み合わせた新しいパルス系列が開発された。この実験により、材料の空間・化学組成・拡散現象を総合的に評価することが可能となった[11]。しかし、スペクトル分解能や解析方法には改善の余地があると考えられた。また、生体試料の空間における各代謝物の運動性を高分解能スペクトルで総合的に評価する実験例は未だ報告されていない。そこで本研究では、新しいパルス系列及びスペクトル処理ツールを開発し、インタクトな生体試料を用いた新しいNMR実験の一例を示すこととした。

HR-MAS、組織内拡散、3次元プロセスツール

○いとうけんご、つぼいゆうり、きくちじゅん

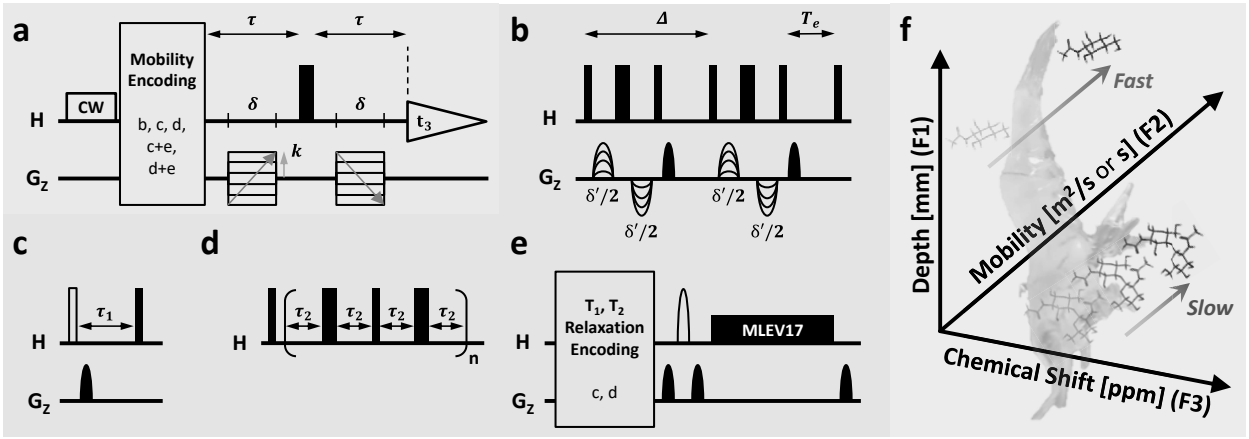


Fig.1 Pulse sequence of HR-SMOOSY used in this study. These involved a combination of (a) a CSI pulse sequence with (b) diffusion (HR-D-SMOOSY), (c) saturation recovery (HR-T_1-SMOOSY), (d) PROJECT (HR-T_2-SMOOSY), or (e) REST (HR-REST-SMOOSY). REST was also constructed in combination with (c) or (d). (f) The method measures the depth-motility-chemical shift correlation spectrum.

【実験方法】

1. サンプル調製

本実験では、長さ1.2 cm程度のインタクトなエビ（*Palaemon sp.*）を生体試料の例として使用した。生体内酵素の影響による成分の溶出を抑制するため、組織固定を行った。固定化後、HR-MASローターに重メタノールを入れ、生体試料を封入し、各種NMR計測に供した。

2. 3D High Resolution Spatial MObility Ordered SpectroscopY (HR-SMOOSY)

本研究では、3D HR-SMOOSYと命名した新しいパルス系列を開発した（**Fig.1**）。例えば、HR-CSIのパルス系列（**Fig.1a**）に、DOSYのパルス系列（**Fig.1b**）を印加することで、深度における各代謝物の拡散現象を捉えるパルス系列（3D HR-D-SMOOSY）となる。また、HR-CSIのパルス系列（**Fig.1a**）に、SR（**Fig.1c**）、PROJECT（**Fig.1d**）、REST（**Fig.1e**）印加することで、深度における各代謝物の磁気緩和現象を捉えることが可能となる。したがって、HR-SMOOSYは拡散または緩和符号化HR-CSIの実験と言え、インタクト試料の深度における各代謝物の運動性を観測することが可能である（**Fig.1f**）。また、得られる3D HR-D-SMOOSYスペクトルの各投影スペクトルは、2D DOSY、2D DWI、2D CSIの結果と同等の結果となる。本計測では、高分解能スペクトルを得るため、Bruker社の500MHz（HR-MASプローブ）NMR装置を用いて、MAS周波数3 kHz、26 ℃で計測を行った。

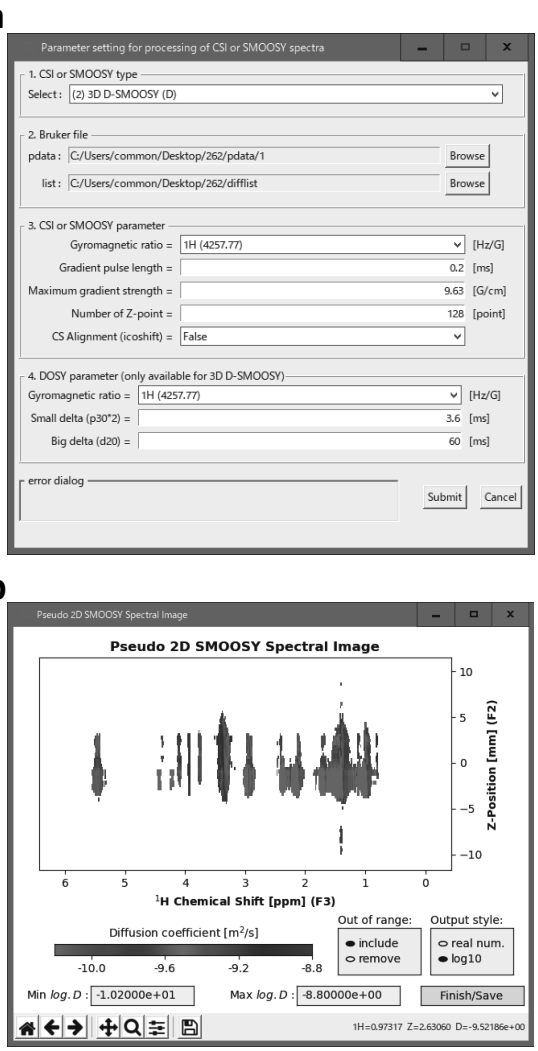


Fig.2 A GUI of SMOOSY processor. (a) The first main window shows the parameter settings. (b) The plot window showing the processed SMOOSY spectra.

3. 疑似2Dスペクトル画像法及び解析

得られた3Dスペクトルから視覚的かつ直感的に情報を取得することは困難である。そこで、擬似2D CSIの拡散または緩和強調スペクトル画像に変換することが望ましいと考え、SMOOSYプロセッサーと命名した3D HR-SMOOSYデータの処理ツールを開発した（**Fig.2a**）。まず、計測した3Dデータの化学シフト軸及び深度軸のフーリエ変換とFOVの算出を行い、3D HR-CSIスペクトルに変換した。また、拡散または緩和軸においては、指数関数曲線フィッティングを行い、拡散係数及び緩和時間を算出した。この物性値をCSIスペクトルにマッピングすることで、疑似2D HR-SMOOSYスペクトル画像を得た（**Fig.2b**）。疑似2Dスペクトル画像における代謝物群のシグナルのアノテーションについては、HR-HSQCスペクトルと当研究室で開発されたInterSpin（http://dmar.riken.jp/interspin/）[5]を用いて行った。インタクト試料の深度における各代謝物の運動性の特徴を探るため、疑似2Dスペクトル画像を用いて主成分分析も行った。

【結果・考察】

まず、2D HR-CSIスペクトルから、インタクトなエビ試料の主要代謝物群の分布を評価した（**Fig.3b**）。深度における代謝物群の分布には類似点と相違点があり、^{1}H密度はエビ試料の*H*側と*T*側で大きく異なった。Cholesterol、DHA、EPA、Taurine、Betaine及びTMAOは深度において全体的に観測された。DHAやEPAなどの不飽和脂肪酸の信号強度と半値幅は、*H*側ほど大きくなった。また、TAGは*H*側にのみ観測され、一方で、Phosphatidylcholineは*T*側に集中して観測された。エビ試料の深度方向における各代謝物の拡散現象は、SMOOSYプロセッサーによって得られた擬似2D HR-D-SMOOSYスペクトル画像を用いて評価した（**Fig.3c**）。脂質は深度方向において全体的に存在するが、拡散係数は*H*側で小さく、約-10.2 [log(m2/s)]であった。一方、*T*側では約-9.4 [log(m2/s)]であった。これらの違いは、脂質とタンパク質の相互作用や、脂質の運動性は細胞膜の内外で変化するため、その存在状態を反映している可能性があると考えられた。TMAO、Taurine及びBetaineも深度方向において全体的に存在するが、空間的に拡散係数の顕著な違いが見られなかった。また、最も拡散係数が小さい成分は、*H*側に集中して観測されたTAGであった。一方で、*T*側に集中して観測されたPhosphatidylcholineの拡散係数は最も大きく、約-9.0 [log(m2/s)]であった。これらの

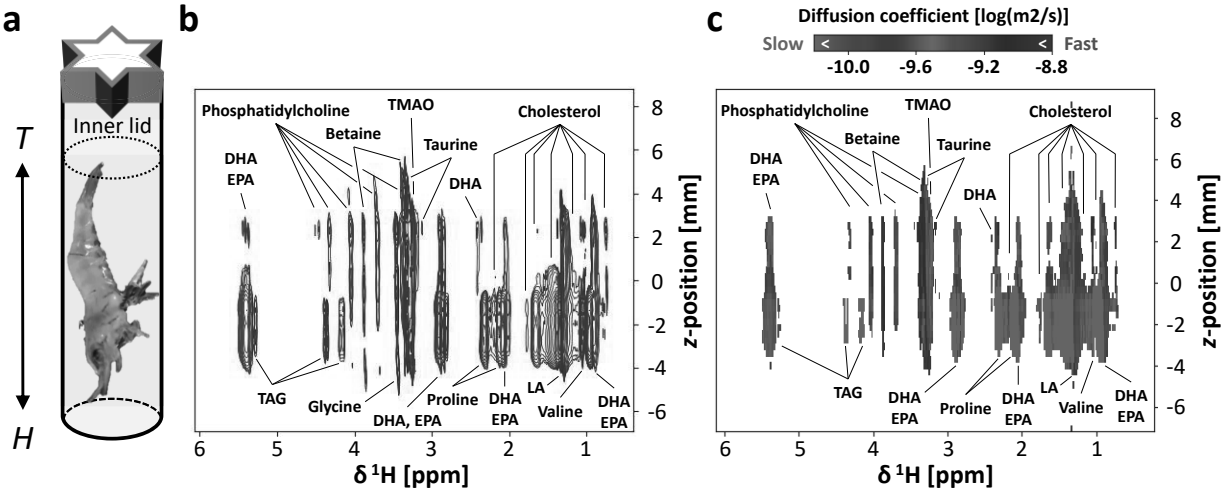


Fig.3 The HR-CSI and HR-D-SMOOSY experiments. (a) The sample was an intact shrimp placed in the HR-MAS rotor. (b) The 2D HR-CSI spectrum and (c) pseudo 2D HR-D-SMOOSY spectral image. The annotated major metabolites are shown with diffusion coefficients colored from red (slow diffusion) to blue (fast diffusion) according to the range shown in the bar above the figure. DHA, Docosahexaenoic acid; EPA, Eicosapentaenoic acid; LA, Linoleic acid; TMAO, Trimethylamine N-oxide; TAG, Triacylglycerol. *H*, head side; *T*, tail side.

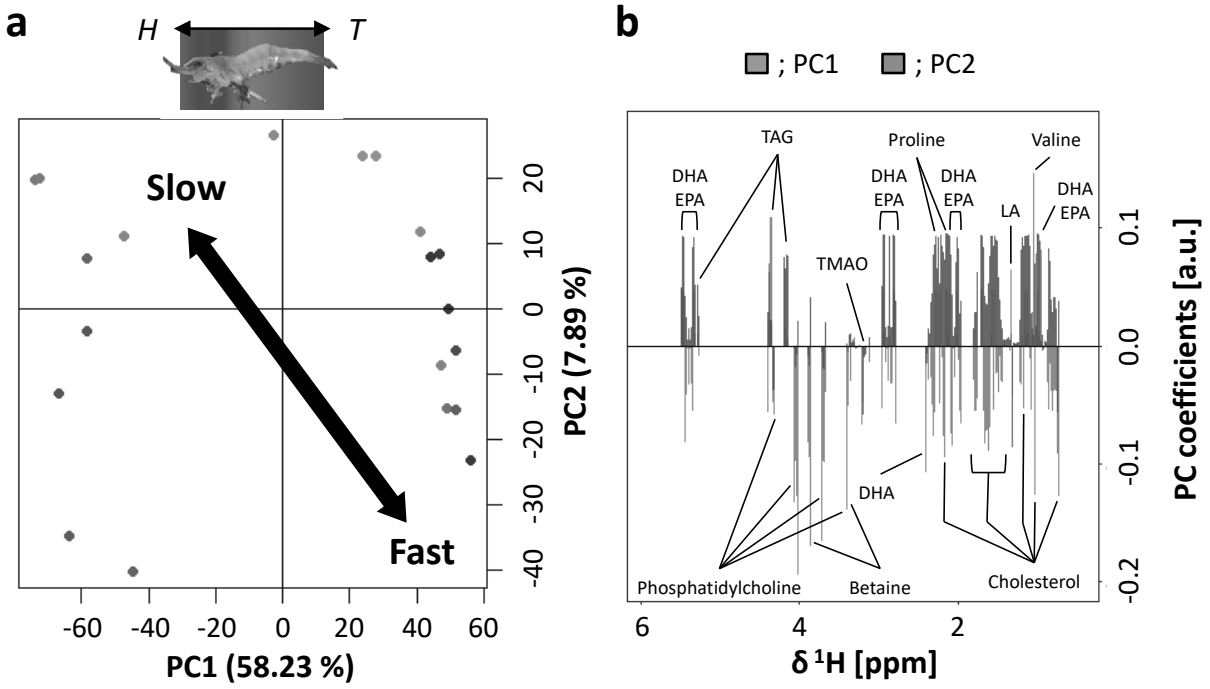


Fig.4 Principal component analysis (PCA) using the pseudo 2D HR-D-SMOOSY spectral image. (a) The scores, colored from red (head) to blue (tail). (b) The loadings, colored blue for PC1 and red for PC2. *H*, head side; *T*, tail side.

代謝物は、他成分との相互作用がほとんど無く、遊離状態で存在していると考えられた。また、深度における各代謝物の磁気緩和現象を捉えた擬似2D HR-SMOOSYスペクトル画像も評価したが、HR-D-SMOOSYほど空間的な違いが顕著ではなかった。さらに、擬似2D HR-D-SMOOSYスペクトル画像の主成分分析を行い、深度方向の代謝物の拡散現象の違いと類似性を評価した(**Fig.4**)。PC1軸は、特に脂質の拡散が深度方向で大きく変化していることを示唆した。空間的に拡散係数の差がほとんど見られなかった代謝物群は、PC2軸で特徴付けられた。

本研究では、HR-SMOOSYと命名した新規のパルス系列と疑似2Dスペクトル画像への変換が可能なSMOOSYプロセッサーを開発した。HR-MASを用いることで、不均一試料においても高分解能スペクトルを得ることが可能なため、インタクトな試料の深度における各代謝物の運動性の評価が可能となった。例としてエビ試料に適用した結果、代謝物群の空間的な分布と物質間の相互作用を示唆し、従来法では得られない情報を得ることが可能となった。 また、本手法はその他の試料への応用が可能であり、植物、種子、動物、卵などの生きた生体試料に適用することで、未知の代謝動態の解明に期待できると考えられる。材料や混合サンプルにも簡単に適用でき、深度方向における成分の流動性や吸着性を物性評価することも可能である。

【参考文献】

[1] Ito, K., et al. *Anal. Chem.* **86**, 1098–1105 (2014); [2] Kikuchi, J., et al. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **104**, 56–88 (2018); [3] Ito, K., et al. *ACS Chem. Biol.* **11**, 1030–1038 (2016); [4] Ito, K., et al. *Chem. Sci.* **9**, 8213–8220 (2018); [5] Yamada, S., et al. *ACS Omega* **4**, 3361–3369 (2019); [6] Foroozandeh, M., et al. *Angew. Chem. Int. Ed.* **55**, 15579–15582 (2016); [7] Dal Poggetto, G., et al. *Chem. Commun.* **53**, 7461–7464 (2017); [8] Ladd, M. E., et al. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **109**, 1–50 (2018); [9] Sarou-Kanian, V., et al. *Sci. Rep.* **5**, 9872 (2015); [10] Wong, A. and Lucas-Torres, C., *Anal. Bioanal. Chem.* **411**, 1591–1599 (2019); [11] Krachkovskiy, S. A., et al. *J. Am. Chem. Soc.* **138**, 7992–7999 (2016).

YP23

テンソル分解と圧縮センシングによる超偏極^{13}C代謝MRIの高速撮像の検討

○辻野正之介[1], Neil J. Stewart[1], 平田拓[1], 松元慎吾[1]
1北海道大学, 大学院情報科学研究院, 磁気共鳴工学研究室

Acceleration of hyperpolarized ^{13}C metabolic MRI image acquisition using tensor decomposition and compressed sensing

○Shonosuke Tsujino[1], Neil J. Stewart[1], Hiroshi Hirata[1], Matsumoto Shingo[1]
1Graduate School, Faculty of Information Science and Technology, Hokkaido University

In contrast to ^{1}H MRI for obtaining anatomical images, MRI of carbon stable isotope ^{13}C, which is abundant in biomolecules, is used for metabolic studies. Although the relative sensitivity of ^{13}C at thermal equilibrium is about 1.5% of ^{1}H, real-time metabolic imaging is feasible by using hyperpolarization technology that temporarily amplifies ^{13}C MRI signal intensity tens of thousands of times using dynamic nuclear polarization (DNP), parahydrogen induced polarization (PHIP), and so on. In metabolic MRI with hyperpolarized ^{13}C-labeled tracers, time resolution is an issue, and fast image acquisition using compressed sensing reconstruction to restore images from partially acquired k-space data have being studied. In this study, we tried to improve image quality of compressed sensing reconstruction by applying a low rank approximation by tensor decomposition as a denoising method.

【序論】

解剖像を取得する ^{1}H MRI に対し、生体分子に多く含まれる炭素の安定同位体 ^{13}C の MRI は代謝研究に用いられている。熱平衡における ^{13}C の相対感度は ^{1}H の約 1.5%であるが、動的核偏極(DNP)等を用いて一時的に ^{13}C MRI 信号強度を数万倍に増幅させる超偏極技術により、リアルタイムの代謝イメージングが可能となっている。超偏極 ^{13}C による代謝 MRI 撮像では時間分解能が課題であり、部分的に取得した k 空間データから画像を復元する圧縮センシングによる高速撮像法が研究されている。本研究では、圧縮センシングによる画像再構成に、テンソル分解による低ランク近似を用いたノイズ除去法を適用することで超偏極 ^{13}C MRI の高速撮像における画質の改善を試みた。

【実験】

部分的に取得したk空間データから元の画像を復元する手法として圧縮センシング画像再構成法がある。一方、ノイズ除去の手段としてテンソル分解による低ランク近似が用いられている。超偏極[1-^{13}C]ピルビン酸の腫瘍における代謝MRIを想定し、(空間２次元)×(スペクトル)×(時間変化)の4階テンソル数値ファントムを作成した。ノイズを加えた数値ファントムのk空間データのうち、40%のみを用いてテンソル分解による低ランク近似を行った後、圧縮センシング画像再構成により画像の復元を行った。元の数値ファントムに対する構造的類似指数(structural similarity, SSIM)及び正規化平均平方二乗誤差(normalized Root Mean Square Error, nRMSE)を評価関数として、画質の改善の程度を評価した。

超偏極^{13}C MRI, テンソル分解, 圧縮センシング

○つじのしょうのすけ, にーるじぇいすちゅあーと, ひらたひろし, まつもとしんご

【結果と考察】

低S/Nの4階テンソル数値ファントム(図1b)のk空間データ40%のみから再構成した数値ファントム(図1c)に、テンソル分解による低ランク近似と圧縮センシングを組み合わせることで[1-^{13}C]乳酸マップを復元した。また低ランク近似のみで復元した画像(図1e)と圧縮センシングのみで復元した画像(図1f)と比較したところ、それぞれに対してSSIMが約20%向上し(図2a)、nRMSEが約9%減少した(図2b)ことから低ランク近似と圧縮センシングを組み合わせた手法の有効性が示された。低ランク近似と圧縮センシングに要した時間は合わせて約6分であり、実用的な許容範囲であった。

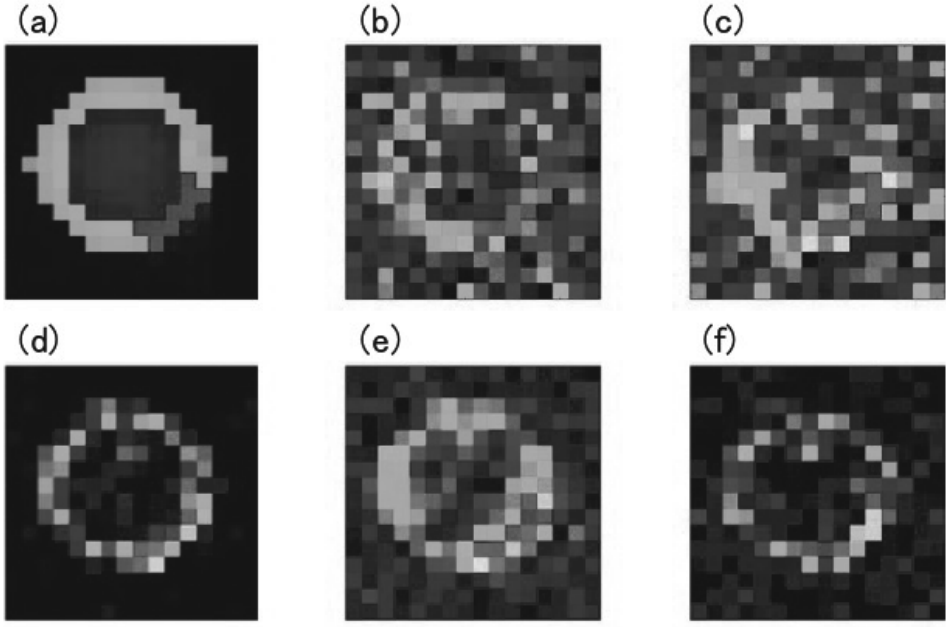


Figure 1 (a)高 S/N [1-^{13}C]乳酸マップ, (b)低 S/N [1-^{13}C]乳酸マップ, (c)k 空間データから 40%を選択し、ゼロフィリングした低 S/N [1-^{13}C]乳酸マップ, (d)低ランク近似と圧縮センシングで復元した[1-^{13}C]乳酸マップ, (e)低ランク近似のみで復元した[1-^{13}C]乳酸マップ, (f) 圧縮センシングのみで復元した[1-^{13}C]乳酸マップ,画像は全て数値ファントムの撮像から 6 枚目(120 秒後)相当。

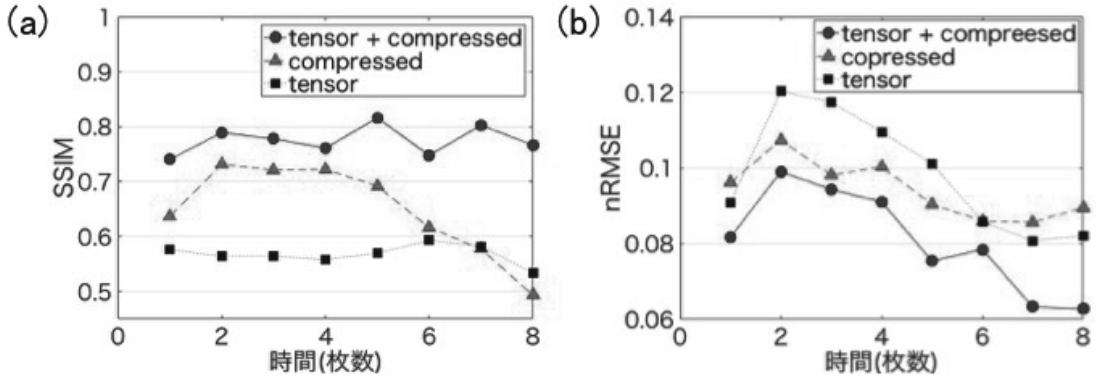


Figure 2 (a)SSIM, (b)nRMSE, 縦軸はそれぞれの評価値, 横軸は時間経過を示す。比較対象の画像は SSIM の値が大きいほど原画像に近く, nRMSE の値が小さいほど原画像に近い。

【参考文献】

1. PET by MRI:Glucose Imaging by 13C-MRS without Dynamic Nuclear Polarization by Noise Suppression through Tensor

2. Accelerated Chemical Shift Imaging of Hyperpolarized ^{13}C Metabolites

YP24

パラ水素誘起偏極法による磁場サイクル型^{13}C励起装置の開発

○福江優香[1]，内尾佳貴[2]、Neil J Stewart[2]、平田拓[2]、松元慎吾[2]
1北海道大学大学院　情報科学院　生体情報工学コース
2北海道大学大学院　情報科学研究院　生命人間情報科学部門

Development of A ^{13}C Hyperpolarizer Device with Magnetic Field Cycling based PHIP technique.

○Yuka Fukue[1]，Yoshiki Uchio[2]、Neil J Stewart[2]、Hiroshi Hirata[2]、Shingo Matsumoto[2]
1 Course of Bioengineering and Bioinformatics, Graduate School of Informatics Science and Technology, Hokkaido University
2 Division of Bioengineering and Bioinformatics, Faculty of Information Science and Technology, Hokkaido University

Aiming at application to metabolic imaging by hyperpolarized ^{13}C MRI, we developed a ^{13}C hyperpolarizer based on parahydrogen induced polarization (PHIP) method using parahydrogen, a nuclear spin isomer of hydrogen molecule. For the polarization transition from ^{1} H to ^{13} C, magnetic field cycle (MFC) method capable of polarization transfer to nuclei separated by 3 or more covalent bonds was used. All J values in the ^{13} C-labeled metabolic probe including long-distance J value were determined by NMR measurements including sel-HSQMBC-TOCSY. An optimal solution of the variable MFC pattern which maximizes the ^{1}H to ^{13}C polarization transfer efficiency was obtained by the DFT simulation considering the singlet relaxation time of hyperpolarized ^{1}H and ^{13}C. A fully automated system to accurately controll the MFC was constructed using the LabVIEW / PXIe system.

^{1}H核磁気共鳴画像（MRI）が形態画像の取得に広く用いられる一方で、多くの生体分子に共通して含まれる炭素の安定同位体^{13}Cを測定核種とする^{13}C MRS/MRIは、特定分子の代謝計測に有用である。^{13}Cは^{1}Hに比べて相対感度が低く、熱平衡状態での^{13}C MRI撮像は困難であるが、「超偏極」誘導によりNMR/MRI信号を一時的に数万倍に増幅することにより生体イメージングが可能となる。^{13}Cへの超偏極の誘導法はいくつかあり、生体計測に最もよく用いられているのは動的核偏極（DNP）法であるが、臨床初期費用が数億円に上り、医療現場への普及の見込みは薄い。一方で、水素分子の核スピン異性体であるパラ水素を用いるパラ水素誘起分極（PHIP）法は安価ではあるが、ヒトに用いるためには解決すべき技術的課題が多く、未だ臨床応用には至っていない。

本研究の目標は、PHIP法による^{13}C核励起装置の開発である。パラ水素付加により誘導される超偏極の^{1}Hから^{13}Cへの分極転移には、共有結合で3つ以上離れた核への分極移動が可能である Magnetic Field Cycle（MFC）法を採用した。

PHIP法による^{13}C核の励起は、目的の代謝プローブの不飽和前駆体にパラ水素を付加することでまず超偏極状態の^{1}Hを作成し、その2つの超偏極^{1}Hから分極を特定の^{13}C核へ移すことにより実施される。

超偏極、13C、PHIP

○ふくえゆうか[1]，うちおよしき[2]、Neil J Stewart[2]、ひらたひろし[2]、まつもとしんご[2]

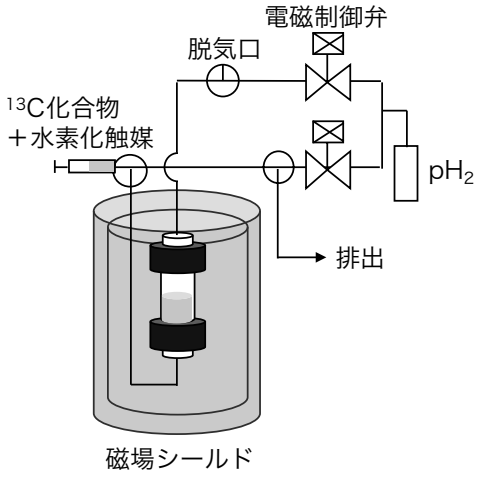


Fig.1 Scheme of the parahydrogen equipment

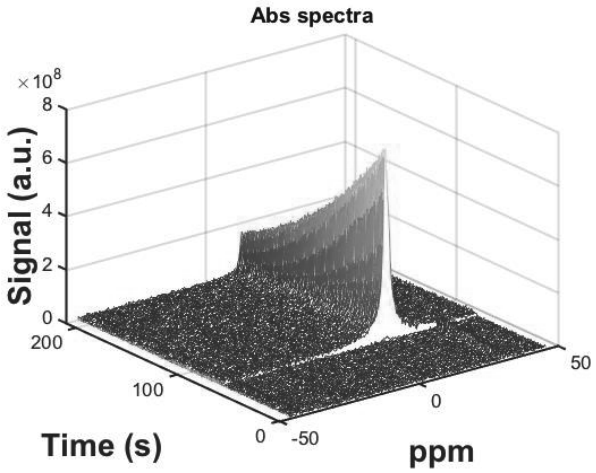


Fig.2 Hyperpolarized ^{13}C NMR spectrum of ^{13}C allyl pyruvate.

そのため、生体計測に必要となる数十mMの代謝プローブへのパラ水素付加反応を出来る限り短時間に完結させることが、高い^{13}C偏極率を得る上で重要となる。本研究ではまず、50-100℃の温度下で、7-8気圧の高圧パラ水素ガスを代謝プローブの不飽和前駆体と任意の反応時間で混合できる水素化装置を作成した（Fig.1）。この高圧水素化装置を使い、ピルビン酸2-プロパルギル（クロロホルム溶媒、水素化触媒として$Rh[(dppb)(COD)]BF_4$を使用）をパラ水素化したところ、安定して50mM以上のピルビン酸アリルが生成できた。パラ水素付加後直ぐに、反応溶液を1.5T MRI装置に移し^{1}H MRS測定を行ったところ、パラ水素由来の2つの^{1}Hの超偏極信号が確認された。

次に、超偏極^{1}Hから特定の^{13}Cへ分極転移するために最適な変動磁場パターンの推定を行った。パラ水素由来の2つの超偏極^{1}Hの量子状態は、周囲の他の核スピンとの磁気的な結合定数と晒されている磁場強度に依存して、時間と共に分子内の他の核スピンへと拡散する。高分解NMRを用いたsel-HSQMBC-TOCSY測定等により決定した長距離J値を含む^{13}C標識代謝プローブ内のすべての核スピン間のJ値と、超偏極^{1}H/^{13}Cの一重項緩和時間を考慮した量子統計力学計算によって分極移動をシミュレーションし、最適な磁場変動パターンを求めた。量子統計力学計算は先行研究[1]を参考にしてMATLABを用いて行った。スピンの状態を密度行列によって表現しその時間発展をリウヴィル方程式によって記述することにより、分極移動の計算を行った。磁場の変化タイミング・強さなどを変化させ、目的の^{13}C核の分極率が最も高くなる最適解を導出した。シミュレーションによって導出した最適なMFC磁場を正確に実装するため、ゼロ磁場チャンバー内部に巻いた磁場掃引コイルの電流制御システムをLabVIEW/PXIeシステムによって構築した。

高圧水素化装置を用いて作成した超偏極^{1}H代謝プローブの周辺磁場に求めた最適な磁場変化パターンを適用したところ、^{13}Cの超偏極信号を確認することができた（Fig.2）。

References（参考文献）

[1] E. Cavallari, C. Carrera, T. Boi, S. Aime, and F. Reineri, “Effects of Magnetic Field Cycle on the Polarization Transfer from Parahydrogen to Heteronuclei through Long-Range J-Couplings,” J. Phys. Chem. B, vol. 119, no. 31, pp. 10035–10041, Aug. 2015.

YP25

^{31}Pスピンの高偏極化のための極低温DNP装置開発

○土井　徹[1]，香川　晃徳[1,2,3]，根来　誠[2,3]，北川　勝浩[1,2]
[1]大阪大学大学院基礎工学研究科
[2]大阪大学先導的学際研究機構　量子情報・量子生命研究部門
[3]JSTさきがけ

Development of A Low-temperature DNP Instrument for ^{31}P spins

○Toru Doi [1], Akinori Kagawa[1,2,3], Makoto Negoro[2,3], Masahiro Kitagawa[1,2]
[1]*Graduate School of Engineering Science, Osaka University*
[2]*Institute for Open and Transdisciplinary Research Initiatives, Quantum Information and Quantum Biology Division*
[3]*JST PRESTO*

Dynamic nuclear polarization (DNP) provides a way to significantly improve NMR sensitivities. Ardenkjær-Larsen *et al*. developed a dissolution DNP instrument, which can monitor real-time chemical reaction and metabolic processes in solution. These studies are mainly carried out with ^{13}C spin. The phosphate nucleus (^{31}P), which plays an important role in life science, has not been studied by dissolution DNP extensively, because its spin-lattice relaxation time is generally short. However, Nardi-Schreiber showed that several biological phosphates highly polarized by DNP have potential applications such as pH-imaging. In this work, we show our developed low temperature DNP instrument for ^{31}P spins and the experimental results using the instrument.

【概要】

動的核偏極（DNP）によってNMRの飛躍的な高感度化が実現されている。液体NMRでは、He冷凍機内でDNPを行った後、瞬時に溶解、溶液を超電導マグネットに転送した後、NMR測定を行う溶解DNP法[1]の開発及びその応用研究が活発に行われている。溶解DNP法による溶液の超偏極化により^{13}Cラベル化されたピルビン酸のリアルタイム代謝イメージング[2]や化学反応の中間体の検出によるpHイメージング[3]、またシクロデキストリンなどのリガンド受容体相互作用によるT_1の変化[4]など様々なNMR応用が報告されている。それらの研究は主に^{13}Cスピンで行われている。一方、生体において重要な^{31}Pスピンではそのスピン格子緩和時間が短いことから、溶解DNP法ではまだあまり研究が進められていない。しかし近年、Nardi-Schreiberらによっていくつかのリン酸塩においては、数十秒程度のスピン格子緩和を持つことから、溶解DNPによるpHイメージングなどへの応用の可能性が示されている[5]。またFisherらによってQuantum dynamical Selection（QDS）と呼ばれる小分子の回転運動が制限された場合に、核スピン選択的に化学反応が変わる現象の理論提案がなされている[6]。その理論提案では^{31}Pスピンを持つ分子が酵素反応によって分解される過程においてQDSが重要な役割を果たしていると考えている。我々は、^{31}Pスピンの高偏極化によってその理論提案の実証を目指している。本講演では、その実証に必要な極低温でのDNP装置の開発と^{31}PスピンのDNPの結果について述べる。

動的核偏極、極低温、溶解DNP
○どい　とおる、かがわ　あきのり、ねごろ　まこと、きたがわ　まさひろ

【実験装置・試料】

溶解DNPを行うためには、DNP後に試料をNMR観測用の超伝導磁石に転送する必要がある。また試料も数十mg以上を用いるために、オーバーサイズ共振器を用いる必要がある。共振器の内部にはNMRのためのサドルコイルを設置した。DNP実験は、4.2 K、4.8 Tで行った。この時の電子スピンの偏極率は65 %であり、電子スピンと^{31}Pスピンの共鳴周波数はそれぞれ136 GHzと83 MHzである。

試料はスルホランとDMSOの1 : 1の溶媒にピロリン酸（3 M）、偏極源であるラジカル分子としてBDPA（50 mM）を混合した。スルホランにBDPAを入れ、超音波処理後、DMSOとピロリン酸を加え、再び超音波処理し試料を調整した。作製した60 μlの試料を、熱伝導率の高いサファイア管に入れ、共振器内部に設置した。BDPAのESRスペクトルは数十MHz程度であり、^{31}Pスピンの共鳴周波数より小さいためDNPのメカニズムはSolid Effectである。本研究では照射マイクロ波を掃引幅70 MHz、掃引時間1 msで掃引し、数十MHzに広がった電子スピンをすべて利用することでDNPの効率化を図った。またマイクロ波の強度は数mWである。

【実験結果・考察】

DNPによる偏極率のビルドアップをFig. 1に示す。ビルドアップの時定数は比較的長く、72 minとなった。最終的にDNPを240 minを行った後の^{31}Pスピンのスペクトルと熱平衡状態のスペクトルをFig. 2に示す。偏極率は4.2 K、4.8 Tの熱平衡状態の200倍となる9.2 %となった。今後はビルドアップが比較的早い^{1}Hスピンへの DNPを行った後、CP（Cross Polarization）を行うことでさらなる高偏極化の効率化をはかることや、サンプル転送機構[7]を作製することで溶解DNPを行う。

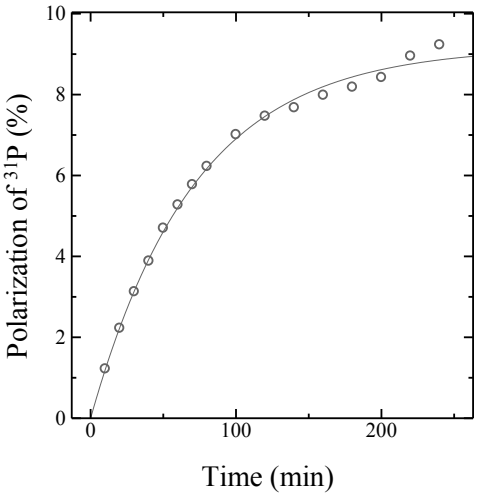


Fig. 1 ^{31}P polarization of pyrophosphoric acid enhanced by DNP.

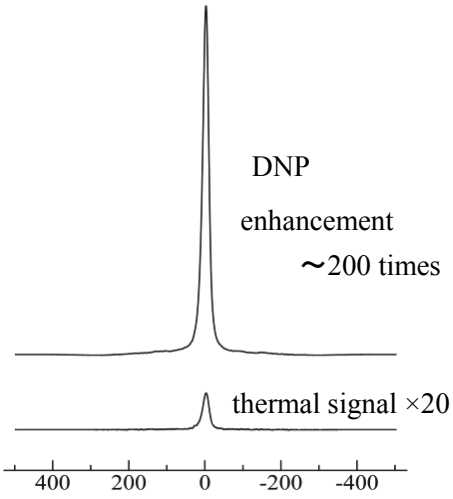


Fig. 2 ^{31}P-NMR spectra with DNP (upper) and without DNP (bottom).

[1] Ardenkjær-Larsen J.H. et al., PNAS, 100, 18, 10158-10163 (2003)

[2] Golman K. et al., PNAS, 103, 30, 11270-11275 (2006)

[3] Ferdia A. Gallargher et al., Nature, 453, 940-943 (2008)

[4] Kayvan R. Kashari et al., Roy. Soc. Chem., 137, 3427-3429 (2012)

[5] Nardi-Schreiber et al., Nature commun., 8, 341 (2017)

[6] Fisher M. P. A., Ann. Phys., 362, 593 (2015)

[7] Karel Kouřil et al., Nature commun., 10, 1733 (2019)

ポスター発表要旨

Poster Abstracts

P1

マルチレシーブ実験によるNOESYとHOESYの同時観測

○金場哲平
ブルカージャパン株式会社バイオスピン事業部

Parallel acquisition of the ^{1}H-^{1}H NOESY and ^{1}H-^{19}F HOESY by multi-receive experiment

○Teppei Kanaba
BioSpin Division, Bruker Japan K.K.

Multi-receive experiments can be performed in which FIDs of multinuclear are observed in a single NMR measurement by using an NMR instrument equipped with multiple receivers. Modern NMR spectrometers have been enabled us to easily perform multi-receive experiments in which FIDs of some nuclei are observed in a single NMR measurement. Here, I describe a newly developed multi-receive experiment that makes it possible to detect 2D ^{1}H-^{1}H NOESY and ^{1}H-^{19}F HOESY spectra simultaneously in half the experimental time compared with conventional experiments.

[序論]

マルチレシーブ実験は測定時間を短縮する方法として注目されており、異なる核種の1Dスペクトルの同時観測、PANSY-COSY(1)やUTOPIA-NMR(2)等の実験が報告されている。マルチレシーバーを搭載したNMR分光計を使用することによって、一つのNMR実験で複数個の核種のFIDを観測するマルチレシーブ実験が簡便に実施できるようになってきている。本研究では^{1}H-^{1}H NOESYと^{1}H-^{19}F HOESYスペクトルを同時に観測する新たなマルチレシーブ実験のパルスシーケンスを作製した。低分子有機化合物を用いてこれらのスペクトルを別々に測定する場合、比較的長い測定時間が必要となる。本研究で作製したパルスシーケンスを用いることにより、これらのスペクトルの測定に要する時間を大幅に短縮することが出来た。

[実験]

全てのスペクトルの測定はSmartProbe を装着したAVANCE NEO 分光計 (400 MHz)を用いた。測定サンプルは抗炎症剤の一つ、diflunisal (2mg / 600 µl DMSO) を用いた。

本研究で作製したパルスシーケンスをFig.1に示す。1D selective NOESYとHOESYのマルチレシーブ実験はある^{1}Hシグナルを選択励起し、近傍にある^{1}HへのNOESYと^{19}FへのHOESYを同時に観測する実験である。diflunisalの各^{1}Hシグナルを選択励起した後、

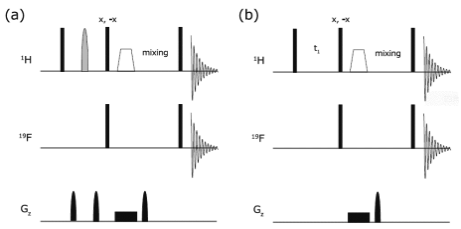


Fig.1 Pulse sequences of multi-receive experiments
(a) 1D selective NOESY and HOESY
(b) 2D NOESY and HOESY

マルチレシーバー、NOESY、HOESY

○かなばてっぺい

混合時間を0.2秒～3.0秒まで0.2秒間隔で変化させて測定を行い、NOE build-up curveを作成した。選択励起パルスにはgaussianの波形の180度パルスを用いた。

2D ^{1}H-^{1}H NOESYと^{1}H-^{19}F HOESYのマルチレシーブ実験は繰り返し待ち時間5秒、混合時間1.6秒、積算回数2回、間接観測軸 (^{1}H) のポイント数512ポイントに設定した。測定時間は約2時間であった。

[結果と考察]

1D selective NOESYとHOESYのマルチレシーブ実験から得られたNOE build-up curveの一部をFig.2に示す。それぞれ選択励起した^{1}Hから空間的に近い距離にある^{1}Hまたは^{19}FへのNOEが観測された。また本研究で作製したパルスシーケンスを用いた測定結果から、典型的なbuild-up curveのパターンが得られることが確認できた。

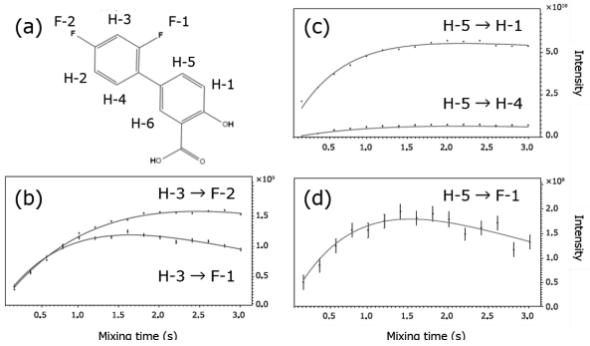


Fig.2 Experimental NOE build-up curves
The chemical structure of diflunisal is shown in (a). Proton pairs or proton-fluorine pairs are as follows: (b) H-3 versus F-2 and H-3 versus F-1, (c) H-5 versus H-1 and H-5 versus H-4, (d) H-5 versus F-1.

マルチレシーブ実験により同時観測を行った2D ^{1}H-^{1}H NOESYと2D ^{1}H-^{19}F HOESYスペクトルをFig.3に示す。混合時間は1D selective NOESYとHOESYの結果を参考にし、小さいNOEピークの観測に適した1.6秒に設定した。2D測定においてそれぞれ空間的に近い距離にある^{1}Hと^{1}Hの間、もしくは^{1}Hと^{19}Fの間にNOEが観測された。

また同様の条件でそれぞれ別に測定した2D ^{1}H-^{1}H NOESYと2D ^{1}H-^{19}F HOESYスペクトルと今回のマルチレシーブ実験で得られたスペクトルを比較した。その結果、本研究で作製したマルチレシーブ実験から得られたスペクトルと通常法から得られたスペクトルは同等であることを確認した。通常法ではそれぞれの二次元スペクトルの測定に2時間ずつかかるので合計4時間必要であった。それに対して、今回のマルチレシーブ実験を適用することにより測定時間を半分に短縮することが出来た。

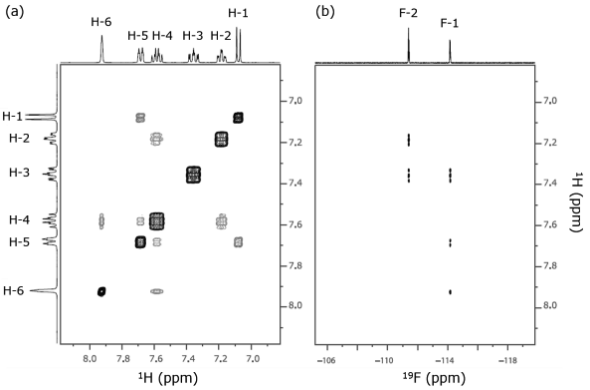


Fig.3 2D ^{1}H-^{1}H NOESY and ^{1}H-^{19}F HOESY spectra recorded simultaneously by multi-receive experiment
2D ^{1}H-^{1}H NOESY spectrum (a) and 2D ^{1}H-^{19}F HOESY spectrum (b) of diflunisal.

[まとめ]

^{1}H-^{1}H NOESYや^{1}H-^{19}F HOESYスペクトルから得られる距離情報は低分子有機化合物の立体構造解析において非常に有用である。本研究で開発したマルチレシーブ実験を使用することで1D selective NOESYとHOESYスペクトル、または、2D ^{1}H-^{1}H NOESYと2D ^{1}H-^{19}F HOESYスペクトルの測定時間を従来法と比べて大幅に短縮することができるようになった。

[Reference]

(1) E. Kupče *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, 128, 9606-9607
(2) A. Viegas *et al.*, *J. Biomol. NMR*, 2016, 64, 9-15

P2

異種核間スピン拡散を利用したファーマコフォア解析の試み

○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

Pharmacophore analysis using heteronuclear spin diffusion

○Jun-ichi Kurita, Yuuka Hirao, Yoshifumi Nishimura
Graduate school of medical life science, Yokohama City University

NMR is currently used as a screening and interaction analysis tool at various stages of drug discovery. ^{1}H nuclei are widely used in NMR observations mainly for screening and interaction analysis, but in recent years, NMR screening using ^{19}F nuclei has attracted attention. Since the ^{19}F nucleus has 100% natural abundance and the Larmor frequency is the second highest after ^{1}H, it can be observed with high sensitivity. In addition, ^{19}F nuclei are also widely present in recent drugs. The chemical shift width of ^{19}F nuclei is about 20 times that of ^{1}H nuclei, and signal overlap hardly occurs. Therefore, this nucleus is suitable for simultaneous detecting the interaction of multiple compounds with proteins, and high throughput is expected for screening. In this study, we attempted to detect more detailed protein-ligand interactions using ^{19}F.

はじめに

NMRは創薬の様々なステージで合成確認のみならずスクリーニングや相互作用解析などでなくてはならないツールとして現在使われている。主にスクリーニングや相互作用解析を目的としたNMR観測には^{1}H核が広く使われているが、近年^{19}F核によるNMRスクリーニングが注目されている。^{19}F核は自然存在が100%かつラーモア周波数も^{1}Hに次いで高く高感度で観測でき、近年の薬剤には広く^{19}F核が存在しているからである。また、^{19}F核は化学シフト幅が^{1}H核に比べ約20倍と広くシグナルのオーバーラップが起こりにくい。これは複数の化合物の相互作用検出の同時測定および解析に向いており、スクリーニングのハイスループット化が期待されている核種である。本研究では、さらに詳細なタンパク質-リガンドの相互作用の検出に^{19}Fを用いて行うことを試みた。

方法

標的タンパク質として神経特異的転写抑制因子RESTが結合するコリプレッサータンパク質mSin3BのPAH1ドメインを用いた。PAH1-GST融合タンパク質10uM,フッ素含有化合物群10種がそれぞれ500uMになるようにpH7.2 100mM リン酸バッファー(10%D_2O)に溶解し試料とした. NMRスペクトルの測定にはCryo TCI-Fを装備したAVANCE III HD 700MHz(BRUKER社製)を用いて、T1ρフィルター実験(sweep:150kHz, B1:3.1kHz, spinlock time:40ms)及び19F-INPHARMA実験(mixing time:200ms, 400ms, 1000ms)を行った。

19F、タンパク質、リガンド

○くりた　じゅんいち、ひらお　ゆうか、にしむら　よしふみ

結果

フッ素含有化合物160、182、202においてタンパク質存在下でのシグナルの強度低下が観測され、比較的強くGST融合mSin3Bタンパク質に結合していることがT1ρフィルター実験から明らかになった(図１)。また、^{19}F-INPHARMAを観測したところ、この三種類の化合物間において、交差シグナルが観測された(図2,3)。

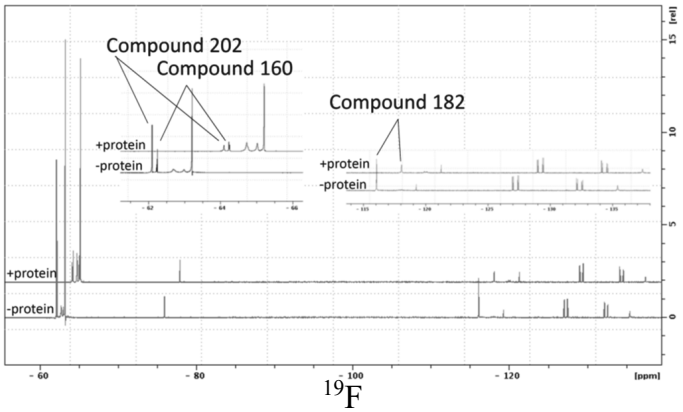


図 1.　T1ρフィルター実験

考察

10種類のフッ素含有化合物の溶液では交差シグナルは観測されなかったことから、このシグナルはリガンドの^{19}F核からタンパク質の^{1}Hを経由し、再度別種のリガンドの^{19}F核にスピン拡散したものを観測したと考えられる。また化合物182(paroxetine)はポケットに結合することがすでに報告されている化合物であるため[1]、化合物202、160も同一のポケットに結合していると考えられる。

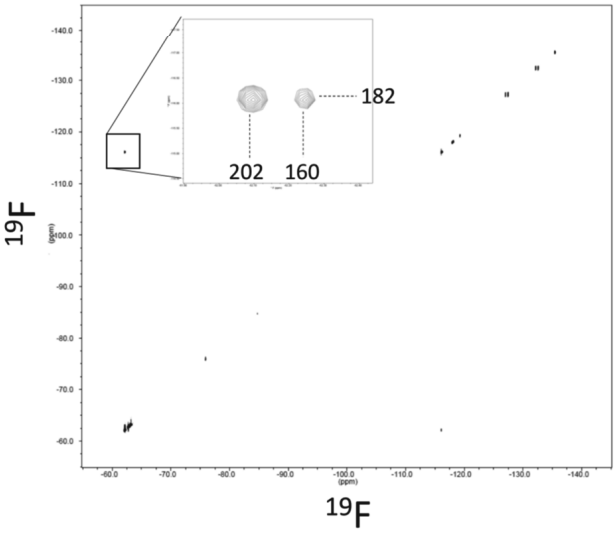


図 2.　^{19}F-INPHARMA　混合時間(400ms)

一般的にwaterLOGSYやSTDなどのリガンド観測型の測定では特異的結合であるかどうかの判断はできない。その為、しばしば標的蛋白質との特異的結合が既知である化合物とのINPHARMA法の観測が行われる。しかし、従来のINPHARMA法は観測核が^{1}Hであるため、シグナルのオーバーラッピングが多く、複数の化合物を同時に観測することが非常に困難である。本研究で確立した^{19}F-INPHARMAならば、化学シフトが広いため、複数の化合物においてもシグナルのオーバーラッピングが少なく同時に測定することができ、特異的結合の選別をハイスル-プットで行うことができると考えられる。当日はさらに詳細なファーマコフォア解析についても発表する。

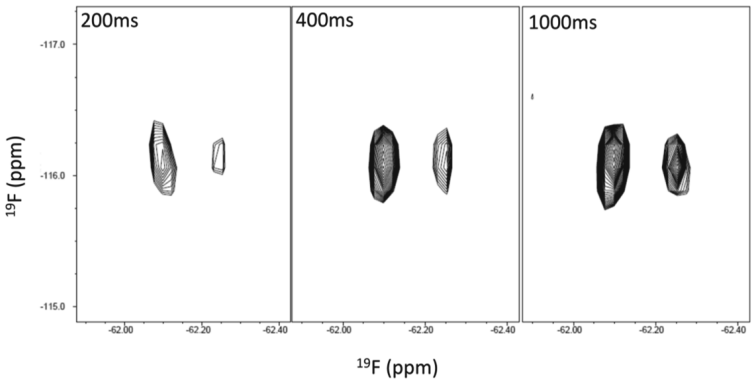


図 3.　^{19}F-INPHARMA　混合時間 200ms(左図)、400ms(中図)、1000ms(右図)

(1) Kurita, J., Hirao, Y., Nakano, H., Fukunishi, Y., and Nishimura, Y. (2018) Sertraline, chlorprothixene, and chlorpromazine characteristically interact with the REST-binding site of the corepressor mSin3, showing medulloblastoma cell growth inhibitory activities. *Sci. Rep. 8*, 13763.

P3

^{13}C直接観測測定の高感度化法の開発

○古板恭子[1]、服部良一[1,2]、杉木俊彦[1]、池上貴久[1,3]、藤原敏道[1]、児嶋長次郎[1,4]
1大阪大学　蛋白質研究所
2徳島文理大学　薬学部
3横浜市立大学　生命医科学研究科
4横浜国立大学　大学院工学研究院

Development of a sensitivity enhancement method for ^{13}C direct detection

○Kyoko Furuita[1], Yoshikazu Hattori[1,2], Toshihiko Sugiki[1], Takahisa Ikegami[1,3], Toshimichi Fujiwara[1] and Chojiro Kojima[1,4]
1Institute for Protein Research, Osaka University
2Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokushima Bunri University
3Graduate School of Medical Life Science, Yokohama City University
4Graduate School of Engineering Science, Yokohama National University

Direct detection of ^{13}C nuclei has several advantages over ^{1}H detection. For example, ^{13}C resonances are well dispersed even where the ^{1}H resonances are heavily overlapped, and ^{13}C nuclei have slower relaxation rate than ^{1}H. However, the sensitivity of ^{13}C detection is much lower than that of ^{1}H detection, having been requiring any method of sensitivity enhancement. In this study, we have developed a sensitivity enhancement method for the ^{13}C detected HCACO experiment. In this method, FID is acquired twice in a single scan as in-phase (IP) and anti-phase (AP) signals. IP and AP spectra of HCACO were successfully obtained using this method with ^{13}C-labeled valine and ^{13}C/^{15}N-labeled protein GB1. $^{13}C^{\alpha}$-^{13}C' J coupling that appeared in the direct dimension was successfully removed by IPAP virtual decoupling. The sensitivity of HCACO experiment was increased by this method by 1.4- and 1.3-fold for valine and GB1, respectively. This method is effective for sensitivity enhancement of most ^{13}C-detected experiments.

【はじめに】

通常、生体高分子の溶液 NMR 測定では、^{1}H 核が観測核として用いられる。^{13}C 核は ^{1}H 核と比較して、化学シフトの分離が良く、横緩和が遅いといった利点があるが、^{13}C 観測測定は ^{1}H 観測と比較して非常に低感度であり、^{1}H 核からの磁化移動を利用する以外に有効な高感度測定法が存在していない。一般的な ^{13}C 観測測定は、^{1}H 観測でよく用いられるいわゆる sensitivity enhancement 法では感度向上できない。2005 年に報告された COCAINE 法は ^{13}C 観測 C^{α}-C'相関スペクトルの感度を向上させることが示された[1]が、この方法で感度向上が可能な実験はごく限られている。Double-acquisition 法[2]は固体 NMR 分野で開発された感度向上法で、1 回のスキャンに 2 回のデータ取得をすることで、測定感度を向上させる。本研究では、double-acquisition 法を利用することで、^{13}C 観測測定の感度向上を目指した。

感度向上、^{13}C 直接観測

○ふるいた　きょうこ、はっとり　よしかず、すぎき　としひこ、いけがみ　たかひさ、ふじわら　としみち、こじま　ちょうじろう

【材料と方法】

^{13}C 標識バリンの試料は濃度約 5 mM、^{13}C, ^{15}N 標識 GB1 の試料は濃度約 0.6 mM で調製した。NMR 測定には、QCI-P CryoProbe を装着した AVANCE III HD 600 MHz NMR 装置(Bruker)を用いた。データ処理は TopSpin 4.04 (Bruker)および NMRPipe、ピーク強度や SN 比の解析には NMRFAM-SPARKY 1.413 を用いた。

【結果と考察】

^{13}C 観測 HCACO 測定[3]に double-acquisition 法を適用した。この測定を以後 dHCACO と記す。通常 ^{13}C'観測測定では、直接観測軸において $^{13}C^{\alpha}$-^{13}C' J カップリングによりピークが分裂する。この分裂を取り除くため、最もよく用いられる方法が virtual decoupling 法である。Virtual decoupling 法は、In-Phase (IP)と Anti-Phase (AP)等の位相の異なるスペクトルを測定し、それらの足し引きによってダブレットの片側のみを含むスペクトルを作り、それぞれのピーク位置をダブレットの中心へ J/2 ずつシフトさせて足し合わせることで、J 分裂のないスペクトルを作り出す方法である。dHCACO 測定では 1 スキャンに 2 回のデータ取得を行うが、一方で AP、もう一方で IP 信号を取得するため、virtual decoupling 法が利用可能である。

^{13}C 標識バリンおよび ^{13}C/^{15}N 標識 GB1 のサンプルに対し、dHCACO 測定を行なった。どちらの場合も、良好な AP および IP スペクトルを得ることができた（Fig. 1）。また、測定した AP および IP スペクトルを用い、virtual decoupling を行うことで J 分裂のないスペクトルを得ることができた。Double-acquisition 法の効果を検証するため、dHCACO 測定で得られたピーク強度とほぼ同じ時間で測定した通常の HCACO 実験と比較した。その結果、バリンでは 2.02 倍、GB1 では 1.79 倍にピーク強度が増大していた。dHCACO では単位時間あたりの積算回数が通常の 2 倍になるため、ノイズが√2倍になる。従って、このピーク強度の増大はそれぞれ 1.43 倍および 1.27 倍の感度向上に相当する。

本研究で開発した手法は特別な装置やデータ処理を必要とせず、大部分の ^{13}C 測定に適用可能であり、^{1}H 観測測定における sensitivity enhancement 法に相当する有力な感度向上法であると考えられる。当日は測定法の詳細についても発表する。

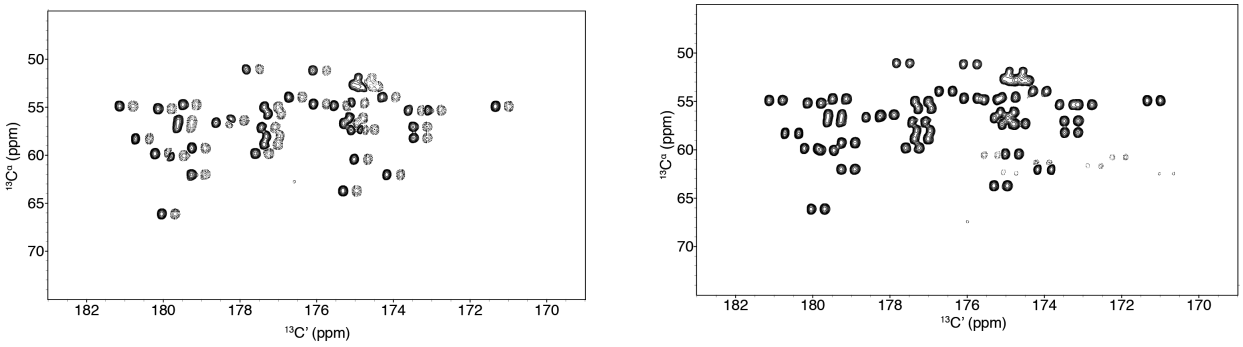


Fig. 1. ^{13}C, ^{15}N標識GB1のdHCACOスペクトル。(左) APスペクトル、(右)IPスペクトル

【参考文献】

[1] D. Lee, B. Vögeli, K. Pervushin, J. Biomol. NMR. 31 (2005) 273–278.
[2] M. Fukuchi, M. Inukai, K. Takeda, K. Takegoshi, J. Magn. Reson. 194 (2008) 300–302.
[3] W. Bermel, I. Bertini, I.C. Felli, R. Pierattelli, J. Am. Chem. Soc. 131 (2009) 15339–45.

P4

^{19}F核とアミド間の水素結合への^{14}N核デカップリングHOESYの適用

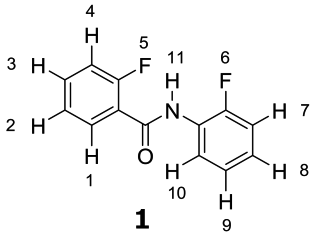
○蓮見 景子[1], 内海 博明[1], 笹川 拡明[1]
1株式会社JEOL RESONANCE, 技術部アプリケーショングループ

Application of ^{14}N-decoupled HOESY for ^{19}F-mediated amide hydrogen bonds

○Keiko Hasumi[1], Hiroaki Utsumi[1], Hiroaki Sasakawa[1]
1Application Group, Engineering Division, JEOL RESONANCE. Inc

Fluorine and nitrogen containing organic compounds are often found in a variety of fields such as pharmaceutical and material sciences. Such compounds show unique properties based on their conformations and orientations, which are often induced by hydrogen bonds between N-H and F atoms. Unlike the other approaches such as AFM, DFT calculation, and solid state NMR, solution state NMR approaches have difficulties due to low sensitivities of NOEs and ^{1}H signals broadening caused by neighboring N atoms. In this work, we report a new NMR technique for detection of N-H…F hydrogen bonds, ^{1}H–^{19}F heteronuclear NOE (HOESY) and ^{1}H–^{19}F heteronuclear correlation (HETCOR) with ^{14}N-decoupling techniques for fluorinated benzanilide as a demonstration. By using these new techniques, through-space coupling between the amide ^{1}H and two ^{19}F atoms were clearly observed, which means direct observation of the hydrogen bonds.

含フッ素、及び含窒素有機化合物は医薬や材料科学など、様々な分野で重要な役割を果たしている。このような化合物の多くは、N-HとF間の水素結合により誘起された分子の特定の配座や配向に基づき、特異な機能を持つことが知られている。近年、このような水素結合の直接検出や考察に関する研究は、AFMやDFT計算、固体NMRなどによって盛んに行われている。一方、溶液NMRでは、N-HとF間の水素結合をもつ化合物に適用できる手法は非常に限られている。その一因として、窒素原子に結合した^{1}H核の信号のブロード化の問題点があり、一般にそのような水素結合の直接観測は困難とされてきた。本研究では、フッ素化ベンズアニリド（**1**）に対して、^{14}N核デカップリング条件下で^{1}Hと^{19}F間のHOESY、及びHETCORを適用し、**1**に働く水素結合の直接検出に成功した。



1

NMR測定は、ROYALプローブ™ HFXを搭載したJNM-ECZ400S分光計を用いて行った。ROYALプローブ™ HFXは二重共鳴モードと三重共鳴モードを自動で切り替えが可能な検出器であり、分光計の構成によらず、三重共鳴測定を行うことができる。HF側には^{1}H、及び^{19}Fが設定されており、シングルチューンモードでは一核（^{1}H、または^{19}F）、デュアルチューンモードでは二核（^{1}Hと^{19}F）でチューニングが可能で、LF側と合わせると最大で三核同時にチューニングが可能である。

---

^{14}Nデカップリング、HOESY

○はすみけいこ、うつみひろあき、ささかわひろあき

1は、^{1}H NMR測定において^{14}N核デカップリング条件下でのアミドの信号の結合定数の変化によって、N-HとF間の水素結合形成が示唆されている[1]。そこで^{1}H-^{19}F HOESY測定[2]へ^{14}N核デカップリングを組み込んだパルスシーケンスを新たに作成し、CWデカップリング条件下でのHOESY測定を試みた。まず、1次元 HOESY測定からは、アミド水素H11の信号強度が^{14}N核デカップリングの効果によって約２倍に向上することを確認した。さらに、B_1=2.9 kHz、オフセット値113.9 ppm条件に最適化したCWデカップリングでの^{1}H-^{19}F 二次元 HOESY測定を行った。Fig.1aに示す通り、アミド水素H11とフッ素F5及びF6間に明確な相関が観測され、空間的な近接が確認された。さらに、同CWデカップリング条件下での^{1}H-^{19}F 二次元HETCOR測定も試みた。その結果、同じくH11…F5及び、H11…F6間に明確な相関が観測された（Fig.1b）。このことから、これらの二箇所に強固な水素結合が形成していることが明らかとなった。なお、一次元 HETCOR測定からそれぞれ約3 Hzと16 Hzの結合定数であることも確認され、空間経由核スピン-スピン結合が存在するものと考えられる。

以上、本研究では^{14}N核デカップリング条件を^{1}H-^{19}F HOESYとHETCORに組み込んだ新しい測定法により、分子内ではたらく^{19}F…^{1}H間の水素結合の直接検出に成功した。この測定法とROYALプローブ™ HFXとの併用によって、さまざまな低分子に存在するこのようなタイプの水素結合の検出が、簡便かつ迅速に行えるものと考えられる。

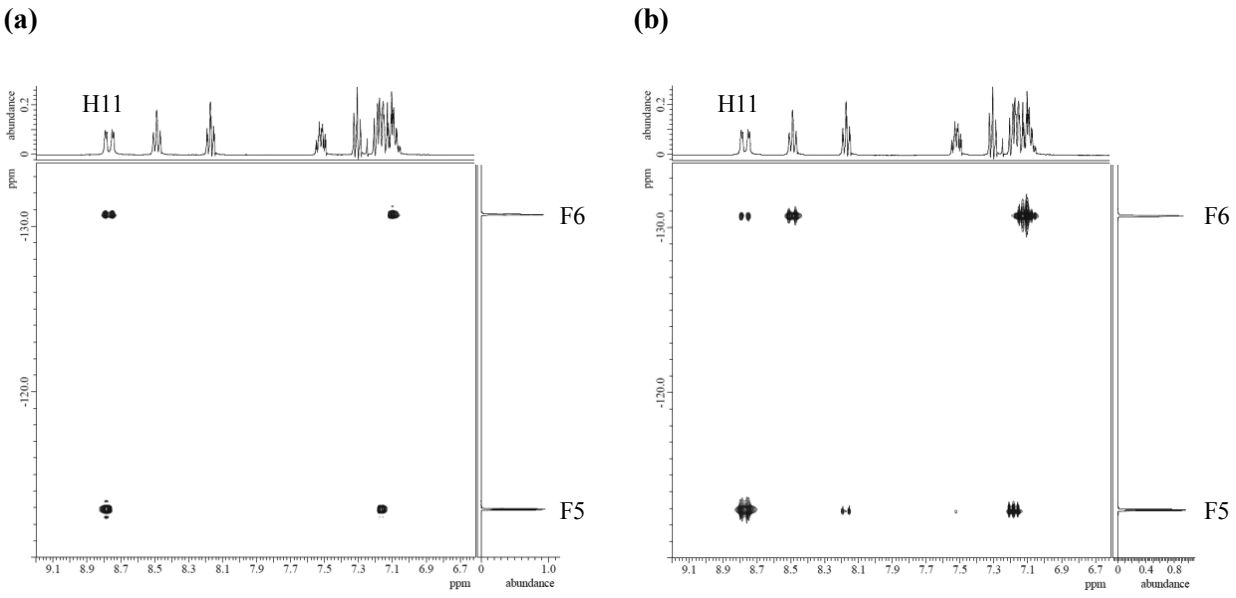


Fig. 1. (a) HOESY (b) HETCOR
(a) 2D-HOESY spectrum of **1** under ^{14}N-decoupling condition. (b) 2D-HETCOR spectrum of **1** under ^{14}N-decoupling condition.

[1] G. N. Manjunatha Reddy, M. V. Vasantha Kumar, T. N. Guru Row, N. Suryaprakash, *Phys. Chem. Chem. Phys*., **12**, 13232-13237 (2010).
[2] L. E. Combettes, P. Clausen-Thue, M. A. King, B. Odell, A. L. Thompson, V. Gouverneur, T. D. W. Claridge, *Chem. Eur. J*., **18**, 13133-13141 (2012).

P5

高感度Rheo-NMRによるタンパク質の不安定化機構および凝集機構の解析

○菅瀬謙治[1]
[1]京都大学大学院 工学研究科

Elucidation of the mechanism of protein deformation and fibrillation using high-sensitivity Rheo-NMR

○Kenji Sugase[1]
[1]*Graduate School of Engineering, Kyoto University*

Shear flow can induce structural deformation of proteins, which might result in fibril formation. However, the mechanism of the deformation and fibrillation of proteins is elusive. Recently, we developed a new Rheo-NMR instrument, which has sufficiently high sensitivity and resolution to study proteins in shear flow at the atomic level. This Rheo-NMR enabled us to analyze change in the structural flexibility and rotational diffusion of ubiquitin by shear flow. We also used the developed Rheo-NMR to analyze fibril formation of superoxide dismutase 1 (SOD1) in the presence of thioflavin T (ThT). As a result, we detected both weak and strong interaction modes between ThT and SOD1. Our Rheo-NMR instrument will shed new light on protein deformation and fibrillation.

【緒言】タンパク質は、生体内や工業プロセスの様々な場面で溶液の流れの影響を受ける。アミロイド線維化や液ー液相分離、抗体などバイオ医薬品の製造・運搬時における凝集化などには流れが関わっていると言われている。これらは生命科学の重要な研究対象、または産業上、改善が強く求められている課題である。このような現象では、結果的にタンパク質の構造が不安定化および構造変化し、会合(凝集・線維化・液ー液相分離)することが分かっているが、そのメカニズムはよく分かっていない。そもそも、流れの中のタンパク質を原子レベルで解析するのが難しい。さらに、流れの中のタンパク質の挙動を記述する学問も確立していない。近い学問としては流体力学があるが、流体力学では個々の分子は意識せず流体と呼ばれる連続体を扱う。しかし、タンパク質では、その形状と表面電荷の分布が複雑で局所的に硬さも異なる。加えて、タンパク質毎に形状と表面電荷の分布が異なる。そのため、流れの中のタンパク質の挙動を理解するためには、流体ではなく個々のタンパク質を原子レベルで解析する必要がある。また、コロイドの分野では粒子の会合が研究されており、衝突頻度と分子間相互作用が会合の要因と言われている。しかし、粒子を単純な剛体球で近似しているため、コロイドの理論では、流れによるタンパク質の不安定化や構造変化を説明するには十分でない。

このような状況の中、申請者らは流れによるタンパク質の安定性の変化や線維化過程を直接計測するツールとして高感度Rheo-NMR装置を製作した[1]。Rheo-NMRは、剪断流(速度勾配のある層流)を発生させながらNMR測定を行える装置で、従来はポリマーや食品の研究に用いられていた。開発した装置は、市販のRheo-NMR装置と異なり高感度極低温プローブと併用でき、既存のRheo-NMR装置の中で世界最高感度を誇る。

Rheo-NMR、剪断流、タンパク質

○すがせけんじ

【実験】剪断流がある条件とない条件でモノユビキチンの縦緩和速度R_1、横緩和速度R_2、^{15}N異種核NOEを測定し、得られた測定値からオーダーパラメータS^2を算出した。また、当研究室で線維化することを見出したヘキサユビキチン[2]について、剪断流がある条件で二次元HSQCスペクトルを連続測定し、ヘキサユビキチンの線維化過程をリアルタイムにモニターした。さらに、筋萎縮性側索硬化症ALSの関連タンパク質であるSOD1の溶液に、アミロイド線維と特異的に結合するチオフラビンTを共存させ、剪断流により線維化するSOD1と相互作用するチオフラビンTの^{1}H NMRシグナルをリアルタイムにモニターした[3]。

【結果と考察】モノユビキチンは極めて硬い構造を持っているため線維化しない。しかし、S^2は剪断流によってわずかに変化した(**図1左**)。また、同じ緩和データを用いてモノユビキチンの回転拡散運動を解析したところ、剪断流によって回転の軸が約8度傾くことが分かった。この回転拡散の変化については、最近、剪断流中の分子動力学計算でも解析した[4]。一方、ヘキサユビキチンは剪断流によってアミロイド線維化し、いくつかの残基の^{1}H–^{13}C相関シグナルに変化が観測された(**図1右**)。シグナルに変化が観測された残基は、主にループや二次構造の末端に位置していた(**図1左:構造中の黒い残基**)。興味深いことに、このような残基の中に、モノユビキチンのS^2が変化した残基が全て含まれていた。

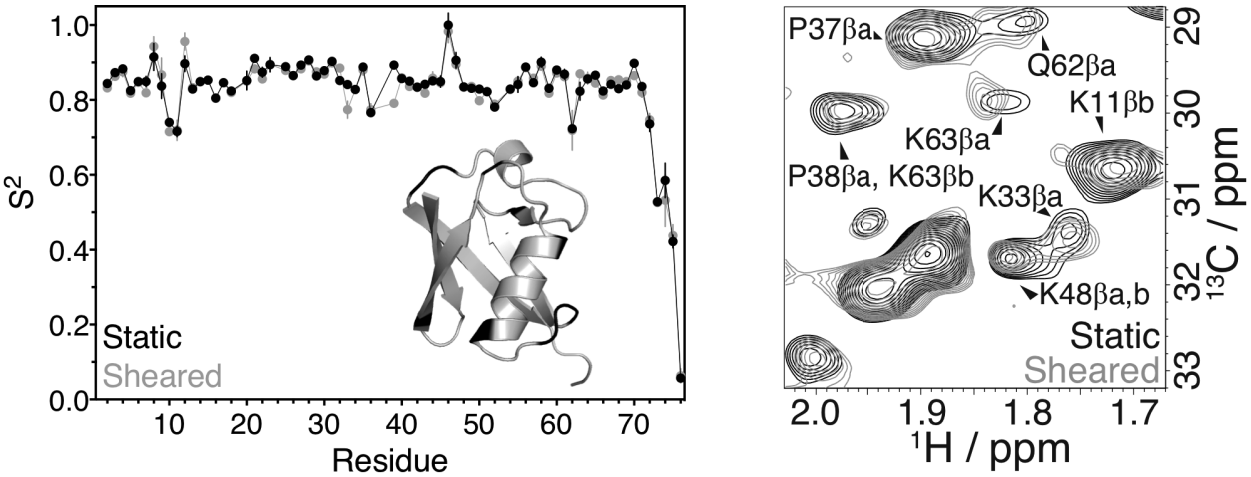


Fig. 1 Effect of shear flow on S^2 of mono-ubiquitin (left) and ^{1}H-^{13}C HSQC spectra of hexa-ubiquitin (right).

SOD1とチオフラビンTの相互作用解析では、まずチオフラビンTの3.113 ppmのシグナルに着目した(**図2左**)。このシグナルは、時間経過(SOD1の線維化)とともに化学シフト変化を示した。これは速い交換であり、かつシグナル強度が時間経過とともに減少したため、大きい分子(線維)との弱い相互作用を示す。また、3.55 ppm付近を調べると、SOD1のアミロイド形成に伴い、新しいシグナルが出現した(**図2右**)。これは遅い交換であり、かつシグナル強度が時間経過とともに増加したため、比較的に小さい分子(オリゴマー)との強い相互作用を示す。

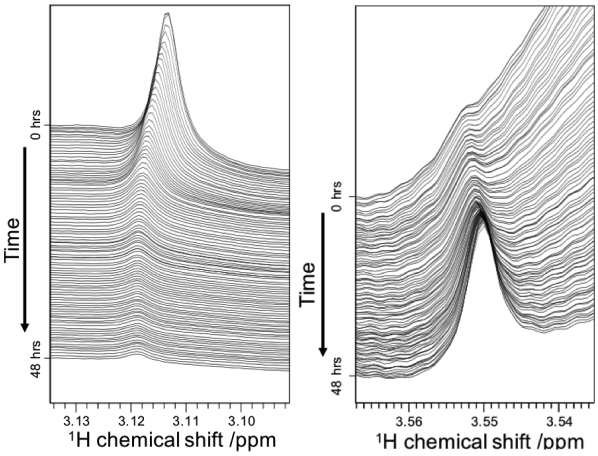


Fig. 2 Interaction between SOD1 fibril and ThT

このように我々が開発したRheo-NMRは、タンパク質の安定性や線維化の解析に有効なツールといえる。同装置は線維化するタンパク質以外にも、液-液相分離するタンパク質などにも適用できる。

References

(1) Morimoto et al. (2017) *Anal. Chem.* **89** (14), 7286–7290.
(2) Morimoto et al. (2015) *Nat. Commun.* **6**, 6116.
(3) Iwakawa et al. (2017) *Int. J. Mol. Sci.* **18** (11), 2271.
(4) Walinda et al. (2019) *Biochim. Biophys. Acta. Gen. Subj.*, Epub ahead of print

P6

COSY 法の新しい応用測定----Selective-HR-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]

Selective-HR-COSY: A New Method for Measuring Proton-Proton Spin Coupling Constants of Multiplet Signals

K. Furihata[1)] and M. Tashiro[2)]

1) Division of Agriculture and Agricultural Life Sciences, University of Tokyo

2) Department of Chemistry, College of Science and Technology, Meisei University,

Natural products very often possess several spin systems consisting of a methine group directly linked to a methyl group (-CH(OH)-CH(CH3)-CH(OH)-). The methine proton splits into a broaden multiplet by coupling with several vicinal protons rendering analysis difficult of JH-H cross peaks of said methine proton in DQF-COSY or E-COSY.

In order to overcome this problem, we have developed a new technique named Selective-HR(high resolution)-COSY. This method incorporates selective pulse and J-scaling pulse into COSY. In this method, high resolution cross peaks can be observed in the F1 dimension by J-scaling pulse, and Selective pulse converts n-type cross peaks into p-type cross peaks. Therefore resolution of cross peaks can be increased. Observation of JH-H values of multiplet signals becomes easy by introducing these two methods into COSY.

天然有機化合物の相対立体構造解析において、プロトンープロトン J_{HH} を如何にして効率よく観測するかが重要な課題の一つである。すでに、COSY 法を利用したプロトンープロトンのスピン結合定数を観測する方法として DQF-COSY、E-COSY といった方法が既に報告されている。しかし、multiplet に分裂した複雑なクロスピークではプロトンープロトンのスピン結合の解析は非常に困難である。例えば、ポリケタイド抗生物質には-CH(OH)-CH(CH_3)-CH(OH)-といったメチル基を多く含んだ化合物が存在する。このメチル基の付け根のメチンプロトンは隣接プロトンと multiplet に分裂しブロードなシグナルとなるため、このメチンプロトンのスピン結合の解析は困難となる。また、メチル基の付け根のメチン炭素はアシメ炭素であることが多く、この炭素に結合した置換基の相対立体配置の解析には、この炭素に結合した隣接プロトンからのスピン結合の観測は重要なポイントになる。このメチンプロトンのスピン結合を解析する方法として、BASHD-J-resolved-COSY 法を開発した(1)。この方法は homo-decoupling を用いて、メチル基を decoupling してメチンプロトンを観測する方法であったが、これに対して、homo-decoupling を用いずに、multiplet を解析する方法として Selective-HR-COSY 法を検討した。

図 1 (a)COSY-J-resolved 2D 法, (b)BASHD-COSY-J-resolved 2D 法、(c)Selective HR-COSY 法の pulse 系列を示す。(a)COSY-J-resolved 2D 法は CT-COSY 法に続いて J-resolved-2D 法を結合した方法である。このスペクトルの特徴は、J-resolved-2D 法と同様の 45 度に傾斜した cross peak を与える。そのため cross peak の分解能が高まる。しかし、multiplet の cross peak から J_{HH} を観測することは困難である。(b)BASHD-COSY-J-resolved 2D 法は、BASHD-J-resolved-COSY 法における、BASHD-J-resolved-2D 法と COSY 法を入れ替え、しかも CT-COSY 法にしている。CT-COSY 法による感度の低下は避けられない。この方法のポイントは J-resolved-2D 法の nt_1 の展開時間の中心に選択的 180° pulse を導入し、decoupling するプ

Selective HR-COSY,

○ふりはたかずお、たしろみつる

ロトンを反転させ nt_1 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 multiplet シグナルが単純化される。(c)Selective HR-COSY 法は COSY-J-resolved 2D の refocus point に selective 180° pulse を導入する。Selective 180° pulse で反転したプロトンとスピン結合したプロトンシグナルは COSY-J-resolved 2D の cross peak(n-type)とは逆方向(p-type)の 45° 傾斜した cross peak となって観測される。その結果、selective pulse で反転させたプロトンとの J_{HH} の分裂(p-type)と selective pulse を被らないプロトンープロトンの J_{HH} の分裂(n-type)が同時に観測され分解能が高まる。この方法は HR-HMBC 法と同じ原理である[2]。BASHD-COSY-J-resolved-2D 法や Selective-HR-COSY 法において、選択励起法を使う場合、選択的 180° pulse としては、複数のメチル基を同時に励起してもスピン結合にも、化学シフトにも影響されず、位相が揃い、なおかつ、シグナルの選択性が高いことが重要である。ここでは、Re-burp を使用した[3]。この Re-burp を使用するにあたっては、pulse 巾を短くなるように、出来るだけ広い範囲を励起するように設定することが重要である。

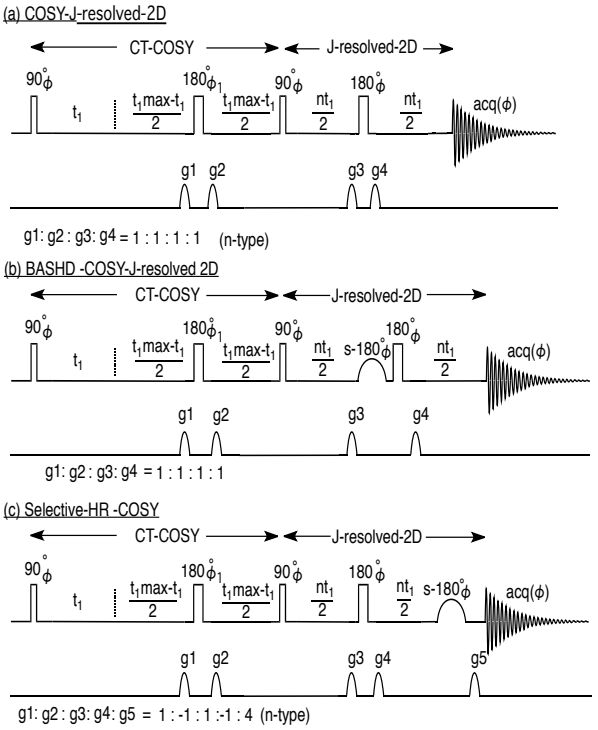


Fig.1 Pulse sequences for Selective-HR-COSY and BASHD-COSY-J-resolved-2D
ϕ=x, -x,-x, x, y, -y, -y, y ϕ_1=y, -y, -y, y x,-x, -x, x n = scaling factor

図 2 に threonine の H3(F2)と 4 位のメチル基(F1)との cross peak において、(a)COSY-J-resolved-2D,(b)BASHD-COSY-J-resolved-2D、(c)Selective HR-COSY の cross peak を示す。(a) COSY-J-resolved-2D スペクトルでは、H3 と 4 位のメチル基の cross peak において、J-resolved-2D スペクトルの multiplet の cross peak と同様の cross peak を与えるがスピン結合の観測には至らない。(b)BASHD-COSY-J-resolved-2D スペクトルは 4 位のメチル基を decoupling したスペクトルである。4 位のメチル基と H3 とのスピン結合は decpupling され、H2 と H3 の doublet が傾斜した二本線を与える。その結果、この cross peak からは、H2 と H3 のスピン結合 4.9 Hz を容易に観測する。しかし、H3 と 4 位のメチル基とのスピン結合の観測は困難である。これに対して、c)Selective HR-COSY スペクトルでは 4 位のメチル基を選択照射した結果、H2 と H3 のスピン結合は n-type の傾斜した doublet の cross peak を与えるが、選択

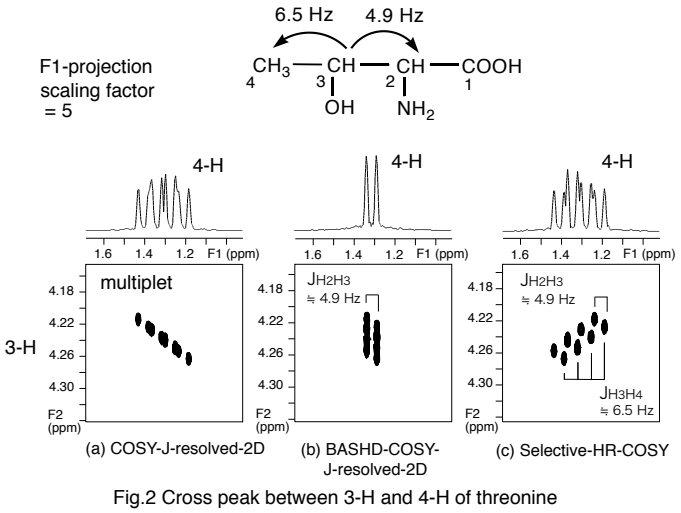


Fig.2 Cross peak between 3-H and 4-H of threonine

励起した4位のメチル基とH3のスピン結合はp-typeのquartetのcross peakとして観測される。その結果、H2とH3のスピン結合(4.9Hz)と4位のメチル基とH3のスピン結合(6.5Hz)も同時に観測する。このスペクトルに示すように、cross peakの分解能が高まることが示された。

図3にはMonazomycinのSelective HR-COSYの部分拡大スペクトルを示す。

Monazomycinは重なりあったメチル基を多く有し、しかも、メチル基と結合したメチンプロトンはブロードなmultipletを与える。そのため、そのメチンプロトンのスピン結合定数の解析は困難であった。

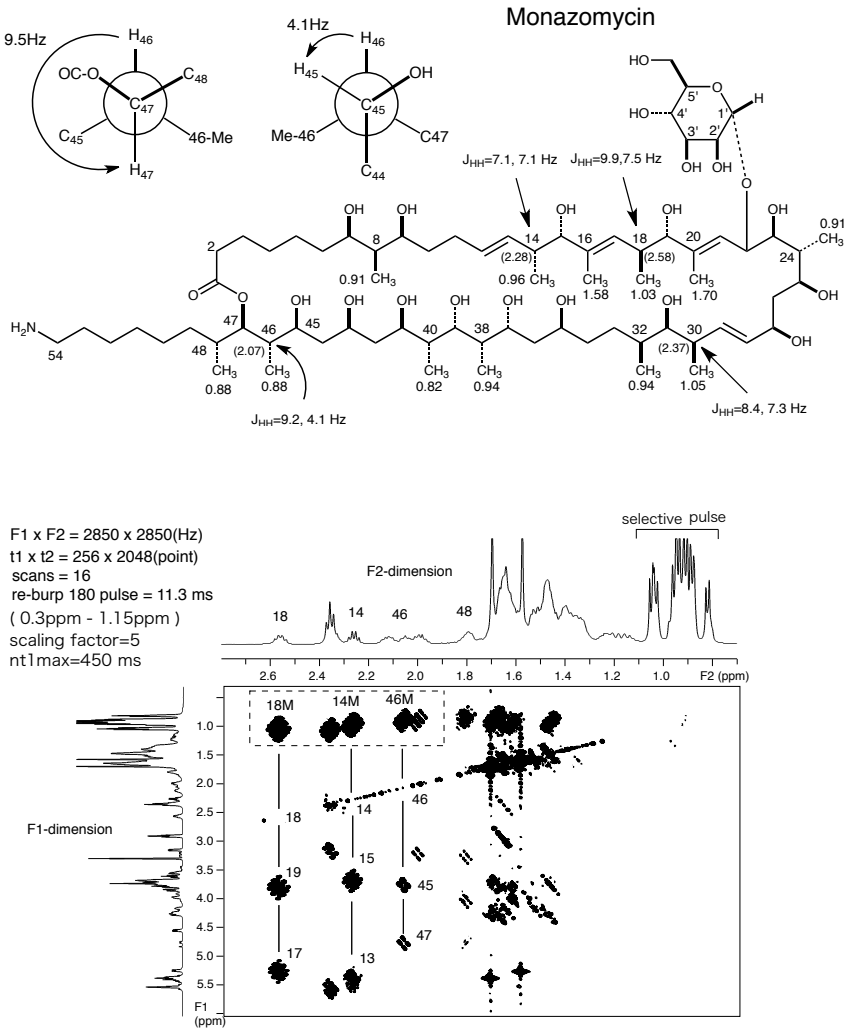


Fig.3 Selective-HR-COSY spectra of Monazomycin

そのメチンプロトンを解析するために、Selective HR-COSYを測定した。メチル基をターゲットにして、0.3ppmから1.15ppmの領域を励起した。Re-burpのpulse幅は11.3msecであった。選択励起した0.3ppmから1.15ppmのF2軸領域ではシグナルが観測されない。

図4には、(a)COSY-J-resolved-2D,(b)BASHD-COSY-J-resolved-2D,(c)selective-HR-COSYのスペクトルにおいて、図3の点線で囲んだ領域の拡大スペクトルを示す。F2軸のメチンプロトンとF1軸のメチル基のcross peakの領域である。(a)COSY-J-resolved-2Dスペクトルでは、メチル基に結合したメチンプロトンにおいて45度に傾斜したmultipletのcoss peakを与えているが、このスペクトルからメチンプロトンのスピン結合の解析は困難である。(b)BASHD-COSY-J-resolved-2Dでは、0.3ppmから1.15ppmのメチル領域をdecouplingした結果、cross peakは単純化されスピン結合の解析も容易であった。これはBASHD-J-resolved-COSY法[(2)]と同じ結果であった。

これに対して、(c)Selective HR-COSY法はdecouplingをしていないため、BASHD-COSY-J-resolved 2D法に比べcross peakは複雑になる。このcross peakからどこまで解析可能であるか興味が持たれた。Monazomycinのメチル基(0.3ppm～1.15ppm)を選択励起した結果、F2軸のメチル基の付け根のメチンプロトン領域で、メチル基に結合した10個のメチンプロトン全部を観測した。しかし、化学シフトが重なり合った領域での24,32,38.40位の4個のメチンプロトンについての解析は困難であった。プロトンの重なり合った領域での解析には

decoupling により、cross peak を単純化で BASHD-COSY-J-resolved-2D 法の方が有利である。Selective HR-COSY のスペクトルには、triplet(18,30,14,)と double -doublet(46)の 4 個のメチンプロトンの cross peak を示した。
H46 のメチンプロトンは 9.2Hz と 4.1 Hz の double doublet の分裂を示す。この H46 と H45 は 4.1Hz でスピン結合し、gauche の関係にあるが、45-OH と C44 は､H46 に対してどちらが anti で、どちらが gauche であるかを判別することは出来ない。また、H46 と H47 は 9.2Hz で anti の関係にある。47-O と C48 は共に gauche の関係をとるが、プロトンのスピン結合だけでは、その相対立体化学は決められない。

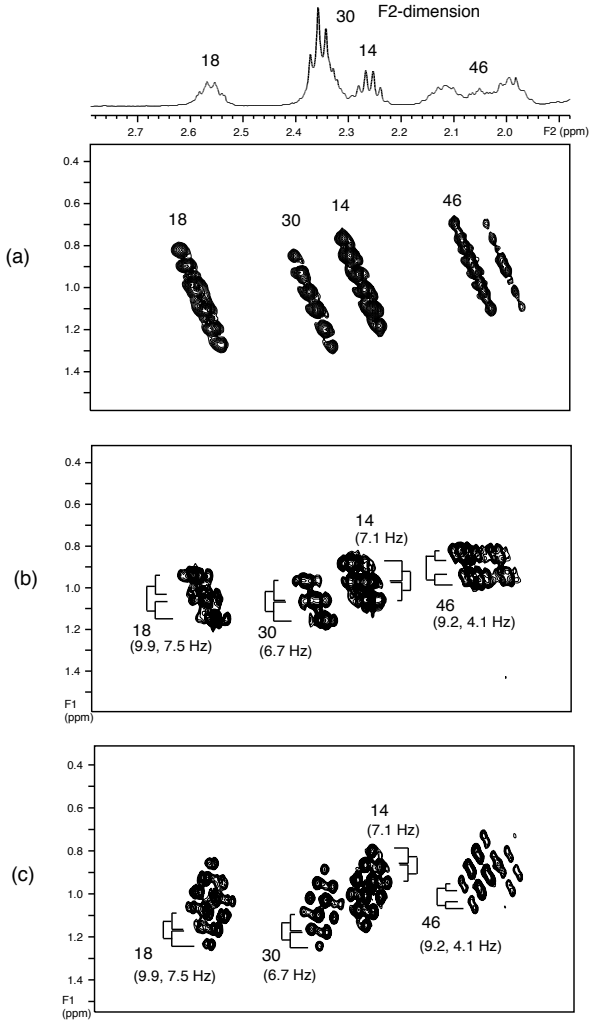


Fig.5c Monazomycin
(a) COSY-J-resolved-2D
(b) BASHD-COSY-J-resolved-2D
(c) BASHD-COSY-J-resolved-2D

まとめ、
ポリケタイド抗生物質の -CH(OH)-CH(CH3)-CH(OH)-のスピン系の解析法として、
(1)COSY-J-resolved-2D 法、
(2)BASHD-COSY-J-resolved-2D 法、
(3)Selective-HR-COSY 法の三方法について検討した。Multiplet の cross peak を multiplet のまま、スピン結合を観測できるという点では Selective HR-COSY 法は有効であった。この方法は n-type cross peak に新たに p-type cross peak を選択的に導入することにより decoupling することなく、スピン結合の観測ができることを示した。これらの方法を monazomycine に応用しその特徴と有効性を明らかにした。

1) K. Furihata, M. Tashiro, Magn. Reson. Chem. 2012, 50, 713 -716
2) K. Furihata, M. Tashiro, Magn. Reson. Chem. 2010, 48, 179 -183
3) H. Geen, R. Freeman, J. Magn. Reson. 1991.93.93.

P7

パルス不完全性を補償する $^{15}N/^{13}C$-CPMG-HSQC パルス系列の開発

○池上 貴久[1]，小沼 剛[1]，栗田 順一[1]，長土居 有隆[2]
[1] 横浜市立大学 生命医科学研究科
[2] ブルカージャパン株式会社

Development of a $^{15}N/^{13}C$-CPMG-HSQC pulse sequence compensating for pulse imperfections

○Ikegami Takahisa[1], Konuma Tsuyoshi[1], Kurita Jun-ichi[1], Nagadoi Aritaka[2]
[1] *Graduate School of Medical Life Science, Yokohama City University*
[2] *Bruker Japan K.K.*

NMR relaxation dispersion experiments are often used to obtain the information about a possible conformational exchange. The experiments often include a Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) pulse train equally separated by a spin-state selective inversion element (U-element). Even with measurement parameters carefully calibrated, however, parts of correlations sometimes exhibit large artifacts that may hamper the subsequent analyses. Our simulation showed that the off-resonance effects and miscalibration of the CPMG π pulses generate artifact maxima at resonance offsets of even and odd multiples of ν_{cpmg}, respectively. We showed that such artifacts can be effectively removed by properly choosing the phase of the $^{15}N/^{13}C$ π pulse in the U-element. We have further developed a pulse sequence that can compensate for artifacts for both TROSY and anti-TROSY components at the same time.

構造交換や化学交換を検出する方法として緩和分散法がある。中でも ^{15}N や ^{13}C などの異種核に CPMG パルスを適用し、二次元 $^{1}H/^{15}N$, $^{1}H/^{13}C$ 相関スペクトルの形で検出する方法が、生体高分子の交換現象を測定するのに多用される。Fig. 1 はその典型的なパルス系列であり、前半の CPMG 期間で反位相の $2S_yI_z$ を、後半の CPMG 期間で同位相の S_x を横緩和の計測対象とすることにより、反位相と同位相の合計時間が同じになるように工夫されている（緩和補償法, RC 法）。特に蛋白質などでは周りの ^{1}H への spin-diffusion により反位相の方が緩和が速い。そのため、π パルスを打つ頻度に依存して反位相と同位相の合計時間の割合が異なると、不正確な交換速度が得られることになる。

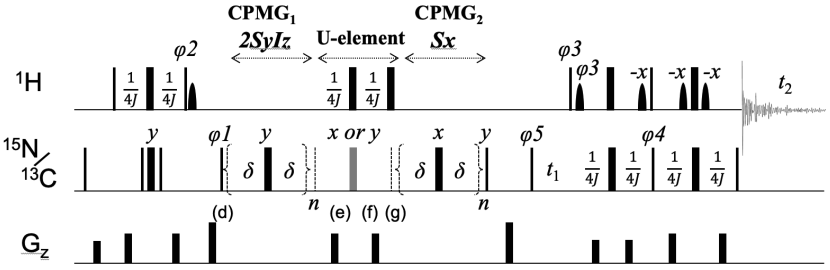


Fig. 1. A pulse sequence for relaxation dispersion experiments

---

CPMG、緩和分散法、パルス不完全性
○いけがみ たかひさ、こぬま つよし、くりた じゅんいち、ながどい ありたか

例えば、オフレゾナンス効果やパルスパワーのミス設定などによるものである。この RC 法は非常に優れてはいるものの、ひとつ大きな問題点があった。$S_{x/y}I_{\alpha}$ 成分と $S_{x/y}I_{\beta}$ 成分の内いずれか一方ではパルスの不完全性によるアーティファクトがキャンセルされるのに対して、他方では逆に蓄積してしまうことである。筆者らは前々回の NMR 討論会にて、Fig.1 の U-element にある S スピン π パルスの位相を x か y のどちらかに設定することにより、$S_{xy}I_{\beta}$ 成分をそのアーティファクトの補償の対象に選べることを示した。そこで、蛋白質のアミド基 ^{15}N や芳香環 ^{13}C の CPMG 実験では、これに TROSY を組み合わせることにより、アーティファクトのより少ない緩和分散曲線を得ることができた。

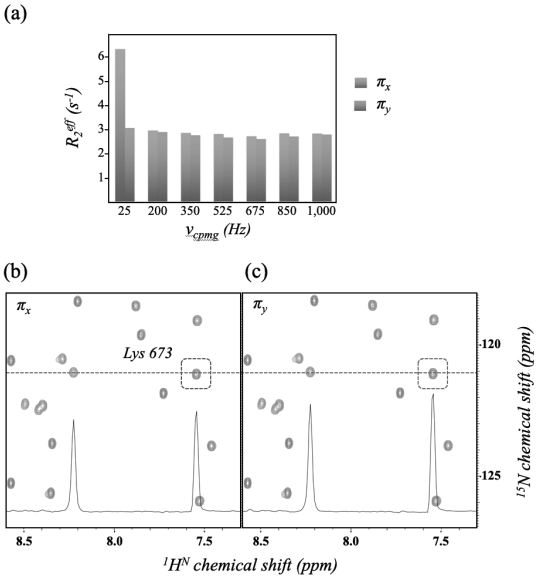


Fig. 2. Artifacts found in a ^{15}N CPMG experiment with the π pulse phase set at x or y.

Fig.2 は蛋白質のアミド基 ^{15}N に、このパルス系列を適用した例である。この蛋白質は構造交換がほとんど無いことが分かっているため、本来ならば平らな緩和分散曲線が得られるはずである。しかし、CPMG 周波数が 25 Hz のサンプリング点では異常に大きな R_2^{eff} がエラー検出されている。このようなアーティファクトは Fig.3 に示したシミュレーションにより、CPMG 周波数の 2 倍のオフセット周波数ごとに現れることが分かった。そのため、CPMG 周波数が低く、さらに π パルスの本数が奇数の際に頻繁に出現する理由が明らかとなった。これに対して U-element の π パルスの位相を x から y に変更すると、このようなアーティファクトがキャンセルされることが、実測でもシミュレーションでも実証された。この効果は大きく、^{15}N の π パルス長が 2*40 μs の際、オフセットが±1,500 Hz で rf 磁場強度を 10 %ミス設定したとしても、解析に足る緩和分散曲線が得られることが分かった。なお、Bruker 社製と Varian 社製では y 位相の符号が逆となるため、後者では逆に x 位相に設定する必要がある。以上の方法は TROSY では有効であるが、HSQC では意味がない。そこで筆者らは $S_{x/y}I_{\alpha}$ 成分と $S_{x/y}I_{\beta}$ 成分の両方でアーティファクトを補償するパルス系列を開発したので、これについても発表する。

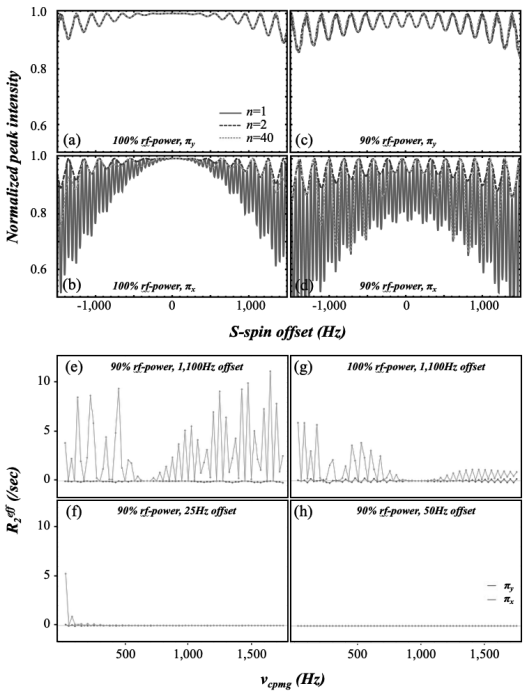


Fig. 3. Simulation of artifacts when the π pulse phase is set at x or y.

References

1. Loria, J.P., Rance, M., and Palmer, A.G. (1999) *J. Am. Chem. Soc.* 121, 2331-2332.
2. Konuma, T., Nagadoi, A., Kurita, J., and Ikegami, T. (2018) *Magnetochemistry* 4(3), 33.

P8

軽水中の化合物の定量NMR（内標準法）

○松村　雄輝[1]，中野　隆行[1]，川口　謙[2]
1（株）東レリサーチセンター　バイオメディカル分析研究部
2（株）東レリサーチセンター　品質保証部

Quantitative NMR for compounds in H_2O by internal standard method

○Yuki Matsumura[1], Takayuki Nakano[1], Ken Kawaguchi[2]
1 Biomedical Analysis Laboratories, Toray Research Center, Inc.
2 Quality Assurance Department, Toray Research Center, Inc.

Quantitative NMR is usually carried out by accurately weighing a powder sample and an internal reference material and dissolving them a deuterated solvent. On the other hand, in the case of a solution sample originally, since it contains a lot of “light” solvents, it is necessary to eliminate the solvent peak in addition to the usual quantitative NMR technique. In this study, we examined NMR measurements and sample preparation methods for the purpose of quantifying compounds in “light” aqueous solutions. As a result, we have adopted WET method for solvent suppression. The result of comparing two preparation methods, using mixed solvent and mixed sample solution, the accuracy of the mixed sample solution was enough high but slightly lower than that of the mixed solvent.

定量NMRでは通常、粉体試料と内標準物質をそれぞれ精密に秤量し、それらを重溶媒に溶解して実施される。一方、溶液試料の場合は、乾燥が可能であれば軽溶媒を留去し、重溶媒に置換することで定量NMRが可能である。しかしながら、溶媒の留去が困難な場合や試料が溶媒とともに共沸してしまうような場合、もしくは乾燥させると不安定な試料の場合は、重溶媒置換による定量ができない。この場合、高い精確性で溶液試料中の化合物濃度を定量するためには、定量NMRの測定パラメーター（^{13}Cデカップリングなど）を基本として、溶媒消去を組み合わせた測定をする必要があると考えられる。

そこで今回、軽溶媒中の化合物を高い精確性で定量することを目的に、水溶液試料を用いて、NMR測定試料の調製法やNMR測定法（溶媒消去と^{13}Cデカップリング等の定量NMRの測定パラメーターの組み合わせ）を検討した。

試料としては純度既知の1-メチル-L-ヒスチジン標準物質（純度：90.0 %）を、内標準物質としてはDSS-d_6を用いることとした。はじめに基準となるデータを取得するため、通常の定量NMRの分析手順に従い、粉体の1-メチル-L-ヒスチジン標準物質とDSS-d_6をそれぞれ精密に秤量し、重水に溶解させ、定量NMRをn=3で実施した（Fig. 1）。装置は、AVANCE III HD 500（ブルカー・バイオスピン社）を用いた。その結果、真度99.7 %、精度（RSD）0.3 %で定量できた。

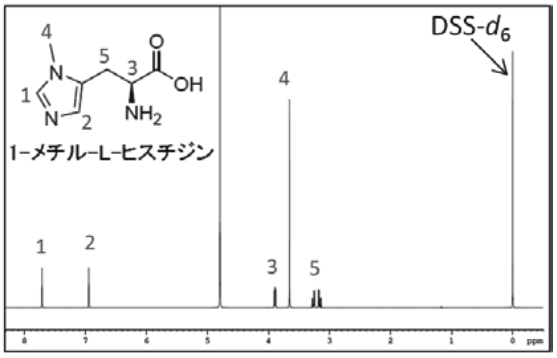


Fig. 1. ^{1}H NMR Specta of 1-Methyl-L-Histidine and DSS-d_6 in D_2O

定量NMR、qNMR

○まつむら　ゆうき、なかの　たかゆき、かわぐち　けん

続いて、軽水を用いたNMR測定試料を次の2種類の方法で調製した。①前述と同様に、1-メチル-L-ヒスチジン標準物質とDSS-d_6をそれぞれ精密に秤量し、そこに90 %軽水10 %重水を加えた。②1-メチル-L-ヒスチジン標準物質を精密に秤量した後、軽水を加え、1-メチル-L-ヒスチジン標準物質水溶液とした。DSS-d_6についても精密に秤量したのち重水を加え、DSS-d_6重水溶液とした。それぞれ、加えた軽水及び重水の量を秤量し、重量法によりそれぞれの正確な溶液濃度を算出した。1-メチル-L-ヒスチジン標準物質水溶液 540 μLとDSS-d_6重水溶液 60 μLを混合し、90 %軽水10 %重水の測定試料を調製した。②は、実際に水溶液試料を定量する際の調製法を想定しており、①の調製法に対して、所定量の溶液混合操作による誤差が生じ、真度・精度に影響することが考えられる。

次に定量NMRの測定条件を検討した。まずはT_1緩和時間測定について、通常の測定法では水シグナルが大きく、化合物シグナルがほとんど観測できなかったため、溶媒消去下でのT_1緩和時間測定を実施し、化合物のT_1緩和時間を求めた。続いて、パルス角：90度、パルス繰り返し時間：$10T_1$以上、^{13}Cデカップリングなどの定量NMR時の測定パラメーターを基本として、はじめに事前飽和法（Presaturation）による溶媒消去を行ったが、水シグナルの影響が化合物のシグナルにも影響した。そのため、WET法による溶媒消去を行った。その結果、水付近の化合物シグナルにおいても、水シグナルの影響のない良好なスペクトルを得ることができた。

本測定法にて、調製した①及び②の試料について測定を行った。その結果、①については通常の定量NMR（重水100 %試料）と同等の真度、精度で定量でき、本測定法により、90 %軽水10 %重水の試料溶液でも高い精度で定量可能であることが示された。

一方、②については、真度が99 %程度となり、①と比較し真度がわずかに低下したものの、高い精確性で定量できることがわかった。真度の低下は、水溶液と重水を混合する際の誤差と考えられる。今後は、精確性の向上を目指した調製法のさらなる検討や、本測定法による、濃度が正確に規定されていない水溶液試料の定量を試みる予定である。また、他の溶媒消去法も現在検討中である。

参考文献

1. Santosh Kumar Bharti, Raja Roy, Quantitative ^{1}H NMR spectroscopy, Trends in Analytical Chemistry, *35*, 5-26 (2012).

P9

多様なユビキチン鎖のロバストな合成法とＮＭＲ法への応用

○鈴木拓巳[1]，　高田夢人[1]，伊藤隆[1]，　三島正規[1]
[1]首都大学東京・大学院・理学研究科

Robust synthesis method of various ubiquitin chains and application to NMR

○Takumi Suzuki[1], Yumeto Takada[1], Yutaka Ito[1], Masaki Mishima[1]
[1]Graduate School of Science, Tokyo Metropolitan University

It is known that the intracellular role of polyubiquitination differs depending on the lysine position that forms a polyubiquitin chain. In addition, it has been also found that polyubiquitin chains take not only a homogenous binding mode but also mixed linkages and branched binding modes. Branched polyubiquitin chains have only partially understood their functions and roles, and more detailed analysis is needed. Therefore, we considered synthesis of branched polyubiquitin chains based on chemical biology without E1, E2 and E3 enzymes. We used a click reaction and a protein ligation reaction by sortase A. We have succeed in synthesizing branched tetrameric ubiquitin. In this presentation, we will report the practical synthetic strategy and application to NMR structural studies.

【序論】

ユビキチンには7つのリジン残基(K6、K11、K27、K29、K33、K48、K63)が存在し、これらすべてでポリユビキチン化が起こる。興味深いことに、どのリジン残基でポリユビキチン鎖を形成するかによって、ポリユビキチン化の細胞内での役割が異なることが知られている。例えばK48を介するポリユビキチン鎖は基質タンパク質をプロテアソームでの分解へ導くが、K63ではシグナル伝達やDNA修復に関与する。さらにはリジン残基以外にも、N末端のメチオニン残基を介して形成される直鎖のポリユビキチン鎖も報告されている。また、ポリユビキチン鎖の重合様式が、単一の連結様式によるものだけでなく、混合連結型、枝分かれした結合型を取るポリユビキチン鎖もあることが分かってきた(1)。枝分かれ型のポリユビキチン鎖としてK48/K63分岐型はNF-κBシグナルの増強することが報告されているが、その他の枝分かれ型ポリユビキチン鎖は機能や役割が一部しか分かっておらず、今後より詳細な解析が必要である。そこで我々は、E1-E3の酵素を用いることなく、化学的な合成法のみで大量かつ低コストで多様なユビキチン鎖を作成することを考えた。

反応には、クリック反応(2)(3)(Fig.1)とsortase Aによるタンパク質ライゲーション反応を用いた。アジドはヨードアセトアミドアジドをリンカーに、アルキンはプロパギルオキシフェニルアラニンを部位特異的導入することで大腸菌発現タンパク質に導入した。また、sortase Aを用いたライゲーション反応では、現在までに多くの例が報告されているが、タンパク質同士を連

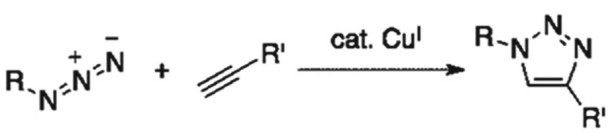


Fig.1 Schematic drawing of Huisgen click reaction

ポリユビキチン鎖，クリック反応，溶液ＮＭＲ

○すずきたくみ，たかだゆめと，いとうゆたか，みしままさき

結する場合、最も良い収量を得るためには室温で1日から数日が必要であった。そこで我々は、活性を上げるために高活性型のsortase A[(4)]を用いた。このsortase Aは4℃でも数時間の反応時間でライゲーション反応が可能であった。ロバストなユビキチン合成法とそのNMR解析への応用について報告する。

【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ユビキチンの二量体の作成を試みた。ユビキチンのプラスミドと非天然アミノ酸である4-Propargyloxy-L-phenylalanineを導入するプラスミドとの共発現系を作成した（Fig.2）（本稿では、変異によって導入された非天然アミノ酸をXとする）。またC末端にシステインを導入したユビキチンにヨードアセトアミドアジドを付加させた。これらをクリック反応させることにより二量体を作成した。また、この合成法を応用するため枝分かれ型四量体の作成を試みた。

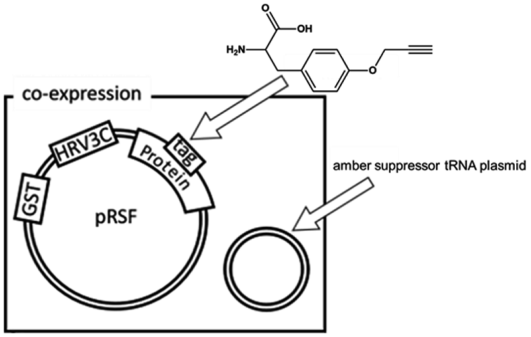


Fig.2 Schematic drawing of the expression system
The expression vector contains an amber codon to incorporate to 4-Propargyloxy-L-phenylalanine by amber suppressor codon.

【結果】

クリック反応において二量体ユビキチンの作成に成功した（Fig.3）。そしてHPLCにより単量体と二量体を分離した。溶液ＮＭＲ法により、G75C、K6X、G75C-K6Xを測定し、スペクトルを重ねた。リンカーに近い部分の化学シフト変化が見られたことから、二量体間での結合が確認できた（Fig.4）。また、クリック反応の条件検討や精製方法の改良を経て枝分かれ型四量体ユビキチンの作成に成功した（Fig.5）。

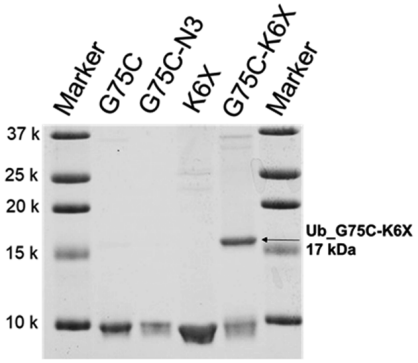


Fig.3 SDS-PAGE of protein ligation of Ub_G75C and Ub_K6X by click reaction

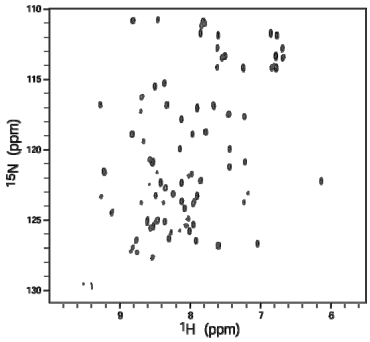


Fig.4 HSQC spectra of the Ub G75C-K6X

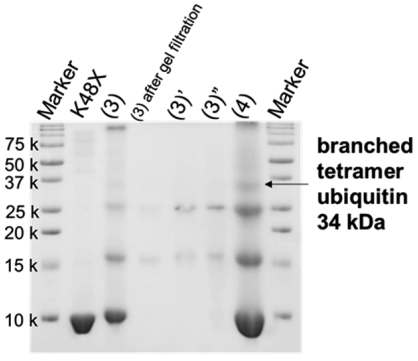


Fig.5 SDS-PAGE of synthesis branched tetrameric ubiquitin

【展望】

今後はクリック反応の条件検討や合成ルートの改良により枝分かれ型四量体ユビキチンの収量を向上させ、溶液NMR測定を行いたい。また、細胞内において野生型のポリユビキチン鎖と同様の働きをするのか検証していく。

【参考文献】

(1) Daniel, S., et al., *Proteomics* 2015, 15, 844-861
(2) Timothy, R., et al., *Org. Lett.* 2004, Vol. 6, No. 17, 2853-2855
(3) Vu, H., et al., *Angew. Chem. Int.* 2009, 48, 9879-9883
(4) Aizu, T., et al., *BBA* – General Subjects *in press.*

P10

PEGを付加したアプタマーのNMR解析

○坂本泰一
1千葉工業大学・先進工・生命科学

NMR analysis of PEG conjugated aptamer

○Taiichi Sakamoto[1]
1 Dept. Life Sci., Fac. Adv. Eng., Chiba Institute of Technology

Aptamers are nucleic acids that bind to a target molecule with high affinity and specificity, which are selected from systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX). Because of their high affinity and specificity, aptamers are strong candidates of next generation molecular targeted agents. However, for the development of aptamer therapeutics, chemical modification of aptamers is required to improve their nuclease resistance. For the efficient modification, structural information could be important. In this study, influence of PEG conjugation to the aptamer was analyzed by NMR.

近年，アンチセンス核酸とsmall interfering RNA（siRNA)とよばれる核酸医薬品が次々と承認されており，次世代型の中分子医薬品として注目されている．アンチセンス核酸とsmall interfering RNA（siRNA)は，RNAに対して塩基配列の相補性により結合して，標的RNAを切断したり，スプライシング反応を制御したりすることで作用する．一方，抗体のようにタンパク質に結合して作用するアプタマーは，核酸抗体ともよばれ，抗体医薬品に代わる分子標的薬として期待されている．

2004年，血管新生を伴う滲出型加齢黄斑変性症（AMD）の治療薬としてMacugenとよばれるアプタマー医薬品がアメリカ食品医薬品（FDA）により承認され，2008年には日本においても認可されている．AMDは，網膜の中心部にある黄斑が加齢などの原因で変性し，その結果、物がゆがんで見えたり、視野の中心が欠けて見えるなどの症状を起こす疾患であり，高齢者の失明や視力低下の主な原因となっている．Macugenは，AMDにおける異常な血管新生の原因となっている血管内皮細胞増殖因子（VEGF）を標的として結合し，その働きを抑えることによりAMDを治療する． Macugen は，28 塩基のオリゴヌクレオチドで構成されており，3´末端に idT（inverted deoxythymidine）が，5´末端に 40 kDa の PEG（PEG：polyethyleneglycol）が付加されている（図１）．さらに，ピリミジンあるいはプリンのリボースの 2´位の OH基がそれぞれ F 基あるいは O-Me 基に置換されている．アプタマーは，SELEX（Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment）法とよばれる方法によって作製することができる．SELEX法では，40塩基程度のランダムな配列をもつRNAライブラリの中から標的分子に結合するRNAを選別すること

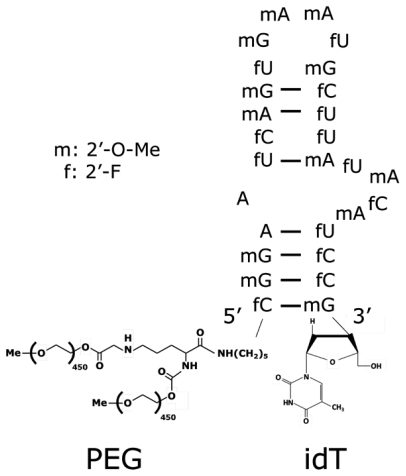


Fig. 1. Macugen

アプタマー，核酸医薬，化学修飾

○さかもとたいいち

によってアプタマーを得るが，RNAは生体内で容易に分解されてしまうため，様々な化学修飾が必要である．しかし，化学修飾を適切に行わないとアプタマーの結合能が失われてしまう．現在のところ，化学修飾は試行錯誤によって行われており，この過程がアプタマー医薬品を開発する際のボトルネックの一つになっている．

MacugenのNMR解析は，Leeらによって報告されており，図1のようなヘアピン構造を形成することが明らかとなっている（Ref）．また，化学シフト摂動法により，VEGFのヘパリン結合部位に結合することが明らかとなっているが，立体構造については明らかにされていない．また， PEG付加を行っていないアプタマーでNMR解析されており，医薬品として使用されるPEG付加の状態については報告されていない．本研究では，PEGを付加することによるMacugenの構造への影響について解析したので報告する．

【 方法】

Macugenを**ジーンデザイン社に依頼合成した**．Macugenを10 mM Tris-d_{11}，100 mM塩化ナトリウム，0.55 mM塩化カルシウム，0.05 mM EDTAの水溶液に溶解し，NMRスペクトルを測定した．PEGを付加したMacugenおよびPEGを付加していないMacugenの濃度は，どちらも0.2 mMとした．NMR測定には，AVANCE 600分光計を用いた．測定温度は，283 Kと298 Kとした．

【 結果および考察】

イミノプロトンスペクトルを測定したところ，Lee らの報告と同様な NMR スペクトルが観測された．2D NOESY スペクトルを測定し，Lee らの報告を参考にして，イミノプロトンシグナルを帰属した．PEG を付加したものと付加していない Macugen の 1D イミノプロトンスペクトルを比較したところ G2，G3 のシグナルが変化し，G27 のシグナルは PEG 化によって，広幅化していた．しかし，この他のシグナルは大きな変化は見られなかった ．

次に,PEG を付加したものと付加していない Macugen の 2D NOESY スペクトルの H8/H6/H2-H1’/H5 の領域を比較したところ，PEG に近い C1，C25，C26 由来のシグナルが変化していた．

以上のNMR解析の結果から，PEGの付加することによるMacugenの構造への影響は末端のステムに限られており，全体的な構造はPEGの有無で変わらないことがわかった．一方，変異体などによる解析および化学シフト摂動法による解析から，Macugenは標的タンパク質である VEGFと内部ループで結合すると考えられている．PEGの有無によってVEGFとの結合能が変わらないことが明らかとなっており，今回のNMR解析の結果と一致すると考えられる．

また，核酸医薬品が使用されるようになると，それらの品質管理が必要になる．現在，それらの品質管理には，HPLCが主に使われているが，PEGは単一の化学構造を持っていないため，PEGが付加された後の化学的均一性については議論されていない．さらに，立体構造が重要なアプタマー医薬品の場合，立体構造の均一性も重要であり，NMR解析が有効であると考えている．今後，核酸医薬品の品質管理にNMRが必要になることが期待される．

Reference

Lee J.H., Canny M.D., De Erkenez A., Krilleke D., Ng Y.S., Shima D.T., Pardi A., Jucker F., A therapeutic aptamer inhibits angiogenesis by specifically targeting the heparin binding domain of VEGF165, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (2005) **102**, 18902-18907.

P11

常磁性緩和促進(PRE)法を用いたタンパク質変性中間体の立体構造研究：ボレリア菌表層タンパク質OspAの圧力変性と温度変性

若本拓朗[1]，北沢創一郎[2,] ○北原亮[1,2]
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

Paramagnetic relaxation enhancements in locally unfolded proteins: Pressure and heat denaturation of outer surface protein A (OspA) of *Borrelia burgdorferi*

Takuro Wakamoto[1], Soichiro Kitazawa[2], ○Ryo Kitahara[1,2]
1 Graduate School of Life Sciences, Ritsumeikan University
2 College of Pharmaceutical Sciences, Ritsumeikan University

We have investigated conformational fluctuations of outer surface protein A (OspA) by high-pressure NMR spectroscopy. OspA is crucial in the infection of *Borrelia Burgdorferi*, which causes Lyme disease. In a previous study, pressure-induced changes in the NMR spectra indicated that the intermediate conformer of wild-type OspA has a folded N-terminal domain but disordered central and C-terminal domains (1). We suggested that the selective unfolding of the C-terminal domain exposes the receptor binding sites of OspA to interact efficiently with the tick receptor for OspA (TROSPA) in the tick gut. Here, we characterized the structure of pressure- and temperature-induced intermediate conformations of OspA by NMR combined with paramagnetic relaxation enhancement (PRE). The PRE results reveal disorder in the central and C-terminal regions of the intermediate structures.

【背景と目的】

NMR法やX線結晶構造解析法、低温電子顕微鏡法により、安定な立体構造をもつタンパク質の構造研究は大きく進展した。しかしながら、それはタンパク質がもつコンフォメーションの１つ、いわゆる天然構造を解明したにすぎない。近年、溶液NMR法を中心に、様々な分光学的手法により、天然状態を逸脱した高いギブズエネルギーを持ったコンフォメーション（高エネルギー構造）の存在が明らかになってきたが、その立体構造解析法は十分に発展していない。我々は、タンパク質の高エネルギー構造の研究に優れた高圧力NMR法に加え、長距離の原子間距離情報の観測に優れた常磁性緩和促進(PRE)法を用いることにより、ボレリア菌表層タンパク質 (OspA)の部分変性し広がった変性中間体の構造研究を行った。

ライム病は、マダニを介したボレリア菌による感染症である。ボレリア菌の表面に存在するOspAが、マダニの腸管細胞の受容体TROSPAを認識し腸管内で共棲することでマダニを介して人間に感染する。OspAは257のアミノ酸残基からなりN末端とC末端側に球状のドメインをもち、それらドメインがβストランドで繋がれた構造をとっている（Fig. 1）。N末端側のドメインはボレリア菌の

常磁性緩和促進、圧力、OspA

わかもとたくろう、きたざわそういちろう、○きたはらりょう

細胞膜と結合しており、C末端側のドメインはマダニの腸管細胞を認識する部位になっている。したがって、受容体を認識する際にはC末端側のドメインが露出した構造を取る必要がある。これまで我々は、高圧力NMR法により中央からC末端にかけて約150残基が局所的に変性している変性中間体を発見した。また、局所変性し探索範囲が広がることで遠方の受容体を認識する分子認識モデルを提唱した(1)。温度変性においても変性中間体の存在が見つかっている(2)。今回、高圧力NMR法を用いたOspAの変性中間体の立体構造解析を報告する。

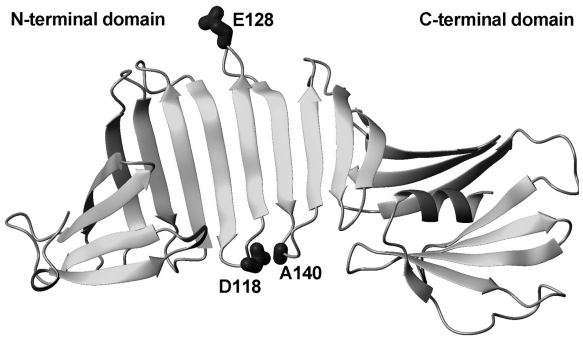


Fig.1 Crystal structure of OspA. MTSL-tagged sites are depicted by bold sticks.

【実験方法】

常磁性プローブとしてシステイン側鎖に共有結合可能なMTSLを用いた。OspAの立体構造を不安定化しないように、ターン部位であるD118またはE128またはA140をシステインに変異した蛋白質を作製し、MTSLを導入した。常磁性MTSLを有した試料（常磁性体）をアスコルビン酸で処理することにより、反磁性体とした。高感度検出器クライオプローブを装備した^{1}H-950 MHz NMR装置（Bruker AVANCE III、大阪大学蛋白質研究所）に、2500気圧まで測定可能な高圧力NMRシステムを構築した。常磁性体および反磁性体について、500気圧毎に１気圧から2500気圧まで^{1}H/^{15}N HSQC測定を行った。常磁性体と反磁性体の信号強度比から、横緩和速度定数におけるPREを求め、MTSLの不対電子とアミド水素の間の距離を算出した。

【結果と考察】

加圧とともに、常磁性体と反磁性体の信号強度比が顕著に変化する残基が観測された。観測核が不対電子と近接する場合、NMR信号はPRE効果に依存して減弱する。したがって信号強度比の減弱は不対電子に近接することを示し、信号強度比が1の場合は不対電子と遠距離（30 Å以上）にあることを示す。E128C変異体において、天然状態の場合は80-83番とプローブが近距離に位置していたが、変性中間体が安定に存在する条件では信号強度比が増加していることから遠ざかっている傾向を示した。また、59-63番に関しては信号強度比が減弱していることから、近接している傾向を示す。PREの結果をまとめると、C末端側ドメインの局所変性に伴って、中央部分もβシートが壊れはじめ、ねじれた構造を取っている可能性が示唆された。同様な結果は、D118C変異体、A140C変異体でも観測された。これらの傾向は圧力変性・温度変性の両方で見られることから、両者の変性状態に類似性が示唆された。

【参考文献】

1. Kitahara, R. et al., A delicate interplay of structure, dynamics, and thermodynamics for function: a high pressure NMR study of outer surface protein A, *Biophys. J.* **102**, 916-926 (2012).
2. Koide, S. et al., Multiple denaturation of *Berrelia burgdorferi* OspA, a protein containing a single-layer β-sheet, *Biochemistry* **38**, 4757-4767 (1999).

P12

分子クラウディング環境下の蛋白質の緩和解析

○田岸亮馬[1]，田中　孝[1]，三島正規[1]，池谷鉄兵[1]，伊藤　隆[1]
[1]首都大学東京大学院理学研究科化学専攻

Relaxation analysis of proteins under macromolecular crowding

○Ryoma Tagishi[1], Takashi Tanaka[1], Masaki Mishgima[1], Teppei Ikeya[1] and Yutaka Ito[1]
[1]Department of Chemistry, Tokyo Metropolitan University

Proteins that work inside living cells exhibit their biological functions under various effects such as structural stabilization by excluded volume effect, destabilization by nonspecific interactions and electrostatic interaction. Relaxation analysis of proteins with crowding reagents or in *E.coli* cells so far has revealed that the backbone ^{15}N T_2 relaxation times of proteins in the crowding environment are greatly reduced. However, it has not yet been clarified what kind of intracellular phenomena actually contribute to changes in T_2 relaxation.

In this study, we aimed to understand the dynamics of proteins in the macromolecular crowding environment quantitatively by employing backbone ^{15}N relaxation analysis, estimation of relaxation contribution (Rex) to T_2 by TROSY-selected spin echo experiments[1] and ^{15}N-DEST(dark-state exchange saturation transfer) experiments[2].

【序論】

細胞内の分子クラウディング環境下で働く蛋白質は，排除体積効果による立体構造の安定化，静電相互作用等の非特異的相互作用による立体構造の不安定化，特異的相互作用などの影響を受けながら生物機能を発現している．しかし，これまでの合成高分子や蛋白質を高濃度に共存させた試験管内分子クラウディング系のNMR解析や，in-cell NMR解析では，分子クラウディング環境がもたらす影響について充分な統一的知見は得られていなかった．そこで本研究では，^{15}N緩和解析やTROSY selected spin echoを用いたR_{ex}の解析[1]，DEST(dark-state exchange saturation transfer)[2]を行うことによって，分子クラウディング環境において，蛋白質が置かれている環境の詳細に迫ることを目的とした．

【実験】

大腸菌内の発現系を用いて，モデル蛋白質となる^{15}N標識されたGB1およびTTHA1718のin-cell NMR試料と単離・精製試料の調製をそれぞれ行った．単離・精製した蛋白質にglycerol, sucrose, bovine serum albumin(BSA), lysozymeをそれぞれ添加した試料を調製し，主鎖^{15}N核のT_1およびT_2緩和解析を行った．また，細胞内環境と同様な挙動が観測された試料については，^{15}N-TROSY selected spin echoを用いてT_2緩和に対する交換過程の寄与(R_{ex})の解析を行った．また，in-cell NMR試料については^{15}N-DESTを用いて蛋白質の巨大構造体との結合状態の解析を行った．

溶液 NMR, 分子クラウディング, 蛋白質動態, 緩和解析, DEST

○たぎしりょうま, たなかたかし, みしままさき, いけやてっぺい, いとうゆたか

【結果･考察】

^{15}N-T_1, T_2緩和解析の結果，BSA，lysozymeを高濃度に添加した試料について，細胞内環境と類似した結果が得られた(Fig.1)．続いて，BSAを濃度500 g/Lで添加した試料についてR_{ex}の算出を試みたところ，ほぼ全ての残基についてR_{ex}値は5 Hz以下となり，化学交換は観測されなかった(Fig.2c,d)．しかし，^{15}N-TROSY selected spin echoを用いたR_{ex}解析では，μ~msec程度より遅い交換過程を捉える事が不可能なため，msecより遅い交換過程を捉えることができる^{15}N-DESTを用いた測定･解析を行った．その結果，大腸菌細胞内においてTTHA1718およびGB1について，各々巨大構造体との結合状態が単量体に対して2~3%程度であり，結合乖離定数が100 Hz程度という推定値の算出に成功した(Fig.3)．

今後は，この大腸菌内での実験に加えて，大腸菌粗抽出液を加えた試料，BSAやlysozymeをクラウダーとして添加した試料について同様の^{15}N-DESTの実験を行っていく．また，今回取り上げた，TTHA1718やGB1は小さな球状蛋白質であるため，扁平な蛋白質や柔軟な立体構造を持つ蛋白質に対しても同様の結果が得られるか否かについても解析を行っていきたい．

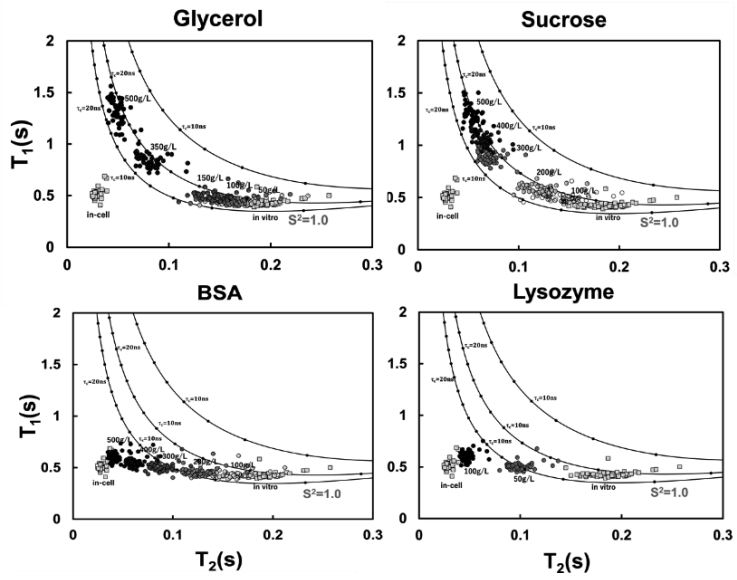


Fig.1 glycerol, sucrose, BSA, lysozyme を添加した GB1 の主鎖 ^{15}N 核 T_2 緩和時間に対する T_1 緩和時間のプロット図．プロットの濃淡は添加した glycerol, sucrose, BSA, lysozyme の濃度変化(淡→濃で濃度増大)を表している．

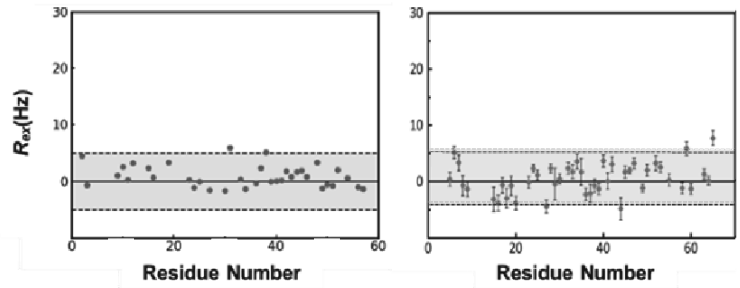


Fig.2 大腸菌細胞内の TTHA1718(左)，500 g/L BSA を添加した GB1(右)の，^{15}N 核 T_2 緩和時間に対する R_{ex} 値のプロット図．

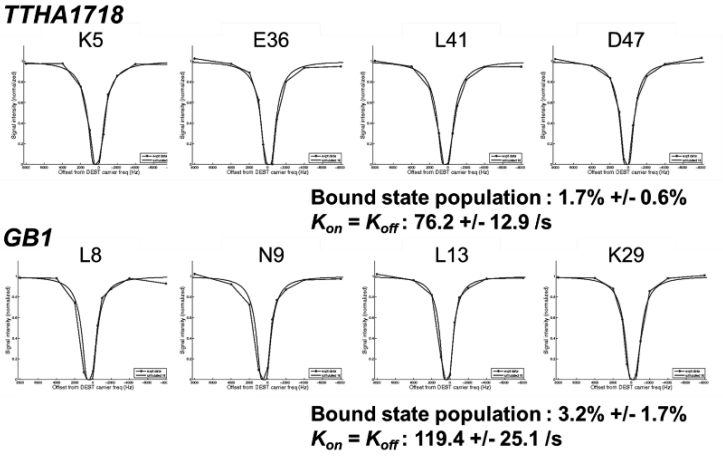


Fig.3 大腸菌細胞内の TTHA1718(上)，GB1(下)の ^{15}N-DEST の測定･解析結果．

【参考文献】

[1] Wang, C. et al. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 8968-8969 (2003); [2] Fawzi, N.L. et al., *Nature* **480**, 268–272 (2011).

P13

高圧下におけるユビキチンの水-アミド水素交換反応:H/D Exchange & CLEANEX-PM NMR

○北沢　創一郎[1]，若本　拓朗[2]，北原　亮[1, 2]
1立命館大学　薬学部
2立命館大学大学院　生命科学研究科

Protein hydration coupled with conformational fluctuation of Ubiquitin studied by high-pressure CLEANEX-PM and H/D Exchange NMR

○Soichiro Kitazawa[1], Takuro Wakamoto[2] Ryo Kitahara[1,2]
1Department of Pharmaceutical Sciences, Ritsumeikan University
2Graduate School of Life Sciences, Ritsumeikan University

Conformational fluctuations of proteins are important for their function. However, changes in the location and dynamics of hydrated water with a conformational transition have not been clear. Here we show changes in water-amide proton exchange rates involved to the conformational transition of ubiquitin from native (N_1) to alternatively folded state (N_2) using high-pressure phase-modulated clean chemical exchange (CLEANEX-PM) and H/D Exchange (HDEX) NMR spectroscopy. CLEANEX-PM demonstrated that water-amide proton exchange rates of residues 32-35, 40, 41 and 71 were consistent with the transition time scale between N_1 and N_2 (~100 μs). HDEX showed that water-amide proton exchange rates of residue 3, 4, 5, 17, 26, 27, 29, 30, 44 and 56 were significantly increased with increasing pressure. These results suggest a stabilization of the totally unfolded state of the protein because the residues are located in the protein interior and the volume change for the transition ($\Delta V°_{HX}$) are close to that of the global-unfolding[1]. The present strategy, namely a combination of CLEANEX-PM and HDEX NMR coupled with pressure perturbation, is useful to detect μs~s conformational dynamics of proteins and then characterize more open and hydrated protein structures.

【研究の背景と目的】

生理的条件下におけるタンパク質の構造の揺らぎは、その機能発現にとって非常に重要である。この構造の揺らぎは単純なタンパク質分子の原子座標の変化だけではなく水和している水分子の座標変化を伴うため、その安定性や熱力学量はタンパク質分子だけではなく水分子も含めて考える必要がある。近年、タンパク質分子の構造変化・構造揺らぎはNMRを含む分光研究により多くのことが分かってきているが、その構造の揺らぎが影響するタンパク質の水和環境の変化は、未だ不明な点が多い。

Phase-modulated clean chemical exchange (CLEANEX-PM)法は、秒より十分に速い水-アミド水素交換速度を測定可能な手法である。それに対してH/D Exchange (HDEX)法は、より遅い水-アミド水素交換反応を観測できる。これら二つの手法により水-アミド水素交換反応が、タンパク質表面に露出しているような速い残基からタンパク質疎水性コア

High pressure、H/D Exchange、CLEAENX-PM

○きたざわ　そういちろう, わかもと　たくろう, きたはら　りょう

に埋もれているような遅い残基まで測定することが可能である。我々はこれらとコンフォメーション変化に敏感な高圧力NMR法を組み合わせることで、構造揺らぎにより露出しバルク水と相互作用するアミノ酸残基とその安定性について解析を行った。

【結果と考察】

高圧CLEANEX-PM NMR法により、Ubiquitinの天然状態(N_1)と高エネルギー状態(N_2)間の状態転移にかかわる残基周辺(32-35, 40, 41, 71)において大きな水-アミド水素交換反応速度の増加と大きな水-アミド水素交換反応に伴う部分モル体積差($\Delta V°_{HX}$)が観測された。これら残基は、 先行研究においてN_2状態で安定性の低下や水素結合の開裂、運動性の増加、水-アミド水素交換反応の促進が観測された残基と一致した[2]。また、高圧CLEANEX-PM NMR測定により算出された$\Delta V°_{HX}$は、おおよそ–20 ml/molとなった。興味深いことにこの$\Delta V°_{HX}$は、化学シフトから算出された状態転移に伴う体積変化とおおよそ一致した。したがって、これら残基はN_1-N_2状態転移に伴い安定性の低下しアミド水素が露出したと考えられる。

一方、高圧HDEX法の結果では疎水性コア領域周辺の残基において高圧CLEANEX-PM NMR法でみられる体積変化より明確に大きい$\Delta V°_{HX}$ (≈ –50 ml/mol)を持つ残基が観測された。先行研究によりUbiquitinの変性に伴う体積変化はおおよそ–50±20 ml/mol [1]であることが分かっている。疎水性コア周辺の残基で観測された大きな$\Delta V°_{HX}$ の値と先行研究の値はおおよそ一致していることから、これら残基はglobal unfoldを強く反映していると考えられる。対して、それ以外の残基はsub-global unfoldを反映していると考えられる。これらsub-global unfoldを示すアミノ酸残基の中で、高圧CLEANEX-PM NMR法で見られた体積変化(–35 ml/mol<$\Delta V°_{HX}$<–15 ml/mol)と近い値を示す残基は、高圧CLEANEX-PM NMR法で同等程度の体積変化を示す残基周辺に多く見られ、高圧CLEANEX-PM NMR法と同様のN_1-N_2状態転移を反映していると考えられる。

これらの解析から高圧CLENEANEX-PM NMR法及び高圧HDEX法により、global unfoldに重要な残基が示された。また、sub-global unfoldを示す残基においても高エネルギー状態において安定性が低下しバルク水に露出する残基が示された。これらの結果から、高圧CLENEANEX及び高圧HDEX法による解析は、高エネルギー状態の水和環境を解析するのに有効なだけではなく、高エネルギー状態の安定性や部分モル体積差を解析可能な強力な手法であることが示された。

【参考文献】

1) H Herverbold and R Winter, ***Biochemistry***, 41, 2396-401 (2002)

2) S Kitazawa, T Kameda, M Yagi-Utsumi, K Sugase, NJ Baxter, K Kato, MP Williamson, R Kitahara, ***Biochemistry***, 52, 1874-85 (2013)

P14

基質の特異的結合を介したMAPキナーゼp38αのアロステリック活性制御の動的構造基盤

○徳永 裕二[1]、竹内 恒[1]、嶋田 一夫[1,2]
1 国立研究開発法人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

Structural basis for the regulation of the kinase activity of MAP kinase p38α by the allosteric interaction with a specific substrate

○Yuji Tokunaga[1], Koh Takeuchi[1], Ichio Shimada[1,2]
1 Molecular Profiling Research Center for Drug Discovery, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (molprof-AIST)
2 Graduate school of pharmaceutical sciences, the university of Tokyo

The kinase activity of a member of MAP kinases, p38α, was regulated by the allosteric interaction with its specific substrates, although its structural basis remained unclear [1]. In this research, we found that p38α was in an equilibrium between two states with higher and lower affinities for ATP. This equilibrium was shifted to the higher affinity state upon forming the allosteric interaction, which could underlie the allosteric enhancement of the affinity of p38α for ATP. Indeed, mutational analyses of the conserved motif of the allosteric sequence of a substrate revealed the correlation between the extents of the equilibrium shift of p38α and the enhancements of the affinity for ATP. From these results, we concluded that the allosteric interaction enhanced the kinase activity of p38α via modulating the functional equilibrium.

１．背景および目的

MAPキナーゼp38αはストレス応答を始めとした多様な生命現象に関与している。p38αは、ATP結合部位を含む活性部位とは反対側のアロステリック部位において、特異的基質のアミノ酸配列末端に含まれる$(R/K)_2$-X_{2-6}-Φ_A-X-Φ_Bを高い親和性にて認識する（Xは任意の、Φは疎水性のアミノ酸を指す）（図１a）。このような相互作用は“ドッキング相互作用”と呼ばれ、シグナル伝達の特異性を保障する機構として知られてきた。発表者らは、先行研究において、ドッキング相互作用がp38αのATPおよび基質のリン酸受容部位に対する親和性を増強させ、さらにATPから基質へのリン酸転移反応を促進することにより、p38αによる特異的な基質リン酸化を効率化することを見出した[1]。特に、ATP親和性は解離定数約400μMから20μMと顕著に増強されることで、ストレス下での細胞内ATP濃度の低下による活性の低下を防ぎ、ストレス応答キナーゼとしての機能に貢献していることが示唆された。しかしながら、ドッキング相互作用による活性増強の構造機構は明らかでなかった。本研究では、溶液NMR法によるp38αの解析により、アロステリック活性制御の構造機構を明らかとし、活性制御の普遍性および調節性について理解することを目的とした。

キナーゼ、アロステリック制御、構造平衡

○とくなが　ゆうじ、たけうち　こう、しまだ　いちお

２．結果

ILVM残基のメチル基を選択的に$^{1}H/^{13}C$標識した*apo*状態p38αの^{1}H-^{13}C SOFAST-HMQCスペクトルを、高タンパク質濃度・高積算回数にて測定した。この結果、ATP結合部位に存在するIle-84を始めとして、構造全体にわたる複数のメチル基にマイナーピークが観測された（図１b）。マイナーピークの化学シフトはATP結合状態とよく一致したことから、マイナーピークを与える構造状態はATP高親和性状態であり、p38αは*apo*状態においてATP低親和性状態と高親和性状態の平衡にあると考えられた。実際に、p38αのATP親和性を20倍に向上させる基質ドッキングペプチドを添加した結果、マイナーピークのシグナル強度は大きく上昇した（図１c）。さらに、ATP親和性上昇と平衡調節の関係を調べるために、ドッキングペプチドの変異体解析を実施した（図２a）。この結果、p38αの構造平衡に対する変調の大きさとp38αのATP親和性の増強の間に相関が見出された（図２b）。以上より、アロステリック相互作用は、p38αの構造平衡の調節を介してキナーゼ活性を制御すると結論した。

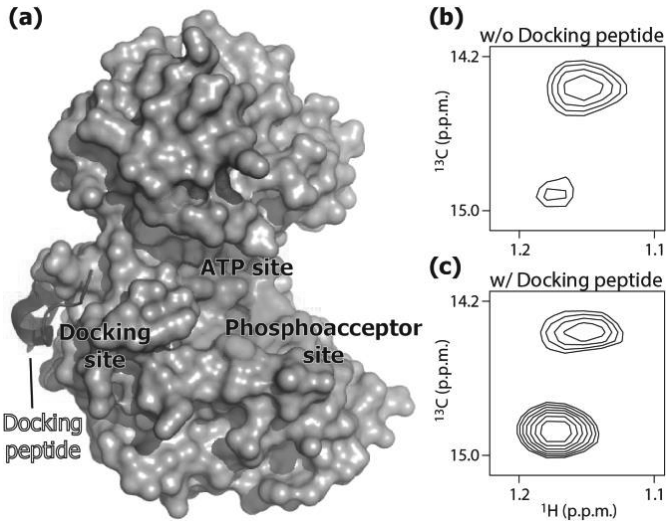


Fig. 1. ドッキング相互作用によるp38αの構造平衡の調節. (a)p38αの活性部位およびドッキング部位(PDB: 2OZA). (b, c)ATP結合部位Ile-84由来シグナルは2状態を示し、ドッキング相互作用に伴いATP高親和性状態（低磁場側）の強度を増す.

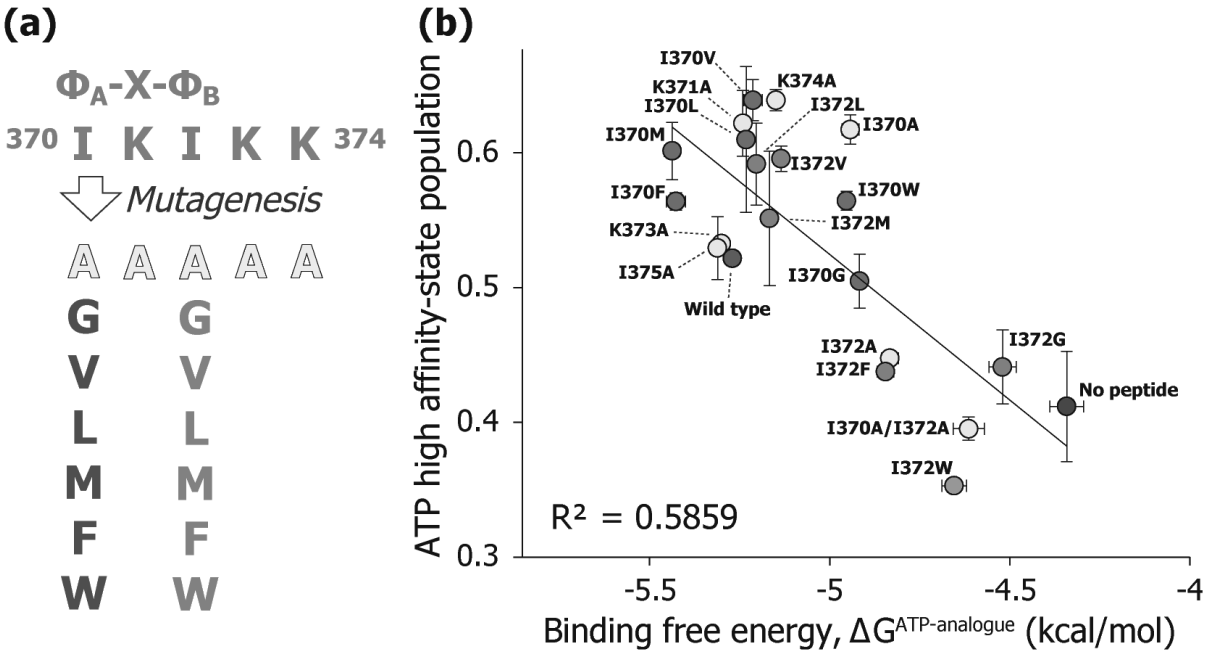


Fig. 2. (a)保存されたΦ_A-X-Φ_Bモチーフへの網羅的変異導入. (b)ドッキングペプチド変異体を添加した時の、p38αのATP結合自由エネルギーとATP高親和性状態の存在比の相関.

[1] Tokunaga Y., Takeuchi K., Takahashi H., and Shimada I., *Nat Struct Mol Biol* (2014), **21**, 704-11.

P15

ヘテロクロマチンタンパク質HP1αと染色体パッセンジャー複合体因子INCENPとの相互作用

○古川　亜矢子[1]，迫　洸佑[2]，栗田 順一[1]，広田 亨[2]，西村　善文[1]
1横浜市立大学大学院　生命医科学研究科
2公益財団法人　がん研究会

英文演題名　Interaction between the heterochromatin protein HP1α and the chromosomal passenger complex component INCENP

○Ayako Furukawa [1], Kosuke Sako [2], Jun-ichi Kurita[1], Toru Hirota[2], and Yoshifumi Nishimura[1]
1 Graduate School of Medical Life Science, Yokohama City University
2 Cancer Institute of the Japanese Foundation for Cancer Research

The highly conserved chromosomal passenger complex (CPC) is a key regulator of chromosome segregation and cytokinesis. The CPC is composed of Aurora B and Inner Centromere Protein (INCENP). The C-terminal region of INCENP interacts with Aurora B to activate the Aurora B kinase activity. In addition, INCENP binds to heterochromatin protein 1 (HP1), which enhances the kinase activity of Aurora B[1]. HP1 contains the N-terminal chromo-domain (CD), and the C-terminal chromo-shadow domain (CSD) that binds to INCENP. To reveal the molecular mechanism of the activation, we have analyzed the interaction mode of INCENP with the HP1α CSD and found that the minimal binding region of INCENP to the HP1α CSD contains an additional C-terminal region to the typical PxVxL motif found in many HP1 binding proteins. Here, we have examined the novel complex structure of the HP1α CSD bound to the INCENP minimal binding region.

染色体パッセンジャー複合体(CPC)は、リン酸化酵素Aurora Bとその活性を制御するINCENP、Survivin、Borealin/Dasraから成るタンパク質複合体である。CPC中のAuroraBの活性が、染色体の成熟、動原体と微小管との正確な結合、細胞質分裂などの分裂期の様々なイベントとその制御に極めて重要な役割を果たしている。広田らは、ヘテロクロマチンタンパク質HP1αがICNENPに結合するとAuroraBの活性が促進することを見出した[1]。また、様々な臓器由来のがん細胞でINCENPに結合するHP1αの量が著しく減少していた。そのため、がん細胞ではAurora Bの活性が減少し、染色体が不安定化することも明らかにしている。INCENPとHP1αとの結合がAuroraBの活性を促進する分子機構を明らかにするために、INCENPとHP1αの相互作用解析を行った。
HP1αは、クロモドメイン(CD)とクロモシャドードメイン(CSD)を持ち、CDが9番目のリシンがメチル化されたヒストンH3(H3K9me3)を認識してクロマチンに局在している。分裂期に入ると10番目のセリン(H３S10)がAurora Bによりリン酸化されることにより、HP１αはクロマチンから解離する。INCENPのC末にAuroraBが結合し、INCENPの中央部の天然変性領域に存在するPxVxLモチーフを含む領域に、HP1αが結合することは既に報告されている。HP１αはCSDが２量化することによって形成される疎水面を

ヘテロクロマチン、細胞分裂期、動的構造変化

○ふるかわあやこ、さここうすけ、くりたじゅんいち、ひろたとおる、にしむらよしふみ

介して、PxVxLモチーフを持つ様々なタンパク質と結合する。

INCENPのHP1α結合領域を同定するために、NMRでINCENPに対してHP1αの滴定実験を行った。INCENPのPxVxLモチーフのみではHP1αは結合することができず、モチーフの更にC末を含む30残基(PxVxLモチーフ+サイト1)がHP1αとの結合に必須であることを明らかにした。次に、HP1αのINCENP結合部位の同定を行った。HP1α全長及びHP1αCSDへのINCENPの結合部位に差はなかったため、同定したINCENP30残基のペプチドをHP1α_CSDに滴定した。非結合時では左右対称であったHP1α_CSD2量体のシグナルが、INCENPの結合によって非対称へと変化し、いくつかの残基のシグナルが２つのピークに分かれた (図1)。HP1α_CSDの非結合状態とINCENP結合状態の化学シフト差を解析した結果、両方のCSDに変化がある残基(グループ１)と片方のCSDだけに化学シフト変化がある残基(グループ2)が存在することが分かった(図2)。既に報告されているHP1_CSDとshugoshinとの複合体の結晶構造と比較すると、グループ1がPxVxLモチーフと結合し、グループ2がINCENPのPxVxLモチーフ後の領域(サイト1)と結合すると考えられる。以上の結果から、INCENPとHP1αの相互作用様式は、今まで報告されているHP1_CSDとPxVxLモチーフ結合様式とは異なることを明らかにした。

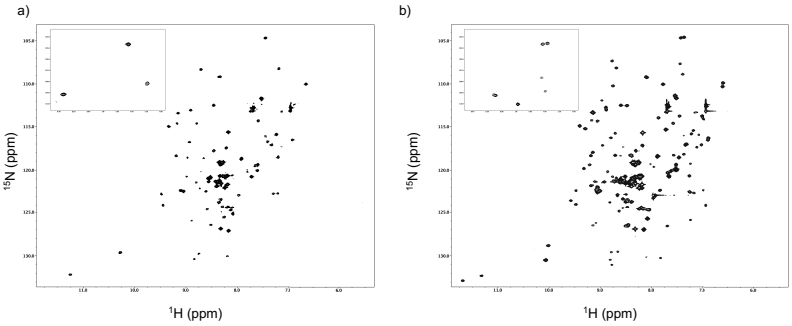


Fig. 1. ^{1}H-^{15}N HSQC spectra of HP1α_CSD in the absence(a) and presence (b) of INCENP peptide

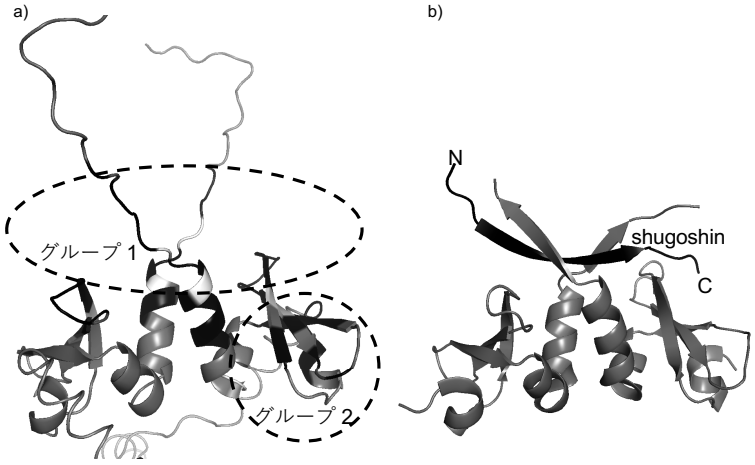


Fig. 2. (a) Mapping of the residues with chemical shift difference values lager than 0.1 ppm on the structure of HP1α_CSD (b) Crystal structure of the complex between HP1β_CSD and Shugoshin (PDB ID:3q6s)

更に、INCENPのPxVxLモチーフ変異体とサイト1変異体を細胞で発現させると、HP1αのセントロメアへの局在量がPxVxLモチーフの変異体と同程度低下しており、新規の相互作用は細胞内でも機能していることも明らかにしている。

(1) Abe, Y., Sako, K., Takagaki, K., Hirayama, Y., Uchida, K.S., Herman, J.A., DeLuca, J.G., Hirota, T. HP1-Assisted Aurora B Kinase Activity Prevents Chromosome Segregation Errors. *Dev Cell*, 36, 487-497 (2016)

P16

PRE,PCSを用いた蛋白質立体構造解析のための常磁性金属タグの性能評価

○田端 真彩子[1], 池谷 鉄兵[1], 彦根 佑哉[1], 岡田 真由[1], 田岸 亮馬[1],
八木 宏昌[2], 木川 隆則[2], 三島 正規[1], 伊藤 隆[1]
[1]首都大学東京・大学院理学研究科
[2]理化学研究所・生命機能科学研究センター

"Performance evaluation" of paramagnetic metal-chelating tags for protein structure determination using PRE and PCS

○Maako Tabata[1], Teppei Ikeya[1], Yuya Hikone[1], Mayu Okada[1], Ryoma Tagishi[1], Hiromasa Yagi[2], Takanori Kigawa[2], Masaki Mishima[1] and Yutaka Ito[1]
[1]*Department of Chemistry, Graduate School of Science, Tokyo Metropolitan University*
[2]*Center for Biosystems Dynamics Research, RIKEN*

Paramagnetic relaxation enhancements (PREs) and pseudocontact shifts (PCSs) caused by interactions of unpaired electrons in transition metal ions and nuclear spins have been proved to be useful for structural analyses of proteins. The key to obtain accurate distance/angle information from PRE/PCS parameters is to find suitable paramagnetic metal-binding tags that allow for site-selective, rigid, irreversible, fast, and quantitative conjugation of the tags to proteins. While various tags have been proposed, there seems to be no "versatile" tags that give strong paramagnetic effects with easy conjugation reactions.

We will report the performance evaluation of four lanthanoid binding tags, DOTA-M8-SPy, DOTA-M8-CAM-I, Maleimide-DOTA, and 4PhSO$_2$-PyMTA, by combining them with three model proteins, ubiquitin, YUH1, and Grb2. The strength of paramagnetic effects and the reactivity with proteins will be discussed.

【序論】

常磁性金属からのparamagnetic relaxation enhancements (PREs)やpseudocontact shifts (PCSs)の解析は, 従来のNOEを用いた解析で得られるよりも大幅に長距離(約10~40 Å)の構造情報の取得を可能にするため, NOE由来の距離制限のみでは立体構造決定が困難な場合に, 構造情報の不足を補う効果的な手法となっている. 常磁性中心からの正確な距離情報の取得には, 常磁性金属結合タグの高い反応性と, 十分な運動性の抑制の両立が鍵となるが, 簡便かつ安価に, 強い常磁性効果を得ることができるような,「決定版の」常磁性金属結合タグは未だ存在せず, 現在も性能向上を謳った金属配位子が提案され続けている.

本研究では, 最近提案された4つの常磁性金属結合タグをモデル蛋白質に導入し, 金属結合能, 蛋白質との反応性, 常磁性効果の強さなどからそれぞれのタグの性能を評価した. また比較のためにMTSLを結合させた蛋白質での実験も行った. モデル蛋白質としては, ヒトubiquitin (以下Ubと略記) L8A/I44A/V70A変異体(76残基), 酵母YUH1(236残基), および

PRE, PCS, 蛋白質立体構造解析

○たばた まあこ, いけや てっぺい, ひこね ゆうや, おかだ まゆ, たぎし りょうま,
やぎ ひろまさ, きがわ たかのり, みしま まさき, いとう ゆたか

マルチドメイン・アダプター蛋白質であるヒトGrb2 C32S/C198A変異体(217残基)を使用した.

【実験】

まず, Ub(L8A/I44A/V70A), YUH1, Grb2(C32S/C198A)について, 大腸菌内発現系を用いて安定同位体標識・試料調製を行った. それぞれ3D NMRを測定し解析することで, 主鎖および側鎖NMRシグナルの帰属を行った. 次に, 常磁性金属結合タグと反応させるため, 内在性のシステインを置換し, 新たに1つのシステインを導入した変異体を作成した. すなわちUbについては, K6C/L8A/I44A/V70AとL8A/I44A/S57C/V70A変異体, YUH1については, N5C/C90S, C90S/S104C, C90S/N140C, C90S/N225Cの各変異体, Grb2については, C32S/S137C/C198AとC32S/C198A/N208C変異体である. それぞれの発現・精製を行い, 常磁性金属結合タグを導入してPREまたはPCSの測定を行った. 常磁性金属結合タグとしては, DOTA-M8-SPy [1], DOTA-M8-CAM-I [2], Maleimide-DOTA [3], 4PhSO$_2$-PyMTA [4]を使用した. MTSLを結合した試料も作成し, PRE測定を行った.

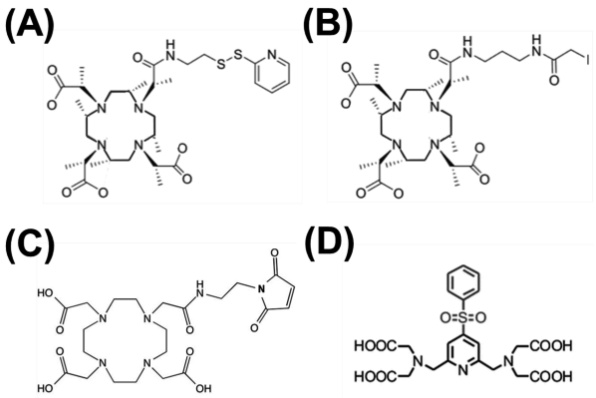


Fig. 1. Structures of paramagnetic metal-binding tags. (A) DOTA-M8-SPy, (B) DOTA-M8-CAM-I, (C) Maleimide-DOTA, (D) 4PhSO$_2$-PyMTA

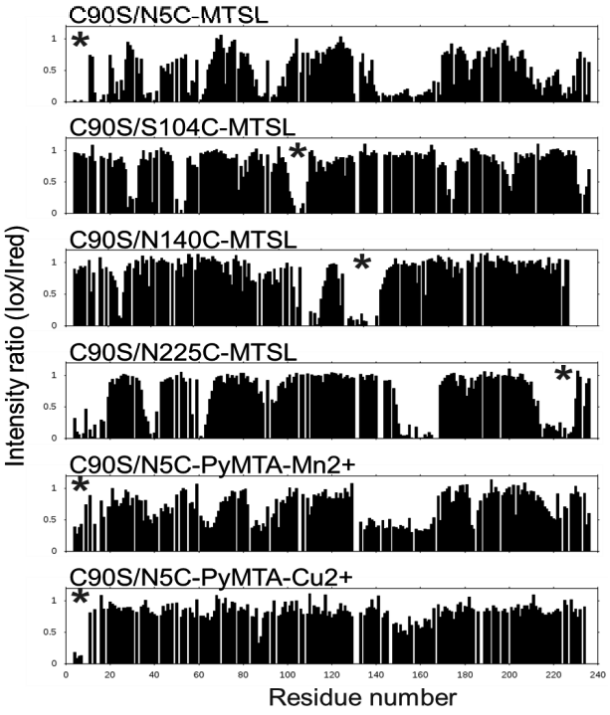


Fig. 2. Residue resolved NMR signal intensity ratios derived from PRE measurements of YUH1. Asterisks indicate the positions of paramagnetic centers.

【結果と考察】

3つのモデル蛋白質を用いて試した全ての変異体とDOTA-M8-SPyおよびMTSLの結合に成功し, これらのタグは蛋白質との反応性が高いことが分かった. MTSLは最も反応性が高く, 簡易的にPREを測定できるが, 他のタグと比べて運動性が高いために距離情報の正確さの点では劣った. 一方, DOTA-M8-SPyはメチル基を多く有し, 疎水性相互作用によって結合を補強するために常磁性効果が大きい. また, 同一骨格を有するDOTA-M8-CAM-Iよりもリンカーが短く, 大きなPCSが観測されている[1]. DOTA-M8-CAM-Iは約1週間の反応時間を必要とするが, 還元環境下においてもPCSを観測することに成功し[2], in-cell NMRにより直接構造情報を取得する際に有用である. Maleimide-DOTAはGrb2(C32S/S137C/C198A)と結合したが, その後に常温で1.5等量の常磁性金属を加えても配位しなかった. 4PhSO$_2$-PyMTAは試した5種類の変異体のうち2種類とのみ結合したが, これは4PhSO$_2$-PyMTAのリンカーが短く, 蛋白質との反応性が低いためと考えられる. しかし, 短いリンカーはPREやPCSにおいて正確な構造情報を取得できる点で有利であり, さらに4PhSO2-PyMTAは安価であるために利用しやすい.

【参考文献】

[1] Häussinger, D. et al., *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 14761-14767 (2009); [2] Hikone, Y. et al., *J. Biomol. NMR. Soc.* 66, 99-110 (2016); [3] Ahlgren, S. et al., *Bioconjugate. Chem.* **19**, 235-243 (2008); [4] Yang, Y. et al., *Chem. Commun.* **51**, 2824-2827 (2015).

P17

花成ホルモン蛋白質のNMR解析および^{19}F-NMRスクリーニング

○安澤すあい[1]，新家粧子[2]，古板恭子[2]，小篭蒼[1]，田岡健一郎[3]，辻寛之[3]，
藤原敏道[2]，児嶋長次郎[1, 2]
1横浜国立大学　理工学府
2大阪大学　蛋白質研究所
3横浜市立大学　木原生物学研究所

NMR analysis and ^{19}F-NMR screening of flowering hormones

○Suai Anzawa[1], Shoko Shinya[2], Kyoko Furuita[2], Aoi Kokago[1], Kenichiro Taoka[3], Hiroyuki Tsuji[3], Toshimichi Fujiwara[2], Chojiro Kojima[1, 2]
1Graduate School of Engineering Science, Yokohama National University
2Institute for Protein research, Osaka University
3Kihara Institute for Biological Research, Yokohama City University

Plants synthesize the flowering hormones called florigen at leaves when they recognize appropriate daylength. Florigen moves to the shoot apex through the phloem. Florigen forms Florigen Activation Complex (FAC) with florigen receptors and transcription factors to activate the transcription of floral meristem identity genes and induce flowering. We aimed at the analysis of function and three-dimensional structure of florigen and the functional control by drugs. We have successfully overexpressed and purified rice florigen Hd3a and Hd3a-like proteins that are thought to form more stable FAC. One of the Hd3a-like proteins was found to bind with the florigen receptor stronger than Hd3a. We also got hit compounds that bind with Hd3a from the ^{19}F compounds library and identified the binding site of Hd3a with the compounds.

【序論】

植物は適切な日長を感知すると、フロリゲンと呼ばれる花成ホルモン蛋白質を葉で合成する。合成されたフロリゲンは師管を通って茎頂まで移動する。フロリゲンは茎頂でフロリゲン受容体や転写因子とフロリゲン活性化複合体(FAC)を形成する。そして、FACが花芽形成遺伝子の転写を促進することで花成が誘導される。このため、これらの蛋白質の機能を制御する薬剤の創製によって花成のコントロールが可能になると考えられる。そこで本研究では、花成の分子メカニズムの解明および人工的な制御を目的とし、機能解析に重要なHd3a-GF14c-OsFD1-DNAの４者複合体の立体構造解析を可能にするイネのフロリゲンHd3aの類似蛋白質と変異体のNMR解析と生化学解析、^{19}F-NMRスクリーニングによるHd3aに特異的に結合する化合物を探索と化合物結合部位の同定を行った。

【実験】

Hd3aはフロリゲン受容体GF14c、転写因子OsFD1とFACを形成する。Hd3aとGF14cの結合は弱く、機能解析に重要なHd3a-GF14c-OsFD1-DNAの４者複合体の立体構造は決定されていない。そのため、

フロリゲン、^{19}Fスクリーニング

○あんざわ　すあい、しんや　しょうこ、ふるいた　きょうこ、こかご　あおい、たおか　けんいちろう、つじ　ひろゆき、ふじわら　としみち、こじま　ちょうじろう

より安定なHd3a-GF14c複合体を形成するHd3a様蛋白質を酵母ツーハイブリッド法で探索し、大腸菌にて大量発現させた。試料調製に成功したHd3a様蛋白質については、プルダウンアッセイによってGF14cとの結合を調べた。

また、Hd3aに結合する化合物の探索においては、220化合物からなるフッ素含有化合物ライブラリーを使用した^{19}F-NMRスクリーニングを実施した。Hd3a上の化合物結合部を調べるための実験においては、Hd3aを^{15}Nで標識し、スクリーニングでヒットした化合物とHd3aを混合させて^{1}H-^{15}N HSQC測定を行い、ケミカルシフトに変化が生じた部位を特定した。

【結果・考察】

酵母ツーハイブリッド法によるHd3a様蛋白質の探索結果より、２つのHd3a様蛋白質がGF14cとより安定な複合体を形成すると考えられた。そこでこれら２つの蛋白質を大腸菌発現系にて大量調製した。Hd3aサンプルでは良質な^{1}H-^{15}N HSQCスペクトルが得られる(Fig. 1)。新たに調製したサンプルの内1つはNMR測定およびプルダウンアッセイに必要な収量の試料調製に成功し、良質な^{1}H-^{15}N HSQCスペクトルが得られた(Fig. 2)。この蛋白質についてプルダウンアッセイを行った結果、この蛋白質のGF14cとの結合強度はHd3aと同等であることが示唆された。また、もう1つの蛋白質は安定性に問題があり、上記の解析が困難であると考えた。そこで、Hd3aの立体構造情報に基づき、より安定なFACを形成できるような点変異をHd3aに入れた。この変異体蛋白質は上記解析に必要な収量の試料調製に成功したため、プルダウンアッセイを行った。その結果、GF14cとの結合強度がHd3aよりも強いということが示唆された。

また、Hd3aに結合する化合物の探索では、フッ素含有化合物ライブラリーを用いて^{19}F-NMR測定を行ったところ、複数の化合物はHd3aの有無によってスペクトルの差が大きく表れた。このスペクトルの差は化合物がHd3aと結合したことに起因すると考えられるため、これらをヒット化合物とした。ヒット化合物と^{15}N標識したHd3aを混合させてHSQC測定を行ったところ、複数の化合物において、Hd3aのいくつかのアミノ酸のケミカルシフトに変化が生じた(Fig. 3)。この結果、各化合物がHd3aのケミカルシフトの変化が生じた部位で結合していると示唆された。

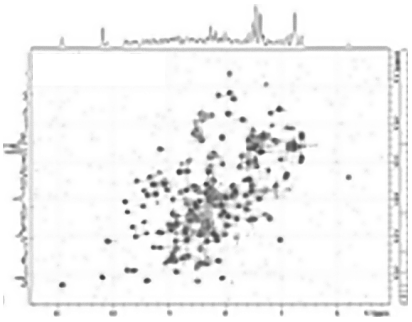


Fig. 1. ^{1}H-^{15}N HSQC spectrum of Hd3a

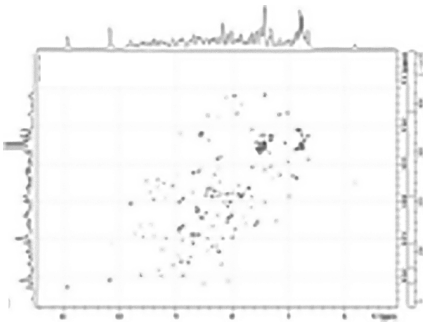


Fig. 2. ^{1}H-^{15}N HSQC spectrum of Hd3a-like protein

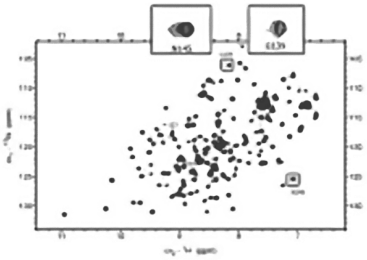


Fig. 3. Chemical change of Hd3a in ^{1}H-^{15}N HSQC

【参考文献】

K Taoka *et al.*,14-3-3 proteins act as intracellular receptors for rice Hd3a florigen, *Nature* 476, 332-335 (2011).

P18

常磁性緩和干渉法(PRI)を用いたTauタンパク質の過渡的構造解析

○川嵜 亮祐[1]，楯 真一[1,2,3]

[1]広島大学大学院 理学研究科 数理分子生命理学専攻

[2]広島大学大学院 統合生命科学研究科

[3]広島大学 クロマチン動態数理研究拠点(RcMcD)

Transient structure analysis of Tau protein by Paramagnetic Relaxation Interference (PRI)

○Ryosuke Kawasaki [1], and Shin-ichi Tate[1,2,3]

[1]*Department of Mathematical and Life Sciences, Graduate School of Science, Hiroshima University*

[2]*Graduate School of Integrated Sciences for Life, Hiroshima University*

[3]*Reseach Center for the Mathematics on Chromatin Live Dynamics (RcMcD), Hiroshima University*

Paramagnetic relaxation interference (PRI) has applied to reveal the conformational dynamics of Tau protein to make explore its transiently formed conformations. On the protein having two paramagnetic spins labeled, the effect of the paramagnetic enhancing transverse nuclear spin relaxations from one paramagnetism changes by the other paramagnetic spin, which is the PRI. The magnitude of the interference depends on the angles formed by the vectors connecting the observed nuclear spin to the paramagnetic spins, respectively. PRI is quite useful to gain insights into the spatial conformational ensembles of the intrinsically disordered proteins like Tau. Here, we will demonstrate how the Tau proteins having pathological modifications, including familial mutations and phosphorylations, change their conformational dynamics by PRI.

天然変性タンパク質(IDP)は，広い構造空間中で大きな振幅をもつ構造変化を繰り返す．動的な構造変化の過程で過渡的に形成する「低存在率構造」の形成が，IDPの機能発現に密接に関わると考えられているが，過渡的構造の精密解析は容易ではなく十分な知見が蓄積されていない．

Tauタンパク質は，神経細胞内で繊維形成するアルツハイマー病原因タンパク質として長く研究されているIDPである．多重リン酸化や家族性変異であるFTDP-17変異により，Tauは繊維化が促進されると言われている．アルツハイマー病患者の脳中に存在するTau凝集体では*cis*-プロリン含量が増加していることが報告されおり[1]，多重リン酸化が誘導する*cis*-プロリンが凝集体形成を促進させる機構が提案された．また，Pro-異性化酵素Pin1の神経細胞内での発現量が高いとアルツハイマー病の進行が抑制されることから，Tau中の*cis*-プロリン含量の増加がTau繊維化を促すと考えられてきた[2]．しかし，多重リン酸化はTauの*cis*-プロリン含量を変化させず，Pin1もリン酸化Tauに結合するが異性化は誘導しないことがNMRにより示され繊維化機構を見直す必要がある[3,4]．これに対して，Tauの構造アンサンブル変化が繊維化機構に関わることが質量分析から示され，より詳細なTauの動的構造変化の解析の必要性が高まってきている．

天然変性タンパク質、常磁性緩和干渉，過渡的構造形成

○かわさき りょうすけ，たて しんいち

そこで本研究では，Tauの動的構造の精密解析を目指して常磁性緩和干渉法(PRI)を用いたNMR構造解析を始めた[5]．繊維形成能を持つ約100残基からなるTauフラグメント上の２か所に常磁性スピンラベルを導入した（図1）．常磁性スピンによる距離に依存した緩和誘導に加えて，2つのラベル導入箇所との相対角度に依存した相互相関緩和(cross-correlated relaxation)が起きる（図2）．PRIにより，リン酸化あるいはアミノ酸変異により誘導されるTauの構造アンサンブル変化を計測することができる．さらに解析精度をあげるために，X線小角散乱(SAXS)，残余双極子効果(RDC)をも併用した．

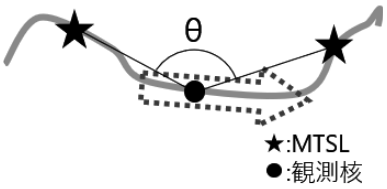


図 1：測定サンプルのモデル図

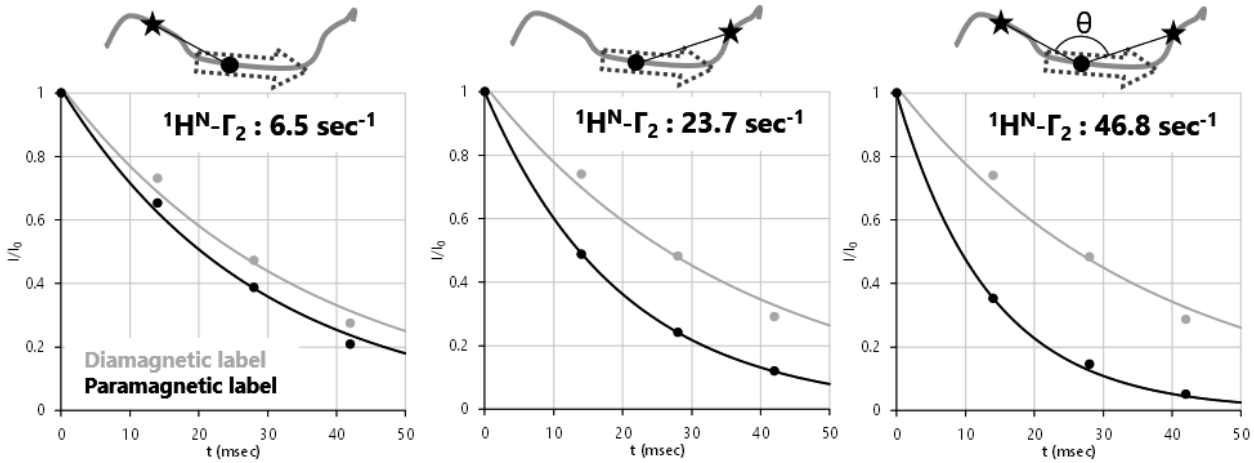


図 2：常磁性緩和干渉(PRI)の測定の一例．左・中央の図は異なる位置に 1 つの MTSL ラベルを導入した結果で，距離に依存した常磁性スピンによる緩和誘導が観測されている．右の図は同位置に MTSL ラベルを同時に 2 つ導入した結果で，常磁性スピンによる緩和誘導に加え，過渡的に形成される低存在率構造による図のθに依存した相互相関緩和誘導が観測されている．

測定の結果，野生型と比べて繊維形成が促進されるFTDP-17変異体において，変異箇所からは離れた部位での過渡的構造形成に変化が見られた．これはX線小角散乱(SAXS)の結果とも相関が取れており，IDPにおけるアロステリック効果による構造変化が示唆される．

References

[1] Nakamura, K., Greenwood, A., Binder, L., Bigio, Eileen H., Denial, S., Nicholson, L., Zhou, Xiao Z., and Lu, Kun P. (2012) Proline Isomer-Specific Antibodies Reveal the Early Pathogenic Tau Conformation in Alzheimer's Disease, *Cell 149*, 232-244.

[2] Lu, P. J. (2001) Critical Role of WW Domain Phosphorylation in Regulating Phosphoserine Binding Activity and Pin1 Function, *Journal of Biological Chemistry 277*, 2381-2384.

[3] Ahuja, P., Cantrelle, F.-X., Huvent, I., Hanoulle, X., Lopez, J., Smet, C., Wieruszeski, J.-M., Landrieu, I., and Lippens, G. (2016) Proline Conformation in a Functional Tau Fragment, *Journal of Molecular Biology 428*, 79-91.

[4] Ikura, T., Tochio, N., Kawasaki, R., Matsuzaki, M., Narita, A., Kikumoto, M., Utsunomiya-Tate, N., Tate, S.-i., and Ito, N. (2018) The trans isomer of Tau peptide is prone to aggregate, and the WW domain of Pin1 drastically decreases its aggregation, *FEBS Letters 592*, 3082-3091.

[5] Kurzbach, D., Vanas, A., Flamm, A. G., Tarnoczi, N., Kontaxis, G., Maltar-Strmecki, N., Widder, K., Hinderberger, D., and Konrat, R. (2016) Detection of correlated conformational fluctuations in intrinsically disordered proteins through paramagnetic relaxation interference, *Physical chemistry chemical physics : PCCP 18*, 5753-5758.

P19

抗体のNMR解析のための安定同位体標識法の開発と応用

○谷中冴子[1,2]，與語理那[1,2]，山崎俊夫[3]，宮ノ入洋平[4]，矢木宏和[2]，
加藤晃一[1,2]
1自然科学研究機構　生命創成探究センター/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　放射光科学研究センター
4 大阪大学　蛋白質研究所

Development and application of stable-isotope labeling techniques for NMR studies of antibodies

○Saeko Yanaka[1,2], Rina Yogo[1,2], Toshio Yamazaki[3], Yohei Miyanoiri[4], 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 RIKEN SPring-8 Center
4 Institute for Protein Research, Osaka University

A variety of engineered immunoglobulin G (IgG) molecules are currently developed for therapeutic and diagnostic applications. NMR is now featured as a promising tool for the quality and higher order structure assessment of therapeutic IgG (1). We have developed a methodology for preparation of stable-isotope labelling of antibody glycoproteins using eukaryotic expression systems and thereby achieved backbone assignments of the NMR signals of Fc regions of mouse and human IgG antibodies (2, 3). Using these signals as spectroscopic probes, we elucidated the structural dynamics of human IgG Fc, which is affected by its glycan structures (4). We have also applied transverse relaxation optimization by tailored deuteration of selected amino acid residues and successfully performed NMR characterization of the full-length IgG with the molecular mass of 150 kDa. This enabled us to conduct *in-serum* NMR for probing molecular interaction networks in the blood system. Here we show the fruits of our technical development and applications of stable-isotope labeling techniques for NMR studies of antibodies.

抗体医薬品として用いられている免疫グロブリン G（IgG）は高い特異性と親和性から分子標的薬として幅広い疾患の治療に使用されているが、バイオ医薬品としての効能を高めることを目指してさらなる高機能抗体の創出が望まれている。IgG を高機能化するためには分子の 3 次元構造ダイナミクスを考慮して機能を最適化する必要がある。そのため、我々は NMR を用いて IgG の溶液中での動的立体構造の解明に取り組んでいる。一方、抗体医薬品の品質管理を目的とした高次構造評価において NMR の活用が有望視されており、抗体の NMR 解析を簡便かつ効率的に行うための技術基盤の構築が望まれている(1)。

IgG は、糖鎖修飾を受けた高分子量タンパク質として機能しているため、安定同位体標識試料を調製するためには真核細胞発現系の利用が不可欠である。これまで我々は動物細胞発現系を用いて IgG に安定同位体標識を施す技術を開発してきた(2)。これを用いて、糖タンパク質である IgG の Fc 領域（分子質量 52kDa）について多次元 NMR スペクトルの観測および解析を達成している(3)。

動物細胞発現系, 安定同位体標識, 抗体
○やなかさえこ, よごりな, やまざきとしお, みやのいりようへい, やぎひろかず, かとうこういち

こうして得られたシグナルをプローブとして、Fc 領域の溶液中での動的立体構造の解明に取り組んできた。その結果、結合糖鎖の構造に応じて Fc 領域の局所構造ダイナミクスを変化させ、Fcγ 受容体との相互作用が制御されていることが明らかとなった。これにより、Fcγ 受容体を介した抗体の細胞傷害活性発動のメカニズムの一端を明らかにすることができた(4)。

動物細胞発現系では均一重水素標識を実施することは困難であるが、部位選択的に重水素標識を施すことで高分子量（150kDa）の糖タンパク質である IgG について、良好な NMR スペクトルを観測することができた(5)。これを活用し、抗体が実際に機能する血中の混み合い環境での血中因子との相互作用を明らかにした。我々はさらに簡便な真核細胞を用いた発現系の構築を目指し、カイコの蛹を用いた安定同位体標識を行い、高収量で安定同位体標識した IgG を得ることに成功した。

本発表ではこれらの真核生物発現系を用いたIgGの効率的な安定同位体標識法の検討の成果と、その応用例を紹介する。

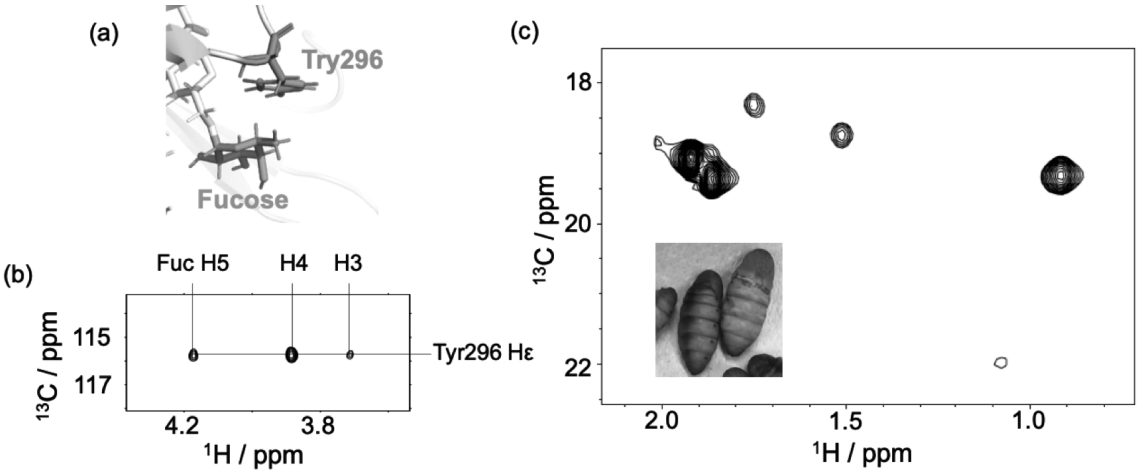


Fig. 1 (a) A typical conformational snapshot of the functionally important tyrosine residue (Tyr296) in the major conformational states of IgG-Fc derived from our molecular dynamics simulation. (b) 2D HSQC-NOESY spectrum of IgG1-Fc labeled with [CO, α, β, γ, ε1, ε2-$^{13}C_6$; β2, δ1, δ2-$^{2}H_3$; ^{15}N] tyrosine. (c) ^{1}H-^{13}C methyl-TROSY spectrum of IgG1 labeled with [methyl-^{13}C] methionine derived from silkworm cocoon (inset).

謝辞
本研究成果の一部は大陽日酸株式会社との共同研究によるものです。

References

(1) Brinson RG *et al.* Enabling adoption of 2D-NMR for the higher order structure assessment of monoclonal antibody therapeutics, mAbs **11**, 94-105 (2019)
(2) Kato K, Yanaka S, Yagi H. Technical basis for nuclear magnetic resonance approach for glycoproteins In: Experimental approaches of NMR spectroscopy-Methodology and application to life science and materials science- *Springer (Singapore)*, 415-438 (2018)
(3) Yanaka S, Yamazaki T, Yogo R, Yagi H, Kato K. An NMR approach for characterizing antibody interactions in serum environment. *Molecules* **22**:1619 (2017)
(4) Yanaka, S., Yogo, R., Inoue, R., Sugiyama, M., Itoh, S.G., Okumura, H., Miyanoiri, Y., Yagi, H., Satoh, T., Yamaguchi, T. and Kato, K. Dynamic views of the Fc region of immunoglobulin G provided by experimental and computational observations, Antibodies 8, 39 (2019)
(5) Yanaka S, Yagi H, Yogo R, Yagi-Utsumi M, Kato K. Stable isotope labeling approaches for NMR characterization of glycoproteins using eukaryotic expression systems. *J Biomol NMR* 1-10 (2018)

P20

光構造スイッチ型抗菌ペプチドGF-17の活性と構造

○長島 敏雄[1]，山崎 俊夫[1]，石井 佳誉[1]
1 理化学研究所　放射光科学研究センター

Analysis on Activated Structure of Photoswitchable Antimicrobial Peptide, GF-17

○Toshio Nagashima [1], Toshio Yamazaki [1], Yoshitaka Ishii [1]
1 RIKEN Spring-8 Center

GF-17 peptide is a fragment of an antimicrobial peptide (AMP), LL-37 in human, and forms a helical structure on a bacterial membrane. However, the activation mechanism of GF-17 including LL-37 is not clear yet, even though a great number of research are reported. To elucidate the structural aspect in activated complex of AMP and the bacterial membrane, we perform the structural analysis by NMR spectroscopy. GF-17 peptide covalently bound with an azobenzene derivative, is controlled its helical structure by light-illuminations. NMR observed the structural change between helix and denatured structure, using a photoswithable GF-17 peptide with a bacterial membrane-mimic bicelle. Furthermore, MIC assay evaluated the activity of helix and denatured structure of GF-17 peptide against *E. coli*. These results lead to obtain a novel knowledge of the activation mechanism of the antimicrobial peptide.

抗菌物質の環境への蓄積により生じる耐性菌は世界的な健康に対する脅威の一つになっている。従来の抗菌剤は細菌の酵素活性を阻害するのに対して、抗菌ペプチド(antimicirobail peptide, AMP)は、細菌の細胞膜構造や物性を変化させることで、活性を発揮することが知られている。このような活性化メカニズムから、抗菌ペプチドに対する耐性菌は生じにくいと考えられており、抗菌剤として有力な候補になっている。しかしながら、2010年代に入ってから発見されたプラスミド媒介性の*mcr-1*遺伝子は、抗菌ペプチドの一種コリスチンに対する耐性を持つことがわかった。細胞膜の電荷バランスを変えてペプチドの結合状態を変化させていると考えられている。

GF-17ペプチドは、ヒト由来Cathelicidinタンパク質のフラグメント抗菌ペプチドLL-37の活性部分である[1]。表面電荷や立体構造の違いから複数のタイプの抗菌ペプチドがあるが、GF-17は正電荷に富み、細菌の膜上でヘリックス構造を形成することがわかっている。しかし、多くの研究成果が報告されているにも関わらず、活性化した構造についてよくわかってない。従来の平衡状態のNMR測定では、得られる構造情報に限界があるため、アゾベンゼン誘導体をGF-17ペプチドに共有結合させ、*cis-trans*光異性化反応によりペプチドの二次構造を動的に操作することで[2]、細菌の細胞膜上での構造変化を追跡することを目的にする(Figure 1)。

抗菌ペプチド、光構造操作、光活性制御

○ながしまとしお、やまざきとしお、いしいよしたか

細菌の細胞膜を模した組成の等方性バイセルにアゾベンゼン結合GF-17ペプチドを混合し、溶液状態でNMR測定を行った。ペプチド、リン脂質ともに非標識試料を用いたので、リン脂質由来のNMR信号を抑制し、ペプチドのアミド領域の信号のみで解析を行った。解析の結果、*cis*ではhelix特有のNOE信号が観測され、*trans*で消失していることが確認できた。これにより*cis*でhelix構造、*trans*でランダムコイル構造であることがわかった。常磁性緩和促進法でからも、*cis*構造ではヘリックス状の構造を有してリン脂質二重膜に結合していることがわかった(Figure 2A)。

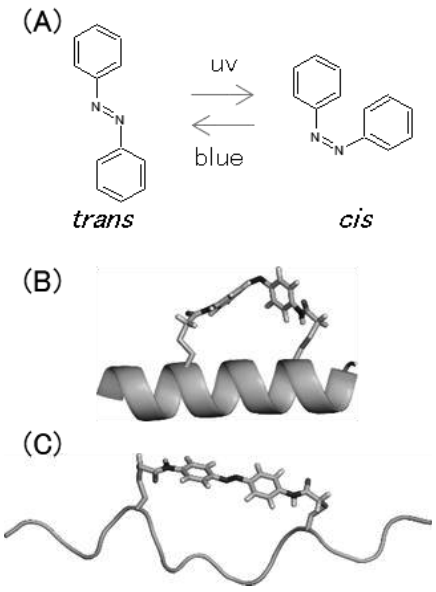


Figure 1. (A) *cis-trans* photoisomerization of azobenzene. (B) GF-17 peptide crosslinked with *cis*-azobenzene through two cysteine residues. (C) Same peptide as (B), but crosslinked with *trans*-azobenzene. Improper distance between two cysteine residues leads to unfolded conformation of GF-17 peptide.

これに対し、最小阻止濃度法によりアゾベンゼン結合GF-17ペプチドの大腸菌に対する活性を調べた。事前にUV照射または暗状態で、*cis*と*trans*体をエンリッチさせたペプチド溶液を大腸菌培地に混合した。結果、ヘリックス構造である*cis*体のほうが、*trans*体よりも少ない濃度で大腸菌が抑制できるということがわかった(Figure 2B)。しかし、その濃度は2倍程度の差であり、NMRで観測された構造の変化から期待できるほどの活性の差が見られなかった。

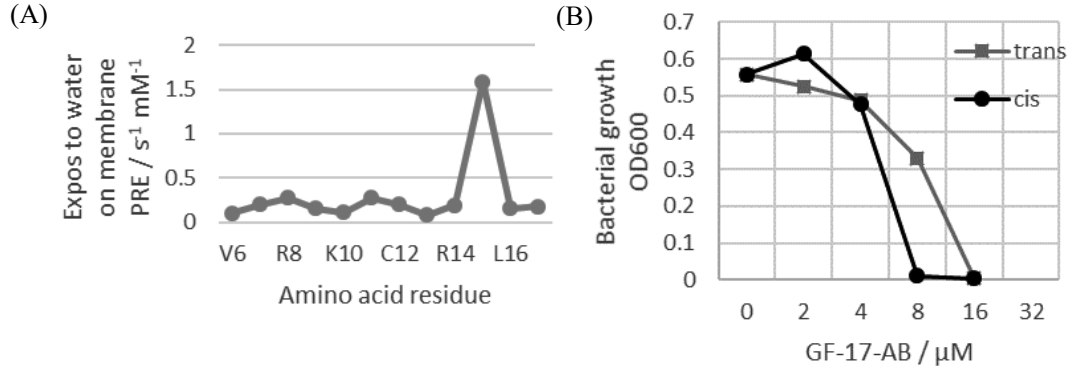


Figure 2. (A) Paramagnetic relaxation enhancement of GF-17-AB peptide on a bicelle. (B) MIC assay of GF-17-AB peptide.

Reference

1. Wang G, et al. (2012) *Antimicrob Agents Chemother* 56(2):845–856.
2. Nagashima T, Ueda K, Nishimura C, Yamazaki T (2015) *Anal Chem* 87(22):11544–11552.

P21 α－シヌクレイン変異体の残存構造のNMR解析

○西村千秋[1]
1帝京平成大学薬学部

Residual structure monitored by NMR in the α-synuclein mutants

○Chiaki Nishimura [1]
1Faculty of Pharmaceutical Sciences, Teikyo Heisei University

Parkinson's disease is thought to be due to either fibrillation or oligomerization of α-synuclein. It attacks the nerves system in brain. Furthermore, it is one of well-known intrinsically disordered proteins, which adopts no globular structure under physiological condition. The residual structures in α-synuclein can give a hint about the fibril structure at the solid state. In order to examine the residual structure, the method of amide-proton exchange was employed for the calculation of k_{ex} rates for each residue by NMR. In this paper, the additional three strategies were tested to seek for the more reliable data. One of them was the calculation of the ratio of k_{ex} values at different temperatures. Another approach was the usage for the peak intensities. Finally, the ratio of the peak intensities was also used. All calculation supports the data about more flexible structure in the C-domain in A30P than those in WT. Some folded structure was observed at mutated 30-70 area (N and NAC regions) derived from the calculation of the ratio of intensities.

αシヌクレインはパーキンソン病の原因蛋白質であり、条件によってはアミロイドを形成する。また生理的条件下でも溶液中で特定の構造をとらない天然変性蛋白質の特徴を持つ。この蛋白質をパーキンソン病の標的蛋白質と考えるときに、天然変性の中に残る残存構造の存在が、アミロイド形成時の構造形成部位に関わってくる可能性がある。野生株のほかに家族性パーキンソン病の変異体A53Tは、野生株よりもアミロイド形成が速く、一方A30PはA53Tと同時に変異が起こると、相乗効果でアミロイド形成がさらに速くなることが示されている。天然変性蛋白質の変性状態の構造解析には、NMRは天然状態の蛋白質に対してほど有益ではないが、少しずつその使用の有用性がわかってきた。

CLEANEX-PMを用いたアミドプロトン交換の測定は、かすかな構造しかないαシヌクレインの場合でも有用である。水との交換時間を5，10，15，20，25，50，100msにしたときのピークの強度変化を求めた(文献1)。例えば100ミリ秒交換させたときには、はっきりと交換を示す残基が示された。次にカーブフィッティングからk_{ex}を計算したところ、WT、A30P、A53Tなどどのαシヌクレインも、Ｃドメインで少し構造ができているように見えたが、配列上多くのネガティブチャージの残基がここのドメイン（酸性ドメイン）にはあるので、そのマイナス化が交換の遅く見える原因であると結論した。次にk_{ex}をもとめてから野生株と変異株を比較してみると、A30Pの方がＣドメインで構造が少ないように思われた（図１）。野生株と変異体を比較しても大きな差は見られなかった。

アミドプロトン交換、シグナル強度、天然変性蛋白質

○にしむら　ちあき

そこで縦軸をk_{ex}ではなく、2つの温度で測定したk_{ex}の比としてもとめた。k_{ex}のときと同じく、Cドメインでの揺らぎ構造の増加がA30Pだけに見られ、一方30-70番目のNとNACドメイン中の変異した場所を含む領域では、逆に安定化が両方の変異体で見られた。

また、シグナル強度をY軸方向にして解析した。先ほどと同じように、Cドメインでの揺らぎ構造がA30Pにだけに見られた。

さらに、25℃と15℃でのシグナル強度の比をもとめた。両変異体ともに野生株と比較してCドメインが揺らぎのある構造を示した。30-70番目の領域に関してはA53Tではほとんど野生株と変わらなかったが、A30Pにおいては構造ができている部分と、さらに揺らぎを持つ部分も見られた。

このように、1) k_{ex}だけを用いて残存構造の量を比較していた場合にくらべて、比やあるいはシグナル強度を用いると、天然変性蛋白質の揺らぎ構造を詳細に解析できると結論した。2) さらに部位特異変異によるCドメインの揺らぎ、のみならず、Nドメインの構造化も本方法で観測できた。3) 変異した場所はアミノ酸配列上離れていたが、Cドメインの揺らぎ構造が増加していた。

HX	A53T		A30P	
	N-domain (+NAC)	C-domain	N-domain (+NAC)	C-domain
HX(5ms)		Flexible		Flexible
kex		No change		Flexible
kex(25C)/kex(15C)	Structured	No change	Structured	Flexible
Signal Intensity				
Signal Intensity		No change		Flexible
I(25C)/I(15C)	No change	Flexible	Flexible and Structured	Flexible

図1：アミドプロトン交換とシグナル強度を指標にした残存構造の解析：野生株との比較：A30Pの方がC-ドメインに関しては大きな揺らぎ構造を持つ。上段：CLEANEX-PMによって25℃と15℃のk_{ex}の比を計算したもの。下段：25℃と15℃でのシグナル強度比から考えられた揺らぎ構造。

文献

1. Okazaki, H., Ohori, Y., Komoto, M., Lee, Y.-H., Goto, Y., Tochio, N., and Nishimura, C. (2013) Remaining structures at the N- and C-terminal regions of alpha-synuclein accurately elucidated by amide-proton exchange NMR with fitting. FEBS Lett. 587, 3709-3714.

謝辞

本研究のNMR測定は、NMR共有プラットフォーム（理化学研究所横浜）を利用しました。
長期間に渡り、大変にお世話になりました荒田洋治先生のご冥福を心からお祈り申し上げます。

P22

ヒストンシャペロンNAP1の酸性領域とヒストンH2A-H2Bとの結合様式

○大友秀明[1]，栗田順一[1]，森脇義仁[1]，津中康央[1]，西村善文[1]
1横浜市立大学生命医科学研究科

The binding mode of the acidic domain of histone chaperone NAP1 with histone H2A-H2B

○Hideaki Ohtomo[1], Jun-ichi Kurita[1], Yoshihito Moriwaki[1], Yasuo Tsunaka[1], Yoshifumi Nishimura[1]
1Graduate School of Medical Life Science, Yokohama City University

Nucleosome assembly protein 1 (NAP1) is a histone chaperone protein, which supports the nucleosome assembly and disassembly. NAP1 contains a core domain and a C-terminal acidic domain (CTAD). We have shown that CTAD of human NAP1 (hNAP1) significantly contribute to the histone chaperone activity interacting with H2A-H2B. NMR analyses of labeled CTAD with non-labeled H2A-H2B revealed two binding sites in CTAD, CTAD-N and CTAD-C, both of which contained many acidic residues with a few hydrophobic residues. Corresponding to this, two binding sites in H2A-H2B have been revealed as hydrophobic patch (HP) for the interaction with CTAD-C and basic patch (BP) for the interaction with CTAD-N. Base on theses interactions we could model the complex structure of H2A-H2B with CTAD by using HADDOC.

クロマチンの最小構造単位であるヌクレオソームはヒストンH3-H4テトラマーと2分子のヒストンH2A-H2Bダイマーからなるヒストン8量体に約146bpのDNAが巻き付くことによって構築される。Nucleosome assembly protein 1(NAP1)はヒストンシャペロンと呼ばれるタンパク質の一つであり、ヌクレオソーム形成を促進する活性と、ヌクレオソームから1分子のH2A-H2Bを取り除く活性があることが知られている。NAP1はコアドメインとN末端、C末端の長い天然変性領域からなる。C末端の天然変性領域は酸性アミノ酸を多く含むためC-terminal acidic domain(CTAD)と呼ぶことにする。ヒトNAP1(hNAP1)において、コアドメインとCTADはそれぞれが単独でH2A-H2Bと相互作用し、CTADはNAP1コアドメインとH2A-H2Bの相互作用をサポートすることと、ヌクレオソーム形成を促進するために必須であることが明らかになっている[1]。本研究では、CTADとH2A-H2Bの相互作用を詳しく調べるために、NMRを用いたCTADペプチドとH2A-H2Bの相互作用解析を行った。ラベルしたCTADペプチドにH2A-H2Bを滴定したとき、CTADのY354を含むD353-E359とY377を含むN373-K381の二つの領域に大きい化学シフト変化またはシグナルの消失が起きた(Fig.1A)。さらに、CTADの二つの結合領域を一つずつに分けたCTAD-NとCTAD-Cはそれぞれ単独でH2A-H2Bと相互作用した(Fig.1A)。H2A-H2Bに結合する配列はいずれも連続した酸性アミノ酸と少数の疎水性アミノ酸を含んでいた。一方、H2A-H2Bをラベルした場合、CTADの滴定によりFig.1Bに示したように二つの領域の

NAP1、H2A-H2B、ヒストンシャペロン

○おおともひであき，もりわきよしひと，くりたじゅんいち，にしむらよしふみ

化学シフトが変化した。一つは塩基性アミノ酸を多く含み(Basic patch, BP)、もう一つは疎水性アミノ酸も含まれていた(Hydrophobic patch, HP)。CTAD-N、CTAD-Cの滴定実験からは、CTAD-CはHPに特異的に結合し、CTAD-NはHPとBPの両方に結合することが明らかになった。これらの化学シフト変化の情報に基づいてHADDOCを用いたドッキング構造をモデルすることを試みた。CTAD-CはHPと特異的に結合するため、CTAD-C結合型のH2A-H2B複合体構造はモデルできたが(Fig.2)、一方、CTAD-NはHPとBPの両方と相互作用するため、構造をモデルすることができなかった。そこで全長のCTAD(344-391)ではHPに特異的なCTAD-Cが結合し、CTAD-NはBPに結合すると仮定して、HPを変異で潰した$H2A_{R77E}$-H2Bを使ってCTAD-Nとの相互作用実験を行った。予想された通り、ラベルした$H2A_{R77E}$-H2BにCTAD-Nを滴定とき、$H2A_{R77E}$-H2BのBPを構成するアミノ酸残基の化学シフトが大きく変化し、HPを構成するアミノ酸残基には影響がなかった。次に$H2A_{R77E}$-H2BとCTAD-Nの化学シフト変化のデータを使うことで、HADDOCを用いてCTAD-NがH2A-H2BのBPに結合したドッキング構造をモデルすることができた(Fig.2)。

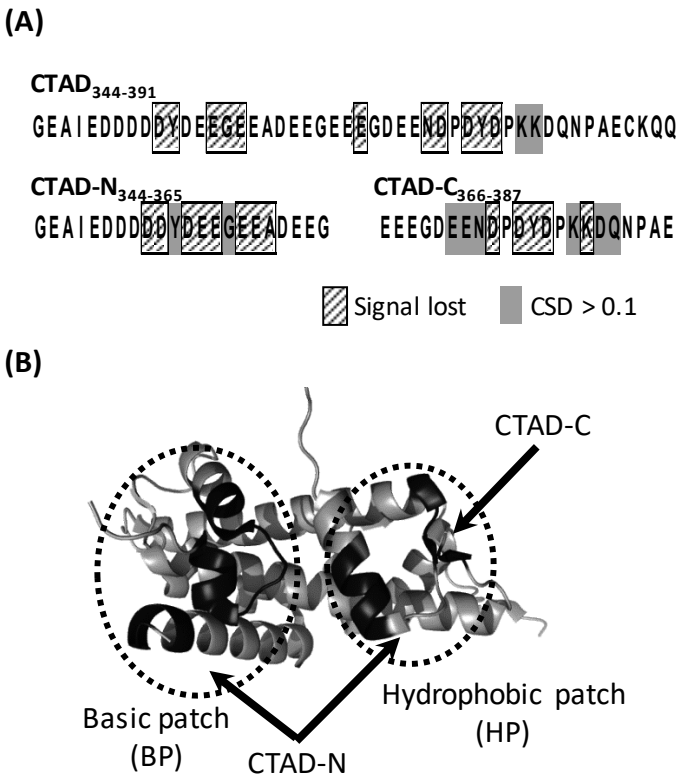


Fig.1 **(A)** The amino acid sequences of CTAD, CTAD-N, CTAD-C. Residues in which the signals disappeared by binding to H2A-H2B were shaded and the residues with CSD> 0.1 were highlighted in gray. **(B)** CTAD binding regions in H2A-H2B. Residues whose chemical shifts were significantly changed by binding to CTAD-N or CTAD-C were shown in black.

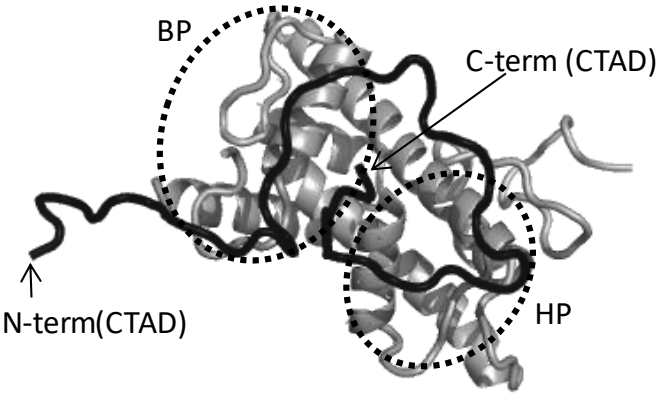


Fig.2 The binding model structure of H2A-H2B with CTAD. Based on CTAD-N/$H2A_{R77E}$-H2B interaction analysis, CTAD/BP of H2A-H2B interface was modeled.

参考文献

1. Ohtomo *et al. Genes Cells* (2016)

P23

常磁性NMRを用いたYeast Ubiquitin hydrolase 1 (YUH1) の構造決定及びダイナミクス解析

○立石 泰[1]，池谷 鉄兵[1]，岡田 真由[1]，三島 正規[1]，美川 務[1,2]，八木 宏昌[2]，河野 俊之[3]，木川 隆則[2]，伊藤 隆[1,2]
[1]首都大学東京・理学部化学科，大学院理学研究科化学専攻
[2]理化学研究所・生命機能科学研究センター
[3]北里大学・医学部

Structural and Dynamics Analysis of Yeast Ubiquitin Hydrolase 1 (YUH1) Using Paramagnetic NMR Spectroscopy

○Yutaka Tateishi[1], Teppei Ikeya[1], Mayu Okada[1], Masaki Mishima[1], Tsutomu Mikawa[1,2], Hiromasa Yagi[2], Toshiyuki Kohno[3], Takanori Kigawa[2], Yutaka Ito[1,2]
[1] *Department of Chemistry, Tokyo Metropolitan University*
[2] *RIKEN Center for Biosystems Dynamics Research*
[3] *Kitasato University School of Medicine*

Ubiquitination and deubiquitination of proteins are involved in numerous cellular processes such as proteolysis, signal transduction, DNA repair, and so on. Yeast Ubiquitin Hydrolase 1 (YUH1), which is composed of 236 residues (26.4kDa), is a deubiquitinating enzyme, capable of hydrolyzing ubiquitin adducts for homeostasis of free ubiquitin levels in the cell. However, the molecular mechanism of its specific substrate recognition and hydrolysis is not fully understood because the three-dimensional (3D) structure of monomeric YUH1 in solution has not been solved yet whilst the crystal structure of its complex with the tight-binding inhibitor ubiquitin aldehyde (Ubal) has been reported previously. Hence, we addressed the protein structure determination and dynamics analysis of monomeric YUH1 to elucidate the structural basis of this specificity with the ubiquitin and dynamical processes.

【序論】

タンパク質のユビキチン化や脱ユビキチン化はタンパク質分解やシグナル伝達、DNA 修復など多くの重要な細胞プロセスに関わっている．Yeast Ubiquitin Hydrolase 1 (YUH1) は 236 残基からなる脱ユビキチン化酵素であり，細胞内の遊離ユビキチン量を調節するためユビキチン付加物から加水分解によりユビキチンを切り離す役割を担っている．YUH1 と阻害剤であるユビキチンアルデヒド(Ubal)との複合体の結晶構造は既に報告されている一方で[1]，溶液中での YUH1 単体の立体構造はいまだに明らかになっておらず，YUH1 の特異的な基質認識や加水分解の分子メカニズムは十分に解明されていない．そこで本研究では，NMR による従来の NOE による立体構造解析に加えて，residual dipolar coupling (RDC)や，常磁性効果を利用した paramagnetic relaxation enhancement (PRE)，pseudo-contact shift (PCS)などの複数の長距離情報を取得し，それらを統合的に解析を行うことで，YUH1 の詳細な立体構造解析を行い，YUH1 のユビキチン認識メカニ

常磁性NMR，タンパク質の立体構造解析，脱ユビキチン化酵素
○たていし ゆたか，いけや てっぺい，おかだ まゆ，みしま まさき，みかわ つとむ，やぎ ひろまさ，こうの としゆき，きがわ たかのり，いとう ゆたか

ズムを解明することを目的とした.

【実験】

内在性のシステインをセリンに置き換え，新たにシステインを一カ所に導入した４種類の変異体（C90S/N5C, C90S/S104C, C90S/N140C, C90S/N225C）を調製し, MTSL, もしくは 4PhSO$_2$-PyMTA，および Maleimide-DOTA の常磁性金属結合タグを導入し（Fig.1a），PRE の測定を行った．また，PCS の測定には，DOTA-M8-SPy タグを用いた．PCS 値は，Dy^{3+}(常磁性)結合型と Lu^{3+}(反磁性)結合型のスペクトルにおける化学シフト差より算出した．RDC 値は，Pfl phage を用いて配向させた試料について IPAP-HSQC 測定を行って求めた.

上記により得られた距離・角度情報に加え，NOE 由来に近距離情報，および TALOS-N から得られた二面角拘束を利用し，CYANA プログラムを用いて立体構造計算を行った.

【結果と考察】

PREの測定結果の一部をFig.1b,cに示す. 常磁性タグを結合させたアミノ酸残基を中心に，その周辺でNMRスペクトルのピーク強度が段階的に減衰していることが確認された.

PCSの測定では，一部のアミノ酸残基について，異なるPCS値をとるピークが確認された(Fig. 2)．このことから，YUH1が当該領域において部分的に複数のコンフォメーションをとっていることが推定された.

先行研究により，活性中心を覆っているループ領域（146～164残基）は脱ユビキチン化を行う際に, ユビキチンに結合した基質のサイズを制限し，触媒活性を調節していると考えられている. また，T_1, T_2緩和解析によって，このループ領域を含む一部の領域の運動性が大きいことが分かっている. そのような領域では, 例えばPREによるスペクトル上のピーク強度の減衰は, 観測する核が存在する複数の状態からのPREの平均として得られていると考えられる. より詳細な解析を行うために, 測定結果を複数状態の観測の平均として取り扱って構造計算することを計画しており, 脱ユビキチン化の特異性及び効率に関わる構造的な役割を明らかにしていく.

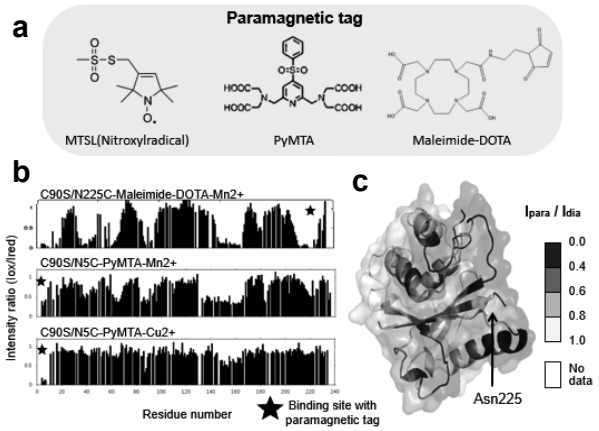


Fig.1 PRE measurements of YUH1. (**a**) Three paramagnetic tags used for the measurements. (**b**) The observed PREs for the backbone $^1H^N$ resonances represented as peak intensity ratio per residue. (**c**) The PREs caused by Maleimide-DOTA(Mn^{2+})-conjugation to YUH1 C90S/N225C, which are mapped on the YUH1 structure (PDBID: 1CMX).

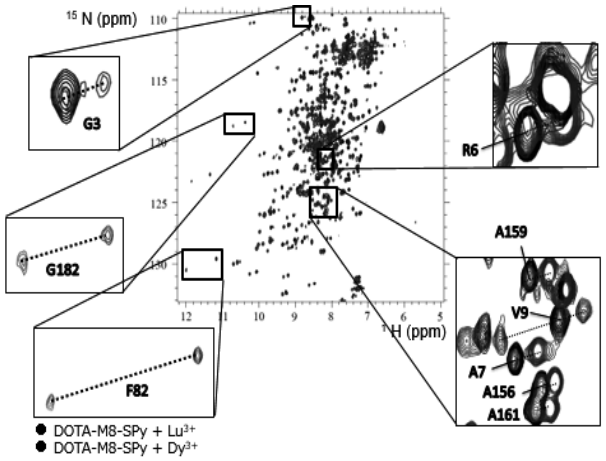


Fig.2 Overlay of ^1H-^{15}N HSQC spectra of YUH1(C90S/N140C) tagged with diamagnetic Lu^{3+}- (black) or paramagnetic Dy^{3+} (grey) -bound form of DOTA-M8-Spy. The spectra were acquired at 303 K.

【参考文献】

(1) Johnston, S. C. *et al.*, *EMBO J.* 1999, 18, 3877-87

P24

NMRによる種々の水素結合の検出

○高田夢人[1]，伊藤隆[1], 三島正規[1]
[1]首都大学東京・理学研究科

Detection of various hydrogen bonds by NMR

○Takada Yumeto[1], Yutaka Ito[1], Masaki Mishima[1]
[1]*Graduate School of Science and Engineering, Tokyo Metropolitan University*

We performed X-ray crystallographic analysis and heteronuclear NMR analysis of the fission yeast protein Cpc2. Since the size of the scalar spin coupling via hydrogen bond is quite sensitive to the geometry of the hydrogen bond, it is important to consider the relationship between the bond geometries and the spin couplings based on the quantitative NMR measurements and crystallographic studies. In general, scalar spin couplings via hydrogen bonds in protein are small (1 Hz or less) such as hydrogen bonds between amide and carbonyl groups. Interestingly, we have identified a large scalar spin coupling via a hydrogen bond of about 7 Hz in size between the amide in backbone and the nitrogen in side chain of histidine in the protein Cpc2. Additionally, we measured a quantitative *J* coupling via hydrogen bond in PcyA of which hydrogen positions were determined by neutron crystallographic study. I would like to discuss the relationship between the hydrogen bond geometry and the *J* values.

【背景】

生体分子の立体構造形成や、生化学反応を分子レベルで理解する基盤として、生体分子内、あるいは分子間の弱い相互作用について理解する必要がある。中でも、水素結合は、相互作用に決定的な役割を果たすことが多いことから、その正確な同定、結合の性質を知ることは大変重要である。しかし一般的に、水素結合の存在や、水素結合におけるドナー原子、アクセプター原子対を同定する際には、X 線結晶構造解析等によって決定された原子座標をもとに、どの原子どうしが水素結合をとり得る配置と、距離に存在しているのかを、結合そのものを観測している訳ではない。従って、現在のように広く生体分子の構造解析技術が広まった状況においても、構造決定の際に水素結合ネットワークなどの同定が正確でない場合がある。

一方で水素結合は、ドナーとアクセプターの原子核間にスカラー・スピン結合（*J*カップリング）が存在すすることが知られている。これは、NMR によって直接的に水素結合の存在が示され、信号の帰属をもとに水素結合のドナーとアクセプターを直接同定し得るということでもある[1)2)3)]。今回、我々は分裂酵母のタンパク質 Cpc2 について、その結晶構造解析と、異種核 NMR 解析を並行して進め、このタンパク質のループ部分に存在するタンパク質主鎖から隣接するヒスチジン側鎖への NH-N タイプの水素結合に関して(Fig1)、水素結合経由の *J* カップリングの観測に成功した。さらに、水素結合経由の *J* カップリングの定量的測定と、決定されたタンパク質座標から得られる水素結合のジオメトリの関連を議論したい

水素結合経由の*J*カップリングの観測

○たかだゆめと,いとうゆたか,みしままさき

【実験】

大腸菌発現系を用いてCpc2の発現・精製を行い、X線結晶構造解析(Fig1)及び^{2}H,^{13}C,^{15}Nラベル試料を用いてHNCACB-TROSY、HN(CO)CACB-TROSY、HN(CA)CO-TROSY、HNCO-TROSYより主鎖の帰属を行った。次に、^{2}H,^{15}Nラベル試料を用いてHNN-COSYの測定を行った。

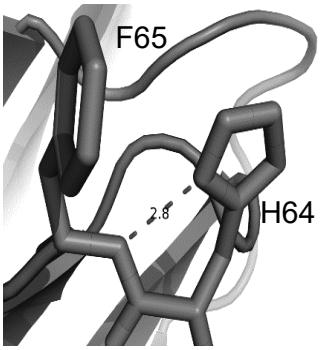


Fig.1 X-ray crystal structure around the H-bond The distance between N (in backbone at F65) and N δ (in sidechain at H64) is 2.8 Å, implying the existence of H-bond.

【結果】

分裂酵母由来CpC2（314残基）の^{1}H-^{15}N TROSYスペクトルを図2に示す。F65の主鎖の信号は、プロトンの化学シフトが、11.4 ppmと極めて低磁場に存在していることから（Fig2）、水素結合のドナーになっていることが示唆された。^{15}N軸を高分解能で測定したTROSYスペクトルからは約7 Hzという非常に大きな分裂が観測された（Fig3）。結晶構造から、F65の主鎖アミドとH64側鎖の水素結合の存在が推定されたことから、次にこの水素結合経由の$^{h2}J_{NN}$を観測するために、HNN-COSYによる測定を行った（Fig4）。その結果、F65の主鎖のNHに関して、H64側鎖のNδの$^{h2}J_{NN}$由来と考えられるクロスピークを観測することに成功した。次いで$1/2\tau_{NN}$を30 msから50 msに変えて測定をすると、H64側鎖のNδの$^{h2}J_{NN}$由来と考えられるクロスピークは、より強く観測された。現在、Spin-echo測定における$^{h2}J_{NN}$による強度変調から、$^{h2}J_{NN}$の大きさの詳細な解析を進めている。TROSYでの分裂幅から推定されたように実際に7 Hz程度の大きさのスピン結合であるとすれば、先行して報告されているヘリックスキャップ構造で観測された$^{h2}J_{NN}$の値~5 Hz[4)5)]よりも大きく、タンパク質内の水素結合における特徴的に大きな$^{h2}J_{NN}$の同定となる。これらの実験情報に基づいて、今後、水素結合のジオメトリと$^{h2}J_{NN}$ 値の関係についても考察を進めていく。

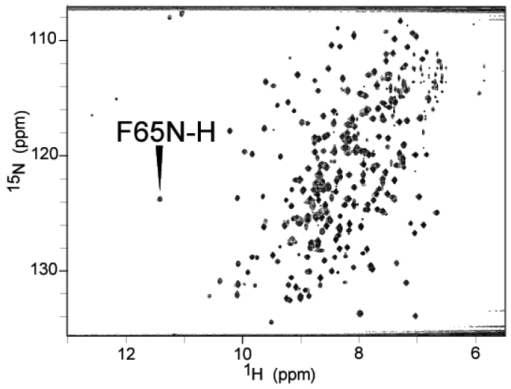


Fig2. ^{1}H-^{15}N TROSY spectrum The peak of F65 exists on the extremely low magnetic field.

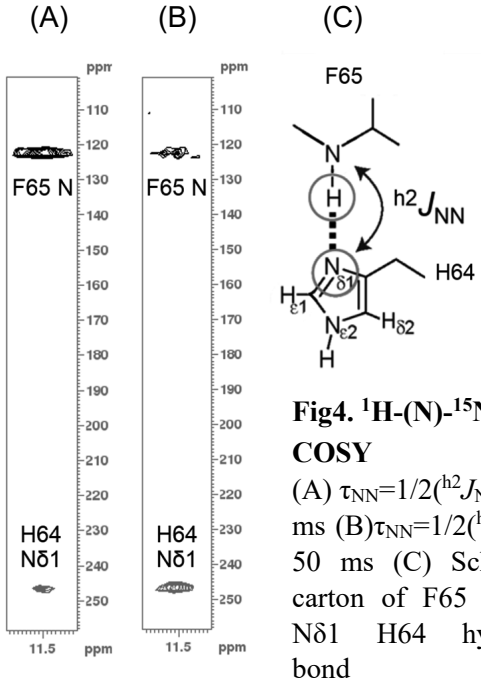


Fig4. ^{1}H-(N)-^{15}Nδ1 COSY
(A) $\tau_{NN}=1/2(^{h2}J_{NN}) \sim 30$ ms (B)$\tau_{NN}=1/2(^{h2}J_{NN}) \sim 50$ ms (C) Schematic carton of F65 N-H … Nδ1 H64 hydrogen bond

【謝辞】

Cpc2の結晶構造解析は、小林彩保 博士（首都大）、森智行 助教、箱嶋敏雄 教授（奈良先端大）に、ご協力いただきました。NMR測定の一部は、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)による支援を頂きました。

【文献】1) Dingley, AJ. and Grzesiek, S. (1998) *J. Am. Chem. Soc.* 120, 8293-8297 2) Cordier, F. *et al* (2008) *Nat. Protocol* 3,235-241

P25

シアノバクテリア由来GAFドメインのNMRによる構造解析

○小泉太貴[1]，会津貴大[1]，伊藤隆[1] ，広瀬侑[2]，三島正規[1]
[1]首都大学東京大学院 理学研究科
[2]豊橋技術科学大学　大学院工学研究科

Structural study of a GAF domain from Cyanobacteria by solution NMR

○Taiki Koizumi[1], Takahiro Aizu[1], Yutaka Ito[1], Yuu Hirose [2], Masaki Mishima[1]
1Graduate School of Science, Tokyo Metropolitan University
2Department of Environmental and Life Sciences, Toyohashi University of Technology

A cyanobacterium synthesizes a photosynthetic pigment which absorbs red light under red-light condition. Conversely, under green-light condition, a photosynthetic pigment which absorbs green light is synthesized. This phenomenon is called “complementary chromatic acclimation”. RcaE protein, a photosensor protein, plays a central role phosphorylating transcriptional factors in a wavelength dependent manner. To elucidate the molecular mechanism of the structural change due to light absorption of RcaE, we are working on NMR structural analysis of RcaE red light absorption form (^{15E}Pr) and green light absorption form (^{15Z}Pg). We have succeeded in obtaining well dispersed HSQC spectra of the GAF-domain for both red light absorption and green light absorption form, and we are proceeding with the structural analysis of the both forms.

〈序論〉

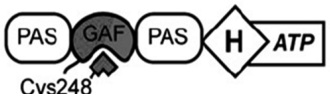


Fig.1 Domain organization of RcaE (adopted from Ref. 1)

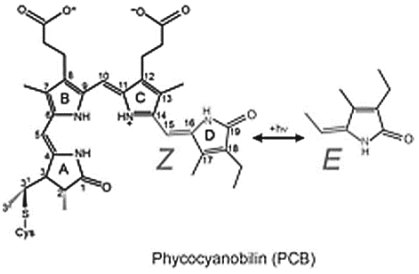


Fig.2 Structure of PCB

ある種のシアノバクテリアは、効率よく光を受容するために，赤色光下では、赤色光を吸収する光合成色素を合成し、逆に緑色光下では、緑色光を吸収する光合成色素を合成する。この現象は、補色順化と呼ばれ、光受容タンパク質であるRcaEタンパク質が、転写調節タンパク質を波長依存的にリン酸化することで制御されている。RcaEは705アミノ酸残基からなるマルチドメインタンパク質であり、色素結合GAFドメインやC末端にはヒスチジンキナーゼドメインを持つ(Fig.1)。また、RcaEは光吸収を担うGAFドメインのシステイン残基がテトラピロール発色団の１つであるフィコシアノビリン(PCB)とチオエーテル結合を介して相互作用しており、赤色光/緑色光をそれぞれ吸収することでPCBのピロール環の１つに*cis-trans*異性化を引き起こし(Fig.2)、RcaE全体に対しても構造変化を及ぼすと考えられている[1)]。我々は、RcaE全長における光吸収からそれに伴う構造変化、キナーゼ活性調節までの分子機構を解明するため、RcaEの赤色光吸収型(^{15E}Pr)と緑色光吸収型(^{15Z}Pg)のNMR構造解析に取り組んでいる。本発表では、まずRcaEのGAFドメインの、^{15E}Prと^{15Z}Pgの構造解析について報告する。

光センサータンパク質、構造解析、溶液NMR

○こいずみ たいき，あいづ たかひろ，ひろせ ゆう，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RcaE GAFドメインとPCBの共発現、精製を行い、赤色光照射下、緑色光照射下において、2D-^{1}H-^{15}N HSQCを行った。赤色光照射下においては、条件検討によって得られた最適な条件で3D-HNCACB、3D-CBCA(CO)NH、3D-HN(CA)CO、3D-HNCO、3D-C(CO)NH、3D-HC(CO)NH、4D-HC(CO)NH、2D-CT ^{13}C HSQC、3D-^{13}C edited NOESY、3D-^{15}N edited NOESY、TALOS-plus、HNHB、HN(CA)HBの測定を行った。

また、基質であるPCBとの相互作用やPCBの構造を調べるため、安定同位体標識されたPCBの前駆体ALAを用いてRcaE GAFドメインとPCBの共発現、精製を行った。

<結果>　赤色光吸収型、緑色光吸収型それぞれにおいて、ピークの分離の良い2D-^{1}H-^{15}N HSQC スペクトルを得ることに成功した(Fig.3, Fig.4)。緑色光吸収型においては3D-HNCACB, 3D-CBCA(CO)NH 、 3D-HN(CA)CO、3D-HNCOを基に主鎖の帰属を行い、約98%のアミノ酸残基の帰属に成功した。また、3D-C(CO)NH 、 3D-H(CCO)NH 、 4D-HC(CO)NH 、 3D-HCCH-TOCSYを基に側鎖の帰属を行い、約95%の側鎖シグナルの帰属に成功した。解析によって得られた距離情報、角度情報を利用し構造計算を行った。また、PCB選択的^{13}C^{15}N標識RcaE GAFドメインのサンプルにおいて既報の化学シフト[2)]からPCBのD環由来と考えられるN-Hシグナルを観測した (Fig.5) 。現在^{15}N-1DによるPCB内の窒素の観測を行っている。

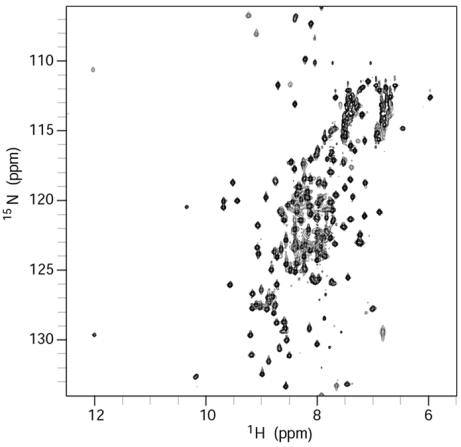


Fig.3 ^{1}H-^{15}N HSQC spectra of RcaE GAF (^{15E}Pr) (pH 6.9)

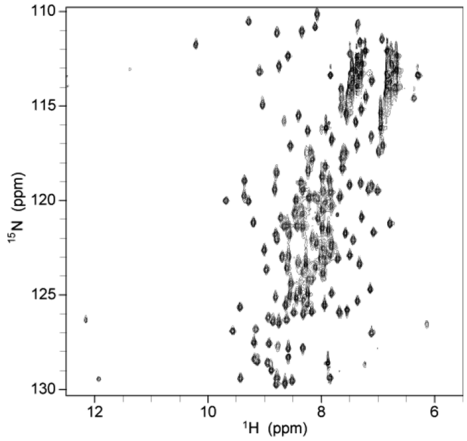


Fig.4 ^{1}H-^{15}N HSQC spectra of RcaE GAF (^{15Z}Pg) (pH 7.5)

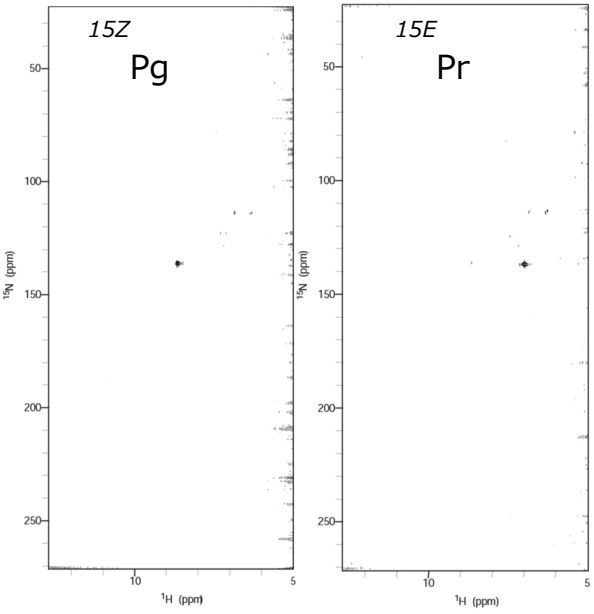


Fig.5 ^{1}H-^{15}N HSQC spectra of RcaE GAF (^{13}C,^{15}N labeled PCB)

<展望>　今後は、緑色光照射下における赤色光吸収型(^{15E}Pr)においてもRcaE GAFの構造を明らかにし、赤色光吸収型と緑色光吸収型の構造の違いを明らかにする。またRcaEにおける光吸収の特徴としてPCBの環上のNHにおいて、光吸収にともないプロトン化、脱プロトン化が起こると考えられており[1)]、NMRによりこれを追跡する。

<参考文献>　1) Hirose, Y et al., *PNAS* , 2013 , 110, 13　2) Rockwell, N et al., *Biochemistry* 2015, 54, 2581−2600

<謝辞>　多次元 NMR 測定の一部は、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)、^{15}N-1D は、蛋白研拠点事業 NMR 共同利用研究(超高磁場)の支援を受けました。

P26

フェレドキシンタンパク質の水素結合の直接観測

○中島弘稀[1]，小泉太貴[1]，伊藤隆[1]，海野昌喜[2]，三島正規[1]
[1]首都大学東京・理学研究科
[2]茨城大学・大学院理工学研究科

Direct observation of hydrogen bonds in ferredoxin protein

○Hiroki Nakajima [1], Taiki Koizumi[1],Yutaka Ito[1],Masaki Unno[2],Masaki Mishima[1]
[1] *Graduate School of Science, Tokyo Metropolitan University*
[2] *Graduate School of Science, Ibaraki University*

Ferredoxin has been subjected to high-resolution X-ray crystal structure analysis and is a suitable protein for discussing hydrogen bonding. We have measured using a J bond via a hydrogen bond and succeeded in observing branched hydrogen bonds. Currently We are analyzing the relationship between the branched hydrogen bond geometry and the J value and I would like to report it at the society.

【序論】

生体高分子の立体構造形成や、その機能の発現である生化学反応を分子レベルで理解する基盤として、分子内あるいは分子間の弱い相互作用について理解することが極めて重要である。なかでも、水素結合は共有結合に比べ、約1/10以下の結合エネルギーしかないが、結合の方向性があること、結合が弱いが故に解離と再結合を行えることなど、生体高分子の構造形成・機能発現に決定的な役割を果たしている。しかし、生体高分子における水素結合の正確な同定や、その性質を調べることは容易ではない。一般に水素結合の存在や、水素結合におけるドナー原子・アクセプター原子対を同定する際にはX線結晶構造解析等によって得られた原子座標を元に、どの原子が水素結合をとり得る配置と距離に存在しているかを調べることで判断しており、結合そのものを観測しているわけではない。そのため、生体分子の構造決定において水素結合ネットワークの同定が正確でない場合がある。

一方、水素結合はわずかに共有結合性を有していることから水素結合を介して、*J*カップリングが存在する。つまり、NMRにより水素結合経由の*J*カップリング(スピン結合)を捉えることは、その存在に関して、直接的な証拠を与える有力な手段である。我々は*bacillus thermoproteolyticus* Ferredoxin(*Bt*Fd)について、そのX線結晶構造[1)]と中性子結晶構造から予測される水素結合に関して、異種核NMR解析を行い、このタンパク質のD38の側鎖カルボキシル基からI43，V44へのCO-HN型の枝分かれ型水素結合の観測に成功したので報告する。

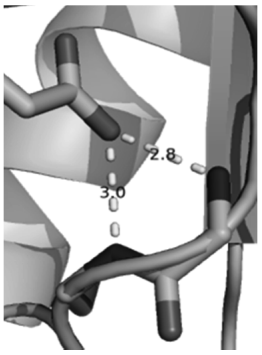


Fig 1. X-ray crystal structure of *Bt*Fd
The interatomic distances from the D38 side chain carboxyl group to the main chain amides of I43 and V44 are 2.8 Å and 3.0Å, respectively[1)].

水素結合、溶液NMR

○なかじまひろき，こいずみたいき，いとうゆたか，うんのまさき，みしままさき

【方法】

*Bt*Fdの主鎖の帰属は、^{13}C,^{15}Nラベル試料を用いて、303 Kで、HNCACB、CBCA(CO)NH、HN(CA)CO、HNCOを測定することにより行った。アスパラギン酸の測鎖カルボキシル基を含む側鎖の^{1}H,^{13}Cの帰属は、^{13}C,^{15}Nラベル試料を用いてC(CO)NH、H(CCO)NH、(H)CCO(^{13}C観測)により行った。また、^{2}H,^{13}C,^{15}Nラベル試料を用いてLong-range-HNCO-TROSYの測定を行った。測定には、Avance-III 600、Avance-III 900を使用し、測定データはnmrPipeを用いてプロセスし、解析にはSparkyを用いた。

【結果】

X線結晶構造解析から、D38の側鎖カルボキシル基とI43，V44の主鎖アミドの枝分かれした水素結合の存在が推定されたことから、この水素結合経由の$^{h3}J_{NC'}$を観測するためにLong-range-HNCO-TROSYによる測定を行った。その結果をFig 2.に示す。178.8 ppm 付近にI43，V44の主鎖NHに関してD38側鎖のカルボキシル基のCの$^{h3}J_{NC'}$由来と考えられる信号を観測することに成功した。これはX線結晶構造から推定されていた枝分かれ型の水素結合の存在をNMRで裏付ける結果である。現在、spin-echo differenceタイプの測定を行い、定量的な$^{h3}J_{NC'}$値の解析を進めている。さらに、現在までに得られている中性子線結晶構造（未発表）に基づく正確な水素の位置から、水素結合距離、角度の関係を併せて本会で議論したい。

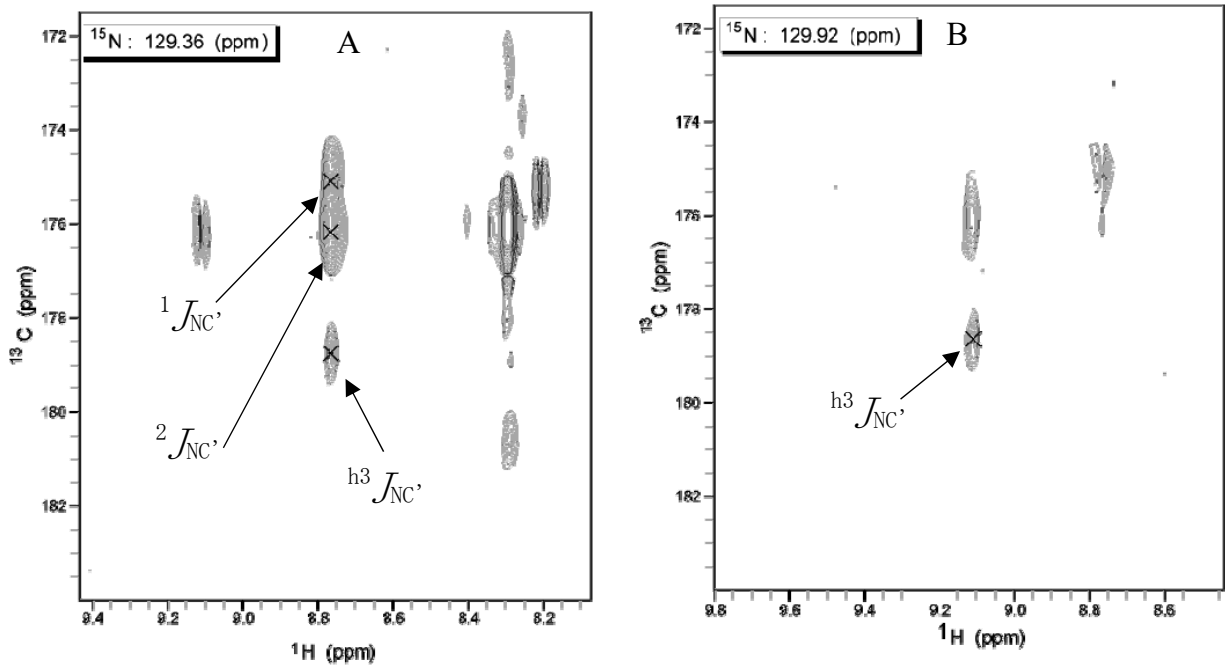


Fig 2. Long-range-HNCO TROSY strips correspond to main chain NH of I43(A) and V44(B) of *Bt*Fd

The peaks (~178.8 ppm, correspond to the chemical shift of the sidechain carboxyl group of D38) were observed in the both strips of I43 and V44 of Long-range-HNCO TROSY.

【参考文献】

1) Fukuyama, K. *et al* (2002) *J.Mol.Biol.* 315:1155-1166

【謝辞】

本研究におけるNMR測定の一部は、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)による支援を頂きました。

P27

溶液NMR法を用いた界面活性剤ミセル中における膜タンパク質の比較構造解析

○鈴木里佳[1]、吉田真帆子[1]、廣畑雅史[1]、村田武士[2]、小島慧一[3]、
須藤雄気[3]、高橋栄夫[1]
1.横浜市立大学大学院　生命医科学研究科　2.千葉大学大学院　理学研究院
3.岡山大学大学院　医歯薬総合研究科　薬学系

Comparative structural analysis of membrane proteins in detergent micelles using solution NMR spectroscopy.

○Rika Suzuki[1], Mahoko Yoshida[1], Masafumi Hirohata[1], Takeshi Murata[2], Keiichi Kojima[3], Yuki Sudo[3], Hideo Takahashi[1]

1.Graduate School of Medical Life Science, Yokohama City University
2.Graduate School of Science, Chiba University
3.Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama University

Membrane proteins are expressed in lipid membranes and play important roles in all organisms. The solubilization of membrane proteins is crucial for the purification of membrane proteins, and the solubilizing environment is known to influence their functions. In this study, we investigated how different membrane mimetic environments affect the stability and structure of a membrane protein using solution NMR spectroscopy. Light-driven proton-pump RxR from the eubacterium *Rubrobacter xylanophilus* was selected as a target membrane protein, and the thermal stability of RxR was estimated for each detergent micelle environment used for the solubilization. Well-resolved ^{1}H-^{15}N TROSY-HSQC spectra of RxR were obtained for several detergent micelles environments, and the substantial chemical shift differences of RxR were observed around the membrane interface region.

【序論】膜タンパク質はシグナル伝達やイオン輸送に関わる生命の維持に重要なタンパク質である。膜タンパク質を構造生物学的に解析する際には、膜から抽出した膜タンパク質を多様な疑似膜環境に再構成し、解析することが多い。これまでに、解析に用いる疑似膜環境の種類によって膜タンパク質の安定性や構造が変化することが報告されており[1, 2]、それに伴い、その機能も影響を受ける。しかしながら、疑似膜環境によって膜タンパク質の安定性、構造や機能がどのように変化しているかを包括的に比較解析した例はほとんどない。そこで、我々は様々な疑似膜環境下における膜タンパク質の溶液NMR解析を通じて、疑似膜環境が膜タンパク質に生じさせる変化を原子レベルで比較解析することを目指した。本発表では、解析対象タンパク質として真正細菌*Rubrobacter xylanophilus*由来の光駆動プロトンポンプ活性を有するロドプシンRxR [3]を、疑似膜環境として汎用的に用いられている界面活性剤を選択し、様々な界面活性剤ミセル中におけるRxRの熱安定性評価と^{1}H-^{15}N TROSY測定により得られたスペクトルの比較解析を行った結果について報告する。

膜タンパク質, 界面活性剤, 溶液NMR法

○すずきりか，よしだまほこ，ひろはたまさふみ，むらたたけし，こじまけいいち，
すどうゆうき，たかはしひでお

【実験内容】1. 各種界面活性剤ミセル中の RxR の安定性評価

ヘッドグループの種類や鎖長の異なる複数の界面活性剤ミセル中の RxR の安定性を評価した。大腸菌の膜上に発現させた RxR を、DDM を用いて可溶化し、Ni 樹脂と陽イオン交換樹脂を用いて精製した。界面活性剤を DDM として精製した RxR を含む溶液を、各種界面活性剤 (DDM, DM, DPC, β-OG, DH_6PC, DH_7PC, LDAO, SDS) が DDM の 50 倍以上含まれたバッファーで希釈し、界面活性剤を置換した。界面活性剤を置換した RxR を含む溶液を 85°C で加熱し、1 時間毎に吸光を測定した。RxR は 541 nm に、結合したレチナールによる特有の吸収を有しており、加熱に伴う 541 nm の吸収の強度変化を比較することで各界面活性剤ミセル中における RxR の安定性を比較した。その結果、界面活性剤の種類によって 541 nm の吸収強度の減少率、すなわち RxR の安定性が異なることが示され、中でも DDM、DM、DPC、DH_7PC 中の RxR の安定性が高いことが示された(Fig. 1)。

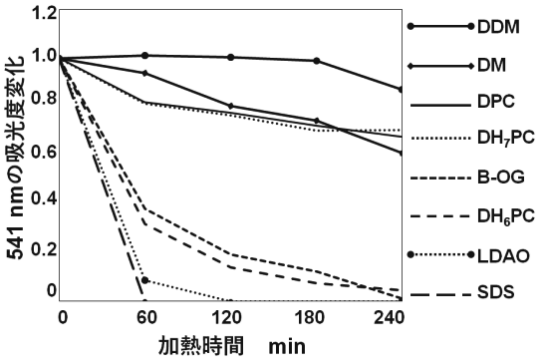


Fig. 1 Time-dependent decrease of the absorbance at 541 nm of RxR in different detergent micelles.

2. 各種界面活性剤ミセル中の[^{15}N] RxR の ^{1}H-^{15}N TROSY スペクトル

各種界面活性剤ミセル中に[^{15}N] RxR を再構成し、^{1}H-^{15}N TROSY 測定を行った。界面活性剤の置換は、陽イオン交換樹脂精製時に行い、測定は 45°C で行った。もっとも熱安定性が高かった DDM ミセル中の RxR については、ミセルサイズの大きさから良質なスペクトルは得られなかったが、DH_7PC ミセル中では、残基レベルの解析が可能なスペクトルを得ることができた(Fig. 2A)。部位特異変異によりシグナル帰属を行った Trp の indole 基由来のシグナルに着目して解析を行ったところ、界面活性剤の種類によって顕著な化学シフト変化が見られることが示された (Fig. 2B)。化学シフト変化が大きいシグナル、すなわち界面活性剤の違いを反映している残基は、膜界面近傍の残基であると推定された。今後、PRE 実験、水素交換実験等により異なる界面活性剤中における Trp 残基の存在様式に関する情報を得るとともに、主鎖アミド基のシグナル帰属に取り組み、全残基レベルでの解析を進めていく予定である。

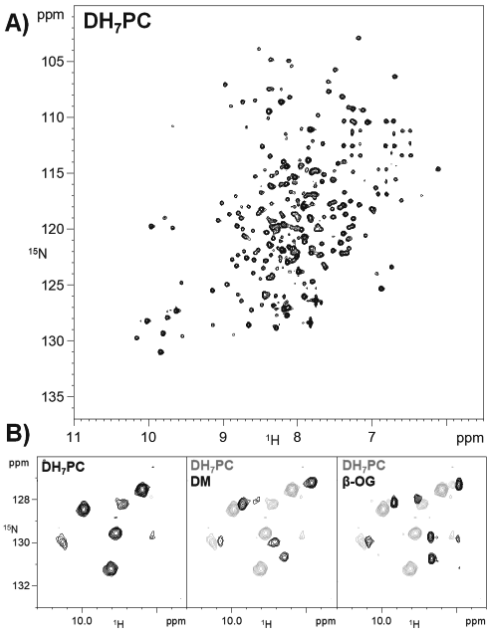


Fig. 2 (A) ^{1}H-^{15}N TROSY spectrum of [^{15}N] RxR in DH_7PC micelles. (B) Close–up views of the Trp indole region in DH_7PC, DM, β-OG micelles.

References

1. Serrano-Vega MJ, Magnani F, Shibata Y and Tate CG. (2008) *PNAS*, **105**, 3, 877-882.
2. Tulumello DV and Deber CM. (2012) *Biochim Biophys Acta*. **1818**, 5, 1351-1358.
3. Kanehara K, Yoshizawa S, Tsukamoto T and Sudo Y. (2017) *Scientific Reports* **7**, 44427.

P28

アドレナリン受容体細胞内第三ループと GPCRモジュレーターSpinophilinとの相互作用解析

○黒川 優香[1]，葛貫 絵梨奈[1]，浦野 智子[1]，島崎 安希子[1]，河野 俊之[2]，細田 和男[1]，寺脇 慎一[1]，若松 馨[1]

1 群馬大学大学院 理工学府

2 北里大学大学院 医療系研究科

Interaction of the third intracellular loop of adrenergic receptor with spinophilin, a modulator of GPCR signaling

○Yuka Kurokawa[1], Erina Kuzunuki[1], Tomoko Urano[1], Akiko Simazaki[1], Toshiyuki Kohno [2], Kazuo Hosoda[1], Shin-ichi Terawaki[1], and Kaori Wakamatsu[1]

1 Faculty of Science and Technology, Gunma University

2 School of Medicine, Kitasato University

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}-ADR), we first narrowed down the interaction regions by referencing $^{1}H^{-15}N$ HSQC spectral change of SPL by the addition of ADR-3iL, and confirmed the sites by pull-down analyses. Different temperature dependences of the HSQC signals in the presence and absence of ADR-3iL suggested the interacting residues in SPL.

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。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}-ADR） の細胞内第3ループと結合し、そのシグナリングを制御する因子の1つである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が、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ADR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が報告によって異なる[1–3]。そこで、α_{2A}-ADR とSPLとの結合領域の絞り込みを行い、さらに、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。

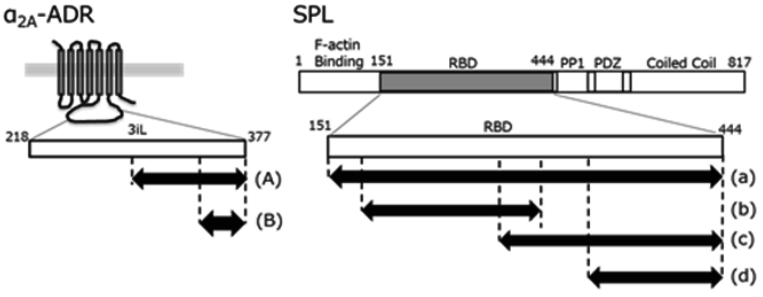


Fig. 1. Domain structures of α_{2A}-ADR and spinophilin.

スピノフィリン、α_{2A}-アドレナリン受容体

○くろかわゆか，くずぬきえりな，うらのともこ，しまざきあきこ，こうのとしゆき，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}-ADRのSPL結合部位を全長の約1/2（Fig. 1-(A): ADR-A）に、SPLのRBDを約1/2（Fig.1(c): SPL-c）に絞り込んだ。結合をpull down assayで確認した後、 [^{15}N]SPL-cを調製しADR-Aを添加して^{1}H–^{15}N HSQCを測定した。しかし、シフト変化は観測されたものの、シグナル分離は不十分だった。そこで、この測定結果をもとに、SPLの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}-ADRも約1/9とさらに短くしたものを作成した（Fig. 1(B): ADR-B）。Pull down assayにより両者の結合を確認したところ、SPLは70残基程度に、α_{2A}-ADRは20残基程度に絞り込むことができた。

次に、[^{15}N]SPL-d、GST-α_{2A}-ADR-Bのタイトレーションを行った。その結果、全くシフトしないシグナルと（Fig. 2(a)）、単調にシフトするシグナル（Fig. 2(b)）を観測した。このことから、SPL-α_{2A}-ADR複合体の形成によって、SPLが立体構造を形成している可能性が示唆された。

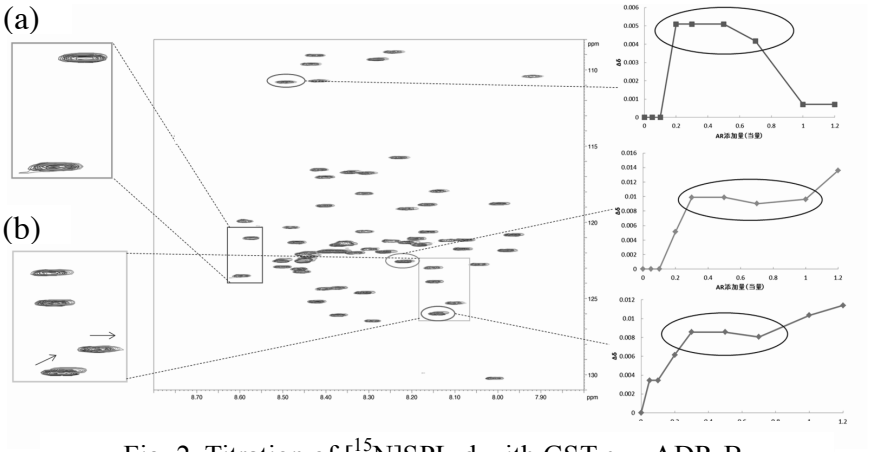
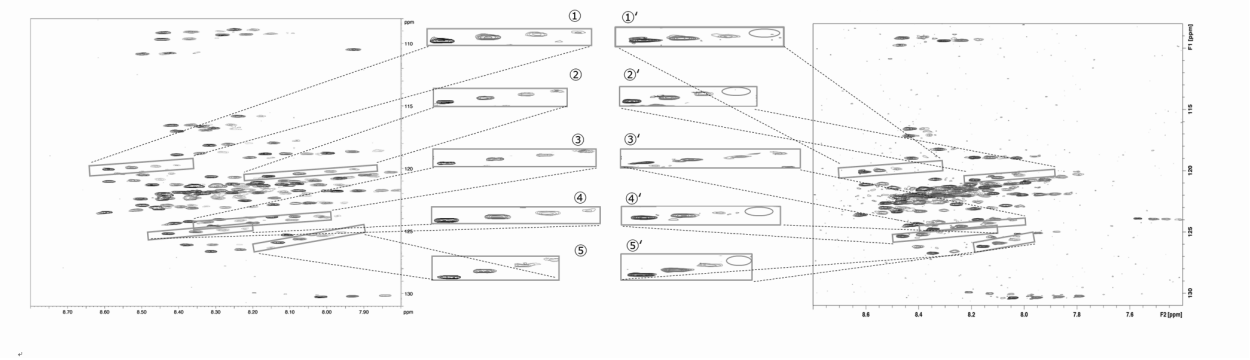


Fig. 2. Titration of [^{15}N]SPL-d with GST-α_{2A}-ADR-B.

さらに、[^{15}N]SPL-d単体とSPL-α_{2A}-ADR複合体について、温度変化によるシグナル強度の変化を比較した(Fig. 2, ①～⑤: SPL–ADR複合体、①'～⑤': SPL単体, 左から298, 308, 318, 328 K)。温度上昇に伴う強度の低下がADRの添加により抑制されるシグナルが見出された。これらのシグナルはADRとの相互作用に関与していると考えられる。


Fig. 3. Temperature dependence of [^{15}N]SPL in the presence (left) and absence of ADR.

^{1}H–^{15}N HSQCを用いたタイトレーションにおいて、複合体形成に伴うSPLのシグナル変化は小さく、結合強度などの情報を得ることは困難だった。このことから、複合体形成に伴うSPL主鎖の構造変化は小さい可能性が考えられる。現在、直接相互作用していると考えられる側鎖の情報を^{1}H–^{13}C HSQCで解析している。

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).

P29

非常に高い活性を有する抗プリオンRNAアプタマーの構造機能相関

真嶋 司[1,2]、Lee Joon-Hwa[3]、鎌足 雄司[4]、林 智彦[1]、木下 正弘[1,2]、桑田 一夫[5]、○永田 崇[1,2]、片平 正人[1,2]
[1]京大・エネルギー理工学研究所、[2]京大・エネルギー科学研究科、
[3]Department of Chemistry and RINS, Gyeongsang National University、[4]岐阜大・科学研究基盤センター、[5]岐阜大・連合創薬医療情報研究科

Structural and functional study of anti-prion aptamers having high activity

Tsukasa Mashima[1,2], Joon-Hwa Lee[3], Yuji O. Kamatari[4], Tomohiko Hayashi[1], Masahiro Kinoshita[1,2], Kazuo Kuwata[5], ○Takashi Nagata[1,4] and Masato Katahira[1,4]
[1]Inst. of Adv. Energy, Kyoto Univ., [2]Grad. Sch. of Energy Sci., Kyoto Univ., [3]Dept. of Chem. and RINS, Gyeongsang Natl. Univ., [4]Life Sci. Res. Center, Gifu Univ., [5]Unit. Grad. Sch. of Drug Disc. and Med. Info. Sci., Gifu Univ.

The conformational transition of prion protein (PrP) from a normal cellular form (PrP^C) into an abnormal form (PrP^{Sc}) is reportedly responsible for prion disease. Previously, we obtained an RNA aptamer, R12, that reduces the production of PrP^{Sc} due to tight binding to PrP^C. Our NMR studies showed that two R12 molecules form a homodimer, in which a single R12 folds into parallel quadruplex. Here, we designed new prion aptamers, R24 and R12-A-R12, based on the structure of R12 homodimer. Both aptamers were supposed to unimolecularly form a similar structure made of two R12 molecules. The assay with prion-infected cells showed that aptamers exhibited much higher anti-prion activity than R12. Then, we determined the solution structure of R12-A-R12. The structure of a single R12-A-R12 molecule resembled that of the R12 homodimer. The mode of interaction was deduced by a model of a single R12-A-R12 molecule in a complex with PrP peptides.

序論

プリオン蛋白質はαヘリックスに富む正常型プリオン蛋白質(PrP^C)と、βシートに富む異常型プリオン蛋白質(PrP^{Sc})が存在することが知られている。プリオン病(ウシの狂牛病、羊のスクレイピー、ヒトのクロイツフェルトヤコブ病等)は、 PrP^CからPrP^{Sc}へと構造が遷移し、そのPrP^{Sc}の蓄積が原因と考えられている。我々はPrP^Cを高い親和性で捕捉し、PrP^{Sc}への遷移を抑制するRNAアプタマー、R12 (r(GGAGGAGGAGGA))が2量化して四重鎖構造を形成し、各1分子がプリオン蛋白質の2箇所のリジンクラスターに同時に相互作用することをNMR法によって明らかにしてきた[1,2,3]。今回、我々はR12の立体構造に基づき、二量化したR12と同様の立体構造を1分子で形成可能と想定される新規RNA分子、R24およびR12-A-R12を設計した。プリオン感染細胞によるアッセイにより、両RNA分子はR12よりも遥かに高い抗プリオン活性を有することが明らかとなった。本研究では新規RNA分子の立体構造の解析、プリオン蛋白質との複合体モデルから相互作用の推測、並びに高い活性を発揮するメカニズムの理解を目指した。

四重鎖核酸、プリオン、立体構造

ましま つかさ、りー じゅんは、かまたり ゆうじ、はやし ともひこ、きのした まさひろ、くわた かずお、○ながた たかし、かたひら まさと

方法

PrP^{Sc}を恒常的に産生するマウス神経細胞を用いて、R24およびR12-A-R12の抗プリオン活性を評価した。R12-A-R12は濃度1 mMとなるように95/5% H_2O/D_2OあるいはD_2O中に溶解させた。これらのサンプルをAVANCE III HD 600 MHzおよび同950 MHz (ブルカー・バイオスピン社)を用いて、^{1}H NMRスペクトル、^{1}H-^{1}H NOESYスペクトル、DQF-COSYスペクトル、TOCSYスペクトル、^{1}H-^{13}C HSQCスペクトル、JRHMBCスペクトルおよび^{1}H-^{15}N HSQCスペクトルの測定と解析を行った。

結果と考察

マウス神経細胞を用いたアッセイにより、R24の異常型プリオンタンパク質の生成を50%阻害する濃度(IC_{50})は100 nMであり、R12の10 μMから100倍改善されたことを見出した。またR12-A-R12もR12より遥かに高い抗プリオン活性を示し、かつ良好なNMRスペクトルを示した。そこでR12-A-R12の各NMRスペクトルの測定と解析を行い、立体構造の解析を行った。

残基間GNH-GH8, GNH_2-GH8およびGNH-GNHなどのテトラッド構造に特徴的なNOEのセットが4つあることから、R12-A-R12は4つのG:G:G:Gテトラッド構造を有することが明らかになった。またこの4つのテトラッド構造のうち、2つについてはGNH2-AH8のsheared型G:A塩基対を形成した際に特徴的なNOEが観測されたことから、G(:A):G:G(:A):Gのヘキサッド構造を2つ持つことが明らかになった。よって、R12-A-R12は2つのG:G:G:Gテトラッド構造と、2つのG(:A):G:G(:A):Gのヘキサッド構造を形成する四重鎖構造であることがわかった。NOEに基づく原子間距離の拘束条件、カップリング定数に基づいた糖のパッカリング情報、テトラッド構造およびヘキサッド構造に関する平面性の拘束条件および水素結合の情報を用いて、Xplor-NIHによる構造計算を行った。100個の構造を計算したうち、エネルギーの低い10個の構造について、AMBERによる水分子を考慮した拘束条件つき分子動力学計算によって、R12-A-R12の構造をリファインメントした。R12-A-R12は鎖の前半部分と後半部分がそれぞれ1つのテトラッド構造と1つのヘキサッド構造からなる平行型四重鎖構造を形成し、各四重鎖構造はヘキサッド構造同士でスタッキングするtail-to-tail様の構造を示した。この立体構造は二量化したR12の立体構造と近いトポロジーであり、R12-A-R12は我々の設計した通りに1分子でR12と同様の立体構造を形成した (Fig. 1)。

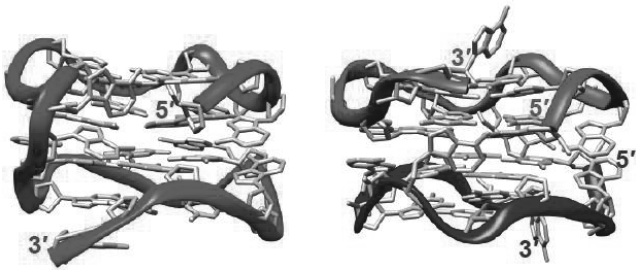


Fig. 1. Representative structure of R12-A-R12 (left) and that of R12 homodimer (right)

我々が過去に決定したR12とPrP^Cの結合部分ペプチド(P16)との複合体を基に、R12-A-R12とP16の複合体モデルを構築した。その結果、R12-P16複合体に見られた静電相互作用およびスタッキング相互作用がよく保存されていた。R12-A-R12は、R12と同様の相互作用様式でPrP^Cを高い親和性で捕捉するとともに、1分子で構造形成することによって獲得した溶液中での安定性が、高い抗プリオン活性に寄与したと考えられる[4]。

References

(1) Mashima, et al., Nucleic Acids Research, 2009, 37, 6249-6258; (2) Mashima, et al., Nucleic Acids Research, 2013, 41, 1355-1362; (3) Hayashi, et al., Nucleic Acids Research, 2014, 42, 6861-6875; (4) Mashima, et al., submitted.

P30

腸球菌のバンコマイシン耐性の原因蛋白質 VanX の二量体構造の解析

○土屋智恵子[1], 小沼剛[1], 西田真之[1], 長土居有隆[2], 池上貴久[1]
[1] 横浜市立大学大学院　生命医科学研究科　生命医科学専攻
[2] ブルカージャパン株式会社

Analysis of the VanX dimer structure of a vancomycin-resistant *Enterococci*

○Chieko Tsuchiya [1], Tsuyoshi Konuma[1], Masayuki Nishida [1], Aritaka Nagadoi [2], Takahisa Ikegami [1]
[1] Graduate School of Medical Life Science, Yokohama City University
[2] Bruker Japan K.K.

VanX is one of the enzymes possessed by vancomycin-resistant bacteria such as *enterococci*. The bacteria have major problems such as causing nosocomial infection. In order to prevent it, I am aiming at developing an inhibitor of VanX. In this study, I analyzed the three-dimensional structure of VanX dimer by NMR. By incorporating amino acid selective unlabeling, I prepared samples with 9 types of amino acids (Arg, Tyr, Asn, Ala, His, Gln, Lys, Thr, and Ser) unlabeled. By combining 3D NMR measurement results and NOE results, I completed about 98% of the assignments of the main chain amide groups. In addition, I performed a transfer-cross-saturation experiment, and almost determined the structure as a dimer. The results show that cation-π interaction possibly exists between Arg and Trp, and that side chains interact between Arg and Asp to form a dimer.

【研究の背景と目的】

バンコマイシンは、ほとんどの抗生物質が効かないとされるメチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）をも殺菌できる抗生物質である。しかし、近年このバンコマイシンをも効かなくさせるバンコマイシン耐性腸球菌や MRSA が現れた。このバンコマイシン耐性菌は、昨今、医療機関で院内感染を引き起こすなど感染力が強く、大きな問題となっている。この腸球菌が持つ、バンコマイシン耐性に重要な役割を担うタンパク質が VanX である。細胞壁の前駆体である D-Ala-D-Ala を加水分解することによって、バンコマイシンの結合を妨げる。VanX は 202 残基を単量体の単位として二量体を形成しており、活性中心に Zn^{2+}を保持している。本研究では、VanX の二量体としての立体構造と機能を NMR で解析した。それらのデータを元に、さらにジペプチダーゼとしての VanX の働きを抑える阻害剤を見つけることで、創薬の開発に繋げることが本研究の目的である。

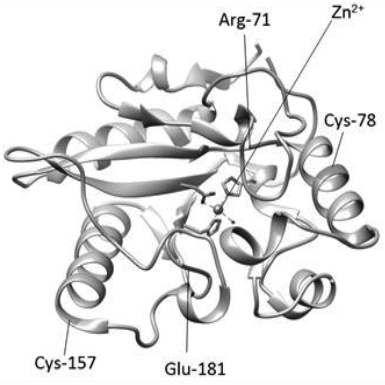


Fig.1 The crystal structure of the VanX monomer PDB: 1r44

耐性菌、バンコマイシン、二量体
○つちやちえこ、こぬまつよし、にしだまさゆき、ながどいありたか、いけがみたかひさ

【結果・考察】

主鎖のアミド基の帰属率を向上させるため、アミノ酸選択的非標識を採り入れた。^{15}N で均一に標識したサンプル(reference)と対象のアミノ酸を非標識にしたサンプルを調製し、^{1}H-^{15}N TROSY-HSQC を測定した。そして、それぞれの NMR スペクトルを重ね合わせた。VanX 中に Lys は 9 個存在するが、Lys を非標識した際、9 個のピーク強度が下がっていることが確認されたため、これらのピークは Lys であると判断できた(Fig.2)。同様に、Arg, Tyr, Asn, Ala, His, Gln, Lys, Thr, Ser のアミノ酸でも選択的非標識を行い、^{2}H, ^{15}N, ^{13}C 標識 VanX の 3 次元 NMR 測定や NOE の結果と合わせたところ約 98%帰属できた(Fig.3)。

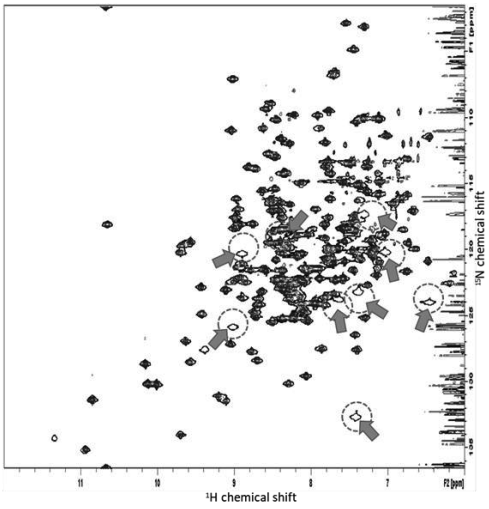


Fig.2 ^{1}H -^{15}N TROSY-HSQC at 303K [^{15}N, ^{14}N-Lys]-VanX (C78S,C157S) at pH4.0

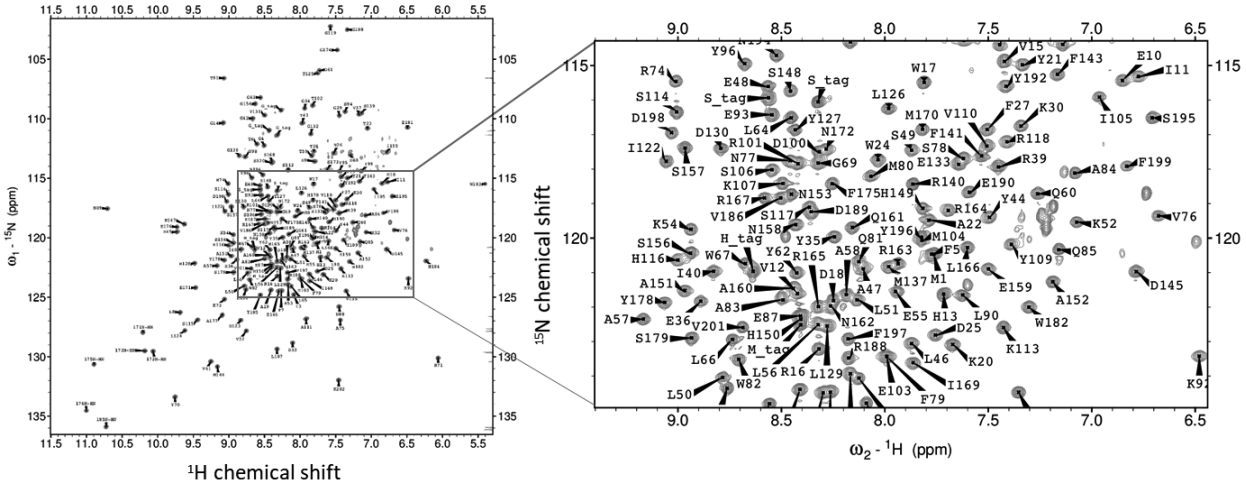


Fig.3 ^{1}H-^{15}N TROSY-HSQC of [^{15}N]-VanX (C78S,C157S) at pH4.0, at 303 K

VanX は二量体で安定することが分かったが、二量体の形成部位が不明であったため、Transfer-cross-saturation 測定を行った。ピーク強度が下がった部位を X 線結晶構造上に濃い灰色でマッピングした(Fig.4)。この部位には Arg や Trp が存在しており、カチオン-π 相互作用していることや、Arg や Asp の側鎖同士が相互作用している可能性が考えられる。

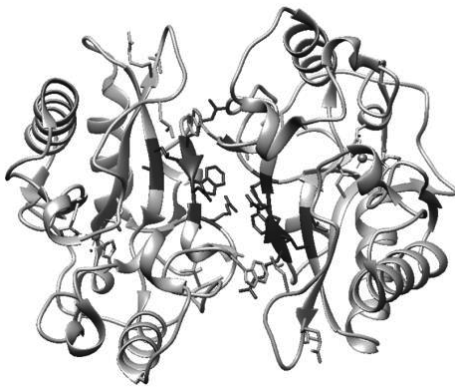


Fig.4 A VanX dimer model

《参考文献》

D.E. Bussiere, S.D. Pratt, L. Katz, J.M. Severin, T. Holzman, and C.H. Park (1998) The structure of VanX reveals a novel amino-dipeptidase involved in mediating transposon-based vancomycin resistance. *Molecular Cell* 2 75-84.

P31

分子混雑環境下のRas蛋白質の動態解析

○亀井 駿[1], 池谷 鉄兵[1], 田仲 加代子[2], 伊藤 隆[1]
[1]首都大学東京・大学院理学研究科
[2]Department of Molecular and Cell Biology, University of Leicester

Ras proteins under macromolecular crowding environment

○Shun Kamei[1], Teppei Ikeya[1], Kayoko Tanaka[2] and Yutaka Ito[1]
[1]Department of Chemistry, Tokyo Metropolitan University.
[2]Department of Molecular and Cell Biology, University of Leicester

The GTP-bound Ras exhibits localised conformational multiplicity around the functionally important three loop regions, L1, L2 and L4 with an exchange rate of ~msec range, while single conformations are found for the corresponding regions in the inactive GDP-bound state. Proteins in living cells interact specifically or nonspecifically with an enormous number of biomolecules, and this macromolecular crowding environment affects proteins' behaviours such as 3D structures, dynamics, binding events. We expect that flexible regions in proteins seem to be affected largely by the crowding effects. However, it has not yet been clarified whether the equilibrium between the multiple conformations in the GTP-bound Ras is altered under the intracellular environment.

In this presentation, we will report our recent results of heteronuclear multi-dimensional NMR studies for HRas(1-171) in the dilute solution and with excess amount of a protein crowder, BSA.

【序論】

原がん遺伝子産物HRasはアミノ酸189残基からなる低分子量GTPaseであり，細胞増殖・分化に関わるシグナル伝達経路において重要な役割を果たしている．HRasはGDPまたはGTPと強く結合し，GTP結合型は下流へのシグナル伝達活性を示すのに対して，GDP結合型は不活性である．NMRを用いた解析で，GTP結合型では，生物活性発現に関わる3つのループ領域（L1/L2/L4）に構造多形が存在し，~msec程度の速度で交換していることが明らかになっている[1]．しかし，この複数のコンフォメーション間の平衡が，細胞内分子クラウディング環境の影響をどの程度受けているかどうかについてはまだ充分な検証が行われていない．そこで本研究では，細胞膜へのアンカーリングに寄与するC末端18残基を切断した，HRas(1-171)について，GDPもしくはGMPPNP（GTPの非水解アナログ）を結合させた試料を調製し，希薄溶液中および細胞内環境を模したクラウディング環境内においてNMR解析を行った．また同様にC末端領域を切断したKRas(1-169)についても解析を試みた．

【実験】

大腸菌内の発現系を用いて，$^{13}C/^{15}N$標識HRasを精製した．精製後の野生型HRasは内在性のGTPase活性によってGDP型になっている．そこで，GMPPNP型は，過剰のGMPPNPを添加してGDPを置換することで調製した．HRas・GMPPNPの主鎖$^{1}H/^{13}C/^{15}N$相関シグナルの帰属は完了しているが[1]，前述のようにL1/L2/L4ループ領域とその周囲の残基由来の$^{1}H^{N}$-^{15}N相関ピークは化学交換のため

Ras，分子クラウディング環境，構造多形性

○かめい しゅん，いけや てっぺい，たなか かよこ，いとう ゆたか

に著しくブロードニングしており，解析が困難である．一方で側鎖メチル基由来の^{1}H-^{13}C相関シグナルはGMPPNP型でも感度よく観測可能であることが判明したため，まずH(CCCO)NH，CC(CO)NH，HCCH-TOCSYスペクトルの解析を行うことでGMPPNP型での側鎖メチル基の帰属を試みた．この帰属を基に2D ^{1}H-^{15}N HSQCおよび^{1}H-^{13}C HSQCスペクトルの両方を用いて分子混雑環境の影響を解析することとした．細胞内環境を模したクラウディング環境は，高濃度でウシ血清アルブミン(BSA)を添加することで調製した．

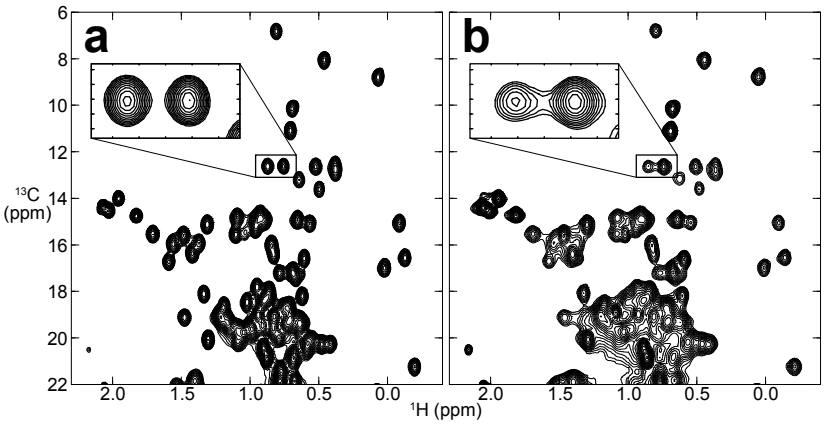


Fig.1 希薄溶液中(a)および BSA 300mg/mL 共存下(b)における HRas・GDP の ^{1}H-^{13}C HSQC スペクトル(メチル領域)．BSA 共存下で顕著にブロードニングしているピークを示すために拡大図も示した．

KRasについても，大腸菌内の発現系を用いて，^{13}C/^{15}N標識HRasを精製した．現在GDP結合型およびGMPPNP結合型の主鎖NMRシグナルおよび側鎖メチル基由来のシグナルの帰属を進めている．

【結果と展望】

Fig.1には，希薄溶液中（a）もしくはBSA共存下（300mg/mL）で測定したHRas・GDPの^{1}H-^{13}C HSQCのスペクトルを示した．BSA添加によってシグナル強度は減少しているが，その減少の程度は一様でないことが判明した．また**Fig.2**にはHRas・GDPの主鎖^{1}H^{N}-^{15}N相関ピーク強度に対するBSA添加の影響を示した．現在は，HRas・GMPPNP型についても同様の解析を進めており，HRasに対する分子クラウディング環境の影響と，（GTP結合型に特有な）構造多形性の平衡に対する分子クラウディング環境の影響を考察していく予定である．

また，KRasに対しても，（HRasと同様に）2D ^{1}H-^{15}N HSQCおよび^{1}H-^{13}C HSQCスペクトルの両方を用いて分子混雑環境の影響を解析し，HRasの結果と比較・検討していく計画である．

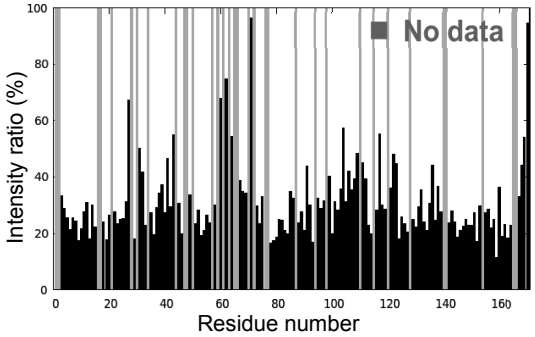


Fig.2 HRas・GDP の^{1}H^{N}-^{15}N 相関ピーク強度に対する BSA 添加の影響．縦軸は希薄溶液中に対する BSA 共存下（300mg/mL）のピーク強度比（%）．

【参考文献】

[1] Ito, Y. et al. *Biochemistry* **36**, 9109-9119 (1997)

P32

藍色細菌*Anabaena variabilis*由来RNA結合タンパク質RbpDとRbpAのRNA結合領域の構造比較

○森田勇人[1]，杉木俊彦[2]，児嶋長次郎[2,3]，林秀則[4]，佐藤直樹[5]
1城西大・理 2阪大・蛋白研 3横浜国・工 4愛媛大・理工
5東大・総合文

Structural comparison of RNA binding domains between RbpD and other Rbps from cyanobacterium *Anabaena variabilis*.

Hayato Morita [1], Toshihiko Suzuki[2], Chojiro Kojima[2,3], Hidenori Hayashi[4], Naoki Sato[5]
1 Fac. Sci., Josai Univ. 2 Inst. Prot. Res., Osaka Univ. 3 Fac. Eng., Yokohama Nat. Univ. 4 Grad. Sch. Sci. Eng., Ehime Univ. 5 Grad. Sch. Arts. Sci., Univ. Tokyo

In the cyanobacterium *Anabena variabilis*, series of the small RNA-binding proteins (Rbps) are expressed for the adaptation to low temperatures. These Rbps are composed of single N-terminal RNA recognition motif (RRM) and a C-terminal Glycine-rich domain. RbpA1 and RbpD are member of these Rbps. RbpA1 is composed of an RRM and a C-terminal glycine rich domain. However, RbpD is composed only of and RRM (homologous to RRMs in other Rbp family) and lacks C-terminal glycine rich domain. In addition to this difference, RbpD expression is not induced with the low temperature stress.

To elucidate the functional differences of RRMs between RbpD and other Rbps, especially RbpA1, we overexpressed the stable isotope labelled RbpD in *E. coli* and chemical shifts were assigned for ^{1}HN, ^{15}NH, ^{13}Ca, ^{13}Cb and ^{13}CO. From this data, the secondary structure of RbpD was estimated and compared with that of RbpA1 based on our previous study.

藍色細菌*Anabaena variabilis*では、生育温度を38℃から22℃に低下させると、低温環境への適応を行うために、一連の小型RNA結合タンパク質(Rbps)の発現が誘導されることが知られている[1]。これらのRbpsは、N末端側のRNA認識モチーフとC末端側のグリシンリッチドメインの２つのドメインから構成されている。RbpA1は、このようなRbpsの中で初期にその発現誘導が確認されたタンパク質であり、RRMとグリシンリッチドメイン一つずつから構成されている。また、RbpA1は安定同位体標識法を用いた多次元NMR分光法により我々のグループがこれまでに高次構造解析を進めてきていることから、RRMとグリシンリッチドメインから構成されるRbpsの構造のモデルと考えることができる。一方、これまでに遺伝子・アミノ酸配列レベルでの相動性比較研究から、新たなRbpsが複数見つかってきたが、その中で唯一RbpDは、低温による発現誘導が確認されなかった[2]。RbpDはアミノ酸配列上、他のRbpsのRRMとの相同性は確認されている一つのRRMのみから構成されている。本研究では、RbpA1とRbpDの構造比較を行うことで、両者の機能上の差異を解明することを目的とし、安定同位体（^{15}N/^{13}C）で標識したRbpDの溶液構造を多次元NMR分光法で解析することを試みた。

RbpDをコードする遺伝子をpET-21aのNdeI/XhoIサイトに挿入することで作成したプラスミドを大腸菌Rosetta GamiB™に形質転換することで構築したRbpDの大量発現系を^{15}NH4Cl、^{13}C-Glucoseを含むM9培地中37℃で培養し、OD_{600}=0.5で0.25mMIPTG(終濃度)を

RNA結合タンパク質、低温誘導、藍色細菌

○もりたはやと、すぎきとしひこ、こじまちょうじろう、はやしひでのり、さとうなおき

添加後さらに3時間培養を継続することで安定同位体標識RbpDを作成した。

作成した安定同位体標識RbpDは、超音波破砕後、PEI処理、硫安分画処理により粗精製を行い、イオン交換ならびにサイズ排除クロマトグラフィーにより精製した。精製したRbpDは限外濾過で0.2mMまで濃縮後、700MHz FT-NMR (Agilent), 800MHz FTNMR（Avance III HD;Bruker）を用いて、^{1}H-^{15}N HSQC, HNCACB, HNCA, HNCO, ^{1}H-^{15}N HSQC-NOESYスペクトル測定を行い、^{1}HN、^{15}NH、^{13}CO、^{13}Ca、^{13}Cbの主鎖周りの核種のケミカルシフトの帰属を行った。得られたデータをもとにRbpDの二次構造予測を行うとともに、RbpA1に関する我々のこれまでの解析結果[3]との比較を行ったので、本報告会ではその結果について報告する。

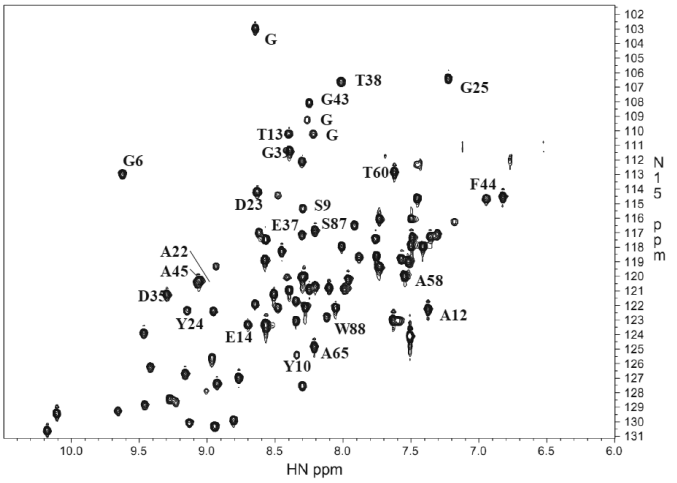


Fig. 1. RbpD の ^{1}H-^{15}N HSQC スペクトル

References

1. N. Sato, *Plant Mol. Biol.*, **24** 819-823 (1994).
2. N. Sato, *Nucl. Acid. Res.* **23** 2161-2167 (1995).
3. E.H. Morita, T. Murakami, K. Uegaki, T. Yamazaki, N. Sato, Y. Kyogoku, H. Hayashi, *J. Biomol. NMR*, **17** (351-352), 2000.

P33

創薬のための生物物理学的アプローチ

○鎌足 雄司[1,2]
1岐阜大学 研究推進･社会連携機構 科学研究基盤センター 機器分析分野
2岐阜大学 大学院連合創薬医療情報研究科 創薬科学専攻

Biophysical approaches for drug discovery

○Yuji O. Kamatari[1,2]
1 Life Science Research Center, Gifu University,
2 United Graduate School of Drug Discovery and Medical Information Sciences, Gifu University

We use multiple biophysical techniques for drug discovery researches including differential scanning fluorimetry (DSF) for high-throughput screening, surface plasmon resonance (SPR) and isothermal titration calorimetry (ITC) for quantitative evaluation of the drug binding, and NMR spectroscopy for structural information. We can select a suitable technique for the purpose and target characteristics. In addition, combination use of these different techniques can be used to understand the reaction mechanism. This information can feed back to molecular design and accelerates drug discovery. We present here some examples of our research aimed at developing therapeutics for prion diseases and influenza.

我々は、スループットの高い示差走査型蛍光定量(DSF)法、結合情報を定量的に評価するための表面プラズモン共鳴(SPR)法や等温滴定型熱量測定(ITC)法、構造情報を得るためのNMR分光法等の複数の生物物理学的アプローチを併用し、標的タンパク質と低分子化合物間の結合を検出し、創薬研究に用いている。研究標的や目的に合った手法を選択し用いる。また、これらの異なる情報を与える手法を組み合わせることにより、反応機構を理解する。これらの情報は、化合物分子設計にフィードバックし、創薬を加速する。プリオン病やインフルエンザ等の治療薬開発を目指した我々の研究例を幾つか紹介する。

抗プリオン治療薬の開発と作用機構の解明

プリオン病は、プリオンタンパク質の関与する脳の海綿状変性を特徴とする致死性の神経変性疾患であり、有効な治療法はまだ確立されていない。我々は、NMR緩和法を用いて正常型プリオンタンパク質に遅い揺らぎをもつ部位が存在することを明らかにした(1)。そして、この部位に結合し揺らぎを抑える化合物を設計し、抗プリオン効果をもつ化合物を得た(1,2)。また、これまでに報告されている抗プリオン化合物を分子間相互作用解析に基づきその作用機構を明らかにした(3)。これらの実験的に得られる構造や相互作用に関する情報は、得られた化合物の最適化だけではなく、化合物設計手法の改良や、薬剤の併用療法の提案等にも繋がる。希少性の高い疾患に対しては特に、計算科学と構造生物学が両輪となり論理的に創薬研究を推進する必要があると考

創薬、プリオン病、インフルエンザ

○かまたりゆうじ

えている。

新規インフルエンザ治療薬の創出のためのin vitroアッセイ系の構築

現在、インフルエンザ治療薬に対する耐性ウイルスの出現は大きな問題となっており、新たなインフルエンザ治療薬の創出が必要とされている。我々は、RNAポリメラーゼを標的とした新たな作用機構で抗インフルエンザ活性を発揮する薬剤の創出を目指している。RNAポリメラーゼは、三つのサブユニット(PA, PB1, PB2)から成り、三量体形成を妨げる化合物は抗インフルエンザ活性を発揮すると考えられる。我々は、RNAポリメラーゼ阻害剤創出のためのスループットの高いin vitroアッセイ系の構築を行った。PB1(678-757)-PB2(1-37)および、PA(257-716)-PB1(1-15)の相互作用部位は、その部位だけで発現・構造解析が行われているため、これらの部位を標的とした。また、高感度で必要サンプル量が少なくスループットの高いDSF法を用いた。DSFは、タンパク質変性に伴う蛍光強度の変化から、変性中点(T_m)を計測する手法であり、薬剤スクリーニングには、化合物結合による標的タンパク質の安定性の変化(ΔT_m)を指標として用いる。今後この系を用いた薬剤スクリーニングを行いヒット化合物をNMR等を用いて検証していく。in vitroアッセイ利用のメリットは、同じ戦略がどのような系へも応用可能、リスクの高い系も安全に使用可能、まだ出現していない薬剤耐性株に対する創薬が可能、化合物の作用機構が明確であるため最適化の戦略が立てやすい等が挙げられる。

References

1. K. Yamaguchi et al., A medical chaperone for prion proteins decelerates the progress of transmissible spongiform encephalopathy, Nature Biomedical Engineering, 3, 206-219, (2019).
2. K. Kuwata et al., Hot spots in prion protein for pathogenic conversion. Proc Natl Acad Sci U S A. 104, 11921-11926 (2007)
3. Y. O. Kamatari et al., Characterizing anti-prion compounds based on their binding properties to prion proteins: Implications as medical chaperones. Protein Sci. 22, 22-34 (2013).

P34

溶液NMRを用いたATP-タンパク質相互作用の解析

○西澤茉由[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 inhibitory mechanism of ATP for protein fibril formation

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

Neurodegenerative diseases including Alzheimer's disease are thought to be caused by abnormal accumulation of amyloid fibrils in neurons. Recently, high concentration of adenosine triphosphate (ATP) is found to inhibit protein fibril formation although ATP generally mediates storage, supply, and transport of energy in cells. Furthermore, the decrease in the intracellular ATP level can lead to neurodegenerative diseases. To date, how ATP inhibits protein fibril formation remains unclear; therefore, it is important to analyze the inhibitory mechanism at the molecular level. In this study, we focus on the intermolecular interactions between ATP and proteins. By using solution NMR techniques, we quantified the concentration-dependent binding of ATP to proteins and found that ATP affects protein-protein interactions. As a result, the suspected intermolecular interaction was observed for two folded proteins and one intrinsically disordered protein, indicating that ATP is a general binder of proteins.

■研究背景・目的

アルツハイマー病をはじめとする神経変性疾患は、タンパク質の異常アミロイド線維が神経細胞に蓄積することによって惹起されると考えられている。近年、生体内のエネルギーの貯蔵や供給、運搬を仲介するアデノシン三リン酸(ATP)がタンパク質の線維化を阻害することが明らかにされた[1]。また、ATP 濃度の低下と神経変性疾患に関連性があることが報告されたことから[2]、ATP の線維化阻害能の分子基盤の解明は、神経変性疾患の治療法開発に重要な知見となることが期待される。さらに、ATP の線維化の阻害能は 1 mM 以上の高濃度で発揮されており、ATP は細胞内に 1-10 mM と高濃度に存在する。したがって、細胞内において ATP はあらゆるタンパク質の線維化を阻害する可能性がある。標的タンパク質との非共有結合性の相互作用により、ATP は線維化の阻害能を持つと考えられるが、なぜ阻害能を持つのか、相互作用に選択性や特異性があるのかは不明である。また、1 mM 以上で ATP と標的タンパク質が相互作用することから、弱い分子間相互作用が予想される。そこで本研究では、弱い分子間相互作用を定量化できる溶液 NMR を用いて ATP と標的タンパク質との相互作用を原子レベルで解析し、線維化の阻害機構を解明する。

ATP、アミロイド
○にしざわまゆ，ヴぁりんだえりっく，もりもとだいち，すがせけんじ，しらかわまさひろ

■研究方法

(1)ATP-タンパク質間相互作用の定量化

あらゆる細胞内に比較的高濃度（数十μM程度）に存在するユビキチン、パーキンソン病 (PD) 原因タンパク質であるαシヌクレイン、ユビキチン結合p62 UBAドメインの3種のタンパク質を研究対象とした。^{15}N標識した各タンパク質50 μMに対して10 mMのATPを共存させ、ATP-タンパク質間相互作用を解析した。さらに、ユビキチン50 μMに対して0 mMから11 mMまで段階的に濃度を変化させたATPを共存させ、溶液NMRでATP濃度に依存するATP-タンパク質間相互作用を解析した。また、測定は298Kで行った。

(2)ATPのタンパク質間相互作用への影響

溶液中で単量体と二量体の2つの状態の平衡状態にあるp62 UBAドメインを用いた。^{15}N標識p62 UBA 50 μMに対してATP 10 mM存在下でNMR測定を行い、ATPとp62 UBAとの相互作用およびp62 UBA同士のタンパク質間相互作用を解析した。

■研究結果および展望

(1) ATP-タンパク質間相互作用の定量化

ATP添加により、ユビキチン、αシヌクレイン、p62 UBAドメインいずれにいても主鎖の化学シフトが部位特異的に変化した(Fig.1a)。詳細な解析から、ATPがユビキチンの疎水面と構造的に柔軟なC末端領域に選択的に結合することが分かった。さらに、ATP濃度を上げるにつれて化学シフトの変化量が増加した(Fig.1b)。この結果より、ATP濃度とATP-タンパク質間相互作用に濃度依存性があることが示唆された。

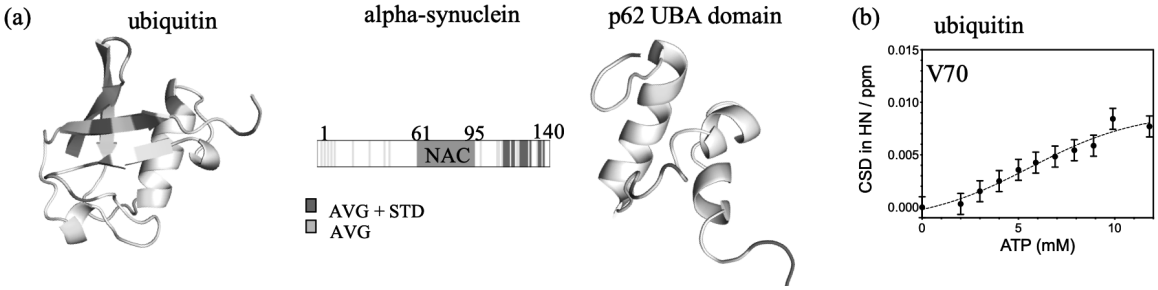


Fig. 1. ATP-protein interaction

a, Residues showing chemical shift differences (CSD); **b**, ATP concentration-dependent CSD.

(2)ATPのタンパク質間相互作用への影響

単量体と二量体の平衡状態にある p62 UBA に 10 mM ATP を添加すると、両状態ともに化学シフトが変化した。ユビキチンと同様に、p62 UBA についても、疎水面および C 末端領域に ATP が選択的に結合した。上記(1)(2)の結果から、タンパク質の種類に関係なく、ATP は疎水性分子表面に結合し、疎水性面を保護することで、線維化しないタンパク質の分子間相互作用を阻害することが示唆された。今後は、NMR 緩和分散法である R_2 relaxation dispersion 法を用いて数百マイクロ秒～数秒の時間範囲における ATP のタンパク質間相互作用への影響を観測する。

References

[1] Patel, A., et al., ATP as a biological hydrotrope. *Science*, **356**, 753-756 (2017)

[2] Pathak, D., et al., The role of mitochondrially derived ATP in synaptic vesicle recycling. *Journal of Biological Chemistry*, **290**, 22325-22336 (2015)

P35

排水処理膜のファウリング予測に寄与する重要因子探索

○横山大稀[1]，朝倉大河[1]，松本朋子[1]，菊地淳[1,2,3]
1理化学研究所環境資源科学研究センター
2横浜市立大学大学院生命医科学研究科
3名古屋大学大学院生命農学研究科

Data mining for factors to occur fouling in an effluent treatment

○Daiki Yokoyama[1], Taiga Asakura[1], Tomoko Matsumoto[1], Jun Kikuchi[1,2,3]
[1]RIKEN CSRS
[2]Grad. Sch. Med. Sci., Yokohama City Univ.
[3]Grad. Sch. Bioagri. Sci., Nagoya Univ.

One of the most critical problems in aquaculture in a closed system is a fouling, which increases an operation cost by obstructing membrane pores. In this study, we aim to identify organic substances to cause the fouling using NMR spectroscopy and machine learning.

We set an experimental system where artificial seawater kept filtered with a membrane filter. We monitored time-series data on flow rate of filtered water and collected the membrane filter after fouling occurred. We found a filter on which fouling occurred promptly had a larger proportion of specific substances (e.g. Glycerol、Betain、Taurine、Trimethylamine-N-oxide、Alanine、Lactate). We will further collect the membrane samples to search causative agents in membrane fouling using machine leaning techniques.

【背景】

世界の水産物需要が年々増加する一方、海面漁業生産量は頭打ちになっていることから、養殖業による水産物供給に期待がかかっている[1]。閉鎖循環式陸上養殖（水をフィルターでろ過し続ける閉鎖系で魚を飼育する養殖法）は、立地を選ばず、環境変動（e.g. 温暖化、赤潮、台風）の影響を受けないことから、安定的に高い生産性を実現しうる。また排水を海に流さないため、環境負荷の少ない持続可能な養殖法である。そのため、閉鎖循環式陸上養殖を利用することによる、食糧確保・環境問題への貢献が期待されている[2]。

この閉鎖循環式陸上養殖等の排水処理においてしばしば問題となるのが、フィルターが目詰まりを起こすファウリング現象である[3]。ファウリングが進行すると膜差圧が増大し、同じ水量ろ過するために必要なエネルギーが増大してしまう。また膜差圧を正常に戻すための膜洗浄や膜交換等でのコストも発生してしまう。このような問題を解決するためには、ファウリング発生メカニズムの理解が必要となる。

ファウリング発生のメカニズムとして、特定の有機物群（多糖類、タンパク質等）が膜に吸着し目詰まりを発生させていることが示唆されている[4,5]。ファウリングの原因物質を特定できれば、その原因物質の蓄積抑制・除外等の処置によって、ファウリング発生を抑制できる可能性がある。そこでNMR法によるフィルター付着有機物の網羅的解析と機械学習を組み合わせることで、数ある有機物群からファウリングの原因物質を詳細に特定することを目的とした。

高分子膜、吸着・界面現象、機械学習予測
○よこやまだいき、あさくらたいが、まつもととともこ、きくちじゅん

【方法】

実験水槽でコモンフグ（*Takifugu poecilonotus*）を飼育し、水槽水（人工海水）を0.2μmメンブレンフィルターでろ過する実験系を設置した（Fig.1）。ろ過重量を経時測定し、ろ過流量を算出した。ろ過流量は時間の経過とともに減少し、流量2mL/minを下回ったところで流量の変化は非常に小さくなった。そこでろ過流量2mL/minを下回った時間をファウリング発生時間と定義し、その時点でフィルターを回収した。フィルター上の有機物をKpi溶液で抽出し、^{1}H-NMRおよび2D-*Jres*のスペクトルを取得した。

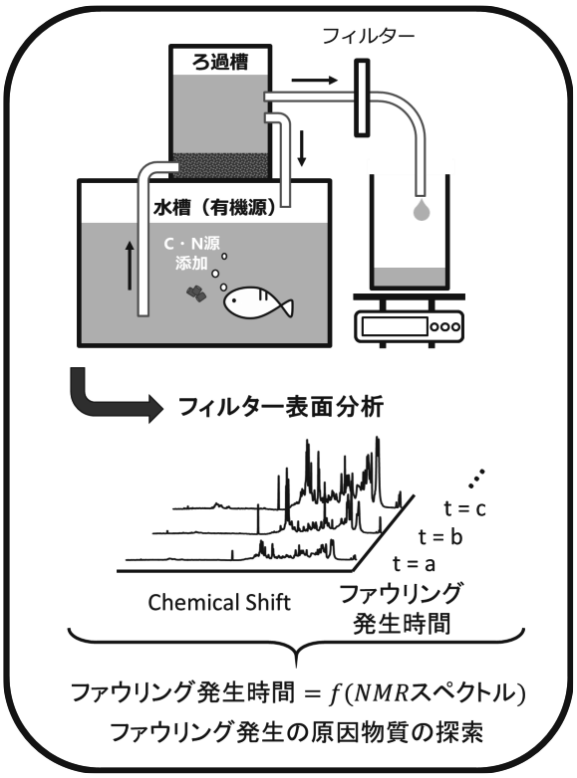


Fig.1 研究概要図

【結果・考察】

初期試験として行った5サンプル分の結果を以下に示す（Fig.2）。ファウリング発生時間が早いフィルターサンプルの表面付着物質ほど、^{1}H-NMRスペクトルのGlycerol、Betain、Taurine、Trimethylamine-N-oxide、Alanine、Lactate等のピークが高いことが確認され、これらの物質が膜表面に特異的に付着しファウリングが発生している可能性が考えられた。今後は、実際の排水処理系と同様に定速ろ過で膜差圧を観測する系に移行するとともに、膜サンプル数を増やしていく予定である。また機械学習では、NMRのスペクトルの数値情報をそのまま説明変数として扱い、ファウリング発生に寄与する原因物質を探索していく（Fig.1）

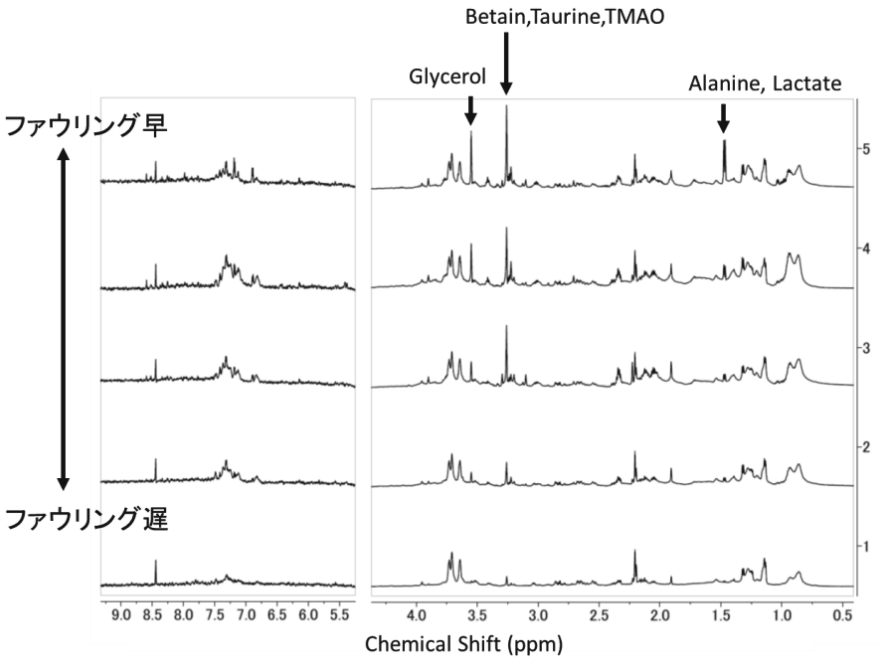


Fig.2 フィルター付着有機物の ^{1}H-NMR スペクトル

【References】

[1] 水産庁、平成30年度水産白書

[2] Martins et al. (2010) *Aquacultural engineering* 43(3): 83-93.

[3] Meng et al. (2009) *Water research* 43(6): 1489-1512.

[4] Inaba et al. (2017) *npj Biofilms and Microbiomes* 3(1):5.

[5] Iorhemen et al. (2016) Membranes 6(2): 33.

P36

魚類における入出力代謝応答の評価系構築

○藤村哲平[1]，坂田研二[2]，菊地淳[1,2,3]
[1]横浜市立大学大学院　生命医科学研究科、[2]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、[3]名古屋大学大学院 生命農学研究科

Building evaluation system for input to output metabolic response in fish

○Teppei Fujimura [1], Kenji Sakata[2], Jun Kikuchi[1,2,3]
[1]*Graduate school of Medical Life Science, Yokohama City University*
[2]*RIKEN Center for Sustainable Resource Science*
[3]*Graduate school of Bioagricultural Sciences, Nagoya University*

In recent years, fish consumption has been increasing worldwide, which is provided from natural resources and aquaculture at a ratio of around 1:1. Since feed is the most important needs in aquaculture, it is desirable to establish an evaluation system for feed development because of the wide variety of feed sources and metabolic capacity depending on fish ecology. In addition, microplastics in natural fishes are also a critical problem. However, there is limited information regarding its effect on metabolic capacity of natural fish. Therefore, this study is aimed to contribute to build evaluation system for input to output metabolic response and the maintenance of biological marine resources. Here, we report the evaluation of metabolic capacity of low and high molecular weight components in fish, using solution and solid-state NMR-based metabolic profiles of feed and feces of fish, which can be sampled non-invasively and easily.

【背景・目的】我々は食品包装材などのワンウェイ・プラスチック製品を使用しているが、廃棄後に海洋流出された一部は、紫外線照射や波などの物理的衝撃によりマイクロ化され、海域に生息する生物付着と物質吸着により比重が上がり、沿岸付近の魚類からだけではなく深海に生息する魚類からもマイクロプラスチックが検出されたことが報告されている[1-3]。しかし、マイクロプラスチックが魚類の体内に侵入することによって、生じる影響についての科学的知見は少ない。そこで本研究では魚類糞便を非侵襲的にサンプリングし、プラスチックが魚類の体内に侵入した際の影響を評価した。 また、海洋資源維持に重要な魚粉に代わる新規飼料の開発が望まれていることから、我々が既に確立した飼料応答評価技術を駆使することで[4]、プラスチック入力のみならず、飼料入力に対する代謝応答を、溶液および固体NMRの糞便や飼育水等の出力プロファイルとの関係性から情報抽出する評価系構築を試みた。

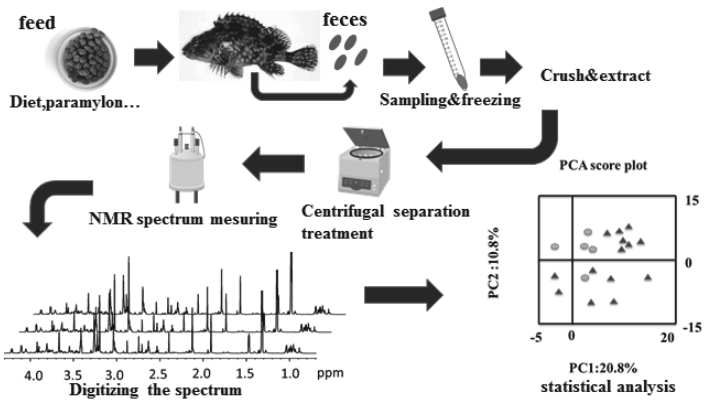


Fig. 1. Experimental scheme of this study.

非侵襲サンプリング、データサイエンス、代謝プロファイリング

○ふじむらてっぺい、さかたけんじ、きくちじゅん

【方法】 魚類のプラスチック摂食時の影響を評価するために、カサゴにPET粉末入りの人工飼料を摂食した際の糞便に加え、PET摂食前の人工飼料摂食時の糞便、PET摂食後に人工餌に戻した際の糞便試料を得た。さらに活魚7種に対して6種の飼料を摂食実験し、得られた390の糞便試料、摂食した飼料をそれぞれ凍結乾燥した後、粗粉砕し、KPi/D_2Oを用いて抽出した。溶液NMR(700 MHz)の2D-*J*res計測により水溶性低分子群を計測した。得られたNMRスペクトルを数値化し、統計計算ソフトRにより多変量解析を行い、魚類における飼料およびマイクロプラスチック入力の出力応答を評価した。

【結果・考察】カサゴへのPET混在飼料系では、時系列サンプリングした糞便抽出物をNMR計測し、得られたスペクトルを用い、PCAを行った結果、PET摂食前の人工飼料摂食時の糞便プロファイルに比べ、PET摂食時の糞便プロファイルは時系列でPC1の負の方向から正の方向に大きくばらつく傾向がみられた。しかしPET摂食後に人工飼料に戻した糞便プロファイルはばらつきが、PET摂食の前と同様に小さい傾向がみられた。

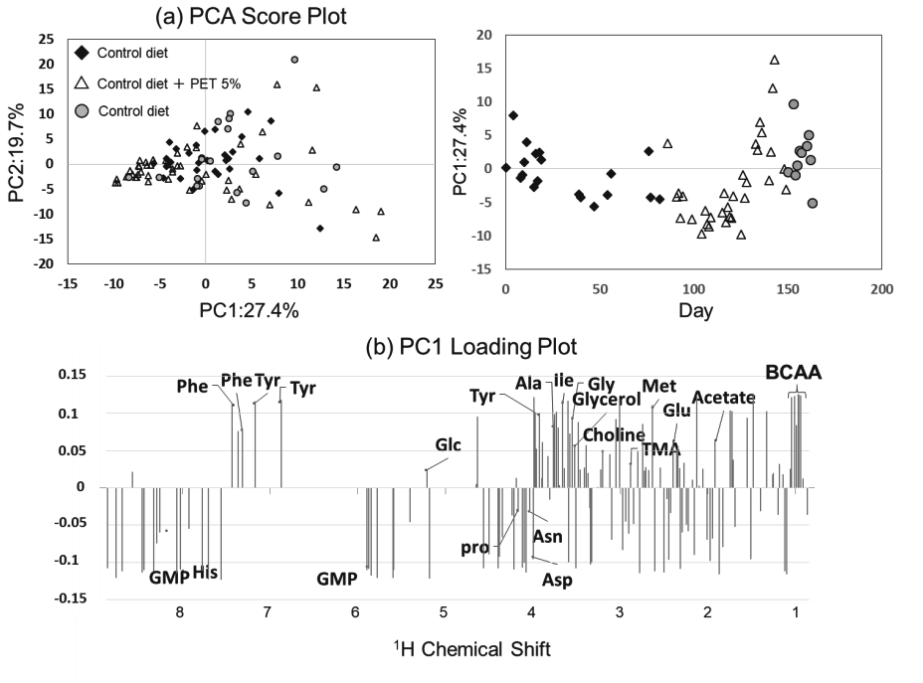


Fig.2. Profiles of the water-soluble fecal components evaluated by PCA. (a) PCA score plot, (b) PCA loading plot.

さらに魚種7種に対する飼料応答実験も、PCAを行った結果、同じ飼料を摂食した魚種でも糞便のプロファイルが異なることから、魚種毎に代謝能が異なることが示唆された。Fig.2の結果ではカサゴのPET摂食時に糞便プロファイルが少し異なることを示したが、魚種全体の糞便プロファイルの結果からはカサゴのPET摂食の有無でのばらつきは小さいことがわかった。以上のことから、糞便の水溶性プロファイルに関してはPET摂食の影響は少ない可能性が示唆された。本会ではこれらの結果に加え、糞便中における難溶性成分、固体成分等の評価も報告する。

[1] Tanaka, K., Takeda, H. *Scientific Reports* **6**, 34351 (2016)
[2] Song Ye, Anthony L Andrady. *Marine Pollution Bulletin* **22**, 12, 608-613(1991)
[3] Kubota, K., et al., *Front. Mar. Sci.* **16** (2018)
[4] Asakura, T., Sakata, K., Yoshida, S., Date, Y. & Kikuchi, J. *PeerJ* **2,** e556 (2014).

P37

データサイエンスによる肉質と魚類共生系の関係性探索

○村田泉[1]，朝倉大河[2]，菊地淳[1 2 3]
[1]横市院・生命医, [2]理研CSRS, [3]名大院・生命農

Extraction of the relationship between fish meat characteristics and symbiosis from the perspective of data science

○Izumi Murata [1], Taiga Asakura[2] ,Jun Kikuchi[1 2 3]
[1]Graduate School of Medical Life Science, Yokohama City University, Japan.
[2]RIKEN Center for Sustainable Resource Science, Japan
[3]Graduate School of Bioagricultural Science, Nagoya University ,Japan.

The Japan coast has been a biodiversity hot spot due to the rich nutrients from the tidal stream and rivers. As for seafood, there is health consciousness, no religious food restrictions, and producible without water footprint. Therefore, recent fishery namely aquaculture has become an overwhelming higher demand than land livestock. However, aquaculture fish feeds require a lot of animal proteins compared to the proportion of livestock feeds. Furthermore, attention to be made for the conversion efficiency from feeds to fish meats among from diversed fish species. The purpose of this study is to visualize the unique meat characteristics of fish by comprehensive analysis using chemical information, biological information, and physical information.

【背景・目的】日本近海は南北からの豊かな潮流と急峻な河川から注ぐ栄養塩により生物多様性のホットスポットとなっている。水産物は昨今の健康志向と宗教的食制限のないことや、生産に関わる水負荷が実質ないことから、世界的に畜肉と比較した際、圧倒的需要の向上が見受けられる。魚肉は食用蛋白源として畜肉と比較した際、天然物の割合が高いことや、飼料から魚肉への変換効率を示す増肉係数が生物学的特徴を反映して、種ごとに異なった特徴を示す。当研究室では魚類を扱った様々な情報抽出を行ってきた［1-5］。本研究では、寒流域を淡水から海水へ往復するサケ科魚類を端緒とし、魚種ごとの増肉係数の違いと腸内共生系の関係や、魚類の持つ特有の肉質を化学的情報、生物学的情報、物理学的情報を網羅的に結合させることによって可視化することを目的とした。

【方法】本研究ではサケ科を中心とする多様な魚種を使用し、まず個体から体長、体重や生殖腺重量といった表現型情報を得た。次に解剖により得られた筋組織をKPi抽出し、700 MHz-NMR装置により、Watergate、2D-*J*res、diffusion-edited及びHSQCを計測した。2D-*J*resのスペクトルはプロジェクションのピークピックにより数値化を行った。筋肉サンプルの物性情報はNMRの各種パルス系列以外にも、オートグラフにより定量した。また、サケ科を中心とする魚種の腸内細菌叢の解析のため、腸内容物から得られたDNAからPCR法にて16S-rRNA遺伝子の配列の増幅を行った後、次世代シーケンサーにより細菌叢解析を行った。全ての計測データは数値マトリックス化し、多変量解析および機械学習計算に処することとした。

共代謝、ビッグデータ解析、重要因子探索
○むらたいずみ、あさくらたいが、きくちじゅん

【結果・考察】魚類における肉質を、筋肉組織の成分や物性など、その筋肉を特徴づける性質と考え、まず、サケ科魚類特有の肉質を評価が可能か検証するために、分類上サケ科と大きく異なるウナギ目、タラ目、フグ目、スズキ目の筋組織を対象とし、2D-*J*resをもとに比較を行った。NMRデータを用いて主成分分析による解析を行った結果、第1主成分はシグナルの全強度に依存したが、第2、第3主成分においてサケ科魚類に特徴を持つことを明らかにした (Fig. 1)。これらの特徴はグルタミン酸やリンゴ酸などの物質によって特徴づけられた。NMRによる比較が魚種間に肉質を示すことが示唆された。

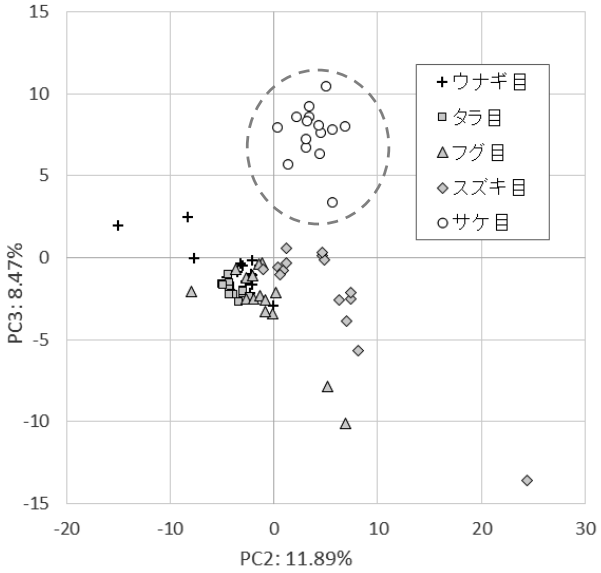


Fig. 1 Score plot by principal component analysis.

次にどのような表現型が肉質に影響を与えるかを示すため、肥満度(BMI：Body Mass Index) (体重-生殖腺重量)*1000/(体長)^{3}を算出した。2D-*J*res ピーク強度に対する肥満度との相関係数を算出した結果、いくつか物質が高い相関を示した。肥満度に何らかの影響を持つのではないかと考えた(Fig. 2)。このような NMR による成分解析に加え、筋組織の物理特性、さらに魚の腸内環境を次世代シーケンサーによって得られた腸内細菌叢の違いをもとに、肉質を示す、またはコントロールするための詳細な特徴抽出の結果について本会で議論する。

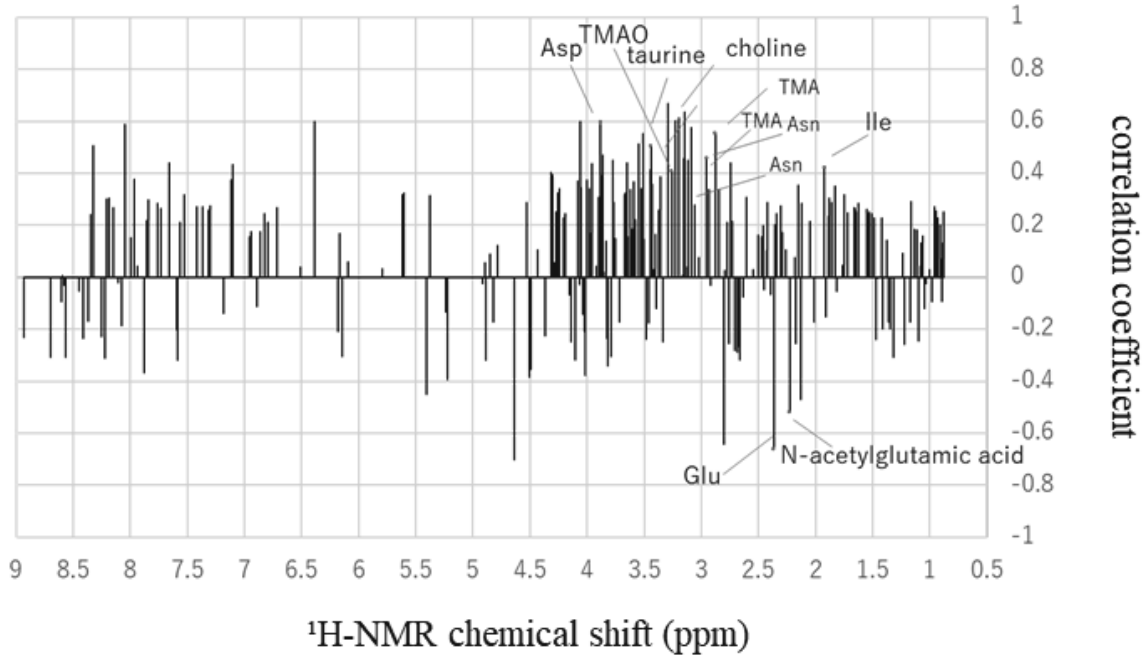


Fig. 2 Comparison of correlation coefficient of BMI and ^{1}H-NMR chemical shift.

[1] S. Yoshida et al., *Sci. Rep.* **4**, 7005 (2014). [2] Y. Date & J. Kikuchi. **90**, *Anal. Chem*. 1805 (2018).
[3] F. Wei et al., *Sci. Rep*. **8**, 3478 (2018). [4] M. Mekuchi et al., *PloS One* **13**, e0197256 (2018).
[5] T. Asakura et al., *Anal. Methods* **10**, 2160-8 (2018). [6] T. Asakura, et al., *Anal. Chim. Acta* **1037**, 230-236 (2018).

P38

成分・物性のNMR情報因子を駆使した水産餌料の最適化戦略

○朝倉 大河[1], 伊藤 研悟[1], 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

Optimization for aquatic feed using NMR spectra of ingredient and physical properties

○Taiga Asakura[1], Kengo Ito[1], 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*.

Aquaculture is one of the major protein sources for human and has a large market scale in terms of the economy. Therefore, it is desired appropriate development and research of feed, but there is few comprehensive understanding of the effects of chemical properties and physical properties on the aquaculture environment. In particular, regarding the physical properties of feed, there is little knowledge about whether dynamics such as diffusion of molecules component affects growth and water quality. By applying various pulse sequences of NMR, it is considered could be achieved that comprehensive understanding and optimization of aquaculture feed. SMOOSY (Spatial Mobility Ordered Spectroscopy) that developed in our laboratory could capture the spatial distribution of feed components diffusion. In this study, we evaluated the relationship between changes in feed components and physical properties, and changes in the dynamics of molecules due to diffusion coefficients.

【背景・目的】水産養殖は人々にとって主要な摂食タンパク源の一種であり、経済性においても大きな市場規模を持つ重要資源である。この背景から餌料の適切な開発・研究が嘱望されているが、成分及び物性が養殖環境に与える影響について包括的な理解はなされていない。特に餌料の持つ物理特性において、これらの成分分子の拡散などの動的性質が成長・水質へ与える影響などについての知見は少ない。核磁気共鳴法（NMR）はそのパルス系列を変えることで、低分子成分やその拡散などミクロな解析から構造解析や空間情報の取得などマクロな解析を行うことができる[1-6]。これらの技術を応用することで水産餌料における包括的な理解と最適化が行えると考えられた。本研究では餌料成分及び物理特性の変動と、拡散係数及び飽和移動による分子の動的作用における変動の関係性を評価する。これらの情報を統合し、機械学習法による餌料の成分及び物理特性の最適化アルゴリズム構築を試みることとした。

【方法】本研究では現在養殖に使用される固形飼料またはゲル状試料などをサンプルとし各種パルス系列で測定した。パルス系列は成分の解析を目的として、水画分抽出を行った溶液^{1}H及びHSQC計測及び、代謝物の深度分布を計測する

aquaculture, molecular mobility, machine learning machine learning
○あさくら たいが，いとう けんご，きくち じゅん

Chemical Shift Imaging (CSI)に加え当研究室で開発された、HR-CSIのパルス系列に、DOSYのパルス系列を印加することで代謝物の拡散現象の深度分布を捉えることを可能にしたSpatial Mobility Ordered Spectroscopy (SMOOSY) 計測を行った(Ito *et al*., to be published)。CSI及びSMOOSYは5 mmのNMR管に飼料領域層と水領域層を作り、境目を中心となるように上下1 cmずつの範囲で3次元測定を行った。

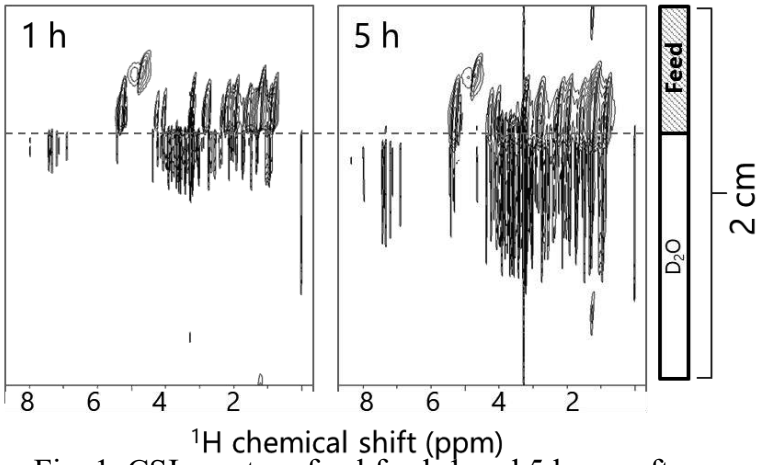


Fig. 1. CSI spectra of gel feed. 1 and 5 hours after adding the sample to the NMR tube.

【結果・考察】CSIによって測定した結果、時系列に従って飼料層の成分が水層へと拡散する様子が見て取れた (Fig. 1)。飼料層では脂質などの高分子成分が強く表れ、低分子成分のシグナルが抑えられたが、水槽へは低分子成分が拡散することでシグナル強度が上昇した。飼料層に表れる成分は飼料よって大きく異なり、固形飼料では飼料層にタンパク質・糖の領域に強く表れたが、低分子成分が水層で強調される現象は飼料間で一致した。SMOOSY計測を行った結果、CSIの深度分布に加え、成分の拡散係数を得ることが可能であった (Fig. 2)。また、ゲル状飼料にいくつかの高分子を添加することで拡散する成分や範囲に変化が見られた。これらの計測により物理的な特性を数値情報として得ることで、新しい効率的な飼料の最適化法への応用が考えられた。本会ではこれらの情報を用いて機械学習によって最適化を試みた結果について議論する。

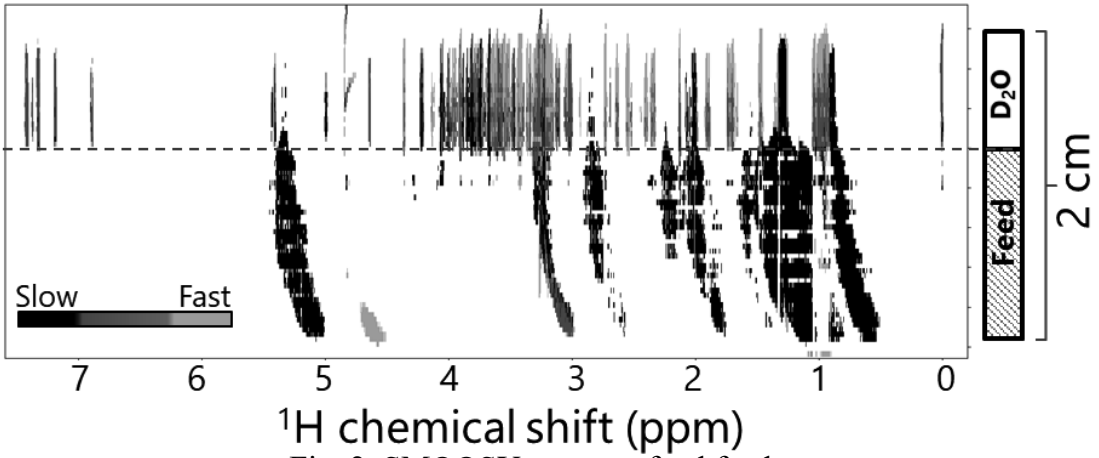


Fig. 2. SMOOSY spectra of gel feed.

【参考文献】

[1] S. Yoshida et al., *Sci. Rep.* **4**, 7005 (2014).
[2] Y. Date & J. Kikuchi. **90**, *Anal. Chem*. 1805 (2018).
[3] F. Wei et al., *Sci. Rep*. **8**, 3478 (2018).
[4] M. Mekuchi et al., *PloS One* **13**, e0197256 (2018).
[5] T. Asakura et al., *Anal. Methods* **10**, 2160-8 (2018).
[6] T. Asakura, et al., *Anal. Chim. Acta* **1037**, 230-236 (2018).

P39

1D-MRIと疑似スペクトル画像法による魚肉の多変量解析

○魏菲菲[1]，伊藤研悟[1]，坂田研二[1]，朝倉大河[1]，菊地淳[1,2,3]
[1]理研CSRS　[2]横市大院・生命医　[3]名大院・生命農

Fish muscle characterization using 1D-MRI and pseudo-spectral method

○Feifei Wei[1], Kengo Ito[1], Kenji Sakata[1], Taiga Asakura[1], Jun Kikuchi[1,2,3]
[1]RIKEN CSRS, Yokohama, Japan; [2] Grad. Sch. Med. Life Sci., Yokohama City Univ., Yokohama, Japan; [3] Grad. Sch. Bioagr. Sci., Nagoya Univ., Nagoya, Japan.

NMR experiments with 1D spatial encoding are not so common even though they provide data that are spatially resolved along the sample depth-profile, which could provide detail information on the microstructure of organism samples. In the present study, the NMR relaxation times, diffusion coefficients and chemical shifts of fish muscle samples were analyzed along its 1D-concentration profile to obtain spatially resolved information on the physical and chemical characterization. By using multivariate analysis, significant spatial differences of chemical shift profiles were observed between the red and white muscle tissues, which indicated the 1D MRI may be a powerful tool to evaluate the fish muscle based on its species diversity.

【背景】NMR イメージング (MRI) 法は核磁気共鳴現象を利用し，試料中原子核の密度や運動性の空間特徴を取得する手法であり，形態・生化学的情報を同時に収集することができる。パルス磁場勾配 NMR を用いて観測原子核の Z 軸方向沿いの空間分布や運動性特徴を取得する手法は一次元 (1D) MRI とも呼ばれる。1D MRI 手法を利用した研究例として、水の多孔質体材料への浸潤過程の追跡 (1) や、エマルジョンの粒子サイズ評価 (2)、^{7}Li 電池中の電荷キャリアの空間分布 (3) などが挙げられ、生体試料への応用例はまだ少ない。筋肉組織などの生体試料は様々な生理機能を発揮するために複雑な化学組成と微細構造を示す。一方、その化学的な組成および物理的な微細構造が食品、特に肉類の呈味や食感などのファクターと繋がると考えられる。NMR を用いた魚類筋肉に関する研究は主に二つに大別され：魚肉の抽出物で代謝物プロファイルを取得する (4)；あるいはインタクトで観測コイル範囲内の組織の平均化した結果で組成や運動性を評価する手法である。cm 範囲内でも不均一性を有する魚類筋肉試料に対して、さらに微細構造に応じた物理化学特性を評価する必要があるものの、このような NMR 研究例は未だ報告されていない。本研究では 1D MRI の手法を開発し、魚類筋肉組織の微細構造や化学組成の空間特徴を示し、従来の抽出溶液データと比較することで、新たな魚肉の評価法創成を狙うこと

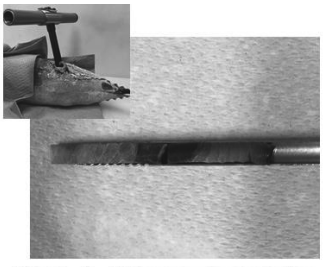


Figure 1. Fish muscle samples used in the 1D MRI

肉質、組織内緩和、CSI
○うぇい　ふぇいふぇい、いとう　けんご、さかた　けんじ、あさくら　たいが、きくち　じゅん

とした。

【方法】日本の河川、近海の天然魚から図 1 で示すコアサンプラーで冷凍状態の魚肉組織を採集し、そのまま 100 μl の KPi (1mM, D_2O) を入れた NMR 試料管に挿入し、NMR 観測に用いた。Bruker Avance III 500 MHz の NMR 装置で 5 つのイメージングパルスシーケンス(図 2:プロトン密度強調像 (PDWI)、縦緩和強調像 (T1WI)、横緩和強調像 (T2WI)、拡散強調像 (DWI) およびケミカルシフト画像 (CSI)) を開発・整備し、魚肉の 1D MRI に応用した。

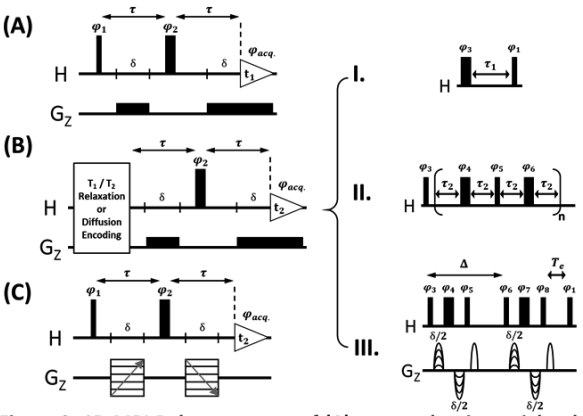


Figure 2. 1D MRI Pulse sequence of (A) proton density weighted imaging (PDWI); (B)I. T1 weighted imaging (T1WI), II. T2 weighted imaging (T2WI) and diffusion weighted imaging (DWI); (C) chemical shift imaging (CSI).

【結果・考察】MRI と同じように魚肉 の 1D PDWI、T1WI、T2WI、DWI はそれぞれ魚肉組織内の Z 方向空間位置に沿ったプロトン密度や、緩和および水分子拡散運動性の特徴を示した結果が得られた。NMR 分光計では計測パルスシーケンスを目的に応じて自由に編集できるメリットがあり、一般的な MRI では観測不可な魚肉の CSI の一例は図 3 で示されている。ウルメイワシの筋肉組織の CSI では、赤筋（上）と白筋（下）の組織的なケミカルプロファイルが異なることが明らかになった。さらに、魚肉組織の空間分布特徴を抽出するため、Z 軸方向のケミカルプロファイルを主成分分析法を用いて多変量解析を行ったところ、図 4 で示されたような二つの集団にプロットされた。右上の赤筋集団に Z 方向の観測中心より上の位置が集中され、PC2 の負方向の白筋集団には Z 方向の観測中心より下の位置が集中された。

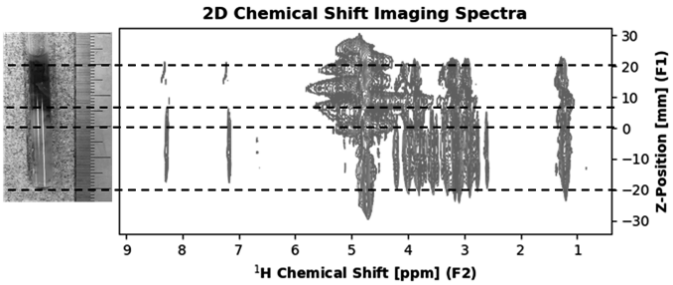


Figure 3. 2D CSI of fish muscle (*Etrumeus teres*)

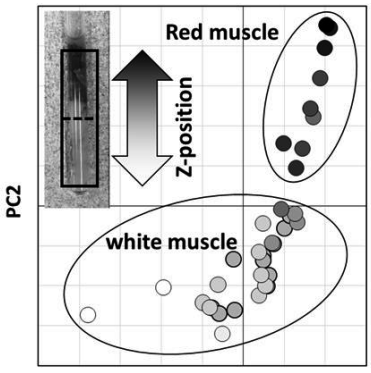


Figure 4. PCA score plot of fish muscle CSI (colored by Z-position).

このような手法を用いることで、赤筋・白筋という異なる筋肉タイプの空間分布のほか、視認では区別がつきにくい化学特徴と空間位置が結び付くことも期待できる。1D MRI は魚類筋肉特徴評価の新しい手法として期待でき、本会では多種の魚類の筋肉評価に展開し、多変量解析法を活用した結果を議論したい。

【参考文献】

(1) Feunteuna, S. L., et al., ***Magn Reson Imag,*** 2011, 29, 443.
(2) McDonald, P. J., et al., ***Phys Rev E,*** 1999, 59, 874.
(3) Klamor, S., et al., ***Phys Chem Chem Phys***, 2015, 17, 4458.
(4) Wei, F., et al., ***Sci. Rep***., 2018, 8:3478.

P40

NMR スペクトルを指標としたアミロイド β42 凝集阻害物質の探索

今前田　大朗[1]，久米田　博之[2,3]，久保　研二[4]，渡邉　輝[4]，倉賀野　正弘[4]，相沢　智康[2,3]，関　千草[4]，中野　博人[4]，徳樂　清孝[4]，◯上井　幸司[4]
（[1]室蘭工業大学応用理化学系学科，[2]北海道大学大学院　先端生命科学院，[3]北海道大学大学院　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，[4]室蘭工業大学大学院工学研究科）

Exploring the amyloid-beta aggregation inhibitors under the guidance of NMR spectroscopy

Taro Imamaeda[1], Hiroyuki Kumeta[2,3], Kenji Kubo[4], Hikaru Watanabe[4], Masahiro Kuragano[4], Tomoyasu Aizawa[2,3], Chigusa Seki[4], Hiroto Nakano[4], Kiyotaka Tokuraku[4], ◯Koji Uwai[4]
[1]Department of Applied Sciences, Muroran Institute of Technology, [2]Faculty of Advanced Life Science, Hokkaido University, [3]Global Station for Soft Matter, GI-CoRE, Hokkaido University, [4]Graduate School of Engineering, Muroran Institute of Technology

The nerve cell death due to the neurotoxicity of amyloid-beta (Aβ) aggregates in the patient's brain is thought to be one of the basic pathogenesis of Alzheimer's disease. Therefore, it is expected to take a drugs and food containing Aβ aggregation inhibitors to be a prevention method. In this study, STD-NMR method was applied to observe the interaction between Aβ and active compounds in the several extracts of natural resources, and we tried to purify them in accordance with the ^{1}H-NMR signals found in STD-NMR spectra. Among them, we found that rosmarinic acid, well-known as a Aβ aggregation inhibitor contained in *Lamiaceae* family, was shown the interaction with Aβ in STD-NMR spectra. Additionally, we purified two active compounds from willow (*Salix sachalinensis*) including the dihydromyricetin which was also purified under the guidance of *in vitro* Aβ aggregation inhibitory activity test and another compound in accordance with the ^{1}H-NMR signals found in STD-NMR spectra.

認知症患者のうち半数以上はアルツハイマー型 (AD) であり，2050 年にはその患者数は全世界で 1 億 5,200 万人に増加すると予測されている．現在，我が国で承認されている AD 治療薬は，脳の神経細胞間の情報を伝達する神経伝達物質を制御することで作用しており，病気の進行に変化を与えるものではないため，修飾治療薬の開発が喫緊の課題となっている．AD 発症のメカニズムには未だ不明な点が多く，様々な要因が指摘されているが，現在有力視されているものの一つに，アミロイドカスケード仮説がある．これは，アミロイドβ(Aβ)と呼ばれるおよそ 40 残基のタンパクが脳内で凝集することで形成されるオリゴマーや線維が直接神経細胞死を誘導すると共に，Aβ 凝集後に続いて起こるリン酸化タウ凝集を要因とする神経原線維変化により，シナプス機能

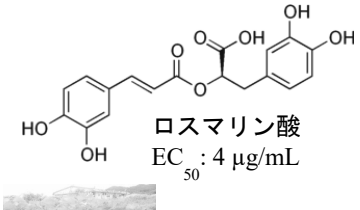
キーワード：STD-NMR, アルツハイマー病, アミロイド-β

いままえだたろう，くめたひろゆき，くぼけんじ，わたなべひかる，くらがのまさひろ，あいざわともやす，せきちぐさ，なかのひろと，とくらくきよたか，◯うわいこうじ

不全や神経細胞の脱落が引き起こされるという仮説である．Aβの凝集を起点とするため，それを抑える物質が AD の予防や治療の鍵となると期待され，世界的にその探索が進められている．

これまでに天然物の抽出物の中から多くのAβ凝集を阻害する物質が報告されているが，これらは主に抽出物を分画する度に，各画分を ThT 法などAβ凝集に伴い形成されるβ-シート構造を認識する色素法でAβ 凝集阻害活性を評価し，その繰り返しにより目的化合物を単離・構造決定する煩雑な手法により見出されて来た．本研究では，より簡便に目的化合物を得るために，Aβと抽出物の相互作用を STD-NMR 測定により観測し，得られたシグナルを指標に精製を試みた．

はじめに本法により Aβと既知の Aβ凝集阻害植物抽出エキスであるアオジソ抽出物（EC_{50}: 24.5 μg/mL）の混合物を STD-NMR 測定し，適用性を検討した．その結果，シソ科ハーブに多く含まれるロスマリン酸（Fig.1a）が抽出物（Fig.1b）の中で Aβと結合する物質として観測された（Fig.1c, d）．実際にロスマリン酸は Aβ凝集阻害物質として知られている（EC_{50}: 4 μg/mL）．



ロスマリン酸
EC_{50}: 4 μg/mL



EC_{50}: 24.5 μg/mL

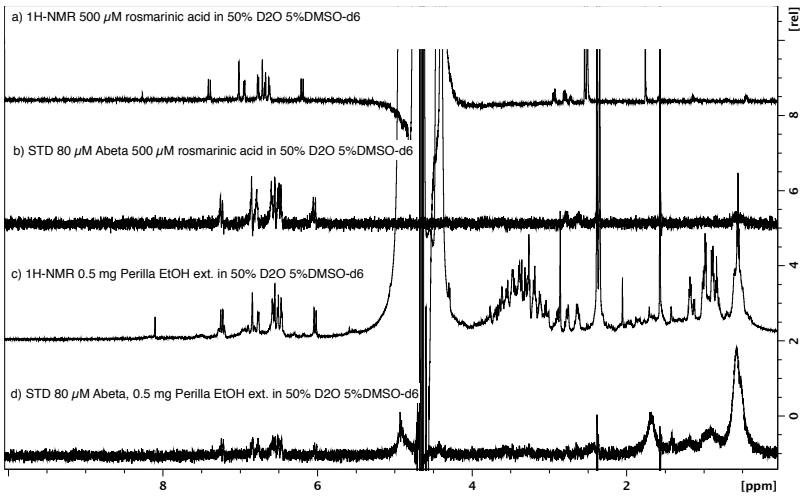
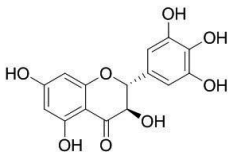


Fig.1 ^{1}H- and STD NMR spectra of rosmarinic acid (a, b) and perilla EtOH extract (c, d)

次に，オノエヤナギ (*Salix sachalinensis*, EC_{50}= 10 μg/mL) の活性成分を，Aβ凝集阻害活性を指標として単離し，ジヒドロミリセチン (EC_{50}= 8 μg/mL, Fig. 2a) と同定した．ジヒドロミリセチンは，STD-NMR スペクトル (Fig. 2b) によっても，Aβ と相互作用することが支持された．オノエヤナギ EtOH 抽出物と Aβ混合物の STD-NMR スペクトル (Fig. 2d) では，ジヒドロミリセチン以外の相互作用物質も観測された．そこで，このシグナルを指標に分画を試み，単一の化合物を得た．



ジヒドロミリセチン
EC_{50}= 8 μg/mL



EC_{50}= 10 μg/mL

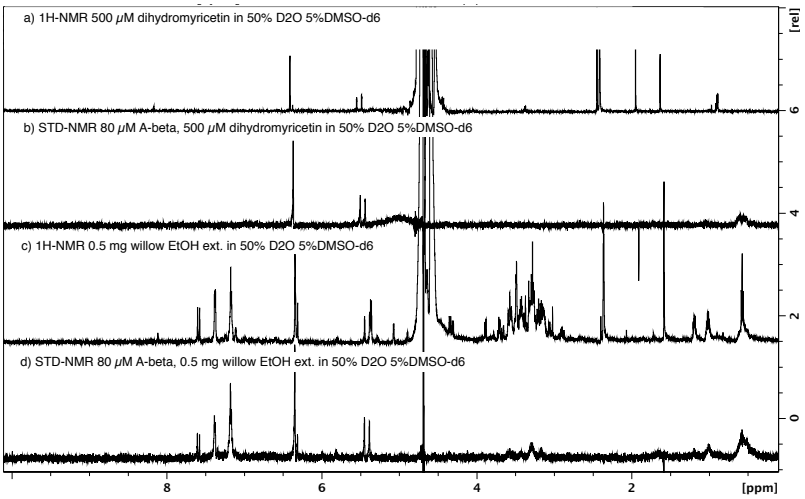


Fig.2 ^{1}H- and STD NMR spectra of dihydromyricetin (a, b) and willow EtOH extract (c, d)

P41

完全重水素化シクロデキストリンの化学酵素合成と糖脂質のＮＭＲ解析

○山口芳樹[1,2]、眞鍋史乃[1]、Peter Greimel[1]，伊藤幸成[1]
1理研
2東北医科薬科大

Chemoenzymatic synthesis of completely deuterated cyclodextrins and its application to NMR analysis of demicellized glycolipids in aqueous solution

○Yoshiki Yamaguchi [1,2], Shino Manabe [1], Peter Greimel [1], Yukishige Ito [1]
1 RIKEN
2 Tohoku Medical and Pharmaceutical University

Hydrophobic molecules such as lipids, including sterols, or low molecular weight drugs are difficult to solubilize in water due to their tendency to form aggregates like micelle. Aggregation may profoundly affect the interaction of these molecules with their respective binding proteins. Cyclodextrins (CD) can trap amphiphilic molecules inside their hydrophobic cavity, effectively acting as a transporter as well as prevent micellization. Our idea is that demicellization of hydrophobic molecules by CD will provide more detailed structural information by NMR due to their increased tumbling rate. Here we report characterization of CD-lipid complexes, utilizing lysophosphatidyl-*myo*-inositol (LysoPtdIns) and lysophosphatidyl β-D-glucoside (LysoPtdGlc) as model lipids. Both model lipids have been reported to act as putative ligands for G protein coupled receptor (GPR) 55, which has been associated with pain sensation. To reduce complexity of NMR spectral data resulting from the overlap of signals originating from CD and the complexed molecule, we chemoenzymatically synthesized completely deuterated CDs from deuterated glucose. Herein, we will report the advantages of deuterated CD for NMR analysis.

Solution NMR analysis of hydrophobic or amphiphilic molecules, such as phospholipids and cholesterol, are in general conducted in organic solvents, such as chloroform, methanol and dimethyl sulfoxide. Conformational analysis of the fully hydrated, native like state, however, require aqueous solution as NMR specimen to preserve physiological relevant interactions, such as hydrogen bonds. NMR analysis of hydrophobic biomolecules in aqueous solution is hampered by their inherently low solubility in water and strong tendency to aggregate, forming micelles or vesicles. Furthermore, aggregation likely profoundly affects intermolecular interaction, specifically with their respective binding proteins, rendering elucidation of solubility limits and critical micellar concentration (CMC) important for the design of biological assay.

One solution to prevent micellization is to use CD which can trap amphiphilic molecules inside its hydrophobic cavity. Due to its unique encapsulation capability, CD is widely used as adjuvant to enhance the bioavailability of drugs. We envisaged that demicellization of hydrophobic and amphiphilic molecules by CD will not only provide comprehensive structural information due to the increased tumbling rate, but also allow conformational analysis under fully hydrated, physiological condition by solution NMR. Here we

シクロデキストリン、重水素化、糖脂質

○やまぐちよしき、まなべしの、ぺーたーぐらいめる、いとうゆきしげ

report the characterization of CD-model lipid complexes with LysoPtdIns and LysoPtdGlc. Both lipids have been suggested as putative ligands for the class A G protein coupled receptor (GPR) 55 [1]. Additionally, better understanding of the conformational properties of these lipids are important to further characterize their structure-function relationship [2]. Initial NMR analysis was complicated by large ^{1}H-NMR signals originating from CD overlapping with the lipid head group signals of glucose or inositol. To avoid this NMR spectral complexity, we chemoenzymatically synthesized completely deuterated CD and demonstrate the advantage of deuterated CD for the conformational analysis of trapped molecules.

To this end, we envisaged to utilize cyclodextrin-glucosyltransferase (CGTase) and α-glucosyl fluoride donors. Completely deuterated α-glucosyl fluoride, α-D-[1,2,3,4,5,6,6-$^{2}H_{7}$]glucopyranosyl fluoride, was prepared successfully from commercial deuterated glucose and was obtained after two steps. α-D-glucopyranosyl fluoride was accepted by *B. circulans* CGTase as a substrate with a K_m = 32.5 mM and k_{cat} = 333 s^{-1} [3], providing completely deuterated CDs. We monitored the reaction *in situ* by ^{13}C-NMR with ^{2}H-decoupling. During CD formation, the anomeric C1 signal exhibited an explicit shift and loss of ^{19}F coupling. Furthermore, an additional ^{13}C signal appeared at ~80 ppm, which was assigned to C4. These spectral changes facilitated monitoring of reaction progress and of reaction completion during this enzymatic reaction.

Finally, with deuterated CDs in hand, we conducted NMR analysis of LysoPtdIns in aqueous solution. Addition of deuterated β-CD (2 eq) to 1 mM micellar LysoPtdIns sharpened the NMR signals in the absence of intense β-CD signals (Fig. 1). This observation suggests that deuterated β-CD can trap LysoPtdIns. Due to the absence of intense NMR signals derived from β-CD, demicellized LysoPtdIns can be analyzed in detail. Pure shift NMR spectrum of the LysoPtdIns-β-CD complex clearly indicates the heteronuclear $^{3}J(^{31}P,^{1}H)$ coupling (8 Hz) between inositol H1 and phosphorus, allowing to determine the P-O-C1-H1 dihedral angle following the Karplus equation.

In summary, we successfully synthesized completely deuterated CDs and showed its benefit in NMR analysis of model lipids. We suggest that the use of deuterated CD is an alternative and powerful method to analyze glycolipids and other insoluble molecules in aqueous solution.

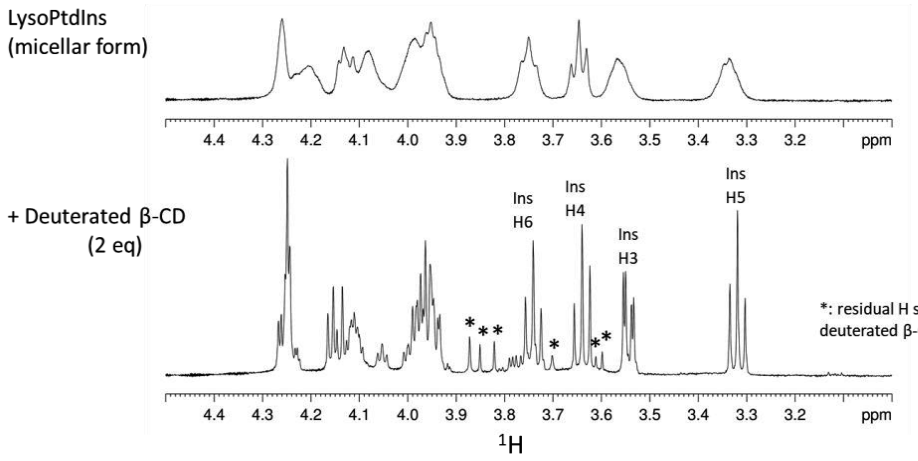


Fig. 1. ^{1}H-NMR spectra of 1 mM LysoPtdIns in micellar form (upper) and in the presence of deuterated β-CD (lower).

References

[1] A. T. Guy, Y. Nagatsuka, N. Ooashi, M. Inoue, A. Nakata, P. Greimel, A. Inoue, T. Nabetani, A. Murayama, K. Ohta, Y. Ito, J. Aoki, Y. Hirabayashi, H. Kamiguchi, *Science* 2015, 349, 974-977.

[2] A. T. Guy, K. Kano, J. Ohyama, H. Kamiguchi, Y. Hirabayashi, Y. Ito, I. Matsuo, P. Greimel, *ACS Chem. Neurosci.* 2019, 10, 716-727.

[3] R. Mosi, S. He, J. Uitdehaag, B. W. Dijkstra, S. G. Withers, *Biochemistry* 1997, 36, 9927-9934.

P42

^{31}P-NMRを用いたナノディスクの組成解析

○中村光咲[1]，杉木俊彦[2]，藤原敏道[2]，児嶋長次郎[1,2]
1 横浜国立大学・大学院　理工学府
2 大阪大学　蛋白質研究所

Quantitative analysis of lipid composition of nanodisc by ^{31}P-NMR

○Misaki Nakamura [1], Toshihiko Sugiki[2], Toshimichi Fujiwara[2], Chojiro Kojima[1,2]
1 *Graduate School of Engineering Science, Yokohama National University*
2 *Institute for Protein Research, Osaka University*

Nanodisc is an artificial and water-soluble lipid bilayer with disk shape. It consists of about eighty lipids and two molecules of membrane scaffold protein MSP, and is used widely for, such as solubilization of membrane protein and protein-lipid interaction analysis. In general, the quantitative analysis of the lipid composition of nanodisc is difficult, but ^{31}P-NMR is known as a powerful tool for such quantitative analysis (Kobashigawa Y. *et al*., Anal Biochem 410, 77-83 (2011)). Here, we applied the ^{31}P-NMR to the quantitative analysis of the lipid composition of nanodiscs to establish the protocol to prepare the nanodisc with appropriate lipid composition. We found the ratio of the lipid composition can be precisely determined by ^{31}P-NMR with less than 0.4% error and it varied with each lot of sample.

［序論］

ナノディスクは円盤状の可溶性人工二重膜である。2分子の膜骨格蛋白質と約80分子の脂質からなっている。ナノディスクは膜蛋白質の可溶化や蛋白質-脂質相互作用解析に広く用いられている。複数のリン脂質を含むナノディスクの脂質組成を定量的に解析するのは容易でないが、小橋川らの先駆的な研究によって^{31}P-NMRが脂質組成の定量解析に有効であることが示唆されている(1)。そこで、本研究では^{31}P-NMRによる脂質組成定量法を用い、様々な条件で作成したナノディスクの脂質組成の定量解析を行った。

［実験］

脂質はAvanti Polar Lipidsから購入し、MSP1D1は大腸菌発現系で調製した。ナノディスクはAlsanousiらが確立したプロトコル(2)に基づいて調製した。ナノディスクの初期混合脂質量比は、DOPC 100%、DOPC : PI(4)P ＝ 95 : 5、DOPC : DOPE : DOPS : PI(4)P ＝ 66.6 : 24.2 : 4.2 : 5(3)（mol%）であり、それぞれをDOPCナノディスク、PI(4)Pナノディスク、ゴルジ膜様ナノディスクと呼称する。脂質をナスフラスコの中で混合し、エバポレーターと凍結乾燥機を用いて溶媒を除去した。界面活性剤を含むbufferで脂質を懸濁し、MSP1D1と脂質の比が1 : 40になるようにMSP1D1を加え、4℃で1～2時間回転混合した。界面活性剤を除くためにBio beadsを加え、さらに4℃で4時間回転混合した後、ゲルろ過にて均一な大きさのナノディスクを得た。得られたナノディスクを22-50 μMに濃縮してNMR測定を行った。

ナノディスク、^{31}P-NMR

○なかむらみさき、すぎきとしひこ、ふじわらとしみち、こじまちょうじろう

［結果・考察］

PI(4)Pナノディスクを同じプロトコールで2回調製した。1回目に調製したPI(4)Pナノディスクの^{31}P-NMRのスペクトルをFig. 1(a)に、2回目に調製したPI(4)Pナノディスクの^{31}P-NMRスペクトルをFig. 1(b)に示す。文献(1)から、-0.9 ppmのピークがDOPC由来、4.1 ppmのピークがPI(4)P由来のピークと帰属された。１回目のPI(4)P含有量は3.5%、2回目のPI(4)P含有量は0.38%であることから、当初の混合比5%を下回るばかりか、調製毎に10倍ものPI(4)P含有量の差が生じていたことが分かった。このPI(4)P含有量の差がゲルろ過や生化学実験で顕著な差として検出できなかったことと、0.38%という微量のPI(4)Pが定量的に検出できたことから、^{31}P-NMRはナノディスクの脂質組成を定量的かつ高感度に評価するための極めて優れた手法であると考えられる。

ゴルジ膜様ナノディスクの^{31}P-NMRのスペクトルをFig. 1(c)に示す。PI(4)Pナノディスクと同様に-0.9 ppmにDOPC由来のピークが、4.1 ppmにPI(4)P由来のピークが確認された。ゴルジ膜様ナノディスクは、DOPC : DOPE : DOPS : PI(4)P ＝ 66.6 : 24.2 : 4.2 : 5 の混合量比で作成し、-0.5 ppmのピークをDOPE由来、0.1 ppmのピークをDOPS由来と帰属した。この帰属に基づいた31P-NMRシグナルの定量から、調製したゴルジ膜様ナノディスクの脂質組成は DOPC：DOPE：DOPS：PI(4)P＝58.1：31.9：4.5：5.4 であった。想定していた混合比とは少し異なるものの、4種類の脂質全てを検出・定量することができ、また、PI(4)Pが1 μM以下であるにも関わらず検出できたことから、複雑な脂質組成であっても定量的かつ高感度な検出が可能であることが分かった。

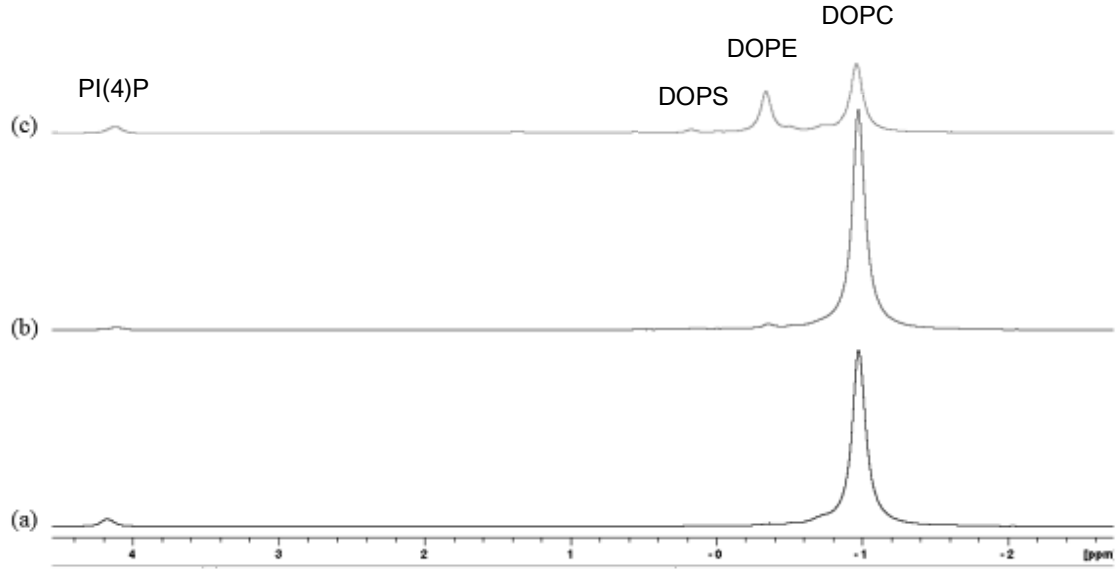


Fig. 1. ^{31}P-NMR spectra of (a) PI(4)P-containing nanodisc (rot #1), (b) PI(4)P-containing nanodisc (rot #2), and (c) Golgi membrane-mimetic nanodisc.

［参考文献］

(1) Kobashigawa Y. *et al*., Phosphoinositide-incorporated lipid–protein nanodiscs: A tool for studying protein–lipid interactions, Anal Biochem 410, 77-83 (2011).

(2) Alsanousi N., NMR study of structure-activity relationship of the biologically active peptide Humanin and the membrane binding protein CERT, Doctoral thesis, Osaka University, doi: 10.18910/59519 (2016).

(3) Sugiki T. *et al*., Structural basis for the Golgi-association by the pleckstrin homology domain of the ceramide trafficking protein CERT, J Biol Chem, 287, 33706–33718 (2012).

P43

水溶液中の重原子イオンの希釈−濃縮シフトに影響を及ぼす相対論的効果の研究

○佐藤立樹[1]、田崎健太[1]、横山拓海[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

Relativistic effects for the dilution-inspissation shifts observed on heavy atoms in aqueous solutions

○Tatsuki Sato [1], Kenta Tasaki [1], Takumi yokoyama[1], Naoya Nakagawa [1], Daisuke Kuwahara[1]
[1]*Graduate School of Informatics and Engineering, The University of Electro-Communications*

In 1967, Nakagawa et al. [1] presented the article on the NMR chemical shifts for heavy atoms. This was the first study for the NMR chemical shifts generated by spin polarization due to heavy atoms. In addition, the NMR chemical shifts were the first relativistic effects found in chemistry. Following this pioneer work, there have been considerable researches on the calculations for the relativistic effects on the NMR chemical shifts. However, the relativistic effects have not been thoroughly investigated experimentally. In this work, we measured the chemical shifts for metallic ions in water solutions of various metallic nitrates and metallic halides. The NMR measurements were performed at a lot of concentrations from the conditions diluted to measurable limit to saturated conditions. We elucidate that the chemical-shift changes between the diluted and saturated conditions arise from relativistic effects based on the spin polarization.

１．序論

1967 年に中川等[1]は、重原子によるスピン分極シフトについての学会発表をはじめて行った。のちに Pekka Pyykko[2]が 2000 年代にまとめたように、その発表は化学の分野における相対論的効果の初めての研究として有名になった。本研究では、様々な金属水和物中の金属イオンに対して NMR 測定を行い、化学シフトの濃度変化に影響を及ぼす（スピン分極等の）相対論的効果の研究を行った。スピン分極とは NMR 信号に影響を及ぼす代表的な相対論的効果で、重原子および、重原子と共有結合している原子に発現し、その効果は原子番号とともに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金属イオンについて、無限希釈状態から飽和状態にかけて化学シフトを測定し、化学シフト変化量を原子番号、常磁性遮蔽効果、反磁性遮蔽効果、相対論的効果等を考慮して理論的に解析した。

２．方法

最初に濃度約 15%の重水を作成した。この重水に第 2 周期から第 6 周期に含まれる様々な金属化合物（硝酸塩とハロゲン化合物）を溶かして試料溶液を作成し NMR 測定を行った。試料の濃度は 12.0mol/kg から 0.1mol/kg のあいだであった。NMR スペクトルはすべて single pulse あるいは Hahn echo を用いて測定した。積算に関しては、濃度の薄い試料は濃度の濃い試料と同等の感度が得られるまで積算を行った。また、量子化学計算ソフト Gaussian を用いて、各種金属水和物の構造最適化計算、結合エネルギーの計算等を行った。

重原子、化学シフト、相対論的効果

○さとうたつき、たさきけんた、よこやまたくみ、なかがわなおや、くわはらだいすけ

3. 結果および考察

Figure 1 に各種金属硝酸塩水溶液の「希釈-濃縮シフト変化」（DI (dilution-inspissation)シフト変化）を示す。DI シフト変化とは、無限希釈の状態と飽和状態で観測される化学シフトの間の変化のことである。横軸は原子番号、縦軸（ppm）は DI シフト変化を示している。一般にスピン分極はスピン軌道相互作用（SO）に比例し、SO 効果は原子番号 Z の 4 乗に比例するため、原子番号が大きくなるにつれて DI シフト変化も大きくなると考えられる。Figure 1 からは、金属核のほとんどが理論通りに原子番号に比例して大きな DI シフト変化をしていることが分かるが、セシウムだけ例外的に小さな変化を示している。これはセシウム水和物の価電子分子軌道中に含まれる s 軌道・p 軌道成分と HOMO-LUMO 間エネルギー差が、他の核種とは大きく異なるためであると考えられる。

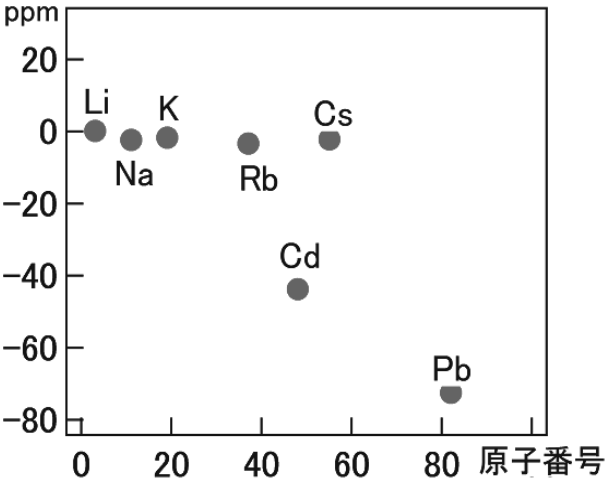


Figure 1. Chemical-shift changes for metallic ions in water solutions of various metallic nitrates. The chemical-shift changes from the conditions diluted to measurable limit to saturated conditions were measured.

Figure 2 には各種ハロゲン金属化合物水溶液の金属核の DI シフト変化を示す。Figure 2 を見ると金属硝酸塩の場合と同様に、原子番号の増加に伴って DI シフト変化が大きくなっていることが分かる。我々は、HALA（Heavy Atom Light Atom）効果で顕著に見られる高磁場方向へのシフト変化を予測していたが、全ての金属化合物水溶液で低磁場方向へのシフト変化（Inverse Halogen Dependence: IHD）の振る舞いが見られた。理論的には、IHD の低磁場方向へのシフトはより重いハロゲンと結合することで増大すると考えられる。しかし Figure 2 を見るとヨウ化セシウム水溶液のみ DI シフト変化が減少する結果となった。

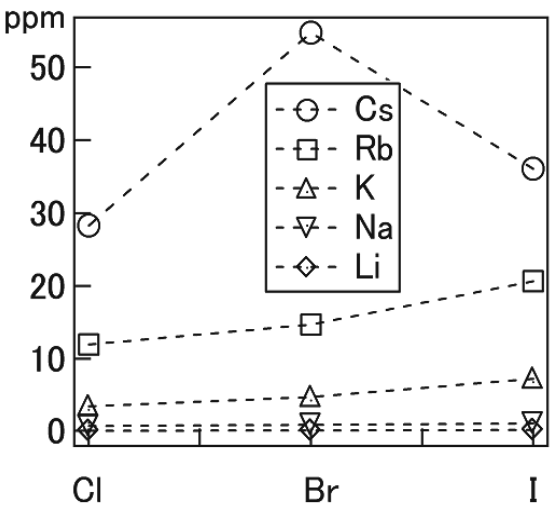


Figure 2. Chemical-shift changes for metallic ions in water solutions of various metallic halides. The chemical-shift changes from the conditions diluted to measurable limit to saturated conditions were measured.

水溶液中の各種金属核の DI シフト変化のメカニズムを解明するために、今後は量子化学計算ソフト Gaussian や Respect を用いて、各種金属イオンと水分子との結合エネルギー、遮蔽定数等の計算を行う。結果については会場にて報告する。

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.

P44

NMRによる濃厚電解液の溶液状態の解析

○木村 一雄[1]，青木 靖仁[1]，松田 景子[1]
1 株式会社 東レリサーチセンター

Analysis of solution state of concentrated electrolyte by NMR

○Kazuo Kimura [1], Yasuhito Aoki[1], Keiko Matsuda[1]
1 Toray Research Center, Inc.

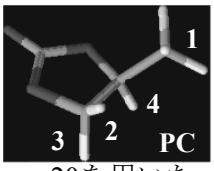
In recent years, lithium ion batteries using concentrated electrolytes have been studied vigorously in order to improve the safety and to achieve high voltage. However, structural information of concentrated electrolytes in solution state has not been analyzed so much. In this study, we tried ^{1}H and ^{13}C NMR and two dimensional NMR measurements for solvent structure analysis on electrolytes, and TD-NMR and diffusion coefficient measurements on the electrolytes for evaluation of molecular mobility. As a result, it was estimated that the concentrated electrolyte solution formed a relatively ordered solvent structure.

【諸言】

リチウムイオン電池の高電圧化と安全性確保の観点から、濃厚電解液を用いたリチウムイオン電池が有力な候補として研究されている[1)]。しかしながら、高濃度の溶液におけるリチウムイオンの溶媒和等に関する構造情報については、あまり解析が進んでいない[2)]。本研究では濃厚電解液について、溶媒構造について化学シフト値の比較および二次元NMRによる解析、分子の運動性についてTD-NMRおよび拡散係数測定を試みた。その結果、濃厚電解液では比較的秩序のある溶媒構造を形成していることが推察される結果が得られた。

【実験】

試料として$LiPF_6$をPC (Propylene carbonate) に溶解した電解液を調製した。0 mol/L, 1 mol/L, 3 mol/Lおよび5 mol/Lと濃度を変えた電解液について各種の測定を実施した。なお、3 mol/Lおよび5 mol/Lが濃厚電解液に相当する。



なお、拡散係数測定はBruker社のDiffBBプローブ、TD-NMRはBruker社のminispec mq20を用いた。

【結果と考察】

Fig.1に濃度を変えた試料について行った^{1}H NMRスペクトルおよび^{13}C NMRスペクトルを示した。スペクトルの比較から、濃厚電解液（3 mol/Lおよび5 mol/L）と1 mol/Lおよび溶媒とでは、化学シフトの変化の大きさおよび線幅が異なることがわかる。

Fig.2にTD-NMRを用いて実施したT_1緩和時間測定結果を示した。その結果、濃厚電解液では、緩和時間の極小値が観測された。このことから、濃厚電解液は溶液であるにもかかわらず分子相関時間が比較的長く、分子運動がかなり拘束された状態にあることがわかった。

次に、濃厚電解液について実施した拡散係数測定結果を示した。Fig.2より、濃厚電解液の領域では、^{1}H核、^{7}Li核および^{19}F核の拡散係数が、ほぼ等しいことがわかる。このことは、濃厚電解液

電解液、リチウム塩

○きむらかずお、あおきやすひと、まつだけいこ

では、溶媒分子やカチオン（リチウムイオン）、アニオン（PF_6^-）が一体となって互いに拘束した状態をとっている可能性が推察される。

Fig.3に通常濃度の電解液、および濃厚電解液（5 mol/L）について実施したHOESYスペクトルのスライスを示した。HOESYは、異種核間のNOEを観測する手法である。本分析では、^{31}P - ^{1}H間、および^{7}Li - ^{1}H間の相関、すなわち異種核での分子間NOE相関を得ることを目的として測定を行った。その結果、通常濃度の電解液と濃厚電解液とでは、スペクトルのパターンが異なることがわかった。特に濃厚電解液では、^{1}H核へのNOEの移り方が、^{7}Li核からと^{31}P核からとで異なることわかる。以上の結果から、拡散係数測定結果等も考慮すると、濃厚電解液では、溶液状態であるにもかかわらず秩序化したネットワーク構造を形成している可能性が考えられる。

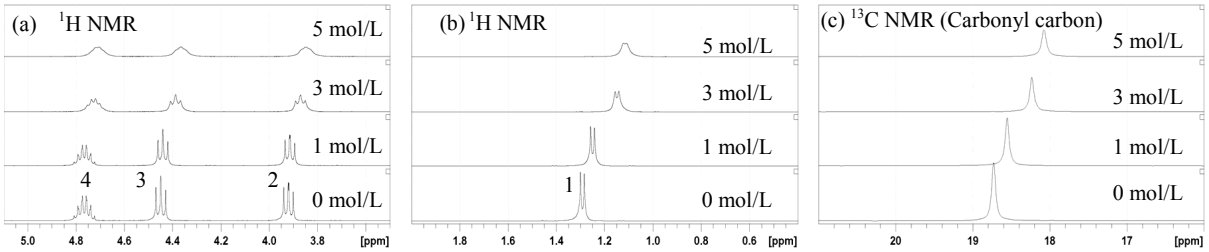


Fig.1 Chemical shift comparison. (a) and (b) are ^{1}H NMR spectra, and (c) is ^{13}C NMR spectrum.

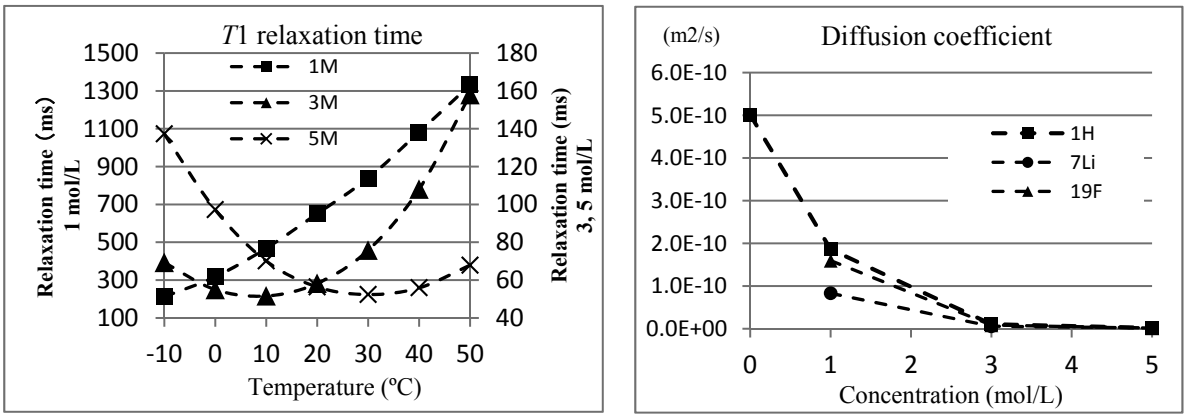


Fig.2 Left: T1 relaxation time vs temperature, obtained by TD-NMR.
Right: Diffusion coefficient vs concentration of electrolytes.

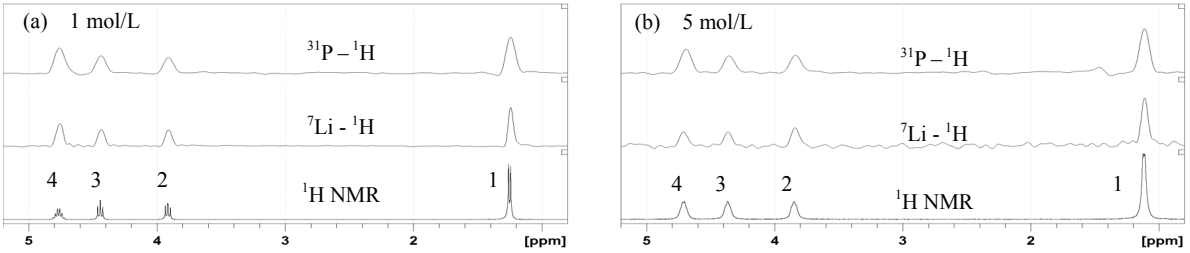


Fig.3 HOESY slice data. (a): electrolyte of 1 mol/L at mixing time of 100 ms, (b): electrolyte of 5 mol/L at mixing time of 10ms.

[1] *J. Am. Chem. Soc,* **2014**, 136, 5039-5046

[2]*J. Phy. Chem. C* **2016**, 120,17196-17204

P45

重原子を配位したキレート化合物中の原子に現れる相対論的効果の検討

○朝倉由光[1]，富岡優充[1]，中谷幸人[1]， 桑原大介[1]，中川直哉[1]
[1]電気通信大学大学院情報理工学研究科

Relativistic effects found in heavy and light atoms in chelate compounds coordinated with heavy atoms

○Yoshimitsu Asakura [1], Masamitsu Tomiaka [1], Yukito Nakatani[1], Daisuke Kuwahara [1], Naoya Nakagawa [1]
[1]Graduate School of Informatics and Engineering, The University of Electro-Communications

The NMR chemical shifts for heavy atoms in the fifth and sixth periods change depending on the concentration of the heavy atoms (and the counter anions) in the aqueous solutions [1][2]. However, such changes are not observed in the complexes of ethylenediamine (ED) and the heavy atoms, in which all coordination sites in the ligands are bonded to counter anions [2]. In this study, we measured the chemical shifts of ^{207}Pb coordinated with ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), and found that the chemical shifts of ^{207}Pb varied with concentration. The concentration change in the ^{1}H or ^{13}C chemical shifts was small compared to the variations in the ^{1}H or ^{13}C chemical-shift values, which were measured in water solutions of different EDTA compounds with heavy atoms other than ^{207}Pb. It follows from these results that EDTAs coordinated with heavy atoms significantly shows the HALA effects [4].

緒言

第5、第6周期の重原子核NMRを測定すると、水溶液の濃度および対アニオン濃度によってその化学シフト値が変化することが知られている[1][2]。一方、配位サイトがすべて結合したエチレンジアミン(ED)-重原子錯体ではこのような変化が見られない[3]。本研究では新たなキレート錯体としてエチレンジアミン4酢酸(EDTA)と配位した^{207}PbのNMRを測定し、その化学シフト値が濃度によって変化することを観測した。さらに同錯体の^{1}H, ^{13}C-NMRも測定し、これらの化学シフト値も変化することを確認した。この濃度変化は、Pb以外の重原子と結合した複数の錯体(ある同一濃度をもったの複数の錯体)の^{1}H, ^{13}C化学シフト値の変動幅と比べると小さいため、重原子と結合したEDTAはHALA効果(Heavy-Atom effects on shielding of Light Atoms) [4]が支配的に表れるキレート錯体であるといえる。よってこのような化合物は、NMRにおける相対論的効果を理論的に解明する際のモデルとして役立つと考えられる。

結果と議論

$Na_2[Pb(edta)]$を溶かした水溶液における^{207}Pbの化学シフトが、0.01mol/kg(無限希釈状態)から2mol/kg(飽和状態)にかけておよそ24ppm変化することを観測した(Fig. 1)。Pb^{2+}のもつ配位サイトはすべてEDTAによって占められているため、Pb自身が水分子と直接相互作用をしているとは考えにくい。そこでEDTAのもつ6つの配位サイトの配位相手と濃度変化の関係に注目すると、この^{207}Pb化学シフトの変化は以下の反応式に示すような$[Pb(edta)]^{2-}$のイオン構造の変化が原因であると考えられる。実験結果は無限希釈状態から飽和状態にかけてこの反応式が右へ進むことを示しているといえる。

$$[Pb(edta)]^{2-} + 2Na^{+} \rightleftarrows Na[Pb(edta)]^{-} + Na^{+} \rightleftarrows Na_2[Pb(edta)]$$

重原子効果、HALA効果、キレート錯体

○あさくらよしみつ，とみおかまさみつ，なかたにゆきと，くわはらだいすけ，なかがわなおや

次に$Na_4[(edta)]$、$Na_3[Tl(edta)]$、$Na_2[Pb(edta)]$、$Na[Bi(edta)]$をそれぞれ重水に溶かして水溶液を作成し、^1Hと^{13}Cの化学シフトを測定した。EDTA錯体に含まれる^{13}Cは三種類あるが、そのうちの一つの濃度変化を例としてFig. 2に示す。他の^{13}Cについてもこれと同様に高周波側(低磁場側)への化学シフト変化が観測された。0.01mol/kgから0.1 mol/kgにかけて最も化学シフトが変化するのは$Na_4[(edta)]$を溶かした水溶液における^{13}Cであり、次いで$[Tl(edta)]^{3-}$における^{13}Cとなっている。Na^+, Tl^+はEDTAにおける安定度定数がそれぞれ1.66、6.53と小さいため分子構造が濃度によって大きく変化しこれが化学シフトに影響を及ぼしていると考えられる。対してPb^{2+}, Bi^{3+}の安定度定数はそれぞれ18.04、27.9であり、水溶液中で安定したキレート錯体を形成しているため、EDTAの余った配位サイトに結合するカチオンNa^+の濃度依存性がシフト値を決定していると考えられる。

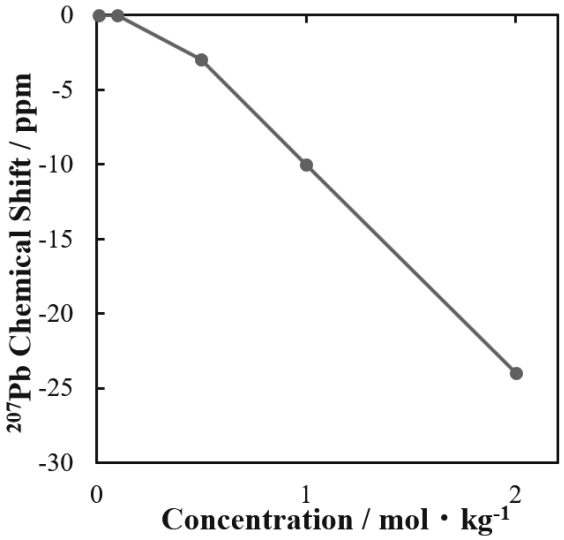


Fig. 1　Concentration dependence of ^{207}Pb Chemical Shifts in $Na_2[Pb(edta)]$ aqueous

ここでこの^{13}Cの、0.01mol/kg, 0.1mol/kgにおける化学シフトが以下のようになっていることに注目する(Table 1)。重原子と結合したEDTAに注目すると、同一濃度における^{13}C原子の化学シフトの変動幅は、濃度変化による化学シフトの変化(最大で0.1ppm程度)に比べ約10倍であることがわかる。この結果は、理論計算において分子の溶媒和構造を考慮しなくとも、およそ実験値に近い遮蔽定数の計算結果が得られることを示唆している。このように溶媒の影響による化学シフト変化が小さく、また軽原子にHALA効果が顕著に見られるような重原子キレート化合物は、適切な計算モデルが作りやすい。よってこれらの化合物はNMRにおける相対論的効果の理論研究に非常に役に立つことが期待される。

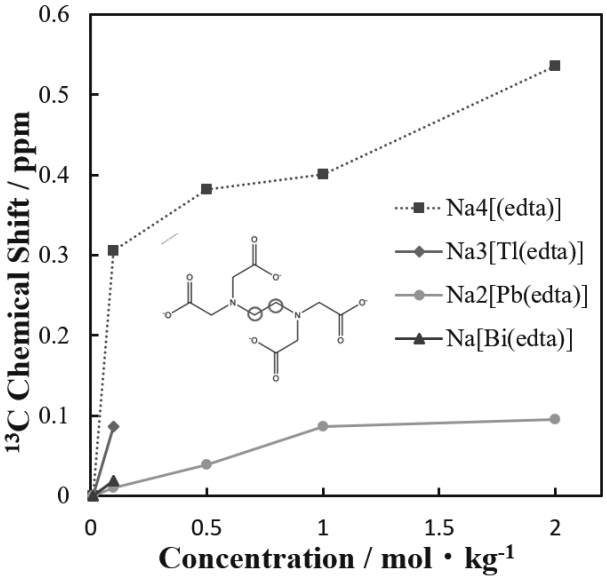


Fig. 2 Concentration dependence of ^{13}C Chemical Shifts in $Na_n[M(edta)]$ aqueous solutions.

Table 1. ^{13}C Chemical shifts in different water solutions.

Solute	0.01mol/kg	0.1mol/kg
$Na_4[(edta)]$	51.64	51.95
$Na_3[Tl(edta)]$	51.44	51.53
$Na_2[Pb(edta)]$	53.09	53.10
$Na[Bi(edta)]$	55.94	55.96

References
[1] Kostelnik, R. J. & Bothner-By, A. A. J.Magn.Resonm,　14, 141–151 (1974).
[2] D. Kuwahara, T. Yokoyama et al.,　第57回NMR討論会(2018).
[3] M. Munakata, S. Kitagawa, F. Yagi, Inorg. Chem., 25, 964 (1984).
[4] M. Kaupp, in *Relativistic Electronic Structure Theory: Part 2. Applications*, 1st ed. (Ed: P. Schwerdtfeger) Vol. **14**, Elsevier B. V., Amsterdam, the Netherlands, Chapter 9 552. (2004).

P46

NMRマイクロプローブとスピントラッピングESRを用いた酸化チタンの光反応解析

○金折 賢二[1]，住吉 政則[1]，會見 宗平[1]，三宅 祐輔[1]，田嶋 邦彦[1]
1京都工芸繊維大学　分子化学系

Photoreaction analysis of TiO_2 using NMR microprobe and spin trapping ESR

○Kenji Kanaori[1]，Masanori Sumiyoshi[1]，Sohei Aimi[1]，Yusuke Miyake[1]，Kunihiko Tajima[1]
1Molecular Chemistry and Engineering, Kyoto Institute of Technology

There have been many reports on photoreactions of bio-related molecules with titanium oxide, and product analysis has been conducted by NMR. However, it is difficult to accurately determine the generation rate of decomposition products generated by light irradiation by NMR measurement because light is not completely transmitted through a normal sample tube. We measured the reaction rate accurately by using a 1.7 mm diameter NMR microprobe, and identified various amino acid and peptide degradation products taking advantage of its high sensitivity. In addition, the radical species generated from amino acids and peptides were observed using spin trapping ESR method, and the decomposition reaction mechanism on the titanium oxide surface was examined from the structure of the product and radical species detected by NMR.

酸化チタン（TiO_2）は光触媒として代表的な物質であり、比較的波長の長い360 nm程度の光で容易に光励起される。LUMOを占有する励起された電子は酸素分子などに容易に電子移動する(1)。一方で、HOMOに残された正孔（ホール）は極めて強い電子アクセプター性を有することから、水の酸化分解によるヒドロキシルラジカルの生成(2)や有機分子の酸化反応に関与する。また、励起に伴いTiO_2表面に水の解離吸着を促す酸素欠陥が生じて親水性が向上し、その結果、TiO_2表面は超親水性を発現する(3)。近年では、その優れた酸化分解特性および超親水性に加え、比較的安価で安全性が高いことが注目され、セルフクリーニング機能や防曇機能を持つコーティング剤、または殺菌活性や防カビ活性を持つ素材として、工業的に様々な分野で利用されている(4)。

菌や細胞を含めた生体関連物質がTiO_2により分解可能であることは知られているが、生体関連物質の中でも比較的単純な構造をしているアミノ酸ですら分解機構は完全に解明されていない。その理由として、生体関連物質の分解は水溶液中での反応が多く、気相での反応と比較すると、TiO_2表面での吸着状態の解析が困難であることや反応が複雑であることが考えられる。TiO_2によるアミノ酸の分解反応において、水酸基を含むアミノ酸であるセリン（Ser）やスレオニン（Thr）は、グリシン（Gly）等に比べてTiO_2表面に吸着しやすく(5)、分解速度が速いことが知られている(6)。本研究では、水酸基を持つアミノ酸残基の分解機構を検討するため、アミノ酸、修飾アミノ

酸化チタン、光分解反応、水素―重水素交換

○かなおりけんじ、すみよしまさのり、あいみそうへい、みやけゆうすけ、たじまくにひこ

酸、および、ペプチドの水溶液に酸化チタンを懸濁させて分解し、分解により生じた生成物をNMRおよび質量分析により同定した。また、スピントラッピングESR法を用いて光照射時に生じるラジカル種を観測して、NMRで検出された生成物と合わせてTiO_2表面での水酸基を持つアミノ酸およびペプチドの分解反応機構を検討した。

【実験】

アミノ酸およびペプチドを、TiO_2 (20 mg/mL) を懸濁させた90% H_2O/10% D_2O、または、D_2Oに溶解し、φ1.7 mm NMRサンプル管に40 μL注入した。TiO_2が沈殿しないようにサンプル管を水平にした状態で回転させながらフィルター（波長280～400 nm）を通した紫外光を照射した。一定時間照射した後、遠心機でサンプル管底にTiO_2を沈殿させてNMRスペクトルを測定した。TiO_2の懸濁、紫外光の照射、測定のサイクルを繰り返しスペクトルの変化の様子を観測した。質量分析はESI-TOFを用いた。スピントラッピング試薬には2-nitroso-methylpropane (MNP) を用い、サンプル管を水平にした状態で光を照射しながらESRスペクトルを測定した。

【結果と考察】

酸化チタンの光照射によってアミノ酸やペプチドのNMRシグナルは150～240 min程度で半減し、それに伴って新たなシグナルが観測された。Ser, Thrの反応では、カルボキシル基の脱炭酸反応により生じた一級アミン化合物とGlyが観測された。Glyが生成したことからSerおよびThr側鎖のC_α－C_β 間の切断が示唆された。D_2O中で反応を行うと、C_αに重水素が結合した一級アミン化合物とGly-d_1が観測された。非極性側鎖を持つAlaとValではアミンやGlyは観測されず、脱炭酸、脱アミノしてアルデヒドが生成物として観測された。Thr methyl esterでは脱炭酸は起きず、Gly methyl esterが生成した。Thrから生成したGlyと比較するとGly methyl esterの生成量は約４倍であった。したがって、Thrのカルボキシル基と水酸基はTiO_2表面の吸着において競合しており、ホールによる直接酸化が示唆された。これらの実験事実は、C_βに水酸基があるとC_α－C_β 間の切断が生じやすいことを示唆している。

Gly-Ser, Gly-Thrでは、脱炭酸反応で生じた化合物とGly-Glyが観測された。このことからSer, Thrの水酸基が側鎖の切断には必要である可能性が示唆された。Gly-Ser, Gly-Thrからは、構造異性体をもつアルケンも生じた。これは、脱炭酸反応につづいて、脱水反応によって二重結合が生成したと考えられるが、D_2O中で同様の実験をおこなってもアルケンには重水素が含まれていなかったことから、脱炭酸で生成したラジカル中間体からの脱水反応でアルケンが生じていることが示唆された。

反応中間体であると予想されるラジカルを検出するため、スピントラッピングESR法を用いて光照射時に生じるラジカル種を観測したところ、Gly-Ser, Gly-ThrからはGly-Gly由来と同じラジカルが検出され、それぞれのカルボキシル基の脱炭酸で生成するラジカルも検出された。ここまでの結果から、側鎖の切断は水酸基の酸化によるアルコキシルラジカルの生成とそれに続くC_α－C_β開裂で生じることが示唆された。

【参考文献】

(1) Ishibashi *et al.*, (2000) *J. Phys. Chem. B 104*, 4934-4938. (2) Zhang, J., Nosaka, Y., (2014) *J. Phys. Chem. C 118*, 10824-10832; (3) Wang *et al.*, (1998) *Adv. Mater. 10*, 135-138. (4) Powell *et al.*, (2016) *Chem. Mater. 2B,* 1369-1376. (5) Brandt, G. E. & Lyubartsev, P. A. (2015) *J. Phys. Chem. C 119*, 18126-18139. (6) Tran *et al.*, (2006) *J. Phys. Chem. B 110*, 25525-25531

P47

半整数四極子核の固体高分解能MQMASとSTMAS測定における SPAM法の活用

○佐々木　彬子[1]，堤　遊[1]，Jean-Paul Amoureux[2]
1 ブルカージャパン株式会社
2 リール大学

Revisiting the Soft-Pulse-Added-Mixing (SPAM) in MQMAS and STMAS NMR of Half-Integer Quadrupolar Nuclei in Solids

○Akiko Sasaki[1], Yu Tsutsumi[1], Jean-Paul Amoureux[2]
1 Bruker Japan K.K.
2 University of Lille

In solid-state NMR, multiple-quantum (MQ) MAS and satellite-transition (ST) MAS experiments are well-established techniques to obtain high-resolution spectra of half-integer quadrupolar nuclei. In 2004 and 2005, a soft-pulse-added-mixing (SPAM) concept was introduced in MQMAS and STMAS NMR by Gan *et al.* and Amoureux *et al.*, respectively, to enhance S/N ratio. Here, we further exploit SPAM-MQMAS and SPAM-STMAS with respect to (a) signal enhancement per unit time and (b) resolution enhancement per unit time. Its ease in experimental setup is demonstrated and some precautions are discussed.

Background

Quadrupolar nuclei account for more than 70% of NMR-active nuclei. Nevertheless, its use in solid-state NMR is limited owing to the presence of quadrupolar interaction that causes a significant loss of sensitivity and resolution. Two-dimensional MQMAS and STMAS are well-known methods to refocus quadrupolar interaction and obtain high-resolution spectra of half-integer quadrupolar nuclei.

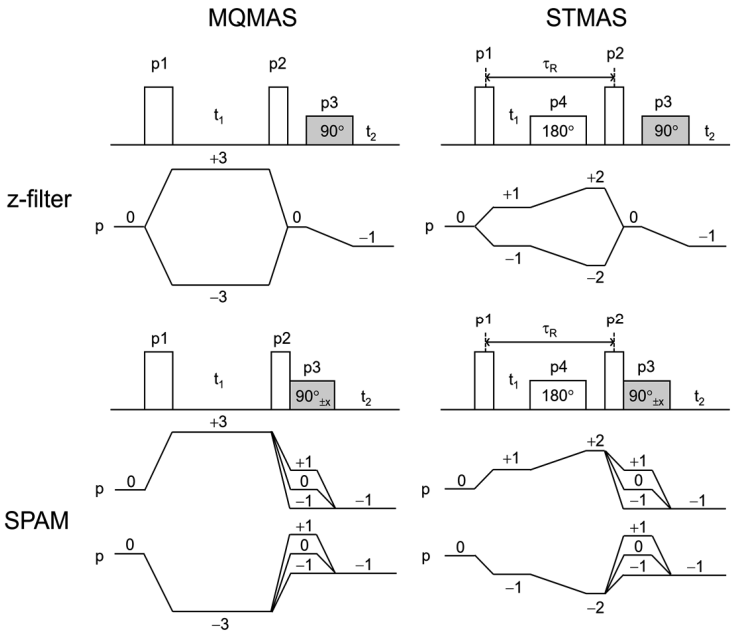


Fig. 1. Pulse sequences and coherence transfer pathways

In 2004 and 2005, Gan *et al.*[1] and Amoureux *et al.*[2–4] introduced a soft-pulse-added-mixing (SPAM) concept in MQMAS and STMAS NMR to enhance S/N ratio. In Figure. 1, pulse sequences and coherence transfer pathways are shown for triple-quantum MQMAS and DQF-STMAS experiments using z-filter and SPAM approaches. In conventional MQMAS or STMAS methods such as z-filter,

MQMAS、STMAS、半整数四極子核

○ささき　あきこ、つつみ　ゆう、じゃんぽーる　あむーる

signals from a pair of symmetrical coherence transfer pathways (echo and antiecho) are selected to yield two-dimensional absorptive lineshape, and frequency sign discrimination is ensured via hypercomplex treatment. In SPAM, an alternate acquisition of echo and antiecho signals via a central-transition selective pulse with properly fixed phase enables constructive addition of signals from other pathways, resulting in an efficient S/N enhancement. Furthermore, antiecho acquisition can be arbitrarily skipped in SPAM approaches, resulting in a reduction in total experimental time.

Here, we further exploit the SPAM concept to establish an efficient acquisition of MQMAS and STMAS spectra with respect to (a) sensitivity enhancement per unit time and (b) resolution enhancement per unit time. SPAM-MQMAS and SPAM-STMAS experiments will be a promising approach for (a) nuclei with intrinsically low S/N and (b) high-resolution heteronuclear correlation experiments (such as SPAM-MQ-HETCOR[5]).

Experimental, results and discussion

All experiments were performed using Bruker Avance NEO spectrometer equipped with a 14.1 T widebore magnet, for ^{23}Na (I = 3/2), ^{87}Rb (I = 3/2), ^{27}Al (I = 5/2) and ^{85}Rb (I = 5/2) nuclei. A 3.2 mm MAS probe was employed and MAS frequencies of 20-22 kHz were used. Powder samples (Na_2SO_4, NaH_2PO_4, Na citrate, AlPO-14, Berlinite, $RbNO_3$, Rb_2SO_4) were packed as purchased or as synthesized. Accurate adjustment of spinning axis to the magic angle was performed prior to all STMAS experiments using the sample of interest itself.

(a) Sensitivity enhancement: Three sets of MQMAS and STMAS experiments were performed with a fixed amount of experimental time (1. conventional z-filter, 2. conventional SPAM in which the number of echo and antiecho is fixed, 3. truncated SPAM in which antiecho acquisition is fully skipped and data points are zero-filled). Compared to conventional z-filter, a maximum signal enhancement of ~2 can be observed in conventional SPAM spectra, and a maximum signal enhancement of ~4 can be observed in truncated SPAM spectra, respectively.

(b) Resolution enhancement: Similarly, three sets of MQMAS and STMAS experiments were performed and its experimental time to achieve an identical resolution in the indirect dimension was compared. With respect to conventional z-filter, conventional SPAM experiments can be twice as short, and truncated SPAM experiments can be four times as short, to achieve an identical resolution.

For samples with small quadrupolar interaction or intrinsically high S/N, however, residual dispersive parts are visible in truncated SPAM spectra. Our retrospective analysis of conventional SPAM spectra revealed that the number of echo:antiecho = 4:1 is sufficient to obtain a two-dimensional absorptive lineshape. Therefore, as a rule of thumb, we suggest to use truncated SPAM with echo:antiecho = 4:1 to maximize sensitivity and resolution of MQMAS and STMAS spectra.

References

1 Z. Gan and H. T. Kwak, *J. Magn. Reson.*, 2004, **168**, 346–351.
2 J. P. Amoureux, L. Delevoye, S. Steuernagel, Z. Gan, S. Ganapathy and L. Montagne, *J. Magn. Reson.*, 2005, **172**, 268–278.
3 J. P. Amoureux, A. Flambard, L. Delevoye and L. Montagne, *Chem. Commun.*, 2005, 3472–3474.
4 J. P. Amoureux, L. Delevoye, G. Fink, F. Taulelle, A. Flambard and L. Montagne, *J. Magn. Reson.*, 2005, **175**, 285–299.
5 J. W. Wiench, G. Tricot, L. Delevoye, J. Trebosc, J. Frye, L. Montagne, J. P. Amoureux and M. Pruski, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2006, **8**, 144–150.

P48

三次元拘束磁場下にある微結晶懸濁体のin situ固体NMR

○久住 亮介[1]，門間 啓[1]，和田 昌久[1]，木村 恒久[1]，武田 和行[2]
1 京都大学大学院　農学研究科
2 京都大学大学院　理学研究科

In situ solid-state NMR for microcrystal suspensions oriented three-dimensionally under a modulated rotating magnetic field

○Ryosuke Kusumi[1], Hiroshi Kadoma[1], Masahisa Wada[1], Tsunehisa Kimura[1], and Kazuyuki Takeda[2]
1 Graduate School of Agriculture, Kyoto University
2 Graduate School of Science, Kyoto University

A magnetically oriented microcrystal array (MOMA), in which microcrystals are aligned three-dimensionally by a frequency-modulated rotating magnetic field, is a powerful tool of determination of the anisotropic interactions, e.g., chemical shift tensor and quadrupolar coupling tensor, from microcrystalline powder. For further applications, we developed a probe which enables to directly measure the solid-state NMR spectra of a magnetically oriented microcrystal suspension (MOMS). We can directly obtain single-crystal rotation patterns of rare and/or minute crystalline samples in a liquid medium by using the developed probe.

1. はじめに

強磁場下では反（弱）磁性体も磁場に応答する．特に結晶や液晶，高分子短繊維など磁化率の異方性を有する物質では，磁場により配向させることができる．NMRは強磁場下における核スピンの振る舞いを利用する手法であることから，これまでに液晶や脂質二重膜などの磁場配向を活用したタンパク・生理活性ペプチドなどの構造解析が多数行われている．しかしながら，NMRにおける磁場配向様式は専ら静磁場下での一軸配向に限られてきた．対象を二軸性の結晶（直方晶，単斜晶，三斜晶）とし，印加磁場を単純な静磁場から時間的に変調する磁場へと拡張すれば，より高度に磁場配向させることが可能である．

2. 変調回転磁場による微結晶の三次元磁場配向化とNMRへの応用

磁化率異方性はχ_1，χ_2，χ_3の3つの主値とその方向からなる磁化率テンソル$\boldsymbol{\chi}$で表される．反磁性体では全て負であり，二軸性結晶であれば主値は全て異なる（$0 > \chi_1 > \chi_2 > \chi_3$）．Fig. 1に，二軸性結晶に種々の磁場を印加した場合に得られる配向形態を示す．静磁場下では，磁化容易軸χ_1が磁場に平行となるよう一軸配向する．回転磁場を用いると，困難軸χ_3を磁場回転面と垂直な方向に一軸配向させることができる．さらに，静磁場と回転磁場の概念を組み合わせた変調回転磁場[1)]を印加すると，結晶を三次元的に配向させることが可能となる．微結晶をあらかじめUV硬化モノマー中に懸濁させておき，三次元配向させた後にUV照射により媒体を固化すると，微結晶が三次元配向した複合体（擬単結晶）が得られる[2)]．なお，動的磁場の印加は，実際には静磁場下（超伝導磁石内）で試料を定速であるいは速度を変調させて回転させることで行う．こうして得られる擬単結晶を単結晶NMR法に供すれば，通常はmmサイズの巨大な単結晶を必要とする化学シフトテンソルの完全決定が，μmサイズの微結晶においても可能となる[3,4)]．

三次元磁場配向，微結晶懸濁体，in situ固体NMR

○くすみ りょうすけ，かどま ひろし，わだ まさひさ，きむら つねひさ，たけだ かずゆき

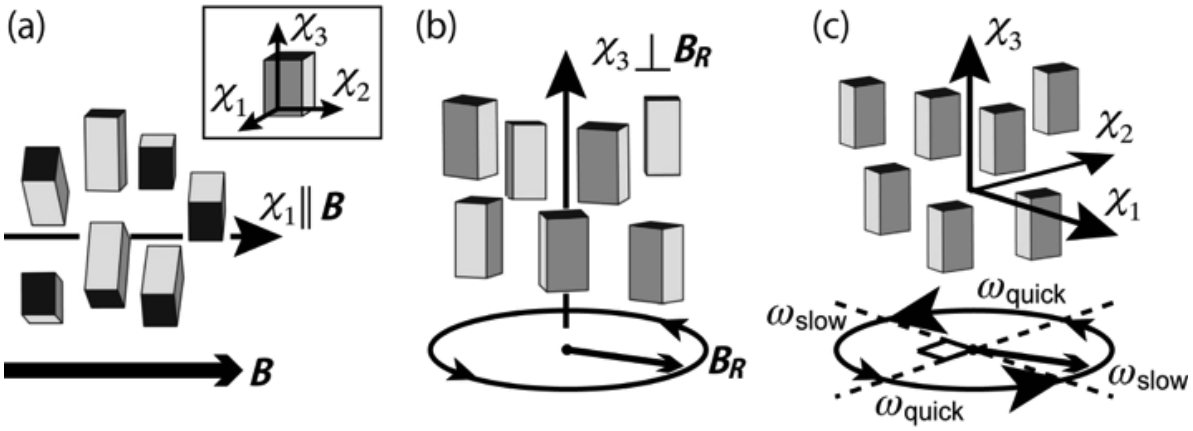


Fig. 1 Magnetic orientation of biaxial crystals under (a) static, (b) rotating, and (c) frequency-modulated rotating magnetic fields.

3. 磁場配向プローブによる磁場配向微結晶懸濁体のin situ固体NMR

擬単結晶化法は微結晶から化学シフト異方性などの異方的相互作用の情報を余すことなく抽出できる強力なツールになり得るが，試料をUV硬化モノマーに分散させる必要があるため，損傷しやすいタンパク質や水和結晶といった物質への応用が困難であった．また，NMR装置の他に擬単結晶作製用の強磁場と配向装置を準備しなければならない．そこで我々は，NMRのプローブ内で微結晶を三次元磁場配向させ，媒体を固化させることなく，そのまま固体NMR測定が可能な磁場配向プローブを新たに開発した[5)].

Fig. 1に，開発したプローブを示す．試料管の長軸を静磁場$\boldsymbol{B_0}$と直交させた状態で変調回転させる機構とし，変調回転の駆動は超伝導磁石の外側にあるステッピングモーターにより行なう．三次元配向した微結晶は試料管に追随して回転するため，光センサーにより試料管の回転とパルスシーケンスを同期させて特定のタイミングで rfパルスを照射・FID信号を受信できる設計としている．L-アラニン微結晶（<20 μm）の懸濁液について，間欠型の変調回転（15 rpmで180°回転させ，$\boldsymbol{B_0}$方向で1 s停止）を施しながら，パルス照射のタイミング（$\boldsymbol{B_0}$と磁化容易軸χ_1方向（回転開始時における静磁場方向）のなす角度）を変化させつつ固体^{13}C CP測定を行なった結果，単結晶振動パターンを観測することに成功した．この結果は，液状媒体中にあるμmオーダーの微結晶からでも，単結晶振動パターンを直接観測することが可能となったことを示している．また，同プローブでは，単結晶法で必要であった参照軸（結晶軸）と試料の回転軸を正確に一致させる軸出し作業が不要となり，解析精度の向上も見込まれる．微小な結晶しか得られないタンパク質や測定後の回収が望まれる希少な化合物などへの応用や，水和・生理環境下でのin situ構造解析などへの展開が期待される．

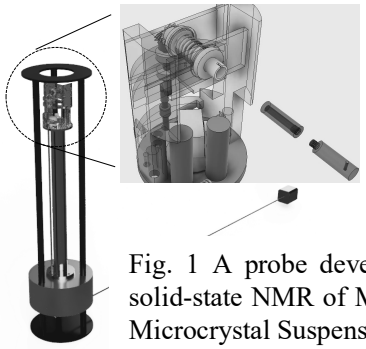


Fig. 1 A probe developed for measuring solid-state NMR of Magnetically Oriented Microcrystal Suspension (MOMS)[5)].

参考文献

1), T. Kimura et al., *Langmuir* **21**, 4805 (2005); 2), T. Kimura et al., *Langmuir* **22**, 3464 (2006); 3), R. Kusumi et al., *J. Magn. Reson.* **223**, 68 (2012); 4), R. Kusumi et al., *Cryst. Growth Des.* **15**, 718 (2015); 5), 門間啓ら，第58回NMR討論会にてポスター発表予定 (2019).

P49

高磁場MAS-DNP固体NMRによる核偏極の空間的不均一性を反映する超偏極率測定法の開発

○杉下友晃[1]，松木陽[1,2]，藤原敏道[1,2]
[1]大阪大学　蛋白質研究所
[2]大阪大学先導的学際研究機構　量子情報・量子生命研究部門

Measurement of hyperpolarization reflecting spatial polarization heterogeneity by high-field MAS-DNP solid-state NMR

○Tomoaki Sugishita [1], Yoh Matsuki[1,2], and Toshimichi Fujiwara[1,2]
[1]*Institute for Protein Research, Osaka University, Osaka, Japan*
[2]*Quantum Information and Quantum Biology Division, Institute for Open and Transdisciplinary Research Initiatives, Osaka University*

High-field dynamic nuclear polarization (DNP) not only significantly improves sensitivity in solid-state NMR, but also generates spatial polarization heterogeneity around polarizing agents in samples, which can provide nanometer-order structural information. In order to quantify polarization, we have developed a new method using high-order spin-correlated component of hyperpolarized magnetization, instead of the conventional method, which have suffered from depolarization in MAS-DNP NMR. Our method also can evaluate polarization heterogeneity as magnetization-growth time dependence of polarization. The experimental result showed polarization of samples of 2-^{13}C alanine and 2-^{13}C glycerol have different tendency to decay, which suggested different efficiency of ^{1}H spin diffusion derived from their chemical structures. We will also discuss local polarization with multi-dimensional polarization measurement.

近年の高磁場動的核分極（DNP）法の発展によって、固体NMRの感度は著しく向上しつつある。DNPにより電子スピン分極を核スピンへと移動させることで、温度による感度利得も含めるとシグナル強度は室温下の1,000倍以上にもなり得る。当研究室では特に生体高分子への応用を見据えて、極低温ヘリウムガスによって試料管をマジック角試料回転（MAS）させるプローブシステムを併用して、感度と分解能を両立したMAS-DNP固体NMR測定装置を開発している。

DNP時にはラジカル分極剤近傍の核に磁化が受け渡され、更に^{1}Hスピン間の双極子相互作用によって試料全体へとスピン拡散が起こることにより、測定の高感度化が達成される。すなわち、試料内は均一に高偏極状態となっているのではなく、分極剤を中心とした偏極の不均一性が生じているものと考えられる。蛋白質の^{1}Hスピンネットワークはおおよそ1 nm/msオーダーの拡散速度をもっているため、したがってこの偏極の不均一性はナノメートルスケールの距離情報へと変換し得る。近年、生物物理学の分野においては、細胞内特有のタンパク質機能や液-液相分離現象など、局在と構造情報の相関がカギとなるトピックスがますます注目されつつあり、DNP時の偏極の不均一性を検出することが可能になれば、NMR従来の構造情報と組み合わせることで新しい研究手法として応用できる可能性がある。

DNP-NMRにおける偏極率評価は従来、電子飽和を行うサブミリ波のON/OFF時のシグナルの比をとることによって行われてきた。しかし、この間接的な方法ではサブミリ波OFF時に核スピンから電子スピンへの逆向きの偏極移動であるdepolarizationが起こる[1]ため正確な偏極率測定にな

固体NMR，動的核分極（DNP），偏極率

○すぎしたともあき，まつきよう，ふじわらとしみち

らず、またこのときの偏極率は全体の平均値としてしか得ることができない。我々は超偏極磁化の高次成分を利用することにより、これらの問題を解決する偏極率測定法を開発してきた[2]。

通常のNMR測定において、平衡状態の磁化は高温近似により観測核の線形成分のみを残して計算すること可能であるが、極低温高磁場DNPを適用した超偏極条件では、スピン系内において他スピンとの相関高次成分がNMRシグナルとして同時に観測される。このとき、たとえば*IS*の2スピン系では、*I*-*S*スピン相関成分と*S*スピン線形成分の比は*I*スピンの偏極率に対応しているため、それぞれの成分に由来するピーク強度の比をとることで、depolarizationの影響を受けることなく、偏極率測定を行うことが可能である[3]。

図1は、^{1}H偏極率を計算するために、^{13}C線形成分と^{1}H-^{13}Cスピン相関成分をそれぞれ分離観測するパルスシークエンスである。CP後のτ_2間でスピン相関成分の成長と^{13}C磁化の平衡状態への減衰が起こるため、分極剤からの距離に応じた偏極の不均一性を偏極率のτ_2依存性によって考察することができる。

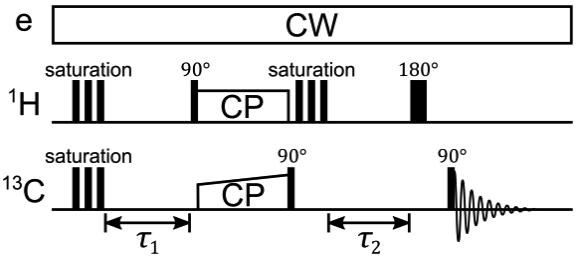


Fig. 1. Pulse sequence for observing ^{13}C linear signal and ^{1}H-^{13}C spin-correlated signal separated from each other. ^{1}H 180° pulse is or is not irradiated synchronously with inversion of acquisition phase.

また偏極率測定を行う上で、各成分由来のピーク強度を正確に評価するためにスピン動力学シミュレーションを行った。シミュレーション結果が実験スペクトルをよく再現するよう、核間双極子相互作用やピーク線幅などのパラメーターの最適化を行い、その結果を偏極率計算へとフィードバックした。

2-^{13}Cアラニンと2-^{13}Cグリセロールを試料として用いて、実際にDNP-MAS 固体NMRによる偏極率計算を行った。偏極率はそれぞれ異なるτ_2依存性を示した（図2）。双方の偏極率とも^{1}Hの磁化回復と同じ時間スケールで立ち上がる傾向は同様であったが、2-^{13}Cアラニンの偏極率は極大をとった後、速やかに減衰し、2%前後に収束した。一方で、2-^{13}Cグリセロールを試料として計測した偏極率は、偏極が十分成長した後はほとんど減衰せず、2.4%付近で安定した。両者は化学構造の違いから、スピン拡散効率に起因して偏極率の試料内不均一性に違いがあると考えられ、その結果、偏極率挙動にも異なる傾向がみられた可能性がある。

また、本研究の目標は試料内の局所的な偏極率を用いて分極剤からの距離を評価することにある。発表では、偏極率測定の多次元化によって得られる局所偏極率についても議論する。

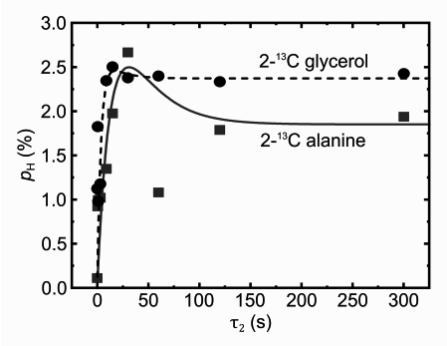


Fig. 2. τ_2 dependence of ^{1}H polarization obtained from powder samples of 2-^{13}C glycerol and 2-^{13}C alanine with the pulse sequence Fig. 1. Data points were fit by double exponential function, $y = a(1 - \exp(-\tau_2/T_r)) - b(1 - \exp(-\tau_2/T_d))$, excluding the point at τ_2 = 60 s of 2-^{13}C alanine because of severe distortion of spin-correlated spectral line shape.

Reference

[1] K. Thurber and R. Tycko. (2014) *J. Chem. Phys.*, **140**, 18420.

[2] T. Sugishita *et al*. (2019) *Solid State Nuclear Magnetic Resonance*, **99**, 20-26.

[3] B. Vuichoud *et al*. (2015) *J. Magn. Reson.*, **260**, 127-135.

P50

Accurate ^{1}H-^{14}N distance measurements by phase-modulated RESPDOR at very fast MAS of 70 kHz

Nghia Tuan Duong[1], Federica Rossi[2], Maria Makrinich[3], Amir Goldbourt[3], Michele R. Chierotti[2], Roberto Gobetto[2], Yusuke Nishiyama[1,4]

[1] *NMR Science and Development Division, RIKEN SPring-8 Center, and Nano-Crystallography Unit, RIKEN-JEOL Collaboration Center, Yokohama, Kanagawa 230-0045, Japan*

[2] *Department of Chemistry and NIS Centre, University of Torino, V. P. Giuria 7, 10125, Italy*

[3] *School of Chemistry, Raymond and Beverly Sackler Faculty of Exact Sciences, Tel Aviv University, Ramat Aviv, Tel Aviv 6997801, Israel*

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

The proton-nitrogen (H-N) distance is important for structural characterizations of molecules in chemistry, biology, and pharmacy. The combination of magic-angle spinning (MAS) and recoupling sequences in solid-state nuclear magnetic resonance (ssNMR) enables such distance measurement when the other methods are unavailable. It is noted that for accurate quantification of ^{1}H-N dipolar coupling, thus distance between the two atoms, the recoupling sequences are required not only to recouple ^{1}H-N dipolar interaction but also to suppress the intense ^{1}H-^{1}H homonuclear dipolar interactions. A number of sequences have been designed but mainly for a ^{1}H-^{15}N pair despite the presence of two N isotopes (^{14}N and ^{15}N nuclei) since ^{15}N nucleus is a spin-1/2. Recent advances in fast MAS technology ($\nu_R \geq 60$ kHz) have further simplified the developments and implementation of ^{1}H-^{15}N recoupling sequences, making the ^{1}H-^{15}N distance measurement straightforward. Nevertheless, these experiments are insensitive due to the low natural abundance of ^{15}N nucleus (0.4 %). In contrast, ^{14}N nucleus benefits from a significantly higher natural abundance (99.6 %); however, it suffers from the quadrupolar interaction since ^{14}N is an integer quadrupolar nucleus (spin number $I = 1$). The presence of a strong quadrupolar interaction and the absence of the central transition for ^{14}N nucleus make the ^{1}H-^{14}N distance measurement challenging. Despite the ^{1}H-^{14}N distances being reported in the literature, that measurement requires the detailed prior knowledge on the studying systems [1].

Rotational-echo saturation-pulse double-resonance (RESPDOR) has been used to determine the distance between a spin-1/2 and a quadrupolar nuclei [2]. However, one drawback of this sequence is that its efficiency depends on experimental conditions. To alleviate such dependences, phase-modulated (PM) pulse has been designed [3]. It is robust to various parameters at moderate MAS, but has not been performed at fast MAS yet. Here, we numerically and experimentally investigate the feasibility of PM-pulse combined with RESPDOR (PM-RESPDOR) sequence, shown in Fig. 1, in measuring ^{1}H-^{14}N distances at very fast MAS.

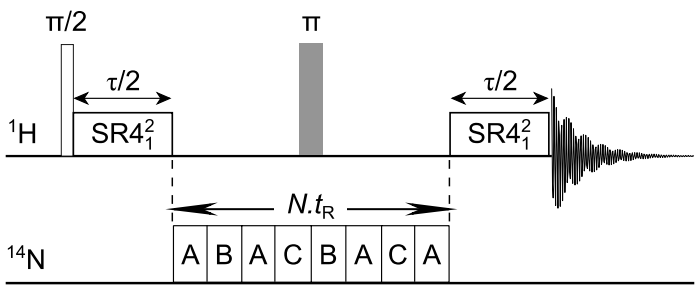


Figure 1. PM-RESPDOR sequence. The phase-modulated (PM) pulse is unsymmetrically composed by the combination of numerous blocks [3]. The pulse length of the PM pulse is $N \cdot t_R$, where N is an integer and t_R is the length of a rotor period.

Firstly, by simulations, we examine (i) the feasibility of PM-RESPDOR at very fast MAS condition, and then investigate (ii) the effect of ^{14}N radio-frequency (rf) field as well as (iii) the robustness to ^{14}N quadrupolar coupling constant (C_Q) on the PM-RESPDOR efficiency. All simulations are performed on an isolated ^{1}H-^{14}N spin system. For (i), the MAS frequency is varied from 20 to 70 kHz while the ^{14}N rf field and C_Q values are fixed. For (ii), the ^{14}N rf field is varied from 10 to 100 kHz at MAS frequency of 70 kHz and fixed C_Q value. For (iii), at MAS frequency of 70 kHz and fixed ^{14}N rf field, simulations are performed with varying ^{14}N C_Q from 1.0 MHz to 6.0 MHz. Based on these simulations, it is concluded that with PM-pulse length of ~ 0.15 ms and ^{14}N rf field of 80 kHz or higher, the PM-RESPDOR sequence is not only feasible at fast MAS condition but also robust to large variations of different experimental parameters.

Finally, the performance of this sequence is experimentally tested on the two model samples, L-tyrosine·HCl (Tyr) and N-acetyl-L-alanine (Ac-Ala). By fitting the experimental data with the analytical fraction curves, the dipolar couplings, thus the distances can be extracted. Fig. 2a, b show an example for the fitting of Ac-Ala where the root-mean square deviation (RMSD) analysis is calculated for the best result of ^{1}H-^{14}N dipolar couplings. The obtained distances are in agreement with those from diffraction techniques.

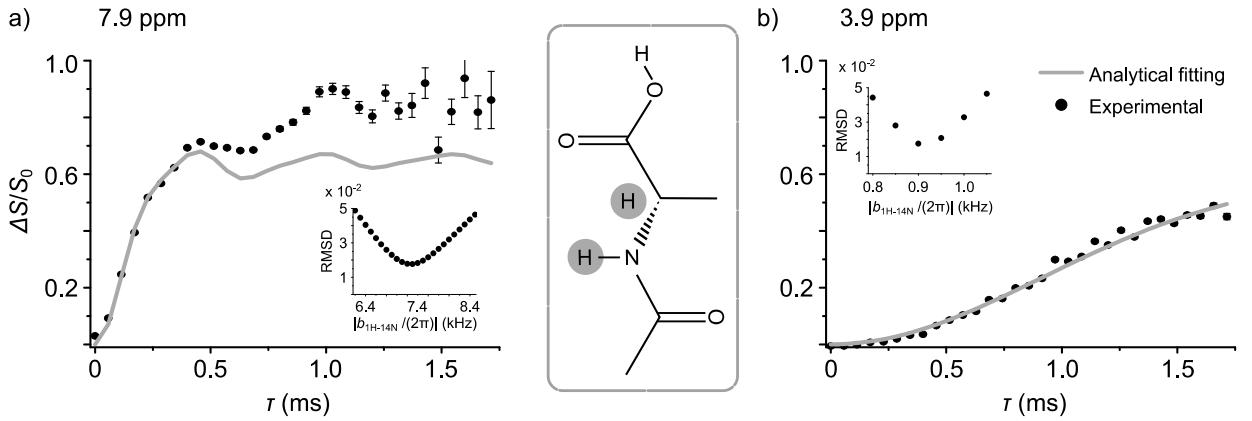


Figure 7. Ac-Ala: the experimental ^{1}H-^{14}N fraction curves at ^{1}H chemical shift of 7.9 ppm (a) and 3.9 ppm (b) achieved by PM-RESPDOR (dots) and the fitting curves by the analytical expression (solid lines). The errors of $\Delta S/S_0$ intensities are displayed as the vertical bars. The structure of Ac-Ala is shown in the middle of Fig. 7a and 7b, where ^{1}H chemical shifts of 7.9 ppm and 3.9 ppm correspond to N**H** and C**H** sites, respectively. The insets show the best fitting ^{1}H-^{14}N dipolar coupling values based on RMSD analysis.

REFERENCES

[1] A. Naito, A. Root, C.A. McDowell, Combined sample rotation and multiple-pulse NMR spectroscopic studies on protons bonded to nitrogen-14 nuclei in solid amino acids, The Journal of Physical Chemistry. 95 (1991) 3578–3581. doi:10.1021/j100162a027.

[2] Z. Gan, Measuring multiple carbon-nitrogen distances in natural abundant solids using R-RESPDOR NMR, Chemical Communications. (2006) 4712–4714. doi:10.1039/b611447d.

[3] E. Nimerovsky, R. Gupta, J. Yehl, M. Li, T. Polenova, A. Goldbourt, Phase-modulated LA-REDOR: A robust, accurate and efficient solid-state NMR technique for distance measurements between a spin-1/2 and a quadrupole spin, Journal of Magnetic Resonance. 244 (2014) 107–113. doi:10.1016/j.jmr.2014.03.003.

^{1}H-^{14}N distance measurement, phase-modulated RESPDOR, very fast MAS ($\nu_R \geq 60$ kHz)

P51

固体NMR測定におけるAdiabatic Pulseを用いた溶媒信号抑制パルスの開発

松永　達弥[1]，○岡部　遼太郎[2]、石井　佳誉[1, 2]
1理化学研究所放射光科学研究センターNMR研究開発部門
2東京工業大学生命理工学院

Development of solvent suppression pulse with adiabatic pulse for solid-state NMR experiment

Tatsuya Matsunaga [1], ○Ryotaro Okabe[2], Yoshitaka Ishii[1,2]
1 NMR Science and Development Division, RSC, RIKEN
2 School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology

^{1}H-detected solid-state NMR (SSNMR) is gaining wide-spread usage because of improved sensitivity due to ultrafast magic-angle spinning (UFMAS) at 60 kHz or a higher sample spinning rate. In ^{1}H-detected SSNMR for samples containing solvents such as proteins, ^{1}H signal of water and/or other solvents can be an obstacle. In this work, we developed a new method for solvent suppression in SSNMR experiment with adiabatic pulse. We compared the new method and the conventional methods through calculations and ^{1}H MAS NMR experiments. The results indicated that the new solvent suppression showed robustness against chemical shift difference. It was also shown that the new method showed better suppression effect for more than one solvents, compared with traditional methods.

【Introduction】

試料回転速度が60 kHzを超えるultrafast magic angle spinning (UFMAS)では有機物の固体NMRで使われている^{13}C, ^{15}Nスペクトルだけでなく、^{1}Hスペクトルの高分解能化が可能となる。このためUFMASを用いた高分解能^{1}H 固体NMRは生体分子の解析などで広く利用されている。しかし、タンパク質をはじめとした固体生体分子サンプルの多くは水や有機溶媒を含むため、これら溶媒由来の^{1}H信号は^{1}H NMR測定における障害となる。したがって、溶媒の^{1}H信号の抑制は固体NMRにおいても重要となっている。

一般的にタンパク質の^{1}H固体NMR測定には一定強度のRF磁場をかけ続けるcontinuous wave (CW)照射や、2種類の位相の異なるRFパルスを組み合わせたMISSISSIPPI[1]を用いる。溶液NMRでは一般にグラジエントコイルによる傾斜磁場を組み合わせる事で溶媒の信号減衰を速めているが、一般的な固体NMR装置ではグラジエントコイルが使えないため、溶媒NMRに比べて信号減衰の効率が悪い。加えて、一般的に固体試料の磁化緩和速度は溶液試料のものに比べて速く、速やかな溶媒信号の抑制が溶液NMR以上に大切になる。

本研究では、グラジエントコイルを必要としない固体NMRのための溶媒信号抑制手法としてSuppression of Liquid with Adiabatic Pulse (SLAP)を開発した。RF照射による溶媒の信号の減衰はRF不均一性による信号のdephasingを原理として用いているが、従来手法の問題点としてパルスの組

solvent suppression, adiabatic pulse, RF inhomogeneity

まつなが　たつや、○おかべ　りょうたろう、いしい　よしたか

み合わせにより、RF不均一性によるdephasingがリフォーカスすることがブロッホモデルによる計算により示唆された。また、照射オフセットによる溶媒ピークごとの有効磁場のばらつきにより、溶媒信号の抑制効率が変化することが同様のモデルにより示唆された。そこでSLAPではadiabatic pulse[2] (Fig.1)を用いることにより、既存の手法よりもRF不均一性によるリフォーカスが起こりにくいようなパルス系列となっている。また、adiabatic pulseはCW pulseに比べてオフセット周波数の影響を受けにくく、既存手法と比較して複数の溶媒ピークが存在する場合に安定した効果が見込まれる。本発表では既存手法との比較を通して新手法の有効性を検証する。

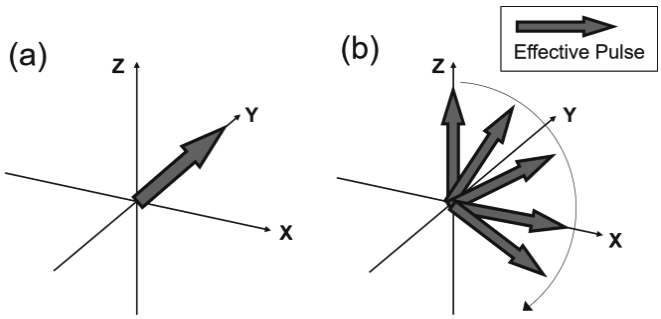


Fig.1. Schematic of CW pulse (a) and adiabatic pulse (b) to rotate magnetization around y axis.

【Methods and Results】

1. NMR Simulation

RF inhomogeneityによる磁化の減衰効果を検証するため、溶媒信号抑制のためのRFパルスによる磁化減衰のシミュレーションを行った。adiabatic pulseを照射した場合におけるパルス照射時間に対する磁化の強度変化を計算した。同様にして、MISSISSIPPIによる磁化減衰のシミュレーションを行った。計算の結果、adiabatic pulseは磁化I_xとI_yを継続的に減衰させたが、I_zについては減衰が見られなかった。このことから、adiabatic pulseを用いたパルス系列は溶媒信号の抑制に応用可能であると考えられる。一方、MISSISSIPPIでは、パルス照射位相を切り替える操作により磁化I_y, I_zのリフォーカスが確認された。また、suppression pulseを照射する過程で磁化の強度が振動したことから、MISSISSIPPIによる溶媒信号抑制の挙動が不安定になることがわかった。SLAPによる磁化の減衰のシミュレーションとともに、実際の^{1}H MAS NMRの測定データとの比較を行う。

2. 二次元NMR測定によるsuppression pulseの効果の比較

β1 immunoglobulin binding domain of protein G (GB1)サンプルを用いた^{1}H核を検出する2D ^{13}C/^{1}H相関SSNMR測定を行い、各種の溶媒信号を抑制する方法を比較した。MISSISSIPPI法では、タンパク質試料に含まれる水や結晶化のために使われるイソプロピルアルコール溶媒由来の^{1}H信号が消えず、二次元スペクトルの中でそれぞれ4.6 ppmと0.8 ppm付近にピークとして現れた。一方で新規手法では、スペクトル中の溶媒由来の信号は十分に抑制できていることが確認できた。発表時には測定した二次元NMRスペクトル、および新手法と既存手法における溶媒信号を抑制する効果の違いを示す。

参考文献

[1] Zhiheng Yu et al., “NIH Public Access” 377, no. 2 (2009): 364–77

[2] J Baum, R. Tycko, and A. Pines, “Broadband Adiabatic,” Physical Review A 32, no. 6 (1985): 3435–47.

P52

固体高次元蛋白NMR測定の高速化と評価

○高橋涼[1]，松永達弥[2]，神原孝之[1]，石井佳誉[1,2]
1東京工業大学生命理工学院
2理化学研究所，SPring-8，NMR施設

New Progress toward Higher-Dimensional Biomolecular SSNMR

○Ryo Takahashi [1], Tatsuya Matsunaga [2], Takayuki Kamihara [1], Yoshitaka Ishii [1,2]
1 School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology
2 NMR Division, RIKEN SPring-8 Center, RIKEN

Solid-state NMR has played an important role in structural analysis of various insoluble biomolecules such as amyloid fibrils. The lack of spectral resolution, however, still poses a serious problem. Although multi-dimensional experiment can enhance spectral resolution, higher dimensional SSNMR experiments beyond 4D are challenging due to exponential increase of the machine time as a function of the dimension. As a benchmark, we performed 5D HACACONH and 4D HACANH experiments with GB1protein to examine the usefulness of these high-dimensional experiments for structural analysis of protein.

Introduction

Solid-state NMR has played an important role in structural analysis of various insoluble and heterogeneous biomolecules such as amyloid fibrils. The lack of spectral resolution, however, still poses a serious problem. Although multi-dimensional experiment can potentially enhance spectral resolution, higher dimensional SSNMR experiments beyond 4D are challenging due to exponential increase of the machine time as a function of the dimension.

In this study, we examined the feasibility of data collection of ^{1}H-detected 5D protein SSNMR as well as fast data collection of 4D protein SSNMR using fast magic-angle spinning (MAS) at 60 kHz and a ^{1}H frequency of 900 MHz. The use of ultra-high field and fast MAS significantly enhanced the ^{1}H resolution and sensitivity for the experiments. To accelerate the experiments, we doped the sample with 20 mM Cu-EDTA and made recycle delays 10 times shorter.(1 Additionally, nonuniform sampling (NUS) was employed to reduce the sampled data points down to 5% of the total points. As a benchmark, we performed 5D HACACONH and 4D HACANH experiments for uniformly ^{1}H, ^{13}C, ^{15}N-labeled the β1 immunoglobulin binding domain of protein G (GB1) in order to examine the usefulness of these high-dimensional SSNMR experiments for structural study of protein in terms of spectral resolution and sequential back bone assignment. The resolution of the 4D and 5D data were compared with the corresponding 3D data. The feasibility of the 4D-5D experiments will be discussed.

Reference

1) N. P. Wickramasinghe et al., *Nature Methods* **6**, 215-218 (2009).

固体NMR、多次元測定

○たかはしりょう、まつながたつや、かみはらたかゆき、いしいよしたか

P53

In situ 光照射固体 NMR によるレチナール結合光受容膜タンパク質(SRII, SRI, bR)の中間体の観測と光反応サイクルの解明

○内藤　晶[1]、槙野義輝[2]、重田安里寿[2], 川村　出[1]
1横浜国立大学　大学院工学研究院
2横浜国立大学　大学院工学府

Photointermediates and photoreaction cycles of retinal-binding photoreceptor membrane proteins (SRII, SRI, bR) as studied by in situ photoirradiation solid-state NMR spectroscopy

○Akira Naito [1], Yoshiteru Makino[2], Arisu Shigeta[2], Izuru Kawamura[1]
1Fuculty of Engineering, Yokohama National University
2Graduate School of Engineering, Yokohama National University

Photoirradiation solid-state NMR spectroscopy is a powerful means to study photoreceptor retinal-binding proteins by the detection of short-lived photointermediates to elucidate the photoreaction cycle and photoactivated structural changes. An in situ photoirradiation solid-state NMR apparatus has been developed for the irradiation of samples with extremely high efficiency to enable observation of photointermediates which are stationary trapped states. Therefore, in situ photoir radiation is particularly useful to study the photocycle of retinal-binding proteins. Photoreaction cycle of sensory rhodopsin II (SRII) was revealed to be SRII → K → L→ M → O(↔ N') → SRII. In SRI, M-intermediate was stationary trapped under illumination with green light, and P-intermediate was trapped under illumination with UV light. In Y185F-bR, CS* and O-intermediates were stationary trapped and the NMR signals were observed in the first time under illumination with green light.

（緒言）　NMR分光法は生体分子の分子構造や分子運動に関して重要な情報を提供する。中でも光照射NMRは光受容レチナール結合膜タンパク質の光反応過程を分子レベルで解明することを可能にする。特に短寿命光中間体を検出することにより、光受容膜タンパク質の光活性構造変化や光反応サイクルを明らかにすることが可能になり、光受容膜タンパク質の作用機序解明に重要な情報を提供する。しかしながら固体NMRに光照射装置を組み込みIn situ光照射固体NMR信号を観測することには多くの問題が存在する。そのため、光受容膜タンパク質の光中間体の観測や、光反応サイクルの観測はフラシュフォトリシスなど光学分光法によりなされてきた。本研究では新たにIn situ光照射固体NMR分光法を開発した。この方法ではLED光源からの光を光ファイバーによりプローブヘッドに伝送し、特殊ガラスキャップで封をしたジルコニア回転子のキャップの上から光を照射した。照射光はガラスキャップにより回転子内に誘導され、回転子内から試料への光照射を可能にした。この方法により効率の高い光照射が可能になった[1-9]。このin situ光照射固体NMR法を用いて、細菌型レチナール結合膜タンパク質である、バクテリオロドプシン(bR)[4,9]、センサリーロドプシンI(SRI)[2,9]、センサリーロドプシンII(SRII)[1, 8, 9]について光反応サイクルの検出を試みた。

光受容膜タンパク質、光反応サイクル、センサリーロドプシン、バクテリオロドプシン、光照射固体NMR

○ないとうあきら、まきのよしてる、しげたありす、かわむらいずる

細菌型レチナール結合膜タンパク質はFig.1に示すように、７本膜貫通ヘリックスから構成されており、レチナールがLysとのシッフ塩基結合によりヘリックスバンドル内に存在する。基底状態（暗状態）ではレチナールはall-trans配座を持ち、光励起により13位、15位の配座に変化が起こることが報告されている。したがって、本研究ではレチナールの20-^{13}C, 14-^{13}C標識を行い、この位置の^{13}C化学シフト値によりレチナールの配座決定を行った。

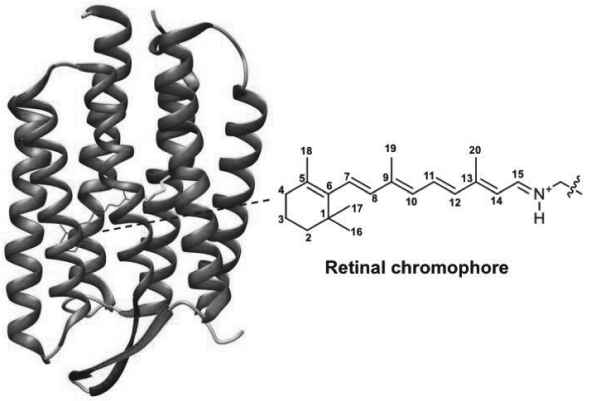


Fig. 1 Structure of bacteriorhodopsin and retinal chromophore with all-trans configuration[9].

（in situ光照射NMR分光器の構成） Fig.2にin situ光照射固体NMR装置の構成を示す。超電導磁石の外側に置かれたLED光源（365 nm, 520 nm）の光は光ファイバーにより、プローブ頭部のMAS装置に伝送される。MAS回転子はジルコニア材質であり透明ではないため、回転子頭部は透明なガラス材質で蓋をした。光ファイバーにより伝送された光はガラスキャップの上部から照射される。このとき光ファイバーはキャップと接触しないことが重要である。これにより、MAS回転中においても光照射が可能になった。さらに光は回転子内部から回転子内壁にフィルム上になった膜タンパク質試料を照射するため、非常に効率の高い光照射が可能になった[1-9]。

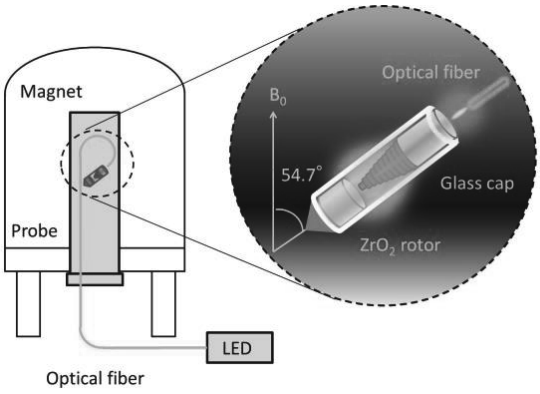


Fig.2 Schematic illustration of in situ photoirradiation solid-state NMR spectrometer[2,9].

（in situ光照射固体NMRによる光中間体の定常捕捉法） SRIIを例として光受容膜タンパク質に光照射を行うと、Fig.3に示すように基底(G)-状態はK-中間体に励起されその後緩和によって、L-, M-, O-中間体を経てG-状態に戻る光反応サイクルを示す。この光反応サイクルにおいてM-中間体の寿命は1.7秒と他の中間体に比べて寿命が長い特徴を持つ。したがって、G-状態に連続光照射を行った場合、M-中間体の占有数が増加して一定時間後はM-中間体の占有数が一定値を示すことが考えられる。この状態を定常捕捉状態と命名する。最初に、暗状態で固体NMR信号(Dark)を観測し、次に光照射状態で固体NMR信号(Light)を観測する。次に差スペクトル(Dark-Light)を求める（Fig.3B(c)）. この結果、反応状態が負のピーク、生成状態（定常捕捉状態）が正のピークで現れる。SRIIの場合、G-状態がM-中間体に変化する反応経路が明らかになった[1,8,9]。

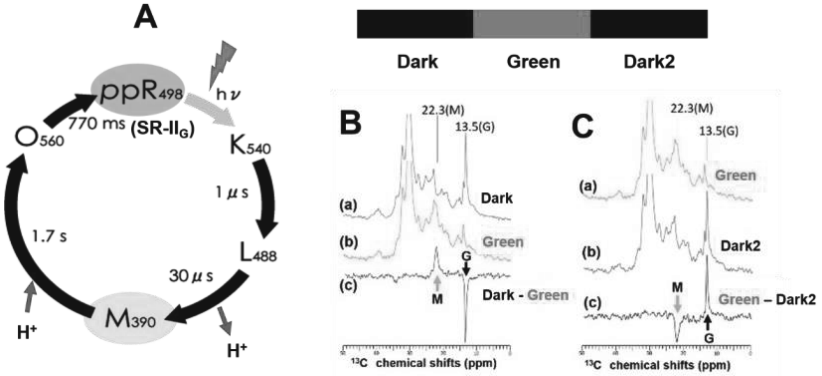


Fig. 3 A: Photoreaction cycle of SRII. B: (a). ^{13}C CP-MAS NMR spectrum of Dark state. (b)Green state. (c) Difference spectrum (Dark-Green). C: (a). ^{13}C CP MAS NMR spectrum of green state. (b). Dark2 state. (c). Difference spectrum (Green – Dark2)[9].

（SRIIの光反応サイクルの解明）
In situ光照射固体NMR法を用いてSRIIの光反応サイクルの解析を行った。まず、-40 CでDark1状態の測定を行い、次にGreen照射状態の測定を行って、差スペクトル(Green-Dark1)を求めた(Fig. 4Bd)。この結果、G-状態がM-, N'-, O-状態に変化する反応経路が明らかになった。Green照射状態後にDark2状態の測定行い、差スペクトル(Dark2-Green)を求めたところ、M-とO-中間体がG-状態に変化したことから、M-中間体はN'-中間体ではなくO-中間体を経てG-状態に変化することが明らかになった。次にGreen照射後にUV照射を行った。そこで差スペクトル(UV-Green)を求めたところ、M-中間体からO-中間体に変化する反応経路の存在が明らかになった。以上の反応経路を考慮した結果Fig. 4Fに示す光反応サイクルが明らかになった[1,8,9]。

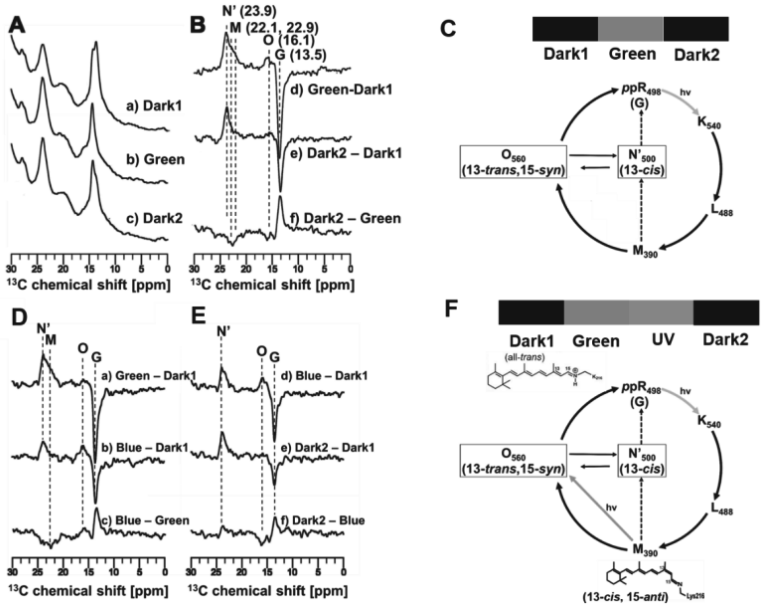


Fig. 4 Photoreaction cycle of ppR/pHtrII complex. A: (a).^{13}C CP MAS NMR spectrum of dark state. (b). Green state. (c). Dark2 state. B: (d). Difference spectrum (Green – Dark1). (e). Dark2 – Dark1. (f) Dark2 – Green. C: Photoreaction cycle of ppR/pHtrII under irradiation with green light. D: Difference spectra. (a). Green – Dark. (b). UV – Dark1. (c). UV – Green. E. Difference spectra. (d). UV – Dark1. (e). Dark1 – Dark2. (f). Dark2 – UV. F: Photoreaction cycle of ppR/pHtrII complex under green and UV light irradiation[8,9].

（SRIの光反応サイクルの解明） In situ光照射固体NMR法を用いてSRIの光反応サイクルの解析を行った。SRIの光反応サイクルはSRIG(587 nm) → (hn) → SRIK(620 nm) → SRIL(540 nm) → SRIM(373 nm) → SRIG(587 nm)であり、さらにUV照射を行うと SRIM(373 nm) → SRIP(520 nm) → SRIG(587 nm)の反応経路に切り替わることが報告されている。そこで、Dark状態の測定を行い、次にGreen状態の測定を行い、差スペクトル(Green – Dark)を求めた。この結果、G-状態からM-状態への反応経路の存在が明らかになった。次にDark状態の後にUV照射の測定を行い、差スペクトル(UV – Dark)を求めた。この結果、G-状態はP-中間体に変化する経路に切り替わることが明らかになった。さらにサスペクトル（UV – Green）を求めたところ、M-中間体からP-中間体に切り替わる変化する経路の存在が

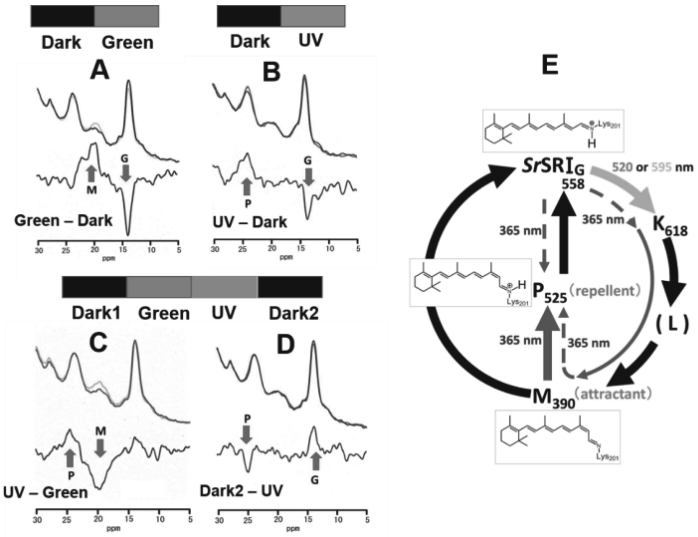


Fig. 5 Photoreaction cycle of SrSRI. A: ^{13}C CP-MAS NMR spectra of [20-^{13}C]ret-SRI under dark (top), green (top) light irradiation and difference spectrum (Green – Dark). B: under dark (top), UV(top) irradiation and difference spectrum (UV – dark). C: under green (top), UV(top) and difference spectrum (UV – Green). D: under UV(top), dark2 (top) and difference spectrum (Dark2 – UV). E: Photoreaction cycle of SrSRI[2,9].

明らかになった。以上に結果をまとめたSRIの光反応サイクルをFig.5Eに示す[2,9]。

（Y185F-bRの光反応サイクルの解明） In situ光照射固体NMR法を用いてY185F-bRの光反応サイクルの解析を行った。Y185F-bRは暗状態ではCS状態とAT状態が２：１で存在することが知られている。またAT状態はAT → K → L → M → N → O → ATなるプロトンポンプ活性に関わる光反応サイクルを示すことが知られている。まず、Dark（D1）状態の測定を行い、次にGreen（L1）状態の測定を行い、差スペクトル(L1 – D1)を求めた。この結果AT状態はN-中間体、CS状態はCS*中間体に変化する反応経路の存在が明らかになった。L1測定の後にD2測定を行い差スペクトル(D2 – L1)を求めた。この結果、N-中間体はO-中間体に変化する経路の存在が明らかになった。D2測定の後、L2測定を行い、差スペクトル(L2 – D2)を求めたところ、O-中間体からN-中間体への反応経路のあることが明らかになった。以上の結果をまとめたY185F-bRの光反応サイクルをFig. 6Bに示す[4,9]。

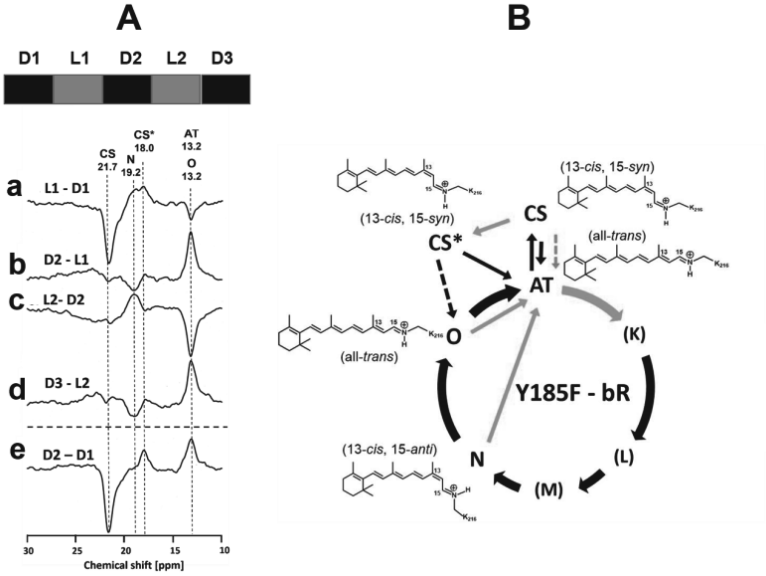


Fig. 6 Photoreaction cycle of Y185F-bR. A: ^{13}C CP-MAS difference spectra of [20-^{13}C]Ret-Y185F-bR. (a) difference spectrum (Light1 – Dark1). (b) Dark2 – Light1. (c) Light2 – Dark 2. (d) Dark3 – Light2). (e) Dark2 – Dark1. B: Photoreaction cycle of Y185F-bR[4,9].

（文献）

[1]. Y. Tomonaga, T. Hidaka, I. Kawamura, T. Nishio, K. Ohsawa, T. Okitsu, A. Wada, Y. Sudo, A. Ramamoorthy, A. Naito. An active photoreceptor intermediate revealed by in situ photoirradiated solid-state NMR spectroscopy. Biophys. J. 101, L50-L52 (2011)..

[2]. H. Yomoda, Y. Makino, Y. Tomonaga, T. Hidaka, I. Kawamura, T. Okitsu, A. Wada, Y. Sudo, A. Naito, Color-discriminating retinal configurations of sensory rhodopsin I by photo-irradiationsolid-state NMR spectroscopy. Angew. Chem. Int. Ed. 53, 6960-6964 (2014).

[3] A. Naito, I. Kawamura, Advances in Biological Solid-State NMR-Proteins and Membrane Active Peptides. Ch. 20 Photoactive structural changes in photoreceptor membrane proteins as revealed by in situ photoirradiation solid-state NMR spectroscopy. Eds. F. Separovic, A. Naito. Royal Society of Chemistry (2014).

[4]. K. Oshima, A. Shigeta, Y. Makino, I. Kawamura, T. Okitsu, A. Wada, S. Tuzi, T. Iwasa, A. Naito. Characterizatioin of photo-intermediates in the photo-reaction pathways of a bacteriorhodopsin Y185F mutant using in situ photo-irradiation solid-state NMR spectroscopy. Photochem. Photobiol. Sci., 14, 1694-1702 (2015).

[5] A. Naito, I. kawamura, N. Javkhlantugs, Recent solid-atate NMR studies of membrane-bound peptides and proteins Annu. Rep. NMR Spectrosc., 86, 333-411 (2015)

[6] A. Naito, Y. Makino, I. Kawamura. In-situ photo irradiation solid-state NMR spectroscopy applied to retinal binding protein. Modern Magn. Reson. 537-557 (2017).

[7] A. Naito, Y. Makino, Y. Tasei, I. Kawamura. Photoirradiation and microwave irradiation NMR spectroscopy. Expefrimental approaches of NMR spectroscopy. Methodology and application of life science and materials science. The NMR Society of Japan. Ed. Springer (2018).

[8] Y. Makino, I. Kawamura, T. Okitsu, A. Wada, N. Kamo, Y. Sudo. Retinal configuration of ppR intermediates revealed by photoirrdiation solid-state NMR. Biophys. J. 115, 72-83 (2018).

[9] A. Naito, Y. Makino, A. Shigeta, I. Kawamura. Photoreavtion pathways and photointermediatews of retinal-binding ohotoreceptor proteins as revealed by in situ photoirradiation solid-state NMR spectroscopy. Biophysd. Rev. 11, 167-181 (2019).

P54

水和脂質膜中での高度不飽和脂肪酸脂質の運動性解析

○大田英和，　梅川雄一，花島慎弥，土川博史，† 村田道雄
大阪大学大学院　理学研究科

Mobility analysis of polyunsaturated fatty acid lipids in model membranes

○Hidekazu Ota, Yuichi Umegawa, Shinya Hanashima,
Hiroshi Tsuchikawa, Michio Murata
Graduate School of Science, Osaka University

Glycerophosholipids largely acquired their structural variety from their acyl chains. Polyunsaturated fatty acids (PUFAs) have two or more olefins, and play critical roles in membrane functions. Lately, it has been revealed that the ω-3 fatty acid, docosahexaenoic acid, is essential in disk membranes of retina for retaining their morphology. Yet, a behavior of PUFA-containing lipids in membrane remains elusive. In this study, we focused on two PUFA-containing membrane lipids, palmitoylarachidonylphosphatidylcholine (PAPC) and palmitoyldocosahexaenoylphosphatidylcholine (PDPC), and compared them on ^{2}H solid-state NMR spectra and DPH fluorescence anisotropy. The results suggested that the orientation of PAPC and PDPC is different from that of usual saturated acyl-chain, and the fluidity of PAPC membrane is higher than that of PDPC membrane.

生体膜を構成するグリセロリン脂質は脂肪酸組成によって多様性を獲得している。これら脂肪酸のうち、二重結合を二つ以上持つものが高度不飽和脂肪酸(PUFA)と呼ばれている。PUFAは、強い生理作用を有する脂質メディエーターとしての役割に加えて、特異な膜物性によっても生命活動に重要な役割を担っているとされている。近年、ω-3系列のドコサヘキサエン酸は視覚に関わる桿体細胞円盤膜の維持に必要不可欠であることが明らかになるなど［1］、PUFA脂質の膜物性を解析することは生命現象の解明につながると考えられている。本研究では、PUFA脂質の膜中で挙動解析を目指し、ω-3、及びω-6系列の脂肪酸を持つリン脂質（Fig. 1）において、その動的挙動を^{2}H固体NMR法や、蛍光分光法等を用いて比較した。

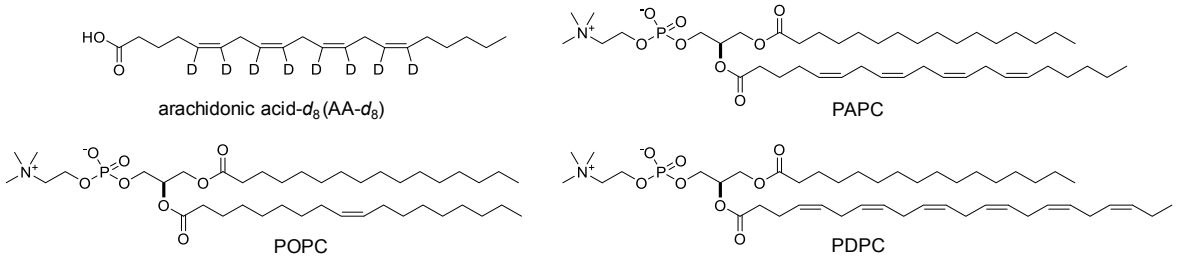


Fig. 1. Chemical structures of ^{2}H labeled PUFA and unsaturated phospholipids.

高度不飽和脂肪酸、水和脂質二重膜
○おおた ひでかず, うめがわ ゆういち, はなしま しんや, つちかわ ひろし, むらた みちお
†現所属：大分大学 全学研究推進機構

まず、PUFA脂質の特異な膜物性をNMRによって観測できるかどうかを調べるため、市販の^{2}H標識アラキドン酸(AA-d_8, Fig.1)を含む同位体異性体混合物を飽和脂質のDPPCとコレステロール(Chol)から成るリポソームに添加し、^{2}H固体NMR測定を行った。その結果、15～20 kHzの比較的大きな分裂幅と持つ成分と、2 kHz程度の小さな分裂幅を与える成分が得られた。これは以前にRajamoorthiらによって報告されたAA-d_8をアシル鎖に持つPAPC(Fig.1)の^{2}H固体NMR測定のスペクトル［2］と類似した結果であった。次にこれら四極子分裂幅の温度依存性を測定したところ、大きな分裂幅を与える信号は温度上昇に伴い、分裂幅が減少した。その一方で、スペクトル中心付近の小さな分裂幅を与える信号では、温度上昇に伴い分裂幅の上昇が見られた。このことは、AAの安定配座が温度依存的に変化し、C-^{2}Hベクトルと膜法線のなす角が変化したことを示唆している。

次に、1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH)蛍光異方性測定によってPAPCおよびPDPCとCholの混合膜における膜の流動性を評価した(Fig. 2)。その結果、PUFA脂質を含む二重膜では一価の不飽和脂質(POPC, Fig.1)に比べDPH蛍光異方性が低下しており、膜の流動性が高いことが分かった。またPUFA脂質間で比較した場合、以前に報告されたように［3］、四価不飽和脂質であるPAPC(Fig.1)膜の方が六価不飽和脂質のPDPC(Fig.1)膜よりも高い流動性を持つことが確認された。このことから不飽和度や炭素長のわずかな違いが膜中のPUFAの配向に影響を与えることによって膜物性に差が生じたと考えられる。これらが生体膜での特異な脂質-脂質間、脂質-タンパク間の相互作用に深く関わっていること示唆している。

現在、より詳細な配向や運動性解析を目指し、PUFA脂質への重水素の位置選択的導入、およびその^{2}H固体NMR測定を試みている。

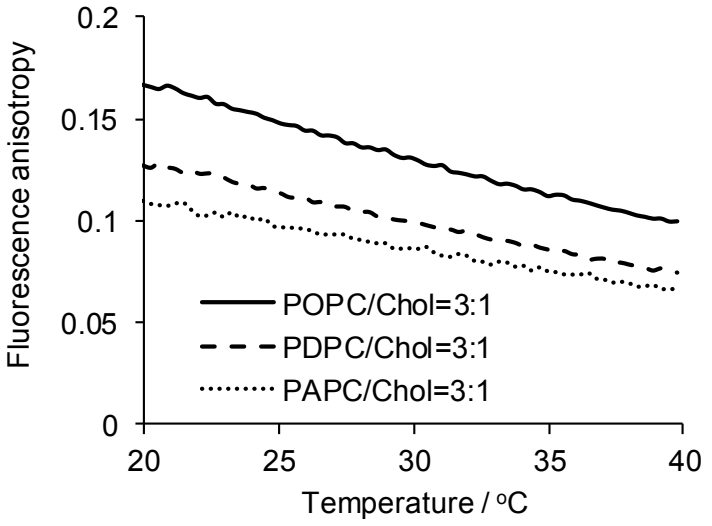


Fig. 2. Temperature dependence of DPH anisotropy in various unsaturated phospholipid bilayers.

Reference

［1］ Shindou, H. *et al. J. Biol. Chem.* **2017**, *292*, 12054−12064.

［2］ Rajamoorthi, K. et al. *Biochemistry* **1991**, *30*, 4202−4212.

［3］ Rajamoorthi, K. et al. *J. Am. Chem. Soc.* **2005,** *127,* 1576−1588.

P55

固体NMRによるフェニルアラニンジペプチドの自己組織化ファイバーの構造解析

○川村 出[1,2]，尾澤夢実[2]，Batsaikhan Mijiddorj[2,3]，茅野洋平[1]，佐藤久子[4]，上田一義[2]，内藤 晶[2]
1 横浜国立大学 大学院理工学府, 2 横浜国立大学 大学院工学府
3 モンゴル国立大学, 4 愛媛大学

Solid state NMR study of structure in self-assembled diphenylalanine fiber

○Izuru Kawamura[1], Yumi Ozawa[2], Batsaikhan Mijiddorj[2,3], Yohei Kayano[1], Hisako Sato[4], Kazuyoshi Ueda[2], Akira Naito[2]
1 Grad. Sch. Eng. Sci., Yokohama Natl. Univ., Japan,
2 Grad. Sch. Eng., Yokohama Natl. Univ., Japan,
3 Natl. Univ. Mongolia, Mongolia, 4 Ehime Univ., Japan.

Self-assembling phenylalanine dipeptides (Phe-Phe) have garnered interest owing to their potential for creating new functional materials. Here, we designed 2 diastereomers, L-Phe-L-Phe (FF) and L-Phe-D-Phe (Ff) to investigate the chiral effect on the self-assembly. Using ^{13}C, ^{15}N and ^{2}H solid-state NMR measurements, we found not only the difference of backbone conformations but also extremely rigid motions of the phenyl-ring in the self-assembly. Using by solid-state vibrational circular dichroism (VCD), observed vibrational differences among both peptides were related with the SSNMR data. MD simulations also showed two different self-assembly behaviors based on different formations of inter-molecular hydrogen bonds. We concluded that the D-Phe leads to the dramatic structural changes to the Phe-Phe dipeptides, resulting two different behaviors of self-associations.

【はじめに】 自己組織化生体材料の設計および制御は近年大きな注目を集めている。特に，フェニルアラニンからなるジペプチドやトリペプチド，またはその誘導体の自己集積においてはペプチド特有の構造柔軟性によって特徴的な超分子構造が形成されるため、自己組織化ナノ構造を調製するための適切な単位として扱うことができる。特にフェニルアラニンで構成される短ペプチドは溶媒などの条件によって多様な構造を形成し，生体適合材料や圧電素子など様々な応用が期待されている。本研究では自己組織化に対するキラルの影響を調べるために，ジアステレオマーL-Phe-L-Phe (FF)とL-Phe-D-Phe (Ff)を設計し，SEM，TG，固体VCDなどの測定とともに，^{13}C, ^{15}N, ^{2}H固体NMR測定を実施した。

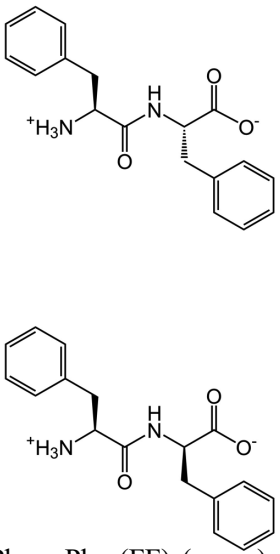


Fig. 1 L-Phe-L-Phe (FF) (upper) and L-Phe-D-Phe (Ff) (bottom).

固体NMR、ペプチド、自己組織化

○かわむら いずる，おざわ ゆみ，ばとさいはん みじどるじ，かやの ようへい，さとう ひさこ，うえだ かずよし，ないとう あきら

【試料調製・方法】ジペプチドFFとFfは固相合成によってそれぞれ合成し，ODS C18カラムを備えた逆相HPLCによって精製した(純度95%以上)。また、VCD測定などのために光学対掌体ffとfFも調製した。自己組織化の手順は10 mgのジペプチドを100 μLのヘキサフルオロイソプロパノールHFIPに溶解させ，超純水900 μLを加えて，数時間静置した。自己組織化後，吸引ろ過を行い，試料を室温・大気圧で十分に乾燥させた。重水素NMR測定用に，1残基目のPheの芳香環が重水素化(d5-ring phenylalanine)したFFとFfを合成した。固体NMR測定はBruker 600 MHz固体NMR分光計を用いて^{13}Cと^{15}N CP-MAS測定を実施した。^{2}H NMR測定はCMX-400 infinity分光計、四極子エコー法で行った。

【結果と考察】FFおよびFfの自己組織化によって、幅400 nmほどのファイバーの構造体を形成した。Fig. 2には自己組織化したFFとFfの^{13}C CP-MAS(カルボニル領域)と^{15}N CP-MASのデータを示す。FFとFfでピーク位置が明らかに異なることがわかる。特に，^{13}COO-の信号はおよそ1 ppm, N端($^{15}NH_3^+$)とアミド窒素(^{15}NH)はおよそ8 ppmと15 ppmの差が生じていた。これはペプチドの主鎖のコンフォメーションと水素結合がFFとFfの間で大きく異なっていることを示唆している。

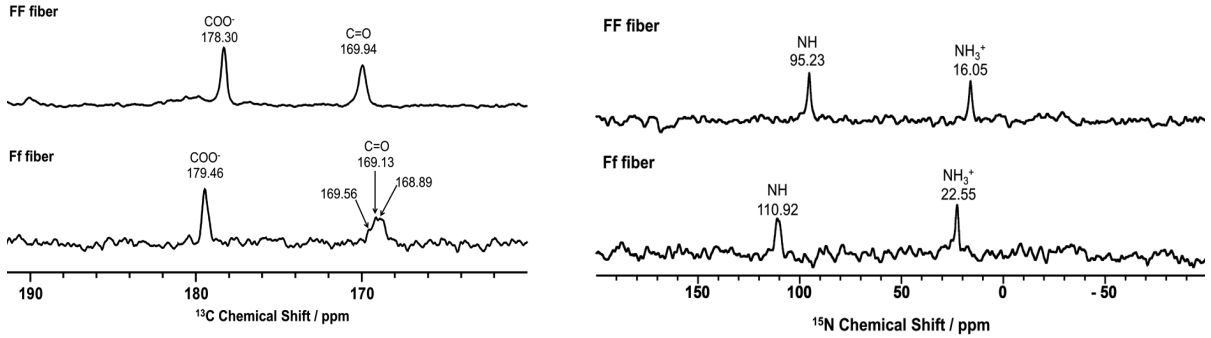


Fig. 2 (left) ^{13}C CP-MAS NMR spectra of FF and Ff (192-160 ppm). (right) ^{15}N CP-MAS NMR spectra of self-assembled FF and Ff.

続いて、自己組織化構造における芳香環側鎖の運動性について^{2}H NMRによる評価を行った(Fig. 3)。結晶フェニルアラニンでは芳香環のフリッピング運動を示唆する線形を得た。一方で、自己組織化したFFとFfは±60 kHzの分裂パターンを示し、それぞれの自己組織化構造体において芳香環側鎖はほぼ静止していると考えることができる。また、昇温させた^{2}H NMR実験を行なったところ、FFは静止状態を示す分裂パターンが残っていたが、Ffでは分裂パターンが大きく減少した。このことは芳香環同士のパッキングの強さに関係し、自己組織化構造体の安定性に寄与していると考えられる。実際、我々が行なったTG-MSによる実験から熱分解温度はFFの方が高いことを示していた。

【まとめ】D体を導入した自己組織化ペプチドにおいて、固体NMRスペクトルからキラリティの影響を示した。現在、分子動力学シミュレーションによる構造解析を進め、実験データとの比較を進めている。

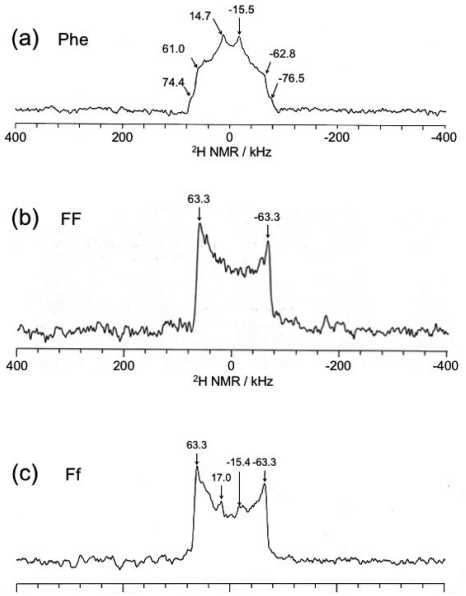


Fig. 3 ^{2}H NMR spectra of (a) d5-phenyl-labeled Phe crystal, (b) Self-assembled FF and (c) Self-assembled Ff at 298 K.

P56

Practical study of protein measurement by ^{1}H detection MAS solid-state NMR

○Xin Zhang[1], Hajime Tamaki[1] and Toshimichi Fujiwara[1]

[1]*Institute of Protein Research, Osaka University*

Proton detection solid-state NMR under fast MAS condition dramatically improves sensitivity of NMR signals and enables us to measure expansive targets. This was exemplified by our experiments for the almost complete ^{1}H and ^{13}C, ^{15}N main chain signal assignments of protein GB1. However, the spectra resolution along proton detected axes was limited by incomplete removal of proton-proton dipolar couplings and the narrow dispersion of ^{1}H chemical shifts for large proteins. Until now, limited samples provide well separated ^{1}H signals, and ultra-fast MAS frequency (>100 kHz) experiments for the improvement in proton-proton dipolar decoupling is performed at the cost of low sensitivity due to reduced amount of samples. Therefore, we should continue to develop sample preparation techniques to expand the application of proton detection solid-state NMR. Here, we developed a complete $^{1}H/^{2}H$ back-exchange protocol for H_N in proteins with transmembrane helices, which can be used for narrowing ^{1}H signals and improving spectral resolution along the proton axes for membrane protein samples in solid-state NMR.

Introduction

Proton detection is the most useful way for increasing sensitivity in NMR since proton has high gyromagnetic ratio. However, in solid states the strong dipolar interaction between protons leads to significant ^{1}H line broadening at moderate magic-angle spinning (MAS) frequencies and makes the proton detection solid-state NMR (ssNMR) useless.

Combination of increasing the MAS frequency and dilution of ^{1}H content can further narrow ^{1}H linewidth by reducing the remaining proton-proton dipolar interactions. However, the increasing of MAS frequency needs advanced probe with smaller rotor, the most advanced equipment available in market support 150 kHz MAS frequency by using 0.6 mm rotor, which narrows the ^{1}H resonance at the expense of reduced sample volume leading to decrease in the sensitivity. Therefore, in most cases, we need to prepare deuterium labeled protein samples for ssNMR study of large protein molecules because those proteins require higher sensitivity given by larger sample volume.

For most proteins, we can use perdeuteration and reprotonation method to make deuterated with amide ^{1}H labeled samples for ssNMR experiments. However, proton exchange rate depends mainly on solvent accessibility. Thus, proteins are unfolded to expedite the $^{1}H/^{2}H$ exchange. However, membrane proteins are often difficult to reconstitute into lipid bilayers in native state after the $^{1}H/^{2}H$ exchange in unfolded states.

In this study, we evaluate the necessity of deuteration for ^{13}C, ^{15}N uniformly labeled proteins GB1 and halorhodopsin (HR) from *Natronomonas pharaonis* by applying multidimensional NMR. We are also developing a complete H_N back-exchange protocol including proteins having transmembrane helices. By using this deuterium labeling sample preparation method we can obtain high-resolution proton detection ssNMR spectra for native state membrane proteins that have large molecular weight with less homogeneity under 70 kHz MAS frequency.

Method and results

We have measured CP-based ^{1}H-^{15}N HSQC spectra and 3D (H)CANH spectra for fully ^{13}C and ^{15}N labeled native state HR in lipid bilayer and microcrystalline GB1 at 70 kHz MAS. We made

solid-state NMR, signal assignments of proteins, H/D exchange

○ちゃんきん　たまきはじめ　ふじわらとしみち

an almost complete backbone signal assignment for 56 amino-acid residues protein GB1 (Fig .1). Compared with GB1 spectra, heavily overlaps are found in spectra of HR (Fig .2), which are due to less homogeneity and large molecular weight with about 260 residues. The serious overlaps in HR spectra prevent any clearly assign for HR. The result showed that 70 kHz MAS frequency is not enough for reducing proton-proton dipolar couplings and providing narrow enough ^{1}H linewidth for signal assignment of large membrane proteins with low homogeneity.

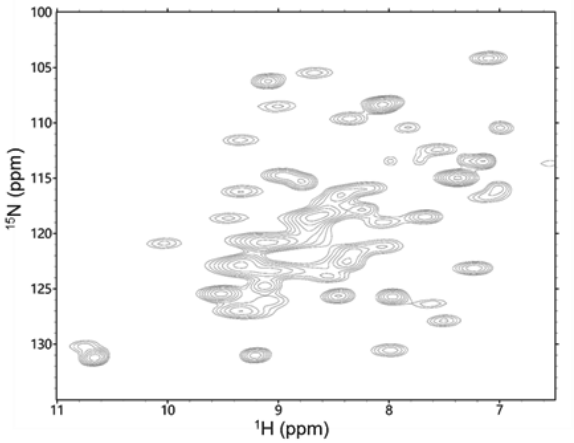


Fig. 1 ^{1}H-^{15}N HSQC spectrum of fully proton labeled GB1.

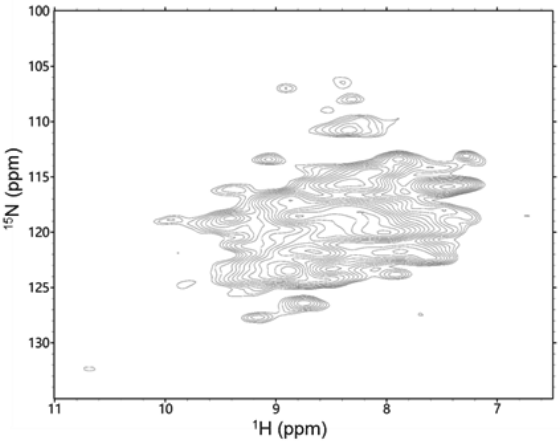


Fig. 2 ^{1}H-^{15}N HSQC spectrum of fully proton labeled HR.

Therefore, ^{2}H-labeled HR samples are necessary for ssNMR structure analysis for HR. However, the limited proton exchange rate in transmembrane regions prohibited direct proton exchange for making deuterated HR with protonated backbone under native states. Previous study showed that after 1-month proton exchange the core of bacteriorhodopsin still remained deuterated[1]. Here we designed an unfolding and refolding method for proton exchange using on-column method. By unfolding HR we can increase the proton exchange rate at transmembrane regions, which allows us to make protonated backbone amides by proton back-exchange method. A successful reconstitution would allow us to obtain native state HR for further structural analysis at higher resolution.

In this unfolding and refolding experiment, we used SDS for solve and unfold HR; DDM with retinal and DMPC liposome are used for reconstitution. The state of HR is checked by UV/Vis spectrum (Fig.3) and CD spectrum, which showed after reconstitution we could obtain monomer native state HR with a yield about 10%.

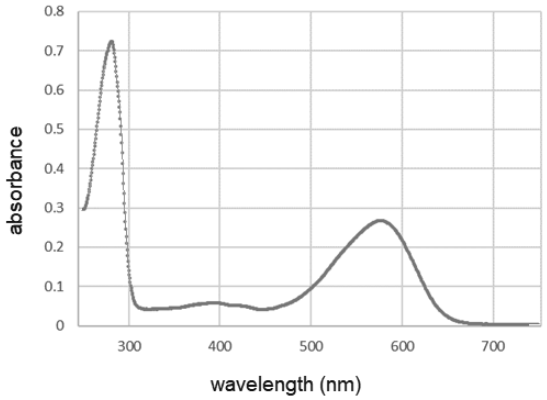


Fig. 3 UV/Vis spectrum of refolded HR. Arrow shows the characteristic absorbance peak of native state HR.

References

(1) Linser, Rasmus, et al. "Proton-detected solid-state NMR spectroscopy of fibrillar and membrane proteins." Angewandte Chemie International Edition 50.19 (2011): 4508-4512.

P57

好熱菌H^+-ATP合成酵素サブユニット*c*リングの膜内構造の精密化

○戸所泰人[1], 姜秀珍[2,3],鈴木俊治[4],吉田賢右[5],池上貴久[6],藤原敏道[3],阿久津秀雄[3,6]

1阪大・理, 2ソウル大,3阪大・蛋白研, 4東工大,5京産大,6横市大・生命医科学

Structure refinement of thermophilic H^+-ATP synthase subunit c-ring in lipid bilayers

○Yasuto Todokoro[1], Su-jin Kang[2,3], Toshiharu Suzuki[4], Masasuke Yoshida[4,5], Takahisa Ikegami[6], Toshimichi Fujiwara[3], Hideo Akutsu[3,6]

1Department of Science, Osaka University

2Seoul National University

3Institute for Protein Research, Osaka University

4Tokyo Institute of Technology

5Kyoto Sangyo University

6Graduate School of Medical Life Science, Yokohama City University

A rotary motor ATP synthase is located in bacterial plasma membranes, thylakoid membranes of chloroplasts, and mitochondrial inner membranes. F-type ATP synthase from a *thermophilic Bacillus* PS3 (TF_oF_1-ATP synthase) is one of them. TF_o subunit *c* (TF_oc) consists of 72 amino acids, and forms an oligomeric ring, which acts as a proton motor. The proton-transfer mechanism has not been understood in detail however several structures of *c*-ring have been determined by X-ray crystal spectrometer and cryo-electron microscopy. Thus, we determined the structure of the TF_oc-ring reconstituted into liposomes to elucidate the proton-transfer mechanism by solid state NMR. The TF_oc-ring structures were reported before, but they were refined using a new force field, *eefxPot*, include Lennard-Jones potential, electrostatic, and solvation energy.

H^+-ATP合成酵素は生体エネルギー変換系の最終段に位置する巨大膜タンパク質複合体であり、真核生物ではミトコンドリア内膜に、バクテリアでは細胞膜に存在する。ATP合成酵素は、生体膜を介した水素の電気化学的ポテンシャルを利用して、ADPとリン酸からATPを合成する。バクテリアでは、主に$\alpha_3\beta_3\gamma\delta\varepsilon$のサブユニットからなる膜表在性の$F_1$と$ab_2c_{8\sim15}$のサブユニットで構成される膜内在性$F_o$から構成され、サブユニット*c*は複数集まってring構造を形成している。本研究では、好熱菌PS3由来ATP合成酵素F_oのサブユニット*c*-ring（以下TF_oc-ring）に注目した。*c*-ringは、生物種によってring構造を構成するオリゴマーの数が異なるが、プロトン輸送によるringの回転は共通している。X線結晶構造解析やクライオ電子顕微鏡により界面活性剤中のring構造が幾つか報告されたが、脂質膜中の構造は全く報告されていない。そこで、回転メカニズム解明に向けて、生体内の環境に近い脂質膜中でのTF_oc-ringの構造決定を固体NMRによりおこなった。

膜たんぱく質、固体NMR、ATP合成酵素

○とどころやすと，かんすじん，すずきとしはる，よしだまさすけ，いけがみたかひさふじわらとしみち，あくつひでお

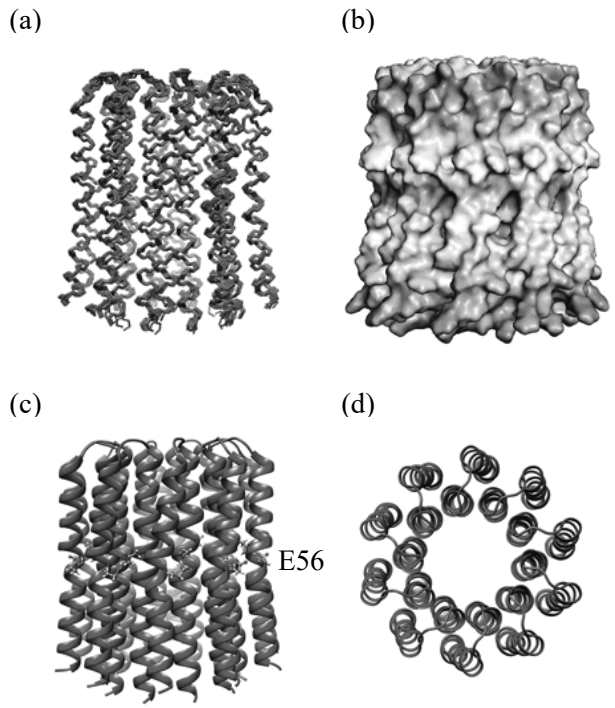


Fig. 1 Structures of TF_oc-ring in membrane determined by solid-state NMR. (a) Superimposed 10 structures. (b) Electrostatic potential mapped with positive or negative areas in gray. Cartoon representation of the ring, viewed from membrane (c) and F_1 (d).

脂質二重膜に再構成したH^+-ATP合成酵素subunit *c*-ringの構造は第52回NMR討論会において報告した。今回は新たに主に脂質環境を再現した陰的溶媒モデルを用いて、より精密で、より天然状態の構造を目指し、リファインメントを行った。Xplor-NIHによる構造計算で構造決定を行っている。従来までのXplor-NIHは非結合性の相互作用ポテンシャルにおいてファンデルワールス反発力のみを考慮した力場つまりファンデルワールス分子間力、静電力、溶媒和エネルギーは含まれていない力場を用いていた。今回用いた新しい力場（*eefxPot*）ではレナード-ジョーンズ・ポテンシャル（ファンデルワールス力）、静電エネルギー、溶媒和自由エネルギーが考慮され、より正確な構造決定が期待される。

構造計算に用いる距離拘束を得るために、大腸菌大量発現系により調整した^{13}C,^{15}N均一標識およびリバースラベル法による部分標識した計4種類の試料を用いた。それらの試料は界面活性剤を用いてインタクトなTF_oc-ringを精製し、DMPC（dimyristoylphosphatidylcholine）でできた脂質二重膜に再構成している。距離相関は上記の4種類の試料のDARR法あるいはspin diffusion法による2D ^{13}C-^{13}C相関スペクトルを用いた。それぞれのサンプルについて混合時間 15、50、100、200、400、600、700 msのスペクトルから距離情報を得た。

得られた距離情報によりXplor-NIHを用いてTF_oc-ringの構造計算を行った。構造計算は2ステップで行った従来の力場を用いてシミュレーティド・アニーリングをおこないホールド構造を計算し、次に*eefxPot*を用いて構造のリファインメントをおこなった。TF_oc-ringは同一の10分子が集まったデカマーであり、分子間の帰属において左右の区別ができない。そこでモノマーのみの構造を決め、分子間の帰属を判別した。最終的には拘束条件として1分子につき分子内6900個(ヘリックス間も含む)、分子間560個の距離制限、TALOSによる二面角制限、水素結合を拘束条件に100個構造計算した。エネルギーの低い10個のTF_oc-ring構造について重ねて表示した（Fig.1a）。

精密化した脂質膜内TF_oc-ringの構造は、界面活性剤中の結晶構造や電子顕微鏡による原子モデルと同様の構造をとっていた。構造の内側2～36残基、外側41～70残基でヘリックスをとるhelix-turn-helix のヘアピン構造となっている（Fig.1c,d）。表面電荷は脂質との接触面は活性部位であるE56付近を除いて疎水的で、ヘリックスの両端には電荷を持ち、DMPC膜に合う構造となった（Fig.1b）。活性部位E56は膜内の疎水的環境にあるため、側鎖の方向が内側のclosed構造とった（Fig.1c）。一方、中心のホール部分は正電荷をもち、ホールは溶媒が出入りしている可能性も示唆された。この結果はクライオEMによるモデルとも一致する。溶媒和エネルギーを考慮していないときには表れていなかった結果なので検討したい。

P58

固体NMRを用いたAβ(1-42)線維へのEGCG添加による構造変化の検出

○藤田健太郎[1]，松田勇[1]，石黒貴也[1]，石井佳誉[1,2]
[1]東京工業大学　生命理工学院
[2]理化学研究所　放射光科学研究センター　NMR研究開発部門

Detection of structural changes by adding EGCG to Aβ(1-42) fibrils using solid-state NMR

○Kentaro Fujita[1], Matsuda Isamu[1], Takaya Ishiguro[1], Yoshitaka Ishii[1,2]
[1]School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology
[2]NMR Science and Development Division, RIKEN SPring-8 Center

Alzheimer's disease has become a major social problem with the aging of the population, but its fundamental treatment has not been developed yet. In this study, we prepared fibril of 42-residue amyloid-β (Aβ(1-42)), which are the causative proteins of Alzheimer's disease, and analyzed the structural changes using solid-state NMR when EGCG, a kind of catechin contained in green tea, was added to fibrils. The structural change is estimated from the ^{13}C chemical-shift changes in the spectrum of Aβ(1-42) to which EGCG was added by solid-state 2D ^{13}C -^{13}C NMR measurement. In this study, it was suggested that EGCG mainly binded to the region of Aβ(1-42) from V18 to A21. This study aims to gain structural understanding of Aβ(1-42) fibril that are interacting with EGCG and contribute to the development of therapeutic drugs.

【背景】

高齢化に伴い、アルツハイマー病は大きな社会問題となっているが、その根本的な治療薬はいまだに開発されていない。アミロイドβ(Aβ)とは膜タンパクAPP(Amyloid precursor protein)の一部が切り出されて産生される40～43残基からなる疎水性のタンパク質である。アルツハイマー病では、Aβが会合して線維を形成し、脳内に老人斑として蓄積する。凝集したAβによる毒性により、脳神経が変性され、アルツハイマー病の発症につながるというメカニズムが示唆されてきた。脳内には40残基と42残基のAβが主なアイソフォームとして存在するが、老人斑の主成分である42残基のAβ(1-42)が特に線維化が速く、神経毒性が高い。Aβ(1-42)線維は、分子内にβシートを複数もつS字型のモノマーが連なって構成されており、分子間における疎水性相互作用や水素結合によって安定化されたクロスβシート構造をとることが分かっている[1]。近年、Aβ(1-42)に作用する低分子化合物が数多く探索されているが、その１つにEGCG(Epigallocatechin gallate)がある。EGCGは緑茶に多く含まれるポリフェノールで、緑茶中のカテキンの約半分を占めている成分である。EGCGはAβ(1-42)の凝集を阻害するほか、Aβ(1-42)繊維を減少させるという報告もあるが、詳しい作用機序が解明されていない[2]。本研究の目的は、アルツハイマー病の原因とされているAβ(1-42)線維にEGCGを添加した時のAβ(1-42)の状態を透過型電子顕微鏡(TEM)や固体NMRを用いて解析し、Aβ(1-42)のその結合部位と、線維が起こす構造変化を明らかにすることである。

アルツハイマー病、Aβ(1-42)線維、EGCG

○ふじた けんたろう，まつだ いさむ，いしぐろ たかや，いしい よしたか

【実験】

Aβ(1-42)線維は、Aβ(1-42)モノマーをペプチド合成機・HPLCによって合成・精製した後、室温でインキュベーションして作製した。ThTを用いた蛍光測定で線維化の進行をモニタリングし、透過型電子顕微鏡によって線維の存在を確認した。Aβ(1-42)線維のサンプルを２つに分け、一方にのみEGCGを加えて両者をさらに室温でインキュベーションした。次に、Aβ(1-42)線維にEGCGを添加した試料と、コントロールとして添加していない試料の分子レベルでの構造的な違いを明らかにするために、固体NMRによる測定を行い、両者を比較した。固体NMRでは5残基のみを^{13}C標識したAβ(1-42)線維を作製し、DARR法を用いた^{13}C-^{13}C 2D測定を行い、スペクトルを比較して構造変化を起こしているかどうかの検討を行なった。EGCGはAβ(1-42)の約10倍の濃度に相当する量を添加した。

【結果】

V12L17G25A30I32を^{13}C標識したAβ(1-42)に関して、EGCGを添加した試料としていない試料の^{13}C-^{13}C 2Dスペクトルを比較したところ、5残基全てにおいて同様のスペクトルが見られ、クロスピークの位置の差異は最大で0.2ppm以下であった。一方、V18F19A21G33L34を^{13}C標識したAβ(1-42)に関して、A21のピークが3つ存在していたのがEGCGの添加によって1つになった。また、V18(Cα-Cβ)のクロスピークの位置が1.0ppm変化していた。さらに、F19(CO-Cα)も1.2ppmの変化を確認した。EGCGがAβ(1-42)のV18からA21付近の領域に対して部位特異的に影響を及ぼしているということが示唆される。

References

1.Xiao Y et al., *Nat. Struct. Mol. Biol*. **6** , 499-505(2015)

2.Palhano FL et al., *J. Am. Chem. Soc.* **135** ,7503-7510(2013)

P59

タンパク質の固体NMR分解能向上のための側鎖選択的重水素標識法の開発

○宮崎勇輝[1]，高橋涼[1]，松田勇[1]，山崎俊夫[2]，石井佳誉[1,2]
[1]東京工業大学生命理工学院
[2]理研RSC NMR部門

New method for selective deuteration of side chains for high-resolution protein SSNMR

○Yuki Miyazaki[1], Ryo Takahashi[1], Isamu Matsuda[1], Toshio Yamazaki[2], and Yoshitaka Ishii[1,2]
[1]*School of Life Science and Technology, Tokyo institute of Technology*
[2] *NMR Division, RIKEN SPring-8 Center, RIKEN*

1行空けます

Solid-state NMR (SSNMR) measurement using ^{1}H detection is attracting attention as a powerful method of protein structure determination. However, the ^{1}H line broadening due to ^{1}H-^{1}H dipolar interactions cannot be completely eliminated even with the 100 kHz ultra-fast MAS, which is an obstacle to signal assignment and structure determination. In this study, we developed a method to selectively deuterate side chains at a high deuteration level with *E. coli BL21 (DE3)* expression system while maintaining the protons at the α-positions, which are useful for determining the backbone structure. ^{1}H-detected 2D ^{1}H-^{13}C SSNMR data showed a drastically simplified spectrum and improved resolution for a microcrystalline sample of uniformly ^{13}C- and ^{15}N-labeled GB1 protein that was deuterated by this method.

1行空けます

序論

^{1}H観測を用いた固体NMR法はタンパク質構造決定の有力手法として注目を集めている。しかし、1H-1H双極子相互作用による1H線幅増大は100kHzの超高速MASを用いても完全には除去できず、信号帰属と構造決定上の障害となる。側鎖スペクトルの単純化と1H信号分解能の向上がタンパク質の主鎖構造解析の容易化に貢献できると考え、本研究では、大腸菌BL21(DE3)発現系を用いてα位の水素を1Hに保ったまま、簡便に側鎖を選択的に重水素標識する方法を開発した。

原理

側鎖の大部分を重水素標識する一方でα位を1Hに維持する本手法はアミノ酸生合成経路におけるアミノ基転移反応を原理としている。アミノ基転移反応によってα-ケト酸はアミノ酸からアミノ基を受け取りアミノ酸へと変換される。この過程でα-ケト酸のα位にはアミノ基と同時に溶媒由来の水素が導入される。この反応を利用して、私は大腸菌を用いた発現系において均一^{2}H, ^{13}C標識したグルコース由来の重水素標識α-ケト酸のα位に軽水由来の^{1}Hを導入し、側鎖のみを選択的に重水素標識する手法を開発した。

選択的重水素標識、固体NMR、分解能

○みやざきゆうき、たかはしりょう、まつだいさむ、やまざきとしお、いしいよしたか

また、クエン酸回路下流で合成されるアミノ酸において重水素標識効率が低いことを確認し、クエン酸回路阻害剤を用いた手法によって更に高い標識効率を達成した。

結果・考察

図１は、(a)^{1}H標識GB1試料と(b)選択的重水素標識GB1試料に対し900MHz固体NMR及び60kHzMASで得られた2D (H)CHのdouble-CPスペクトルを示す。本技術を用いた試料では、α領域の信号強度の維持と側鎖領域における大部分のピーク消失と信号強度の抑制を確認した。また、α領域の独立したすべてのピークにおいて約1.5倍もの^{1}H分解能の向上を達成した。これにより、今まで困難であった高分子タンパクの^{1}H検出SSNMRによる連鎖解析の有望な展望が示された。

本標識技術を用いた更なる立体構造情報の取得の見通しやサンプル調製の詳細、重水素標識のアミノ酸選択性についてはポスターにて発表する。

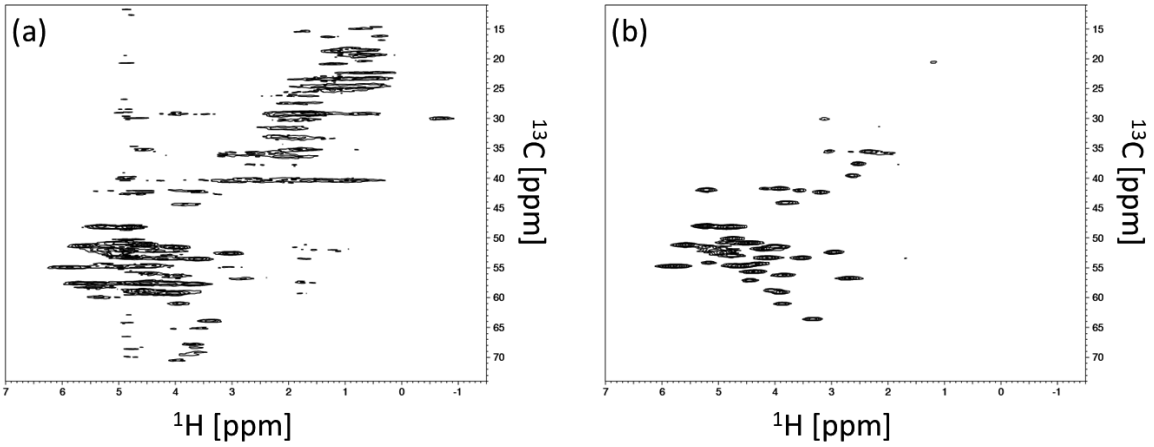


Fig. 1. 2D (H)CH double-CP SSNMR spectra of (a) fully protonated and (b)selectively deuterated microcrystalline GB1. MAS rate of 60 kHz and a ^{1}H NMR frequency of 900 MHz.

P60

固体NMRによる異種Aβ間相互作用の解析

○石黒貴也[1]，松田勇[1]，石井佳誉[1,2]
1東京工業大学　生命理工学院
2理化学研究所　放射光科学研究センター

Solid-state NMR studies of cross-seeding of Aβ40 with Aβ42 fibril

○Takaya Ishiguro [1], Isamu Matsuda[1], Yoshitaka Ishii[1,2]
1Department of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology
2RIKEN SPring-8 Center

Misfolded β-amyloid (Aβ) is 39-43 residue peptide associated with Alzheimer's disease (AD). Among different isoforms of Aβ, the most abundant isoforms in brains are 40-residue Aβ40 and 42-residue Aβ42. Despite similarities in their amino acid sequences, the two Aβ species have different properties. Aggregation kinetics and structures of both Aβ40 and Aβ42 fibrils have been studied separately to investigate the mechanism of AD. However, both Aβ40 and Aβ42 coexist in AD. Thus, it is important to understand interactions between the different isoforms of Aβs. To examine the interaction between Aβ40 and Aβ42 at atomic level, in this study, we analyzed ^{13}C SSNMR spectra for Aβ40 cross-seeded with Aβ42 fibril as fingerprints. The solid-state NMR data suggested that Aβ40 monomer is likely to interact with Aβ42 fibril, but may "cap" the terminus of Aβ42 fibril and prevent further elongation by forming a disrupted structure that was not fully templated by Aβ42 fibril.

［背景］

Aβとはアルツハイマー病に関わる40-43残基の線維性ペプチドである。そのなかでも主に脳内に存在する種は40残基のAβ40と42残基のAβ42である。Aβ40とAβ42はアミノ酸配列中の違いがたった2残基であるにもかかわらず、それぞれ異なる性質をもつ。従来の研究では、これらのAβの線維化のプロセスや構造は別々に研究されてきた[1,2]。しかし、脳内にはAβ40とAβ42が共存するため、異種Aβ間で相互作用が引き起こされるのか、またそれに伴うAβの構造変化が起きるのかについて調べることが重要だと考え、研究に至った。

本研究では、特にAβ40モノマーとAβ42線維間の相互作用について調べた。なぜなら、Aβ42はAβ40に比べて線維化が速いため、アルツハイマー病の初期の脳内ではAβ40モノマーとAβ42線維が共存すると考えられるからである。

［実験］

化学合成したAβ40とAβ42をそれぞれリン酸ナトリウム緩衝液に溶解し、Aβモノマー溶液を調製した(~40 uM, pH 7.4)。 Aβ42モノマー溶液は室温中、回転撹拌をしながらインキュベーションした。伸長したAβ42線維は超音波処理により断片化され、このAβ42線維断片をシードとして再びAβ42モノマー溶液に加えてインキュベーションすることで、より構造的に均質なAβ42線維を作製した。この操作を繰り返すことで試料の均質性を高めた。これらの操作により得られた均質な構造をもったAβ42線維をシードとしてAβ40モノマー溶液中に加えた。線維化過程は蛍光色素

ベータアミロイド、クロスシーディング

○いしぐろたかや、まつだいさむ、いしいよしたか

thioflavin Tにより記録した。回収した線維は1 mmローターに詰め、固体NMRによる測定、解析を行った。モノマーのみ^{13}C標識したAβに対してRFDR法を用いた^{13}C-^{13}C 2D測定を行った。

［結果］

蛍光観測結果について、シードを加えない時のAβ線維形成はシグモイド曲線に従う。これはモノマーからの核依存的重合反応を意味する。通常のシーディングでは、シードを加えると、オリゴマー化・線維核形成過程をスキップし、線維伸長促進効果がみられる。しかしAβ40モノマーにAβ42シードを加えたときは伸長促進効果がみられなかった。

また異種Aβ間相互作用を原子レベルで解析するために^{13}C-^{13}C 2Dスペクトルを得た。クロスシーディングサンプルにおけるスペクトルはAβ40線維、Aβ42線維におけるスペクトルと比べて線幅の増大が確認された。これはAβ40モノマーが複数の構造をとるためだと考えられる。

［考察］

固体NMR測定結果および蛍光観測結果からAβ40モノマーはAβ42線維と相互作用を引き起こし、構造変化することが示唆される。詳細な作用機構については当日の発表で議論する。

References

[1] Petkova, A. T. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A.* **2002**, 99, 16742.
[2] Xiao, Y. et al., *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2015**, 22, 499.

P61

Towards in-cell DNP MAS NMR spectroscopy of α-synuclein

Jaka Kragelj[1], Julita Chlebowicz[2], Rupam Ghosh[1], Yiling Xiao[1], Barbara Stopschinski[2], Marc Diamond[2], Kendra Frederick[1]

[1]*Department of Biophysics, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, USA*

[2]*Center for Alzheimer's and Neurodegenerative Diseases, University of Texas, Southwestern Medical Center, Dallas, USA*

For a cell to be viable, its proteins must adopt functional conformations. Defined energy landscapes drive the folding towards the thermodynamic minimum and well defined structures. Some proteins, however, display energetic folding landscapes which are rather flat. In such cases, the cellular environment will influence the folding and function of the protein. Studying proteins inside their native cellular environment using in-cell NMR spectroscopy is therefore necessary for a complete understanding of their folding and function.

In-cell NMR has been used to study protein folding and stability under crowding conditions, to determine disorder-order equilibrium populations, and latest developments have resulted in successful 3D structure determination from distance restraints measured inside mammalian cells. Solution-state NMR studies become progressively more difficult when the correlation times gets longer. Magic-angle spinning (MAS) solid-state NMR is not size-limited and can be used to study megadalton-size molecular complexes, membrane bound proteins, and oligomers. However, the main limitation of using MAS NMR spectroscopy for in-cell studies is sensitivity.

Sensitivity and specificity are crucial if we want to study proteins at physiological concentrations inside intact cells. Dynamic nuclear polarization (DNP)-enhanced MAS NMR spectroscopy provides sufficient sensitivity to allow in-cell measurements at physiological concentrations. Specificity can be achieved by introducing purified, isotopically labeled protein into cells using electroporation. The protein of interest can be distinguished from the cellular background when the cellular background contains isotopes at natural abundance and when in 2D correlation experiments are used (e.g. 13C-13C or 15N-13C). DNP MAS NMR experiments are performed at cryogenic temperatures which is a challenge and a benefit. Low temperatures allow week-long measurements on intact cells without any impact on cellular viability or integrity provided no damage occurs during freezing. Measurements at cryogenic temperatures that are non-destructive in nature open doors to new applications such as examination of cell phenotypes before and after data collection with the goal of correlating biological phenotypes directly to NMR-based structural characterization.

In-cell NMR, Hyperpolarization, Solid NMR

We developed a protocol for DNP MAS NMR spectroscopy on HEK293 cells. Using this protocol, cells are viable after DNP MAS NMR measurements. We have used this method to study an intrinsically disordered protein called α-synuclein. It can form an α-helix when it binds to cellular membranes, and this same protein can form different forms of β-strand rich aggregates in the form of fibrils. In-cell solution-state NMR and EPR have been used by other research groups to show that α-synuclein is disordered under native cellular conditions. We characterized the purified disordered form, the α-helical form, and the aggregates using DNP MAS NMR. As a first step towards in-cell studies of α-synuclein aggregates, we modified the HEK293 cell line to express an aggregation prone mutant (A53T) of α-synuclein that is fused to CFP. These cells are able to form α-synuclein aggregates that can be observed using fluorescence microscopy. Using confocal microscopy, we confirm that α-synuclein introduced using electroporation localized to the pre-existing aggregates. The described advances are the first step towards an in-cell study of α-synuclein using DNP MAS NMR spectroscopy.

P62

固体NMRによるポリビニルピロリドン中の水の状態分析

○石田宏之[1], 中田克[1], 古島圭智[1], 松田景子[1]
1 株式会社東レリサーチセンター

Structural analysis of water in polyvinylpyrrolidone by solid-state NMR

○Hiroyuki Ishida[1], Masaru Nakada[1], Yoshitomo Furushima[1], Keiko Matsuda[1]
[1] *Toray Research Center, Inc.*

The states of water in polyvinylpyrrolidone (PVP) were studied by using solid-state ^{2}H-NMR. In order to investigate the behavior of water in PVP, the temperature dependence from −90°C to 40°C of ^{2}H-NMR spectra and spin-lattice relaxation times T_1 were observed for PVP with various contents of water (D_2O). The water contents of PVP samples were adjusted to 18, 35, 57, 108, 145, 435 wt%. The results of temperature dependence of the peak area and T_1 for D_2O characterize slow and fast intermediate waters in PVP samples according to molecular mobility and interaction with PVP.

【緒言】

人工腎臓などの医療機器の多くにはポリマー材料が用いられているが、ポリマーの生体適合性の発現メカニズムは未だ解明されておらず、医療分野における重要な課題となっている。ポリマー材料表面の近傍では、ポリマーと相互作用した吸着水層が形成されている。吸着水はポリマーからの相互作用距離によって近傍水（不凍水）と中間水に分類される。また、ポリマー表面から離れたポリマーと相互作用していない水は自由水として存在し、通常のバルク水と同様の挙動を取っている。この中でポリマー材料表面における吸着水、特に中間水の存在が生体適合性の発現に大きく寄与していると着目されている[1)]。そこで本研究では、生体適合性ポリマーとして医療機器材料に広く用いられているポリビニルピロリドン（PVP）について、ポリマー中の水（重水）の状態・運動性の評価を固体^{2}H-NMRにより行った。

【実験】

乾燥重量当たりの水分率の異なるPVP（18, 35, 57, 108, 145, 435 wt%）試料を調製し、Bruker社製AVANCE 400（9.4T）分光計を用いて^{2}H-NMRスペクトル測定と反転回復法による緩和時間T_1測定を行った。測定は、40°Cから−90°Cまでの冷却過程と、更に−90°Cで12時間以上保持した後の−90°Cから40°Cまでの昇温過程で行った。なお、各温度点では約15分保持した後に測定を実施した。

【結果と考察】

水分率18～435wt%のPVP試料のスピン-格子緩和時間T_1の温度可変測定結果をFig.1に示した。水分率の低い3試料（18, 35, 57 wt%）では、降温過程と昇温過程でT_1値はほぼ一致した。一方、水分率の高い3試料（108, 145, 435 wt%）では、降温過程で−15°C～−5°Cまで過冷却が起き、昇温過程でのT_1値との間でヒステリシス様の差が生じた。自由水の存在する水分率435 wt%試料と同様に、自由水の存在しない水分率108, 145 wt%の2試料でも降温過程での過冷却が発生したことから、これらに存在する

固体NMR、ポリビニルピロリドン、中間水

○いしだひろゆき, なかだまさる, ふるしまよしとも, まつだけいこ

PVPとの相互作用が弱く比較的分子運動の速い中間水（DSCにおける融点低下水）は、自由水と同様に過冷却を起こす特徴を持っていると考えられる。これに対して、水分率の低い3試料（18, 35, 57 wt%）の結果より、PVPとの相互作用が強いため比較的分子運動の遅い中間水（DSCにおける不凍水）は過冷却を起こさない特徴があると考えられる。

水分率18～145wt%のPVP試料の昇温過程における^{2}H-NMRスペクトルのピーク面積変化を水分率に換算した結果をFig.2に示した。^{2}H-NMRスペクトルにおいては、分子運動が凍結していない水だけがピークとして観測される。−70°C以下では何れの試料においてもピークは観測されなかったが、これはPVPの分子運動が凍結し、その中に存在する水の分子運動も凍結したためと考えられる。何れの試料においても、温度上昇とともにピーク面積が増大し、ある温度以上で一定となった。

分子運動の遅い中間水のみの水分率の低い3試料（18, 35, 57 wt%）においては、Fig.2のように水分率が低い程、ピーク面積が一定になる温度が高い傾向を示した。これは、Fig.1のようにT_1値が極小となる温度が、水分率が低い方が高い、すなわちPVPとの相互作用がより強くなるため分子運動性が低いという傾向と一致している。

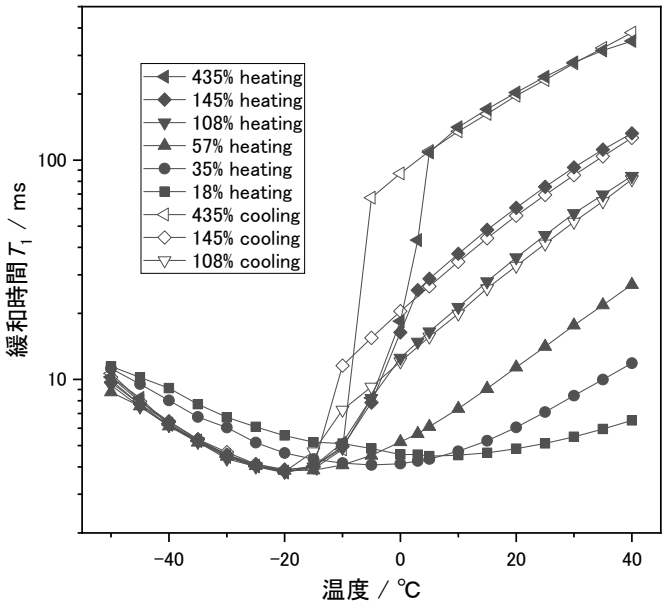


Fig. 1. Spin-lattice relaxation time (T_1) of D_2O in PVP at various temperatures.

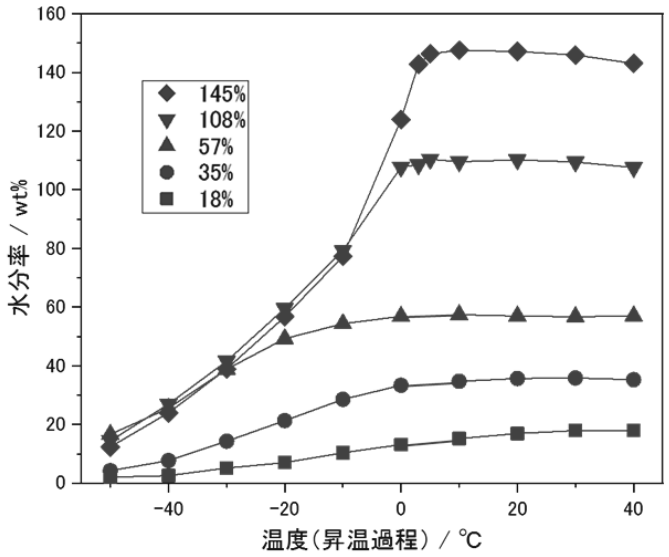


Fig. 2. Temperature dependence of the peak areas converted into water contents for D_2O in PVP.

比較的分子運動の速い中間水も存在する水分率が108, 145 wt%の試料になると、Fig.2のように−30°Cまでは57 wt%とピーク面積の増加傾向はほぼ一致しているが、それよりも高温になると比較的分子運動の速い中間水の融解が始まるために、ピーク面積は一気に増大し、重水の融点以下で一定となった。T_1値についてもFig.1のように−15°C以下では分子運動の遅い中間水のみの57 wt%と同様の傾向を示し−20°C近傍で極小を示すものの、−15°C以上では比較的分子運動の速い中間水の融解が始まることによって57 wt%に比べて急速に増大した。

≪参考文献≫

1) 田中賢: 化学と教育, **60(6)**, 250 (2012).

P63

分子性ナノ細孔によって安定化された人工 Xe ハイドレートにおける Xe 吸蔵挙動

○中山　連太朗，今泉　卓，鈴木　陽，亀渕　萌，田所　誠
東京理科大学理学部第一部化学科

Ad-/desorption Behavior of Artificial Xenon Hydrate Stabilized in Molecule-Based Nanoporous Crystal

Rentaro Nakayama, Taku Imaizumi, You Suzuki, Hajime Kamebuchi, Makoto Tadokoro
Department of Chemistry, Faculty of Science, Tokyo University of Science

Clathrate hydrates have been widely studied for their potential applications such as natural gas transportation and storage, greenhouse gas removal, refrigerant storage, *etc.* due to host-guest interactions. We employed a molecule-based nanoporous crystal, $\{\{[Ru^{III}(H_2bim)_3](TMA)\}_2\cdot 30H_2O\}_n$ (H_2bim = 2,2′-biimidazole, TMA^{3-} = trimesate), where huge water cages are stabilized. The water cages can accept Xe atoms and establish Xe clathrate hydrate by exposuring the crystal to Xe gas. In this presentation, ad-/desorption behavior of the Xe hydrate within the crystal by means of ^{129}Xe-NMR spectroscopy.

【緒言】ガスハイドレートは水分子間の水素結合により形成されるケージの内部に気体分子が取り込まれた特異な氷の構造である。その代表例であるメタンハイドレートは次世代のエネルギー源として期待されているが、海底のような低温かつ高圧な条件でしか安定に存在できない。当研究室では $[Ru^{III}(H_2bim)_3]^{3+}$ (H_2bim = 2,2′-biimidazole) と TMA^{3-} (= trimesate) を H_2O/THF = 8/2 (*v*/*v*) の混合溶媒中で拡散させることで、構成単位 (1 つのケージ) あたり 30 個の水分子からなる巨大な籠状の水和クラスターが、THF 3 分子を包接した分子性ナノ多孔質結晶 $\{\{[Ru^{III}(H_2bim)_3](TMA)\}_2\cdot 3THF\cdot 30H_2O\}_n$ (1) の合成に成功した。また、この結晶 1 を 293 K、相対湿度 50% の大気圧下で 1 時間風乾処理を行うと、THF だけが取り除かれた $\{\{[Ru^{III}(H_2bim)_3](TMA)\}_2\cdot 30H_2O\}_n$ (2) の単結晶が得られる。X 線結晶構造解析から、結晶 2 の内部の水和クラスターは中空状態になり、Xe ガスに暴露することによって人工的な Xe ハイドレートが容易に得られる。今回は固体 ^{129}Xe-NMR を用いて、このハイドレートにおける Xe の存在状態や吸蔵された Xe の定量および吸蔵過程について調べたので報告する。

【実験】結晶 2 をガラスサンプル管に入れ、液体窒素で冷却しながら Xe を導入し、封じ切ることでサンプルを調製した。封入した Xe ガスの圧力は重量および ^{129}Xe-NMR スペクトルにおけるガスピークの化学シフト値から見積もることができる。[1] 今回は 13 atm 程度 (299 K) に加圧したサンプル A について調査した。多孔質結晶中への Xe 吸蔵量の定量にはガス圧力決定時に算出した物質量を用いた。サンプリング時に封入した Xe 全量の物質量との差分を結晶中に吸蔵された Xe の物質量と考え、結晶自体の物質量で割ることで水和クラスターの 1 ケージあたりの Xe 吸蔵量を算出した。吸蔵された Xe 物質量を算出する際、結晶が多孔質であるため Xe が吸蔵されない結晶の体積分を考慮した値をエラーバーとし、その間に真の Xe 吸蔵量があるとした。

ガスハイドレート、固体 ^{129}Xe-NMR 、ガス吸蔵

◯なかやまれんたろう，いまいずみたく，すずきよう，かめぶちはじめ，たどころまこと

【結果と考察】サンプル A に対して ^{129}Xe-NMR スペクトルの温度変化を測定し、0 ppm 付近に観測される結晶 2 に取り込まれていない Xe ガスピークの化学シフト値から、ケージ 1 つあたりの Xe 吸蔵量を算出した。293 K から 203 K まで 0.7 K/min の速度で降温させ、同様の速度で 203 K から 293 K まで昇温させ、測定を行った。この際の Xe 吸蔵量を各温度に対してプロットしたところ、温度低下に伴って吸蔵量は増加し、特に 263 K 以下で急激に吸蔵量が増加する様子が観測された (Fig. 1) 。これは水和クラスターが過冷却状態で動きやすいことに起因するものだと考えている。また降温 (吸蔵) 過程と昇温 (放出) 過程で吸蔵量に差が見られた。このヒステリシスのような Xe 吸蔵挙動が本質的なものか明らかにするため、^{129}Xe-NMR スペクトルの時間変化測定を行って Xe 吸蔵量の時間依存性を調べた。一例として、248 K における吸蔵量の平衡値を調べた (Fig. 2) 。① 293 K から 248 K まで 10 K/min 程度で急速に降温したのちに、観測した吸蔵プロット (■)、② 293 K から 248 K まで 0.5 K/min 程度でゆっくりと降温したのちに、観測した吸蔵プロット (◆)、および ③ 203 K から 248 K まで 10 K/min 程度で昇温したのちに、観測した放出プロット (●) がほぼ一定の値に収束する結果が得られた。このことから Xe の吸蔵と放出では平衡へ達する時間が異なるため、ヒステリシスのような挙動が見られたのだろう。平衡到達時の吸蔵状態でも、^{129}Xe-NMR スペクトルの線形, ピーク面積強度を比較したところ違いは見られなかった。①を用いて 248 K で平衡状態に到達したときの ^{129}Xe-NMR スペクトルを Fig. 3 に示した。サンプル A は 248 K から低温になるにつれて、200 ppm 付近に 2 種類の Xe の吸蔵ピークが観測された。恐らく、低温では水和クラスターの Xe 吸蔵サイトが 2 つ存在し、2 つに別れるものと考えている。この場合、より低磁場シフトした方が、水和クラスターによる締め付けが大きく、小さなケージに取り込まれているものと判断できる。[2] 面積比から小さなケージ/大きなケージ＝約 2.0 となり、小さなケージは大きなケージと比べより多くの Xe を吸蔵していることになる。

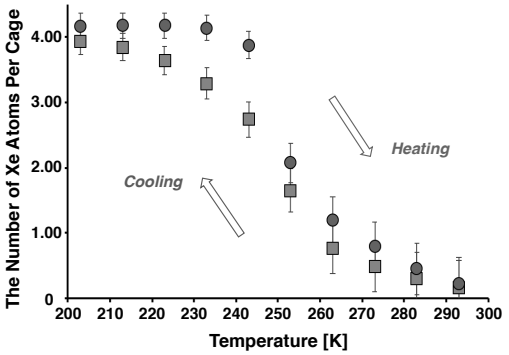


Fig. 1. Xe adsorption capacity of sample A at various temperatures

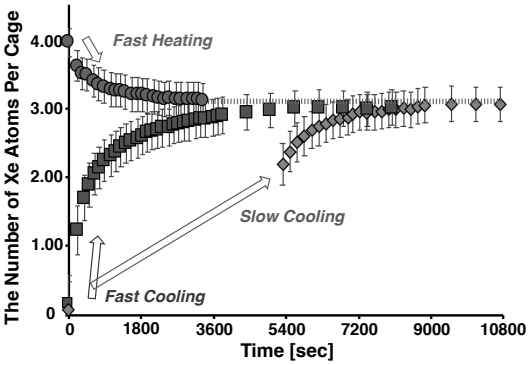


Fig. 2. Time variation of Xe adsorption capacity at 248 K (sample A)

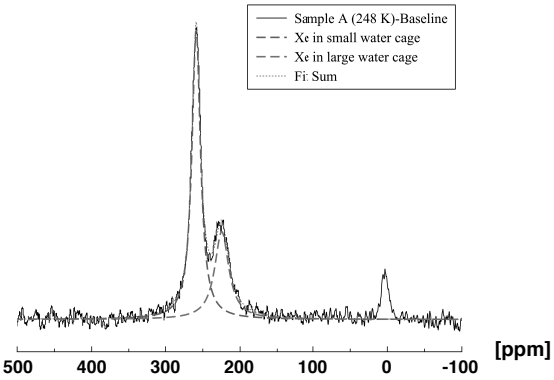


Fig. 3. ^{129}Xe-NMR spectrum of sample A at 248 K being in equilibria with Fast Cooling

[References]

[1] C. J. Jameson, A. K. Jameson and S. M. Cohen, *J. Chem. Phys.*, **59**, 4540-4545 (1973).

[2] T. Pietrass *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 7520-7525 (1995).

P64

β-グルカンの無秩序ー秩序構造転移の解明

○甲野裕之[1]，近藤修啓[2]，平林克樹[2]，尾形慎[3]
1 苫小牧工業高等専門学校
2 伊藤忠精糖株式会社
3 福島工業高等専門学校

Secondary structure and order–disorder transition of a water-soluble β-(1→3, 1→6)-glucan from *Aureobasidium pullulans*

○Hiroyuki Kono[1], Nobuhiro Kondo[2], Katsuki Hirabayashi[2], Makoto Ogata[3]
1 National Institute of Technology, Tomakomai College
2 Itochu Sugar Co. Ltd.
3 National Institute of Technology, Fukushima College

Water-soluble *Aureobasidium pullulans* β-(1→3, 1→6)-D-glucan (KBG) has a structural unit comprising a β-(1→3)-D-glucan backbone with four β-(1→6)-D-glucosyl branching units every six residues. Herein, we show that KBG forms a triple helix in H_2O and a random structure in DMSO, which is similar to the behavior of schizophyllan (SPG) whose structure comprises a β-(1→3)-D-glucan backbone with one β-(1→6)-D-branching unit every three residues. The transformation from the triple helix of KBG to the random structure occurs reversibly, and the triple helix is recovered from the random structure in DMSO/H_2O mixtures containing more than 30% H_2O. Solid-state NMR and diffraction studies revealed that the triple helix of KBG is more stable than that of SPG. The KBG helical pitch is 1.82 nm, which is about 10% longer than that of the SPG triple helix. These findings show that the β-(1→6) side-chain frequency strongly affects the stability and helical pitch of a β-(1→3, 1→6)-D-glucan.

【目的】グルコースがβ-(1→3)-結合した主鎖を持つ多糖類は螺旋構造の高次構造を取るものが多い。細菌、真菌、酵母、キノコなどの細胞壁においてβ-(1→3)-グルカンはキチンや細胞表層糖鎖と結合して存在している。β-(1→3)-グルカンの中で、β-(1→3)-主鎖にβ-(1→6)-結合の分岐側鎖を持つβ-(1→3, 1→6)-グルカンは腫瘍免疫賦活作用を持つものある。抗がんという視点で、シイタケ子実体のレンチナン、スエヒロタケ由来のシゾフィランが医薬品として研究開発されていた。しかし抽出が煩雑であるため、極めて高価なものである。一方、ある種の黒酵母はβ-(1→3)-グルカンを高効率で菌体外に生産するが、水不溶性のため低分子化よる可溶化が困難という理由から産業利用が行われてこなかった。最近、穏やかな水熱処理を適用することで黒酵母β-グルカンの可溶化が可能となり[1]、伊藤忠製糖（株）により「KBG」として市場化された。NMRによる構造解析から、その一次構造はβ-(1→3)-主鎖6残基毎に4残基のβ-(1→6)-グルコース分岐を持ち、既存のβ-(1→3, 1→6)-グルカンと比較して突出した分岐度を持つことが明らかになった（図１）[2]。そこで本研究ではKBGの高次構造に関する検討を実施したので報告する。

【方法】水とDMSOに溶解したKBGを凍結乾燥し、得られた試料の構造均一性と分子運動性を^{1}H核スピン格子緩和時間、^{13}Cスピン格子緩和時間から決定した。さらに各試料

固体NMR、β-(1→3, 1→6)-グルカン、構造転移
○こうの ひろゆき、こんどう のぶひろ、ひらばやし かつき、おがた まこと

についてWAXSおよびSAXS測定を行いにより高次構造に関する情報を得た。ランダムコイル化したKBGをD_2O/DMSO-d_6混合溶媒に溶解させ、溶液NMRによって高次構造形成と溶媒の関係を見積もった。NMRはBruker社AVIII 500MHzを用いて行った。

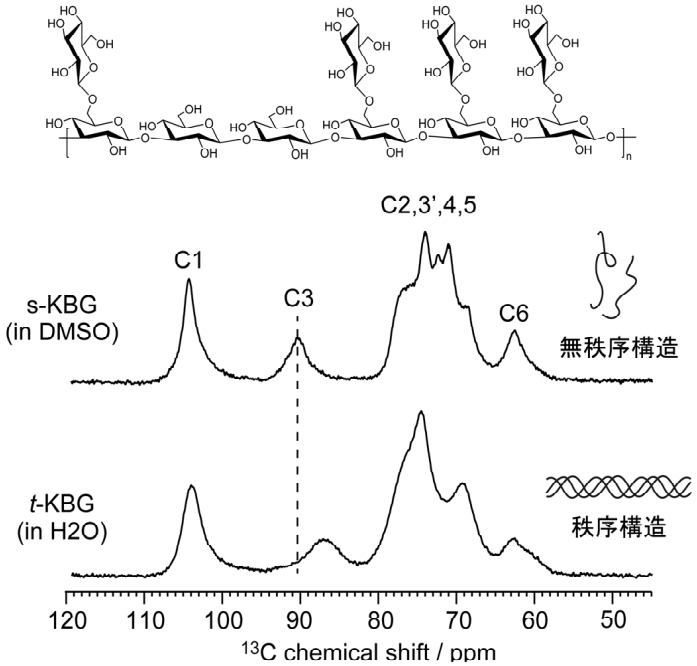


Fig. 1. (Top) Primary structure of the repeating units of KBG. (Bottom) CP/MAS ^{13}C NMR spectra of KBG samples lyophilized from DMSO and water. C3 and C3' indicate the ^{13}C resonances for the 3-positions of the (1→3)-β-glucosyl main-chain and the β-(1→6)-β-glucosyl side-chain, respectively.

【結果】水およびDMSOから凍結乾燥したKBGのCPMASスペクトルでは主鎖C3共鳴線で5ppm変化しており、主鎖骨格の構造変化が示唆された（図１）。さらにT_1緩和時間より水から凍結乾燥したKBGはDMSO試料よりも運動性が低下しており、特に主鎖C1とC3のT_1はDMSO試料の三倍程度であった。これは高次構造形成によってβ-(1→3)-主鎖グリコシド結合の運動性が極端に拘束されていることを示していた。また$T_{1\rho}$値の増大も水から乾燥したKBGでは確認され、分子鎖全体としての運動性が低下していることが明らかになった。主鎖3残基毎に1残基の側鎖を持つシゾフィラン（分岐度33%）の三重螺旋構造とKBG（分岐度67%）三重螺旋構造の緩和時間を比較した結果、KBG三重螺旋が構造安定性が示唆された。分岐度の高いKBGの方がより構造安定な三重螺旋を形成していることが明らかになった。

WAXS、SAXSによる三重螺旋構造解析を進めた結果、KBG分子鎖は主鎖6残基（繰返し構造単位）で1回螺旋し、そのピッチ長は1.82nmであった。シゾフィランも主鎖6残基で同様の螺旋構造を持つが、そのピッチ長は1.68nmと若干短く、分岐度の違いが螺旋ピッチに影響を与えていることが確認された。

ランダムコイル化したKBGをDMSO-d_6/D_2O混合溶媒に添加し、溶液NMRを測定した結果、D_2O比が70(v/v)%以上において、分子鎖の一部が三重螺旋へ構造転移することが確認された。シゾフィランではD_2O比30(v/v)%以上で三重螺旋となりことから、KBGは側鎖間の水素結合により構造安定化していることが明らかになった。

参考文献

[1] K. Hirabayashi, N. Kondo, S. Hayashi, *World J. Microbiol. Biotechnol.* **32,** 206-212 (2016).

[2] H. Kono, N. Kondo, K. Hirabayashi, M. Ogata, et al., *Carbohydr. Polym.* **174,** 876-886 (2017), H. Kono, N. Kondo, K. Hirabayashi, M. Ogata, et al., *Data in Brief* **15,** 382-388 (2017).

P65

木綿布に存在する水とセルロースの分子運動性解析

○笹原久武，五十嵐崇子，中村浩一
花王株式会社

Molecular mobility measurement of water and cellulose in the cotton fabric

○Hisamu Sasahara, Takako Igarashi, Koichi Nakamura
Kao Corporation

We are trying to understand the phenomenon that wet cotton becomes very hard after natural drying. Regarding this phenomenon, we have already proposed new theory that it originates from cross-linkage type of hydrogen bonding made of bound water between cotton single fibers. However, the actual state of this bound water could not be well clarified. Therefore, the relaxation time of water molecules in the cotton cloth were tried and measured using the solid-state NMR. As a result, it was found that the calculated T_2 value of water molecule was significantly smaller than that of free water. In addition, we have cleared that the cotton fiber after complete-drying showed signals originated from cellulose molecules whose relaxation time is higher than those measured under the normal condition.

【緒言】

濡れた木綿繊維を自然乾燥すると、固く、ごわごわした手触りになることが経験的に知られており、この硬化の機構が木綿単繊維間に存在する結合水に起因するものである事を、既に報告している[i]。しかし、この結合水の実態を把握する事はできていない。そこで、水分子とセルロースの分子運動性に着目した解析を進めた。水分除去後の木綿は、常温常湿下のものに比べて、柔軟性が高くなる事がわかっている[ii]。また、一般的に、水の分子運動性はバルク中に存在する自由水よりも、結合水の方が低いことが知られている[iii]。そこで、木綿を構成するセルロース分子と水の水分除去前後での分子運動性の違いを調べた。本発表では、固体NMRを用いて木綿繊維に存在するセルロースと水の緩和時間（T_2）測定を行い、得られた結果から双方の分子運動性に関する解析を行った結果について議論する。

【実験方法】

測定試料として、予め十分な溶剤洗浄を行った木綿タオル（武井タオル社製 TW220）を用いた。この木綿から水分を完全に除去する為、塩化カルシウム管を取り付けたデシケーター中で、加熱条件下（110℃）で、減圧乾燥（0.67kPa、3時間）を行った。固体NMRの測定には、JEOL RESONANCE社製ECA500, 700を用いた。緩和時間（T_2）測定にはスピンエコー法を用いた。

固体NMR、セルロース、磁気緩和時間

○ささはら ひさむ、いがらし たかこ、なかむら こういち

T_2の算出方法は、各 Echo pulse 照射時間で得られたスペクトルに対し、ピーク分割を行い、各シグナルの積分値を求めた。Echo pulse 照射時間に対する積分値の減衰をプロットし、フィッティグすることで各シグナルの T_2 を算出した。

$$f(t) = \left(\frac{f_1(0)}{f_1(0)+f_2(0)}\right) \times f_1(t) + \left(\frac{f_2(0)}{f_1(0)+f_2(0)}\right) \times f_2(t), \quad f_1(t) = f_1(0) \times e^{-\frac{t}{T_2}}, \quad f_2(t) = f_2(0) \times e^{-\frac{t}{T_2}}$$

【結果・考察】

ECA500 6 mmプローブ（MAS:10 kHz） とECA700 1 mmプローブ（MAS:70 kHz）で測定した常温常湿下の木綿繊維の[1]H-NMRスペクトルをFig.1に示す。結果、6 mmプローブを用いた測定では、シグナルがブロードであり、水とセルロース由来のシグナルを区別できない。一方、1 mmプローブで測定したシグナルは鮮鋭化し、水とセルロースの由来のシグナルを区別可能であることがわかった。以上の結果より、1 mmプローブを用いて緩和時間（T_2）測定を行った。

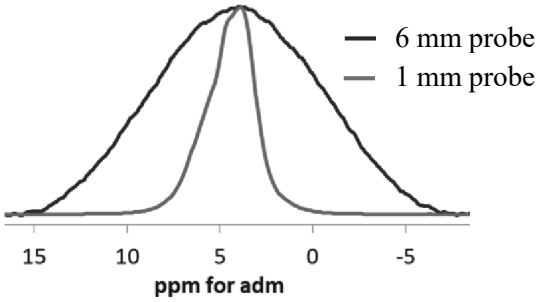


Fig. 1 [1]H-NMR spectra of cotton by 6.0 mm probe of 500 MHz and 1.0 mm probe of 700 MHz solid NMR

スピンエコー法で測定した、Echo pulse照射時間が2 ms時の常温常湿下の木綿繊維の[1]H-NMRスペクトルと、文献より推定したシグナルの帰属をFig.2に示す[iv, v]。Echo pulse照射時間毎の各シグナルの積分値を求め、T_2を算出した結果、常温常湿下の木綿繊維に存在する水は、少なくとも2つの状態から構成されている事がわかった。また、水分除去操作の有無によってセルロースの水酸基由来のシグナルのT_2が異なることがわかった。以上の結果は、木綿繊維に水が存在すると、セルロースの分子運動性に影響を与える事を示唆している。

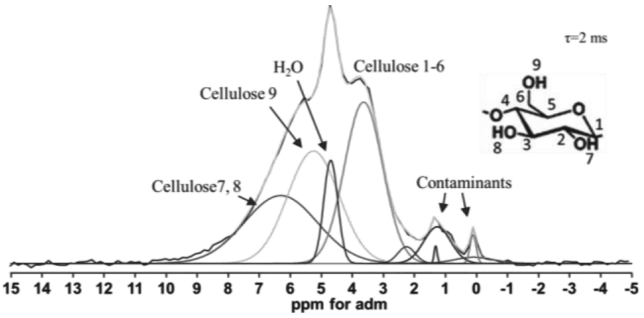


Fig. 2 [1]H-NMR spectra of cotton at echo pulse 2.0 ms irradiation by 1.0 mm probe of 700 MHz solid NMR

【謝辞】

本研究におけるNMR測定の一部は、文部科学省先端研究基盤教養推進事業「NMR共用プラットフォーム」（大阪大学 蛋白質研究所）を利用した。本研究にご協力いただいた、大阪大学蛋白質研究所の藤原敏道教授、江川文子助教に感謝する。

【参考文献】

i T. Igarashi, et al., *Journal of Surfactants and Detergents*, 2016, 759-773
ii T. Igarashi, et al., *Journal of Surfactants and Detergents*, 2016, 183-192
iii N. Sun, et al., *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2009, 2971-2975
iv K. Kuroda, et al., *Cellulose,* 2014. 21, 2199-2206
v D. A. Cerqueira, et al., *Polimeros,* 2010. 20, 85-91

P66

リコンビナントクモ糸の産業化に果たす NMR の役割

○朝倉哲郎[1]、松田裕生[1]、内藤晶[1]、佐藤健大[2]、安部佑之介[2]、菅原潤一[2]
1 東京農工大学大学院 工学研究科
2 Spiber（株）

Role of NMR in the Industrialization of Recombinant Spider Silk

○Tetsuo Asakura[1],Hironori Matsuda[1],Akira Naito[1],Takehiro K. Sato[2],Yunosuke Abe[2],Jun-ichi Sugahara[2]
[1]Department of Biotechnology, Tokyo University of Agriculture and Technology, Koganei, Tokyo, Japan
[2]Spiber Inc., Tsuruoka, Yamagata, Japan

Structural and dynamical analyses of spider dragline silk fibers have been the focus of numerous recent studies because of the silk's high tensile strength and exceptional extensibility. The primary structures are repeated ones of polyalanine (PLA) and Gly-rich regions. The PLA region has been associated with high tensile strength, and the Gly-rich region is associated with the exceptional extensibility. In this work, ^{13}C solid-state NMR together with MD simulation was used to clarify the structure and dynamics of the spider silk fibers for the industrialization of recombinant spider silk. Appropriate ^{13}C-labeled model peptides were used for the NMR analyses. The staggered packing structure was a key of the PLA region with antiparallel β-sheet structure. On the other hand, the fraction of each residue in Gly-rich region was determined experimentally and could be reproduced by MD simulation theoretically. The supercontraction of the spider dragline silk fiber was also studied using several solid-state NMR.

＜緒言＞
クモ牽引糸は、高強度・高弾性の優れた繊維特性を有することから、その特性を生かして産業利用を図るための研究が世界中で始まっている。[1] クモから得られる糸を産業に利用するためには、多量のクモ糸を生産する必要があるが、クモは共食いをするので、例えば、家蚕について、これまで農家で行ってきたような大量飼育をするわけにはいかない。
そこで、リコンビナントクモ糸を分子設計し、大腸菌や微生物発酵あるいはヤギの乳や煙草の葉を用いて生産する研究が報告されてきた。[2] しかしながら、いずれにしても得られる試料は粉末である。いかにして粉末から、実際のクモ牽引糸のような高強度・高弾性の繊維を作製するかという点が大きな課題となる。すなわち、一般に、溶液紡糸によって粉末の繊維化を行うことになるが、その紡糸方法をいかに開発・確立するかということがポイントとなる。さらに、クモ牽引糸は水中では瞬時に長さが半分程度に収縮する“超収縮”という現象がある。産業利用の観点からは、それが大きな欠点となる。
これらの問題をいかにして克服するかが、リコンビナントクモ糸の産業化を図る上でエッセンスとなる。まずは、クモ糸の構造とダイナミクスに関する分子レベルでの解明が不可欠であるが、従来の報告の内容を再検討してみると、その解明は全く不十分と言わざるを得ない。[1]

そこで、本研究では、リコンビナントクモ糸の産業化への利用を念頭に、クモ糸の構造とダイナミクスに関する分子レベルでの解明を固体NMRを用いて進めた。その際、適宜、試料の^{13}Cラベル化と特徴的な連鎖構造を有するモデル化合物を合成した。その成果をもとにして、リコンビナントクモ糸の構造―物性予測と分子設計、紡糸技術の開発ならびに超収縮の改善を行った。

固体 NMR, クモ牽引糸、リコンビナントクモ糸、

○あさくらてつお、まつだひろのり、ないとうあきら、さとうたけひろ、あべゆうのすけ、すがはらじゅんいち

1. クモ糸の産業化のためのクモ牽引糸の固体 NMR 構造解析

米国女郎グモ(*Nephila clavipes*) 牽引糸の一次構造の一部を Fig.1 に示した。

N……GAGAAAAAAGGAGQGGYGGLGGQGAGQGGY
GGLGGQGAGQGAGAAAAAAAGGAGQGGYGGLGSQG
AGRGGQGAGAAAAAAGGAGQGGYGGLGSQGAGRGG
LGGQGAGAAAAAAAGGAGQGGLGGQGAGQGAAAAA
AGGAGQGGYGGLGSQGAGRGGLGGQGAGAAAAAAG
GAGQGGYGGLGGQGAGQGGYGGLGSQGAGRGGLGGQ
GAGAAAAAAAGGAGQGGYGGLGNQGAGRGGQ……. C

Fig.1 Primary structure of *Nephila clavipes* dragline silk. The upper and lower underlined sequences are adapted as the model peptides of Gly-rich and PLA regions, respectively, in this work.

アラニン連鎖 (PLA:太字) 領域とグリシンリッチ (Gly-rich:) 領域が交互に繰り返された構造を有しており、前者が高強度、後者が高弾性の源と考えられてきた。

PLA 領域については、逆平行 β シート構造であることは報告されてきたが、高強度の源と関連して重要なパッキング構造に関しては、殆ど情報が得られてこなかった。[1]

また、Gly-rich 領域は、不規則なアミノ酸配列から成るが、これまで、ランダムコイルや 3_1-ヘリックス構造が提案されてきたものの、不規則な配列までを考慮した詳細な構造解析は全く行われてこなかった。[1] 高強度・高弾性のリコンビナントクモ糸の分子設計を行うにあたり、各領域のアミノ酸残基毎の構造やダイナミクス情報は極めて重要である。

アラニン連鎖領域の解析

先ず、PLA 領域を含み、両端に Gly-rich 領域を有する一連のモデルペプチド$(E)_4GGLGGQGAG(A)_nGGAGQGGYGG(E)_4$ ($Gr(A)_nGr^*$：n = 3-8 と略、Fig.1 下線下部にマーク）を合成した。それらを、ギ酸に溶解後、メタノールで沈殿させ、^{13}C CP/MASNMR を測定すると、n = 4 以上の場合に、いずれも逆平行 β シート構造をとって沈殿した。さらに、アラニンメチル領域には、Staggered Packing 構造（β シートの面が層方向に交互にずれる）の出現のマーカーとなる 22.7ppm のピーク [3-7] が観測された(Fig.2)。

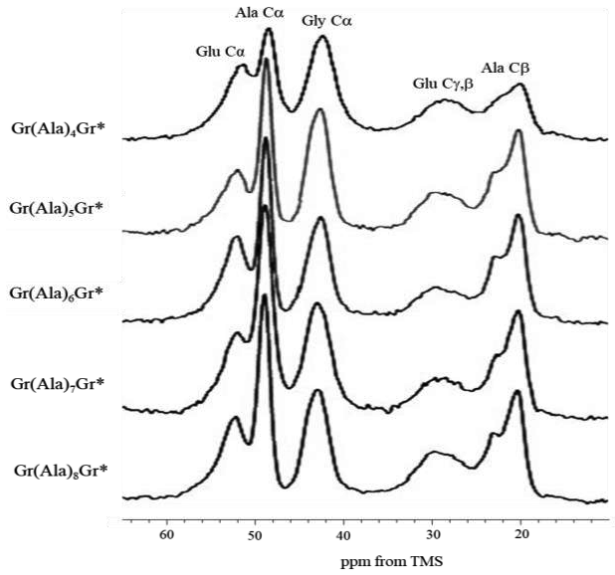


Fig. 2. ^{13}C CP/MAS NMR spectra of $Gr(Ala)_nGr^*$ (n = 4-8) after FA /MeOH treatment.

そこで、各々[3-^{13}C]Ala ラベルされた *Nephila clavata* 牽引糸の ^{13}C CP/MAS NMR を測定し、アラニンメチルピークから、Staggered Packing 構造とそれ以外の β シート構造の割合を決定した。乾燥状態で 51%、含水状態で 60%であり、クモ糸の状態で、その割合は変化することがわかった。[7]

さらに、クモ牽引糸の PLA 領域が Staggered Packing 構造を取る場合、アラニン残基が密にパッキングされるため、部分的にメチル基同士の距離が極めて短くなる。しかし、これらのメチル基の ^{13}C CP/MAS NMR スピン-格子緩和時間の測定から決定したホッピング運動は、その予想に反して極めて速かった。

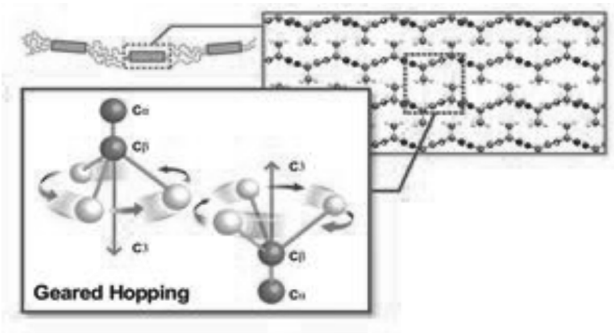


Fig.3 Geared hopping motion of the Ala methyl groups for Ala residues where two methyl groups are located closely each other in the staggered packing arrangement.

この実験結果と MD 理論計算の結果と合わせて、Fig.3 に示したメチル基同士の“ギアー運動”が存在すると推測した。[8,9]

尚、分子のパッキング構造の解明と言うと、真っ先に浮かぶのが X 線解析の適用である。しかしながら、Fig.4 に示したように、非晶

部分の多いクモ牽引糸の場合、パッキング構造の情報は殆ど得られない。[7] 固体 NMR 法が現在の所、唯一のパッキング構造の解析手段となる。しかしながら、この場合も、適当なモデル化合物を用いての解析が不可欠であることは言うまでもない。

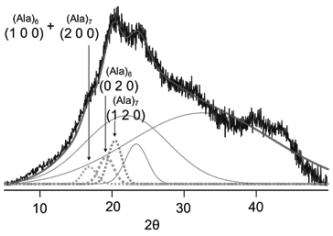


Fig. 4. X-ray powder pattern of *N. clavata* dragline silk fiber

以上の結果から、リコンビナントクモ糸の PLA 領域を分子設計するにあたり、アラニン連鎖長は、n = 4 もしくは 5 以上であれば良いことがわかる。また、高強度を有するリコンビナントクモ糸の紡糸技術を開発するにあたり、溶液紡糸の際の紡糸液ならびに凝固液の選択や紡糸装置や延伸技術の最適化が必要となるが、その指針の一つは、紡糸によって得られた繊維中の PLA 領域の Staggered Packing 構造の割合を増やすことである。

グリシンリッチ領域の解析

Fig.1 下線上部にマークしたように、両端を$(E)_4$ と$(Ala)_6$連鎖で挟まれた Gly-rich 領域のモデルペプチド、$(E)_4(A)_6$GGAGQGGYGGLGSQGAGRGGLGGQGAG$(A)_6(E)_4$（適宜 ^{13}C ラベルした 10 種類）を合成した。[10-12] [1-^{13}C]Gly[3-^{13}C]Ala[2-^{13}C]Gly のブロック単位を異なる部位に導入した試料の [3-^{13}C]Ala のメチルピークは、ラベル部位によって異なり、かつ、いずれも 3_1-ヘリックス構造に特徴的な化学シフトを示さず、Gly-rich 領域が 3_1-ヘリックス構造という提案は明確に否定された。さらに、[1-^{13}C]Gly を 7 カ所の異なる部位に導入したペプチドの結果を加え、Gly-rich 領域について残基毎にコンフォメーション分率を決定することができた(Fig.5:left)。

さらに、この実験結果の特徴は MD 計算(Fig.5:right) によって十分に再現することができた。[10]

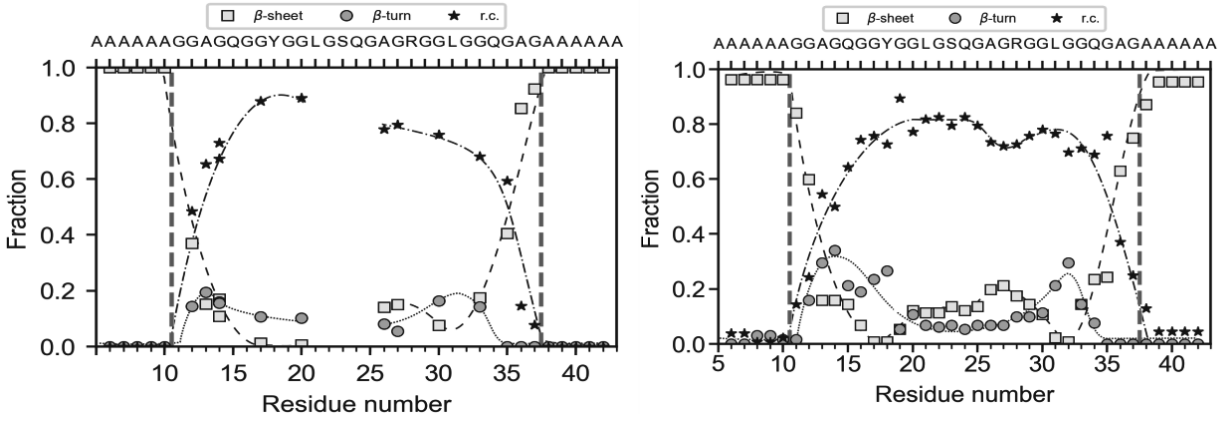


Fig.5 Plots of the fractions of several conformations (β-sheet, β-turn and random coil) of Gly and Ala residues against the ^{13}C labeled position in the Gly-rich region of 47-mer peptides. (left): determined by ^{13}C CP/MAS NMR experimentally and (right): calculated for the same sequence by MD simulation theoretically.

以上の結果から、クモ糸の高弾力性の要因は、Gly-rich 領域に 3_1-ヘリックス構造が存在し、そのらせんの伸び縮みに起因するという説は否定される。Gly-rich 領域の決定された構造(Fig.5)から推測してエントロピー弾性が高弾性の要因であると考えられる。

さらに、本研究で用いた MD 計算は、クモ糸の局所構造の実測結果をよく再現することがわかったので、一歩進めて、MD 計算からリコンビナントクモ糸の物性予測を行うことを試みた。すなわち、クモ糸の応力ーひずみ曲線を理論的に計算するための MD 計算プログラムを作製した。それを用いて、クモ糸の一次構造を系統的に変えて、応力ーひずみ曲線を理論計算し、最終的に高強度・高弾性の物性を与える一次構造を決定した。その一次構造の情報は、実際にリコンビナントクモ糸の一次構造を系統的に変えて行った応力ーひずみ曲線の実測結果とよく一致し、新たなリコンビナントクモ糸の分子設計に、本プログラムが使用できることを実証した。

2. クモ牽引糸の超収縮挙動を解明するための固体 NMR 研究

クモ牽引糸の “超収縮”挙動の解明を行うため、クモ(*N. clavata*) 牽引糸の固い部位が強調して表れる ^{13}C CP/MAS NMR の測定を乾燥状態(a)と含水状態(b)で行うとともに、含水状態で、溶液の

ように早く運動する部位が強調して表れる ^{13}C r-INEPT(d) と全域のダイナミクスを検討できる ^{13}C DD/MAS　NMR(c)を測定した(Fig.6 left)。[7-9,11,13,14,16]　PLA 結晶部のメチル基のピーク強度は、(a),(b)で殆ど変わらず、含水状態でもメチル基の運動は固いままでかわらないが、一方、Gly-rich 域の各残基は、孤立したアラニン残基も含め、含水に伴い、シャープなピークが新たに出現することから極めて高い運動性を有することがわかる。さらに、NMR 緩和時間の測定を乾燥状態と含水状態で行い、含水に伴うクモ牽引糸のダイナミクス挙動の変化を検討した。[8,9]

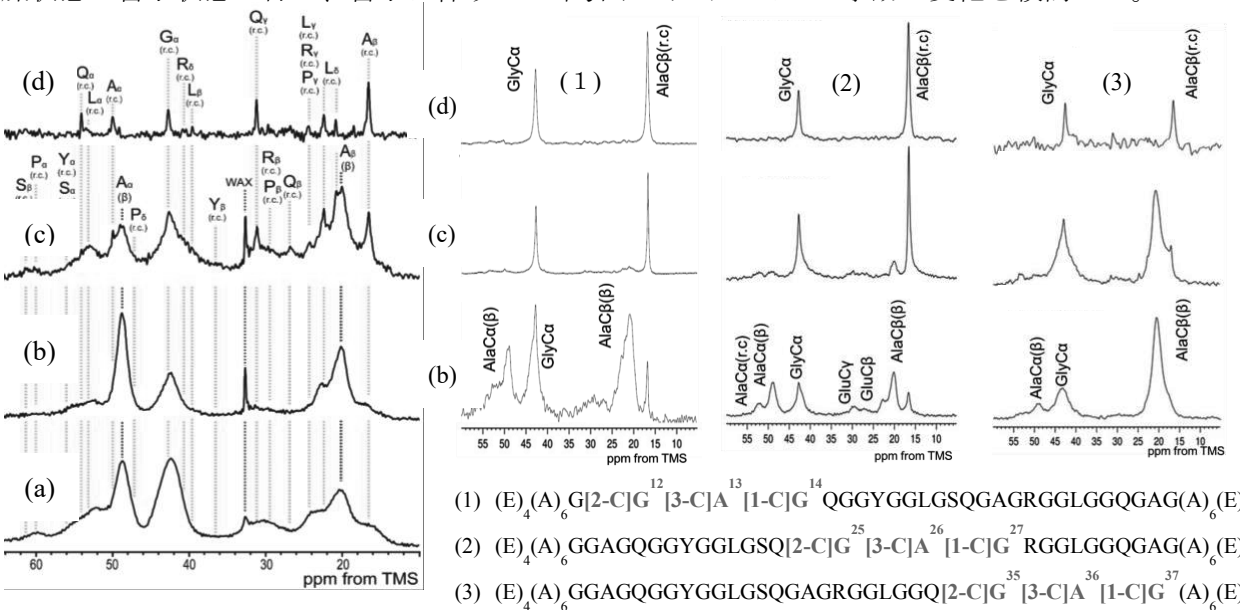


Fig.6 (left) ^{13}C Solid-state NMR spectra of *N. clavata* silk fiber. (a)^{13}C CP/MAS NMR spectrum in the dry state, (b) ^{13}C CP/MAS NMR spectrum in the hydrated state. (c) ^{13}C DD/MAS NMR spectrum in the hydrated state and (d) ^{13}C r-INEPT spectrum in the hydrated state.
(right) ^{13}C solid-state NMR spectra of 47-mer model peptides with ^{13}C-labeled blocks, (1)[2-^{13}C]Gly^{12}[3-^{13}C]Ala^{13}[1- ^{13}C]Gly^{14}, (2)[2-^{13}C]Gly^{25}[3-^{13}C]Ala^{26} and (3)[1- ^{13}C]Gly^{27}[2-^{13}C]Gly^{35}[3-^{13}C]Ala^{36} [1- ^{13}C]Gly^{37}. (b) ^{13}C CP/MAS, (c) ^{13}C DD/MAS and (d) ^{13}C r-INEPT spectra in the hydrated state.

さらに、含水状態の Gly-rich 領域のモデルペプチドについて、含水挙動を検討したところ、C 端近傍が、N 端近傍および中央部分と比較して極端に疎水的であることがわかった(Fig.6 right)。[11] 以上の結果は、超収縮を防ぐリコンビナントクモ糸を分子設計する上で、重要な指針を与える。

さらに、本研究手法は、当研究室で現在行っている、もう一つの絹の実用化研究―絹の小口径人工血管の開発―において、含水状態の絹人工血管の構造やダイナミクスを検討する有力な研究手段として用いることができた。それは、絹の物性が含水状態では乾燥状態に比べて著しく異なるとともに、含水状態の分子レベルでの解析のための分析手段が極めて少ないためである。[17]

＜謝辞＞　本研究は一部、科研費(課題番号 19K05609) ならびに ImPACT Project により実施された。
＜参考文献＞
1. Asakura,T., Miller,T. Eds. *Biotechnology of Silk*. Springer, Dordrecht, **2014**, pp.1-272.
2. Aigner, T. B., DeSimone, E., Scheibel, T. *Adv. Mater*, **2018**, 1704636.
3. Asakura,T.,Okonogi,M.,Horiguchi,K.,Aoki,A.,Saito,H. *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2012**,*51*,1212-1215.
4. Asakura,T.,Nishimura,A.,Kametani,S.,Kawanishi,S.,Aoki,A.,Suzuki,F.*et al*. *Biomacromolecules* **2017**,*18*,1965-1974.
5. Asakura,T., Miyazawa,K., Tasei,Y., Kametani,S., Nakazawa,Y., Aoki,A., Naito, A. *PCCP.* **2017**, *19*, 13379 -13386.
6. Kametani,S.,Tasei,Y.,Nishimura,A., Asakura,T. *PCCP.* **2017**, *19*, 20829 -20838.
7. Asakura,T., Tasei,Y., Aoki,A., Nishimura, A. *Macromolecules* **2018**, *51*,1058-1068.
8. Naito, A.,Tasei,Y.,Nishimura,A.,Asakura,T. *J. Phys. Chem. B* **2018**,*122*,6511- 6520.
9. Asakura,T.,Tasei, Y.,Naito,A. *Macromolecules* **2018**,*51*,6746-6756.
10. Asakura,T., Nishimura, A., Tasei, Y. *Macromolecules* **2018**, *51*, 3608-3619.
11. Asakura, T., Matsuda, H., Kataoka, N., Imai, A. *Biomacromolecules* **2018**, *19*, 4396 - 4410.
12. Asakura, T., Matsuda, H., Aoki, A., Kataoka, N., Imai, A. *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, *131*, 654-665.
13. Tasei,Y.,Nishimura,A.Suzuki, Y., Sato, K. T., Sugahara, J., Asakura,T. *Macromolecules* **2017**, *50*, 8117-8128.
14. Asakura,T.,Endo,M.,Tasei,Y.,Ohkubo,T.,Hiraoki,T.,Boutis,G.S.,Li.J.L.,Wang,X.G. *J.Mater.Chem.B* **2017**,*5*,1624-1632.
15. Asakura,T.,Endo,M.,Fukuhara, R., Tasei,Y. *J.Mater.Chem.B* **2017**,*5*,2152-2160.
16. Rigueiro,J.P., Madurga,R.,Ganan-Calvo.A.M.,Elices,,M.,Guinea, G.V.,Tasei,Y., Asakura,T.,*et al.*, *Sci.Rep*., **2019**,*9*:2398.
17. Asakura,T.,Tanaka,T.,Tanaka,R. *ACS Biomater. Sci. Eng.,* **2019**, review, *in press.*

P67

^{19}F固体NMRによるタイソナイト型フッ化物のイオン伝導の研究

○村上美和[1]，嶺重温[2]
1京都大学　産官学連携本部
2兵庫県立大学大学院　工学研究科

^{19}F Solid-state NMR Study of Anion Conductivity in Tysonite Structure

○Miwa Murakami [1], Atsushi Mineshige[2]
1 Office of Society-Academia Collaboration for Innovation, Kyoto University
2 Graduate School of Engineering, University of Hyogo

The high mobility of fluorine ion in metal fluorides with the tysonite-type structure such as LaF_3 and CeF_3 has been known for a long time. It is an established fact that ionic diffusion begins only one fluorine sublattice first, but it is still controversial about which one in the three fluorine sites called F1, F2 and F3. In LaF_3, solid state NMR analysis showed F1-F3 exchange. However, similar analysis has been difficult for CeF_3 due to the paramagnetic effect of Ce^{3+}. In this work, we applied solid-state NMR at low magnetic field, under fast MAS, and with variable temperature for CeF_3. Observed sideband patterns can be described by CSA and by the paramagnetic anisotropy evaluated by taking the electron-^{19}F dipolar interactions into account. We show that the fluorine-ion exchange between F1 and F3 sites in CeF_3 occurs at temperature ca. 200 ˚C below the exchange temperature observed for LaF_3.

１．目的

LaF_3やCeF_3のようなイオン伝導性を持つことが知られているタイソナイト型のフッ化物の結晶構造には、F1(12*g*)、F2(4*d*)、F3(2*a*)の3種類のフッ素サイトがあるが、それぞれのフッ素の運動性については複数の説がある。その中でLaF_3に関しては、NMRによる決定的な分光学的な証拠が示されているが[1]、CeF_3については未だ明確な結果は得られていない。これは、Ce^{3+}が不対電子を持ち、常磁性を示すことにより、^{19}F NMRスペクトルがサイドバンドパターンを示し、解析が困難なことが一因である。一方でサイドバンドパターンは電子-^{19}Fの双極子相互作用を反映した構造情報を含んでいる。本研究では、常磁性相互作用の解析のために低磁場と高速試料回転と温度変化測定を適用して高分解能スペクトルを測定し、結晶構造から求めた電子-^{19}Fの双極子相互作用テンソルから計算したNMR線形と比較してCeF_3の^{19}F-NMRスペクトルを詳細に解析することにより、CeF_3のフッ素交換に関する評価を試みた。

２．実験

CeF_3は高純度化学研究所から購入した。NMR測定はJEOL社製ECA600(14 T; ^{19}Fの共鳴周波数は564.6 MHz)とOpenCore NMR(7 Tおよび4.9 T; ^{19}Fの共鳴周波数は282.8 MHz、188.4 MHz) を用いて行った。

イオン伝導体、タイソナイト型フッ化物、常磁性

○むらかみみわ、みねしげあつし

３．結果および考察

Fig.1に試料回転速度50kHzで測定したCeF_3の^{19}F MAS NMRスペクトルの磁場依存性を示す。信号の分解能の点では7 Tが望ましいが、試料回転が速いと測定可能な温度範囲が狭くなることから、試料回転35 kHzと静磁場4.7 Tの組み合わせで温度依存性を検討した。Fig.2に線形の温度依存性を示す。高温ではキュリー・ワイス則に従い常磁性の影響が減少し、分解能が向上するが、同時にFの交換も速くなるため、各サイトの信号の分離は悪くなる。一方、低温では、Fの交換は遅くなり信号分離には有利であると考えられるが、常磁性によるブロードニングが大きく、信号の分離には適さなかった。中間の0℃辺りで、3サイトの信号が分離した。そこでサイドバンド線形の解析を検討した。考慮すべき相互作用としては、1)化学シフト異方性(CSA)、2)^{19}F-^{19}F双極子相互作用、3)Ce^{3+}の不対電子と^{19}Fの双極子相互作用が考えられる。このうち、2)はMASで充分軽減されており、3)に関しては結晶構造から計算することができるが[2,3]、常磁性を考慮したCSAの計算は容易ではない。そこで、CSAをパラメータとして、100℃の線形からF2のCSA、0℃の線形からF1のCSAを推定した。F3に関しては信号が小さくCSAの推定は行わなかった。線形解析の詳細については、当日紹介するが、不対電子－^{19}F核スピン間の双極子相互作用とCSAを取り入れた計算による線形解析の結果、低温で3サイトに分離している信号が高温ではイオン交換が速くなりF2とF1+F3の2種類の信号となることを示すことができた。F1⇔F3の交換は、LaF_3で報告されている結果と同じであるが、CeF_3で交換が起こる温度はLaF_3より約200℃低く、イオン伝導の違いと相関があるのではないかと考えている。

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。4.7 Tの磁場の利用は、京都大学理学部竹腰先生にご協力いただきました。

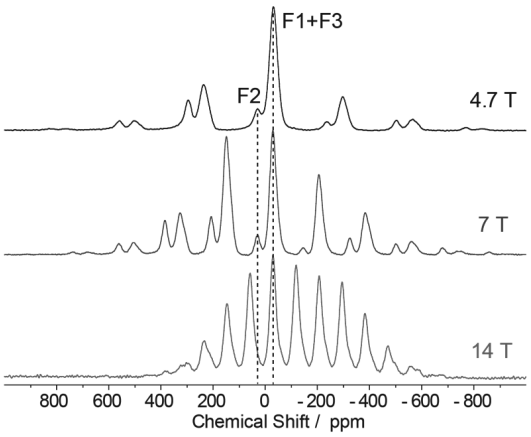


Fig.1 Magnetic field dependence of ^{19}F MAS spectra of CeF_3 under ω_{MAS} = 50 kHz.

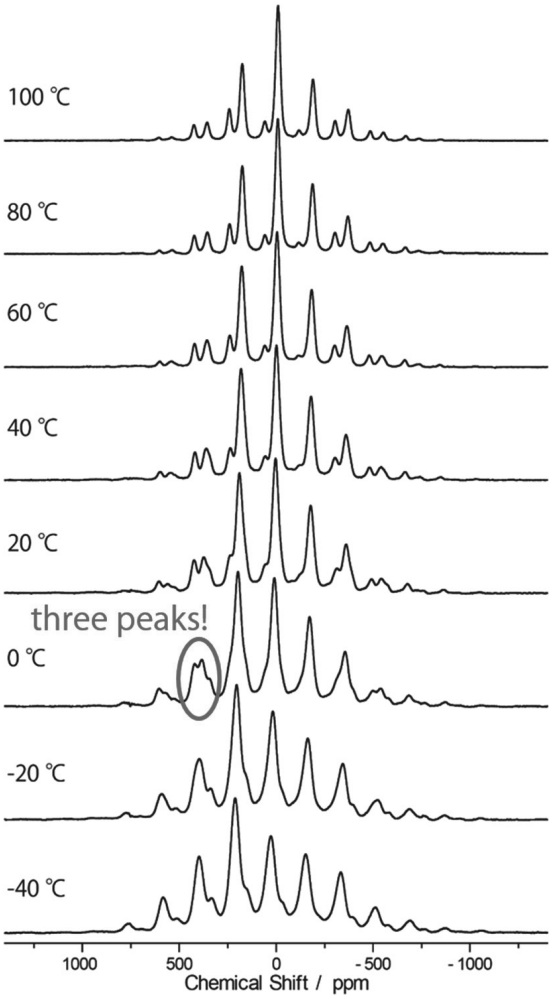


Fig.2 Temperature dependence of ^{19}F MAS spectra of CeF_3 at 4.7 T under ω_{MAS} = 35 kHz.

(1) F. Wang and C.P. Grey, *Chem. Mater.* **9**, 1068 (1997).
(2) A. Nayeem and J.P. Yesinowski, *J. Chem. Phys*. **89**, 4600 (1988).
(3) M. Murakami et al., *J. Magn. Reson*. **231,** 66 (2013).

P68

親水性ナノ細孔で安定化されたCO_2ハイドレートの ^{13}C-NMR スペクトル解析

○今泉　卓，中山連太朗，鈴木　陽，亀渕　萌，田所　誠
東京理科大学理学部第一部化学科

^{13}C-NMR Spectroscopy on CO_2-Hydrate Stabilized in Molecule-Based Crystal with Hydrophilic Nanopores

○Taku Imaizumi, Rentaro Nakayama, You Suzuki, Hajime Kamebuchi, Makoto Tadokoro
Department of Chemistry, Faculty of Science, Tokyo University of Science, Tokyo, Japan

Gas-Hydrate (GH) is a crystalline solid with cage-like structures clathrating guest molecules established by water molecules at relatively high pressure and low temperatures. In order to create artificial GHs, we employed $\{\{[Ru^{III}(H_2bim)_3](TMA)\}_2\cdot 3THF\cdot 30H_2O\}_n$ (H_2bim = 2,2′-biimidazole, TMA^{3-} = trimesate) (1) crystal, where tube-like water clusters (water nanotube; WNT) containing THF molecules is formed within 1-D nanometer-scale channel of 1. After removing THF molecules from 1, $^{13}CO_2$-hydrayte can be established by exposuring the remaining crystal to $^{13}CO_2$ gas. This time, physico-chemical characterization of the artificial $^{13}CO_2$-hydrayte by solid-state ^{13}C-NMR will be presented.

【諸言】　地球温暖化への関心が高まるにつれて、その原因である CO_2 の捕捉・吸蔵という観点に注目が集められている。近年では、工場などから発生する CO_2 を回収し、海底下に封じ込める技術が検討され、その方法としてガスハイドレート (Gas Hydrate; GH) が注目されている。GH は、水分子の水素結合によって構築されるケージの内部に気体分子が取り込まれた特異な氷の構造である。しかし、天然に存在する GH の一つである CO_2 ハイドレートは､低温かつ高圧な条件でしか安定に存在できないことが知られている。また、CO_2 ハイドレートは固体の ^{13}C-NMR によるスペクトルの検出により、内部での CO_2 の吸蔵状態を調べることができる。[1]

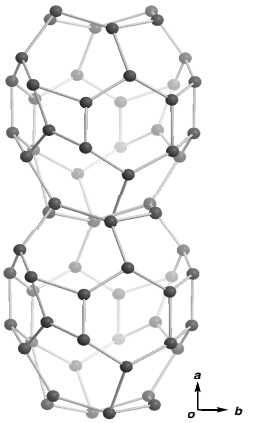


Fig. 1 Crystal structure of WNT in 1.

そこで､私たちは人工的に常温常圧で安定な GH を作ることを目標とし、その手法として $[Ru^{III}(H_2bim)_3]^{3+}$ (H_2bim = 2,2′-biimidazole) と TMA^{3-} (= trimesate) の水素結合相互作用によって自己組織化させた分子性ナノ多孔質結晶の一次元チャネル内に閉じ込められた室温でも安定なハイドレートクラスター (Water Nanotube; WNT) に着目した。これらの構成要素を、H_2O/THF の混合溶液中で自己組織化させると、内部に THF を包接した $\{\{[Ru^{III}(H_2bim)_3](TMA)\}_2\cdot 3THF\cdot 30H_2O\}_n$ (1) が得られる。[2] 結晶 1 で安定化された WNT の X 線構造解析による結晶構造を Fig. 1 に示した。結晶 1 の単位空孔内には 3 分子の THF が WNT に封入されており、この THF 分子のみを湿度の制御によって取り除いた結晶 $\{\{[Ru^{III}(H_2bim)_3](TMA)\}_2\cdot 30H_2O\}_n$ (2) に対して、キセノンやメタン等のガスを作用させることで気体分子を閉じ込めることができる。今回は、$^{13}CO_2$ ガスを用いて室温でも安定な $^{13}CO_2$ ハイドレートを作成し、^{13}C-NMR 測定から吸蔵状態の解析を行った。

キーワード：分子性ナノ多孔質結晶 / 固体 ^{13}C-NMR / CO_2 ハイドレート

○いまいずみたく，なかやまれんたろう，すずきよう，かめぶちはじめ，たどころまこと

【実験】 結晶 1 は、$[Ru^{III}(H_2bim)_3](NO_3)_3$ と K_3TMA を、$H_2O/THF = 8/2$ の混合水溶液中でゆっくりと拡散させることによって、青緑色の六角柱状結晶 1 が得られた。この結晶 1 を湿度 50%の空気中で 1 時間風乾処理することで、WNT 内部に包接された THF を完全に除去した結晶 2 を得た。この結晶 2 に対して、標識化された CO_2 ガス ($^{13}C > 99\%$) の包接を以下のように行った。直径 4 mm の硬質ガラス製サンプル管に結晶 2 を 20 mg 程度入れ、液体窒素で冷却しながらサンプル管内を真空ポンプで脱気し、管内を CO_2 ガスで置換した。CO_2 ガスは低温で固体化され、ガラス管を焼切ることでサンプル管の内部を CO_2 で満たした。室温へ戻すことで数気圧～十数気圧の封入された $^{13}CO_2$ で満たされたサンプル管を得た。ここで、^{13}C-NMR のスピン-格子緩和時間 (T_1) は、サンプル管内の $^{13}CO_2$ ガスの圧力に依存する。この T_1 から管内に存在する CO_2 ガス圧を決定した。また、この CO_2 ハイドレートの WNT 骨格の運動状態を観測するために、結晶 2 の H_2O を D_2O で重水素置換した $\{\{[Ru^{III}(D_2bim)_3](TMA)\}_2 \cdot 30D_2O\}_n$ (3) を同様の方法で合成し、$^{13}CO_2$ ガスを封入したサンプル管を作成し、^{2}H-NMR 測定を行った。固体 ^{13}C-NMR スペクトルの測定には chemical shift echo 法、固体 ^{2}H-NMR スペクトルの測定には四極子エコー法、スピン-格子緩和時間(T_1)の測定には反転回復法を用いた。^{13}C-NMR の共鳴周波数は 75.55 MHz、^{2}H-NMR の共鳴周波数は 46.12 MHz を用いた。

【結果と考察】Fig. 2 に $^{13}CO_2$ が包接された結晶 2 の 296 K における ^{13}C-NMR スペクトルを示した。バルクの CO_2 ガスのピーク (124 ppm) と比較して広範囲 (50～170 ppm) に信号が観測された。これは CO_2 分子が WNT に取り込まれたことに起因すると考えられる。また、取り込まれた CO_2 分子の定量は、CO_2 封入から充分な時間が経った後のスピン-格子緩和時間 (T_1) 測定から決定される CO_2 の圧力を利用した。[2] 封入直後の質量から求められる CO_2 の圧力は 12.5 atm であり、T_1 測定から見積もられた CO_2 の圧力は 8.20 atm であった。この圧力の差分が CO_2 の吸蔵量に相当すると考え、WNT の 1 単位ケージあたり 3 分子程度の CO_2 の吸蔵量が見積もられた。

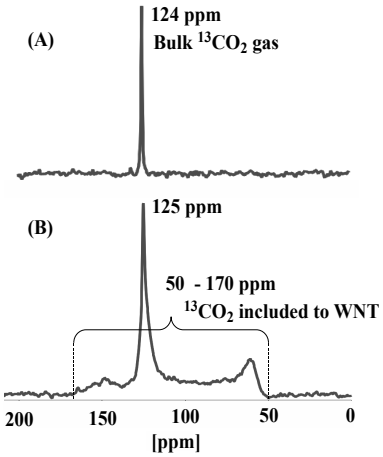


Fig.2 ^{13}C-NMR spectra at 296 K. (A) $^{13}CO_2$ gas, (B) $^{13}CO_2$ molecules in crystal 2

Fig. 3 に CO_2 が包接された結晶 3 の ^{2}H-NMR スペクトルを示す。線形は 173 K ではブロードなピークが観測され、温度上昇に伴って線形の変化がみられた。示差走査熱量測定(DSC)から、結晶 3 の相転位が 213 K に観測されているため、高温におけるスペクトルの先鋭化は水分子によるものである。討論会当日は CO_2 ガス吸蔵状態の圧力依存性と定量結果についても報告する予定である。

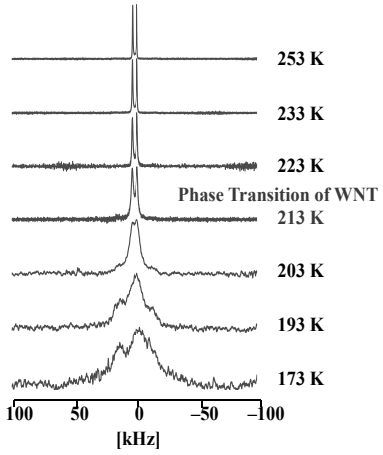


Fig.3 Temperature dependence of solid state ^{2}H-NMR spectra of 3

【References】

[1] H. Omi *et al., Appl. Surf. Sci.,* **252**, 660 (2005).
[2] M. Tadokoro *et al., RSC Adv.,***2**, 12101 (2012).
[3] C. J. Jameson *et al*., *J. Chem. Phys.,* **86**, 2717 (1987).

P69

高圧環境下における配位高分子内部の二酸化炭素の運動

○犬飼 宗弘[1], 栗原 拓也[2], 野田 泰斗[2], 中村 浩一[1]
1徳島大学大学院社会産業理工学研究部
2京都大学大学院理学研究科

Dynamics of carbon dioxides in a metal-organic framework under high pressure

○Munehiro Inukai[1], Takuya Kurihara[2], Yasuto Noda[2], Koichi Nakamura[1]
1 Graduate School of Technology, Industrial and Social Sciences, Tokushima University
2 Graduate School of Science, Kyoto University

We investigate CO_2 dynamics in a MOF under high pressure using the combination of MAS NMR and CSA analyses. The NMR studies reveal the multiple dynamics of CO_2, which are local vibration or rotation with the rate of ~10^{-8} s and rotation on a cone around adsorption sites with the rate of ~10^{-6} s. The detail analyses would help to enhance the function of separation in MOFs via the control of dynamics and kinetics for CO_2.

Metal-organic frameworks (MOFs) and coordination polymers (CPs) are an emerging class of nanoporous crystalline solids to address the energy and environmental problems [1-3]. They show considerable large uptake and selectivity of gases due to the advantages of large surface area and tunable pore size. The use under high pressure gas are considered as some potential applications, which are methane storage in high pressure tank with MOFs and CO_2 separation membrane from high pressure H_2 and CO_2 (precombustion CO_2 capture). Some study on the uptake and selectivity under high pressure conditions have been reported, which suggest that host-guest (MOF-gas molecules) interaction mainly affect the uptake and the selectivity under low pressure region, while guest-guest interactions would contribute to the functionality under high pressure region. Fundamental investigations such as the interaction, dynamics and adsorption behavior under high pressure gas are important because they strongly affect the uptake and selectivity; however, the study under high pressure have been very limited.

In this work, we investigate the dynamics of CO_2 in MOF-74 in the wide rage pressure including high pressure (0.01 － 1 MPa) using the combination of CSA and T1 analyses. MOF-74 has honeycomb analogous structure composed of Zn^{2+} and 2,5-dioxidoterephatalate (DOTP) (Figure 1) [4]. The structure contains one-dimensional straight miropores of ca. 11 Å diameter and coordinatively unsaturated metal sites (open metal site: OMS) at the corner of the pores. The OMS play role of a Lewis acid site, leading to excellent adsorption and separation behavior for CO_2. To investigate the dynamics of CO2 adsorbed at OMS and ligands sites, we analyzed the ^{13}C CSA

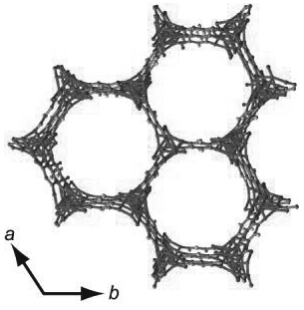


Figure 1. Crystal structure of MOF-74

配位高分子

○いぬかいむねひろ、くりはらたくや、のだやすと、なかむらこういち

patterns and spin-lattice relaxation time (T1) for adsorbed CO_2. The CSA patterns for static sample reflect 6-site or 12-site hopping around adsorption sites with the rate of ~10^{-6} (Figure 2). Figure 3 shows ^{13}C MAS NMR spectra with ^{1}H decoupling and 6 kHz spinning. The peak shift would suggest the increment of CO_2 adsorption at ligand sites. The T1 value for the adsorbed CO_2 increase with the increment of pressure (Figure 4). The pressure dependence indicates enhancement of CO_2-CO_2 interactions under high pressure region. We calculated correlation time (τ) that corresponds to one rotation time of CO_2 at 0.1 MPa and 1.0 MPa were 1.8 × 10^{-8} s and 3.2 × 10^{-8} s, respectively. The low mobilities are similar to the dynamics of CO_2 in a restricted microporosity [5] and side chain of the general polymers. These NMR studies reveal the multiple dynamics of CO_2, which are local vibration and rotation with the rate of ~10^{-8} s and rotation on a cone around adsorption sites with the rate of ~10^{-6} s.

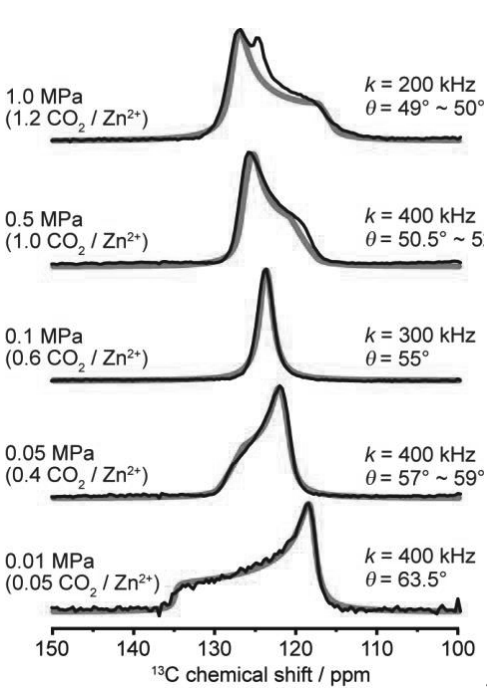


Figure 2. ^{13}C CSA patterns of CO_2.

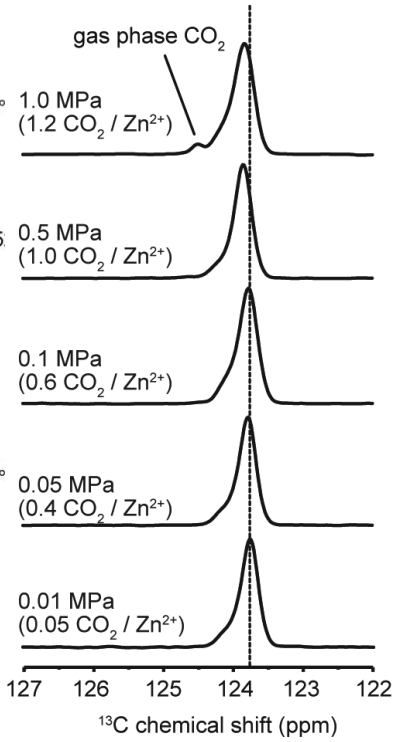


Figure 3. ^{13}C MAS NMR spectra

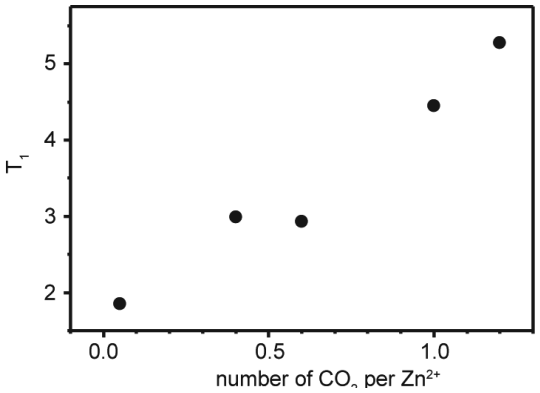


Figure 4. Pressure dependence of T_1.

[References]

[1] O. M. Yaghi, M. O'Keeffe, N. W. Ockwig, H. K. Chae, M. Eddaoudi and J. Kim, *Nature*, 2003, **423**, 705-714.

[2] S. Kitagawa, R. Kitaura and S.-i. Noro, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2004, **43**, 2334-2375.

[3] G. Férey, C. Mellot-Draznieks, C. Serre and F. Millange, *Acc. Chem. Res.*, 2005, **38**, 217-225.

[4] N. L. Rosi, J. Kim, M. Eddaoudi, B. L. Chen, M. O'Keeffe and O. M. Yaghi, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 1504-1518.

[5] M. Inukai, M. Tamura, S. Horike, M. Higuchi, S. Kitagawa and K. Nakamura, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2018, **57**, 8687-8690.

P70

ガラス溶解によって生じる表面変質層の多核固体NMRによる解析

○古谷健太，大窪貴洋
千葉大学大学院　融合理工学府

Multinuclear solid-state NMR analysis of surface alteration layers caused by glass dissolution

○Kenta Furutani, Takahiro Ohkubo
Chiba University Graduate School of Science and Engineering

Surface alternation layers resulting from glass dissolution is a key material to control dissolution rate of the nuclear water glass for Long-term safety assessment. To understand formation mechanisms and mass transport in the surface alternation layers, structural analysis of pristine and altered alumino-boro silicate glasses following nuclear waste glass was carried out by multinuclear solid-state NMR. Four glasses with different Al content were prepared, and glass dissolution test was run to obtained the sample including the alternation layer. ^{29}Si MAS NMR spectra of pristine glasses showed Q^3, Q^4 and neighboring Al Q^4(1Al) species. Significant peak narrowing and increasing Q^4 contents were found in the altered glasses due to the release of soluble elements in the glass. Peak narrowing is due to structural relaxation, and increasing Q^4 was caused by repolymerization of dissolved Si. Preferential dissolution of BO_4 species for the glass without Al was found in the ^{11}B MAS NMR spectra. On the other hand, the glass with higher Al content show congruent dissolution of BO_3 and BO_4.

【緒言】

原子炉の運転により発生する高レベル放射性廃棄物は、ホウケイ酸ガラスとともに溶融しガラス固化体として地下深くに埋設され、人間の生活から隔離する「地層処分」により最終処分される。ガラス固化体の地下水に対する溶解特性を理解することは地層処分による安全性および信頼性の向上に関して特に重要事項である。これまでガラス固化体の性能評価は短期のガラス溶解試験に基づいた結果から行われている。しかし、ガラスの溶解挙動に影響を与えるとされているガラス表面の変質層の理解が不十分であり、長期の溶解挙動を予測するための解明すべき課題となっている。本研究では、ガラス固化体およびガラス溶解によって生じる表面変質層のキャラクタリゼーションを目的とし、溶解試験および固体核磁気共鳴法(NMR)によるガラス構造の解析を行った。

【実験】

ガラスネットワーク構成元素についてガラス固化体と同じ組成をもちAl含有量を変化させたガラスを対象に実験を行った。SiO_2、H_3BO_3、Na_2CO_3、Al_2O_3 を原料としてx(67.8SiO_2-18.0B_2O_3-14.2Na_2O)-(100-x)Al_2O_3 (x = 0, 4, 8, 12それぞれ00A, 04A, 08A, 12Aと表記)となるように試薬を秤量し、乳棒・乳鉢を用いて混合した後に白金るつぼに入れた。白金るつぼを1500℃で1 h溶融し、急冷させることでガラスを作製した。得られたバルクガラスをボールミルにより粉砕し、20 μm以下に分級したガラス粉末をガラス溶解試験および固体NMR測定用試料とした。ガラス溶解による変質層の作製は、ガラスの溶解特性を評価するために用いられるPCT-A試験法に準拠して行った。テフロン容器にガラス試料1 gと1 Mに調製したHCl 10 mlを加え、90℃の恒温槽にセットし、7日間静置した。その後回収した溶液中の溶存元素濃度をICP-AESによって定量し、ガラス元素溶解量を評

ガラス、溶解
○ふるたにけんた、おおくぼたかひろ

価した。溶解試験後のガラス試料はイオン交換水にて洗浄した後、90℃で乾燥して固体NMR測定用試料とした。NMR測定は、物質・材料研究機構強磁場ステーションに設置されている500MHz(11.7T)の磁石を用い^{11}B, ^{23}Na, ^{27}Al, ^{29}Si MAS NMR測定を行った。^{29}Si MAS NMR測定は、縦緩和時間による待ち時間を30 minとし、4 msのエコー時間でCPMG法により取得した20個のエコーを足し合わせて信号を得た。

【結果および考察】

Figure 1はAl含有量の異なるガラス試料の溶解試験前後での^{29}Si MAS NMRスペクトルを示す。溶解前のガラス試料で得られたスペクトルは、これまでの研究よりAlを含まない00A試料はQ^3およびQ^4(0Al)構造、含む構造ではQ^4(1Al)とQ^4(0Al)のピークを仮定してピーク分離を行った。00A のQ^3とQ^4の比は1:9であった。04Aと08Aで、Q^4(1Al)とQ^4(0Al)の存在比は1:1、もっともAlを多く含む12Aでは、Q^4(1Al)とQ^4(0Al)の存在比は9:1であった。すべての試料で、溶解によりピークの先鋭化が生じた。この結果は、ガラスネットワークを構成する可溶性元素が溶出することによって、ガラス構造の緩和が生じ、Si局所構造の不均一性が解消したためと考えられる。また溶解後のガラス試料で得られたスペクトルは、溶解前と比較してQ^4(0Al)構造の存在比が増大していた。浸出溶液のSi濃度は無視できるほど小さいことから、ガラス溶解によってSiの浸出・沈殿により再重合することでQ^4(0Al)構造が増加したと考えられる。

Figure 2はAl含有量の異なるガラス試料の溶解試験前後での^{11}B MAS NMRスペクトルを示す。-2および10 ppm近傍のピークはそれぞれBの4配位、3配位構造に対応する。Al含有量が増加することで溶解前のガラスでは4配位構造のB種から3配位構造のB種へとネットワーク構造が変化した。00Aの試料では、ガラス溶解によって、BO_4サイトのピーク面積比が減少し、BO_3サイトのピーク面積比が増加した。この結果からガラス中のNa^+はマイナス電荷を持つBO_4^-近傍に多く存在し、溶液との接触において可溶性元素であるNa^+が選択的に溶出すると同時にカウンターアニオンであるBO_4^-の溶出を引き起こしていると考えられる。12Aの試料では溶解後のガラスのスペクトルは溶解前のガラスと近い線形を示す。これはガラスネットワークを構成するBO_4とBO_3が調和的に溶出したためと考えられる。

当日は、^{23}Na MAS、^{27}Al MAS NMRによる解析結果についても報告する。

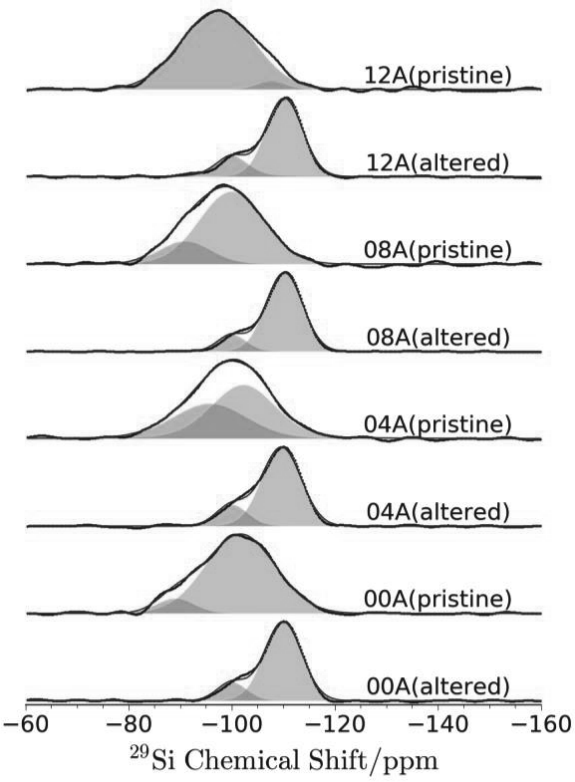


Figure 1 ^{29}Si MAS NMR spectra of glasses with different aluminum content before and after dissolution

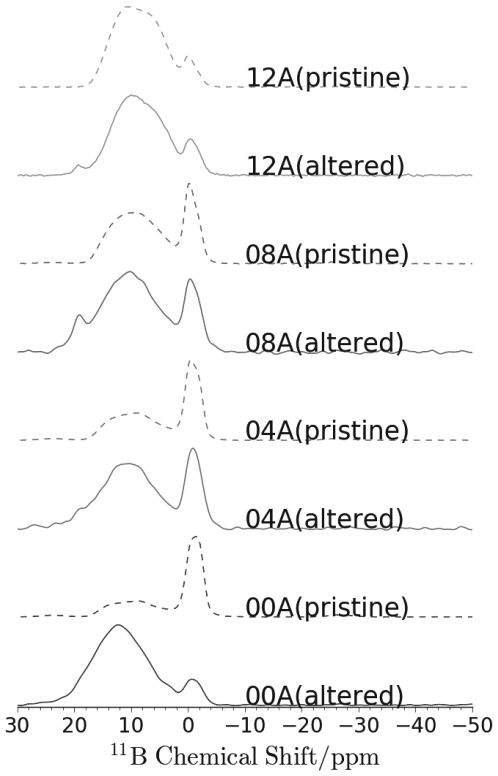


Figure 2 ^{11}B MAS NMR spectra of glasses with different aluminum content before and after dissolution

P71

石炭の固体NMR線形分離のための多変量解析法の応用

○奥下慶子[1]，畑友輝[1]，杉本　義一[2]，高橋貴文[1]，金橋康二[1]
[1]日本製鉄株式会社
[2]産業技術総合研究所

Application of multivariate analysis for peak deconvolution in solid-state NMR spectra of coals

○Keiko Okushita [1], Yuki Hata[1], Yoshikazu Sugimoto[2], Takafumi Takahashi[1], Koji Kanehashi[1]
[1]Nippon Steel Corporation
[2]National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

The structure and percentage of organic components in coals affect their physical and chemical properties necessary in the iron-making process. Solid-state NMR spectra contain these structural parameters of bulk coals, but there are also unavoidable problems in the spectra, namely multiple overlaps and broad width of the spectra, derived from their complex origin. In this study, we applied a multivariate analysis to extract the peak deconvolution parameters in solid-state NMR spectra of coals by combining NMR relaxation measurements, and discussed the reliability of the extracted parameters.

１．背景・目的

石炭有機元素のうち炭素（C）や水素（H）が主要割合を占め、製鉄工程に関わる石炭物性は基本的に、C及びHを含む骨格構造の変化に依存すると考えられている。また、製鉄工程での石炭燃焼に伴うNO_x発生には石炭中の窒素（N）含有官能基構造も関連していると考えられ、複雑な構造が混在する石炭中の有機成分を分離・定量しうる固体NMR法で得られる各官能基の定量比率はNO_x化機構解明においても重要なパラメーターである。一方、石炭の固体NMRスペクトルは、定量比率算出が比較的容易なI=1/2核であっても分布の広い多くの成分が重なり合った線形を示す。そのため、成分比率を計算するための線形分離処理を行う際、分離関数の種類、ピーク位置や線幅といった分離パラメーターの決定に解析者の判断を要する。そこで本研究では、NMR法の特徴である緩和時間測定データを利用し、さらに多変量解析を併用することで、極力１次元固体NMR分離パラメーターの決定に任意性を要さない解析手法を構築することとした。本研究では特に、二次元相関NMR法で相関ピークトップが既知[1)]の^{15}N標識化人工石炭[2)]の固体NMRスペクトルで手法検討を行うとともに、分離パラメーターの妥当性を評価した。

２．実験

【測定試料】セルロースに[1-$^{15}N_1$]Glycine、^{15}N-Uracil、$(^{15}NH_4)_2SO_4$を窒素源として加え300℃で合成された、瀝青炭程度の炭化度を有する^{15}N標識化人工石炭G300、U300及びA300を固体^{15}N核NMR測定に用いた。

【NMR測定条件】分光器：Bruker Ascend 800 Avance NEO、共鳴周波数：{^{1}H}800.19 MHz, {^{15}N}81.08 MHz、プローブ：PH MASDVT800S4 BL3.2 N-C/F-H FIX、マジック角回転（MAS）：23 kHz（3.2 mmϕ）、測定法：Hahn-echo法、^{1}H-^{15}N CP/MAS（接触時間 0.1～8.0 ms）

石炭、緩和時間測定、多変量解析

○おくした　けいこ、はた　ゆうき、すぎもと　よしかず、たかはし　たかふみ、かねはし　こうじ

３．結果と考察

Fig. 1aに示した^{15}N標識化人工石炭A300の^{15}N Hahn-echo及び^{1}H-^{15}N CP/MAS NMRスペクトルを比較すると、CP/MAS では-220～-280 ppm付近で選択的にスペクトル強度が高くなることがわかる。同領域は^{1}Hと^{15}Nが直接結合したアミド/ピロール系窒素官能基領域に対応しており、既報での超高速MAS二次元スペクトル解析により詳細に分離・帰属されている[1)]。同領域は少なくとも12成分を含むが、それら成分の定量的な窒素定量比率を二次元スペクトルから求めて試料間で比較するのは現実的ではない。一方、従来研究で用いられてきた線形分離パラメーター[2)]による一次元^{15}N MAS NMRスペクトル分離結果をFig. 1bに示したが、アミド/ピロール系窒素官能基領域は1成分として分離されており、NMRだからこそ分離できた構造の違いに関する情報が隠れてしまっている。一方、Fig. 1aのようにCP/MASスペクトルでは接触時間tの変化に伴ってスペクトル強度$I(t)$が変化し、その強度変化は結合する^{1}H数や運動性にも依存することが知られている。そのため、このようなスペクトル強度$I(t)$依存性を極力客観的に抽出するため、接触時間tを目的変数として多変量解析の1種のPLS（Projection to Latent Structure）を行った（Fig. 1c）。PLSでは説明変数（NMRスペクトル）と目的変数（接触時間）の共分散が最大となるように主成分（PC）を計算し、主成分に対応したローディングを回帰していく。Fig. 1dにはPC1とPC2のPLSローディングから決定したピーク分離パラメーターをCP/MASスペクトルに適用した結果を示した。同分離パラメーターは、既報の詳細分離・帰属結果における官能基の大分類とも概ね対応しており、分離手法としても妥当性も確認された。分離パラメーターの決定手順に依然として、任意性が入る余地もあるため、手順を改良して得られた結果の進捗についても本会で議論する。

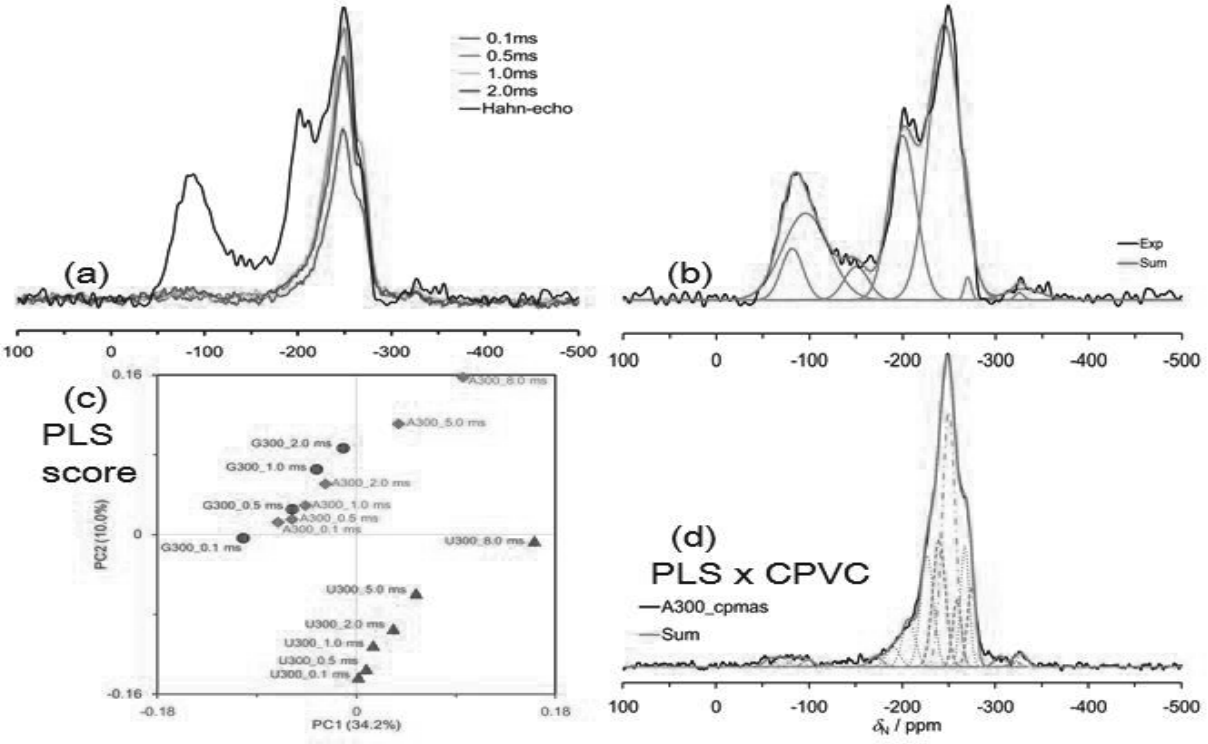


Fig. 1 (a) ^{15}N Hahn-echo and ^{1}H-^{15}N CP/MAS NMR spectra of A300, (b) deconvolution result of Hahn-echo by previously reported parameters, (c) PLS-score plot of CP/MAS spectra, and (d) application of deconvolution parameters to CP/MAS spectrum (contact time 1.0 ms), which parameters were improved by PLS application.

【参考文献】

1) Okushita *et al.*, *Energy & Fuels* **2019**, submitted.
2) 川島、呉、杉本、*日本エネルギー学会誌* **2002**, *81*, 49-56.

P72

生分解性ポリマーの構造・物性データサイエンス

○山脇涼[1]，坪井裕理[2]，鄭章代[2]，伊藤研悟[1,2]，菊地淳[1,2,3]
[1]横浜市立大学大学院 生命医科学研究科
[2]理化学研究所 環境資源科学研究センター
[3]名古屋大学大学院 生命農学研究科

Data Science for Evaluating the Relationship among Structure and Physical Properties of Biodegradable Polymers

○Ryo Yamawaki[1], Yuuri Tsuboi[2], Akiyo Tei[2], Kengo Ito[1,2], Jun Kikuchi[1,2,3]
[1]Grad. Sch. Med. Life Sci., Yokohama City Univ., [2]RIKEN CSRS, [3]Grad. Sch. Bioagri. Sci., Nagoya Univ.

Since the conventional plastics are difficult to degrade in the natural environment, there is an increasing interest towards the biodegradable polymers as alternative materials. However, to produce the biodegradable polymers practically, it was considered necessary to clarify the relationship among these structures, physical properties, and degradability. In this study, we conducted biodegradation experiments using the biodegradable polymers with higher-order structure formed by the annealing process. Also, we aimed to construct the strategy that can comprehensively evaluate the relationship among the structures, physical properties, and decomposability by data scientific method using various analytical data from NMR, TG/DTA, etc. From the PCA results using the ^{13}C CP/MAS spectra of the molded PLA, the structural change due to the annealing process was confirmed, and this change was expected to affect the degradation performance.

【背景・目的】

プラスチックは世界各国で使用される欠かせない材料である。しかし、廃棄された大部分のプラスチックは自然環境中で難分解なため、国際的な環境問題へと発展している。そのため、生産・分解の循環が可能な生分解性ポリマーが注目されている。一方で、環境中で分解されるということは劣化が早いことと同義であり、耐久性等に関して改善の余地がある。例えば、生分解性ポリマーであるポリ乳酸(PLA)は、酸や塩基の濃度、水分量、温度などの要因によって分解の程度が変化することが知られている[1]。そこで、環境条件下では分解されないが、温度が一定以上であるなど、特殊な条件下にあると速やかに分解されるような工夫がなされれば、より実用的な生分解性ポリマーが得られると期待できる。また、これらの評価には、NMRを含めた多角的な分析法を用いたデータ取得とデータサイエンス手法が有効である[2-4]。そこで本研究では、アニール処理などにより高次構造を変化させたポリマーを用いて生分解実験を行い、NMRなどの分光測定や機械物性の測定からデータを網羅的に取得し、データサイエンスにより構造・物性・分解性の関係を網羅的に評価する系の構築を目指した。

【方法】

本実験では、まず、生分解性ポリマーの各種フィラメントを用いて、成型処理過程を変化させたシート状のサンプルを作成した。サンプルは3Dプリンターを用

高分子物性、固体NMR、マテリアルズインフォマティクス

○やまわきりょう、つぼいゆうり、ていあきよ、いとうけんご、きくちじゅん

いて、大きさ40 mm × 40 mm、厚さ0.4 mmの規格になるように成型した。また、この時に、成型温度やアニール処理の有無、種類によって熱履歴を変化させた。この処理により変化したサンプルの結晶・非晶度の評価は、熱分析(TG/DTA)を用いて行った。次に、得られたPLA由来のサンプルを、60 ℃の恒温槽内のコンポストに埋没させ、生分解実験を行い、1週間ごとにサンプルを回収した。回収前後のサンプルは、MASプローブを用いた^{1}H NMR及び^{13}C CP/MAS実験に供した。計測はMAS周波数12 kHz、27 ℃で行った。また、得られたデータの主成分分析(PCA)などを行い、生分解性ポリマーの構造・物性の評価を行った。

【結果・考察】

まず、成型したPLA由来の30サンプルを用いてTG/DTA測定を行った。アニール処理前のサンプルでは存在していた結晶性を示すピークがアニール処理後に消失し、結晶・非晶の比率の変化が確認できた。次に、同30サンプルの^{1}H NMR及び^{13}C CP/MASスペクトルのPCAを行った。^{1}H NMRスペクトルのPCAの結果では、各種フィラメントの違いがスコアプロットに大きく反映されたが、アニール処理の有無はごくわずかな違いしか示さなかった。この要因として、各種フィラメントに用いられた添加剤が顕著に検出されたためだと考えられた。一方で、^{13}C CP/MASスペクトルのPCAの結果では、アニール処理の有無がスコアプロットに大きく反映され(**Fig.1a**)、ローディングプロットでは、各ピークに分かれた(**Fig.1b**)。スペクトルそのものを比較すると、アニール処理の条件が厳しくなるほど各ピークがシャープになっていた。^{1}H NMR実験と比較して、^{13}C CP/MAS実験は剛直な化合物のフラグメントを積極的に検出するため、より敏感にアニール処理の違いが識別できた可能性が考えられた。さらに本発表では、多角的な計測及びデータサイエンス的解析から評価した生分解性ポリマーの構造・物性・分解能の関連性を報告する。

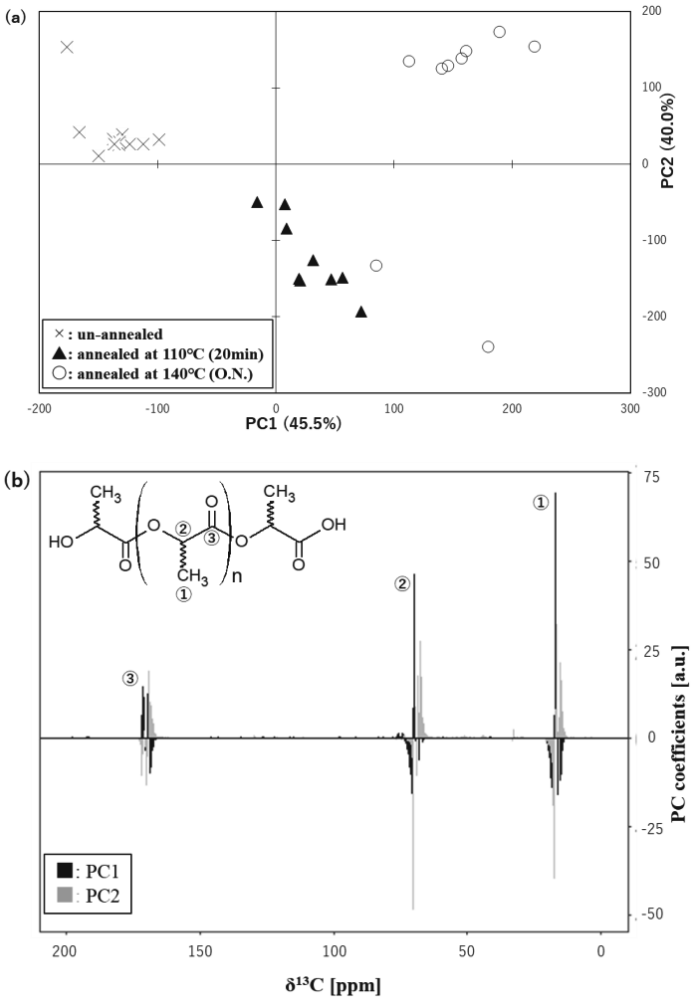


Fig. 1. (a) Score plots and (b) loading plots of PCA using ^{13}C CP/MAS spectra.

【参考文献】

[1] Drumright, R. E., Gruber, P. R. and Henton, D. E. *Adv. Mater.* **12**, 1841–1846 (2000).

[2] Bagheri, A. R., Laforsch, C., Greiner, A. and Agarwal, S. *Global Challenges* **1**, 1700048 (2017).

[3] Spaccini, R., Todisco, D., Drosos, M., Nebbioso, A. and Piccolo, A. *Chem. Biol. Technol. Agric.* **3**, 4 (2016).

[4] Kikuchi, J., Ito, K. and Date, Y. *Prog. NMR Spectrosc.* **104**, 56–88 (2018).

P73

重水素NMRによる細孔径の異なる活性炭素繊維へ吸着挙動の検討

○出田圭子[1]，下林佑輝[2]，中林康治[1,2]，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府

Study of adsorption behavior with different pore sizes on activated carbon fibers using deuterium NMR

○Keiko Ideta[1], Yuki Shimobayashi[2], Koji Nakabayashi[1,2], Seong-Ho Yoon[1,2], Jin Miyawaki[1,2]
1 Institute for Materials Chemistry and Engineering, Kyushu Univ., Fukuoka, Japan.
2 Interdisciplinary Graduate School of Engineering Sciences, Kyushu Univ., Fukuoka, Japan.

Activated carbon fiber (ACF) is used to purify water and air due to its adsorption capacity. Adsorption ability varies depending on pore size, depth, and surface condition, and the desired performance is exhibited by using ACF with selectivity according to the adsorbate.

It is required to act in high humidity, when it was used to remove formaldehyde (HCHO) in the environment, which is a cause of sick house syndrome. In previous studies, we conducted an HCHO removal experiment using activated carbon fibers and activated carbon nanofibers which polyacrylamide was as starting material. ACNF showed good removal ability under high humidity conditions. Therefore, in this experiment, we analyzed how water molecules are adsorbed on ACFs and ACNFs using solid-state ^{2}H-NMR, in order to help in future material design.

【緒言】

活性炭素繊維(ACF)はその吸着能により、水や空気の浄化に用いられる。吸着能は細孔サイズや深さ・表面状態により異なるため、吸着質に応じた選択性を持つACFを用いることで目的の性能を発揮する。

シックハウス症候群の一因とされる環境中のホルムアルデヒド(HCHO)の除去に用いる場合、高湿度中で働くことが要求される。我々は以前の研究により、ポリアクリルアミド(PAN)を出発物質としたACFおよびより繊維径の小さい活性炭素ナノ繊維(ACNF)を用い乾燥および高湿度条件下でHCHO除去実験を行なったところ、ACFよりもACNFが良い除去能を示すことを見出した (Fig.1) [1], [2]。

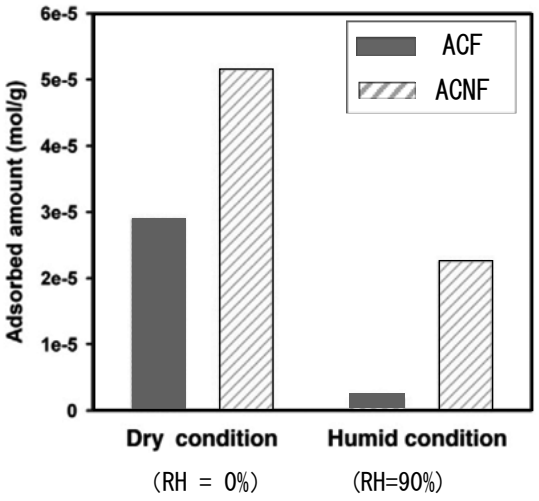


Fig. 1. Comparison of formaldehyde adsorption amount until the breakthrough time in dry or humid condition between ACF and ACNF

そこで、本実験では今後の材料設計に役立てるため、まず水分子が活性炭素繊維にどのように吸着しているのかを固体 ^{2}H-NMRを用いて解析した。

活性炭素繊維、^{2}H-NMR

○いでた けいこ、 しもばやし ゆうき、 なかばやし こうじ、 ゆん そんほ、 みやわき じん

【実験】

PAN系ACFは市販のポリアクリルアミド由来水蒸気賦活活性炭素繊維 FE100, FE200, FE300（東邦テナックス(株)）を用いた。ACNFは、電界紡糸法にてPAN濃度8wt％と13wt％にて調製したPANナノ繊維に耐炎化、炭素化、賦活処理を施すことで作製した。これらの試料にD_2OあるいはH_2Oを吸着させ、固体NMR測定およびDSC測定を行った。固体NMR測定はJEOL ECX400 3.2 ㎜ CPMASプローブ（^{2}Hの共鳴周波数61.639MHz）を用いた。

【結果と考察】

Tableに各試料の元素組成、表面積及び平均細孔径を示した。いずれも出発原料は同じであるが表面積や平均細孔径が異なっていた。また窒素含有量にも差があり、このことは極性分子の吸着に影響すると考えられるため、これらの物性が近いFE100及びACNF8をDSCで水の吸着状態を比較した(Fig .2)。水の脱着とみられる吸熱ピークはACNFでは20℃付近の1ピークであるが、ACFでは55℃付近にもう一つピークがあることが観測された。ACFにはACNFと同じとみられる脱着しやすい水の他に安定化された吸着水があることが分かった。この差はナノ繊維であるACNFの繊維径300~500 nmであるが ACFのそれは10~20 μmと大きく異なる繊維径に由来することが考えられる。

Fig.3に ^{2}H-固体NMRの結果を示す。ACF3種はいずれも四極子のパターンを示しており、水の2回軸周りの回転運動もしくは四面体サイト間のジャンプと思われる。また平均細孔径が小さいほど線幅が太く、水の運動が制限されていると考えられる。一方、ACNFの線幅はACFの平均細孔径から予想されるより細く、高い運動性が示唆されたため、さらに水の吸着挙動との関連を検討していく。

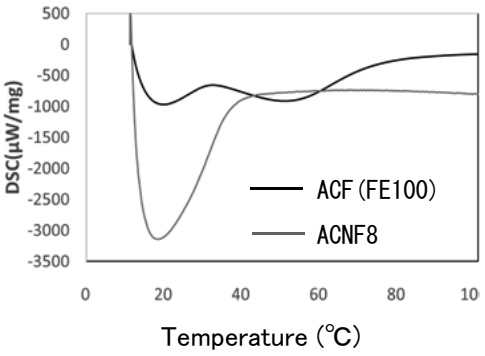


Fig. 2. DSC analysis of water-adsorbed ACF and ACNF

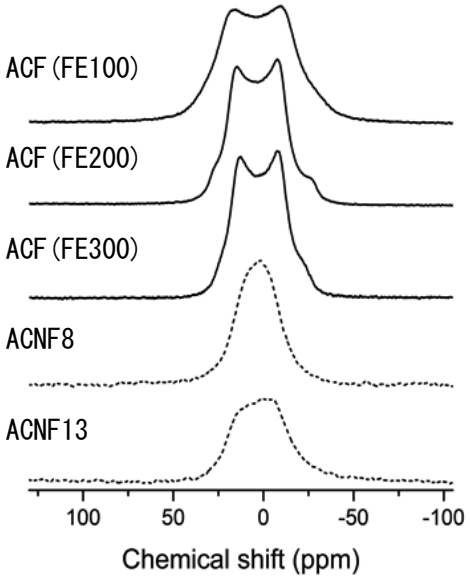


Fig. 3. Static ^{2}H –NMR spectra of adsorbed D_2O on ACFs and ACNFs

Table. Basic properties of ACFs and ACNFs

Samples	Elemental composition (wt %)				BET surface area (m^2 / g)	Average Pore diameter(nm)
	C	H	N	O (diff)		
ACF(FE-100)	80.9	1.0	11.1	7.0	643	0.63
ACF(FE-200)	83.7	0.9	6.1	9.3	725	0.70
ACF(FE-300)	83.7	1.0	5.1	10.2	1082	0.72
ACNF8	79.9	1.3	12.9	5.9	725	0.65
ACNF13	79.7	1.5	13.1	5.7	801	0.65

^{2}H-固体NMRの解釈についてご助言をいただいた金沢大学　水野元博先生に感謝いたします。

References

[1] K.J. Lee, et.al., *CARBON*, **48**, 4248–4255, (2010)

[2] J. Miyawaki, et.al., *Catalysis Today* ,**185**, 278–283, (2012)

P74

超高速MASのLIB正極材解析への応用－NMR、XRD、TEMを相補的に用いた構造およびサイクル劣化挙動解析－

○矢澤宏次[1]，佐々木義和[2]，田渕光春[3]
1JEOL RESONANCE
2日本電子
3産業技術総合研究所

Applications of ultra fast MAS for LIB cathode materials - Complementary analysis by using NMR, XRD, and TEM

○Koji Yazawa [1], Yoshikazu Sasaki[2], Mitsuharu Tabuchi[3]
1 JEOL RESONANCE Inc.
2 JEOL Ltd.
3 National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

NMR is extremely useful tool for characterizing local structure of materials for lithium ion battery (LIB) because it is able to observe Li ion directly. In this study, we report composition and deterioration in charge/discharge cycle of layered lithium nickel manganese oxides synthesized under air and nitrogen by ^{7}Li solid state NMR spectroscopy. In order to obtain high resolution ^{7}Li spectra without spinning side band originated from paramagnetic interaction, we used an ultra fast spinning magic angle spinning system and a recent pulse technique, magic angle turning and phase adjusted sideband (MATPASS). ^{7}Li MATPASS spectra showed clear peaks originated from Li in Li layer and in transition metal layer, respectively, for the both sample. However, the sample synthesized under air exhibited narrower linewidth indicating formation of Ni rich and Mn rich domains, and suggesting these domains relates to the Li rich phase forming small monoclinic (c2/m) domain which is not observable in x-ray spectra. We will report the results of after charge/discharge samples as well and discuss structural change in cycles with results from XRD and TEM-EDS analysis in the presentation.

【緒言】

ニッケルマンガン系正極材料は高電位サイクル特性と電解質との低反応性を併せ持ち、またCo等の高価な原材料も必要としないため、次世代LIB正極材料として非常に期待されている。LIB構成材料の化学構造や組成の情報を得るうえで、Li原子を直接観測できるNMRは有効な分析手段で広く用いられている。 しかしながら、LIB正極材料では、近接する常磁性遷移金属による常磁性相互作用で多くのスピニングサイドバンド(SSB)が生じてしまい、特に磁気回転比の高い^{7}Liでは、SSBの重なりが大きいため、一般的な固体NMRプローブ（回転周波数～20kHz）ではスペクトルの解析が困難であった。

本研究では超高速MASプローブとmagic-angle turning and phase adjusted sideband separation (MATPASS)法[1]を組み合わせて用いることで、1mg程度の微量試料でSSBフリーの^{7}Li高分解能スペクトルを取得し、各種合成条件やサイクル劣化過程での正極中のLiイオンの状態の解析を行った。XRDによる結晶の情報や、TEM観察、およびEDS解析による、遷移金属の局所情報を相補的に用いることで、ニッケルマンガン系正極の構造およびサイクル劣化挙動の解析を行った。

電池、固体NMR、常磁性

○やざわこうじ、ささきよしかず、たぶちみつはる

【実験】

試料はNi-Mn前駆体とLi_2CO_3をLi/M=2(M=Ni, Mn)の比率で混合し、空気中（650℃、5時間）で1次焼成し、その後、空気中および窒素中（900℃、8時間）で2次焼成したものを用いた。NMR装置はJNM-ECZR600 (JEOL RESONANCE) を用い、超高速試料回転は1mmHXMASプローブを用い回転速度50-70kHzで行った。１次元スペクトルはスピンエコー法を、SSBフリーの^{7}LiスペクトルはMATPASS法を用いて取得した。

【結果と考察】

Fig.1 に空気中で焼成した $LiNi_{0.3}Mn_{0.7}O_2$ の 2D MATPASS スペクトルを示す。これをチルト処理し、足し合わせることで SSB フリーの ^{7}Li スペクトルが得られる(pj-MATPASS)。通常の 1D スピンエコー測定では得られない高分解能スペクトルが得られた。次に空気中、および窒素中で焼成した試料の比較を行った。以前の研究から空気中で焼成した試料の方が高容量を示すことがわかっている。Fig.2 に両試料の pj-MATPASS スペクトルを示す。両試料とも 500-900ppm に Li 層中の Li (Li_{Li})、1300-1500ppm に遷移金属層中の Li (Li_{TM})由来のピークを示した。しかしながらそのスペクトル形状は異なっており、空気中で形成された試料の方が線幅が細く、特に Li 層中の Ni 近傍のピークにおいてそれが顕著であった。このことから、空気中で焼成した試料の方が XRD では確認できない、微小な Mn リッチなドメインと Ni リッチなドメインを形成しており、これらが高容量なリチウム過剰相の形成と関係していることが示唆された。発表ではサイクル劣化試料の NMR 解析結果も示し、XRD による結晶の情報や、TEM 観察、および EDS 解析による遷移金属の局所情報を相補的に用いることで、ニッケルマンガン系正極の構造およびサイクル劣化挙動について議論する。

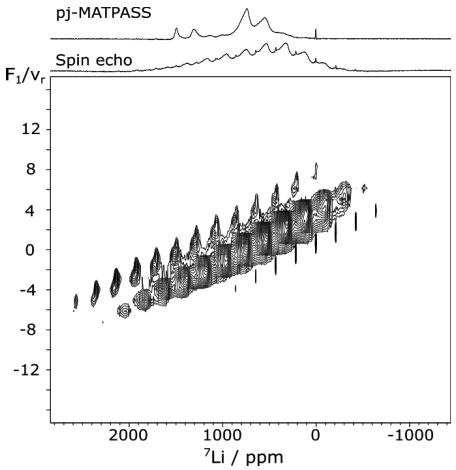


Fig. 1　2D MATPASS spectrum of $LiNi_{0.3}Mn_{0.7}O$ synthesized under air atmosphere. Isotropic spectrum (pj-MATPASS) is obtained from summation of ssbs after shearing. Spin echo spectrum obtained at 70kHz MAS is also shown.

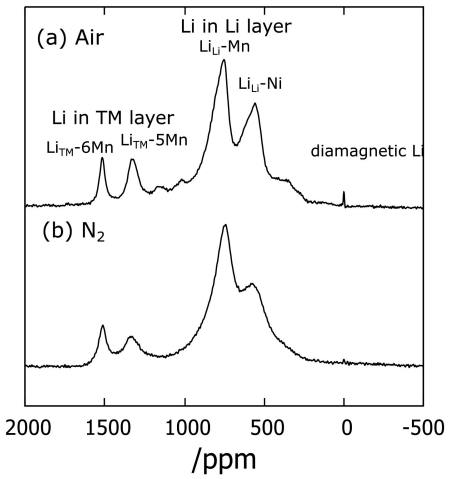


Fig. 2 pj-MATPASS spectra of $LiNi_{0.3}Mn_{0.7}O$ synthesized under (a) air and (b) nitrogen atmosphere.

【参考文献】

(1)　Hung, I.; Zhou, L.; Pourpoint, F.; Grey, C. P.; Gan, Z. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 1898–901.

P75

固体NMRによるC-S-Hおよび水和aliteの構造解析

○高橋 貴文[1]
[1]日本製鉄株式会社　先端技術研究所

Solid State NMR structural analysis on C-S-H and hydrated alite

○Takafumi Takahashi [1]
[1]*Advanced Technology Research Laboratories, Nippon Steel Corporation*

Since alite ($3CaO \cdot SiO_2$) is the most abundant mineral component in Portland cement, its hydration would affect the strength of cement pastes in the early stage of hydration. In this study, we have examined the effect of gypsum ($CaSO_4 \cdot 2H_2O$) on hydration of alite by using solid state NMR. Structural analysis of C-S-H has also been performed for characterization of the hydration products. Network structure of hydrated products was analyzed based on the spectra of ^{29}Si MAS, $^{29}Si\{^1H\}$ CPMAS and ^{29}Si DQMAS.

【諸言】

Alite($3CaO \cdot SiO_2$)は、ポルトランドセメントを構成する鉱物（クリンカー）の中で最も存在比率が高く、Fig.1示すように、SiO_4が孤立したQ^0構造で構成されているため水和反応性も高いと考えられている。このような特徴から、aliteはセメントの初期の水和反応を研究するためのモデル物質と見なされ、その水和硬化過程が研究されてきた。その一方で、近年、alite単体とセメントでは、硬化体の初期強度や硬化組織に大きな乖離があることも報告されている。例えば、Motaら[1]は、gypsum（$CaSO_4 \cdot 2H_2O$）添加の有無によって、セメントの強度発現や硬化組織に違いが現れるとしている。著者らも、大気圧走査電子顕微鏡を用いた追跡観察によって、カルシウムシリケイト水和物（Calcium Silicate Hydrate C-S-H）および水酸化カルシウム($Ca(OH)_2$)の晶出挙動に違いが現れることを見出した[2]。こうしたGypsum添加による硬化組織の違いが報告される一方で、カルシウムシリケイト水和物（C-S-H）に代表される水和物の化学構造への影響は道である。C-S-Hの構造は非晶質に近く、X線回折では明確な回折線を与えないため、分子レベルの構造情報を取得可能なＮＭＲ分光法が構造解析に適している。そこで、本研究では、固体NMRを用いてCa/Si比の異なるC-S-Hの構造的特徴を把握するとともに、水和前後のalite試料の解析を行い、水和硬化過程での化学構造変化およびgypsum添加の影響について検証した。

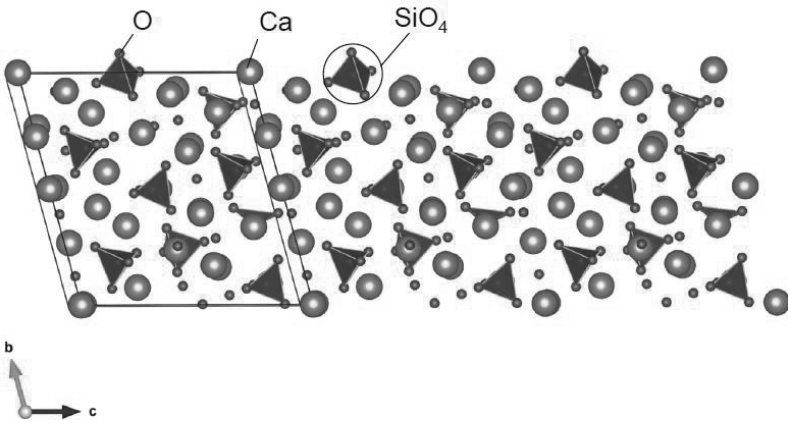


Figure 1. Crystal structure of alite visualized by VESTA[3].

Keywords: Alite, C-S-H, ^{29}Si
○ たかはし　たかふみ

【実験方法】

Aliteは、^{29}Si同位体標識されたSiO_2に化学量論比を考慮した$CaCO_3$を添加して出発原料とし、脱炭酸後、焼成することで合成した。尚、実際のポルトランドセメント中のaliteを想定し、Caサイトの固溶元素として、数%のFe_2O_3, Al_2O_3を添加し、その分、$CaCO_3$混合量を微調整した。上記のように合成したalite試料に、①水のみ、②$CaSO_4$・$2H_2O$および水を添加したケースについて、60s混合した後、25℃に設定された恒温槽内で養生した。所定の養生時間経過後、硬化体を取り出し、減圧下でアセトンに繰り返し浸漬させ、水和反応停止処理を施した。この処理後、硬化体試料を粉砕し、以下の固体NMR測定に供した。

^{29}Si MAS, ^{1}H{^{29}Si} CPMAS および ^{29}Si DQMAS NMR測定は、静磁場9.4T（ω_{Si}=79.459 MHz, ω_H=400 MHz）、7mmφZrO_2製試料管およびMAS回転周波数20kHzにて行った。

^{29}Si MAS NMR測定は、π/6パルス（1.96μs）、繰り返し時間3s（alite試料），C-S-H試料は1500（C-S-H試料）で行い、定量性を確保した。^{29}Si DQMAS測定には、16-BABAシーケンスを用いた。

【結果および考察】

水和反応前後の^{29}Si MASスペクトルをFig.1に示す。この図より、gypsum 添加の有無に関わらず、24h水和後には79ppm, 84ppm付近に水和物由来の新たなピークが観測された。この水和物由来のピークをC-S-H試料の^{29}Si NMR スペクトルと比較すると、Ca/Si(C/S)比=1.4, 2.0のC-S-Hと化学シフトがほぼ一致し、線形も非常に近いことが分かった。従って、alite水和によって生じる水和物はC/S比が1.0より大きいC-S-Hであると考えられる。養生後に観測される水和物の構造に関しては、以下のように考えられる。化学シフト値に基づくと、79ppm付近のピークは架橋酸素1つで結合されたSi四面体ネットワーク構造であり、84ppm付近のピークはSi四面体あたり架橋酸素2つで結合したネットワーク構造に帰属できる。次に、Si四面体の連鎖構造について考察するため^{29}Si DQMASスペクトルを測定した。その結果、水和物由来のQ^1サイト、Q^2サイトは相関を示しており、分子レベルで結合して全体として紐のような構造を有し、Q^2が内部、Q^1が端面を形成することが考えられる。その一方で、水和物由来のQ^1サイト、Q^2サイトは、aliteとは相関を示しておらず、aliteの粒子表面にて水和物が生成するよりも、一端溶解したイオンから生成するC-S-Hが支配的であることが示唆された。

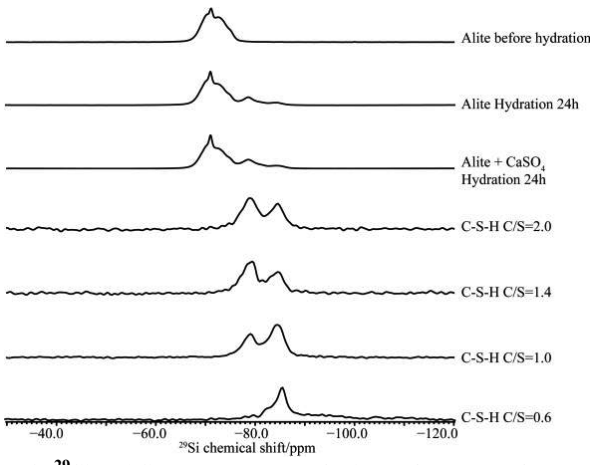


Figure 2. ^{29}Si MAS NMR spectra of alite before and after hydration and C-S-H samples.

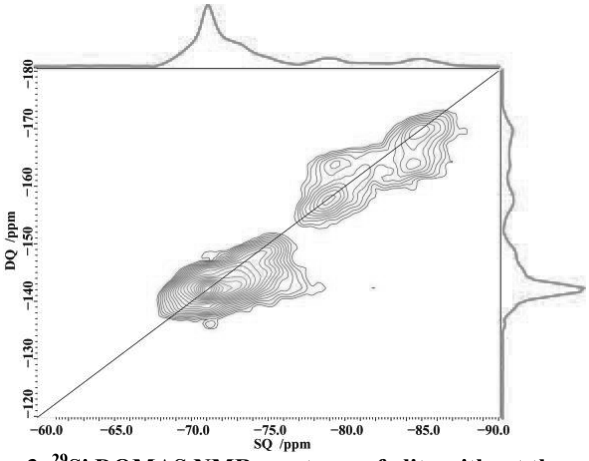


Figure 3. ^{29}Si DQMAS NMR spectrum of alite without the addition of $CaSO_4$・$2H_2O$ after 24h hydration.

【References】

[1] B. Mota, T. Matschei, K.L. Scrivener, *Cemen. Concr. Res.* (2015) 75, 53 [2] T. Takahashi, T. Jinnnai, M. Kimura, 34th cement &concrete conference proceedings [3] K. Monna, and F. Izumi, *J. Appl. Crsytallogr.* (2011) 44, 1272

P76

Agマジックサイズクラスターの^{109}Ag CP/MAS NMRシグナルの帰属

○木下誠志[1]，室和希[1]，藏重亘[2]，川脇徳久[2]，根岸雄一[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 化学専攻
[2]東京理科大学理学部

^{109}Ag CP/MAS NMR signal assignment of silver magic-sized clusters

○Seiji Kinoshita[1], Kazuki Muro[1], Wataru Kurashige[2], Tokuhisa Kawawaki[2], Yuichi Negishi[2], Yasuto Noda[1], and Kiyonori Takegoshi[1]
[1]*Graduate School of Science, Kyoto University*
[2]*Faculty of Science, Tokyo University of Science*

Atomically precise coinage metal nanoclusters doped with multiple foreign metal atoms have been focused as promising functional materials. However, structure analysis of the doped clusters has issues because preparation of the single crystals is difficult. Here, aiming introduction of solid-state NMR to structure analysis of the doped metal clusters, we observed ^{1}H-^{109}Ag CP/MAS NMR signals of $[Ag_{25}(SPhMe_2)_{18}]^-[PPh_4]^+$, which comprises an Ag_{25} cluster formed by an icosahedral Ag_{13} core capped with six –S–Ag–S–Ag–S– silver–thiolate oligomer motifs. The ^{1}H-^{109}Ag CP/MAS NMR signals were decomposed into components. These signals were assigned to the apex sites on the cluster surface, the bridging Ag sites in the oligomer motifs, and the starting material on the basis of contact–time dependence and peak strength ratio as well as chemical shift values calculated by DFT.

【はじめに】

数個～十数個の原子からなる物質はクラスターとよばれている。構成原子数を精密に揃えたクラスターをマジックサイズクラスター（MSC）といい、適切な配位子で保護することで液中に大量合成可能である。近年、貨幣金属 MSC において、合金化や配位子交換による機能発現の探索が行われている[1]。合金化や配位子交換した貨幣金属 MSC は単結晶が得難く、構造解析は困難である。今回、合金化や配位子交換した貨幣金属 MSC の構造解析の足がかりとして、合金化や配位子交換を施していない Ag MSC である$[Ag_{25}(SPhMe_2)_{18}]^-[PPh_4]^+$を固体高分解能 ^{1}H-^{109}Ag CP/MAS NMR によって測定し、シグナルを各 Ag 原子サイトに帰属することを目的とした。なお、$[Ag_{25}(SPhMe_2)_{18}]^-[PPh_4]^+$は 12 個の銀原子からなる正 20 面体頂点サイトの中心(以下､中心サイト）に 1 個の銀原子が存在し、正 20 面体頂点サイト（以下、頂点サイト）を 6 個の $Ag_2(SPhMe_2)_3$ が配位した（以下、この銀原子が配位しているサイトをリガンドサイトと呼ぶ）構造を持つことが単結晶 XRD により判明している[1]。

Agマジックサイズクラスター、^{109}Ag、広幅CP/MAS

○きのしたせいじ、むろかずき、くらしげわたる、かわわきとくひさ、ねぎしゆういち、のだやすと、たけごしきよのり

【実験・数値計算】

試料として、文献[2]に基づいて合成された$[Ag_{25}(SPhMe_2)_{18}]^-[PPh_4]^+$を東京理科大学理学部の根岸雄一教授からご提供いただいた。^{1}H-^{109}Ag CP/MAS NMR 測定は 14 T の磁場中で 4 mm T3 プローブを用いて行った。^{109}Ag と ^{1}H の観測周波数はそれぞれ 27.93 MHz と 600.13 MHz である。なお、自作したマッチングボックスを取り付けることにより、^{1}H-^{109}Ag 二重共鳴を実現した。

DFT 計算によって ^{109}Ag の NMR 化学シフトを計算したが、その際、ソフトウェアは Material Studio の CASTEP、計算手法は Gauge-including projector augmented-wave (GIPAW)法、汎関数には GGA-PBE を用いた。また、cutoff energy は 680 eV とし、Ag と S の配置のみ構造最適化した後に化学シフトを計算した。化学シフトの基準を、実験では 9 M $AgNO_3$ を 0 ppm、DFT 計算では固体 $AgNO_3$ を-76 ppm とした。

【結果・考察】

Fig.1 に $[Ag_{25}(SPhMe_2)_{18}]^-[PPh_4]^+$ の ^{1}H-^{109}Ag CP/MAS NMR スペクトルを示す。この測定において、試料回転速度は 5 kHz、積算回数は 40000 回、接触時間は 50 ms である。試料回転速度を変えて測定したスペクトル同士を比較し、等方化学シフト(δ_{iso})が 800–950 ppm の信号と帰属した。このスペクトルを Voigt 関数でフィッティングすることで 3 つのピークに分離し、δ_{iso} がそれぞれ(1)923 ppm、(2)896 ppm、(3)855 ppm となった。面積強度比は(1):(2):(3) = 39:48:13 であった。ピーク(1)–(3)の δ_{iso}、化学シフト異方性(δ_{aniso})、化学シフトの非対称性パラメータ、接触時間依存性は Table 1 のようになった。比較のため、化学シフトについては DFT 計算結果も Table 1 に示す。^{1}H から遠い ^{109}Ag ほど CP の信号の立ち上がりが遅いことから、(1)が ^{1}H を持つリガンドから遠いコアサイト由来と示唆された。また、面積強度が(1)に近い(2)が頂点サイトと考えた。(2)は T_{IS} が(1)より小さく、頂点サイトの ^{109}Ag 信号はリガンドサイトよりも定周波数側に出るという DFT 計算と定性的に一致した。(3)は T_{IS} が(2)と同程度で面積強度が(1)や(2)より小さいため、不純物の Ag チオラート錯体によるものと帰属した。発表当日は δ_{aniso} が大きいサンプルに対応した CP/MAS のシーケンスやスペクトルについて報告する。

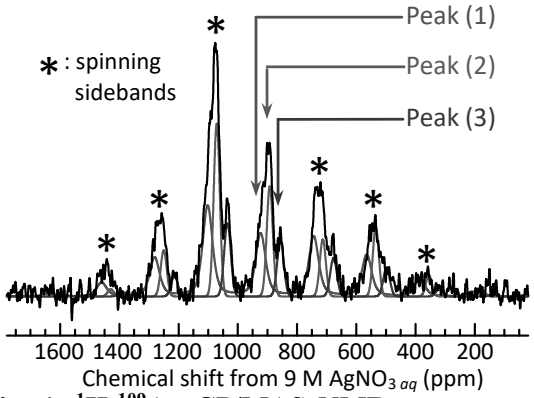


Fig. 1. ^{1}H-^{109}Ag CP/MAS NMR spectrum of $[Ag_{25}(SPhMe_2)_{18}]^-[PPh_4]^+$.

Table 1. ^{109}Ag chemical shift and dependence on the contact time

	δ_{iso} (ppm)	δ_{aniso} (ppm)	η	T_{IS} / ms
Peak (1)	923	-613	0.75	22.6
Peak (2)	896	-590	0.45	17.5
Peak (3)	855	-555	0.57	14.2
DFT center	789	-65	0.44	
DFT apex	910	1069	0.36	
DFT ligand	773	1278	0.21	

【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。京都大学化学研究所のスーパーコンピュータを用いて DFT 計算を行った。

【参考文献】

[1] A. Ghosh et al., *Acc. Chem. Res.* **2018**, *51*, 3094–3103.

[2] C. P. Joshi et al., *J Am. Chem. Soc.* **2015**, *137,* 11578–11581.

P77

水素−金属原子間距離と^{1}H NMRスペクトルの相関

○俣野晃広[1]，青山拓也[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]東北大院理

The relationship between hydrogen–metal distance and ^{1}H NMR spectrum

○Akihiro Matano[1], Takuya Aoyama[2], Yasuto Noda[1], and K. Takegoshi[1]
[1]*Division of Chemistry, Graduate School of Science, Kyoto University*
[2]*Department of Physics, Graduate School of Science, Tohoku University*

In these days, oxyhydrides, where H^- partially substitutes to O^{2-} of oxides, has attracted attention as new materials. ^{1}H NMR has potential to be an effective method for characterization of oxyhydrides as reported that the interatomic distance reduced by atomic substitution in mayenite shifted the ^{1}H chemical shift toward higher and lower frequencies for the proton and the hydride, respectively. However, it is uncertain whether the relationship observed in mayenite holds with other oxyhidrides. In this study, measuring the ^{1}H NMR of the sample where the interatomic distance is reduced directly and continuously by high pressure, we examine the relationship between ^{1}H NMR chemical shift and hydrogen–metal distance.

<はじめに>

酸化物中の水素は水酸基として通常存在するが、近年、酸化物中の酸素の一部をヒドリドで置換した酸水素化物が報告され注目を集めている。酸水素化物の分析にはNMRが有効な分析手段になりうるものと考えられるが、水酸基と酸水素化物の^{1}H NMR化学シフトはどちらもTMSより高周波数側に現れ、そのままでは判別が困難である。マイエナイト系では元素置換により水素—金属原子間距離を減少させるとH^-では高周波側に、H^+では低周波側にピークがシフトすることが報告されている[1]が、他の酸水素化物でも成り立つか不明である。

本研究ではサンプルに超高圧をかけ、原子間距離を直接的かつ連続的に変化させつつ^{1}H NMRを測定し、ピークのシフトと水素—金属間の距離との相関を検証する。

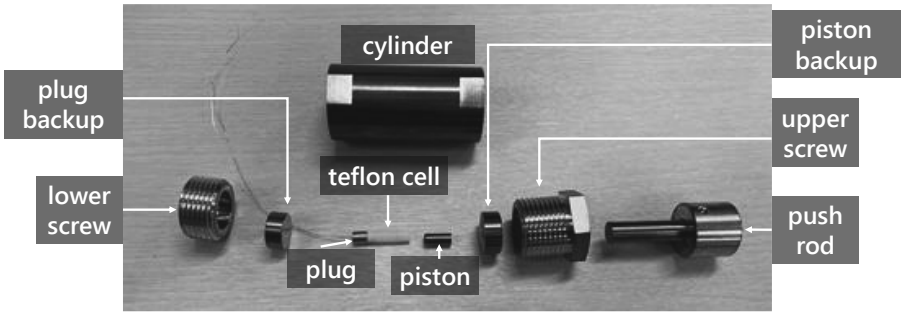


Fig.1. A photo of the piston cell for high-pressure NMR.

超高圧NMR、酸水素化物、^{1}H NMR

○またのあきひろ，あおやまたくや，のだやすと，たけごしきよのり

<装置作製>

超高圧の加圧にはFig.1のピストンシリンダー型セル(C&T Factoryより購入)を用いた。ワイドボアマグネット用の室温シムコイル内に入るようにシリンダーの長さを既製品の58.0 mmから50.0 mmに変更した。シリンダーは二層構造になっており、外層はCuBe合金、内層はNiCrAl合金でできている。サンプルと圧力媒体をテフロンセル内に入れ、ピストンでテフロンセルを押し、上部ボルトを締めることによって圧力を保持する。最大3 GPaまで静水圧を印加できる。プラグバックアップと下部ボルトの中心には小さな穴が開いており、導線と側圧用光ファイバーをテフロンセルに通すことができる。テフロンセルの内径は3 mmで、その内部にNMR測定用のコイルを巻くので、サンプルスペースはϕ2 mm×10 mm程度である。

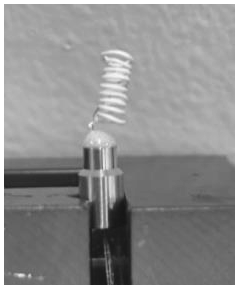


Fig.2. Plug and coil

本研究ではルビー蛍光法[2]により加圧状態の確認を行うために先端にルビー片を接着した光ファイバーをコイルの足となる導線と共にセル内に通し、アルミナを混ぜたアラルダイトを用いてプラグに固定するとともに穴を封止した(Fig.2)。また、圧力媒体には重水素化イソプロパノールを用いた。

ピストンセルはFig.3のように可変コンデンサ上部に固定し、セルから出ている2本の導線をコンデンサーにはんだ付けで接続して、300 MHzに同調できる回路を形成している。

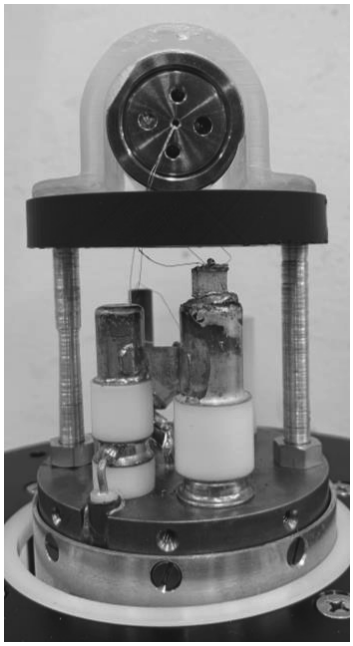


Fig.3. NMR probe

<化学シフト計算>

原子間距離と^{1}H NMR信号のシフト方向の相関関係について予備的検討をDFT計算により行った。ヒドリドを含んだ物質としてLiHを、プロトンを含んだ物質として$Mg(OH)_2$を選び、格子定数を変化させてGIPAW法による化学シフト計算を行い、格子定数変化に対するピークシフトを計算したところ、LiHでは格子定数を4.10 Åから4.07 Åに減少させるとケミカルシフトは傾き2.4 ppm/Åで増加し、$Mg(OH)_2$では格子定数を3.15 Åから3.10 Åに減少させると傾き4.2 ppm/Åで減少し、[1]で示されている元素置換により原子間距離を変化させた時の傾向と同様の結果となった。

当日の発表ではプロトンおよびヒドリドを含んだサンプルそれぞれの^{1}H NMRデータを示し、原子間距離と^{1}H NMRピークの位置の相関について議論を深める。

<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]K. Hayashi *et al., Nature Communication* **5**, 3515 (2014).
[2]藤城ら、高圧の科学と技術 **3**, 1 (1994).

P78

結晶多形をとるジシラン化合物の固体NMRスペクトル

○服部峰之[1], 治村圭子[1], 林繁信[1], 西尾正樹[2], 尾本賢一郎[2], 島田真樹[2], 前田啓明[2], 宮地麻里子[2], 山野井慶徳[2], 西原寛[2]
1 産業技術総合研究所 物質計測標準研究部門
2 東京大学大学院理学系研究科化学専攻

Solid state NMR of polymorphic crystals for organodisilane molecules

○Mineyuki Hattori[1], Keiko Jimura[1], Shigenobu Hayashi[1], Masaki Nishio[2], Kenichirou Omoto[2], Masaki Shimada[2], Hiroaki Maeda[2], Mariko Miyachi[2], Yoshinori Yamanoi[2] and Hiroshi Nishihara[2]
1 National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, MCM, NMIJ
2 Department of Chemistry, School of Science, The University of Tokyo

Correlation between the SHG (second harmonic generation) activity and molecular packing in single crystals of 1,1,2,2-tetramethyl-1-(4-dimethylaminophenyl)-2-(2cyanophenyl)disilane are reported. This compound showed two polymorphs and both crystals were characterized by single-crystal X-ray diffractions. The single crystal analysis indicated that the SHG activity was attributed to the crystal packing and the orientation of dipole moment. Single-crystal from MeOH exhibited non-centrosymmetric packing (P_a (C_c)) in a parallel fashion, which is a favorable situation for SHG. On the contrary, single crystal crystallized from pentane showed centrosymmetric structure ($P2_1/c$) in an antiparallel form which is loss of SHG activity. When SHG active crystal was melted and cooled, SHG inactive crystal was obtained. Recrystallization of SHG inactive crystals from MeOH reversibly return to SHG active crystals. Powder XRD and solid-state ^{13}C NMR were applied for quantitative analysis of the centrosymmetric or non-centrosymmetric polymorphs.

【背景】ケイ素を含む有機化合物は有機EL材料や電子輸送材料に利用されている。なかでも Si-Si結合を有するジシラン類、オリゴシラン類は C=C結合を有するアルケンや芳香族化合物と同程度のイオン化ポテンシャルを有する。化学的性質が類似しているため Si-Si結合を芳香環と連結させると共役系が拡張することが知られている。しかしながら、Si-Si結合を有する化合物を効率良く合成する手法は、分子変換中にSi-Si結合がしばしば切断するために研究例がそれ程多くはない。この研究過程で、ジシランユニット（Si-Si 結合）を有する分子を合成し、この化合物が固体状態で発光を示すとともに溶液中で様々なコンフォメーションを取ることがわかってきた[1,2]。図1.に示す、構造式を持つ化合物においては、結晶多形が存在し、SHGが出るもの、出ないもの、その混ざりなど結晶化条件によって結晶パッキングが変わってくることがわかっている。メタノールから再結晶した、(a)P_aが対称心なし構造（SHG活性）。

ジシラン化合物、結晶多型、^{13}C CP/MAS

○はっとりみねゆき、じむらけいこ、はやししげのぶ、にしおまさき、おもとけんいちろう、しまだまさき、まえだひろあき、みやちまりこ、やまのいよしのり、にしはらひろし

この結晶は、51℃で融解するが、冷却して凝固した結晶は、(b) $P2_1/c$の対称心あり構造(SHG非活性)をとることがわかった。そこで、固体高分解能NMRスペクトルに分子構造が同一の結晶多形の(a), (b)において顕著な相違が見られるか検討する。

【実験（Experimental）】

図1.に示したジシラン化合物結晶の溶融後に生成した、 (b) $P2_1/c$の^{13}C固体高分解能NMRスペクトルを測定した。NMR測定は、Bruker Avance III HD 600WBを用いて行った。測定周波数は150.97 MHzである。外径4mmのジルコニアローターを用い、マジック角回転（MAS）速度を8,10 kHzとした。サンプル量が少なく、純正のサンプルスペーサーを使用した。パルス系列は、クロスポーラリゼーション（CP）法を用いた。

【結果と考察（Results and Discussion）】

図2.に結果を示す。(b)の結晶系では、Si-CH_3に帰属されるピークの強度比が異なり、$(CH_3)_2N$-の線幅が広がるのが観測された。

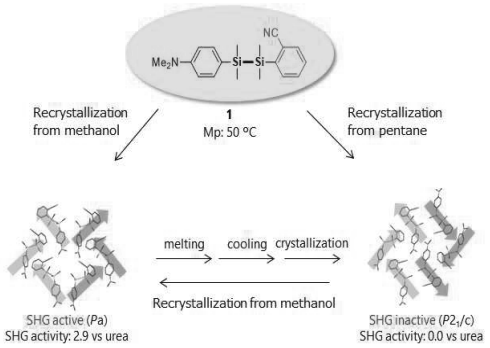


図 1. 結晶多形をとるジシラン化合物

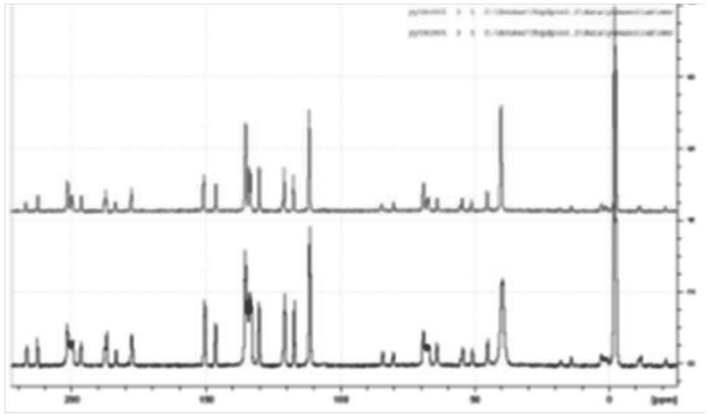


図 2. ^{13}C CP/MAS NMR スペクトル

SHG活性と分子のパッキングの相関について、1,1,2,2-tetramethyl-1-(4-dimethylaminophenyl)-2-(2-cyanophenyl)disilaneの化合物について考察した。この化合物は、2つの結晶多形をとることがわかった。SHG活性は、分子のパッキングと双極子モーメントの配向のかね合いで決まることが示唆された。メタノールから得られた単結晶は、非中心対称P_a (C_c)をとり、SHG活性なパラレル配向を示す。ペンタンからの単結晶は、中心対称性の$P2_1/c$をとり、SHG活性を失う。SHG活性な結晶を溶融し冷却すると、SHG不活性な結晶が得られ、メタノールから再結晶するとSHG活性となる。ここでは、粉末X線解析と固体NMRを適用して、定量的な構造解析を行った。

[参考文献]

1. Shimada, M.; Yamanoi, Y.; Nishihara, H. J. Synth. Org. Chem. Jpn. 2016, **74**, 1098-1107.
2. Shimada, M.; Yamanoi, Y.; Matsushita, T.; Kondo, T.; Nishibori, E.; Hatakeyama, A.; Sugimoto, K.; Nishihara, H. J. Am. Chem. Soc. 2015, **137**, 1024-1027.

P79

in situ NMR法によるリチウムイオン電池炭素負極の過充電挙動の解析

○山上　登夢[1]，米谷　雛[1]，後藤　和馬[1]，端　健二郎[2]，清水　禎[2]，
大山　貴志[3]，石田　祐之[1]
[1]岡山大学大学院　自然科学研究科
[2]国立研究開発法人物質・材料研究機構
[3]オーティス株式会社

Analysis of overcharge behaviors of carbon negative electrode in lithium ion battery using *in situ* NMR

○Tomu Yamakami [1], Hina Kometani[1], Kazuma Gotoh[1], Kenjiro Hashi[2], Tadashi Shimizu[2], Takashi Oyama[3], Hiroyuki Ishida[1]
[1]Graduate School of Natural Science and Technology, Okayama University
[2]National Institute for Materials Science
[3]OTIS CO., Ltd

A problem with lithium ion batteries is that dendritic lithium deposits on a negative electrode. The dendrite lithium breaks a separator and causes short circuit. Thus, observing the lithium deposition is quite important for the safety of the battery. *In situ* NMR is suitable for analyzing internal changes during overcharge of lithium ion batteries. In this research, overcharge behaviors in graphite and hard carbon (HC) electrodes were observed at various charging rates by *in situ* ^{7}Li NMR using lithium ion half-cells composed of negative electrode and lithium metal counter electrode. When the charging rate was 1 C or less, dendritic lithium deposited on the surface of the electrode after insertion of lithium into carbon, whereas dendrite deposition began during insertion into carbon in the case of high-rate charging.

【緒言】リチウムイオン電池(LIB)は様々な小型・大型機器の動力源として広く用いられており，さらなるエネルギー密度や安全性の向上のために研究が進められている．LIBの問題の一つとして，過充電時に負極活物質である炭素負極上にデンドライト状リチウムが析出してセパレータを突き破り，短絡の原因になることが挙げられる．サンプルを非破壊かつリアルタイムで観察できる*in situ* NMRは，充電中の電池内における測定核まわりの局所構造の変化を直接観察できるため，過充電時の内部変化の解析に適している．当グループでは以前よりアルミラミネート外装で封じた電池サンプルを用いた研究を報告してきているが，アルミラミネートによる遮蔽効果のため，強度の弱いNMR信号の検出は困難であった．本研究では，測定サンプルの外装にPEEK材製のプラスチックセルを使用してリチウムイオン半電池を作製し，より高感度で*in situ* ^{7}Li NMR測定を行うことでハードカーボン(HC)電極と黒鉛電極の過充電挙動を様々な充電速度で観察した．

【実験】Ar雰囲気下においてPEEK材製のプラスチックセルケースに負極(HC電極あるいは黒鉛)，セパレータ(ガラスマイクロファイバーフィルター Whatman GF/D)，対極(金属ナトリウム箔)を重なるように入れ，Oリングがついた PEEK材製の蓋と筒のケースで密閉し，電池サンプルを作製し

リチウムイオン電池，リチウムデンドライト，過充電

○やまかみ　とむ，こめたに　ひな，ごとう　かずま，はし　けんじろう，しみず　ただし，おおやま　たかし，いしだ　ひろゆき

た．電解液には1 M $LiPF_6$ EC:DEC (1:1 v/v%)を用いた．^{7}Li NMRスペクトルの測定にはAgilent DD2 spectrometer(11.7 T)および電流印加回路付プローブを用い，様々な充電速度で電圧の下限を設定せずに定電流充電を行った．

【結果・考察】Fig. 1に0.2 Cで充電したHCセルの充電曲線を示す．負極と対極で構成された半電池を用いているため，電圧の低下が実電池における充電に対応している．リチウムイオンがHC内に挿入されるに伴い，電圧が低下して0 Vを下回り過充電状態になった．さらに充電を続けていくと充電曲線に極小が出現し，その後徐々に電圧が上昇した．Fig. 2に0.2 Cで充電したHCセルの^{7}Li NMRスペクトルを示す．0 ppm付近の大きなピークは電解液由来のリチウムイオン，245 ppmにあるピークは金属リチウムに帰属できる．時間経過に伴いシフトしているピーク(a)は，HC層間内のリチウムイオンと空孔内の擬金属的なクラスター状リチウムが高速で交換されている状態を示しており，クラスターの比率が増加するに伴い高周波数側にシフトしている．また，過充電状態ではデンドライト状リチウムであるピーク(b)の成長を確認できた．ピーク(a)のシフト完了時間とピーク(b)の出現時間を算出したところ，それぞれ充電開始から8時間34分と8時間45分であったため，0.2 CではHC内にリチウムが充填しきってからデンドライト状リチウムが析出するということがわかった．Fig. 3と4に2.5 Cで充電したHCセルの充電曲線および^{7}Li NMRスペクトルをそれぞれ示す．Fig. 4でもFig. 2と同様にHC内のリチウムイオンを示すピーク(c)とデンドライト状リチウムを示すピーク(d)が確認できた．ピーク(c)のシフト完了時間とピーク(d)の出現時間を算出したところ，それぞれ充電開始から1時間6分と57分であった．したがって，2.5 CではHC内にリチウムイオンが充填しきる前にデンドライト状リチウムが析出していることがわかる．

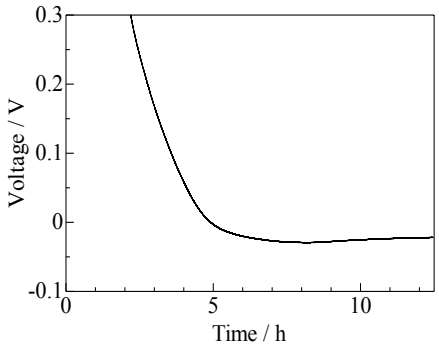


Fig. 1. Charge curve of HC cell (at 0.2 C).

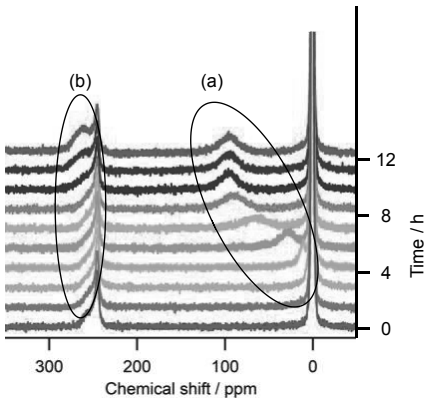


Fig. 2. ^{7}Li NMR spectrum of HC cell (at 0.2 C).

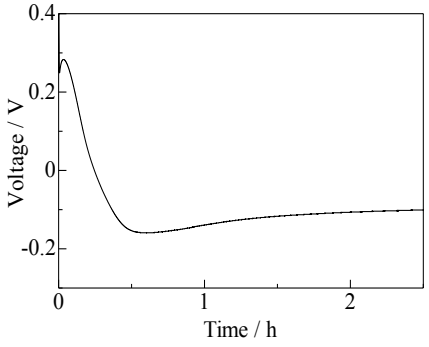


Fig. 3. Charge curve of HC cell (at 2.5 C).

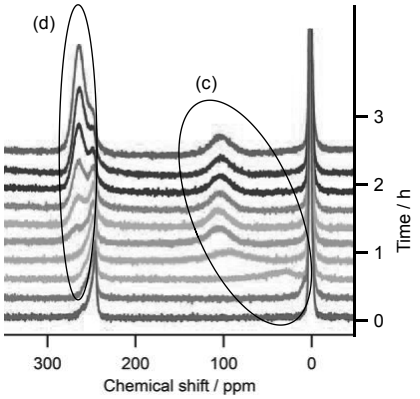


Fig. 4. ^{7}Li NMR spectrum of HC cell (at 2.5 C).

P80

固体NMR測定と量子科学計算によるポーラスカーボンの構造モデリング

○柏原功典[1]，石井佳誉[1,2]，Ruoff Rodney[3]
[1]東京工業大学　生命理工学院
[2]理化学研究所　放射光科学研究センター　NMR研究開発部門
[3]Ulsan National Institute of Science and Technology (UNIST)，蔚山、韓国

Structure modeling of porous carbon by solid state NMR measurement and quantum chemical calculation

○Kousuke Kashihara[1], Yoshitaka Ishii[1,2], and Ruoff Rodney[3]
[1]School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology
[2]NMR Science and Development Division, RIKEN SPring-8 Center
[3]Ulsan National Institute of Science and Technology (UNIST), Ulsan, Korea

Porous carbon is widely used for adsorbents and battery materials. It has been considered that the structure of porous carbon is based on the graphene or graphite structure. However, its detailed chemical structure at the molecular level has not been understood. We performed quantum chemical calculations for several models including single-layer graphene-based defect structure. Structural stability and chemical shifts were calculated for several models. The obtained ^{13}C chemical shifts were compared with those of a ^{13}C solid state NMR (SSNMR) spectrum of a-MEGO (activated microwave expanded graphite oxide), a mesoporous carbon material which showed excellent performance as a prospective electrode material for supercapacitor.[1] We also performed quantum chemical calculations for graphite that has defect structure in order to evaluate the correlation between interlayer distance and chemical shifts.

Porous carbon materials are gaining importance as a vital component of batteries and ultra-capacitors. The structure of porous carbon is long considered to be based on the graphene- or graphite-like structure. However, its detailed chemical structure at the molecular level is largely unknown. In this work, we aim to analyze structures of mesoporous carbon based on SSNMR measurement and electron microscope analysis and performed ab-initio ^{13}C chemical calculations using Gaussian 16 for several models including single-layer graphene-based structures with defects. We compared ^{13}C chemical shifts obtained by the ab-initio chemical calculations with those obtained by SSNMR for a-MEGO (activated microwave expanded graphite oxide),[1] a mesoporous carbon material which demonstrated high surface areas and other excellent characteristics as an electrode material for supercapacitors.

The a-MEGO sample was synthesized by exfoliation of graphite oxide with microwave irradiation and subsequent activation with KOH, in which oxygen atoms were removed from the graphene oxide and pores were produced.[1, 2] ^{13}C solid state NMR measurement results of a-MEGO showed a peak at ~120 ppm, which was attributed to the graphite- or graphene-like sp^2 carbon with a broad shoulder peak at 150–160 ppm, which could not be assigned to conventional graphene-like sp^2

ポーラスカーボン、化学シフト計算、欠陥構造

○かしはら　こうすけ、いしい　よしたか、るおふ　ろどにー

carbons. As high resolution TEM (Transmission Electron Microscope) results indicated that sp^2 surface with defects, we hypothesized that the shoulder peak may be attributed to curved sp^2 surface with defects. We performed ab-initio chemical calculations on graphene sheets containing different types of defect structure and compared the calculated ^{13}C shifts with those from the ^{13}C solid state NMR results of a-MEGO under the hypothesis.

References:

1. Zhu, Y.W., et al., *Carbon-Based Supercapacitors Produced by Activation of Graphene.* Science, 2011. **332**(6037): p. 1537-1541.

2. Zhu, Y.W., et al., *Microwave assisted exfoliation and reduction of graphite oxide for ultracapacitors.* Carbon, 2010. **48**(7): p. 2118-2122.

P81

^{1}Hおよび^{2}H NMRによるMg共挿入エチレンジアミンの黒鉛層間での運動状態解析

○橋本一樹[1]，後藤和馬[1]，水野元博[2]，堂ノ下将希[3]，北川宏[3]，石田祐之[1]
1岡山大学　大学院・自然科学研究科
2金沢大学　大学院・自然科学研究科
3京都大学　大学院・理学研究科

Dynamics of ethylenediamine intercalated in graphite layers with magnesium studied by ^{1}H NMR and ^{2}H NMR

○Itsuki Hashimoto [1], Kazuma Gotoh[1], Motohiro Mizuno[2], Masaki Donoshita[3], Hiroshi Kitagawa[3], Hiroyuki Ishida[1]
1Graduate School of Natural Science and Technology, Okayama University
2Graduate School of Natural science and Technology, Kanazawa University
3Graduste School of Science, Kyoto University

Ternary graphite intercalation compounds (GICs) formed by co-intercalating metal and organic molecule are expected to be applied as negative electrode materials for secondary battries. Recently, a ternary GIC which contains magnesium and ethylenediamine (en) was reported. [1] In the GIC, magnesium ions are intercalated between graphite layers coordinating with en molecules. Because the GIC can easily intercalate or de-intercalate Mg ions during charge/discharge processes, the superior cycle performance is expected. In this study, our group investigated the dynamics of en molecules coordinating to Mg ion in the graphite layer using ^{1}H and ^{2}H solid state NMR. The two kinds of en molecules under different molecular motion between graphite layers were observed by ^{1}H and ^{2}H NMR at room temperature.

緒言

アルカリ金属イオンが黒鉛層間に挿入された二元系黒鉛層間化合物(GIC)はリチウムイオン電池の負極材料として広く利用されているが、金属が有機分子と共に黒鉛層間に共挿入されて形成される三元系黒鉛層間化合物についても金属イオン二次電池の負極材料として期待されている。このようなGICでは金属イオンが有機分子と配位した状態で黒鉛層間に挿入されるため、充放電サイクルにおいて金属イオンの挿入及び脱離における障害が少ないと考えられ、高い繰り返し充放電特性が期待される。近年、マグネシウム(Mg)とエチレンジアミン(en)が共挿入された三元系GICが報告され[1]、多価イオン電池の材料として期待されている。しかしこのようなGICの層内分子の状態にはまだ不明なことが多く、特に動的挙動などは今までに全く明らかにされていない。本研究ではMg-en-GICについて^{1}Hおよび^{2}H固体広幅NMRにより観測し、黒鉛層間でMgに配位して存在していると考えられるエチレンジアミンの運動状態を調べ、GICにおける層間構造の解析を試みた。

黒鉛層間化合物、二次モーメント解析、分子運動

○はしもといつき、ごとうかずま、みずのもとひろ、どうのしたまさき、きたがわひろし、いしだひろゆき

実験

Mg-en-GICは報告されている方法と同様の方法で作製した[1]。アルゴン雰囲気のグローブボックス内で試験管に黒鉛、粉末状金属Mg、ヨウ素を入れゴム栓で密閉した。続いてドラフト内で密閉した試験管にシリンジを用いてエチレンジアミン(2 ml)またはエチレンジアミンと重水素化エチレンジアミン(d_8)の2：1混合液(1 ml : 0.5ml　計1.5 ml)を加えたのち、100 ℃の油浴下で5日間撹拌した。その後遠心分離にて上澄み液を除去し、80 ℃で真空乾燥させ目的のMg-en-GICとMg-en(d_8)-GICを得た。作製した試料について粉末X線回折測定(PXRD）を行いGICの層間距離を調べ先行研究で作製されたGICと比較した。Mg-en-GIC試料は^{1}H NMR測定(AVANCE Ⅱ$^+$400NMR)にて、Mg-en(d_8)-GICは^{2}H NMR測定(JEOL ECA-300NMR)にてエチレンジアミンを観測した。^{1}H NMRは温度範囲133 ~ 353 Kで、^{2}H NMRは298 Kで測定した。

結果・考察

PXRD測定の結果からMg-en-GICはstage 1構造であり、黒鉛層間の層間距離は0.880(2) nm、層内距離は0.544(2) nmであった。先行研究で示されていた層間距離[1]と同等であり、作製した試料が目的のGICであることを確認した。Mg-en(d_8)-GICの^{2}H NMRスペクトルをFig.1に示す。このスペクトルには0 kHz付近に先鋭化したピークと50 ~ -50 kHz付近に2つに分裂したピークが存在しており、黒鉛層間で運動状態の異なる2種類のenが存在していることを示している。また分裂したピークの分裂幅から四極子結合定数(qcc)を求めたところ152 kHzであった。固定されたメチレン基(-CD_2-)のqcc = 167 kHz [2]より、層間内において一部のenはMgに配位し固定されていることがわかった。次にMg-en-GICの^{1}H NMRスペクトルをFig.2に示す。このスペクトルは先鋭的なピーク成分とブロードしたピーク成分が重なった形をしており、^{2}H NMRの結果と同様に、室温において運動状態の異なる2種類のenが存在していることを示している。それぞれのピーク成分の半値幅から二次モーメントを計算したところ、どちらの成分も温度が低くなるほど二次モーメントの値が増加し、低温ほどen分子の運動が制限されることがわかった。以上の結果からMg-en-GICは黒鉛層間にMgとenの配位体もしくはMgと未配位のenが存在する構造を有していると考えられる。

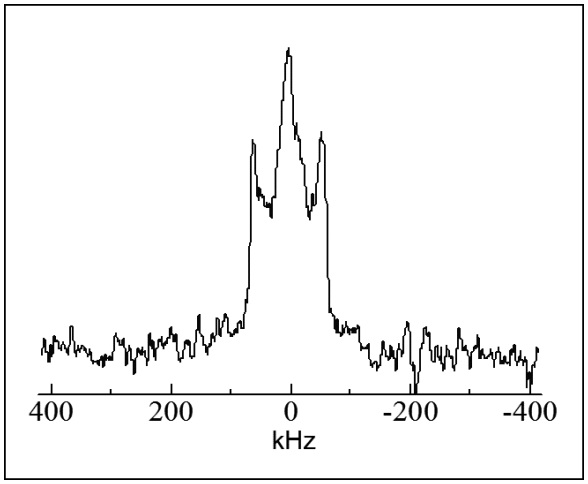


Fig. 1 Mg-en(d_8)-GIC ^{2}H NMR spectrum (298 K).

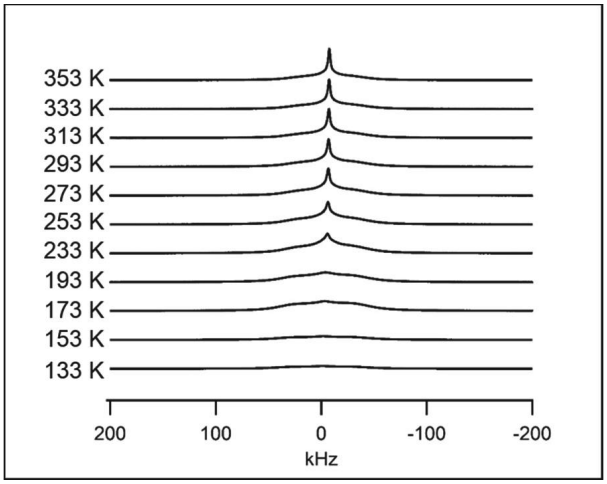


Fig. 2 Mg-en-GIC ^{1}H NMR spectra (133-353 K).

References

[1]Wei, X. Hanyang, Z. and Michael M. Lerner, *Inorg. Chem.*, 2018, **57**, 8042-8045.

[2] R. G. Barnes, and J. W. Bloom, *Mol. Phys.*, 1973, **25**, 493-494.

P82

化学交換飽和移動(CEST)−MRI プローブとしての新規ホスホリルセリンポリマーの合成と機能評価

○村上 知広[1]，山田 久嗣[2]，今井 宏彦[3]，青山 安宏[4]，木村 祐[1]，近藤 輝幸[1]
[1]京大院工
[2]徳島大院社会産業理工
[3]京大院情報
[4]京大

Synthesis and Functional Evaluation of a Novel Phosphorylserine Polymer Probe for CEST−MRI

○Tomohiro Murakami,[1] Hisatsugu Yamada,[2] Hirohiko Imai,[3] Yasuhiro Aoyama,[4] Yu Kimura,[1] Teruyuki Kondo[1]
[1]Graduate School of Engineering, Kyoto University
[2]Graduate School of Technology, Industrial & Social Science, Tokushima University
[3]Graduate School of Informatics, Kyoto University
[4]Kyoto University

We have already developed a biocompatible and zwitterionic phosphorylcholine polymer (PMPC) probe which accumulated efficiently and selectively in tumor in mice observed by the probe−targeted MRI technique. Here, we report our success in developing a novel phosphorylserine polymer (PMPS) probe that mimicked the membrane of apoptosis cell as well as the results of Chemical Exchange Saturation Transfer (CEST)−MRI using the present PMPS probe.

生体内での分子プローブの動態を磁気共鳴イメージング（MRI）により直接観測する手法は、生体深部での分子プローブの機能を低侵襲かつ高選択的に可視化する極めて有効な生体イメージング技術である。我々は既に、細胞膜の構成成分であるホスホリルコリンを側鎖に有する双極性ポリマー PMPC プローブが腫瘍に高効率かつ高選択的に集積することを分子標的 MRI 法により明らかにし報告している[1)]。

一方、化学交換飽和移動（CEST: Chemical Exchange Saturation Transfer）の原理に基づく MRI 法（CEST−MRI）では、励起パルスを標的分子の交換性 ^{1}H に照射し磁化を飽和させた後、その飽和磁化を化学交換を介して溶媒である水分子に移動させることにより、標的分子の検出シグナル強度の著しい増大が可能である。しかしながら、高効率な CEST 効果の発現と分子プローブの化学構造との構造－活性相関については未解明な点が残されており、生体内での分子プローブの動態を選択的かつ高感度で検出可能な CEST−MRI プローブの報告例は極めて少ない。

本研究では、CEST−MRI 法に適用可能な新しいポリマープローブの開発を目的とし、アポトーシス細胞膜表面に露出しているホスホリルセリンを側鎖に有するポリ(2−メタクリロイルオキシエチルホスホリルセリン)(PMPS)プローブを設計し、合成に成功した。

化学交換飽和移動、磁気共鳴イメージング、ホスホリルセリンポリマー

○むらかみ ともひろ，やまだ ひさつぐ，いまい ひろひこ，あおやま やすひろ，きむら ゆう，こんどう てるゆき

具体的には、*N*-Boc-*O*-*tert*-butyl-MPS モノマーの原子移動ラジカル重合（ATRP)を行い、トリフルオロ酢酸を用いる Boc 基および *tert*-butyl 基の脱保護を経て、側鎖に交換性 ^{1}H（アンモニウム基)を有する分子量 33,000(アンモニウム基ユニット数 = 110)の PMPS プローブを合成した。

小動物実験用 7T MRI 装置（Bruker Biospec 70/20 USR）を用い、PMPS プローブの CEST 効果について評価した。水の周波数を 0 ppm とし、飽和パルス（5 μT, 5 sec）の周波数を −10 ppm から 10 ppm まで掃引し、PMPS プローブ（0.20 mM, pH 5.0）を含む水溶液の CEST スペクトルを測定した。その結果、1–5 ppm 付近で MR 信号強度が顕著に減衰した（Figure 1a）。この結果は、PMPS 側鎖の交換性 ^{1}H の飽和磁化が、溶媒水分子に移動したことを示している。さらに、CEST スペクトルの非対称性（MTR_{asym}）を評価した結果、2.0 ppm 付近にピークトップをもつ強い CEST シグナルが観測され（Figure 1b）、その画像化が可能であった。一方、同一条件下におけるポリ（*O*–メタクリロイル–L–セリン）（PMS）（アンモニウム基ユニット数 = 110）の CEST 効果は、全く観測されなかった（Figures 1a and 1 b）。すなわち、PMPS プローブの CEST 効果の発現には、交換性 ^{1}H の近傍に位置するホスホリル基が極めて重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

ホスホリルセリン基は、炎症部位に高集積するマクロファージ細胞と特異的に結合し、貪食を促すことが報告されており[2)]、本研究で開発した PMPS プローブを用いる CEST−MRI 法は、炎症性疾患の新規画像診断法としての発展が期待される。

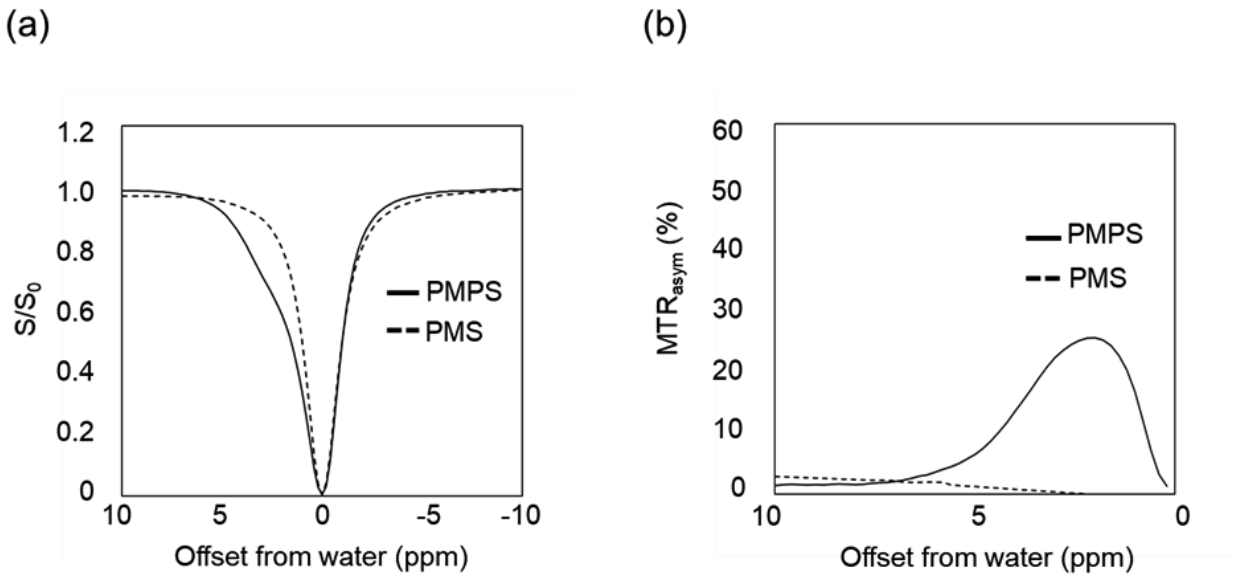


Figure 1. CEST properties of PMPS (solid line) and PMS (dotted line) by 7 T MRI (pH 5.0 at 25 ºC). (a) CEST spectra of 0.20 mM PMPS and PMS. (b) MTR_{asym} plots of PMPS and PMS.

参考文献

1) Yamada, H.; Hasegawa, Y.; Kimura, Y.; Aoyama, Y.; Kondo, T. *et al. J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137,* 799−806.

2) Fadok, V. A.; Voelker, D. R.; Campbell, P. A.; Cohen, J. J.; Bratton, D. L.; Henson, P. M. *J. Immunol.* **1992**, *148*, 2207−2216.

P83

深層学習を利用した超偏極 ^{13}C MRI 代謝イメージングの高速撮像法の開発

菅井　秀斗[1],ニール・J・スチュアート[1], 松元　慎吾[1]
北海道大学大学院　情報科学研究科　生命人間情報科学専攻
磁気共鳴工学研究室

Acceleration of image acquisition for hyperpolarized ^{13}C MRI by deep learning

Shuto Sugai[1], Neil J. Stewart[1], Shingo Matsumoto[1]
[1)]Division of Bioengineering and Bioinformatics, Graduate School of Information Science and Technology, Hokkaido University

Hyperpolarized (HP) ^{13}C signal overcomes intrinsic low sensitivity of ^{13}C NMR/MRI and makes it possible to noninvasively image metabolic process. Because HP signal rapidly decays by longitudinal relaxation and RF excitation pulse, acceleration of image acquisition of hyperpolarized (HP) ^{13}C MR is essential. To boost image acquisition of HP ^{13}C MRI, we combined a partial k-space imaging technique and a deep learning reconstruction (DLR). Anatomic ^{1}H MRI and HP ^{13}C MRI images of HP [1-^{13}C] allylpyruvate were prepared as training and test data of DLR, creating a guesser for image reconstruction. The guesser was applied to partial k-space MRI data and reconstructed images. Improvement of image quality was confirmed in HP ^{13}C MRI images with 20% acquisition rate of k-space using the objective evaluation parameters including SSIM.

[研究背景] 解剖像を取得する ^{1}H MRI に対し、^{13}C MRI は ^{13}C 標識した化合物の生体内代謝の計測に用いられる。^{13}C NMR の相対感度は ^{1}H の約 1/64 であるが、2003 年 Ardenkjaer-Larsen 等により溶液の NMR 信号を一時的に数万倍に増強する超偏極技術が開発され、低濃度の代謝物における ^{13}C MRI 撮像が可能となっている。超偏極 ^{13}C NMR 信号は励起直後から縦緩和により減衰し、数分で熱平衡状態に戻る。MRI 測定における励起パルス自体によってもこの超偏極信号の減衰は加速されるため、超偏極 ^{13}C MRI では代謝プローブの投与後、短時間で撮像を終える必要がある。この超偏極信号の持続時間の制限に加え、複数の代謝物を区別して同時に可視化できる化学シフトイメージング(Chemical Shift Imaging, CSI)は、全ての位置情報を位相エンコードで取得するため、一般的な ^{1}H MRI 撮像シーケンスに比べ長い撮像時間を必要とする。

本研究では、撮像時のデータ数を削減する部分 k 空間イメージング法によって撮像を高速化する。深層学習を用いて、スパースサンプリングにより劣化した画像から、本来の画質を推測し再構成(Deep Learning Reconstruction, DLR)することで、撮像時間を短縮しアーチファクトの少ない画像を取得することを目的とした。

---

^{13}C MRI、超偏極、深層学習

○菅井秀斗すがいしゅうと

[手法] 画質が低下した部分 k 画像の再構成を行うため、畳み込みニューラルネットワーク(Convolution Neural Network, CNN)の一種である U-net を構築した。この U-net に学習させるデータとして、マウスの ^{1}H MRI 画像のフル k 画像 1000 枚と、このデータに 0 を挿入して作成した 1000 枚の部分 k 画像を用意した。このようにして作成した推測器を用いて、マウスの ^{1}H MRI 画像やピルビン酸アリルの超偏極 ^{13}C MRI ファントム画像の再構成(Deep Learning Reconstruction ,DLR)を行い、Structural Similarity (SSIM)などの評価関数によって評価を行なった。

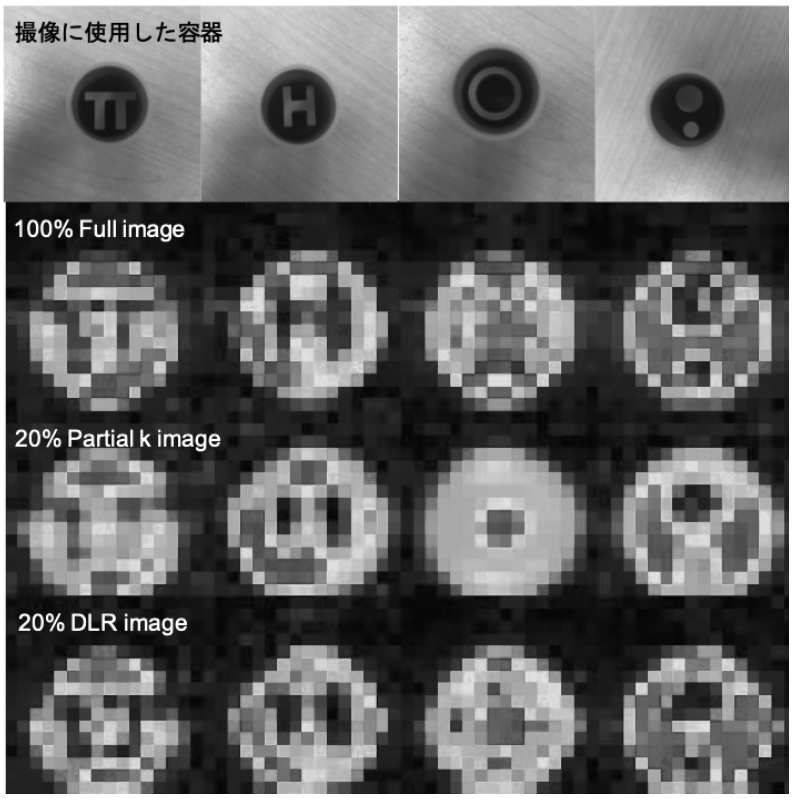


Figure1 ピルビン酸アリルの超偏極 ^{13}C MRI ファントム画像
1 段目目 ピルビン酸アリルを入れて撮像した容器
2 段目 100%のデータ取得による画像
3 段目 100%のデータに 0 を挿入して作成した 20%の部分 k 画像
4 段目 20%のデータを深層学習で再構成した画像

[結果] 20%のデータ取得率の部分 k 画像において、DLR による再構成で Figure1 のような画質の改善された画像を取得した。画像ごとに再構成精度の差はあるが主観的な評価でもフル k 画像に近い再構成が行われており、それぞれの SSIM 値は部分 k 画像では 0.764、0.765、0.708、0.787 で DLR 画像では 0.847、0.891、0.784、0.885 となり、客観的な評価関数においてもフル k 画像に近い画像が再構成できることが示された。

参考文献

[1] Jiaming Chen, Lu Zhang, Yuemin Zhu, and Jianhua Luo, “MRI reconstruction from 2D Partial k-space Using Algorithm”

[2] Olaf Ronneberger, Philipp Fischer, and Thomas Brox ,” U-Net: Convolutional Networks for Biomedical Image Segmentation ”

[3] Ki Hwan Kim , Won-Joon Do, Sung-Hong Park,“Improving resolution of MR images with an adversarial network incorporating images with different contrast“

P84

ラミネートLi全固体電池の低磁場1TeslaによるNMR/MRI計測

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

^{7}Li-NMR/MRI at 1Tesla for a laminated all-solid-state rechargeable lithium battery

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

Synopsis: A experimental method of ^{7}Li-NMR/MRI for aluminum-laminated rechargeable Li batteries with acquiring a charge / discharge curve *in-situ* has developed. we performed NMR/MRI measurements (at 1.0T / 9.4Tesla) of aluminum-laminated all-solid-state lithium batteries in a proper orientation of the B_1 excitation pulse to the sample's lamination plane with a 200 μm sealing gap. Charge / Discharge operations of the Li battery were prepared for NMR/MRI measurements.

緒言： NMR/MRIによる全固体Li(リチウム)電池の計測は，NMR原子核である^{7}Liカチオンを直接的に観測できることから，Li二次電池の研究開発に有用である。本研究グループは本学会にてアルミラミネート型のリチウム二次電池について，4.7および9.4Teslaでのin-situ計測の実例を示してきた。いっぽう電池材料に起因する磁場不均一性を，静磁場強度を下げることで回避し高磁場では見えない^{7}Li -NMR信号を見積もることができるなら有益である。またLi電池の研究開発が行われるドライルームへin-situ計測を導入する観点では，永久磁石式NMR/MRIに低温寒剤(液体He，液体N_2)を使用しない利点がある。試料空間も広い。本研究では静磁場強度1TeslaのMRI磁石を用いて全固体Li電池の充放電状態を変えたNMRスペクトルを取得し9.4Teslaの計測との比較を行った。

NMR/MRI system and Li battery samples:

A 1.0-Tesla 90 mm gap permanent magnet (Fig.1), 9.4-Tesla narrow-bore NMR magnet, analog NMR/MRI (DTRX5, S7A, MRTe, Japan), digital NMR/MRI console (DTRX6/ S7D/ iPlus, MRTe, Japan), home-built 3-axis gradient coils, and rectangle solenoid rf coils were employed. 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. 1T/90mm permanent magnet

MRI，全固体電池，Li
はいしともゆき，○ふじきさとし，あいはらゆういち

NMR/MRI experiments and results:

The aluminum-laminated all-solid-state rechargeable Li batteries (NCA/ Solid- Electrolyte/ Li-foil) were prepared for NMR/MRI experiments. For negative electrodes, Cu, AgC and Au/Cu (only for imaging) were used and SOC of 0, 10, 30, 70, and 100% were prepared before NMR/MRI experiments. Fig.2 shows one of the rechargeable Li batteries and Fig.3 is an MRI of Li-deposition at 9.4T. The ^{7}Li NMR spectra were acquired at 9.4T (Fig.4) and at 1.0T (Fig.5). For the measurement of ^{7}Li-NMR spectra, pulse sequence parameters were below: TR = 50ms, width = 120μs, sampling rate =1μs, deadtime delay = 50μs, 2048 points, T_{acq} = 51sec.

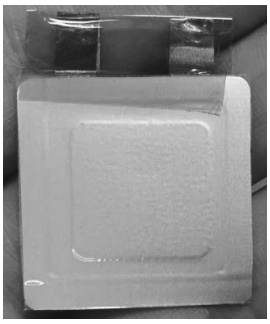


Fig.2. All-solid Li B 28 mm x 28mm

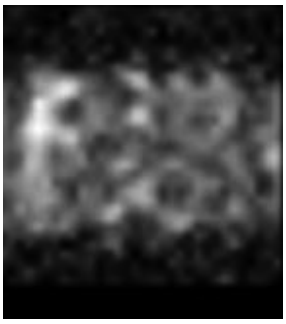


Fig.3. Li-deposition. SOC 100% on Au/Cu

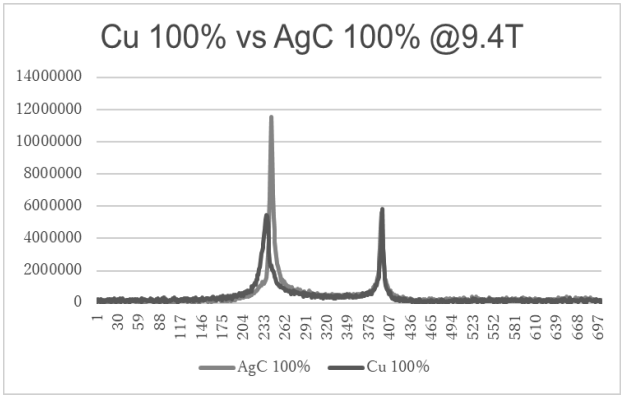


Fig.4. ^{7}Li-NMR spectrum difference in negative electrodes at 9.4T (SOC100%, Cu vs AgC).

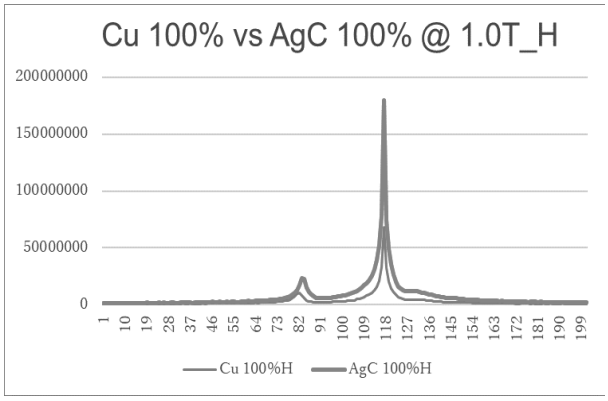


Fig.5. ^{7}Li-NMR spectrum difference in negative electrodes at 1.0T (SOC100%, Cu vs AgC).

Conclusion:

NMR spectra of the Li batteries at 1.0 Tesla were clearly acquired as well as at 9.4 Tesla. The chemical sifts between the solid electrolyte peak and Li foil peak were observed at 1.0T and the sift was changed as the battery sample direction was in perpendicular to the B_0 filed or in parallel.

^{7}Li NMR/MRI spectra of aluminum-laminated all-solid-state Li batteries (Cu / AgC, SOC: 0, 10, 30, 70, 100%) were compared with at 1.0T/90mm of ^{7}Li-17MHz or at 9.4T/54mm of ^{7}Li-156MHz. No big differences in NMR spectra at 1.0T or 9.4T were observed.

参考文献

1) 「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
2) 「Li二次電池のオペランドNMR／MRI観察」:拝師智之，藤木聡，相原雄一，第65回固体NMR・材料フォーラム(日本製鉄REセンター)，2019

P85

9.4Tesla-MRIを用いて生体マウス腎の^{23}Naナトリウム分布を可視化する

○拝師智之 [1]，忰田亮平 [2]，成田一衛 [2]，佐々木進 [3]
1）株式会社エム・アール・テクノロジー(つくば市)，
2）新潟大学大学院医歯学総合研究科
3）新潟大学工学部

Visualization of sodium distribution in living mouse kidney using 9.4 Tesla ^{23}Na-MRI

○Tomoyuki HAISHI [1], Ryohei KASEDA [2], Ichiei NARITA [2], Susumu SASAKI [3]
[1)] MRTechnology, Inc., Tsukuba, Ibaraki, JAPAN, [2)] Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences, [3)] Faculty of Engineering, Niigata University,

Synopsis: The number of chronic kidney disease is reported as an increasing trend in ~15% of the world population (NHANES). Renal biopsy is still required for clinical diagnosis. In this study, we have started a research and development of a ^{23}Na-MRI to visualize sodium dynamics in renal disease mice models.

緒言：臨床用 MRI は最も感度の高い ^{1}H プロトンのみを計測対象としている。生体を計測する場合は low-γ(磁気回転比)かつ低濃度の NMR 原子核の感度は少なくとも 1,000 倍低い。今回，生体内電解質の可視化の臨床応用を目的とし，まずはマウスの腎疾患モデルの sodium（スピン量子数 3/2，γ=11.26MHz/T）動態を可視化する ^{23}Na-MRI 手法の研究開発を開始した。生体内にはいわゆる生理食塩水として Na^{+}イオンが安定的に存在しておりその濃度は血液等の細胞外液で約 0.9%（=140mEq）で，腎臓内では対向流増幅機構という濃縮系が存在することが知られている。慢性腎疾患の患者数は世界人口の約 15%で増加傾向との報告(NHANES)がある一方で，臨床では腎生検が必要とされ ^{1}H-MRI では造影剤禁忌の NSF という適用への障壁がある。新しい腎診断を実現する，非侵襲な腎機能 ^{23}Na-MRI の開拓を本研究の目的としている。

装置および被検体：9.4T/54mm 縦型超電導磁石，三軸勾配磁場コイル(自作，三層，φ39-32mm)，MRI コンソール(DTRX6, S7D, iPlus)，RF 送受信コイルはヘルムホルツ型φ22mm(分割 2, 間隔 10mm)を用いた。生理食塩水を用いた ^{23}Na-NMR 信号基準を適宜用いた。生体試料として C57BL/6(M, 5wo)および BALB/cAJcl-nu/nu(M,5wo)を用いた。3D-GRE 系の撮像シーケンスを使用した。

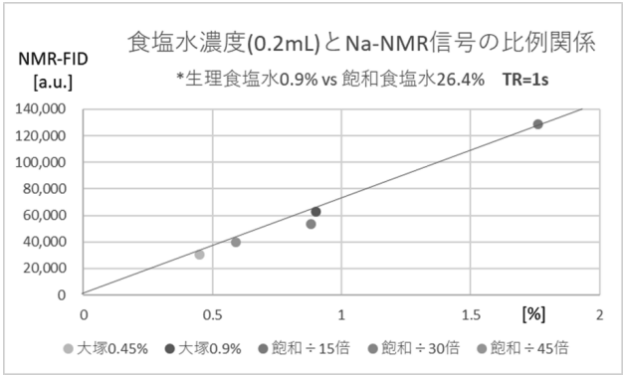


Fig.1 ^{23}Na signal intensity on its saline density.

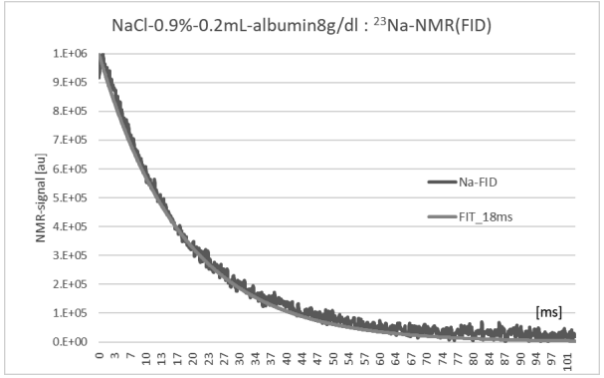


Fig.2 FID signal of albumin (8g/dL) saline

sodium, MRI, kidney
○はいしともゆき，かせだりょうへい，なりたいちえい，ささきすすむ

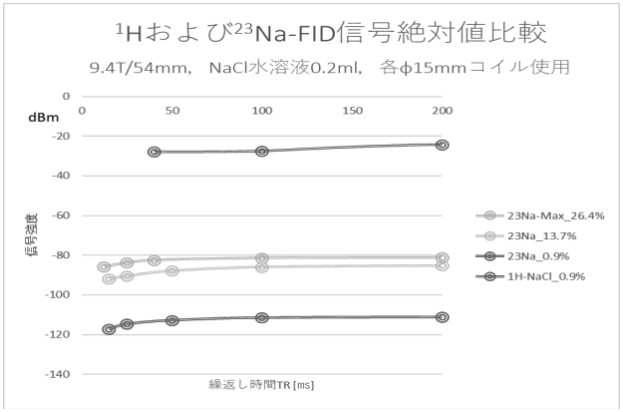


Fig.3 Absolute signal level [dBm] of ^{1}H, ^{23}Na

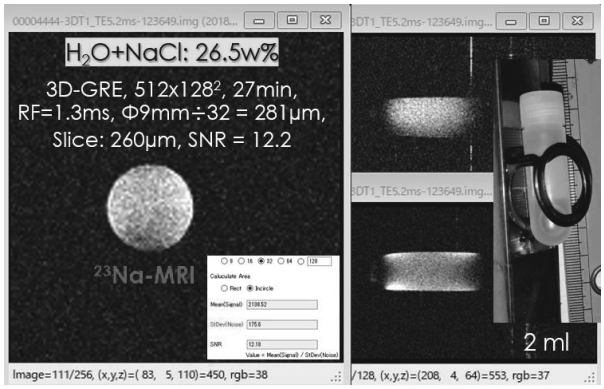


Fig.4 ^{23}Na -MRI at 9.4T: res. 280^2x260(μm)^3

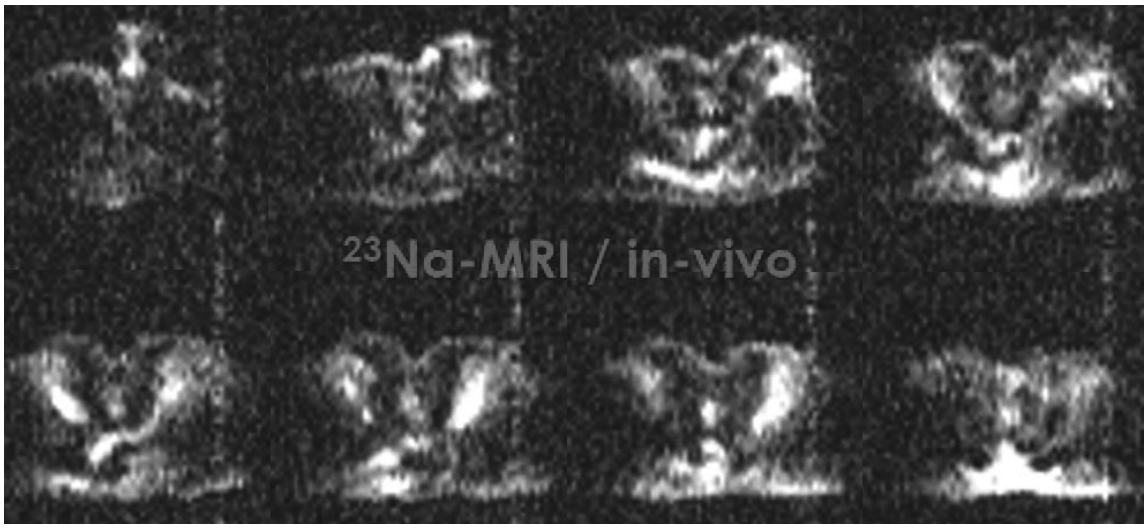


Fig.5 Mouse Kidney: ^{23}Na-MRI at 9.4T, C57BL/6, 3D-GRE, 64x64x16, $(420\mu m)^2$ x 1.1mm

結果と考察：Fig.1 に示すように単一の 90 度励起パルスによる生理食塩水(0.4%～1.75%)の ^{23}Na-NMR 信号強度は Na^+イオン濃度に対して単純比例関係にあった。^{23}Na-MRI では信号強度が Na^+イオンの分布密度を示していると推察できる。Fig.2 に示すように血液を模擬してアルブミンを 8 g/dL で溶解させた生理食塩水の FID 減衰信号は T_2＝18 ms で減衰した。また生理食塩水 0.9%の 9.4T での ^{23}Na の T_2 緩和時間は約 2ms と約 20ms の 2 成分が観測された(図示せず)。生体内の水と脂質 ^{1}H の T_2 緩和時間（数 ms～数百 ms）に比較して長い T_2 成分が存在していないことが分かった。Fig.3 は生理食塩水 0.9%の ^{1}H と ^{23}Na の信号強度比が約 20,000 倍であることを示している。Fig.4 は飽和食塩水の ^{23}Na-MRI である。画像の輪郭等で一見して ^{1}H-MRI と差がないことが分かる。Fig.5 は 3D-GRE 法による麻酔下マウス両腎の in-vivo 撮像で $(420\mu m)^2$ ×1.1mm の画素サイズである。以上の遂行に際して日本医療研究開発機構 AMED 先端計測 (2018 年~)と筑波大学寺田康彦研究室からの厚いサポートに感謝する。

まとめ：^{23}Na-MRI を用いた生体マウス腎の Na 分布可視化は可能であった。

参考文献：[1]「水・電解質の可視化」瀬尾芳輝，腎と透析 vol.80-3，2016， [2] 「9.4 Tesla 標準ボア NMR 磁石による C57BL/6 生体マウス腎 MR マイクロスコープの検討」拝師，佐々木，忰田，大塚，成田：第 45 回日本磁気共鳴医学会大会(宇都宮)2017,

P86

周期的刺激と独立成分解析を用いた マウス嗅覚応答の機能的MRI研究

○武田　光広[1]，林　芙優[1]，杠　直哉[1]，吉永　壮佐[1]，寺沢　宏明[1]
[1]熊本大学大学院生命科学研究部

Functional MRI study of odor responses in mice using periodic stimulations and independent component analysis

○Mitsuhiro Takeda [1], Fuyu Hayashi [1], Naoya Yuzuriha [1], Sosuke Yoshinaga [1], Hiroaki Terasawa[1]
[1]*Faculty of Life Sciences, Kumamoto University*

Olfaction is an important sense in humans and animals. Olfactory perception starts upon the binding of odorants to olfactory receptors on the olfactory epithelium. The signal is transduced from the receptors to the olfactory bulb, and then to higher-order brain regions. To study the signaling pathways in the brain, functional MRI (fMRI) is the method of choice. In addition, mice have a well-developed olfactory system, and thus serve as a useful model for the olfactory responses. To date, almost all of the previous fMRI studies of odor-evoked responses in mice have focused on the activations in the olfactory bulb. However, our understanding of the olfactory responses in the higher-order brain regions is still limited. To expand the range of fMRI analyses, we developed a method using periodic odor stimulations and independent component analysis. In this study, we identified the brain response regions evoked by muscone stimulation.

【背景・目的】嗅覚は五感の一つとしてヒト・動物の生活において重要な役割を担う［1]。自然界に数十万種あるといわれる匂い物質をヒト・動物は識別し、固有の行動・情動・生理変化を生じる。匂いの識別は脳を介して生じる現象である。匂い物質が嗅上皮の嗅覚受容体に結合した後、その入力信号が嗅神経を介して一次中枢である嗅球内の糸球体へと伝えられる。続いて、嗅球から高次の脳領域へとシグナルが伝達され、匂い固有の行動へと結びついていく。嗅覚伝導路を研究する上で、発達した嗅覚システムを持つマウスは有用な研究モデルとなる。これまでにBOLD 法を利用した機能的 MRI 法により、匂い刺激によるマウス嗅球の応答を解析した報告例は複数ある[2, 3]。同様に、高次の脳領域の嗅覚伝導路も原理的には BOLD 原理を用いて検出できるはずだが、マウスの場合脳容積が小さくノイズの影響を受けやすい。我々はマウスの全脳にわたる機能的 MRI 解析を実現するため、周期的な匂い刺激と独立成分解析（ICA: Independent component analysis）を組み合わせた、BOLD 信号の高感度検出法の開発を進めている[4]。ICA は周期的に活性化する脳領域を同定する方法である[5]。刺激と同周期で応答する成分を抽出することで活性化部位を同定する[4]。
本発表は、ジャコウジカ由来のムスク化合物 muscone による匂い刺激をマウスに与え、高次脳領域における活性化部位を調べることを目的とした。

BOLD、匂い刺激、機能的MRI

○たけだみつひろ、はやしふゆ、ゆずりはなおや、よしながそうすけ、てらさわひろあき

【方法】マウス脳用の2チャンネル極低温プローブを備えた、ブルカー社製7テスラ小動物用 MRI 装置を用いた。C57BL/6 雄マウスを medetomidine により麻酔して撮像に用いた。匂い刺激のタイミングと曝露時間を厳密に制御するため、アルコシステム社と共同で作製した匂い暴露装置を利用した。本システムでは吸気ラインに三方活栓を介してシリンジポンプを接続した。シリンジポンプ内には muscone の液滴を入れて内部で気化させることで、飽和蒸気により内部を満たした。シリンジポンプと三方活栓の間には電磁弁を取り付け、プログラムにより電磁弁の開閉とシリンジポンプの作動を同期させて匂いの投与を行った。本実験では、5 秒間匂い刺激・55 秒間待機のサイクルを 24 回繰り返した。その間、嗅球から扁桃体にわたる Bregma: +4.8 mm～ -2.0 mm の領域を撮像領域として、グラジエントエコー型 EPI 法による連続撮像を行った。マウス３例の撮像を行い、活性化の解析を行った。解析は、まず SPM8 による動き補正および平滑化処理を行った。その後、MELODIC（FSL）による T2 強調画像を介した空間的標準化を行い、グループ ICA 解析を行った。ICA 解析により同定された成分から、匂い刺激と同一の周期を持つ成分を選り抜き手作業で擬陽性信号を取り除いて活性化部位を同定した。

【結果】３例の muscone 刺激マウスのデータを用いたグループ ICA 解析の結果、１次嗅覚中枢である嗅球および、梨状皮質、扁桃体副嗅覚系、前嗅核、嗅結節を含む高次の嗅覚中枢において活性化が検出された。

【考察】周期的な匂い刺激と ICA 解析を組み合わせることで、muscone 刺激によるマウス脳の活性化領域を検出できた。従来の線形モデル解析は、BOLD 信号が一般的な Hemodynamic response function の形に従わないと検出できないため、生体由来のノイズが多い高次中枢領域では検出が難しい。今回、周期的匂い刺激とICA解析を組み合わせた解析法を適用することで、マウス高次脳領域における信号を検出できた。ICA は周期的な応答を分離して検出するため、ノイズからBOLD 信号を分離して検出できると考えられる。Muscone 刺激により活性化された部位のうち、嗅球は１次の嗅覚中枢にあたりムスコン受容体に対応した糸球体が含まれる。梨状皮質、前嗅覚、嗅結節は嗅覚野に含まれる高次の嗅覚中枢にあたり、幅広い種類の匂い物質の嗅覚伝導路が含まれる。このうち扁桃体は情動に関与した部位である [6]。muscone 刺激により、梨状皮質、前嗅覚、嗅結節、扁桃体に活性化が生じることは、神経マーカーである c-Fos 抗体を用いた免疫染色解析においても報告されている [7]。

【結語】周期的匂い刺激と ICA 法を組み合わせた機能的 MRI 解析を行い、muscone 刺激によるマウス脳の活性化部位を全脳にわたり同定した。

【参考文献】

[1] Touhara, K. and Vosshall, L.B., *Annu. Rev. Physiol.* **71**, 307–332 (2009),

[2] Pain, F. *et al., Cell. Mol. Life Sci.* **68**, 2689–2709 (2011),

[3] Xu, F. *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 11029–11034 (2003),

[4] Yuzuriha, N. et al., Proc. Intl. Soc. Mag. Reson. Med. 24, 1722 (2016),

[5] McKeown, M.J. *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **95,** 803-810 (1998).

[6] Venkatraman, A. et al., Front Neuroanat. **11**, 15 (2017),

[7] Shirasu, M. et al., Neuron **81**, 165-178 (2014).

P87

In-cell NMR法を用いたヒト生細胞内のDNAおよびRNAの構造安定性評価

○山置佑大[1]，永田崇[1,2]，高見昇平[2]，阪本知樹[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

In-cell NMR studies on structural stabilities of DNA and RNA introduced inside the living human cells

○Yudai Yamaoki[1], Takashi Nagata[1,2], Shohei Takami[2], Tomoki Sakamoto[2], and Masato Katahira[1,2]
1 Institute of Advanced Energy, Kyoto University, 2 Graduate School of Energy Science, Kyoto University

The intracellular environment is extremely crowded with biomolecules. It has long been considered that the structures and structural stabilities of macromolecules, such as nucleic acids, inside the living cells are different from those in *in vitro* dilute conditions. In-cell NMR is a promising method to obtain relevant information. So far, NMR spectra of nucleic acids (NAs) were reported mostly in *Xenopus laevis* oocytes. Since we are interested in the properties in living human cells, we introduced NAs into those cells using a pore forming toxin streptolysin O (SLO) and observed their NMR signals. The observation of the imino-proton signals indicates the formation of hairpin and G-quadruplex structures inside the living human cells. Imino-proton/water exchange rate indicates that the structural stabilities of the hairpin and G-quadruplex inside the living human cells are lower than those in *in vitro* conditions.

【研究背景および本研究の目的】様々な生体分子が密に存在する細胞内環境では、蛋白質や核酸などの生体高分子の構造や構造安定性などが*in vitro*の希薄溶液中とは異なると考えられている。生きた細胞内においてこれらの性質を評価するのに適した手法としてin-cell NMR法があり、主に蛋白質を対象としてこれまで多くの報告がなされてきた[1]。一方、核酸を対象としたin-cell NMR法の報告は限られており、多くはマイクロインジェクション法によってアフリカツメガエルの卵母細胞内に対象とする核酸を導入する系であった[2]。我々は、細菌毒素ストレプトリシンO (SLO)を用いてヒト生細胞内に核酸を導入した。そして、ヒト生細胞内においてDNAおよびRNAのイミノプロトンシグナルを観測することに世界に先駆けて成功した[3]。さらに、長時間のin-cell NMR測定を可能とするためバイオリアクターシステム[4]を導入した。アガロースゲルを利用したバイオリアクターシステム[5]を改変し、簡便かつ安定に培地を供給可能にした(Fig. 1)。これにより可能となったイミノプロトン/水交換速度解析により、生細胞内において核酸構造を構成する各塩基対の構造安定性を評価することを試みた。

【実験】SLOによってHeLa細胞表面に細孔を形成し、これらの細胞と各種オリゴDNAおよびRNAをインキュベーションした。その後、$CaCl_2$を添加し、SLOによる細孔をリシールすることで細胞内に封入した。これらの細胞を、ライボビッツL15培地で調製した3%低融点アガロース水溶液と混合し、内径0.5 mmのPTFEチューブ内で氷冷し、凝固させ、細胞を含むアガロースゲルチューブ

in-cell NMR、核酸、四重鎖構造

○やまおきゆうだい，ながたたかし，たかみしょうへい，さかもととともき，かたひらまさと

を調製した。ゲルチューブをNMR試料管内に注入し、in-cell NMR測定試料とした。10% D_2Oを含むL15培地を供給しながら測定を行った。

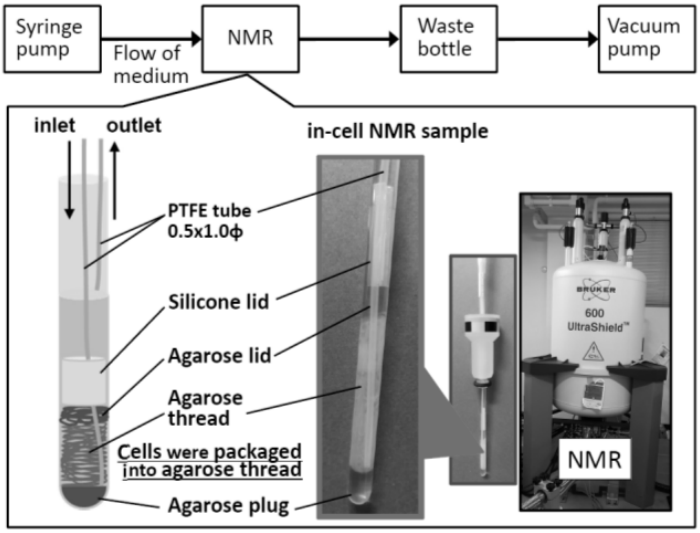


Fig. 1 Bioreactor system for in-cell NMR measurement using agarose gel.

【結果と考察】*In vitro*においてヘアピン構造を形成するRNA (5'-GGCACUUCGGUGCC-3'、2'-OMe化体)およびグアニン四重鎖構造を形成するヒトテロメアDNA (5'-TTGGG(TTAGGG)$_3$A-3') を導入したHeLa細胞を試料とし、バイオリアクターシステムを用いて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複数のシグナルが観測された。バイオリアクター使用時にはこれらのシグナルが測定開始から24時間後であっても検出可能であった。また、細胞外へと漏れ出た核酸分子は、バイオリアクターシステムにより試料管外に排出されており、24時間後であっても細胞外液に核酸由来のシグナルは観測されなかった。細胞内RNAのシグナルパターンは*in vitro*において得られたスペクトルのシグナルパターンと良く一致していた。また、テロメアDNAに関しても、細胞内および*in vitro*において得られたスペクトルで類似のシグナルパターンが確認された。核酸のイミノプロトンシグナルの化学シフト値は核酸のコンフォメーション変化に敏感である。そのため、*in vitro*およびin-cellで得られたスペクトルのシグナルパターンの一致は、細胞内においても*in vitro*における構造と似たヘアピン構造およびグアニン四重鎖構造を形成していることを示している。

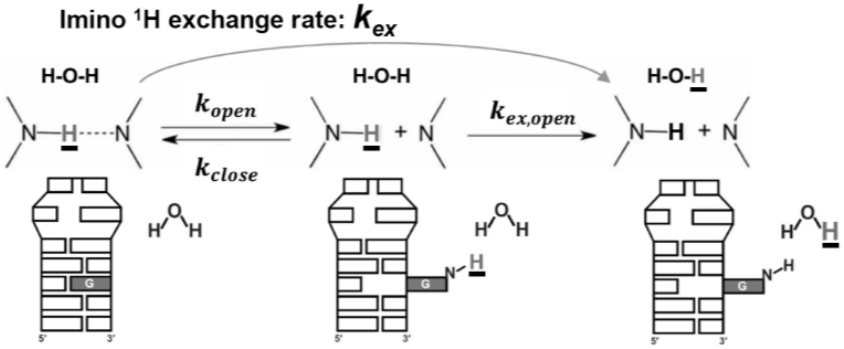


Fig. 2 Two-state model of imino proton exchange.

一方で、*in vitro*またはin-cell条件下におけるヘアピンRNAおよび四重鎖DNAに対し、水からの磁化移動を利用したイミノプロトン/水の交換速度解析(Fig. 2)の結果からは、細胞内のこれらの構造は*in vitro*よりも不安定化していることが示唆された。つまり、細胞内では*in vitro*環境と似た構造が形成されるが、一方でその構造安定性が*in vitro*よりも低下していることが示唆された。さらに*in vitro*において種々の分子クラウディング剤を用いて同様の解析を行った。その結果、細胞内における上記の構造不安定化は細胞内分子との非特異的な相互作用に由来する可能性が示唆された。

References [1] Luchinat, E. and Banci, L. (2017) *IUCrJ*, 4, 108-118. **[2]** Giassa, I.C., Rynes, J., Fessl, T., Foldynova-Trantirkova, S. and Trantirek, L. (2018) *FEBS Lett*., 592, 1997-2011. **[3]** Yamaoki, Y., Kiyoishi, A., Miyake, M., Kano, F., Murata, M., Nagata, T. and Katahira, M. (2018) *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 20, 2982-2985. **[4]** Kubo, S., Nishida, N., Udagawa, Y., Takarada, O., Ogino, S. and Shimada, I. (2013) *Angew. Chem. Int. Ed*., 52, 1208-11. **[5]** Breindel, L., DeMott, C., Burz, D.S. and Shekhtman, A. (2018) *Biochemistry*, 57, 540−546.

P88

Toward automatic metabolite identification by machine learning of observed and simulated NMR spectra

Jinzhe Zhang [1,2], Kei Terayama[1,2,3,4], Masato Sumita[2,5], Kengo Ito[7,8], Jun Kikuchi[7,8,9], Koji Tsuda[1,2,6]

[1]Grad. Sch. Frontier Sci., Univ. Tokyo, Japan; [2]RIKEN AIP, Japan; [3]Grad. Sch. Med., Kyoto Univ., Japan; [4]RIKEN MIH, Japan; [5]NIMS WPI-MANA, Japan; [6]NIMS CMI[2], Japan; [7]RIKEN CSRS, Japan; [8]Grad. Sch. Med. Life Sci., Yokohama City Univ., Japan; [9]Grad. Sch. Bioagri. Sci., Nagoya Univ., Japan

Molecular identification from NMR spectra is a basic but very important task. At present, various methods have been proposed, such as identification methods comparing spectra to databases. However, such methods often 1) rely on human involvement which requires efforts and raise objectivity concerns, 2) are database dependent. We will introduce our work focusing on an automated method of molecules identification from various NMR spectra by combining *de novo* molecular generation algorithm and quantum chemical calculation, named as NMR-Tree Search (NMR-TS).

Introduction

Designing physical property with *de novo* molecule generation has become much attention in various fields. Our research team has developed “ChemTS” that can explore chemical space by combining Monte Carlo Tree Search (MCTS) with Recurrent Neural Network (RNN).[1] Furthermore, targeting the ultraviolet-visible spectra, we have succeeded to select the molecule with desired property from designed organic molecules by combining "AI technology by deep learning" and "molecular simulation technology based on quantum chemistry".[2] The similar technique was considered applicable to molecular identification of complex NMR spectra that contain a lot of structural information. Conventionally, the molecular identification methods for complex NMR spectra using experimental chemical shift database, quantum chemical calculation, and machine learning have been reported.[3-7] However, these molecular identification methods target known substances, and most of them are semi-automatic methods. In addition, an example of analysis for complex NMR spectra that combine machine learning-like *de novo* molecule generation algorithm and quantum chemical calculation, has not yet been reported. Therefore, in this study, we aimed to develop the *de novo* molecule generation algorithm from complex NMR spectra by combining molecular simulation technology based on quantum chemistry with AI technology.

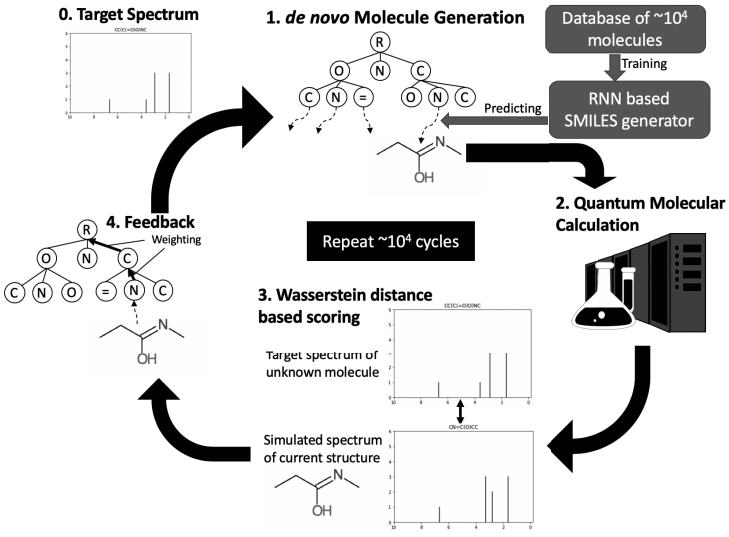


Fig. 1 Concept of NMR-Tree Search (NMR-TS)

Monte Carlo tree search, Wasserstein distance, DFT calculation

○チョウキンテツ、てらやまけい、すみたまさと、いとうけんご、きくちじゅん、つだこうじ

Methods

We show the concept of this study to generate a molecule which has a similar NMR spectrum to the target one of an unknown molecule in Fig. 1. In this study, we use the simulate ^{1}H spectrum obtained by density functional theory (DFT)[8] calculation and the number of Hydrogen and Carbon atoms as information of an unknown molecule (0: Target spectrum). The proposed method, called NMR-TS, searches a molecule which have the same NMR spectrum by using ChemTS as a *de novo* molecule generator and DFT calculations. ChemTS generates molecules based on the MCTS algorithm using the SMILES format of molecule representation.

Following the concept of ChemTS, we train an RNN using an input SMILES database to get an RNN model that can generate various valid SMILES strings depending on input prefixes. For molecule generation (1: *de novo* Molecule Generation), a prefix of SMILES determined by MCTS is given to the pre-trained RNN model to obtain a complete SMILES string which represents a molecule. Next, we calculate the ^{1}H spectrum of the generated molecule (2: Quantum Molecular calculation). Once the simulated NMR spectra is obtained, it is compared with the target ^{1}H spectrum and the Wasserstein distance between two spectra is computed (3: Wasserstein distance based scoring). In addition, the numbers of Hydrogen and Carbon atoms contained in both target chemical structure and ChemTS generated one are also considered for the similarity evaluation. We update weighting (scoring) of each prefix branch using the calculated sore to proceed MCTS (4: Feedback). Once the search tree is updated, a new SMILES prefix is selected and the above steps are repeated. By repeating these steps, we can eventually expect that the tree explores the chemical space and provide molecules which fit the target spectrum.

NMR spectrum prediction

For the computation of ^{1}H-NMR spectra, molecular structures whose atom positions are described in Cartesian coordinates were made by converting a SMILES format to a 3D molecular structure[8] through the function implemented in the RDKit library[9]. We calculated ^{1}H-NMR spectra by using density functional theory (DFT) [10] at the B3LYP/3-21G* level on the optimized structure at the universal force field (UFF) level. Magnetic shielding tensors at positions of protons were calculated by the gauge-invariant atomic orbital (GIAO) method. The (isotropic) chemical shift in ^{1}H-NMR was estimated by subtracting that of tetramethylsilane (TMS) calculated at the same level. For the temporal convenience in this work, we ignored the degeneracy between the protons. Hence, one ^{1}H-NMR spectrum of a molecule was computed as a line spectrum of all protons included in the molecule. In this study, all DFT calculations were performed with the Gaussian 16 package[11].

Wasserstein Distance and Evaluation function

The Wasserstein distance[12], also known as Kantorovich–Rubinstein metric or earth mover's distance is a function that describes the distance between two distributions. If we see two distributions as two piles of dirt, the Wasserstein distance is the minimum amount of work needed to reshape one into the other. We show some typical examples of the distances between calculated NMR spectra of molecules in Figure 2. In this study, the Wasserstein distance is used to evaluate the difference between the NMR spectra of new generated SMILES and our target NMR spectra. We also use the information of the numbers of Hydrogen and Carbon atoms in our evaluation function in order to guild the MCTS. We define the evaluation function $Score(M_g, M_t)$ between a generated molecule M_g and a target (unknown) molecule M_t as follows:

$$Score(M_g, M_t) = 1 - \tanh\left(WD(M_g, Mt) + \alpha\, Penalty(M_g, M_t)\right)$$

$$Penalty(M_g, M_t) = |C(M_g) - C(M_t)| + |H(M_g) - H(M_t)|$$

where $WD(M_g, Mt)$ is the Wasserstein distance between the calculated ^{1}H-NMR spectra of M_g and M_t. $C(M)$ and $H(M)$ respectively represents the numbers of carbons and hydrogen of molecule M. α is a parameter indicating the strength of the penalty. Please note that the range of calculated scores is [0,1]. For calculation of the Wasserstein distance between two spectra, we used the implementation of the SciPy library[13].

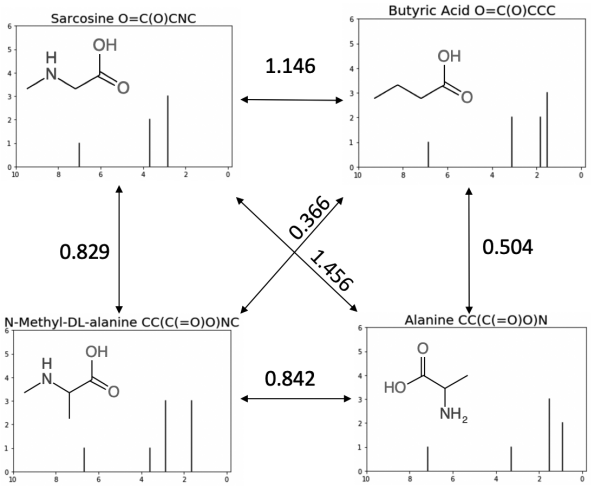


Fig. 2 Use of Wasserstein Distance to quantify difference between NMR spectra to SMILES generated molecules.

Database

We downloaded molecules in form of SMILES with PCCDB-ID from 1 to 138895. We run a selection on these 138895 molecules to eliminate all SMILES contains elements other than C, H, N, O. Also, we have eliminated molecules with chemical charge (such as O+, N+, C-). After selection, 10548 molecules remained. 8 molecules are removed for Gaussian failure. Finally, 10540 molecules are used as the SMILES database.

Test molecules

We selected 9 molecules, Butyric Acid, N-Methyl-DL-alanine, Glycylglycine, Sarcosine, Alanine, Salicylic Acid, 3-phenylprop-2-enal, Phenylalanine, and Phenpromethamine, as test set of the presented method. For case of Butyric Acid and Sarcosine, they are originally contained in our database which against our assumption of molecule being unknown. We therefore removed them from the database.

Results and Discussion

We executed a search trial for each test molecule by using the parallelized version of NMR-TS on RAIDEN (Riken AIp Deep learning Environment) supercomputer system with 250 cores. The computation time was limited to 24 hours for each test molecule.

Figure 3 show three examples of the searched results for N-Methyl-DL-alanine (top row), Salicylic Acid (middle row), and Glycine (bottom row). The first column in Fig.3 shows the calculated NMR spectra by Gaussian. The searched molecules that have the best scores are listed in the second column. The score is the same as the evaluation function. The third column shows the best scored molecules in the database. For Salicylic Acid, NMR-TS successfully obtained the perfect match molecule whose SMILES representations were different: O=C(O)c1ccccc1O and Oc1ccccc1C(=O)O, while it was not found in the database. In addition, for N-Methyl-DL-alanine (CC(C(=O)O)NC), although the best molecules in the database and found by NMR-TS were the same chemical compound, their SMILES are actually different: NCCCC(=O)O in the database and O=C(O)CCCN from NMR-TS. These two cases prove that NMR-TS is not only just producing what they have learned from the database, but also generating novel chemical compounds.

Figure 4 show the search processes for the molecules in Fig. 3. The horizontal and vertex axis represent the iteration number of loops and the score, respectively. For Salicylic Acid, NMR-TS found the identical molecule within 6,000 iterations. For N-Methyl-DL-alanine and Glycine, their searches seemed saturated between 10,000 and 20,000 iterations. For the other six molecules which were not shown in Fig.3 and Fig.4, in some cases, the searched scores are not necessary reached high score.

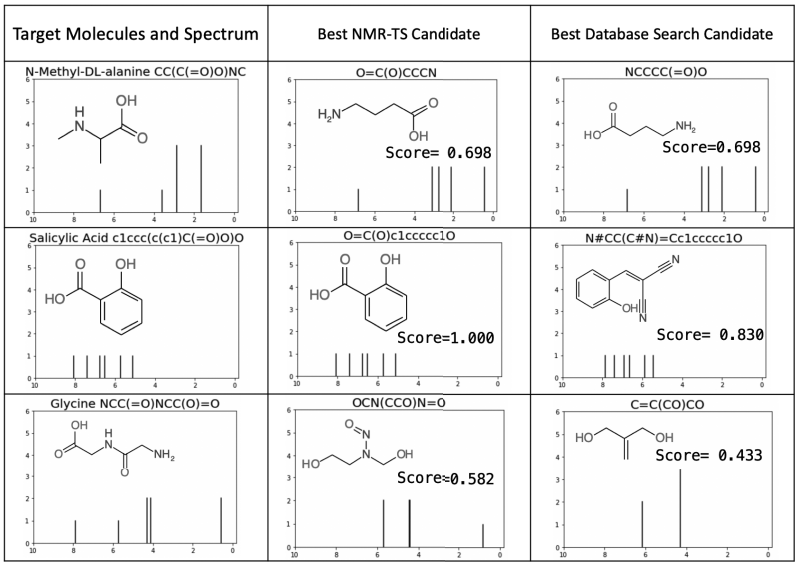


Fig.3 Typical results for targeted spectra and computed signals

In order to improve the performance of NMR-TS, we plan to modify and adjust the scoring function and the parameter α in NMR-TS. In addition, the molecule generation using RNN has database dependency, that is, statistical properties such as average of molecular weights strongly depend on the properties in the dataset. Therefore, preparing a database suitable for a target molecule or modification of search algorithm would be needed to improve the performance of NMR-TS.

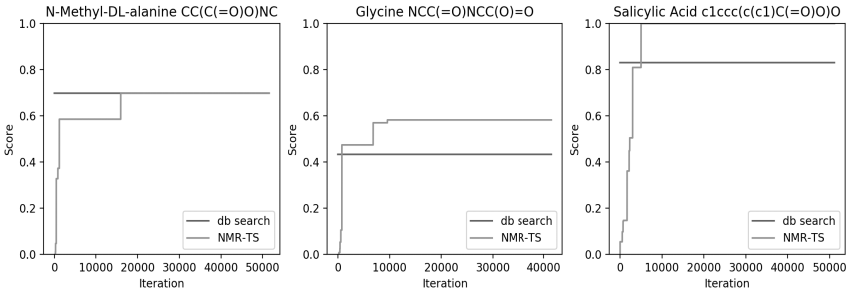


Fig.4 Results of NMR-TS for targeted molecules.

References

1. X. Yang, J. Zhang, K. Yoshizoe, K. Terayama and K. Tsuda, *Sci. Tech. Adv. Mat.*, 2017, **18**, 972-976.
2. M. Sumita, X. Yang, S. Ishihara, R. Tamura and K. Tsuda, *ACS Cent.l Sci.*, 2018, **4**, 1126-1133.
3. T. Misawa, T. Komatsu, Y. Date and J. Kikuchi, *Chem. Comm.*, 2016, **52**, 2964-2967.
4. T. Komatsu, R. Ohishi, A. Shino and J. Kikuchi, *Angew. Chem. Int. Ed*, 2016, **55**, 6000-6003.
5. E. Chikayama, Y. Shimbo, K. Komatsu and J. Kikuchi, *J. Phys. Chem. B*, 2016, **120**, 3479-3487.
6. K. Ito, Y. Tsutsumi, Y. Date and J. Kikuchi, *ACS Chem. Biol.*, 2016, **11**, 1030-1038.
7. K. Ito, Y. Obuchi, E. Chikayama, Y. Date and J. Kikuchi, *Chem. Sci.*, 2018, **9**, 8213-8220.
8. A. K. Rappé, C. J. Casewit, K. S. Colwell, W. A. Goddard III, W. M. Skiff, *J. Am. Chem. Soc.*, 1992, **114**, 10024-10035.
9. RDKit: Open-source cheminformatics. http://www.rdkit.org. Accessed 23 August 2019.
10. R. G. Parr, W. Yang, W, Density-Functional Theory of Atoms and Molecules; Oxford University Press: New York, 1989.
11. Frisch, M. J. et al. Gaussian 16, revision A.03; Gaussian, Inc.: Wallingford CT, 2016.
12. C. Villani. Optimal transport: old and new, volume 338. Springer Verlag, 2009.
13. A. Ramdas, N. Garcia, M. Cuturi, *Entropy*, 2017, **19**, 47.

P89

粘土鉱物に吸着したCsのケミカルシフトと構造の関係

○武井 滉洋[1], 大窪貴洋[2], 舘 幸男[3], 深津 勇太[3]
[1] 千葉大学大学院 融合理工学府
[2] 千葉大学大学院 工学研究院
[3] 日本原子力研究開発機構

Relationships between ^{133}Cs chemical shift and absorbed structure on clay

○ Koyo Takei[1], Takahiro Ohkubo[1], Yukio Tachi[2], Yuta Fukatsu[2]
[1] *Graduate School of Science and Engineering, Chiba University*
[2] *Graduate School of Engineering, Chiba University*
[3] *Japan Atomic Energy Agency*

Cs adsorption sites on vermiculite clays were investigated by ^{133}Cs magic-angle-spinning nuclear magnetic resonance (MAS NMR) and theoretical ^{133}Cs chemical shift calculations. A vermiculite sample with partially Cs exchange was prepared. Three peaks on ^{133}Cs MAS NMR spectra were experimentally found, however, assigning Cs absorption sites were not assigned to these peaks. A molecular model of fully Cs exchanged vermiculite was built to obtain theoretical ^{133}Cs chemical shift by GIPAW method. Calculated ^{133}Cs chemical shift ranged 23 to 47 ppm, which corresponds to the peak of the lowest field side. Detailed relationships between structure and ^{133}Cs chemical shifts were investigated from Cs position and vermiculite layer structure.

[緒言]

天然の岩石や土壌中の放射性核種の移行を評価するうえで、風化生成物として含まれる粘土鉱物への放射性核種の吸着・固定は重要な現象のひとつである。放射性廃棄物の地層処分の安全評価や福島の環境中へ放出された核種の挙動評価において、重要な放射性核種であるCsは、主に粘土鉱物によって吸着・固定化される。岩石や土壌に含まれる代表的な粘土鉱物であるバーミキュライトはCsを強く吸着することが知られており Csの移動挙動を支配する物質の一つである。バーミキュライトへのCsの吸着・脱着試験より、バーミキュライトは複数のCs吸着サイトが存在することが示唆されているが、その詳細なメカニズムについては解明されていない。そこで本研究ではCsが吸着したバーミキュライトの^{133}Cs固体NMR実験とモデル構造によるシフト計算により、バーミキュライトに吸着したCsのケミカルシフトと構造の関係を調べた。

[実験およびシフト計算]

天然のバーミキュライトを0.1 mMのCsCl水溶液に接触させ、5日間接触攪拌することで層間にCsが吸着した試料を調製した。作製した試料は、エタノールで過剰のCl^-を洗浄した後、NMR測定の試料とした。作製した試料に含まれるCs量は、試料を酸溶解し原子吸光測定で求めたところバーミキュライト1 gあたり0.538 mgであった。^{133}Cs MAS NMR測定は、ジルコニア製3.2 mm試料管を用いて18.8T下でJEOL ECA-800により行った。スピニング速度は20

---

^{133}Cs NMR, 粘土鉱物, GIPAW計算

○たけい こうよう, おおくぼ たかひろ, たち ゆきお, ふかつ ゆうた

kHz としパルス幅は 2.6 μs、パルス待ち時間は 1 sec. とした。

第一原理計算のための構造は、実験で用いた試料の組成に基づいて以下のように作成した。

$$Cs_{10}^{+}(Mg_{32}^{2+}Al_{4}^{3+})_3(Si_{34}^{4+}Al_{14}^{3+})_4O_{120}(OH)_{24} \quad (1)$$

初期構造は、結晶構造から古典分子動力学計算で得た。計算条件はエネルギーカットオフを 97 Ry とした。GIPAW 計算を行う前に、原子位置および格子定数に自由度を与えて構造最適化を行った。

[結果]

Figure 2 は、Cs 吸着バーミキュライトの ^{133}Cs MAS NMR スペクトルを示す。スペクトル上に 3 つのピークが観測された。これら 3 つのピークは、既報の研究で報告されておらず帰属できないが、層間に存在する Cs や積層構造のミスマッチに由来するナノサイズの間隙、フレイドエッジサイト及び層の最表面に吸着した Cs に由来すると考えられる。

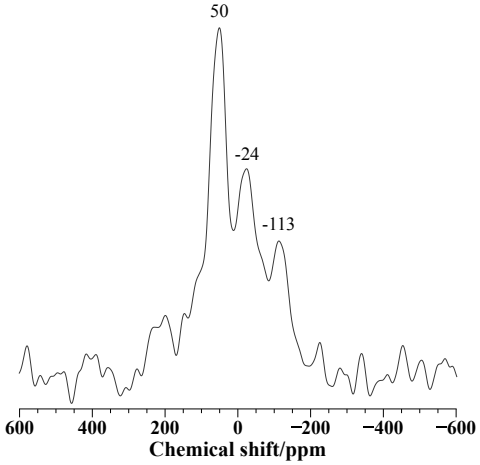


Figure 1 ^{133}Cs MAS NMR spectra of partilay Cs exchanged vermiculite clay.

Figure 2 は計算した原子モデルの上四面体層と Cs 位置を示す。すべての Cs は四面体層の Si、Al 及び O によって形成される六員環の中央付近に吸着している。GIPAW 計算から得られた δ_{iso} は、23 から 47 ppm に分布しており平均値は 32 ppm であった。GIPAW 計算から得られた平均 δ_{iso} = 32 ppm は、実験的に観測された最も低磁場側のピーク位置に近い。

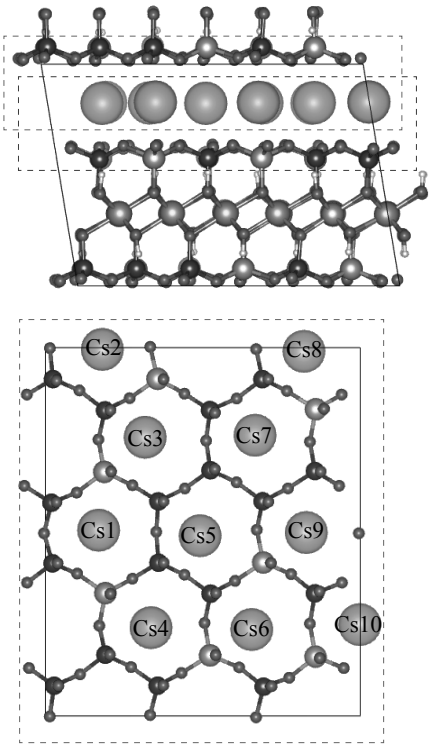


Figure 2 Optimized structure of Cs exchanged vermiculite clay. Mg, Si, Al, O and H are represented by ocher, blue, silver, red, cyan and white balls, respectively.

δ_{iso} は近接原子の電子供与性を反映することが知られていることから、吸着サイトと δ_{iso} の関係を調べるために各 Cs と四面体層の底面酸素面との距離及び最近接酸素を求めた。ここで、底面酸素面と Cs の距離は底面酸素の c 軸方向の平均位置と Cs の位置から計算した。最近接の O との距離は、全ての Cs で 3.1 Å 程度であり大きな相違はなかった。底面酸素面との距離も全ての Cs で 2.2 Å 程度で同程度である。このように、近接する底面酸素面や最近接 O との距離では 23 から 47 ppm に分布する δ_{iso} を解釈することができない。

このため ^{133}Cs のケミカルシフトと Cs 吸着構造の関係性を明らかにするため、(1) 構造中のすべての Cs において 5 Å 以内に存在する Al 原子の数 (2) 最近接 Al 原子との距離 (3) 最近接 O 原子との距離 (4) 六員環の中心位置との距離 (5) 底面 O 原子平面との距離の 5 つの構造パラメータと ^{133}Cs のケミカルシフトの関係を多変量解析で影響因子を整理した。

※本報告は、経済産業省委託事業「平成 30 年度高レベル放射性廃棄物等の地層処分に関する技術開発事業（ニアフィールドシステム評価確証技術開発）」の成果の一部である。

P90

分極剤濃度が高磁場DNP効率に与える影響のスピン拡散を考慮した高速定量的シミュレーションによる評価

○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 concentration of biradical dopant in sample on high-field solid-state DNP efficiency as analyzed by a fast and quantitative spin dynamics calculation which includes the effect of spin diffusion

○Jun Fukazawa[1], Toshimichi Fujiwara[1], and Yoh Matsuki[1]
[1]*Institute for Protein Research, Osaka University, Osaka, Japan.*

Although NMR signal enhancement by Dynamic Nuclear Polarization (DNP) is theoretically expected to exceed six hundred times, the ratio of the electron gyromagnetic ratio to the proton gyromagnetic ratio, actual DNP experiments show less effectiveness. We studied possible causes by using the simulation program we have developed, in which we calculate 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 of intermolecular electron spin couplings, T_{1e} depending on sample temperature, ^{1}H spin diffusion etc. by the numerical simulation, to explain why both too high and too low concentration of biradical is bad for the signal enhancement by DNP.

【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。

前々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スピン系にもう1つのバイラジカル分子の2電子の影響を加えた5スピン系でDNPの素過程に関する計算を行い、濃度

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

の影響について考察していたが，その際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していた。今回は複数分子に跨がる交差効果についても考慮し、より現実に近しいシミュレーションを行うことによって濃度の影響について考察した。また，これまでは励磁される^{1}Hを単独として考察していたが，今回は^{1}Hスピンの拡散に関する考察も行った。

【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の積分ステップで解く必要がある。5スピン系ならば32×32行列となり、計算量は膨大となりシミュレーションに掛かる時間は全く現実的ではなくなる。しかし, 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，電子スピン間双極子相互作用によるスピン交換および^{1}Hスピンの拡散も同様に近似可能である。

【結果・考察】

Fig. 1に6044点のZCW3[3,4]オイラー角の分子の向きに対する^{1}HのDNP効率の大きさのシミュレーションによる結果を集計したヒストグラムを示す。この図からはDNP励磁を受けない^{1}Hが相当数あるとわかり，またこのデータ群の単純平均を取るとDNP効率は約99倍となるが，それは各系の^{1}Hが完全に独立している仮定での話であり，^{1}Hのスピン拡散が十分速く起こる状態ではDNP効率の大きい^{1}Hが小さいあるいは励磁を受けない^{1}Hを援助するためこの限りではない。しかしDNP効率が最大の^{1}Hの値に収束するわけでもない。交差効果の逆経路による緩和（サブミリ波非照射の系で起こるものはThurber効果[5]と呼ばれる）によって^{1}H磁化の全体量が減少するという要素も考慮しなければならない為である。

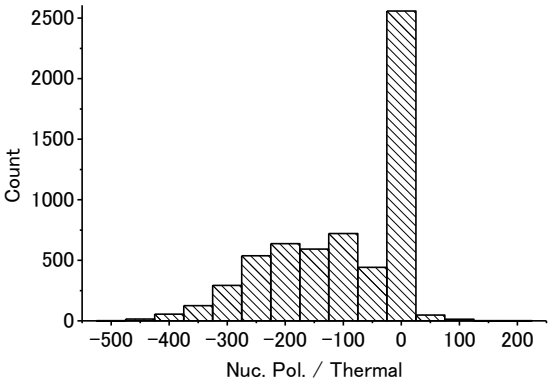


Fig.1. Histogram of Simulated DNP enhancement of AMUPOL molecule system, after a build-up time of 7.1 s, about 6044 data of ZCW3 molecular Euler-angle set. In this calculation, $T_{1\mathrm{H}}$ =4 s, $\omega_{\mathrm{MAS}}/2\pi$=7 kHz.

この他に，2分子系のシミュレーションから，近傍バイラジカル分子が交差効果を阻害するという機構に関する考察も行う。

References

[1] K. R. Thurber, R. Tycko, *J. Chem. Phys.*, **137**, 084508 (2012)
[2] T. Mary, et. al., *J. Chem. Phys.* **128**, 052211 (2008)
[3] M. Edén, M. H. Levitt, *J. Magn. Reson.*, **132**, 220-239 (1998)
[4] M. H. Levitt, http://www.southampton.ac.uk/~mhl/resources/Orientations/index.html
[5] K. R. Thurber, R. Tycko. *J. Chem. Phys.*, **140**, 184201 (2014)

P91

Nearly complete assignments for 23kDa membrane protein by solid-state NMR using MagRO system assisted by Graph_Robot based on finite automaton theory.

Naohiro Kobayashi[1], Toshio Nagashima[1] and Toshio Yamazaki[1]
[1]RIKEN Spring-8 Center, Yokohama, Japan

We have developed new function of MagRO which is upgraded version of the integrated tools for NMR analysis named Kujira (1) using a module Graph_Robot based on finite automaton theory. The module allows us to manipulate and display multi-dimensional NMR spectra, and simulate expected peaks based on libraries describing chemical topology, isotope labeling and simplified pulse scheme for wide variety of NMR experiments. Here we present a high completeness of assignments for observable signals (>90%) in solid-state NMR spectra of $^{13}C/^{15}N$ uniformly labeled membrane protein in natural lipid bilayer, bacterial Aquaporin Z (~23kDa) demonstrating high feasibility of flexible and easy handing complicated data sets.

Solid-state NMR spectrum data measurement and analysis have been routinely performed by established methods for uniformly stable isotope labeled (^{13}C and ^{15}N) samples. However, the assignments of the signals for difficult cases such as membrane protein with a number of residues (more than 200aa) are required extremely complicated spectrum data sets and special isotope labeling in order to over-come the severe signal overlapping. On the other hand, if a high completeness of the assigned chemical shifts was achieved as well as expected observable signals on the multi-dimensional NMR spectra are reasonably explained by the assigned chemical shifts, their trustfulness of the assignments would be more strongly enhanced. Additionally the high complete assignments will be more applicable to such as ligand interaction, local and global stability analysis. We have developed new module, named Graph_Robot, implemented in the MagRO system and further optimized for solid-state NMR study, which is using subroutines based on finite automaton theory with the chemical topology of target sample, isotope labeling of nuclear spins and simplified NMR magnetization transfer scheme (Fig. 1). By the new functions of the module allow the user to easily manipulate wide variety of multi-dimensional NMR spectra either for solution- or solid-state with special stable isotope-labeling. The module requires several mandatory libraries, chemical structure (*_atom*.lib), spin hierarchy (magn_spin.lib) and NMR magnetization transfer scheme (magn_spec.lib). The chemical structure library is described according to the ontology schema, for instance, chain→residue→atom. In the case of protein as chain system to construct whole chemical structure topology, the module requires proten_residue.lib for residue names, protein_atom.lib for atoms in each residue, protein_atom_isotope.lib for isotope-labeling and protein_atom_topo.lib for inter-atomic connectivity. The module then constructs database file, protein_*x*_y_acs.db for assigned chemical shifts from these libraries and residue sequence (protein_*x*_*y*_seq.db), where *x* corresponding to Chain-ID and *y* to status-ID (useful for description of minor state or comparison with other assignments). The simulated peak positions are then calculated finite automaton operator imitating coherence transfer based on the simplified pulse scheme library (Fig. 2).

Solid-sate NMR, finite automaton theory, automation

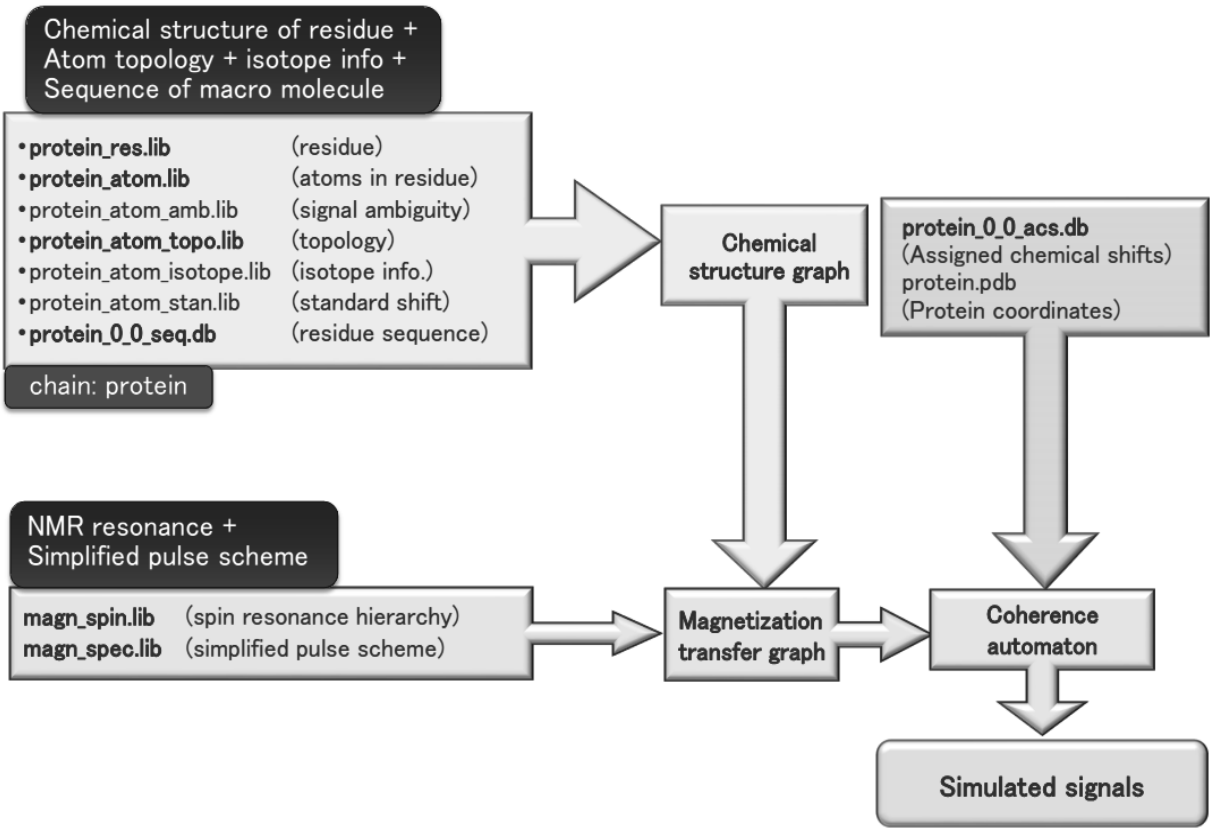
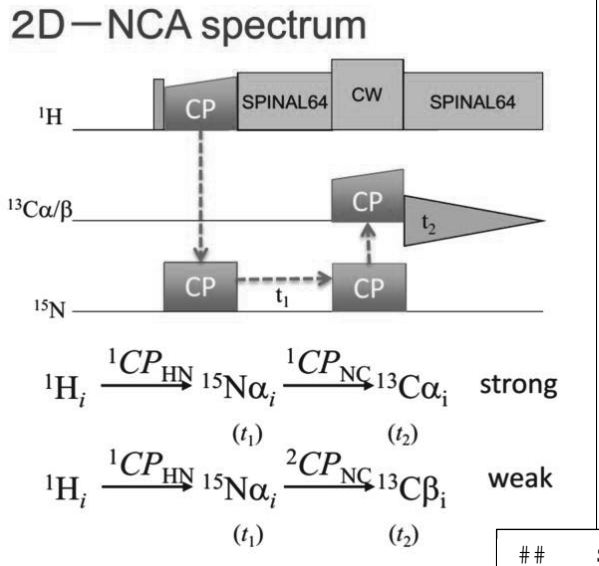
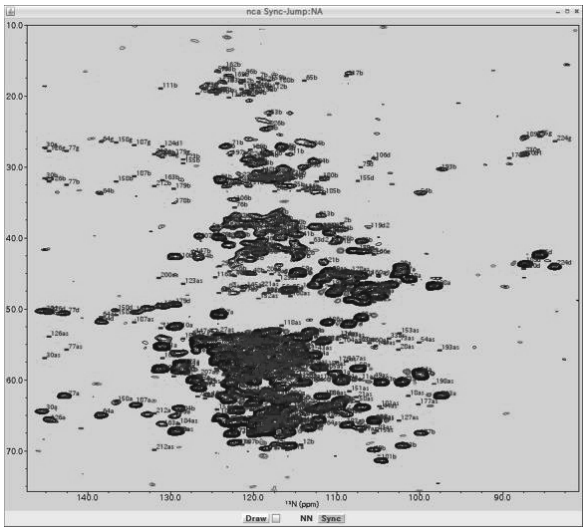


Fig. 1. Schematic representation of flow-chart to simulate NMR signals by Graph_Robot based on finite automaton theory. The module requires residue names in chain system (protein), atoms composing in each residue, atom-atom bonding topology and isotope labeling information with chain sequence. Firstly starting from building whole chemical topology the coherence automata are calculated according to spin resonance and simplified pulse scheme information.





```
##    Spec  step  Nu1  Nu2  Path  TD   -   -   eff   fold
Spec: nca   0     CL   CL   --    2    0   0     1.0   1
Spec: nca   1     CL   NN   CP1   0    0   0     1.0   0
Spec: nca   1     CL   NN   CP2   0    0   0     1.0   0
Spec: nca   2     NN   NN   --    1    0   0     1.0   1
```

Fig. 2. An example of simplified NMR pulse scheme (right lower panel) for 2D NCA spectrum (left upper panel). In the pulse scheme only three steps of automaton command CP1 and CP2 (1- and 2-bond cross polarization transfer) are used for spins CL (all aliphatic carbons) and NN (all nitrogen).

The bacterial membrane protein, uniformly $^{13}C/^{15}N$ labeled Aquaporin Z (AqpZ) in natural lipid bilayer (231aa, ~23kDa) was used as a sample for demonstration of this study. Aquaporin is a ubiquitous family protein which has been widely found in life organs from bacterial to mammals. The major function of the protein is selective transportation of water channel whose detailed mechanisms have been studied by high resolution X-ray structure and NMR studies (2-5). We have measured hetero-nuclear 2D and 3D slid-state NMR spectra for the AqpZ. The sample expression and preparation were described elsewhere (5), all NMR experiments for 2D ^{13}C-^{13}C DARR, NCA, NCO, 3D CANCO, NCACB, NCACX, NCOCX, CANCOCA and N(CO)CACB on Bruker 700MHz Avanace spectrometer using 3.2mm HCN MAS probe (15.7kHz MAS frequency).

In the new system of MagRO, three Sync-Jump modes were designed for manipulating 2D spectrum strips extracted from multi-dimensional data, synchronizing 2D plane for $^{15}N(i)$ and $^{13}C\alpha(i)$ as NA, $^{15}N(i)$ and $^{13}CO(i\text{-}1)$ as NC and $^{15}N(i)$ and $^{13}C\alpha(i\text{-}1)$ as NS. Using semi-automated sequential method in MagRO, the backbone assignment over 98% of residues were achieved using the information of signal clusters of ^{15}N resonance accompanied with $^{13}CO(i\text{-}1)$, $^{13}CO(i)$, $^{13}C\alpha(i\text{-}1)$, $^{13}C\alpha(i)$, $^{13}C\beta(i\text{-}1)$ and $^{13}C\beta(i)$ resonances. The side-chain signals were also assigned using 2D ^{13}C-^{13}C DARR, 3D NCACX and NCOCX.

Backbone signal assignments were confirmed by checking sequential signal connectivity on the module to graphically display aligned 2D strips extracted from corresponding region of 3D spectra with automated signal simulation by Graph_Robot as shown in Fig. 3.

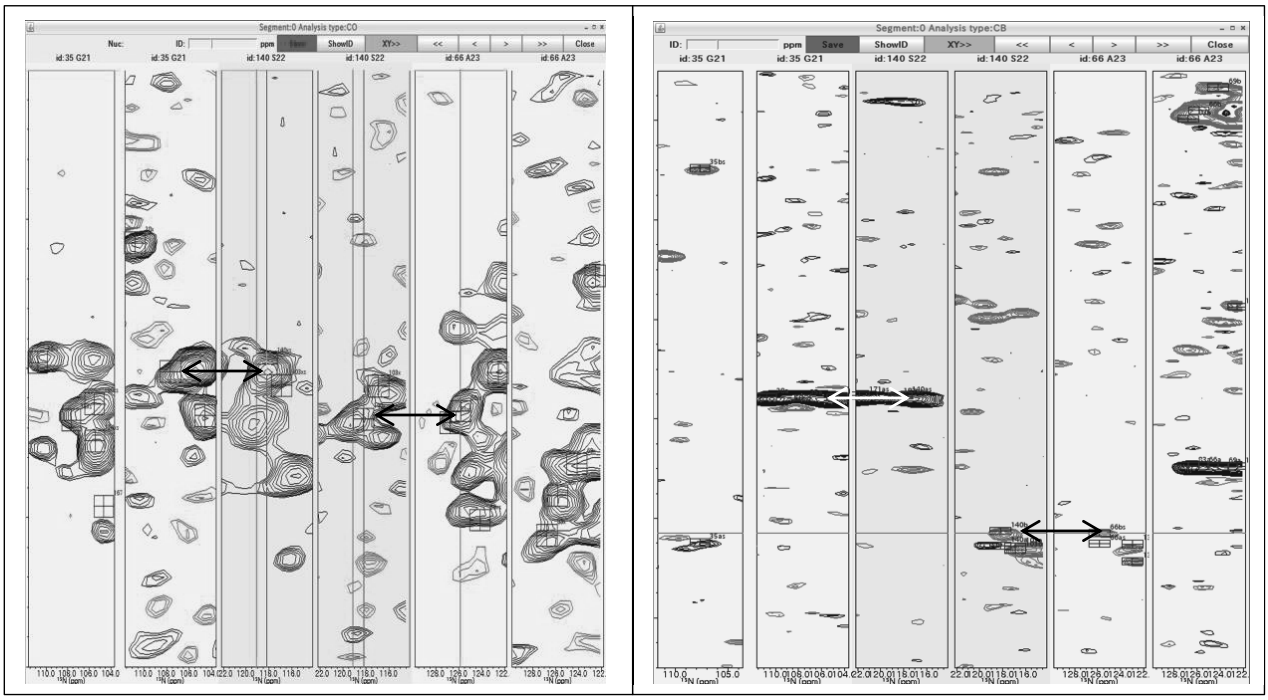


Fig. 3. Graphical module for displaying arrayed 2D spectrum strips. The sequential connectivity (indicated by arrows) of ^{13}CO (left) and $^{13}C\alpha/\beta$ (right) are shown in y-axis using sync-jump modes, NC and NA/NS respectively. 3D CANCOCA for $^{13}CO(i\text{-}1)$, NCACX for $^{13}CO(i)$, while 3D N(CO)CACB for $^{13}C\alpha/\beta(i\text{-}1)$ and NCACB for $^{13}C\alpha/\beta(i)$ are used respectively. Three residues, G21, S22 and A23 of AqpZ are shown for the sequential connectivity. Simulated peak positions are calculated by Graph_Robot and represented by blue boxes.

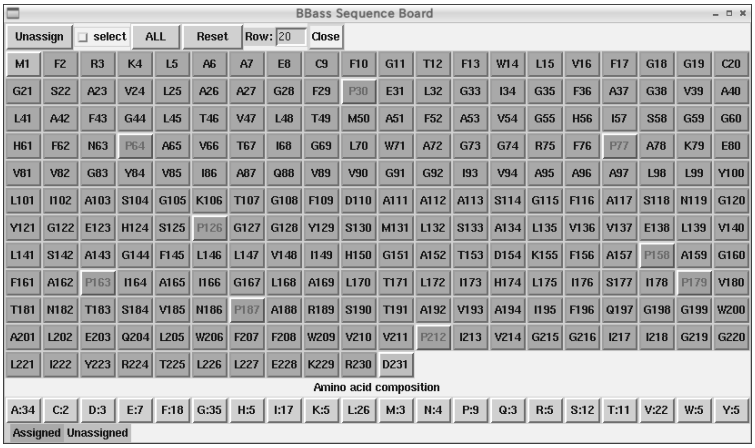


Fig. 4. One of the function of GUI module in MagRO for Backbone signal assignments. The sequence board is showing assignment completeness.

The assigned chemical shifts of AqpZ were further confirmed by careful inspection of minor and weak signals that are expected by 2D NCA and NCO spectra using different types of customized magnetization transfer scheme to display evidential sequential peaks. Finally 1242 out of 1370 observable signals (~90.7%) were assigned including aromatic and amide side-chains (see Fig. 5). The assigned chemical shifts performed by previous study (4) are compared and the residues revealing large difference (greater than 1.0 ppm for backbone ^{13}C and ^{15}N signals) mapped on the X-ray crystal structure of AqpZ at 3.2Å in Fig.6.

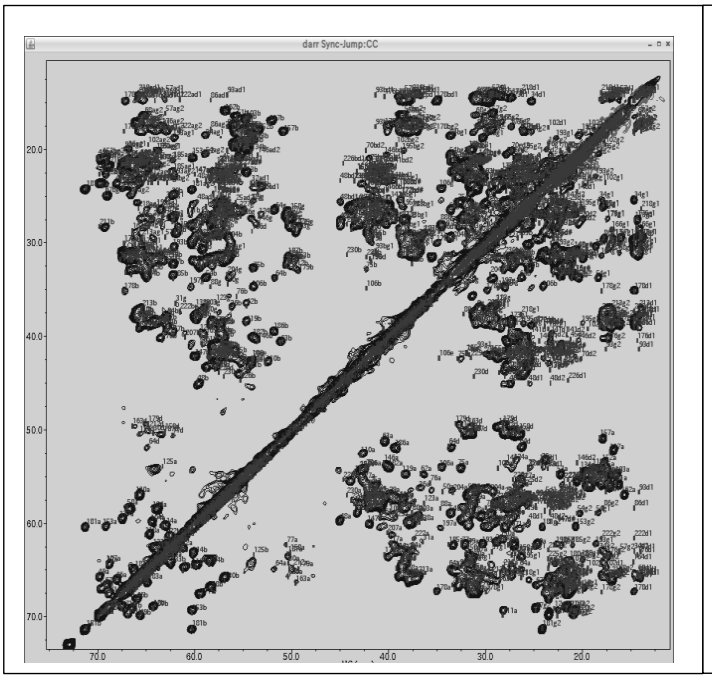


Fig. 5. 2D ^{13}C-^{13}C DARR spectrum (20ms mixing time) of AqpZ. Only showing aliphatic region (15-75 ppm). The peaks simulated by Graph_Robot are represented by blue boxes with simplified labeling (residue number and abbreviated atom names).

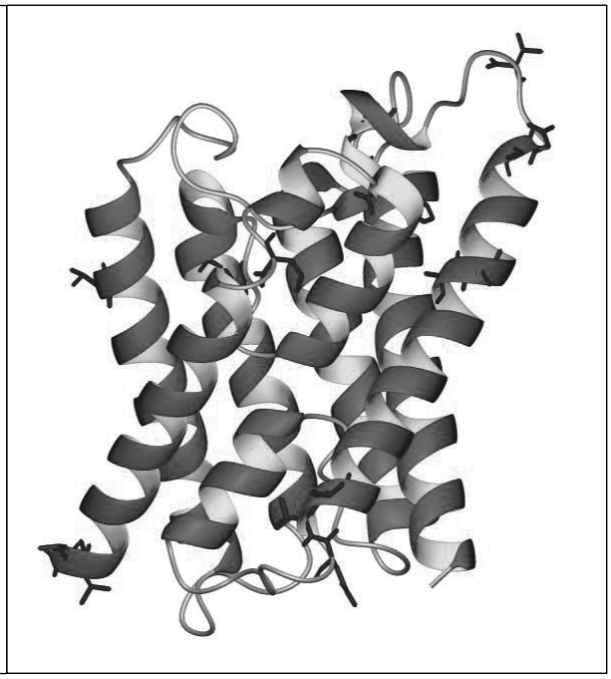


Fig. 6. Ribbon model of X-ray structure of AqpZ (2ABM). Blue lines are corresponding to the residues found to have large difference (>1.0 ppm) are mainly localized on loop regions.

References

(1) Kobayashi N. et al., *J. Biomol. NMR* (2007) 39, 31-52.

(2) Jiang J. el al., *J. Biol. Chem.* (2006) 281, 454-456.

(3) Zhao Y. et a., *J. Am. Chem. Soc.* (2018) 140, 7885-7895.

(4) Xie H. et al., *Biomol. NMR Assign.* (2018) 12, 323-328.

(5) Phillips et al., *J. Biol. NMR* (2018) 71, 91-100.

P92

PHIP-SAH法を用いた腫瘍における超偏極^{13}Cピルビン酸の代謝MRI技術の開発

○加瀬優希[1]，Neil J Stewart [2]，平田拓[2]，松元慎吾[2]，松元慎吾[2]
1北海道大学大学院　情報科学研究院　情報科学専攻　生体情報工学コース
2北海道大学大学院　情報科学研究科　生命人間情報科学専攻

Development of metabolic MRI technique for hyperpolarized ^{13}C pyruvate in tumors using PHIP-SAH method

○Yuki Kase[1], Neil J Stewart [2], Hiroshi Hirata[2], Shingo Matsumoto[2]
1 Course of Bioengineering and Bioinformatics Graduate School of Information Science and Technology, Hokkaido University
2 Division of Bioengineering and Bioinformatics Graduate School of Information Science and Technology, Hokkaido University

Hyperpolarized ^{13}C MRI metabolic imaging of [1-^{13}C] pyruvate has been clinically applied in cancer diagnosis and cardiac function evaluation. Although the dynamic nuclear polarization (DNP) is current mainstream of hyperpolarization techniques for ^{13}C, side-armed parahydrogen-induced polarization (PHIP-SAH) can potentially reduce the initial cost of clinical applications. To conduct ^{13}C MRI of hyperpolarized [1-^{13}C] pyruvate in tumor-bearing mouse, we considered two types of ^{1}H/^{13}C RF coil system; a dual coil structure of ^{13}C solenoid and ^{1}H saddle coils or a pair of independent solenoid coils for both channels. Mouse squamous cell carcinoma SCC VII and human hepatocellular carcinoma HepG2 xenografts were prepared, and the feasibility of PHIP-SAH hyperpolarized ^{13}C MRI was evaluated.

^{13}C MRI は ^{13}C 標識した化合物の代謝反応の非侵襲計測が可能であり、癌診断および心機能評価に用いられている。熱平衡の ^{13}C NMR 信号は微弱であるため、in vivo 計測には超偏極による信号増強が用いられている。現在、^{13}C 核スピンに超偏極を誘導する手法として最も研究されているのは動的核偏極（Dynamic Nuclear Polarization：DNP）法であるが、超電導磁石と極低温条件を要する DNP 法は導入初期費用およびランニングコストが高額であり、臨床への普及を妨げる主因となっている。一方、低コストな超偏極誘導法であるパラ水素誘起偏極（ParaHydrogen Induced Polarization：PHIP）法では、代謝プローブの前駆体にパラ水素を付加する必要があるため、励起できるのは炭素多重結合を含む前駆体構造を取れる分子に限られる。この分子構造の制限を解消する手法として、2015 年に R.Renieri らにより PHIP-SAH（Side Arm Hydrogenation）法が報告された [6]。この手法では、不飽和アルコールとのエステル前駆体のアルコール側鎖にパラ水素付加し、生成する超偏極 ^{1}H から特定の ^{13}C への偏極移動後に不要なアルコール側鎖を加水分解することで。ピルビン酸のように直接は不飽和前駆体構造を取れない分子の励起を可能とする。

以上の背景から、本研究ではPHIP-SAH法に着目し、代謝MRI技術の開発として^{1}H/^{13}C RFコイルの作製を行うとともに、PHIP-SAH法による^{13}Cピルビン酸の励起および担癌モデルマウスにお

超偏極、PHIP-SAH、^{13}C MRI

○かせゆうき [1]，Neil J Stewart [2]，ひらたひろし [2]，まつもとしんご [2]

ける超偏極^{13}C MRI撮像を試みた。RFコイルについては、^{13}C用ソレノイドコイルと^{1}H用サドルコイルの二重コイル構造の共振器（Fig. 1）、および、両チャネルに対して独立した一対のソレノイドコイルを用意し、位置情報のズレを抑えるために専用のステージの上に固定したマウスを両共振器間で移動するシステム (Fig.2) を作成し、画質の比較を行った。また、マウス扁平上皮癌SCC-Ⅶ、ヒト肝細胞癌HepG2をそれぞれマウス後肢の皮下に移植した二系統の担癌モデルを作製し、PHIP-SAH法による超偏極^{13}Cピルビン酸の代謝MRIの実用性評価を行った。

^{13}CチャネルのMRI感度は両方の共振器システムで同等であったが、^{1}Hにも高感度なソレノイドコイルを使用するFig.2の構成では、^{1}H MRIにおいて二重コイル構造よりも良好な画質の形態画像が得られた。

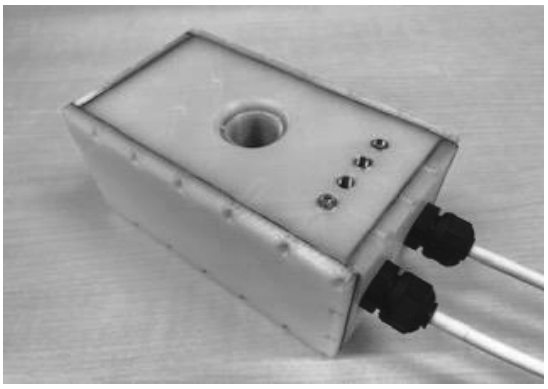


Fig.1 ^{1}H/^{13}C dual RF coil for measurement of tumor-bearing model

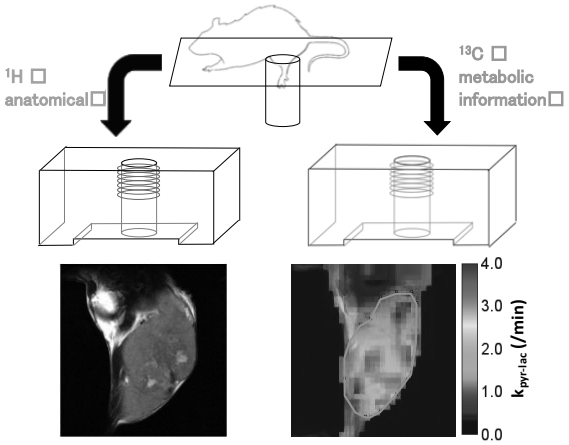


Fig.2 Concept of ^{1}H/^{13}C solenoid coil pair for high sensitivity of ^{1}H channel. The tumor-bearing mouse is fixed on a dedicated holder, and the RF coil is exchanged according to the nuclide to be imaged.□

参考文献

[1] 安藤勲, 内藤昌, NMRNMR分光学: 基礎と応用. 東京化学同人, 2008

[2] Sarah J Nelson *et al*., *Sci. Trans. Med*., 2013, 5, 198

[3] P.P.Hsu and D.M.Sabatini *et al., Cell*., 2008, 134, 703-707.

[4] K.Golman, *et al., Cancer. Res*., 2006, 66, 10855-60.

[5] C.Bowers and D. Weitekamp, *Phys. Rev. Lett.*, 1984, 57, 2645-48.

[6] F. Renieri *et al*., *Nat. Commun.*, 2015, 6, 6858.

[7] E. Cavallari *et al*., *Chem. Eur. J*., 2017, 23, 1200-1204.

[8] M. G. Pravica *et al*., Chem. *Phys. Rev. Lett.*, 1998, 145, 255-258.

[9] E. Cavallari *et al.,J. Phys. Chem. B*.. 2015, 119, 10035-100441.

[10] J.-B Hövener, *et al., Magn, Reson. Mater. Physics. Biol. Med.*, 2009, 22, 123-121.

[11] J.-B Hövener, *et al., Magn, Reson. Mater. Phys.,* 2009, 22, 123-134.

[12] スリクター C.P. 磁気共鳴の原理. シュプリンガーフェアラーク東京, 1998

[13] N. J. Stewart et al. *J Magn Reson* 2018, 296, 85-92.

P93

バルク超伝導磁石のためのパッシブシムの検討

○仲村高志[1]，高橋雅人[1]，井上夏希[2]，岡徹雄[2]
1理化学研究所　RSC NMR研究開発部門
2芝浦工業大学工学部材料工学科

Study of passive shims for superconducting bulk magnets

○Takashi Nakamura [1], Masato Takahashi [1], Natsuki Inoue [2], Tetsuo Oka [2]
1 RIKEN RSC NMR Science and Development Division
2 Materials Science and Engineering, Shibaura Institute of Technology

We have developed a 200 MHz (4.7 T) superconducting magnet using a high-temperature superconducting bulk material (Eu-Ba-Cu-O) to realize a cryogen-free benchtop NMR system. Last time, we reported on the development of a multi-shim coil to enable high-resolution NMR, but in order to generate a uniform magnetic field at a low cost, we studied a passive shim using iron pieces like a MRI system.

本年に入ってからヘリウムは供給の量を需要が大きく上回ることが原因で価格が上昇するだけでなく、注文してもオーダーを受け付けられないような状況になってきた。超伝導状態を保つため液体ヘリウムを補充する必要のあるNMR機器を扱う研究者にとっては大きな問題が発生している。一方、数年前から永久磁石を用いたベンチトップNMRはヘリウムなどの冷媒を必要とせず非常に小型であるため、徐々に市場での規模を増している。永久磁石は冷媒補給の必要がなく、クエンチの危険性がないので安全性が高いなど様々な利点があるが、残念ながら3 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ので高性能化には限界がある。また、高温超電導線材を用いたNMR磁石も現れてきているが、装置として必須の超伝導接合にようやく成功した[1]ばかりなため、NMR磁石として使えるようになるのは、まだまだ先と予想され、液体窒素温度では臨界電流密度の関係で磁場強度はやはり3 T程度が限界となるため液体ヘリウムが必要となるであろう。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）かつ非常に小型で、かつ移動が可能な無冷媒型超電導磁石(SCM: Superconducting Magnet)を開発[2]してきている。これを高分解能NMRに適応できれば冷凍機冷却(40 K ~ 50 K)で超伝導を実現しているためヘリウムフリーでかつ臨界電流密度や臨界磁場といった物性的な点では30 T以上の磁場を発生させることも可能となる。この際の技術的な問題点は磁石にかかる電磁力でバルク体自身が機械強度としては非常に脆弱であるため電磁力に対する技術的な対策が必須となる。

いままでの研究で、バルク磁石と超伝導円筒の組み合わせが有効であることを見出し[3]、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のバルク内部に対して、さらに外径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内挿するという方法で

キーワード：高温超伝導バルク体　卓上型 NMR　ヘリウムフリー

○なかむらたかし，たかはしまさと，いのうえなつき，おかてつお

実現したバルク磁石を静磁場着磁法（FCM: Field Cooling Method）を用いて均一なNMR用超電導磁石の磁場を精密にバルク超電導磁石に捕捉させることに成功し、一昨年のNMR討論会で報告した[4]。この報告で^{1}Hのクロトン酸エチルのスペクトル上でスピン接合まで明瞭に観測できるところまで報告したがスペクトルの線形のうち裾の部分には、まだブロードな成分が残っており、製品としてのレベルの分解能を達成できていなかった。昨年の報告では室温シムコイルを非対称なXY平面に働くマルチシムコイルで実現しようとしてきたが、この方法では変更できるパラメータが多すぎるのと、解析的に電流のコントロールができないため、通常のNMR装置で観測できるスペクトルの観測に至っていない[5]。この磁石の短所は通常のワイドボア(89 mm)NMR用超伝導磁石から磁場を着磁するためにボア径が小さく（内径23 mm）、大口径化が困難なことである。このため磁場均一度を上げる仕組みを高密度に仕立て上げなければならない。

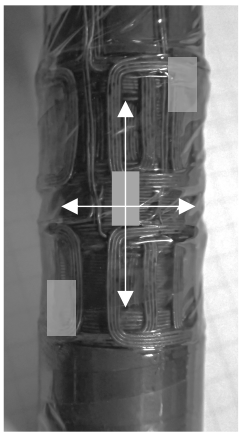


Fig. 1 Schematic view of passive shim 1) Some small ferromagnetic piece attached to a multi-shim coil

バルク磁石を静磁場着磁したあとの磁場解析方法の確立するために従来の超伝導磁石の最初の立ち上げ時に用いるシムロボットの適応を考えた。ただし、上記の問題と同様で非常に小さい内径中の小さな部位からのNMR信号を位置精度よく確実に計測する方法を実装することに困難を極めている。また、それと並行して従来も用いていたMRIによる磁場分布計測も行っているが、こちらはMRIに望まれる磁場均一性は高分解能NMRに対して1/100程度の均一性でのため精度の問題でppbレベルの磁場の不均一性を正確に評価できていない。そこで、解析的な方法と同時にMRIで用いられている広範囲に磁場均一性を発生させる方法として鉄片をボア内の周囲に配置するパッシブシムの適応を考えたのが本研究である。実際にNMRにおいても1020 MHzで高精度の磁場均一度の発生に適応されている[6]ので磁場強度を上げた場合にも基礎技術として採用できる。この方法はFig.1に示すように一昨年に報告しているシムコイルの外側に非常に薄くて小さい鉄片を貼り付けることによって磁場均一度を上げる方法となる。詳細については会場で報告する。

参考文献

[1] 山崎ほか (2019) 第58回NMR討論会 口頭発表.
[2] Nakamura, T. et al. (2015) *J. Magn. Reson.* **259** 68-75.
[3] Fujishiro, H., et al. (2015) *Superconductor Science & Technology*, **28** (9).
[4] 仲村ほか (2017) 第56回NMR討論会 L5-4, 102-103.
[5] 仲村ほか (2018) 第57回NMR討論会 L1-16, 60-61.
[6] Iguchi S. et. al. (2016) *IEEE Trans. Appl. Supercond., VOL. 26, NO. 4, 4303507*

P94

片側開放型NMRを用いたマグロ肉の脂質の非侵襲計測

○中島　善人[1]
1産業技術総合研究所　地圏資源環境研究部門

Tuna scanning by single-sided time-domain NMR

○Yoshito Nakashima[1]
1National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

A portable single-sided NMR surface scanner was applied to the non-destructive quantification of lipid in meat block samples of farmed bluefin tuna. Totally, 34 tuna meat block samples were measured; the required measurement time was approximately 70 s for each sample. The results yielded an estimation error of 3.7 g/100 g for the lipid weight fractions. The investigation depth of the sensor was as deep as 3 cm, which enables the non-destructive quantification of the meat of the intact whole tuna beneath the thick scales, skin, and subcutaneous fat in markets and seafood factories.

はじめに

マグロをはじめとする魚介類の脂質含有量は、食味ひいては価格を左右する重要な特性である。魚市場などでマグロを非破壊非侵襲で迅速に脂質定量できることが望まれているが、現状の計測手法（近赤外や電気伝導度）はかならずしも満足できるものではない。時間領域型プロトン核磁気共鳴(NMR)は脂質の定量が可能であり、片側開放型という特殊な磁気回路を搭載すれば非破壊非侵襲で物体から数mm～数cm深部の部位を計測できる。そこで、マグロ肉ブロック肉について、4.1MHzの片側開放型NMRで計測を試み、脂質定量の精度を確認した[1]。

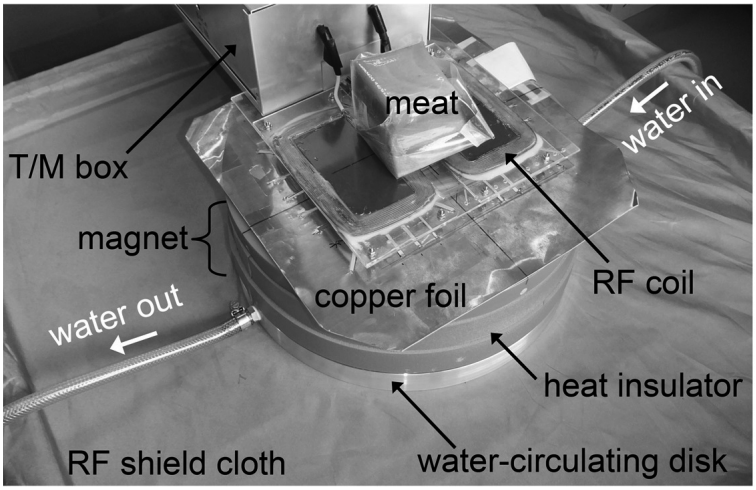


Fig. 1. Sensor unit (single-sided magnet and plane RF coil) of the prototype of the tuna scanner [1]. A meat block of bluefin tuna is placed on the coil. The sensed region is located at approximately 3 cm above the coil.

実験

直径30cmの片側開放型磁石を用いた計測システムのセンサーユニットを図１にしめす。基本構成は、発表済み[2-3]と同じであるが、静磁場の温度ドリフトを防ぐために、

fat, single-sided magnet, tuna, T2 relaxometry

○なかしまよしと

今回あらたに保温用循環水ユニットを追加して、希土類永久磁石の温度変動を0.1℃以下に抑制した（ラーモア周波数の変動は500Hz以下）。平面型RFコイルの上のクロマグロのブロック肉（皮あり、皮なし）に対して、CPMGパルスシーケンスでプロトン横緩和波形を計測した。エコー間隔は0.5ms、RFパルス幅は0.2ms、信号積算回数は32回、シーケンスの繰り返し間隔は2.2秒であった。NMR計測後、感度領域の部位の肉を切り取って、ソックスレー抽出法で脂質の定量を実施して、NMRによる結果と比較した。

以下のような横緩和データ解析を行って脂質定量を行った。生のCPMG波形には、脂質由来と筋肉中の水由来の二種類のプロトン信号が混在しているので、両者を区別する必要がある。幸いにも、試料温度や感度領域の定常磁場勾配やエコー間隔等を注意して選べば、両者の実効的なT2値を約3倍も異なるようにできた。これを利用して、大トロのCPMG波形を両者の機械的混合物として近似してfittingすることで、その混合比（すなわち脂肪交雑比）を求めることができた。

結果と考察

クロマグロの34個のブロック肉試料について計測した結果、ソックスレー抽出法との誤差（根平均自乗残渣）は±3.7wt%に抑えることができた。これは、他の手法による脂質の計測精度とくらべて遜色ない。また、他の計測手法と違って、皮・鱗の有無に計測精度が左右されないことも確認できた。さらに、NMRは感度領域がコンパクトなので、計測部位の概念が明確である。このように、マグロの肉質スキャナーとしての片側開放型NMRの可能性を示すことができた。ただ、図１の磁石は約50kgもあり、魚市場で手軽に操作するのは難しい。そこで、より小型な磁気回路をデザインして、図2のように魚体丸ごとスキャンして、脂質の全身マッピングを行う研究を実施中である。

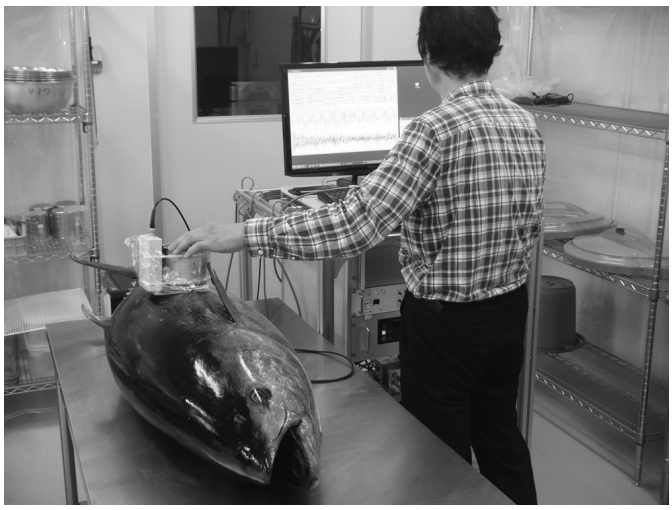


Fig. 2. Preliminary NMR scanning of a whole tuna (project in progress).

References:

[1] Nakashima, Y. (2019) Non-destructive quantification of lipid and water in fresh tuna meat by a single-sided Nuclear Magnetic Resonance scanner. Journal of Aquatic Food Product Technology. 28:241-252.
https://doi.org/10.1080/10498850.2019.1569742 (Open Access)

[2] 中島善人 (2015) 牛の霜降り状態がNMRでわかる！？ 月刊化学 70:25-28.
https://staff.aist.go.jp/nakashima.yoshito/bin/kagaku2015.pdf

[3] Nakashima, Y. (2015) Development of a Single-Sided Nuclear Magnetic Resonance Scanner for the In Vivo Quantification of Live Cattle Marbling. Applied Magnetic Resonance, 46, 593-606. http://dx.doi.org/10.1007/s00723-015-0657-4 (Open Access)

P95

磁気共鳴法によるゴムの架橋評価

○原　英之
ブルカージャパン株式会社バイオスピン事業部

Evaluation of cross-linking of rubbers by magnetic resonance

○Hideyuki HARA
BioSpin Division, Bruker Japan K.K.

TD-NMR (time domain nuclear magnetic resonator) is the analytical method which estimates the motility from relaxation time of the proton. In generally low motility materials indicate short relaxation time and high motility materials indicate long relaxation time. It's possible to observe the difference in the motility by crosslinking of rubber by using this method. The ESR (electron spin resonance) method is an analytical technique for observing unpaired electrons (radicals). Many radicals are observed in the reaction system such as crosslinking reaction of rubber. By using ESR, it is possible to evaluate the crosslinking reaction process.

【序論】

TD-NMR（時間領域核磁気共鳴）はプロトンの緩和時間から運動性を評価する分析手法である。一般に運動性の低いもの（硬いもの）は緩和時間が短く観測され、運動性の高いもの（柔らかいもの）は緩和時間が長く観測される。この手法をゴムに用いることで架橋による運動性の違いを観測することが可能である。ESR(電子スピン共鳴) 法は不対電子（ラジカル）を観測する分析手法である。ラジカルは反応系において多く観測され、ゴムの架橋の際にもラジカル反応が寄与している。ESR を用いることで、どのように架橋反応が進んでいるかを評価することが可能である。

【装置および測定法】

TDNMR 測定は minispec mq20（Bruker BioSpin）を用いた。測定は 60 度で行い、架橋による残余双極子相互作用の観測に Multi Quantum 法を用いた。パルスシーケンスを図 1 に示す。解析は緩和時間解析ソフトウェア TDNMR-A（ブルカージャパン）を用いて行った。試料は、EPDM の未架橋および 4 種類の架橋密度の異なる試料を用意した。Multi Quantum 法は式(1) にフィッティングすることで残余双極子相互作用(D)を求めた。

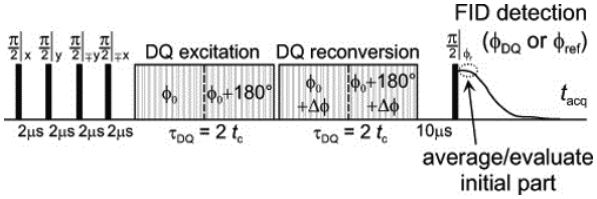


Fig.1 Pulse sequence of MQ

TD-NMR, ESR, **架橋**

○はら　ひでゆき

$$I_{nDQ}(\tau_{DQ}, \overline{D}_G, \sigma_G) = \frac{1}{2}\left(1 - \frac{\exp\left\{-\frac{\frac{2}{5}\overline{D}_G^2\tau_{DQ}^2}{1+\frac{4}{5}\sigma_G^2\tau_{DQ}^2}\right\}}{\sqrt{1+\frac{4}{5}\sigma_G^2\tau_{DQ}^2}}\right)$$

Eq.1 Gaussian distributed fitting function)

ESR 測定は E500（Bruker BioSpin）を用いた。測定は 100 度から 190 度まで昇温させて行い、その間にみられるラジカルを観測した。ラジカルの同定は spinfit シミュレーションソフトを用いた。試料は EPDM(ENB)，EPDM(ENB)+DCP, EPDM(ENB)+DCPD+DCP の 3 種類を用意した。

【結果および考察】

架橋による硬化はネットワークの形成による運動性の低下によるものと考えられるため、TDNMR を用いてネットワーク形成による残余双極子相互作用を直接モニターできる Multi Quantum 法を用いて評価も行った。Multi Quantum 法ではすべての相互作用を含んだ信号(Iref)と Double Quantum 相互作用を含んだ信号(IDQ)を観測することで残余双極子相互作用の成分を取り出すことができる。図 2 に架橋密度と残余双極子相互作用の大きさの関係を示す。架橋密度が高いほど残余双極子相互作用が大きいことが角確認できた。

また、図 3 に EPDM(ENB)(左),EPDM(ENB)+DCP(中)，EPDM(ENB)+DCPD+DCP（右）を 100℃から 190℃まで昇温させたときに観測される ESR 信号を示す．緑で囲んだ信号はすべての試料で観測されており，これは試料に含まれる酸化防止剤由来の信号と思われる．青で囲んだ信号は架橋反応による信号を示す.

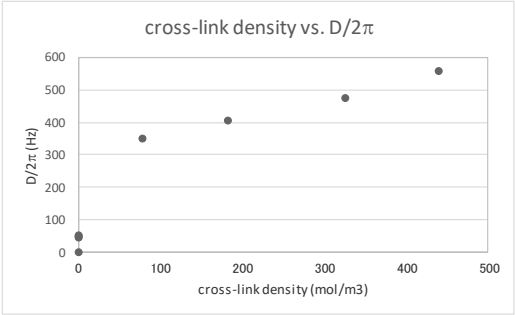


Fig.2 Relation between crosslink density and RDC

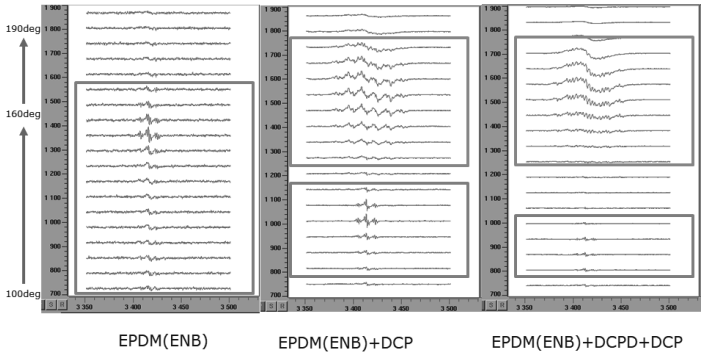


Fig.3 ESR signal vs. temperature for EPDM(left), EPDM+DCP(center) and EPDM+DCPD+DCP(right)

P96

パラ水素誘起偏極法によるINEPT型^{13}C NMR計測手法の開発

○友広 潤志[1], StwwartJ Neil[1], 平田 拓[1], 松元 慎吾[1]
1 北海道大学大学院 情報科学研究科 生命人間情報科学専攻

Measurement of hyperpolarized ^{13}C NMR using INEPT-type PHIP technique

○Mitsushi Tomohiro [1], Stewart J. Neil [1], Hiroshi Hirata [1], Shingo Matsumoto [1],
1 Graduate School of Information Science and Technology, Hokkaido University

Hyperpolarized ^{13}C MRI is a promising tool for imaging metabolic processes *in vivo* where ^{13}C NMR signal can be enhanced 10^4~10^5 times compared to thermal equilibrium level. In this study, parahydrogen induced polarization (PHIP) method and an INEPT-based polarization transfer pulse sequence was applied to amplify the ^{13}C NMR signal. [1-^{13}C, 1,2-D_2] fumarate was hydrogenated by vigorous bubbling with 7-9 bar parahydrogen gas (> 90% purity), generating ^{1}H hyperpolarized [1-^{13}C, 1,2-D_2] succinate, a key intermediate metabolite in TCA cycle. Spin order of two hyperpolarized ^{1}H was transferred to labeled ^{13}C nuclei by several different INEPT based pulse sequences using 1.5T MRI system. The ^{1}H to ^{13}C polarization transfer was confirmed by measuring the signal intensity changes of ^{1}H and ^{13}C NMR signal.

【研究背景と目的】核磁気共鳴画像（MRI）は通常^{1}H核を観測対象とし、非侵襲的に生体の解剖画像を取得する。対して^{13}C核を観測対象とし、その低いMR感度を超偏極技術により数万倍に増幅する超偏極^{13}C MRIでは、代謝反応のリアルタイムイメージングが可能である。特定の炭素核を安定同位体^{13}Cで標識したピルビン酸やコハク酸などの生体低分子を代謝プローブとして用いることで、腫瘍における解糖系の亢進に伴うピルビン酸から乳酸への代謝フラックスの増加といった、疾患に特有の代謝変化の可視化に利用されている。しかし、臨床試験も始まっている超偏極法である動的核偏極（DNP）は、初期投資やランニングコストが数億円と高価で、励起に数時間を要し、絶対零度付近の極低温環境が必要となるなど、実際の医療現場への普及の妨げとなる要因が多い。一方で臨床応用に向けた技術的課題の多さから普及が進んでいないが、安価かつ短時間・常温での核励起が可能な超偏極法としてパラ水素誘起偏極（Para-Hydrogen Induced Polarization: PHIP）法がある。パラ水素誘起偏極では水素の核スピン異性体であるパラ水素を代謝プローブの不飽和前駆体に付加し、続いてパラ水素由来の^{1}H核の持つ高い分極を^{13}C核に転移させる。分極転移の手段は複数存在するが、中でもINEPT（Insensitive Nuclei Enhanced by Polarization Transfer）に基づくRFパルスシーケンスの照射は、[1-^{13}C,2,3-D_2]コハク酸のような^{13}C核と付加した水素原子の距離が近い代謝プローブの分極転移に有用である。本研究ではパラ水素誘起偏極法を採用した超偏極^{13}C NMRの取得方法を検討した。パラ水素の付加反応とINEPTに基づくRFパルスシーケンス照射による分極転移における諸条件の最適化を行い、^{13}C NMRの信号を通常の熱平衡時と比較することで^{13}C核励起を確認した。

13C NMR、超偏極、INEPT

○ともひろみつし、スチュアートニール、ひらたひろし、まつもとしんご

【実験】代謝プローブの不飽和前駆体として[1-^{13}C, 2, 3-D_2]フマル酸を用意した。溶媒にMethanol-d4、水素化触媒としてRh[(nbd)(dcpe)]BF_4[1]を用い、反応温度70℃、反応時間10秒で水素付加させた。水素付加後の代謝プローブは速やかに1.5 T MRIマグネットに移動し、分極転移RFパルスシーケンス（LPH-INEPT+とGoldmanの2種類）を照射した後、直ちに^{13}C NMR（※）を取得し^{1}H→^{13}C分極転移の有無を確認した。

※ フリップ角 67°
シングルスキャン
^{1}H デカップリング無し

【結果】2種類の分極転移シーケンスいずれに対しても、^{1}H→^{13}C分極転移が起こったことが、^{13}C NMR信号増強によって確認された（Fig. 1）。^{13}C分極率はそれぞれ0.174%（LPH-INEPT+）、0.244%（Goldman sequence）と算出され、これは先行研究[2], [3]に比べて低い値となった。

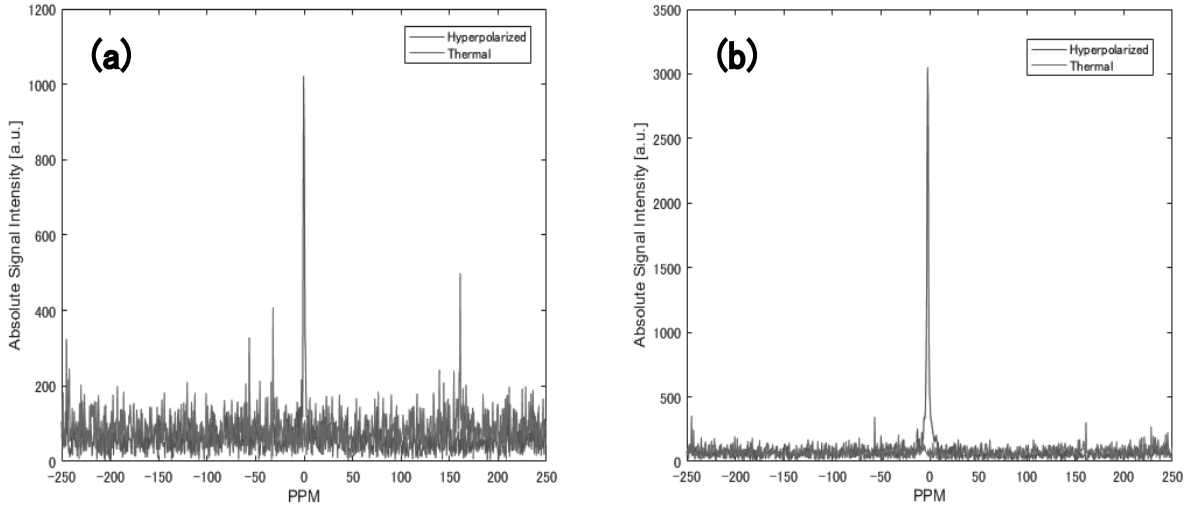


Fig. 1 Hyperpolarized ^{13}C NMR spectrum (blue) and thermal spectrum (red) were acquired at 1.5 T. Two polrarization transfer sequences (LPH-INEPT+ (a) and Goldman sequence (b)) were implemented. Both enhanced spectra indicate that polarization transfer was occurred due to the irradiation of the INEPT-based RF pulse sequences.

信号増強は分極率に比例し、最終的な^{13}C NMRの信号増強に寄与する要因としては、付加させるパラ水素の純度、水素付加反応率と最終的な代謝プローブ濃度、フリップ角や周波数オンレゾナンスといった分極転移シーケンスの精度が考えられる。今後はこれらの要因を最適化し、より高い分極率の^{13}C代謝プローブの作成と、それを用いた*in vivo*イメージングへの応用を考えている。

References

[1] M. Itoda, Y. Naganawa, M. Ito, H. Nonaka, and S. Sando, “Structural exploration of rhodium catalysts and their kinetic studies for efficient parahydrogen-induced polarization by side arm hydrogenation,” *RSC Adv.*, 2019.

[2] A. B. Schmidt *et al.*, “Liquid-state carbon-13 hyperpolarization generated in an MRI system for fast imaging,” *Nat. Commun.*, vol. 8, 2017.

[3] S. Berner *et al.*, “SAMBADENA Hyperpolarization of ^{13} C-Succinate in an MRI: Singlet-Triplet Mixing Causes Polarization Loss,” *ChemistryOpen*, p. open.201900139, 2019.

キーワード検索
著者検索

Keyword Index
Author Index

キーワード索引

数字

^{109}Ag …… P76
^{129}Xe …… L3-1
^{13}C …… YP24
^{13}C CP/MAS …… P78
^{13}C MRI …… P83, P92
^{13}C NMR …… P96
^{13}C-detection …… YP6
^{13}C直接観測 …… P3
^{14}Nデカップリング …… P4
^{19}F …… P2
^{19}F-NMR …… YP10
19Fスクリーニング …… P17
^{1}H NMR …… YP8, P77
^{1}H-^{14}N distance measurement …… P50
^{29}Si …… P75
^{2}H-NMR …… P73
^{31}P-NMR …… P42
3次元プロセスツール …… YP22
77セレニウム …… L1-9

アルファベット

A

adiabatic pulse …… P51
Agマジックサイズクラスター …… P76
Alite …… P75
amyloid-beta …… L3-6
antimicrobial peptides …… YP1
aquaculture …… P38
ATP …… P34
ATP合成酵素 …… P57
automation …… P91
Aβ fibrils …… YP17
Aβ(1-42)線維 …… P58

B

BioMagResBank …… HL-2
biomembrane systems …… HL-2
BOLD …… P86

C

calmodulin …… YP1
Cell-Free Expression …… IL-1
CIDNP …… S2-1
CLEANEX-PM …… P13
ClpX …… YP4
CO2ハイドレート …… P68
cold regulation …… P32
CPMG …… P7
Cross Polarization …… YP14
cross-seeding …… L3-6
Cryo-EM …… IL-2
C-S-H …… P75
CSI …… P39
cyanobcaterium …… P32

D

DFT calculation …… P88
DNA …… L1-10
DNP-NMR …… YP18
DNP効率 …… P90
D-RINEPT …… YP11
Dynamic Nuclear Polarization …… S2-3, P90

E

EGCG …… P58
Electro-Mechano-Optical (EMO) NMR …… L1-5, YP21
electron diffraction …… L3-11
ENDOR. HYSOCORE …… S3-1
EPR Spectroscopy …… S2-2
ESR …… P95

F

fast MAS …… YP14
fat …… P94
FFATモチーフ …… YP5
Field-swept NICP …… YP13
finite automaton theory …… P91
FKBP12 …… YP2
Fragment Based Drug Discovery (FBDD) …… YP10

G

GaN結晶 …… L1-4
GTPase …… HL-1

H

H/D Exchange …… P13, P56
H2A-H2B …… P22
HALA効果 …… P45
High pressure …… P13
HOESY …… P1, P4
HR-MAS …… YP22
Hyperpolarization …… S2-3, P61

I

in situ固体NMR …… P48
in-cell NMR …… S3-2, P61, P87
INEPT …… P96

K

kidney …… P85
Kinases …… IL-1

L

Li …… P84

M

Magnetic field effect …… S2-1
microED …… L3-11
MOF …… YP20
Molecular Chaperone …… YP4

molecular mobility …… P38, P38
Monte Carlo tree search …… P88
MQMAS …… P47
MRI …… YP21, P84, P85
Multi-state conformations …… S3-2

N

NAP1 …… P22
NF-κB …… YP3
NMR …… IL-2, HL-1
NMR crystallography …… L3-11
NOESY …… P1
non-coding RNA …… YP7
Nuclear Integrated Cross Polarization (NICP) …… YP13

O

oncoprotein …… HL-1
OspA …… P11

P

paramagnetic effects …… S3-2
paramagnetic relaxation enhancement …… HL-1
PCS …… P16
PELDOR …… S3-1
Pentacene …… S2-2
phase separation …… YP6
Phase-modulated pulse and RESPDOR …… P50
PHIP …… YP24
PHIP-SAH …… P92
Photosystem II …… S3-1
Photozipper …… S3-1
PRE …… P16
Protein …… S2-1
protein droplet …… YP6
Protein Dynamics …… L3-7
protein structure determination …… S3-2
proteins …… HL-1

Q

qNMR …… P8
Quadrupolar nuclei …… L3-10

R

Radical Triplet Pair Mechanism …… S2-3
RAS …… HL-1
Ras …… P31
RF inhomogeneity …… P51
Rheo-NMR …… P5
RNA …… YP7
RNA binding protein …… P32

S

SAIL法 …… L3-8
secondary structure …… YP7
Selective Isotope Labeling …… IL-1
Selective-HR-COSY …… P6
signal assignments of proteins …… P56
Simultaneous adiabatic sweep CP …… YP13
single-sided magnet …… P94
Singlet Fisson …… S2-2
sodium …… P85
Solid NMR …… P61
solid-state NMR …… HL-2, P56, P91
solvent suppression …… P51
SSNMR …… L3-6, YP17
stable isotopic label …… YP1
STD-NMR …… P40
STMAS …… P47
Structure calculation …… IL-2
SWIFT …… YP21

T

T2 relaxometry …… P94
TD-NMR …… P95
trigger factor …… YP4

U

Ultra-fast MAS …… YP17, P50

V

VAP …… YP5
vibrational spectroscopy …… HL-2

W

Wasserstein distance …… P88

五十音順

あ

圧縮センシング …… YP23
圧力 …… P11
アプタマー …… P10
アミロイドβ …… L3-4
アミドプロトン交換 …… P21
アミノ酸選択的安定同位体標識法 …… L3-9
アミロイド …… P34
アミロイド-β …… P40
アミロイド線維 …… L3-5
アルツハイマー病 …… P40, P58
α2A-アドレナリン受容体 …… P28
アロステリック制御 …… P14
安定同位体標識 …… P19

い

イオン伝導体 …… P67
異方性相互作用 …… YP12
医薬品 …… YP19
インフルエンザ …… P33

え

永久電流 …… L3-12

お

遅い化学交換 …… YP15
温度安定性 …… YP9

か

界面活性剤 …… P27
化学交換飽和移動 …… P82
化学シフト …… P43
化学シフト計算 …… P80
化学修飾 …… P10
架橋 …… P95
核酸医薬 …… P10
核酸 …… P87
核酸触媒 …… L1-11
過充電 …… P79
ガス吸蔵 …… P63
ガスハイドレート …… P63
活性炭素繊維 …… P73
過渡的構造形成 …… P18
ガラス …… P70
頑強で持続可能な装置 …… L3-1
ガングリオシド …… L3-4
感度向上 …… P3
緩和 …… YP19
緩和時間測定 …… L3-2, P71
緩和分散法 …… P7

き

機械学習予測 …… P35
気体のNMR …… L3-2
キナーゼ …… P14
機能的MRI …… P86
吸着・界面現象 …… P35
共代謝 …… P37
極低温 …… YP25
キレート錯体 …… P45
金属イオン …… L1-11

く

区分標識法 …… L3-7
クモ牽引糸 …… P66
クリック反応 …… P9
クロスシーディング …… P60

け

計算 …… P89
結晶形 …… YP19
結晶多型 …… P78
欠陥構造 …… P80

こ

高温超電導 …… L3-12
高温超伝導バルク体 …… P93
抗菌ペプチド …… P20
高磁場条件 …… S1-1
構造解析 …… P25
構造多形性 …… P31
構造転移 …… P64
構造分布 …… L1-1
構造平衡 …… L1-3, P14
抗体 …… P19
高度不飽和脂肪酸 …… P54
高分子材料 …… YP18
高分子物性 …… P72
高分子膜 …… P35
高分子量蛋白質 …… L3-8
黒鉛層間化合物 …… P81
固体^{129}Xe-NMR …… P63
固体^{13}C-NMR …… P68
固体DNP-NMR …… YP11
固体NMR …… L1-6, L3-4, YP14, YP15, YP16, P49, P52, P55, P57, P59, P62, P64, P65, P66, P72, P74
固体NMRプローブ開発 …… YP12
ゴム材料 …… L3-2

さ

細胞内混雑環境 …… YP2
細胞分裂期 …… P15
酸化チタン …… P46
三次元磁場配向 …… YP12, P48
三重項電子 …… YP20
酸水素化物 …… P77
残余双極子相互作用 …… L3-3

し

時間分解ESR …… S1-4
磁気緩和時間 …… P65
磁気共鳴イメージング …… P82
シグナル強度 …… P21
シグナル分離 …… L3-9
シクロデキストリン …… P41
自己組織化 …… P55
ジシラン化合物 …… P78
自発分極 …… L1-4
磁場配向NMR …… L3-3
シミュレーション …… P90
重原子 …… P43
重原子効果 …… P45
重水素化 …… P41
重要因子探索 …… P37
手法開発 …… L1-7
常磁性 …… P67, P74
常磁性NMR …… P23
常磁性緩和干渉 …… P18
常磁性ランタノイドイオン …… L1-1
シングレット状態 …… L1-8
深層学習 …… P83

す

水素結合 …… L1-2, P26
水素結合経由のJカップリングの観測 …… P24
水素―重水素交換 …… P46

水和脂質二重膜 …… P54
スピノフィリン …… P28
スピン結合 …… L1-2
スピンコントラスト法 …… S1-2
スピン偏極 …… YP20

せ

石炭 …… P71
セルロース …… P65
セレノメチオニン …… L1-9
全固体電池 …… P84
選択的重水素標識 …… P59
剪断流 …… P5

そ

相対論的効果 …… P43
創薬 …… P33
組織内拡散 …… YP22
組織内緩和 …… P39

た

代謝イメージング …… S1-3
代謝プロファイリング …… P36
耐性菌 …… P30
タイソナイト型フッ化物 …… P67
ダイヤモンドNV中心 …… L1-7
卓上型NMR …… P93
多次元測定 …… P52
脱ユビキチン化酵素 …… P23
多変量解析 …… P71
タンパク質 …… L1-9, P2, P5, P52
蛋白質 …… YP5
タンパク質間相互作用 …… YP3
タンパク質 - タンパク質相互作用 …… L1-3
蛋白質動態 …… L3-8, P12
タンパク質の立体構造解析 …… P23
蛋白質立体構造解析 …… P16

ち

中間水 …… P62
中性子散乱 …… S1-2
超高圧NMR …… P77
超電導接続 …… L3-12
超偏極 …… L3-1, YP24
光センサータンパク質 …… P25
超偏極 …… P83, P92, P96
超偏極 ^{13}C MRI …… S1-3, YP23
直鎖型ユビキチン鎖 …… YP3
直接観察 …… L1-4

て

定量NMR …… YP9, P8
データサイエンス …… P36
デオキシリボザイム …… L1-10
電解液 …… P44
電気-機械-光結合 …… L1-5
テンソル分解 …… YP23
電池 …… P74
天然変性タンパク質 …… P18
天然変性蛋白質 …… P21

と

糖脂質 …… P41
動的核分極（DNP） …… P49
動的核分極（DNP）法 …… S1-1
動的核偏極 …… S1-3, S1-4, YP25
動的構造解析 …… P15
動物細胞発現系 …… P19
ドラッガビリティ …… L1-3
トリプレットDNP …… L1-8

な

ナノディスク …… P42

に

匂い刺激 …… P86
肉質 …… P39
二次モーメント解析 …… P81
二量体 …… P30

ね

粘土鉱物 …… P89

は

配位高分子 …… P69
配向剤 …… L3-3
パルス不完全性 …… P7
バンコマイシン …… P30
半整数四極子核 …… YP11, P47

ひ

光活性制御 …… P20
光構造操作 …… P20
光受容膜タンパク質 …… P53
光照射固体NMR …… P53
光反応サイクル …… P53
光分解反応 …… P46
光変換 …… L1-5
光励起三重項電子 …… S1-4
微結晶懸濁体 …… P48
非侵襲サンプリング …… P36
ヒストンシャペロン …… P22
ビッグデータ解析 …… P37
ヒト糞便 …… YP8
表面・界面 …… L1-6
ピログルタミン酸 …… YP9
広幅CP/MAS …… P76

ふ

複合材料の構造解析 …… S1-2
符号化標識法 …… L3-9
プリオン …… P29
プリオン病 …… P33
プロテインライゲーション …… L3-7
フロリゲン …… P17
分解能 …… P59
分子運動 …… P81
分子クラウディング …… P12
分子クラウディング環境 …… P31
分子性ナノ多孔質結晶 …… P68

へ

β-(1→3, 1→6)-グルカン …… P64
β2-microglobulin …… L3-5
ベータアミロイド …… P60
ヘテロクロマチン …… P15
ペプチド …… P55
ヘム …… L1-10
ヘリウム温度 …… S1-1
ヘリウムフリー …… P93
ヘリオロドプシン …… YP16
偏極率 …… P49
変性中間体 …… P11

ほ

膨潤度 …… YP18
ポーラスカーボン …… P80
ホスホリルセリンポリマー …… P82
ポリビニルピロリドン …… P62
ポリユビキチン鎖 …… P9

ま

膜タンパク質 …… YP15, YP16, P27
膜たんぱく質 …… P57
マジック角試料回転(MAS) …… S1-1
マジックサイズクラスター …… L1-6
マテリアルズインフォマティクス …… P72
マルチドメインタンパク質 …… L1-1
マルチレシーバー …… P1

め

メタボローム …… YP8

や

薬剤ータンパク質間相互作用 …… YP2

よ

溶液NMR …… S1-4, L1-7, P9, P12, P25, P26
溶液NMR法 …… P27
溶解 …… P70
溶解DNP …… L1-8, YP25
四重鎖核酸 …… P29
四重鎖構造 …… P87

り

リガンド …… P2
リコンビナントクモ糸 …… P66
リチウムイオン電池 …… P79
リチウム塩 …… P44
リチウムデンドライト …… P79
立体構造 …… L1-11, P29
立体構造解析 …… L3-5

著者検索
アルファベット

A

Abe, Yunosuke …… P66
Abe-Yoshizumi, Rei …… YP16
Aihara, Yuichi …… P84
Aimi, Sohei …… P46
Aizawa, Tomoyasu …… YP1, YP8, P40
Aizu, Takahiro …… P25
Akutsu, Hideo …… HL-2, P57
Amano, Hiroshi …… L1-4
Amoureux, Jean-Paul …… YP11, P47
Anzawa, Suai …… P17
Aoki, Daisuke …… YP6
Aoki, Yasuhito …… P44
Aoyama, Takuya …… P77
Aoyama, Yasuhiro …… P82
Asada, Mizue …… L1-1
Asakura, Taiga …… P35, P37, P38, P39
Asakura, Tetsuo …… P66
Asakura, Yoshimitsu …… P45
Ayabe, Tokiyoshi …… YP8

B

Bao, Kefei …… YP8
Batsaikhan, Mijiddorj …… P55
Beyer, Hannes M. …… L3-7
Boisbouvier, Jerome …… IL-2
Bouguechtouli, Chafiaa …… IL-1

C

Cheney, Daniel …… S2-3
Chierotti, Michele R. …… P50
Chlebowicz, Julita …… P61
Colletier, Jacques-Philippe …… IL-2

D

Dale, Matthew W. …… S2-3
Demura, Makoto …… YP1, YP8
Diamond, Marc …… P61
Doi, Toru …… YP25
Donoshita, Masaki …… P81
Duong, Nghia Tuan …… P50

E

Ebina, Yasuo …… L3-3
Effantin, Gregory …… IL-2
Enozawa, Hideo …… L1-8
Estrozi, Leandro F. …… IL-2

F

Favier, Adrien …… IL-2
Frederick, Kendra …… P61
Fujiki, Satoshi …… P84
Fujimura, Teppei …… P36
Fujita, Kentaro …… P58
Fujiwara, Hideaki …… L3-1
Fujiwara, Masanori …… L1-7
Fujiwara, Saiya …… YP20
Fujiwara, Toshimichi …… S1-1, L1-9, L3-5, YP5, YP10, P3, P17, P42, P49, P56, P57, P90
Fukazawa, Jun …… P90
Fukazu, Yuta …… P89
Fukue, Yuka …… YP24
Furihata, Kazuo …… P6
Furuita, Kyoko …… YP5, P17, P3
Furukawa, Ayako …… P15
Furushima, Yoshitomo …… P62
Furutani, Kenta …… P70

G

Gauto, Diego F. …… IL-2
Ghosh, Rupam …… P61
Ghouil, Rania …… IL-1
Gobetto, Roberto …… P50
Goldbourt, Amir …… P50
Goto, Yuji …… L3-5
Gotoh, Kazuma …… P79, P81
Greimel, Peter …… P41
Gu, Hao …… YP1
Güntert, Peter …… IL-2, S3-2

H

Hachitani, Kenichi …… L3-12
Haishi, Tomoyuki …… P84, P85
Hamada, Mamoru …… L3-12
Hanashima, Shinya …… P54
Hanzawa, Hiroyuki …… L1-3
Hara, Hideyuki …… P95
Harada, Kenichi …… L1-9
Hashi, Kenjiro …… P79
Hashimoto, Itsuki …… P81
Hasumi, Keiko …… P4
Hata, Yuki …… P71
Hattori, Mineyuki …… P78
Hattori, Yoshikazu …… P3
Hayashi, Fuyu …… P86
Hayashi, Hidenri …… P32
Hayashi, Shigenobu …… P78
Hayashi, Tomohiko …… P29
Hayashi, Yoshihiro …… YP19
Hibe, Yuta …… YP13
Hikone, Yuya …… P16
Hirabayashi, Katsuki …… P64
Hirakawa, Takuya …… YP2
Hiramatsu, Soya …… L1-1
Hirao, Yuuka …… P2
Hiraoka, Marina …… L1-9, YP5

Hirata, Hiroshi ····· YP23, YP24, P92, P96
Hirohata, Masafumi ····· P27
Hirose, Yuu ····· P25
Hirota, Toru ····· P15
Hosoda, Kazuo ····· P28

I

Ichijo, Naoki ····· L1-8
Ideta, Keiko ····· P73
Igarashi, Takako ····· P65
Ikeda, Shiro ····· L3-9
Ikegami, Takahisa ····· P3, P7, P30, P57
Ikeya, Teppei ····· S3-2, P12, P16, P23, P31
Ikura, Mitsuhiko ····· HL-1
Imai, Hirohiko ····· L3-1, P82
Imaizumi, Taku ····· P63, P68
Imamaeda, Tarou ····· P40
Inomata, Rika ····· L1-11
Inoue, Keiichi ····· YP15, YP16
Inoue, Natsuki ····· P93
Inukai, Munehiro ····· P69
Ishida, Hiroaki ····· YP1
Ishida, Hiroyuki ····· P62, P79, P81
Ishida, Yasuhiro ····· L3-3
Ishiguro, Takaya ····· P58, P60
Ishii, Naoki ····· YP3
Ishii, Yoshitaka ····· L3-6, L3-12, YP14, YP17, P20, P51, P52, P58, P59, P60, P80
Ishimori, Koichiro ····· L1-1, YP4
Ito, Kengo ····· YP22, P38, P39, P72, P88
Ito, Yukishige ····· P41
Ito, Yutaka ····· S3-2, L1-2, P9, P16, P23, P24, P25, P26, P31
Itou, Yutaka ····· P12
Iwai, Hideo ····· L3-7
Iwakawa, Naoto ····· YP2, YP3

J

J Stewart, Neil ····· P92
J Stewart, Niel ····· YP24
Jimura, Keiko ····· P78

K

Kadoma, Hiroshi ····· YP12, P48
Kagawa, Akinori ····· L1-8, YP25
Kainosho, Masatsune ····· ML-1, L3-8
Kamatari, O. Yuji ····· P29, P33
Kamebuchi, Hajime ····· P63, P68
Kamei, Shun ····· P31
Kamihara, Takayuki ····· P52
Kanaba, Teppei ····· P1
Kanaori, Kenji ····· P46
Kandori, Hideki ····· YP15, YP16
Kanehashi, Koji ····· P71
Kaneko, Rina ····· YP15, YP16
Kang, Su-Jin ····· P57
Kasai, Takuma ····· L3-9
Kase, Yuki ····· P92
Kaseda, Ryohei ····· P85
Kashihara, Kousuke ····· P80
Katahira, Masato ····· P29, P87
Kato, Koichi ····· ML-3, L3-4, P19
Kawaguchi, Ken ····· P8
Kawai, Gota ····· YP7
Kawamoto, Akihiro ····· L3-5
Kawamura, Izuru ····· YP15, YP16, P53, P55
Kawasaki, Ryosuke ····· P18
Kawawaki, Tokuhisa ····· P76
Kay, Christopher W. M. ····· S2-2
Kayano, Yohei ····· P55
Kerfah, Rime ····· IL-2
Kigawa, Takanori ····· L3-9, P16, P23
Kikuchi, Jun ····· YP22, P35, P36, P37, P38, P39, P72, P88
Kikukawa, Takashi ····· YP1, YP8
Kimizuka, Nobuo ····· YP20
Kimura, Atsuomi ····· L3-1
Kimura, Hideaki ····· YP6
Kimura, Kazuo ····· P44
Kimura, Tsunehisa ····· YP12, P48
Kimura, Yu ····· P82
Kinoshita, Masahiro ····· P29
Kinoshita, Seiji ····· P76
Kitada, Naoya ····· YP8
Kitagawa, Hiroshi ····· P81
Kitagawa, Masahiro ····· YP25, L1-8
Kitaguchi, Hitoshi ····· L3-12
Kitahara, Ryo ····· P11, P13
Kitazawa, Soichiro ····· P11, P13
Kiyosawa, Hidenori ····· YP7
Kobayashi, Hinano ····· YP7
Kobayashi, Naohiro ····· YP16, YP17, P91
Kobayashi, Youta ····· YP21
Kohno, Toshiyuki ····· P23, P28
Koizumi, Taiki ····· L1-2, P25, P26
Kojima, Chojiro ····· L1-9, YP5, YP10, P3, P17, P32, P42
Kojima, Keiichi ····· P27
Kokago, Aoi ····· YP10, P17
Kometani, Hina ····· P79
Kon, Yoshihiro ····· YP11
Kondo, Nobuhiro ····· P64
Kondo, Teruyuki ····· P82
Kono, Hiroyuki ····· P64
Konuma, Tsuyoshi ····· P7, P30

Kragelj, Jaka ····· P61
Krishna, Murali C. ····· S1-3
Kubo, Kenji ····· P40
Kubota, Tomomi ····· L1-11
Kumada, Shungo ····· YP19
Kumada, Takayuki ····· S1-2
Kumaki, Yasuhiro ····· YP1, YP8
Kumeta, Hiroyuki ····· P40
Kuragano, Masahiro ····· P40
Kurashige, Wataru ····· P76
Kurihara, Takuya ····· L1-6, P69
Kurita, Junichi ····· P2
Kurita, Jun-Ichi ····· P7, P15, P22
Kurokawa, Yuka ····· P28
Kushimoto, Maki ····· L1-4
Kusumi, Ryosuke ····· YP12, P48
Kuwahara, Daisuke ····· P43, P45
Kuwata, Kazuo ····· P29
Kuzunuki, Erina ····· P28

L

Lafon, Olivier ····· YP11
Lee, Joon-Hwa ····· P29

M

Macek, Pavel ····· IL-2
Maeda, Hideaki ····· L3-12
Maeda, Hiroaki ····· P78
Maeda, Kiminori ····· S2-1
Makino, Yoshiteru ····· P53
Makrinich, Maria ····· P50
Manabe, Shino ····· P41
Markley, John L. ····· ML-2
Mas, Guillaume ····· IL-2
Masaki, Yu ····· YP6
Mashima, Tsukasa ····· P29
Matano, Akihiro ····· P77
Matsuda, Hironori ····· P66
Matsuda, Isamu ····· L3-6, YP14, P58, P59, P60
Matsuda, Keiko ····· P44, P62
Matsukawa, Takaaki ····· L1-5
Matsuki, Yoh ····· S1-1, L3-5, P49, P90
Matsumoto, Shingo ····· S1-3, YP23, YP24, P83, P92, P96
Matsumoto, Tomoko ····· P35
Matsumura, Yuki ····· P8
Matsunaga, Tatsuya ····· YP14, P51, P52
McElheny, Dan ····· L3-6
Mikawa, Tsutomu ····· P23
Mikula, Kornelia M. ····· L3-7
Mineshige, Atsushi ····· P67
Mino, Hiroyuki ····· S3-1
Mishima, Masaki ····· L1-2, P9, P12, P16, P23, P24, P25, P26
Miyachi, Mariko ····· P78
Miyagishi, Makoto ····· L1-11
Miyake, Yusuke ····· P46
Miyanishi, Koichiro ····· L1-8
Miyanoiri, Yohei ····· L3-8
Miyanoiri, Youhei ····· P19
Miyawaki, Jin ····· P73
Miyazaki, Yuki ····· P59
Miyoshi, Yasuyuki ····· L3-12
Mizukoshi, Yumiko ····· L1-3
Mizuno, Motohiro ····· P81
Mizuochi, Norikazu ····· L1-7
Momotake, Atsuya ····· L1-10
Mori, Yusuke ····· L1-4
Morimoto, Daichi ····· YP2, YP3, P34
Morishita, Hiroki ····· L1-7
Morita, Hayato ····· P32
Morita, Koki ····· L1-7
Morita, Yasushi ····· L1-8
Moriwaki, Yoshihito ····· P22
Motoyama, Makoto ····· L1-8
Murakami, Miwa ····· P67
Murakami, Tomohiro ····· P82
Murata, Izumi ····· P37
Murata, Michio ····· P54
Murata, Takeshi ····· P27
Murata, Tsuyoshi ····· L1-8
Muro, Kazuki ····· P76

N

Nagadoi, Aritaka ····· P7, P30
Nagaishi, Tatsuoki ····· L3-12
Nagashima, Hiroki ····· YP11
Nagashima, Toshio ····· YP15, YP16, P20, P91
Nagata, Takashi ····· P29, P87
Nagatani, Hayato ····· YP6
Naito, Akira ····· P53, P55, P66
Nakabayashi, Koji ····· P73
Nakada, Masaru ····· P62
Nakagawa, Naoya ····· P43, P45
Nakajima, Hiroki ····· L1-2, P26
Nakajima, Yumiko ····· YP18
Nakajima, Yusuke ····· L1-10
Nakamura, Kiminori ····· YP8
Nakamura, Koichi ····· P65, P69
Nakamura, Koshi ····· YP8
Nakamura, Misaki ····· P42
Nakamura, Takashi ····· P93
Nakamura, Toshikazu ····· L1-1
Nakamura, Yushi ····· L1-8

Nakano, Hiroto ····· P40
Nakano, Takayuki ····· P8
Nakashima, Yoshito ····· P94
Nakatani, Yukito ····· P45
Nakayama, Rentaro ····· P63, P68
Narita, Ichiei ····· P85
Negishi, Yuichi ····· P76
Negoro, Makoto ····· L1-8, YP25
Neya, Saburo ····· L1-10
Ng, Wern ····· L1-5
Nishida, Masayuki ····· P30
Nishihara, Hiroshi ····· P78
Nishimura, Chiaki ····· P21
Nishimura, Katsuyuki ····· L3-4
Nishimura, Yoshifumi ····· P2, P15, P22
Nishio, Masaki ····· P78
Nishiyama, Yusuke ····· L3-11, P50
Nishizawa, Mayu ····· P34
Noda, Yasuto ····· L1-6, P69, P76, P77

O

Ogata, Makoto ····· P64
Ogawa, Atsuko ····· YP18
Ogura, Tatsuki ····· YP9
Ohki, Izuru ····· L1-7
Ohki, Kotaro ····· L3-12
Ohkubo, Takahiro ····· P70, P89
Ohnishi, Yuki ····· YP8
Ohtomo, Hideaki ····· P22
Oka, Tetsuo ····· P93
Okabe, Ryotaro ····· P51
Okada, Kotaro ····· YP19
Okada, Mayu ····· S3-2, P16, P23
Okitsu, Takashi ····· YP16
Okushita, Keiko ····· P71
Ollila, O.H. Samui ····· L3-7
Omoto, Kenichirou ····· P78
Ono, Shunsuke ····· L3-9
Onuki, Yoshinori ····· YP19
Onuma, Koki ····· YP1
Orihashi, Kana ····· YP20
Ota, Hidekazu ····· P54
Oyama, Takashi ····· P79
Ozawa, Yumi ····· P55

P

Piao, Renzhong ····· L3-12
Price, William S. ····· ML-4

R

Roche, Maxime ····· IL-1
Rossi, Federica ····· P50
Ruoff, Rodney ····· P80

S

Saio, Tomohide ····· L1-1, YP4
Saito, Genta ····· L1-1
Saito, Kazuyoshi ····· L3-12
Sakamoto, Taiichi ····· P10
Sakamoto, Tomoki ····· P87
Sakata, Kenji ····· P36, P39
Sako, Kosuke ····· P15
Sasahara, Hisamu ····· P65
Sasakawa, Hiroaki ····· P4
Sasaki, Akiko ····· P47
Sasaki, Susumu ····· L1-4, P85
Sasaki, Takayoshi ····· L3-3
Sasaki, Yoshikazu ····· P74
Sato, Hisako ····· P55
Sato, Kazuhiko ····· YP11, YP18
Sato, Naoki ····· P32
Sato, Takahiro ····· P66
Sato, Tatsuki ····· P43
Schanda, Paul ····· IL-2
Schmidt, Elena ····· IL-2
Schoehn, Guy ····· IL-2
Schwieters, Charles D. ····· IL-2
Seki, Chigusa ····· P40
Shibata, Tomokazu ····· L1-10
Shigeta, Arisu ····· YP15, P53
Shimada, Ichio ····· ML-5, L1-3, P14
Shimada, Masaki ····· P78
Shimazaki, Akiko ····· P28
Shimizu, Tadashi ····· P79
Shimobayashi, Yuki ····· P73
Shinya, Shoko ····· YP10, P17
Shiraishi, Kenji ····· L1-4
Shirakawa, Masahiro ····· L1-7, YP3, P34
Sivertsen, Astrid C. ····· IL-2
So, Masatomo ····· L3-5
Soga, Tomoyoshi ····· YP9
Song, Zihao ····· YP8
Sounier, Remy ····· IL-2
Stewart, J.Neil ····· P96
Stewart, Neil ····· YP23
Stopschinski, Barbara ····· P61
Sudo, Yuki ····· P27
Suetomi, Yu ····· L3-12
Sugahara, Jun-Ichi ····· P66
Sugai, Shuto ····· P83
Sugase, Kenji ····· YP2, YP3, P5, P34
Sugiki, Toshihiko ····· L1-9, P3, P32, P42
Sugimoto, Yoshikazu ····· P71
Sugishita, Tomoaki ····· S1-1, P49
Sumita, Masato ····· P88

Sumiyoshi, Masanori ····· P46
Suzuki, Akihiro ····· L1-10
Suzuki, Rika ····· P27
Suzuki, Shibuki ····· YP16
Suzuki, Takumi ····· P9
Suzuki, Toshiharu ····· P57
Suzuki, Yasuhito ····· L1-10
Suzuki, You ····· P63, P68
Suzumura, Takuma ····· YP7
Sychrovský, Vladimír ····· L1-9

T

Tabata, Maako ····· P16
Tabuchi, Mitsuharu ····· P74
Tachi, Yukio ····· P89
Tadokoro, Makoto ····· P63, P68
Tagishi, Ryoma ····· P12, P16
Tajima, Kunihiko ····· P46
Takada, Yumeto ····· L1-2, P9, P24
Takahashi, Hideo ····· P27
Takahashi, Masato ····· L3-2, L3-12, P93
Takahashi, Ryo ····· P52, P59
Takahashi, Takafumi ····· P71, P75
Takami, Shohei ····· P87
Takao, Tomoaki ····· L3-12
Takeda, Kazuyuki ····· L1-5, YP12, YP13, YP21, P48
Takeda, Mitsuhiro ····· L3-8, P86
Takegoshi, Kiyonori ····· L1-6, YP13, YP21, P76, P77
Takei, Koyo ····· P89
Takeuchi, Koh ····· L1-3, P14
Takishita, Shunpei ····· L1-1
Takizawa, Takeshi ····· L1-3
Tamaki, Hajime ····· L3-5, P56
Tamakoshi, Akiko ····· YP8
Tanaka, Kayoko ····· P31
Tanaka, Shinji ····· YP18
Tanaka, Takashi ····· P12
Tanaka, Toshiyuki ····· L3-9
Taoka, Kenichiro ····· P17
Tasaki, Kenta ····· P43
Tashiro, Mitsuru ····· P6
Tate, Shin-Ichi ····· YP6, P18
Tateishi, Kenichiro ····· S1-4, YP20
Tateishi, Yutaka ····· S3-2, P23
Tei, Akiyo ····· P72
Terasawa, Hiroaki ····· P86
Terauchi, Tsutomu ····· L3-8
Terawaki, Shin-Ichi ····· P28
Terayama, Kei ····· P88
Theillet, Francois-Xavier ····· IL-1
Todokoro, Yasuto ····· P57
Tokunaga, Yuji ····· L1-3, P14
Tokuraku, Kiyotaka ····· P40
Tominaga, Yusuke ····· L1-5
Tomioka, Masamitsu ····· P45
Tomita, Masasu ····· YP9
Tomohiro, Mitsushi ····· P96
Trebosc, Julien ····· YP11
Tsuboi, Yuuri ····· YP22, P72
Tsuchikawa, Hiroshi ····· P54
Tsuchiya, Chieko ····· P30
Tsuda, Koji ····· P88
Tsuji, Hiroyuki ····· P17
Tsujino, Shonosuke ····· YP23
Tsukamoto, Takashi ····· YP1, YP8
Tsunaka, Yasuo ····· P22
Tsutsumi, Yu ····· L3-2, P47

U

Uchida, Noriyuki ····· L3-3
Uchio, Yoshiki ····· YP24
Ueda, Kazuyoshi ····· P55
Uesaka, Tomohiro ····· S1-4, YP20
Umegawa, Yuichi ····· P54
Umehara, Takashi ····· YP6
Urano, Tomoko ····· P28
Utsumi, Hiroaki ····· P4
Uuno, Masaki ····· P26
Uwai, Koji ····· P40

V

Vogel, Hans J ····· YP1

W

Wada, Akimori ····· YP16
Wada, Masahisa ····· YP12, P48
Waild, A. Houry ····· YP4
Wakamatsu, Kaori ····· P28
Wakamoto, Takuro ····· P11, P13
Wakayama, Masataka ····· YP9
Walinda, Erik ····· YP3, P34
Watanabe, Hikaru ····· P40
Wedge, Christopher J. ····· S2-3
Wei, Feifei ····· P39
Wickramasinghe, Ayesha ····· YP17
Wüthrich, Kurt ····· ML-6

X

Xiao, Yiling ····· L3-6, YP17, P61

Y

Yagi, Hirokazu ····· P19
Yagi, Hiromasa ····· P16, P23
Yagi-Utsumi, Maho ····· L3-4
Yamada, Hisatugu ····· P82
Yamada, Kazuhiko ····· L3-10
Yamagishi, Kazama ····· L3-12
Yamaguchi, Takashi ····· L3-12

Yamaguchi, Yoshiki ····· L3-3, P41
Yamakami, Tomu ····· P79
Yamamoto, Yasuhiko ····· L1-10
Yamamura, Ryota ····· YP8
Yamanoi, Yoshinori ····· P78
Yamaoki, Yudai ····· P87
Yamasaki, Kazuhiko ····· L1-11
Yamasaki, Tomoko ····· L1-11
Yamawaki, Ryo ····· P72
Yamazaki, Toshio ····· L3-12, YP14, YP15, YP16, P19, P20, P59, P91
Yanagisawa, Yoshinori ····· L3-12
Yanai, Nobuhiro ····· YP20
Yanaka, Saeko ····· P19
Yazawa, Koji ····· P74
Yogo, Rina ····· P19
Yokoyama, Daiki ····· P35
Yokoyama, Takumi ····· P43
Yoo, Brian ····· L3-6
Yoon, Seong-Ho ····· P73
Yoshida, Mahoko ····· P27
Yoshida, Masasuke ····· P57
Yoshikawa, Masatoshi ····· L3-12
Yoshimizu, Hiroaki ····· L3-2
Yoshimura, Yuichi ····· YP6
Yoshinaga, Sosuke ····· P86
Yoshioka, Ken-Ichi ····· YP6
Yuzuriha, Naoya ····· P86

Z

Zhang, Jinzhe ····· P88
Zhang, Xin ····· P56
Zhao, Jing ····· L1-11
Zhu, Haojie ····· YP4

五十音順

あ

相沢　智康 …… YP1, YP8, P40
会津　貴大 …… P25
相原　雄一 …… P84
會見　宗平 …… P46
青木　大将 …… YP6
青木　靖仁 …… P44
青山　拓也 …… P77
青山　安宏 …… P82
阿久津　秀雄 …… HL-2, P57
朝倉　大河 …… P35, P37, P38, P39
朝倉　哲郎 …… P66
朝倉　由光 …… P45
浅田　瑞枝 …… L1-1
安部　佑之介 …… P66
天野　浩 …… L1-4
綾部　時芳 …… YP8
安澤　すあい …… P17

い

五十嵐　崇子 …… P65
伊倉　光彦 …… HL-1
池上　貴久 …… P3, P7, P30, P57
池田　思朗 …… L3-9
池谷　鉄兵 …… S3-2, P12, P16, P23, P31
石井　公貴 …… YP3
石井　佳誉 …… L3-6, L3-12, YP14, YP17, P20, P51, P52, P58, P59, P60, P80
石黒　貴也 …… P58, P60
石田　博昭 …… YP1
石田　宏之 …… P62
石田　祐之 …… P79, P81
石田　康博 …… L3-3
石森　浩一郎 …… L1-1, YP4
一条　直規 …… L1-8
出田　圭子 …… P73
伊藤　研悟 …… YP22, P38, P39, P72, P88
伊藤　幸成 …… P41
伊藤　豊 …… P26
伊藤　隆 …… S3-2, L1-2, P9, P12, P16, P23, P24, P25, P31
犬飼　宗弘 …… P69
井上　圭一 …… YP15, YP16
井上　夏希 …… P93
猪股　梨華 …… L1-11
今井　宏彦 …… L3-1, P82
今泉　卓 …… P63, P68
今前田　大朗 …… P40
岩井　秀夫 …… L3-7
岩川　直都 …… YP2, YP3

う

ヴァリンダ　エリック …… YP3, P34
魏　菲菲 …… P39
上坂　友洋 …… S1-4, YP20
上田　一義 …… P55
内尾　佳貴 …… YP24
内田　紀之 …… L3-3
内海　博明 …… P4
梅川　雄一 …… P54
梅原　崇史 …… YP6
浦野　智子 …… P28
上井　幸司 …… P40
海野　昌喜 …… P26

え

江野澤　英穂 …… L1-8
海老名　保男 …… L3-3

お

大木　出 …… L1-7
大木　康太郎 …… L3-12
大窪　貴洋 …… P70, P89
大田　英和 …… P54
大友　秀明 …… P22
大西　裕季 …… YP8
大貫　義則 …… YP19
大沼　幸暉 …… YP1
大山　貴志 …… P79
岡　徹雄 …… P93
岡田　康太郎 …… YP19
岡田　真由 …… S3-2, P16, P23
尾形　慎 …… P64
岡部　遼太郎 …… P51
小川　敦子 …… YP18
沖津　貴志 …… YP16
奥下　慶子 …… P71
小倉　立己 …… YP9
尾澤　夢実 …… P55
小野　峻佑 …… L3-9
尾本　賢一郎 …… P78
折橋　佳奈 …… YP20

か

甲斐荘　正恒 …… L3-8
香川　晃徳 …… L1-8, YP25
葛西　卓磨 …… L3-9
柏原　功典 …… P80
加瀬　優希 …… P92
悴田　亮平 …… P85
片平　正人 …… P29, P87
加藤　晃一 …… L3-4, P19
門間　啓 …… YP12, P48
金折　賢二 …… P46
金場　哲平 …… P1

金子　莉奈 …… YP15, YP16
金橋　康二 …… P71
鎌足　雄司 …… P29, P33
神原　孝之 …… P52
亀井　駿 …… P31
亀渕　萌 …… P63, P68
茅野　洋平 …… P55
河合　剛太 …… YP7
川口　謙 …… P8
川嵜　亮祐 …… P18
川村　出 …… YP15, YP16, P53, P55
川本　晃大 …… L3-5
川脇　徳久 …… P76
姜　秀珍 …… P57
神取　秀樹 …… YP15, YP16

き

木川　隆則 …… L3-9, P16, P23
菊川　峰志 …… YP1, YP8
菊地　淳 …… YP22, P35, P36, P37, P38, P39, P72, P88
北川　宏 …… P81
北川　勝浩 …… L1-8, YP25
北口　仁 …… L3-12
北沢　創一郎 …… P11, P13
北田　直也 …… YP8
北原　亮 …… P11, P13
木下　誠志 …… P76
木下　正弘 …… P29
君塚　信夫 …… YP20
木村　敦臣 …… L3-1
木村　一雄 …… P44
木村　恒久 …… YP12, P48
木村　英昭 …… YP6
木村　裕 …… P82
清澤　秀孔 …… YP7

く

久志本　真希 …… L1-4
葛貫　絵梨奈 …… P28
久住　亮介 …… YP12, P48
久保　研二 …… P40
久保田　智巳 …… L1-11
熊木　康裕 …… YP1, YP8
熊田　俊吾 …… YP19
熊田　高之 …… S1-2
久米田　博之 …… P40
倉賀野　正弘 …… P40
藏重　亘 …… P76
栗田　順一 …… P2, P7, P15, P22
栗原　拓也 …… L1-6, P69
黒川　優香 …… P28
桑田　一夫 …… P29
桑原　大介 …… P43, P45

こ

小泉　太貴 …… P25, P26
小泉　大貴 …… L1-2
河野　俊之 …… P23, P28
甲野　裕之 …… P64
小篭　蒼 …… YP10, P17
谷　昊 …… YP1
小島　慧一 …… P27
児嶋　長次郎 …… L1-9, YP5, YP10, P3, P17, P32, P42
後藤　和馬 …… P79, P81
後藤　祐児 …… L3-5
小沼　剛 …… P7, P30
小林　直宏 …… YP16, YP17, P91
小林　ひなの …… YP7
小林　洋太 …… YP21
米谷　雛 …… P79
今　喜裕 …… YP11
近藤　輝幸 …… P82
近藤　修啓 …… P64

さ

斉尾　智英 …… L1-1, YP4
斉藤　一功 …… L3-12
齋藤　彦太 …… L1-1
坂田　研二 …… P36, P39
坂本　泰一 …… P10
阪本　知樹 …… P87
迫　洸佑 …… P15
笹川　拡明 …… P4
佐々木　彬子 …… P47
佐々木　進 …… L1-4, P85
佐々木　高義 …… L3-3
佐々木　義和 …… P74
笹原　久武 …… P65
佐藤　一彦 …… YP11, YP18
佐藤　健大 …… P66
佐藤　立樹 …… P43
佐藤　直樹 …… P32
佐藤　久子 …… P55

し

ジェイ　スチュワート　ニール …… YP24
重田　安里寿 …… YP15, P53
柴田　友和 …… L1-10
島崎　安希子 …… P28
嶋田　一夫 …… L1-3, P14
島田　真樹 …… P78
清水　禎 …… P79
治村　圭子 …… P78
下林　佑輝 …… P73
朱　浩傑 …… YP4
白石　賢二 …… L1-4
白川　昌宏 …… L1-7, YP3, P34

新家　粧子 …… YP10, P17
す
末富　佑 …… L3-12
菅井　秀斗 …… P83
菅瀬　謙治 …… YP2, YP3, P5, P34
菅原　潤一 …… P66
杉木　俊彦 …… L1-9, P3, P32, P42
杉下　友晃 …… S1-1, P49
杉本　義一 …… P71
鈴木　秋弘 …… L1-10
鈴木　しぶき …… YP16
鈴木　拓巳 …… P9
鈴木　俊治 …… P57
鈴木　康仁 …… L1-10
鈴木　陽 …… P63, P68
鈴木　里佳 …… P27
鈴村　拓馬 …… YP7
須藤　雄気 …… P27
隅田　真人 …… P88
住吉　政則 …… P46
せ
関　千草 …… P40
そ
宗　正智 …… L3-5
曽我　朋義 …… YP9
宋　子豪 …… YP8
た
田岡　健一郎 …… P17
高尾　智明 …… L3-12
高田　夢人 …… L1-2, P9, P24
高橋　貴文 …… P71, P75
高橋　栄夫 …… P27
高橋　雅人 …… L3-2, L3-12, P93
高橋　涼 …… P52, P59
高見　昇平 …… P87
滝沢　剛 …… L1-3
田岸　亮馬 …… P12, P16
瀧下　俊平 …… L1-1
武井　滉洋 …… P89
竹内　恒 …… L1-3, P14
竹腰　清乃理 …… L1-6, YP13, YP21, P76, P77
武田　和行 …… L1-5, YP12, YP13, YP21, P48
武田　光広 …… L3-8, P86
田崎　健太 …… P43
田嶋　邦彦 …… P46
田代　充 …… P6
舘　幸男 …… P89
楯　真一 …… YP6, P18
立石　健一郎 …… S1-4, YP20
立石　泰 …… S3-2, P23
田所　誠 …… P63, P68
田仲　加代子 …… P31
田中　真司 …… YP18
田中　孝 …… P12
田中　利幸 …… L3-9
田端　真彩子 …… P16
田渕　光春 …… P74
田巻　初 …… L3-5, P56
玉腰　暁子 …… YP8
ち
張　欣 …… P56
張　金哲 …… P88
つ
塚本　卓 …… YP1, YP8
辻　寛之 …… P17
辻野　正之介 …… YP23
津田　宏治 …… P88
土川　博史 …… P54
土屋　智恵子 …… P30
堤　遊 …… L3-2, P47
津中　康央 …… P22
坪井　裕理 …… YP22, P72
て
鄭　章代 …… P72
出村　誠 …… YP1, YP8
寺内　勉 …… L3-8
寺沢　宏明 …… P86
寺山　慧 …… P88
寺脇　慎一 …… P28
と
土井　徹 …… YP25
堂ノ下　将希 …… P81
徳永　裕二 …… L1-3, P14
徳樂　清孝 …… P40
戸所　泰人 …… P57
富岡　優充 …… P45
冨田　勝 …… YP9
冨永　雄介 …… L1-5
友広　潤志 …… P96
な
内藤　晶 …… P53, P55, P66
永石　竜起 …… L3-12
中川　直哉 …… P43, P45
中島　善人 …… P94
中島　弘稀 …… L1-2, P26
中島　優輔 …… L1-10
中島　裕美子 …… YP18
長島　敏雄 …… YP15, YP16, P20, P91
永島　裕樹 …… YP11
中田　克 …… P62
永田　崇 …… P29, P87
中谷　幸人 …… P45

長谷　颯士 …… YP6
長土居　有隆 …… P7, P30
中野　隆行 …… P8
中野　博人 …… P40
中林　康治 …… P73
中村　公則 …… YP8
中村　浩一 …… P65, P69
中村　幸志 …… YP8
仲村　髙志 …… P93
中村　敏和 …… L1-1
中村　光咲 …… P42
中村　祐士 …… L1-8
中山　連太朗 …… P63, P68
成田　一衛 …… P85

に

西尾　正樹 …… P78
西澤　茉由 …… P34
西田　真之 …… P30
西原　寛 …… P78
西村　勝之 …… L3-4
西村　千秋 …… P21
西村　善文 …… P2, P15, P22
西山　裕介 …… L3-11

ね

根岸　雄一 …… P76
根来　誠 …… L1-8, YP25
根矢　三郎 …… L1-10

の

野田　泰斗 …… L1-6, P69, P76, P77

は

拝師　智之 …… P84, P85
包　克非 …… YP8
端　健二郎 …… P79
橋本　一樹 …… P81
蓮見　景子 …… P4
畑　友輝 …… P71
蜂谷　健一 …… L3-12
服部　峰之 …… P78
服部　良一 …… P3
花島　慎弥 …… P54
濵田　衞 …… L3-12
林　繁信 …… P78
林　智彦 …… P29
林　秀則 …… P32
林　芙優 …… P86
林　祥弘 …… YP19
原　英之 …… P95
原田　健一 …… L1-9
半沢　宏之 …… L1-3

ひ

彦根　佑哉 …… P16
日部　雄太 …… YP13
平尾　優佳 …… P2
平岡　万里菜 …… L1-9, YP5
平河　卓也 …… YP2
平田　拓 …… YP23, YP24, P92, P96
平林　克樹 …… P64
平松　蒼野 …… L1-1
広瀬　侑 …… P25
広田　亨 …… P15
廣畑　雅史 …… P27

ふ

深澤　隼 …… P90
深津　勇太 …… P89
福江　優香 …… YP24
藤木　聡 …… P84
藤田　健太郎 …… P58
藤村　哲平 …… P36
藤原　才也 …… YP20
藤原　敏道 …… S1-1, L1-9, L3-5, YP5, YP10, P3, P17, P42, P49, P56, P57, P90
藤原　英明 …… L3-1
藤原　正規 …… L1-7
降旗　一夫 …… P6
古板　恭子 …… YP5, P3, P17
古川　亜矢子 …… P15
古島　圭智 …… P62
古谷　健太 …… P70

ほ

朴　任中 …… L3-12
細田　和男 …… P28

ま

前田　公憲 …… S2-1
前田　秀明 …… L3-12
前田　啓明 …… P78
槙野　義輝 …… P53
政喜　優 …… YP6
真嶋　司 …… P29
俣野　晃広 …… P77
松川　陽亮 …… L1-5
松木　陽 …… S1-1, L3-5, P49, P90
松田　勇 …… L3-6, YP14, P58, P59, P60
松田　景子 …… P44, P62
松田　裕生 …… P66
松永　達弥 …… YP14, P51, P52
松村　雄輝 …… P8
松元　慎吾 …… S1-3, YP23, YP24, P83, P92, P96
松本　朋子 …… P35
眞鍋　史乃 …… P41

み

美川　務 …… P23
三島　正規 …… L1-2, P9, P12, P16, P23, P24, P25, P26
水落　憲和 …… L1-7
水越　弓子 …… L1-3
水野　元博 …… P81
嶺重　温 …… P67
三野　広幸 …… S3-1
宮岸　真 …… L1-11
三宅　祐輔 …… P46
宮崎　勇輝 …… P59
宮地　麻里子 …… P78
宮西　孝一郎 …… L1-8
宮ノ入　洋平 …… L3-8, P19
宮脇　仁 …… P73
三好　康之 …… L3-12

む

村上　知広 …… P82
村上　美和 …… P67
村田　泉 …… P37
村田　武士 …… P27
村田　剛志 …… L1-8
村田　道雄 …… P54
室　和希 …… P76

も

本山　誠 …… L1-8
百武　篤也 …… L1-10
森　勇介 …… L1-4
森下　弘樹 …… L1-7
森田　航希 …… L1-7
森田　勇人 …… P32
森田　靖 …… L1-8
森本　大智 …… YP2, YP3, P34
森脇　義仁 …… P22

や

矢木　宏和 …… P19
八木　宏昌 …… P16, P23
矢木　真穂 …… L3-4
矢澤　宏次 …… P74
楊井　伸浩 …… YP20
谷中　冴子 …… P19
柳澤　吉紀 …… L3-12
山置　佑大 …… P87
山上　登夢 …… P79
山岸　風摩 …… L3-12
山口　高史 …… L3-12
山口　芳樹 …… L3-3, P41
山崎　和彦 …… L1-11
山崎　智子 …… L1-11
山崎　俊夫 …… L3-12, YP14, YP15, YP16, P19, P20, P59, P91
山田　和彦 …… L3-10
山田　久嗣 …… P82
山野井　慶徳 …… P78
山村　凌大 …… YP8
山本　泰彦 …… L1-10
山脇　涼 …… P72

ゆ

杠　直哉 …… P86
尹　聖昊 …… P73

よ

與語　理那 …… P19
横山　大稀 …… P35
横山　拓海 …… P43
吉岡　賢一 …… YP6
吉川　正敏 …… L3-12
吉住　玲 …… YP16
吉田　賢右 …… P57
吉田　真帆子 …… P27
吉永　壮佐 …… P86
吉水　広明 …… L3-2
吉村　優一 …… YP6

わ

若松　馨 …… P28
若本　拓朗 …… P11, P13
若山　正隆 …… YP9
和田　昭盛 …… YP16
和田　昌久 …… YP12, P48
渡邉　輝 …… P40

（無断で複製・転載を禁じます）
Copyright©2019 The Nuclear Magnetic Resonance Society of Japan

2019年10月25日発行
Published on 25th October 2019

第58回NMR討論会（2019）

会　　期：2019年11月7日（木）～9日（土）
7-9 November 2019

会　　場：川崎市コンベンションホール
Kawasaki Convention Hall
〒211-0063　神奈川県川崎市中原区小杉町2丁目276番地1
パークシティ武蔵小杉 ザ ガーデン タワーズ イースト2階

編集・発行：第58回NMR討論会事務局
〒230-0045　神奈川県横浜市鶴見区末広町1-7-22
国立研究開発法人理化学研究所内
Tel：045-503-9203
E-mail：58nmr2019@ml.riken.jp

協賛企業・団体

Wavefunction, Inc. 日本支店 / 株式会社アフィニティサイエンス

NMR共用プラットフォーム

株式会社エムアールテクノロジー

株式会社エルエイシステムズ

株式会社シゲミ

ジャスコインタナショナル株式会社

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

東北大学東北メディカル・メガバンク機構

株式会社　トミー精工

中山商事株式会社

ナカライテスク株式会社　横浜営業所

日京テクノス株式会社

日本サーマルエンジニアリング株式会社

日本電子株式会社

株式会社バイオネット研究所

ブルカージャパン株式会社

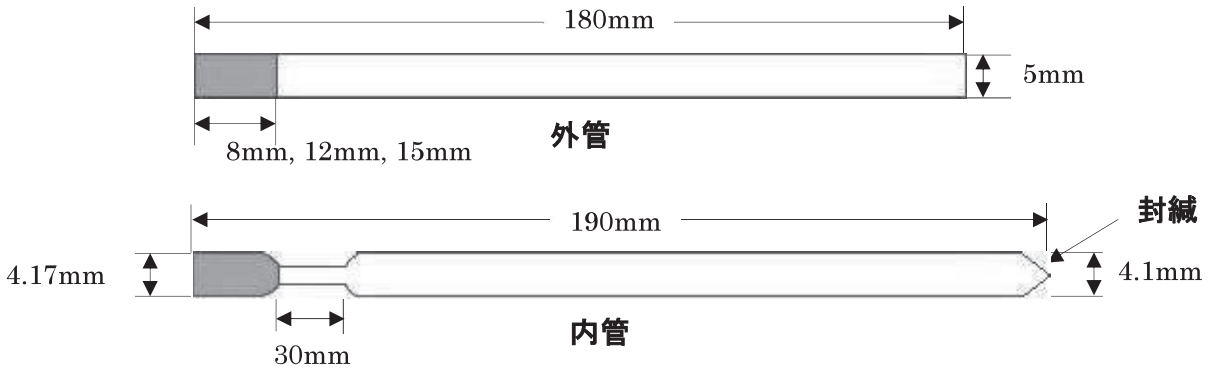
モレキュラーデバイスジャパン株式会社

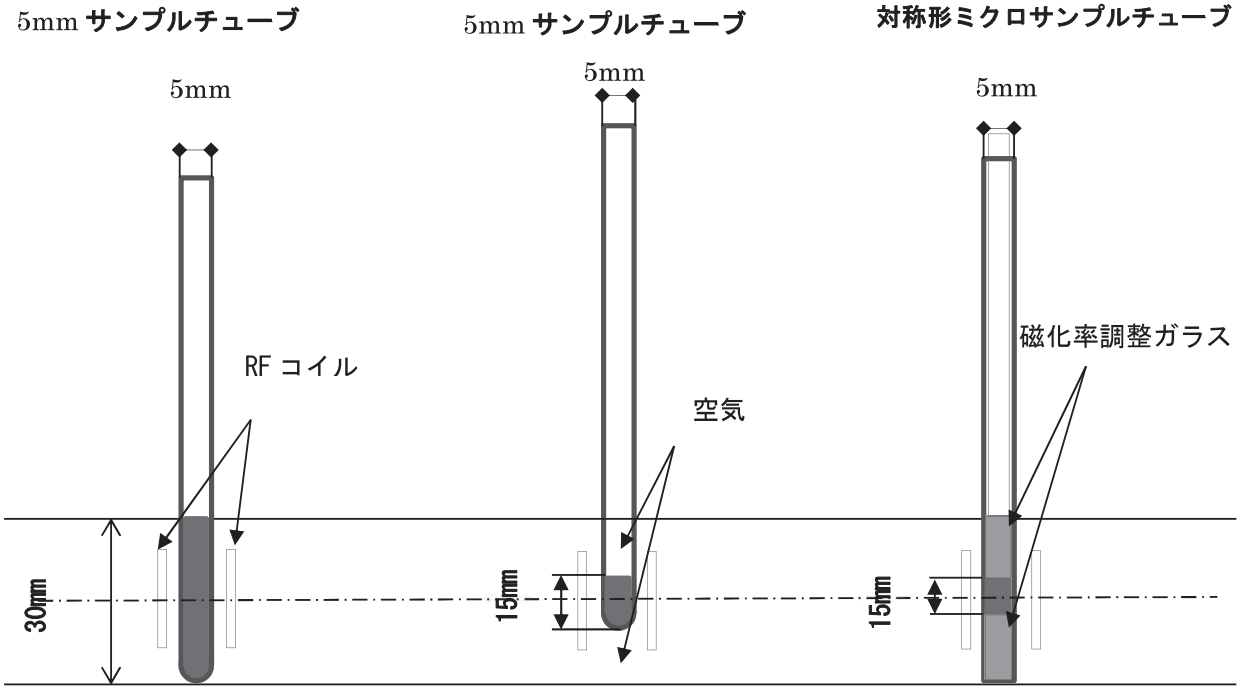
株式会社リアクト

理研シンポジウム

（敬称略、五十音順、作成：2019年10月15日）

Aceton-d_6 用対称形ミクロサンプルチューブ





5mmφ用プローブでの測定例

5mmφサンプルチューブにシムが十分調整可能な液高に注入。	5mmφサンプルチューブに濃度を上げるために溶媒を減らしたが、液高が低いためシム調整できない。	5mmφ対称ミクロ形サンプルチューブに5mmφサンプルチューブの半分の量注入。シム調整問題なし。
液高：30mm	液高：15mm	液高：15mm
量：410μL	量：210μL	量：210μL

2.5mm・3mm・5mm・8mm・10mm のラインアップがあります。

平成２１年度「日本化学会科学有効賞」受賞製品

電話　042-624-2207
FAX　042-622-0937
株式会社　シゲミ
http://www.shigemi.co.jp
mail:shigemi-corp@nifty.com

nanalysis



100PRO

対応核種 $^{1}H/^{13}C$, $^{1}H/^{31}P$, $^{1}H/^{19}F$, $^{1}H/^{11}B$, $^{19}F/^{7}Li$

100MHz
卓上型で遂に到達



100e

対応核種 ^{1}H または ^{19}F

※2020 年春以降販売開始

株式会社 東京インスツルメンツ
TOKYO INSTRUMENTS, INC.
http://www.tokyoinst.co.jp

本　　社：〒134-0088 東京都江戸川区西葛西 6-18-14 T. I. ビル
TEL: 03-3686-4711　FAX: 03-3686-0831
大阪営業所：〒532-0003 大阪市淀川区宮原 4-1-46 新大阪北ビル
TEL: 06-6393-7411　FAX: 06-6393-7055

東北大学
東北メディカル・メガバンク機構

Japanese Multi Omics Reference Panel.
jMorp

日本人多層オミックス参照パネル（jMorp）の収載データを大幅拡充

jMorpの収載データと、疾患由来のデータを比較することにより疾患の原因や治療法の発見につながります



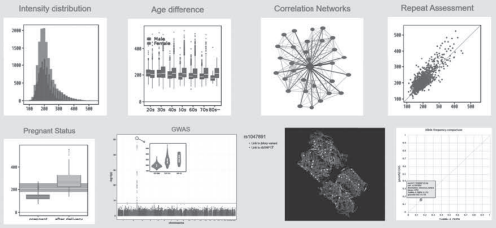
大規模健康調査で得られた試料 15万人分 → NMR装置等で解析 →





jMorp

ヒトのゲノム、メタボローム、プロテオーム情報を含む大規模かつ総合的なリファレンスパネル



NMRを含むさまざまな解析情報が公開データベースで！



装置名	共鳴周波数	装備
Bruker 800 NMR	800MHz	高感度極低温プローブ
Bruker 600 NMR	600MHz	自動サンプル交換装置

NMRによる解析項目とその情報（NMR解析以外の項目については jMorp をご覧ください）

項目と解析人数		
	公開内容	人数
基本情報	性別・年齢・BMI の分布	13,729
代謝物	43代謝物の定量値と分布 （詳細は右記の表をご覧ください）	13,729
代謝物(妊婦)	43代謝物の定量値と分布 （詳細は右記の表をご覧ください）	1,674
経時変化情報	3～5年おきの変化情報	約1,000

代謝物情報一覧（すべての項目で43種類の代謝物が対象）	
	機 能
定量値と分布	年齢、性別ごとの代謝物分布
相関情報	代謝物間の相関情報
MGWAS解析結果	特定の遺伝子の多型との関連
経時変化情報	年齢、性別、遺伝型ごとの経時変化

お問い合わせ先 jmorp@omics.megabank.tohoku.ac.jp

https://jmorp.megabank.tohoku.ac.jp/ jMorp 検索

TOMY

微量高速冷却遠心機 MDX-310

ECO TOMY

さらなる革新!
安全性と操作性の向上を追求した『MDX-310』
シンプルなデザインと見やすく使いやすさをプラスしたニューモデル登場!



新発売



クラス初!
タッチパネル機能付4.3インチフルカラー液晶ディスプレイ

TOMY　MDX-310　検索

詳しくはホームページをご覧ください。

TOMY

使いやすさを追求した大口径

オートクレーブ FLS-1000



販売元 株式会社 トミー精工

http://bio.tomys.co.jp

本社 東京都練馬区田柄 3-14-17　TEL.03-5987-3111　事業所 札幌・仙台・つくば・神奈川・名古屋・大阪・福岡

“高性能”卓上型NMR

Spinsolve

magritek
www.magritek.com

Spinsolve について

・永久磁石を用いた卓上型 NMR
・コンパクトで簡単操作
・通常のラボ環境で使用可能
・冷却溶媒が不要、低ランニングコスト
・43、60、80MHz、Ultraとラインナップが充実！

・測定核種は 1H,19F,13C,31P, その他
・2D 測定が可能
・リアクションモニタリングが可能
・自動シム調整が可能

・つくばデモルームに是非お越しください！



Chemistry for Life　Science for Future

中山商事株式会社

本社：茨城県 日立市 相賀町 17-9
TEL：0294-22-5291　FAX：0294-25-0058

筑波営業所：茨城県 つくば市 鬼ヶ窪 1139-1
TEL：029-847-7355　FAX：029-847-6497

お問合せ先：筑波営業所事業課 Email: dsd@nakayama-co.jp　TEL:029-847-7355

Nakayama

溶液NMRの操作性を固体NMRの世界に！

Automated solid state NMR system



固体試料測定に溶液プローブの使い勝手と操作性をもたらす新開発のAUTOMASプローブとローターキャリアーは、これまで固体NMR測定にハードルを感じていた溶液NMRユーザーにとってブレークスルーとなる画期的なシステムです。

既存のオートサンプルチェンジャーの機能と、溶液プローブと共通のオートチューニングユニットが使え、溶液NMRのように固体NMRの連続自動測定が可能です。オートサンプルチェンジャーやオートチューニングユニットを各々に用意することなく、溶液と固体の試料測定が行えます。



AUTOMAS プローブ

AUTOMAS PROBE



ローターキャリアー

ROTORCARRIER

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

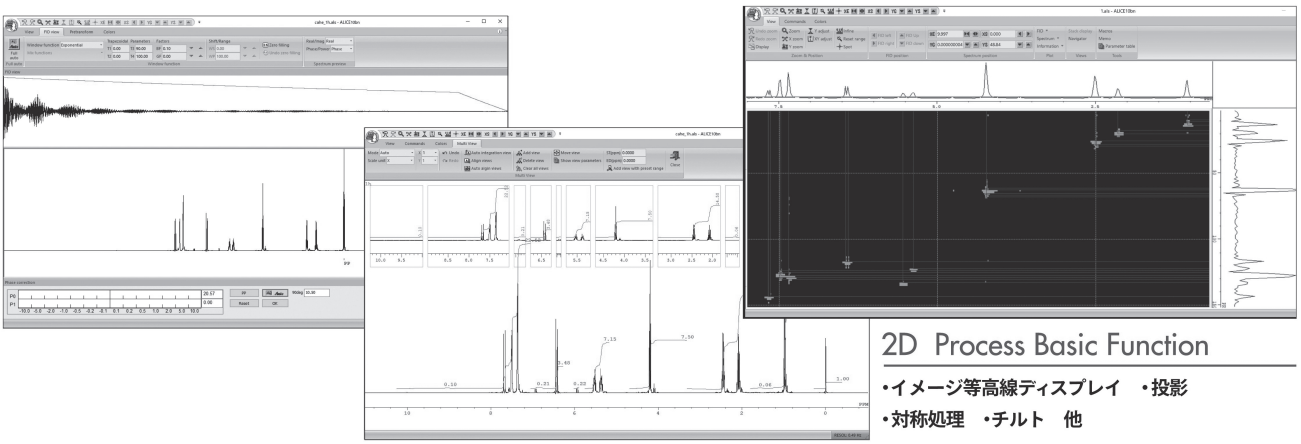
JEOLグループは、「理科学・計測機器」「産業機器」「医用機器」の3つの事業ドメインにより事業を行っております。
「理科学・計測機器事業」電子光学機器・分析機器・計測検査機器　**「産業機器事業」**半導体関連機器・産業機器　**「医用機器事業」**医用機器

NMR分析のオンリーワン・ソフト
Windows 10対応版完成!

ALICE10bn
アリス　テン　ビーエヌ

ALICE10QTbn
ALICE10MLbn

■データ処理・印刷・保存を素早く簡単に行える
■最新のWindows UIを備えたWindows 10 (32/64bit) 完全対応版



2D Process Basic Function
・イメージ等高線ディスプレイ　・投影
・対称処理　・チルト　他

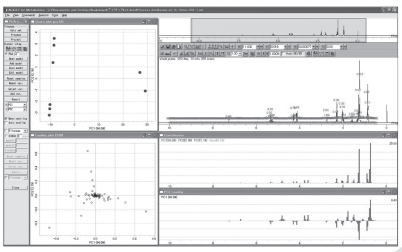
1D Process Basic Function
・マルチビュー　・マルチスペクトル
・緩和時間計算　・J couple機能　他

その他のラインナップ

NMR定量ソフト ALICE10QTbn
定量NMR（内標準法）の多検体処理・定量計算を効率的に実行!



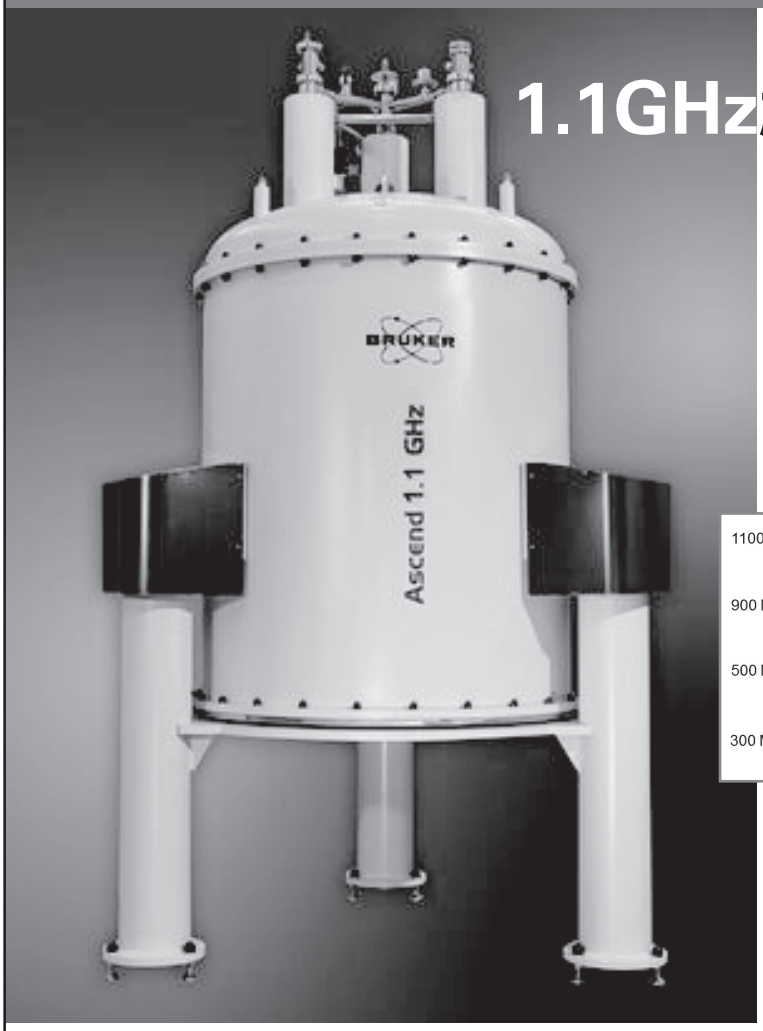
NMRメタボローム解析ソフト ALICE10MLbn
多変量解析に必要な全ての処理・解析を、1つの画面で簡単に操作!



Easy Operation
高度かつ多角的なNMR 解析機能と、
シンプルでわかりやすい操作性を両立

NetALICE
ネットライセンス管理と分散処理により、
導入時のインストール作業を大幅削減

株式会社バイオネット研究所　TEL：042-512-9021　URL：www.bio-net.co.jp



1.1GHz超電導磁石が導く新しい世界

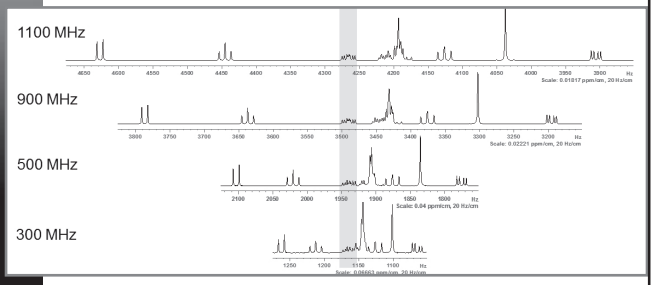


Fig. Sugar ^{1}H signals of 2mM Sucrose in H_2O:D_2O 9:1 illustrating the dispersion gain with increasing field strength. The yellow bar highlights a single ^{1}H resonance, easily identified at higher fields.

世界初の安定で均質な Ascend 1.1 GHz NMR 磁石

高分子量のタンパク質や変性タンパク質、その複合体は、NMRスペクトルの狭い領域に多くのシグナルが観測されるために、解析が困難でした。1.1 GHzの装置を用いることで分離能が向上したり、超高磁場ならではの感度向上のテクニックを駆使することで課題を解決できるようになってきました。

For more information please visit: www.bruker.com

ブルカージャパン株式会社
バイオスピン事業部
info.bbio.jp@bruker.com

本社（横浜営業所）
〒221-0022 神奈川県横浜市神奈川区守屋町3-9
TEL：045-444-1390
大阪営業所
〒532-0004 大阪府大阪市淀川区西宮原1-8-29 テラサキ第2ビル2F
TEL：06-6394-8989

BRUKER

LabScape
we've got you covered

修理対応型から予防保守へ

装置稼働率を最大化する先端サポート、ラボスケープ

保守契約サービスプログラム

・目的やご予算に応じた多彩なサービスプログラム

・リモートアクセスにより、エンジニアが装置の診断を行うまでの待ち時間が短縮

・潜在的な異常を感知するための継続的なリモートモニタリングや、いざという時のクエンチリカバリー対応



LabScape Comprehensive



LabScape Essential



LabScape Connect

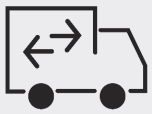


LabScape Select

オンサイト・オンデマンドサービス

・お客様ごとのニーズに応じたフレキシブルなサービス対応

・適切な在庫管理による、必要部品や消耗品の迅速なご提供



LabScape Relocate



LabScape Evolve



LabScape Maintenance



LabScape Repair

研究サポートサービス

・消耗品のご購入に便利なオンラインストアを開設

eストアへは、https://bruker-labscape.store/ またはQRコードから

For more information please visit: www.bruker.com

ブルカージャパン株式会社
バイオスピン事業部
info.bbio.jp@bruker.com

本社（横浜営業所）
〒221-0022 神奈川県横浜市神奈川区守屋町3-9
TEL：045-444-1390
大阪営業所
〒532-0004 大阪府大阪市淀川区西宮原1-8-29 テラサキ第2ビル2F
TEL：06-6394-8989

NMR

Innovation with Integrity

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。

文部科学省
先端研究基盤共用促進事業（共用プラットフォーム形成支援プログラム）

NMR共用プラットフォーム ご利用案内

NMR共用プラットフォームでは、参画機関が保有する NMR装置を産業界・アカデミアに開放しています。

「最先端利用開発」利用枠 2020年度第１回公募

公募期間（予定）　：　1月6日(月)～2月7日(金)

NMR技術領域の拡大発展に寄与する利用課題を対象とし、最先端のNMR装置を利用した先端的かつ新規の測定技術の開発や、NMR共用プラットフォーム全体における測定技術等の向上を目指した課題を募集します。

各機関の情報や、応募方法等の詳細は Webサイトをご覧ください
URL： http://nmrpf.jp/

◆ご利用前の相談も随時、承ります。

NMR共用プラットフォーム　検索

各機関では、このほか独自の利用枠を設けております。

NMRのプロフェッショナルが 豊富な経験に基づいて、皆様の研究をサポートいたします。

◇実施機関紹介　**この他にも多種多様なNMR装置、 NMRプローブを取り揃えております。**

理化学研究所

豊富な実績と経験があります

- 材料、天然物、生体分子など幅広い試料の溶液・固体NMR測定可能！
- タンパク質の発現から解析までの技術支援！
- NMR初心者大歓迎！まずは無料トライアル！


900MHz固体NMR 高速MAS


NMR立体構造解析 パイプライン


世界最大規模の台数を有するNMR棟

横浜市立大学

世界最高レベルの共用装置群

- 通常の溶液NMRに加え、LC-NMR、固体NMR、オートサンプラー測定により多くの企業の成果に活用された豊富な実績！
  ^{19}Fも最高レベルで測定可能！
- NMRリモート測定も対応可能！


950MHz溶液NMR、LC-NMR、固体NMR


800MHz溶液NMR 最大480本オートサンプラー


700MHz溶液LC-NMR 最大16本オートサンプラー CryoTCI-Fプローブ装備

大阪大学

世界最大級・最高性能装置群を擁する西の拠点

- 西日本からのアクセス良好！
- 高磁場NMRで高分解能スペクトル！
- ^{19}Fライブラリを使ってスクリーニング！
- 高磁場DNPで高感度NMR測定！


700MHzDNP固体NMR 高速MAS


950MHz溶液NMR


400MHz溶液NMR ^{19}Fスクリーニング

北海道大学

北日本最大のNMR施設が皆様を支援します！

- 食品・農林水産を含む、幅広い産業利用実績！
- 利用相談・技術支援を専門スタッフが担当！
- インターネット教材や実習コースなど、各種NMR教育プログラムも充実！


800MHz溶液NMR ランタニドプローブ


600MHz固体NMR 高速MAS、FG-MAS


装置実習、教育プログラム

参画機関
◎代表機関　国立研究開発法人理化学研究所
○実施機関　公立大学法人横浜市立大学
国立大学法人大阪大学
国立大学法人北海道大学
協力機関　日本電子株式会社、ブルカージャパン株式会社

NMR共用プラットフォームポータルサイト
URL： http://nmrpf.jp/

安定同位体標識化合物
Stable Isotope for Structural Biology

大陽日酸は多次元NMRでの構造解析に必須な安定同位体標識化合物を高品質･お求め易い価格で販売しております。

New! 無細胞タンパク質受託合成

無細胞タンパク質合成技術を用いた受託合成を開始しました。
細胞内タンパク質、分泌系タンパク質、膜タンパク質発現を承ります。

- 鋳型DNA設計･作製
- 条件検討試験
- 発現･可溶性確認試験
- 中量･大量スケール合成

無細胞くん®

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Start New!

特徴

無細胞タンパク質合成をお手軽にお試しいただけます。小スケール（0.1mL）反応を付属の微量透析カップで6回実施できます。発現量や可溶性の確認および条件検討用に最適です。

製品番号	製品名	数量	保存温度	希望納入価格(円)
A183-0242	無細胞くんStart	1キット (0.1mL反応×6回分)	−80℃	28,000
A89-0126	無細胞くんSI SS	1キット (1mL反応×1回分)	−80℃	65,000
A29-0059	無細胞くんSI	1キット (1mL反応×1回分)	−80℃	55,000

◎ PCRで調製した**直鎖状DNA**もご使用いただけます。

国立研究開発法人 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・膜タンパク質合成用試薬

■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-$^{13}CH_3$;^{2}H]Leu＋ [γ1-$^{13}CH_3$;^{2}H]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

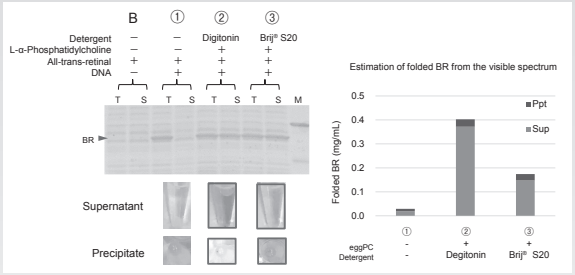
製品番号	製品名	数量	希望納入価格(円)
A107-0144	アミノ酸混合物水溶液-UL-d	1mL	25,000
A39-0072	アミノ酸混合物水溶液-UL-^{15}N	1mL	15,000
A41-0074	アミノ酸混合物水溶液-UL-^{15}N,d	1mL	18,000
A40-0073	アミノ酸混合物水溶液-UL-^{13}C,^{15}N	1mL	30,000
A42-0075	アミノ酸混合物水溶液-UL-^{13}C,^{15}N,d	1mL	35,000
A91-0128	アミノ酸混合物水溶液-Lys,Arg-UL-^{13}C,^{15}N	1mL	20,000
A92-0129	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。			

■膜タンパク質合成用試薬

製品番号	製品名	数量	希望納入価格(円)
A226-0290	膜タンパク質合成用添加剤 Set A	1キット	20,000

膜タンパク質 発現例

Bacteriorhodopsin



Purplish brown color represents proper folding of Bacteriorhodopsin.

用途例

◎ スクリーニング用多検体発現、細胞毒性タンパク質発現、変異体発現
◎ 多次元NMR、クライオ電子顕微鏡、X線回折、中性子線回折等による構造解析用タンパク質発現
◎ 質量分析用安定同位体標識タンパク質発現

核酸

- New! 10%, 20% Phosphoramidites (^{13}C, ^{15}N, d)
- NTPs / NMPs (^{13}C, ^{15}N, d)
- RNA･DNAオリゴマ合成

アミノ酸･ケト酸

- L-Amino Acids (^{13}C, ^{15}N, d)
- Algal Amino Acids (^{13}C, ^{15}N, d)
- α-Keto Acids (^{13}C, d)

培地

- D-Glucose (^{13}C, d)
- Salts (^{15}N, d)
- Deuterium Oxide 99.9atom%

その他

- New! Lanthanide Tag
- Water-^{17}O (10-90atom%)
- Pf1 NMR Cosolvent

※Biomolecular NMR専門カタログをご用意しておりますのでお気軽にお問い合わせください。

製造・総販売元 **大陽日酸株式会社 SI事業部**
〒142-8558 東京都品川区小山1-3-26 東洋Bldg.
Tel.03-5788-8550（代表） Fax.03-5788-8710
●資料のご請求は、大陽日酸までお気軽にご用命ください。
メールアドレス Isotope.TNS@tn-sanso.co.jp
ホームページアドレス http://stableisotope.tn-sanso.co.jp

大陽日酸 The Gas Professionals