

第 61 回 NMR 討論会 (2022)

The 61st Annual Meeting of the Nuclear Magnetic Resonance Society of Japan
(2022)

講演要旨集

Abstracts

会 期：2022 年 11 月 8 日 (火) ~10 日 (木)

November 8 – 10, 2022

会 場：高知県立県民文化ホール

Kochi Prefectural Culture Hall

〒780-0870 高知県高知市本町 4 丁目 3 - 30

主 催：日本核磁気共鳴学会

共催・協賛・後援：高分子学会、日本磁気共鳴医学会、日本生物物理学会、
分子科学会、日本分析化学会、日本生化学会、日本材料科学会、
固体 NMR・材料フォーラム、定量 NMR クラブ

第 61 回 NMR 討論会 プログラム委員会

山田	和彦	(高知大学)	[委員長]
犬飼	宗弘	(徳島大学)	[チュートリアル担当]
右手	浩一	(徳島大学)	
大木	忍	(物質・材料研究機構)	[受付担当]
後藤	和馬	(岡山大学)	
薛	猷宇	(岡山大学)	
楯	真一	(広島大学)	
仲村	高志	(理化学研究所)	[懇親会担当]
安田	恭大	(広島大学)	

会場（高知県立県民文化ホール）への交通案内



高知県立県民文化ホール

Kochi Prefectural Culture Hall

〒780-0870 高知県高知市本町4丁目3-30

航空機をご利用の場合

高知龍馬空港から タクシーで約 30 分

空港連絡バス（県庁前行き）＜約 30 分＞「県庁前」下車 徒歩数分

空港連絡バス（JR 高知駅行き）＜約 25 分＞「はりまや橋」下車。とさでん交通路面電車（鏡川橋、朝倉、いの方面）に乗り換え＜約 5 分＞「県庁前」下車 徒歩数分

＜空港連絡バスの詳細＞

<http://www.kochiap.co.jp/access/#bus> もしくは「高知龍馬空港 連絡バス」で検索

JR をご利用の場合

JR 高知駅から タクシーで約 10 分、徒歩で頑張れば約 30 分

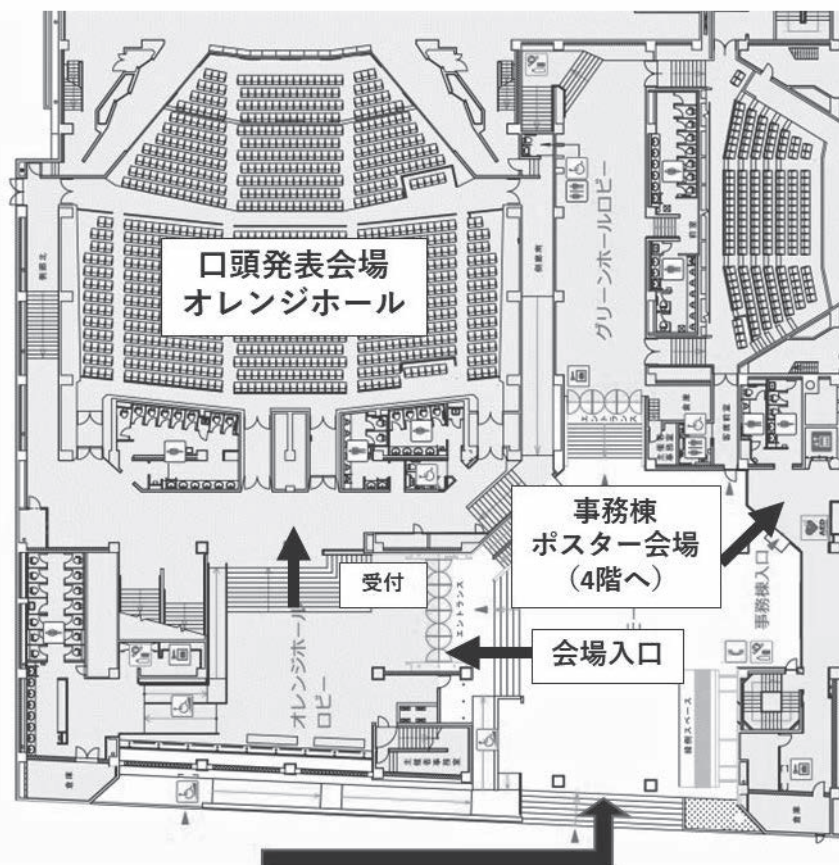
とさでん交通路面電車「高知駅前」＜約 5 分＞「はりまや橋」下車。「鏡川橋、朝倉、いの方面行き」に乗り換え＜約 5 分＞「県庁前」下車 徒歩数分

＜とさでん交通路面電車の詳細＞

<https://www.tosaden.co.jp/train/rosenzu.php> もしくは「とさでん交通 電車路線図」で検索

口頭発表会場（オレンジホール）の案内図

高知県立県民文化ホール 1階平面図



高知城・県庁・路面電車電停
方面から

とさでん交通「県庁前」(国道32号線)から徒歩2~3分。

建物正面に向かって左側がオレンジホール(口頭発表会場)、右側が事務棟(4階ポスター会場)です。
オレンジホールロビーに受付と手指消毒・検温コーナーがあります。

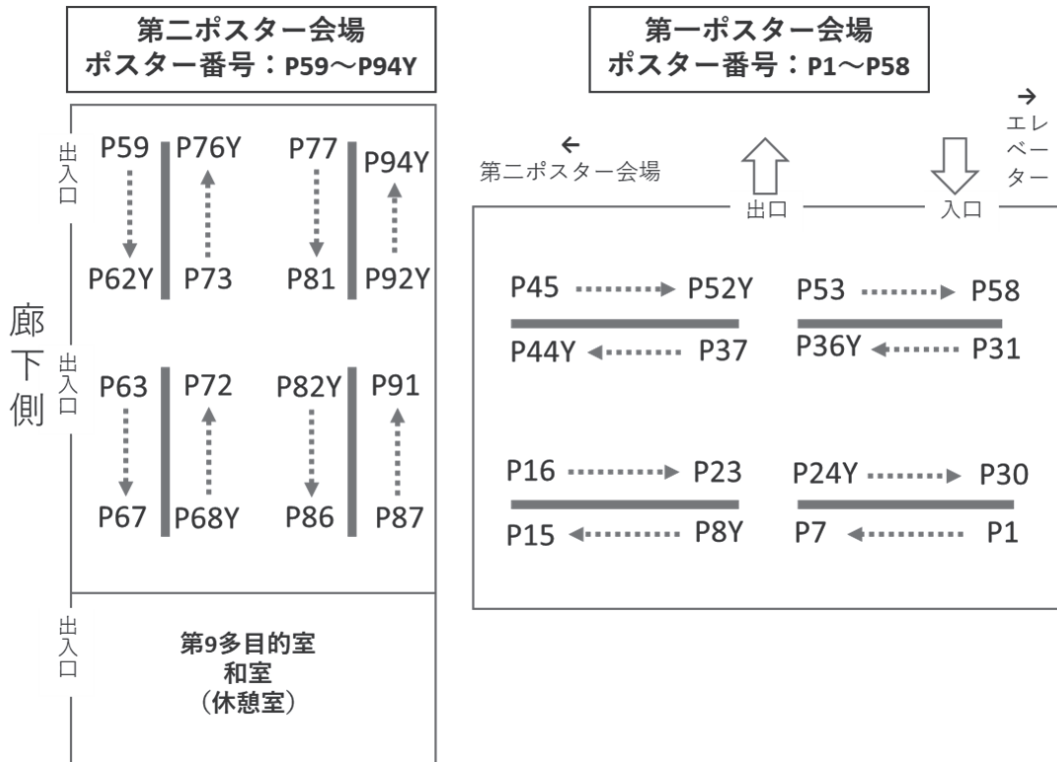
ポスター会場（事務棟 4 階）の案内図

事務棟4階平面図



ポスター会場は事務棟 4 階です。口頭発表会場（オレンジホール）からは、事務棟 1 階よりエレベーターもしくは階段①をご利用ください。エレベーター前のホールに手指消毒コーナーがあります。オレンジホールへ戻るには、エレベーターもしくは階段②をご利用ください（密集回避のため）。

第一ポスター会場（P1～P58）と第二ポスター会場（P59～P94 Y）に分かれています。



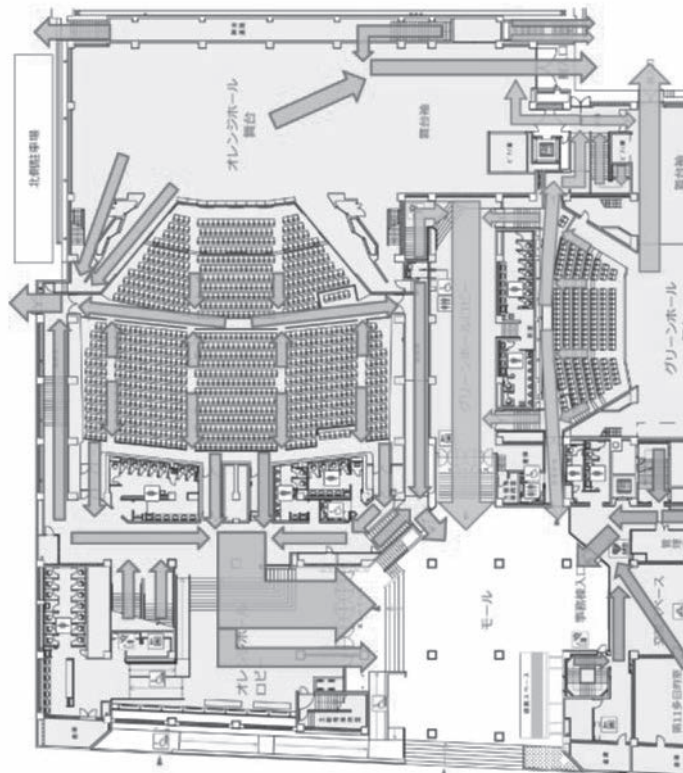
南海トラフ地震発生時の対応について

南海トラフ地震は、概ね 100～150 年間隔で繰り返し発生しており、前回の南海トラフ地震（昭和東南海地震（1944 年）及び昭和南海地震（1946 年））が発生してから 70 年以上が経過した現在では、次の南海トラフ地震発生切迫性が高まっています。

高知県立県民文化ホールでは、インターネットを通じて事業者より配信される高度利用者向け緊急地震速報装置を設置しています。通常、震度 6 弱以上が予想される場合に、大小ホールの客席を含む全館に非常放送が流れます。非常放送は、NHK チャイム音の後に音声でお知らせします。

南海トラフ巨大地震では、非常放送が流れてから強い揺れがくるまでの時間はわずかしかなりません。非常放送が流れたら、あわてずに身の安全を確保してください。県民文化ホールは耐震工事を行っていますので、係員の指示に従い、落ち着いて行動してください。絶対にあわてて出口や階段に殺到しないでください。津波が発生しないと予想された場合は、広域避難場所（鷹匠公園、高知城）に避難してください。また、津波発生時は、事務棟 4 階もしくは屋上が避難場所となります。

オレンジホールの避難経路図



新型コロナウイルスの感染予防対策について

1. 感染症予防対策として実施する項目

- ・新型コロナウイルスに感染している疑いのある方の来場自粛のお願い
- ・オレンジホールロビー受付前における検温の実施（各日）
- ・会場内での常時マスク着用のお願い
- ・会場内各所へ手指消毒液を設置
- ・講演会場内の適切な間隔確保のお願い、および入退室ルートの指定等の密集回避対策の実施
- ・定期的な窓開け等による、会場内の換気の励行
- ・マイク、演台、PC 接続ケーブル等、会場内の共有部分の定期的な消毒
- ・飲食時の黙食等の励行
- ・大声や咳等のエチケット順守の呼びかけ

2. 参加を予定されている皆様へのお願い（具体的な実施項目）

1) 有症状者の参加自粛

討論会会場に来場される前に（可能な限り）各自で検温していただき、体温が 37.5℃以上の場合、あるいは 37.5℃未満でも体調不良の場合は来場をご遠慮ください。なお講演予定の方の場合は、その旨を世話人までご連絡ください。

2) 受付時における検温（各日実施）

オレンジホールロビー受付前にて検温を実施いたします。体温が 37.5℃以上の方、または 37.5℃未満であっても、下記①～③のいずれかに当てはまる方の参加はお断りする場合がありますのでご了承ください。

- ①息苦しさや強いだるさ、のどの痛み、高熱のいずれかの症状がある。
- ②比較的軽微であっても、発熱や咳などの風邪症状や味覚や嗅覚の異常がある。
- ③明らかに体調不良そうに見えるが、当日発表があるので我慢している方

3) マスクの常時着用のお願い

討論会期間中、原則として会場内では常時マスク（不織布製を推奨）を正しく着用していただきますようお願いいたします。着用いただけない場合は参加をお断りする場合がございますので、予めご了承ください。また、討論会スタッフも常時マスクを着用しておりますので、併せてご了承ください。

4) 会場内における三密（密閉・密集・密接）回避

口頭発表会場（オレンジホール）では適切な距離をとって着席ください。会場内では出入口の指定等、動線を制限している場合があります。会場系の指示に従ってください。その他、会場内でのソーシャルディスタンス確保にご協力をお願いいたします。

5) 飲食

休憩時間に休憩室（事務棟4階）やオレンジホールロビーにおいて飲食していただくことは可能ですが、その際は、黙食またはマスク会食をお願いいたします。なお、ホール客席内での飲食はご遠慮ください。

6) その他

NMR に関する白熱した議論は大歓迎ですが、大声を出すことはお控えください。会場外においても国、高知県、各所属組織のルールに従い、感染予防を心掛けていただきますようお願いいたします。討論会会期中および終了後4日以内に、新型コロナウイルス陽性と診断された場合は、速やかに世話人までご連絡ください。また、討論会会期中に、新型コロナウイルス陽性と診断された方が参加されていた事が確認された場合、その後の日程を中止する場合があります。

以上、ご不便・ご迷惑をおかけいたしますが、新型コロナウイルス感染症拡大防止のためご理解ご協力のほどよろしくお願い申し上げます。

第 61 回 NMR 討論会 (2022) 日程表

11月7日 (月) Mon, Nov. 7th		11月8日 (火) Tue, Nov. 8th			11月9日 (水) Wed, Nov. 9th			11月10日 (木) Thu, Nov. 10th		
オレンジ ホール	ロビー	オレンジ ホール	事務棟 4階	ロビー	オレンジ ホール	事務棟、 他	ロビー	オレンジ ホール	事務棟 4階	ロビー
		開場 9:00	開場 9:00	開場 9:00	開場 9:00	開場 9:00	開場 9:00	開場 9:00	開場 9:00	開場 9:00
		9:40 ~ 10:40 一般演題 L1-1 ~ L1-3			9:40 ~ 10:40 Lec. III L3-1 ~ L3-3			9:40 ~ 10:40 一般演題 L4-1 ~ L4-3	9:30 ~ 11:00 ポスター 展示	9:30 ~ 12:30 企業展示@ オレンジ ホール ロビー
		休憩			Break					
		10:50 ~ 11:50 一般演題 L1-4 ~ L1-6	9:30 ~ 13:30 ポスター 貼付		10:50 ~ 11:50 Lec. III L3-4 ~ L3-6				11:00 ~ 12:30 ポスター 発表2 奇数番号	
開場 11:30	開場 11:30	11:50 ~ 12:20 総会		9:30 ~ 17:00 企業展示 @オレンジ ホール ロビー		9:30 ~ 17:00 Poster Exhibition	9:30 ~ 17:00 Corporate Exhibition @ Lobby		12:30 ~ 13:30 ポスター 撤去	12:30 ~ 展示搬出
受付										
12:30 ~ 14:00 チュート リアルⅠ	展示搬入 13:00 ~		13:30 ~ 15:00 ポスター 発表 1 偶数番号		13:30 ~ 15:25 Invited Lec. IL-1, IL-2			13:30 ~ 14:50 一般演題 L5-1 ~ L5-4		
休憩					Break			休憩		
14:10 ~ 15:40 チュート リアルⅡ		15:00 ~ 16:20 一般演題 L2-1 ~ L2-4	15:00 ~ 17:00 ポスター 展示		IL-3			15:00 ~ 16:00 一般演題 L5-5 ~ L5-7		
休憩					Ceremony					
15:50 ~ 16:50 チュート リアルⅢ		休憩			Break					
休憩		16:30 ~ 17:50 一般演題 L2-5 ~ L2-8			15:45 ~ 16:55 Award Lec. AL-1 ~ AL-2					
17:00 ~ 18:30 チュート リアルⅣ					Break					
			18:10 ~ 20:00 (予定) 評議員会 新評議員会 新理事会 @第9多目 的室		17:05 ~ 18:25 Honorary Lectures HL-1, HL-2					
						19:00 ~ 21:00 Banquet @Sansuien				

参加者へのご案内

1. 受付と参加登録

受付はオレンジホールロビーに設けます。

受付時間：11月8日（火） 9：15～18：00

11月9日（水） 9：15～18：00

11月10日（木） 9：15～16：30

・事前登録を済ませ、参加費を支払い済みの方は、受付デスクで手続きを行う必要はありません。本要旨集に同封した参加証を提示していただくだけでご入場できます。参加証ホルダーは会場入口付近に置いてありますので、ご自由にお使いください。会期中は参加証ホルダーの着用をお願いいたします。

・事前登録を済ませても、参加費の振り込みが確認できなかった方は、当日参加登録扱いとなります。

・当日参加の方は、受付前に置かれた当日参加者用紙に必要事項をご記入の上、受付デスクまでお越しください。参加費を現金でお支払いいただきます。お渡しする参加証に所属と氏名を各自で記入し、会場内で着用してください。

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

・領収書の発行

事前参加登録と懇親会の領収書は、参加証と一緒に郵送しております。それ以外に領収書が必要な場合は、参加証を持参して受付デスクにお申し付けください。

・講演要旨集

本講演要旨集は、日本核磁気共鳴学会会員と事前参加登録をした非会員（一般・学生）に事前送付しております。残部がある場合に限り、一冊につき 5,000 円で当日販売を行います。

・学会費の支払いと入会手続き

2022 年度における日本核磁気共鳴学会の学会費を未納の方は、受付デスクに併設する日本核磁気共鳴学会の受付でお支払いください。また、日本核磁気共鳴学会への入会も受け付けております。

2. 禁止事項

本講演会場（オレンジホールと事務棟 4 階）は禁煙・禁酒となっています。また、携帯電話による通話を禁止いたします。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お願いいたします。

3. 第 61 回 NMR 討論会についてのお問い合わせ

・会期中

受付デスク

〒780-0870 高知県高知市本町 4 丁目 3 - 30

高知県立県民文化ホール オレンジホールロビー

・会期外

第 61 回 NMR 討論会

〒783-8505 高知県南国市岡豊町小蓮

高知大学岡豊キャンパス医学部総合研究棟 III 409 号室

Tel : 088-888-2009

4. 発表者へのご案内

・座長の方へ

座長の方は、担当セッションになりましたら、スクリーン向かって右側の座長席（壇上）までお越しください。進行は全て座長に一任いたします。仮にセッション終了時間がオーバーした場合は、直後の休憩時間を短縮し、プログラム通りに次のセッションを始めてください。また、次のセッション開始時刻を会場にアナウンスしてください。新型コロナウイルス感染予防のため、マイクパーソンを配置せず、4本の質問者用マイクを通路に用意いたします。質疑応答時間において質問やコメントがある場合は、質問者が近傍のマイクまでお越しになるようお伝えください。

・口頭発表者の方へ

発表は発表者自身の PC で行っていただきますので、必ずご持参下さい。液晶プロジェクタは（少し年季の入った品物ですが）会場の備品を使用します。ノート PC との接続用として HDMI ケーブルと VGA ケーブルを用意いたします（VGA のマスターケーブルから変換機を通じて両ケーブルと接続します。）。Mini DisplayPort→HDMI/VGA と UBS Type C→HDMI/VGA、等の変換ケーブルも用意いたします。MAC ユーザーの方もしくは上記接続に不安がある方は、ご自身で変換コネクタをご用意下さい。ご自身の発表前の休憩時間に、スクリーン向かって左側の PC 受付デスク（壇上左奥）までお越しいただき、液晶プロジェクタとの接続を必ずご確認下さい。操作について不明な点がある場合は、会場担当スタッフにご相談下さい（上手く行かない場合は、会場の液晶プロジェクタ（VGA）に直接接続するか、会場の PC（Windows10）を使用します。）。発表データを USB メモリ等に入れて、バックアップ用としてご持参ください。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。レーザーポインタは会場に用意されております。

講演時間は、特別講演 35 分、招待講演 35 分、一般講演 20 分です。下記のタイミングで、ベルを鳴らします。持ち時間内での終了にご協力いただけますようお願いいたします。発表終了後

は、すみやかに次の発表者と交代して下さい。

	一鈴	二鈴（発表終了）	三鈴（質疑終了）
特別講演	30分	35分	
招待講演	25分	30分	35分
一般講演	13分	15分	20分

なお、特別講演には質疑の時間はございません。

・ポスター発表者の方へ

ポスター発表における使用言語は、英語もしくは日本語といたします。後者の場合、英語によるタイトル・名前・所属も併記してください。また、発表者の氏名には○印を付けてください。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。ポスターボードの大きさは 縦 210 cm × 横 90 cm です。床から 30 cm 程度のスペースを空けておくことを推奨します。画鋏は各ポスターパネルに用意いたします。左上隅 20 cm 四方のスペースに演題番号を表示しておりますので、各自のパネルに掲示して下さい。ポスター会場は事務棟 4 階の第一ポスター会場（第 6 多目的室）と第二ポスター会場（第 7・8 多目的室）に分かれております。前項「ポスター会場（事務棟 4 階）の案内図」をご参照ください。当初、第二ポスター会場は土足禁止とお伝えしておりましたが、養生することになりました。スリッパなど履物のご持参は不要となります。ポスター番号が偶数番号および若手ポスター賞候補の方（P2, P4, …）は、11月8日（火）13:30～15:00 にポスター討論を行って下さい。若手ポスター賞候補におけるポスター番号の末尾には「Y」がついています。奇数番号（P1, P3, …）の方は、11月10日（木）11:00～12:30 にポスター討論を行って下さい。発表時間の間は、必ずポスター前に立ち、質問と討論に応じて下さい。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8日（火）9:30～13:30 の間に掲示し、11月10日（木）12:30～13:30 の間に取り外して下さい。ポスター撤去時刻を過ぎても取り外されないポスターは事務局で撤去いたします。

5. 懇親会について

日 時：2022年11月9日（水）19:00～21:00

会 場：三翠園 (<https://www.sansuien.co.jp/>)

新型コロナウイルス感染予防対策に万全を期して、懇親会を開催いたします。会場は「高知家あんしん会食推進の店」の認証店です。大皿料理（皿鉢料理）は感染対策として提供できないことから、個別提供の形式となります。なお、新型コロナウイルス感染対策により、会場の参加可能人数に制限があります関係で、新規のお申込みをストップさせていただいております。参加をご検討いただいている皆様におかれましては、大変申し訳ございませんが、人数制限が撤廃され、

大皿料理が提供可能な状況になりましたら、懇親会当日のお申し込みの受付を再開する予定です。すでにお申し込みをいただいている参加予定者の皆様には懇親会における感染対策ガイドラインを別途メールでお伝えいたします。

6. 2022年度日本核磁気共鳴学会通常総会開催通知

日 時：2022年11月8日（火）11：50～12：20

場 所：高知県立県民文化ホール・オレンジホール

日本核磁気共鳴学会総会を上記日程で開催いたします。会員の方は必ずご出席ください。やむを得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。紙媒体の委任状を当討論会の受付にも用意しておりますので、メールで提出しなかった方は、総会開始までに受付までご提出ください。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. 日本核磁気共鳴学会評議員会・新評議員会・新理事会の案内

2022年11月8日（火）18時10分より、事務棟4階第9多目的室（和室）において、評議委員会、新評議員会、新理事会を開催いたします。総会で承認された新評議員も出席の必要がございます。新理事会は新評議員会が終了次第、開催いたします。

チュートリアルコース

日時：2022年11月7日（月）12:30～18:30（受付12:00～）

会場：高知県立県民文化ホール・オレンジホール（受付：オレンジホールロビー）

(1) 12:30～14:00

AX3 スピン系は訳分らないけど、やはり「メチル基」様様

池上 貴久 先生（横浜市立大学）

溶液 NMR に限ったことではないが、何かサンプルの ^1H , ^{13}C -NMR を測定すると、溶媒のピークを除いて真っ先に目に飛び込んでくるのはメチル基のピークではないだろうか？シャープで一際高くそびえ立つピークを見ると、少なくともサンプルが溶けていたことにホッと一安心するのは筆者だけではなからう。これは低分子だけでなく高分子の場合でも同じで、特に蛋白 NMR の分野では分子量が5万を超える辺りから、これまでの $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ アミド基ではなく、 $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ メチル基が主役に躍り出た。今では試料作りも測定法もかなりルーチン化されているが、ふと、「何故メチル基はそれほど感度が高く、1MDa レベルでも観測可能なのか？」という点が気になることがある。「それはもちろん ^1H ピークが3つも重なっているからだよ」という答が速攻で返ってきそうである。少し高度になると「それは“メチル TROSY”のせいだよ」という答。それでは「何故その TROSY は HMQC であって HSQC ではないの？」「メチル TROSY があるなら、メチレン TROSY もあっていいよね？」「メチル基以外を重水素化するのは高くつくから軽水素でいいよね？」など、突き詰めていくと上手く説明できないことも多いような気がする。今回はこれを機にこれらの疑問点を解決したい。また、普通は3つの ^1H の化学シフトが同じ場合は、その間の J カップリングは表面的には効かない。そのため、 I_x から $I_x I_z I_z$ などは生じないはずであるが、メチル基という木ではこの禁断の果実がいきなり生まれる。その仕組みについても触れたい。

(2) 14:10～15:40

Q を上げると感度が良くなるのではなく、感度を良くすると Q が上がるんです

武田 和行 先生（京都大学）

NMR を愛で楽しんでいると、日々いろいろな疑問を抱く。そのうち以下について解説する：

・プローブの共振回路の Q 値が高いと感度がよい！？

これは微妙である。例えばクライオプローブは Q 値が高く、感度が通常のプローブに比べて格段に高い。だが感度が良い理由は「Q 値が高いから」ではなく、回路が冷やされて熱雑音が小さくなるから、である。回路が冷えると電気抵抗が小さくなる。その「結果」、Q 値が高くなる。つまり Q 値が高くなるのは結果であって、原因ではない。以前サッカー日本代表選手（誰かは忘れた）のインタビューで、「強いから勝つんじゃない。勝った方が強いんです。」という印象的なコメントを聞いたことがある。ちょっと

ロジックが似ている。

・テンソルって何？

核スピン相互作用を語るときに欠かせないのがテンソル。「テンソル」という用語を調べてみると、「回転にともないある規則にしたがって変化する量」、とか説明されていたりする。最近、「 n 階のテンソルとは、 n 個のベクトルを受け取って、数値を返す線形マシンである」旨の説明に出会った。これは実に面白い。紹介したい。

・磁気なのに電気、これ如何に？

核「磁気」共鳴でお馴染みの四極子相互作用は「電気」相互作用である。何か不思議だ。解説する。

(3) 15:50~16:50

計測手法としての MRI をどのように使っていくか

拝師 智之 先生 (国際医療福祉大学)

MRI は 1973 年に P. Lauterbur 博士によって発見され、その後は ^1H -MRI として、医療分野で目覚ましい発展を遂げた。世の中のほぼすべての MRI は医療用であり、生体中の細胞内液、外液に含まれる ^1H プロトン (T_1 緩和時間 \sim 1 秒、 T_2 緩和時間 \sim 100ms) のみを対象とした、緩和時間を強調した ^1H 核磁化分布の計測と言い切ってもよいであろう。

MRI の計測は、 G_x, G_y, G_z の三軸に直交した勾配磁場「mT/m」(=医療業界では傾斜磁場) によって空間的に異なる歳差運動周波数を与えている、とされているが、本講義では、空間周波数空間 (k 空間) と、時間軸に沿って巧妙に併せこまれた MRI 信号の関係を、初学者のために解説したい。この位置情報のエンコードに、Repetition 時間毎の、冒頭の励起パルス (例えば 90°) 後から勾配磁場の駆動に数 ms が必ず必要であり、足の速い横磁化は掴まえられず可視化できないし、頑張っても掴まえても緩和時間情報 (= 被写体の特徴) が失われた単なる分布像になってしまう。

MRI は核磁化の分布を計測する手法なので NMR 信号は細切れにされる方向にあり、いつでも感度が不足している。一方で、時間変化する場合や、in-vivo、in-situ 計測であるからこそ重要性が見いだせる。人体以外の MRI 計測を行う場合で、特に、静磁場強度 B_0 [Tesla] と RF コイルを自作することとその形状・大きさの選択がキーファクターとなる。水分の少ない試料での ^1H -MRI、多核として ^7Li および ^{23}Na -MRI の実例を挙げて、MRI の適用可能性を考える。

(4) 17:00~18:30

NMR を創った人たち：第 1 話 夜明け前 [2] Isidor I. Rabi, 分子線磁気共鳴法の開発

寺尾 武彦 先生 (京都大学)

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、未踏の地に道を切り開いた開拓者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が、我々にとって間違いなく貴重な財産になるだろう。そのためには、研究を行なった本人の育った環境や受けた教育、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多面的に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ることを願っている。今回は、Bloch と Purcell に先立って分子線で NMR を実現した Rabi の人生後半の物語を話す予定である。

第 61 回 NMR 討論会 (2022)

The 61st Annual Meeting of the Nuclear Magnetic Resonance Society of Japan (2022)

会 期：2022 年 11 月 8 日 (火) ~10 日 (木)

November 8 – 10, 2022

会 場：高知県立県民文化ホール

Kochi Prefectural Culture Hall

〒780-0870 高知県高知市本町 4 丁目 3 - 30

第 1 日目 11 月 8 日 (火) / Day 1 (Tue. 8th Nov.)

- 9:30-13:30 ポスター貼付【会場：第一・第二ポスター会場】
9:30-17:00 展示会【会場：オレンジホールロビー】
9:25-9:30 事務連絡【会場：オレンジホール】
9:30-9:40 開会の挨拶 藤原 敏道 (日本核磁気共鳴学会会長)
Opening Remarks by Prof. Toshimichi Fujiwara
(President of the Nuclear Magnetic Resonance Society of Japan)

一般演題 I 【会場：オレンジホール】

9:40-11:50 座長：浅野 敦志 (L1-1 ~ L1-3), 梶 弘典 (L1-4 ~ L1-6)

9:40-10:00

L1-1 ^1H - ^{13}C 二重共鳴 NMR のための小型電気-機械-光変換プローブ

○富永 雄介¹⁾、武田 和行¹⁾

¹⁾京都大学大学院理学研究科

10:00-10:20

L1-2 高温超伝導バルク磁石表面勾配磁場を用いた拡散 NMR 測定装置の開発

○高橋 雅人¹⁾²⁾、菊池 翔²⁾、坂井 直道²⁾、村上 雅人²⁾、横山 和哉³⁾、Tritrakarn Techit⁴⁾、
岡村 哲至⁴⁾、岡 徹雄¹⁾²⁾、仲村 高志⁵⁾²⁾

¹⁾理化学研究所生命機能科学研究センター、²⁾芝浦工業大学大学院理工学研究科、³⁾足利大学工学部、⁴⁾東京工業大学工学院機械系、⁵⁾理化学研究所環境資源科学研究センター

10:20-10:40

L1-3 Sec 非依存性膜蛋白質膜挿入における大腸菌由来糖脂質 MPIase の作用機構の解明

○野村 薫¹⁾、森 祥子¹⁾、大澤 月穂¹⁾、藤川 紘樹¹⁾、西山 賢一²⁾、島本 啓子¹⁾

¹⁾公益財団法人サントリー生命科学財団生物有機科学研究所、²⁾岩手大学農学部

10:40-10:50 休憩/Break time

10:50-11:10

L1-4 三次元磁場配向プローブによる微結晶粉末の in situ 単結晶 NMR

○久住 亮介¹⁾、安井 颯¹⁾、門間 啓¹⁾、和田 昌久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

11:10-11:30

L1-5 細胞内構造生命科学に向けた DNP-MAS-NMR の装置・方法論開発と応用

○松木 陽¹⁾²⁾、藤原 敏道¹⁾²⁾

¹⁾大阪大学蛋白質研究所、²⁾大阪大学量子情報・量子生命研究センター

11:30-11:50

L1-6 DNP-SENS of metal oxides and sulfides

○永島 裕樹¹⁾、Julien Trebosc³⁾、今 喜裕¹⁾、Yannick Coppel⁵⁾、Myrtil L. Kahn⁵⁾、Olivier Lafon²⁾、Jean-Paul Amoureux²⁾⁴⁾

¹⁾産業技術総合研究所触媒化学融合研究センター、²⁾University of Lille, CNRS, UCCS, Lille, France、³⁾University of Lille, CNRS, IMEC, Lille, France、⁴⁾Bruker BioSpin, Wissembourg, France、⁵⁾LCC-CNRS, University of Toulouse, Toulouse, France

11:50-12:20 2022 年度日本核磁気共鳴学会総会/General Meeting of the NMR Society of Japan

【会場：オレンジホール】

12:20-13:30 昼食/Lunch

13:30-15:00 ポスターセッション I (偶数番号、若手ポスター賞審査)

【会場：事務棟 4 階 (第 6 多目的室と第 7,8 多目的室)】

一般演題 II 【会場：オレンジホール】

15:00-17:50 座長：竹内 恒 (L2-1 ~ L2-4)、児嶋 長次郎 (L2-5 ~ L2-8)

15:00-15:20

L2-1 シアノバクテリアの光センサーにおける脱プロトン化した塩基性アミノ酸の観測

○永江 峰幸¹⁾、飯塚 佑介¹⁾、青山 洋史¹⁾、宮ノ入 洋平²⁾、神野 智司³⁾、伊藤 隆⁴⁾、
広瀬 侑⁵⁾、三島 正規¹⁾

¹⁾東京薬科大学薬学部、²⁾大阪大学蛋白質研究所、³⁾株式会社 CRYO SHIP、⁴⁾東京都立大学理学研究科、⁵⁾豊橋技術科学大学工学研究科

15:20-15:40

L2-2 In-cell NMR 法によるヒト生細胞内における核酸の塩基対開閉ダイナミクスの解析

○山置 佑大¹⁾²⁾、永田 崇¹⁾²⁾、近藤 敬子¹⁾、阪本 知樹²⁾、Eladl Omar²⁾、
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

15:40-16:00

L2-3 メチオニン側鎖メチル基の信号観測による細菌べん毛モーター固定子のNa⁺イオン結合による構造変化の解析

○錦野 達郎¹⁾、小嶋 誠司²⁾、本間 道夫²⁾、宮ノ入 洋平¹⁾

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生命理学専攻

16:00-16:20

L2-4 インバース型拡散プローブを用いた合成高分子のDOSY測定

○右手 浩一¹⁾、渡邊 一也¹⁾²⁾、高松 京祐¹⁾、渡邊 颯¹⁾、徳田 規紘¹⁾

¹⁾徳島大学大学院社会産業理工学研究部、²⁾KURITA EUROPE GmbH R&D department

16:20-16:30 休憩/Break time

16:30-16:50

L2-5 残基特異的 LFER 関係はポリペプチド鎖のスムーズな構造変化のための物理化学的要件である

○神田 大輔¹⁾、林 成一郎¹⁾、藤浪 大輔²⁾

¹⁾九州大学生体防御医学研究所、²⁾静岡県立大学薬食生命科学総合学府

16:50-17:10

L2-6 ATP とタンパク質との弱い非特異的相互作用

西澤 茉由²⁾、Walinda Erik³⁾、森本 大智²⁾、 Benjamin Kohn⁴⁾、 Ulrich Scheler⁴⁾、
白川 昌宏²⁾、○菅瀬 謙治¹⁾²⁾

¹⁾京都大学大学院農学研究科、²⁾京都大学大学院工学研究科、³⁾京都大学大学院医学研究科、
⁴⁾Leibniz-Institut für Polymerforschung Dresden

17:10-17:30

L2-7 Paip2A inhibits translation by competitively binding to the RNA recognition motifs of poly(A)-binding protein C1 and promoting its dissociation from the poly(A) tail

寒河江 彪流¹⁾、横川 真梨子¹⁾、沢崎 綾一¹⁾、石井 裕一郎¹⁾、細田 直²⁾、星野 真一²⁾、
今井 駿輔³⁾⁴⁾、嶋田 一夫³⁾⁴⁾、○大澤 匡範¹⁾

¹⁾慶應義塾大学大学院薬学研究科、²⁾名古屋市立大学大学院薬学研究科、³⁾東京大学大学院薬学系
研究科、⁴⁾理化学研究所生命機能科学研究センター

17:30-17:50

L2-8 アデノシン A_{2A} 受容体とリガンドの滞在時間を規定する構造基盤の解明

○上田 卓見¹⁾、土田 知輝¹⁾、栗田 政稔¹⁾、水村 拓也¹⁾、今井 駿輔¹⁾²⁾、
白石 勇太郎¹⁾²⁾、幸福 裕¹⁾、竹内 恒¹⁾、嶋田 一夫¹⁾²⁾

¹⁾東京大学大学院薬学系研究科、²⁾理化学研究所生命機能科学研究センター

18:10-20:00 日本核磁気共鳴学会評議員会・新評議員会・新理事会

【会場：事務棟4階 第9多目的室（和室）】

総会で承認された新評議員も出席、新理事会は新評議員会終了後に開催。

第 2 日目 11 月 9 日 (水) / Day 2 (Wed. 9th Nov.)

9:30-17:00 Corporate Exhibition 【venue : Orange-Hall Lobby】

9:30-17:00 Poster Exhibition 【venue : 4th floor of the office building next to the Hall】

Lecture Session III 【venue : Orange Hall】

9:40-11:50 Chairpersons: Takahisa Ikegami (L3-1 ~ L3-3) and Yoh Matsuki (L3-4 ~ L3-6)

9:40-10:00

L3-1 Mapping the per-residue surface electrostatic potential of CAPRIN1 along its phase separation trajectory

○Yuki Toyama^{1) 2) 3)}, Atul Kaushik Rangadurai^{1) 2) 3) 4)}, Julie D. Forman-Kay^{2) 4)},
Lewis E. Kay^{1) 2) 3) 4)}

^{1)Department of Molecular Genetics, University of Toronto, ^{2)Department of Biochemistry, University of Toronto, ^{3)Department of Chemistry, University of Toronto, ^{4)Hospital for Sick Children, Program in Molecular Medicine}}}}

10:00-10:20

L3-2 Biphasic activation of β -arrestin 1 upon interaction with a GPCR revealed by methyl-TROSY NMR

○Yutaro Shiraishi¹⁾, Yutaka Kofuku²⁾, Takumi Ueda²⁾, Shubhi Pandey³⁾,
Hemlata Dwivedi-Agnihotri³⁾, Arun K. Shukla³⁾, Ichio Shimada¹⁾

^{1)RIKEN Center for Biosystems Dynamics Research, ^{2)Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo, ^{3)Department of Biological Sciences and Bioengineering, Indian Institute of Technology, Kanpur}}}

10:20-10:40

L3-3 An affinity-driven protonation-coupled substrate transport of a MATE transporter

○Koh Takeuchi¹⁾, Ichio Shimada²⁾

^{1)Graduate School of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo, ^{2)RIKEN Center for Biosystems Dynamics Research}}

10:40-10:50 **Break time**

10:50-11:10

L3-4 Correlation and distance measurements between ^1H and ^{14}N using ^{14}N overtone NMR spectroscopy

○Yusuke Nishiyama^{1) 2)}

¹⁾RIKEN-JEOL Collaboration Center, RIKEN, ²⁾JEOL RESONANCE Inc.

11:10-11:30

L3-5 Revealing cation disorder and hydrogen bonding in minerals via multi-nuclear NMR and first-principles calculation

○Xianyu Xue¹⁾

¹⁾Institute for Planetary Materials, Okayama University

11:30-11:50

L3-6 Innovations in High-field Protein Solid-state NMR and its Applications to Amyloid- β Fibrils and Other Biomolecules

Ayesha Wickramasinghe²⁾, Tatsuya Matsunaga²⁾, Isamu Matsuda¹⁾, Mohammad Jafar Tehrani¹⁾, Hibiki Terami¹⁾, Yoshiki Shigemitsu¹⁾, Naohiro Kobayashi²⁾, ○Yoshitaka Ishii^{1), 2)}

¹⁾School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology, Yokohama, Japan, ²⁾BDR Center, RIKEN, Yokohama, Japan

11:50-13:30 **Lunch**

Invited Lectures 【venue : Orange Hall】

13:30-15:25 Chairpersons: Kazuhiko Yamada (IL-1), Yoshitaka Ishii (IL-2), Shinichi Tate (IL-3)

13:30-14:05

IL-1 NMR-Based Molecular Rheology for the Study of Chain Motion in Complex Polymer Systems

○Kay Saalwächter¹⁾, Anton Mordvinkin¹⁾, Marcus Suckow²⁾, Diana Döhler³⁾, Frank Böhme²⁾, Wolfgang H. Binder³⁾, Ralph H. Colby⁴⁾

¹⁾Institut für Physik – NMR, Martin-Luther-Univ. Halle, Germany, ²⁾IPF Dresden, Germany,

³⁾Macromol. Chemistry, MLU Halle, Germany, ⁴⁾Penn State U, State College, USA

14:05-14:40

IL-2 Non-Covalent Secondary Bonding Interactions Examined via Multinuclear Solid-State Magnetic Resonance

○David L. Bryce¹⁾

¹⁾University of Ottawa, Ottawa, Canada.

14:40-14:50 **Break time**

14:50-15:25

IL-3 Studying protein weak interaction by NMR

○Nico Tjandra¹⁾

¹⁾Biochemistry and Biophysics Center, National Heart, Lung, and Blood Institute, National Institutes of Health, Bethesda, U.S.A.

15:25-15:35 Honorary-Member Award Ceremony by the Nuclear Magnetic Resonance Society of Japan 【venue : Orange Hall】

Chairperson: Toshimichi Fujiwara

15:35-15:45 **Break time**

Award lectures 【venue : Orange Hall】

15:45-16:55 Chairpersons: Yutaka Ito and Koh Takeuchi

15:45-15:55

Award Ceremony by the Nuclear Magnetic Resonance Society of Japan

15:55-16:25

AL-1 Clarification of the GPCR signaling mechanism based on the function-related conformational dynamics

○Takumi Ueda¹⁾

¹⁾Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo

16:25-16:55

AL-2 Atomic-level elucidation of amyloid formation mechanism by NMR spectroscopy

○Daichi Morimoto¹⁾

¹⁾Department of Molecular Engineering, Kyoto University

16:55-17:05 **Break time**

Honorary Lectures 【venue : Orange Hall】

17:05-18:25 Chairperson: Gota Kawai (Vice-President of the Nuclear Magnetic Resonance Society of Japan)

17:05-17:15

Honorary-Lecture Ceremony by the Nuclear Magnetic Resonance Society of Japan

17:15-17:50

HL-1 Pulse!

○K. Takegoshi¹⁾

¹⁾*Kyoto Univ. Kyoto, Japan*

17:50-18:25

HL-2 Tips to prevent aggregation and denaturation of proteins/peptides in solution NMR

○Kaori Wakamatsu¹⁾

¹⁾*Gunma University, Kiryu, Gunma, Japan.*

19:00-21:00

Banquet 【venue : Sansuien】

MC: Takashi Nakamura

第3日目 11月10日(木) / Day 3 (Thu. 10th Nov.)

9:30-12:30 展示会

9:30-11:00 ポスター展示

一般演題 IV 【会場：オレンジホール】

9:40-10:40 座長：菅瀬 謙治 (L4-1 ~ L4-3)

9:40-10:00

L4-1 Gタンパク質共役型受容体 β_2 ARのリガンド依存的活性化機構

○今井 駿輔¹⁾、横溝 智貴¹⁾²⁾、幸福 裕²⁾、白石 勇太郎¹⁾、上田 卓見²⁾、嶋田 一夫²⁾

¹⁾理化学研究所生命機能科学研究センター、²⁾東京大学大学院薬学系研究科

10:00-10:20

L4-2 ヒト細胞を用いた in-cell NMR: タンパク質の立体構造および運動性の解析

○古板 恭子¹⁾、児玉 高志¹⁾²⁾³⁾、杉木 俊彦¹⁾、赤木 謙一²⁾、物部 容子²⁾、榎園 能章³⁾、
門田 典子⁴⁾、中村 光咲⁴⁾、服部 良一¹⁾、猪俣 晃介⁵⁾⁶⁾、白川 昌宏⁵⁾、朽尾 豪人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⁾医薬基盤・健康・栄養研究所、³⁾京都大学理学研究科、⁴⁾横浜国立大学大学院工学研究院、⁵⁾京都大学工学研究科、⁶⁾理化学研究所生命システム研究センター

10:20-10:40

L4-3 高圧力 NMR 法による大腸菌ジスルフィド結合形成酵素 DsbA の酸化還元状態非依存的な構造揺らぎの発見

○北原 亮¹⁾、山本 純也²⁾、北沢 創一郎¹⁾、宮ノ入 洋平³⁾、Biswaranjan Mohanty⁴⁾、
Martin Scanlon⁵⁾

¹⁾立命館大学薬学部、²⁾立命館大学大学院薬学研究科、³⁾大阪大学蛋白質研究所、⁴⁾シドニー大学分析研究所、⁵⁾モナッシュ大学薬学研究科

10:40-11:00 休憩/Break time

11:00-12:30 ポスターセッション II (奇数番号)

【会場：事務棟4階(第6多目的室と第7,8多目的室)】

12:30-13:30 昼食/Lunch

一般演題 V 【会場：オレンジホール】

13:30-16:00 座長：浅川 直紀 (L5-1 ~ L5-4), 右手 浩一 (L5-5 ~ L5-7)

13:30-13:50

L5-1 NMR Spectra Recognition with Neural Networks and Deep Learning

○山内 一夫¹⁾、宋 子豪²⁾、甘 莉²⁾、蔣 佳稀²⁾、胡 知彦²⁾、大西 裕季²⁾、熊木 康裕²⁾、相沢 智康²⁾

¹⁾沖縄科学技術大学院大学機器分析セクション、²⁾北海道大学大学院先端生命科学研究院

13:50-14:10

L5-2 MOF 配位子の回転と関連した CO₂ の吸着ダイナミクス

○栗原 拓也¹⁾、犬飼 宗弘²⁾、水野 元博³⁾⁴⁾

¹⁾金沢大学理工研究域、²⁾徳島大学大学院社会産業理工学研究部、³⁾金沢大学ナノマテリアル研究所、⁴⁾金沢大学新学術創成研究機構

14:10-14:30

L5-3 常磁性 CeF₃ のフッ化物イオン伝導の固体 NMR 解析

○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

14:30-14:50

L5-4 固体 NMR による有機 EL 発光材料の定量的非晶構造解析

○梶 弘典¹⁾、鈴木 克明¹⁾

¹⁾京都大学化学研究所

14:50-15:00 休憩/Break time

15:00-15:20

L5-5 測定中にパラメータを自律的に選択することで高精度を目指す適応的 NMR 測定法

○葛西 卓磨¹⁾、木川 隆則¹⁾

¹⁾理化学研究所生命機能科学研究センター

15:20-15:40

L5-6 生体試料の卓上 NMR 装置による分析手法の検討

○相沢 智康¹⁾、宋 子豪¹⁾、甘 莉¹⁾、蔣 佳稀¹⁾、胡 知彦¹⁾、大西 裕季¹⁾、長田 誠司²⁾、久米田 博之¹⁾、熊木 康裕¹⁾、山内 一夫³⁾

¹⁾北海道大学大学院先端生命科学研究院、²⁾中山商事株式会社、³⁾沖縄科学技術大学院大学機器分析セクション

15:40-16:00

L5-7 NMR解析を用いた解糖系酵素 PGK の環境適応的活性制御による解糖系調節機構

○八木 宏昌¹⁾、葛西 卓磨¹⁾、Elisa Rioual¹⁾、池谷 鉄兵²⁾、木川 隆則¹⁾

¹⁾理化学研究所生命機能科学研究センター、²⁾東京都立大学理学部

16:00-16:05 閉会の挨拶（世話人）

ポスター発表/Poster presentation

会場：事務棟 4 階

ポスター番号 P1～P58： 第一ポスター会場（第 6 多目的室）

ポスター番号 P59～P94Y： 第二ポスター会場（第 7, 8 多目的室）

発表日：

偶数番号： 2022 年 11 月 08 日(火)13:30-15:00

奇数番号： 11 月 10 日(木)11:00-12:30

（偶数番号の末尾 Y：若手ポスター賞エントリー）

ポスター掲示： 11 月 8 日 9:30-13:30

ポスター撤去： 11 月 10 日 12:30-13:30

P1 B型肝炎ウイルス X 蛋白質 (HBx) の C 末側欠失変異体ペプチドと抗アポトーシス蛋白質 Bcl-x_L の相互作用の NMR 解析

○楠 英樹¹⁾、坂本 泰一²⁾、河野 俊之³⁾、若松 馨⁴⁾、浜口 功¹⁾、永田 崇⁵⁾

¹⁾国立感染症研究所次世代生物学的製剤研究センター、²⁾千葉工業大学先進工学部、³⁾北里大学医学部、⁴⁾群馬大学大学院理工学府、⁵⁾京都大学エネルギー理工学研究所

P2Y フルオロキノロン化合物と RNA との相互作用解析：近接する塩基対の影響の解析

○一條 梨花¹⁾、上村 孝²⁾、河合 剛太¹⁾

¹⁾千葉工業大学、²⁾株式会社 Veritas In Silico

P3 水溶液試料における Pure Shift 測定の試み

○高橋征三¹⁾、河合 剛太¹⁾

¹⁾千葉工業大学大学院生命科学研究科

P4Y 針状常磁性体を用いた走査型 ex-situ 固体 NMR による高分子薄膜材料のイメージング法の開発

○河端 夏輝¹⁾、浅川 直紀¹⁾

¹⁾群馬大学大学院物質・生命理工学研究科

P5 片側開放型 NMR による建築材料の含水率の原位置・非破壊計測にむけて

○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

- P6Y X 染色体不活性化に関与する Xist-SHARP 複合体の相互作用解析**
○長谷川 拓矢¹⁾、柳沢 耕太¹⁾、鈴木 拓巳²⁾、中島 弘稀²⁾、永江 峰幸³⁾、青山 洋史³⁾、三島 正規²⁾³⁾、坂本 泰一¹⁾
¹⁾千葉工業大学先進工学研究科、²⁾東京都立大学院理学部、³⁾東京薬科大学薬学部
- P7 高精度リングング評価方法の開発**
○山本 航輝¹⁾、トリトラカーン テシット¹⁾、高橋 雅人²⁾、岡村 哲至¹⁾
¹⁾東京工業大学工学院機械系、²⁾理化学研究所生命機能科学研究センター
- P8Y Double nutation cross polarization**
○王 雨¹⁾、武田 和行¹⁾
¹⁾京都大学大学院理学研究科化学専攻
- P9 Presaturation pulse を用いた正確な ¹H-qNMR の検討**
○斎藤 直樹¹⁾
¹⁾国立環境研究所 環境リスク・健康領域 基盤計測センター
- P10Y 変調したマイクロ波を用いた動的核偏極効率の向上**
○張 仲良¹⁾、松木 陽¹⁾²⁾、藤原 敏道¹⁾²⁾
¹⁾大阪大学蛋白質研究所、²⁾大阪大学量子情報・量子生命研究センター
- P11 磁場掃引 SWIFT による 3次元 MRI**
○澤田 永¹⁾、武田 和行¹⁾
¹⁾京都大学大学院理学研究科
- P12 同軸チューブを用いた qNMR における測定管ロット管理の重要性**
○小倉 立己¹⁾²⁾、若山 正隆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
- P13 高磁場 B₁不均一分布でのヒト脳 ¹H MRS 代謝物定量化法の開発**
○渡邊 英宏¹⁾、高屋 展宏¹⁾、斎藤 直樹¹⁾
¹⁾国立環境研究所環境リスク・健康領域
- P14Y CGG リピート結合薬剤ナフチリジンダイマーによる DNA 認識機構の NMR 解析**
○櫻林 修平¹⁾²⁾、古板 恭子¹⁾、山田 剛史²⁾、藤原 敏道¹⁾、中谷 和彦²⁾、児嶋 長次郎¹⁾³⁾
¹⁾大阪大学蛋白質研究所、²⁾大阪大学産業科学研究所、³⁾横浜国立大学大学院工学研究院

- P15 昆虫細胞発現系におけるアラニン選択標識法の開発**
 ○幸福 裕¹⁾、横溝 智貴¹⁾、今井 駿輔¹⁾、白石 勇太郎¹⁾、五十嵐 俊介²⁾、山口 秀幸²⁾、水越 利巳²⁾、鈴木 榮一郎²⁾³⁾、嶋田 一夫¹⁾
¹⁾東京大学大学院薬学系研究科、²⁾味の素株式会社、³⁾社団法人日本バイオ産業情報化コンソーシアム
- P16 マテリアルリサイクルの高度化を指向した汎用プラスチックフィルムの固体 NMR 解析**
 ○田中 真司¹⁾、Phanthong Patchiya²⁾、杉田 知子¹⁾、八尾 滋²⁾
¹⁾産業技術総合研究所触媒化学融合研究センター、²⁾福岡大学工学部
- P17 定量 NMR 用認証標準物質(フタル酸水素カリウム, NMIJ CRM 4603-a)の開発**
 ○山崎 太一¹⁾、清水 由隆¹⁾、北牧 祐子¹⁾、中村 哲枝¹⁾、鮑 新努¹⁾、伊藤 信靖¹⁾
¹⁾産業技術総合研究所物質計測標準研究部門
- P18Y 光照射溶液 NMR 技術を用いたプロトンポンプ型ロドプシン R_xR の暗状態および光反応サイクル中間体における構造特性解析**
 ○鈴木 里佳¹⁾、廣西 麗加¹⁾、小島 慧一²⁾、須藤 雄気²⁾、長島 敏雄³⁾、山崎 俊夫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⁾岡山大学大学院学術研究院医歯薬域薬学系、³⁾理化学研究所生命機能科学研究センター
- P19 CO₂ のダイナミクスを通じた多孔性配位高分子の構造転移過程の解析**
 ○曾利 惟恵¹⁾、栗原 拓也¹⁾、雨森 翔悟²⁾、重田 泰宏²⁾、井田 朋智¹⁾、水野 元博¹⁾²⁾
¹⁾金沢大学大学院自然科学研究科、²⁾金沢大学ナノマテリアル研究所
- P20Y 酸素同位体および高感度固体 ¹⁷O NMR による石炭の酸化反応機構解析**
 ○畑 友輝¹⁾⁴⁾、奥下 慶子¹⁾、高橋 貴文¹⁾、金橋 康二²⁾、齋藤 公児³⁾、則永 行庸⁴⁾
¹⁾日本製鉄株式会社先端技術研究所、²⁾日鉄テクノロジー株式会社、³⁾日鉄総研株式会社、⁴⁾名古屋大学
- P21 Magnetically manipulated goniometer**
 ○上出 友哉¹⁾、武田 和行¹⁾
¹⁾京都大学大学院理学研究科
- P22Y 遺伝的アルゴリズムによる RF コイルの最適化設計及び評価法の開発**
 ○TRITRAKARN Techit¹⁾、山本 航輝¹⁾、高橋 雅人²⁾、岡村 哲至¹⁾
¹⁾東京工業大学工学院機械系、²⁾理化学研究所生命機能科学研究センター

- P23** イネ粒重を抑制する TGW6 の阻害剤開発を目指した ^{19}F NMR フラグメントスクリーニング
 ○赤羽根 健生¹⁾、長門石 暁²⁾、津本 浩平³⁾、廣津 直樹¹⁾、加藤 悦子⁴⁾
¹⁾東洋大学大学院生命科学研究科、²⁾東京大学医科学研究所、³⁾東京大学大学院工学系研究科、⁴⁾東洋大学食環境科学部
- P24Y** ベンチトップ NMR による炎症性腸疾患モデルマウスのメタボロミクス研究
 ○宋 子豪¹⁾、大西 裕季¹⁾、長田 誠司²⁾、甘 莉¹⁾、蔣 佳稀¹⁾、胡 知彦¹⁾、
 久米田 博之¹⁾、熊木 康裕¹⁾、中村 公則¹⁾、綾部 時芳¹⁾、山内 一夫³⁾、相沢 智康¹⁾
¹⁾北海道大学大学院生命科学院、²⁾中山商事 (株)、³⁾沖縄科学技術大学院大学
- P25** ヒト NMR データのフェデレーテッドラーニング
 ○藤村 礼¹⁾、山田 隼嗣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
- P26Y** ^{14}N NMR における磁場依存性: 高磁場の方が有利か?
 ○魚返 祐太郎¹⁾²⁾、西山 裕介¹⁾²⁾
¹⁾JEOL RESONANCE、²⁾理化学研究所理研-JEOL 連携センター
- P27** 多核固体 NMR を用いた高炉セメント中性化挙動の解析
 ○高橋 貴文¹⁾、諸岡 等¹⁾、大塚 勇介²⁾
¹⁾日本製鉄株式会社、²⁾日鉄高炉セメント株式会社
- P28Y** 卓上 NMR を用いた母乳中のラクトースの定量
 ○蔣 佳稀¹⁾、胡 知彦¹⁾、甘 莉¹⁾、宋 子豪¹⁾、大西 裕季¹⁾、長田 誠司²⁾、
 久米田 博之¹⁾、熊木 康裕¹⁾、山内 一夫³⁾、相沢 智康¹⁾
¹⁾北大・院生命科学、²⁾中山商事 (株)、³⁾沖縄科学技術大学院大学機器分析セクション
- P29** Aggregation kinetics and Structural Insight of α -synuclein Monomers Cross-seeded with β -amyloid Fibrils
 ○Li Bing Kee,¹⁾ Takayuki Kamihara,^{1,2)} Tatsuya Matsunaga,²⁾ Yoshiki Shigemitsu,¹⁾
 Isamu Matsuda,¹⁾ Yoshitaka Ishii^{1,2)}
¹⁾School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology
²⁾Advanced NMR Development & Application Team, BDR Center, RIKEN

- P30** **Solution-state polyubiquitin binding specificity exhibited by the extended NZF domain of LUBAC component HOIL-1L**
 ○Erik Walinda¹⁾, Kenji Sugase²⁾, Masahiro Shirakawa²⁾, Kazuhiro Iwai¹⁾, Daichi Morimoto²⁾
¹⁾Kyoto University Graduate School of Medicine Department of Molecular and Cellular Physiology, ²⁾ Kyoto University Graduate School of Engineering Department of Molecular Engineering
- P31** **固体 NMR と MD シミュレーションによるヒトカルシトニンの変異とクルクミン添加による線維形成阻害機構の解明**
 ○内藤 晶¹⁾、伊藤一渡邊 ひかり¹⁾、豊田 修平¹⁾、Javkhlantugs Namsrai^{1) 2)}、川村 出¹⁾、上田 一義¹⁾
¹⁾横浜国立大学大学院工学研究院、²⁾国立モンゴル大学工学応用科学科
- P32Y** **酸化チタンナノシートと非界面活性剤スルフォペタインを用いた蛋白質の RDC 測定手法開発**
 ○板坂 佑真¹⁾、小籠 蒼¹⁾、古板 恭子²⁾、杉木 俊彦²⁾、若松 馨³⁾、内田 紀之⁴⁾、石田 康博⁴⁾、相田 卓三⁵⁾、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、³⁾群馬大学大学院理工学府、⁴⁾理化学研究所創発物性科学研究センター、⁵⁾東京大学大学院工学系研究科
- P33** **α -グルコシダーゼ阻害物質を含むクワ葉の投与によるマウス腸内環境への影響の NMR メタボロミクス解析**
 ○甘 莉¹⁾、稲村 勇雅¹⁾、宋 子豪¹⁾、大西 裕季¹⁾、熊木 康裕¹⁾、相沢 智康¹⁾
¹⁾北海道大学大学院生命科学院
- P34Y** **NMR analysis of 2'-fucosyllactose in human breast milk**
 ○胡 知彦¹⁾、蔣 佳稀¹⁾、甘 莉¹⁾、宋 子豪¹⁾、大西 裕季¹⁾、長田 誠司²⁾、久米田 博之¹⁾、熊木 康裕¹⁾、山内 一夫³⁾、相沢 智康¹⁾
¹⁾北大・院生命科学、²⁾中山商事 (株)、³⁾沖縄科学技術大学院大学機器分析セクション
- P35** **ナノダイヤモンドを分極剤として用いた DNP-MAS-NMR の生体分子への応用**
 ○加藤 賢¹⁾、田巻 初¹⁾、杉下 友晃¹⁾、藤原 敏道^{1) 2)}、松木 陽^{1) 2)}
¹⁾大阪大学蛋白質研究所、²⁾大阪大学量子情報・量子生命研究センター

- P36Y 時間領域 NMR を用いた生分解性材料の運動性・親水性評価に基づく組成最適化**
 ○山田 隼嗣¹⁾、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
- P37 医薬品の原料粉末における結晶形の定量評価を目的とした T_2 緩和に対する部分的最小二乗回帰の適用**
 ○岡田 康太郎¹⁾、千葉 悠矢¹⁾、林 祥弘²⁾、熊田 俊吾²⁾、大貫 義則¹⁾
¹⁾富山大学薬学部、²⁾日医工株式会社
- P38Y エチレンアイオノマーの構造と熱劣化過程に関する固体 NMR 法と ESR 法による研究**
 ○三影 昇平¹⁾、中澤 千香子¹⁾、浅野 敦志¹⁾
¹⁾防衛大学校応用化学科
- P39 グアニン四重鎖への陽イオン結合の位置選択性と交換過程の研究**
 ○寺村 琢央¹⁾、金折 賢二¹⁾
¹⁾京都工芸繊維大学大学院機能物質化学専攻
- P40Y Q 値を指標にした外部標準法定量 NMR (EC-qNMR) の測定自動化とその定量精度について**
 ○西崎 雄三¹⁾、石附 京子¹⁾、吉村 弘伸²⁾、松熊 伸也²⁾、朝倉 克夫³⁾、末松 孝子²⁾、杉本 直樹¹⁾
¹⁾国立医薬品食品衛生研究所、²⁾株式会社 JEOL RESONANCE、³⁾日本電子株式会社
- P41 PFG NMR 法によるシンジオタクチックポリスチレンにおける気体拡散特性の評価**
 ○吉水 広明¹⁾
¹⁾名古屋工業大学大学院工学研究科
- P42Y 14-3-3ζ による転写因子 FOXO3a の阻害メカニズムの解明**
 ○桑山 知也¹⁾、中塚 将一¹⁾、横川 真梨子¹⁾、河津 光作¹⁾、中村 吏佐¹⁾、木村 友美¹⁾、田辺 幹雄²⁾、千田 俊哉²⁾、齋藤 潤³⁾、佐谷 秀行³⁾、大澤 匡範¹⁾
¹⁾慶應義塾大学大学院薬学研究科、²⁾高エネルギー加速器研究機構物質構造科学研究所構造生物研究センター、³⁾慶應義塾大学大学院医学研究科
- P43 健全な水循環社会に向けた NMR 代謝プロファイルと環境要因のリンク予測**
 ○佐藤 莉帆¹⁾、山田 隼嗣¹⁾²⁾、松本 朋子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⁾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

- P44Y OH 信号をもとにした J coupling の測定および二面角の計算**
○藤村 遥¹⁾、内海 博明¹⁾、笹川 拓明¹⁾
¹⁾株式会社 JEOL RESONANCE
- P45 極低温 MAS-DNP 固体 NMR による多剤結合転写因子 QacR の構造分布解析**
○田巻 初¹⁾、藤原 敏道¹⁾²⁾、松木 陽¹⁾²⁾
¹⁾大阪大学蛋白質研究所、²⁾大阪大学量子情報・量子生命研究センター
- P46Y VEGF165 に対する人工塩基 Ds を含む DNA アプタマーの NMR 解析**
○長濱 友海¹⁾、染谷 龍彦²⁾、坂本 泰一¹⁾
¹⁾千葉工業大学大学院生命科学、²⁾タグシクス・バイオ株式会社
- P47 固体 NMR を用いたアミロイドベータアイソフォームの相互作用の解析**
○親泊 遼¹⁾、松田 勇¹⁾、神原 孝之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⁾理化学研究所生命機能科学研究センター
- P48Y 分子込み合い環境下における DNA 三重鎖構造の塩基対の開閉ダイナミクスの緩和分散法を用いた解析**
○阪本 知樹¹⁾²⁾、山置 佑大¹⁾²⁾、永田 崇¹⁾²⁾、片平 正人¹⁾²⁾
¹⁾京都大学エネルギー理工学研究所、²⁾京都大学大学院エネルギー科学研究科
- P49 In-cell NMR による linear diubiquitin の in-situ 立体構造解析**
○屋部 祥大¹⁾、田岸 亮馬¹⁾、鴨志田 一¹⁾、美川 務²⁾、猪股 晃介¹⁾、池谷 鉄兵¹⁾、伊藤 隆¹⁾
¹⁾東京都立大学大学院理学研究科、²⁾理化学研究所生命機能科学研究センター
- P50Y 化学シフトから推定するヘリックス形成割合**
○柳田 侑樹¹⁾、吉田 清美²⁾、藤原 和夫¹⁾²⁾、池口 雅道¹⁾²⁾
¹⁾創価大学大学院理工学研究科生命理学専攻、²⁾創価大学大学院工学研究科生命情報工学専攻
- P51 高圧 NMR 法によるトランスサイレチンの圧力変性の解析**
○粕谷 尚央¹⁾、山本 京香¹⁾、赤坂 一之²⁾、金折 賢二¹⁾
¹⁾京都工芸繊維大学大学院機能物質化学専攻、²⁾けいはんな文化学術協会
- P52Y スギ及びセイヨウイトスギ花粉由来 GRP アレルゲンの立体構造解析**
○飯塚 友菜¹⁾、鄭 靖康¹⁾、久米田 博之²⁾、熊木 康裕¹⁾、花岡 杏美¹⁾、吉川 一步¹⁾、中嶋 友理枝¹⁾、石原 颯馬¹⁾、相沢 智康²⁾
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

- P53** **プロトン伝導性アルギン酸/2-アルキルイミダゾール複合体の分子運動と局所構造**
 ○細江 菜々花¹⁾、栗原 拓也¹⁾、重田 泰宏²⁾、雨森 翔悟²⁾、井田 朋智¹⁾、水野 元博¹⁾²⁾
¹⁾金沢大学大学院自然科学研究科、²⁾金沢大学ナノマテリアル研究所
- P54Y** **K48 結合型環状ユビキチン鎖の物性解析**
 ○空田 知樹¹⁾、森本 大智¹⁾、Erik Walinda²⁾、菅瀬 謙治³⁾
¹⁾京都大学大学院工学研究科、²⁾京都大学大学院医学研究科、³⁾京都大学大学院農学研究科
- P55** **In-cell NMR による Keap1/Nrf2 系の研究**
 ○豊田 芽生¹⁾、猪股 晃介¹⁾、末広 志織¹⁾、島 海翔¹⁾、池谷 鉄兵¹⁾、鈴木 隆史²⁾、
 山本 雅之²⁾³⁾、伊藤 隆¹⁾
¹⁾東京都立大学大学院理学研究科化学専攻、²⁾東北大学大学院医学系研究科、³⁾東北メディカル・
 メガバンク機構
- P56Y** **HCV ゲノム RNA に存在するキッキンググループ構造の解析**
 ○留守 めぐみ¹⁾、河合 剛太¹⁾
¹⁾千葉工業大学
- P57** **固体 NMR を用いたヒト脳由来 A β 42 線維の研究における試料の最適化と構造解析**
 ○寺見 響¹⁾、重光 佳基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⁾理化学研究所生命機能科学研究センター先端 NMR 開発・応用
 チーム
- P58** **持続可能な高分子材料設計を指向した NMR 記述子抽出**
 ○北山 翔矢¹⁾、横山 大稀¹⁾²⁾、坪井 裕理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環境代謝分
 析研究チーム、³⁾名古屋大学大学院生命農学研究科
- P59** **NMR による閉鎖循環式陸上養殖魚の代謝・肉質分析**
 ○丸橋 愛美¹⁾、横山 大稀³⁾、坂田 研二³⁾、寺山 慧¹⁾²⁾、菊地 淳²⁾³⁾⁴⁾
¹⁾横浜市立大学理学部生命医科学科、²⁾横浜市立大学大学院生命医科学研究科、³⁾理化学研究所環
 境資源科学研究センター、⁴⁾名古屋大学大学院生命農学研究科
- P60** **アミノ酸変異と圧力摂動を用いたタンパク質の変性中間体の安定化**
 ○北沢 創一郎¹⁾、若本 拓朗²⁾、山本 純也³⁾、小出 怜奈³⁾、北原 亮¹⁾
¹⁾立命館大学薬学部、²⁾立命館大学院生命科学部、³⁾立命館大学院薬学部

- P61 小胞体膜貫通蛋白質 VAP-B 及び VAP-B-FFAT motif 複合体の NMR 構造解析**
 ○戸川 航¹⁾、古板 恭子²⁾、小林 直宏³⁾、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、³⁾理化学研究所放射光科学研究センター
- P62Y DNP-NMR によるオクタデシルシリルシリカゲル表面におけるアルキルスルホコハク酸分子吸着構造の解析**
 ○笹原 久武¹⁾、鈴木 克明²⁾、岡村 諭¹⁾、青野 恵太¹⁾、鈴木 不律¹⁾、梶 弘典²⁾
¹⁾花王株式会社、²⁾京都大学化学研究所
- P63 常磁性 NMR を用いた根粒菌マルチドメイン蛋白質 FixJ の立体構造解析**
 ○大久保 里佳¹⁾、池谷 鉄兵¹⁾、渡邊 吏輝¹⁾、菱倉 直樹¹⁾、三島 正規¹⁾³⁾、猪股 晃介¹⁾、小手石 泰康²⁾、澤井 仁美²⁾、城 宣嗣²⁾、伊藤 隆¹⁾
¹⁾東京都立大学大学院理学研究科化学専攻、²⁾兵庫県立大学大学院理学研究科、³⁾東京薬科大学薬学部
- P64Y 残基特異的な熱力学・速度論解析が明らかにする spectrin SH3 ドメインのフォールディング機構**
 ○林 成一郎¹⁾、藤浪 大輔²⁾、神田 大輔¹⁾
¹⁾九州大学生体防御医学研究所、²⁾静岡県立大学薬食生命科学総合学府
- P65 重元素の NMR 化学シフト濃度変化に関する DFT 計算: 相対論効果に基づく観測原子核内での電子スピン密度の現れ**
 ○朝倉 由光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
- P66Y ミューオピオイド受容体のアロステリックモジュレーターによる活性化機構の解明**
 ○金子 舜¹⁾²⁾、今井 駿輔¹⁾、浅尾 信央¹⁾²⁾、幸福 裕²⁾、上田 卓見²⁾、嶋田 一夫¹⁾
¹⁾理化学研究所生命機能科学研究センター、²⁾東京大学大学院薬学系研究科
- P67 マルチドメイン蛋白質 GRB2 と SOS1-PRM 領域の相互作用解析**
 ○館野 桂太¹⁾、菅澤 はるか¹⁾、安藤 考史¹⁾、田端 真彩子¹⁾、美川 務²⁾、猪股 晃介¹⁾、甲斐荘 正恒¹⁾、三島 正規¹⁾⁴⁾、杉田 有治³⁾、池谷 鉄兵¹⁾、伊藤 隆¹⁾
¹⁾東京都立大学大学院理学研究科、²⁾理化学研究所生命機能科学研究センター、³⁾理化学研究所杉田理論分子科学研究室、⁴⁾東京薬科大学薬学部

- P68Y 常磁性 NMR を用いたマルチドメイン蛋白質 GRB2 の立体構造解析**
○安藤 考史¹⁾、菅澤 はるか¹⁾、館野 圭太¹⁾、田端 真彩子¹⁾、美川 務²⁾、
宮野入 洋平³⁾、川端 庸平⁴⁾、Hisham Dokainish⁵⁾、Weitong Ren⁵⁾、大出 真央⁵⁾、
寺内 勉⁶⁾、猪股 晃介¹⁾、三島 正規⁷⁾、甲斐荘 正恒¹⁾、杉田 有治⁵⁾、池谷 鉄兵¹⁾、
伊藤 隆¹⁾、
¹⁾東京都立大学大学院理学研究科、²⁾理化学研究所生命機能科学研究センター、³⁾大阪大学蛋白質
研究所、⁴⁾酪農学園大学食と健康学類、⁵⁾理化学研究所杉田理論分子化学研究室、⁶⁾太陽日酸 SI イ
ノベーションセンター、⁷⁾東京薬科大学薬学部
- P69 魚類へのマイクロプラスチック摂餌における代謝プロファイル安定性評価**
○松永 一太¹⁾²⁾、八木 達紀²⁾、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生命医科学専攻、²⁾理化学研究所環境資源科学研究セン
ター環境代謝分析研究チーム、³⁾名古屋大学大学院生命農学研究科
- P70Y Bullet DNP を用いたピルビン酸の酵素反応実験**
○望月 佑紀¹⁾、深澤 準²⁾、根来 誠²⁾³⁾、北川 勝浩¹⁾²⁾、香川 晃徳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・量子生命研究セン
ター、³⁾量子科学技術研究開発機構
- P71 ペロブスカイト型酸窒化物の ¹⁴N 固体 NMR の再検討**
○野田 泰斗¹⁾、石井 桜子¹⁾、新木 聡太¹⁾、日部 雄太¹⁾、鱒淵 友治²⁾、竹腰 清乃理¹⁾
¹⁾京都大学大学院理学研究科、²⁾北海道大学大学院工学研究科
- P72 ¹³C および ¹⁵N 標識 5-アミノレブリン酸の合成と NMR 解析**
○青山 洋史¹⁾、飯塚 佑介¹⁾、永江 峰幸¹⁾、広瀬 侑²⁾、三島 正規¹⁾
¹⁾東京薬科大学薬学部、²⁾豊橋技術科学大学大学院応用化学生命工学系
- P73 MD 計算、深層学習を活用したタンパク質複合体解析**
○小林 直宏¹⁾、小沼 剛²⁾、有田 恭平²⁾、池上 貴久²⁾、山崎 俊夫¹⁾
¹⁾理研生命機能科学研究センター、²⁾横浜市立大生命医科学研究科
- P74Y GMPPNP 結合型 K-Ras^{G12V} と Rgl2^{RBD} の相互作用解析**
○富樫 直之¹⁾、宮田 裕貴¹⁾、亀井 駿¹⁾、菅澤 はるか¹⁾、美川 務³⁾、猪股 晃介¹⁾、
田仲 加代子²⁾、伊藤 隆¹⁾、池谷 鉄兵¹⁾
¹⁾東京都立大学大学院理学研究科、²⁾レスター大学分子細胞生物学科、³⁾理化学研究所生命機能科
学センター

P75 NMRを用いたシャルコー・マリー・トゥース病の原因遺伝子産物ミエリンタンパク質ゼロ(MPZ)の構造解析

○坂倉 正義¹⁾、三尾 和弘²⁾、田辺 幹雄³⁾

¹⁾横浜市立大学大学院生命医科学研究科、²⁾産総研・東大・オペランド計測 OIL、³⁾高エネ機構物構研構造生物

P76Y 炭素材料の表面官能基解析における DNP-NMR の利用

○安東 映香¹⁾、鈴木 克明²⁾、梶 弘典²⁾、仁科 勇太¹⁾、神戸 高志¹⁾、後藤 和馬¹⁾

¹⁾岡山大学大学院自然科学研究科、²⁾京都大学化学研究所

P77 無細胞合成系による β_2 アドレナリン受容体発現とその構造アンサンブルの固体 NMR 解析

○杉下 友晃¹⁾、田巻 初¹⁾、加藤 賢¹⁾、藤原 敏道¹⁾²⁾、松木 陽¹⁾²⁾

¹⁾大阪大学蛋白質研究所、²⁾大阪大学量子情報量子生命研究センター

P78Y 全固体電池の高感度オペランド計測法の開発

○四方 歩美¹⁾、田上 修¹⁾、藤原 僚平¹⁾、高橋 勝國¹⁾、寺西 貴志¹⁾、端 健二郎²⁾、藤戸 輝昭³⁾、品川 秀行³⁾、後藤 和馬¹⁾

¹⁾岡山大学大学院自然科学研究科、²⁾物質・材料研究機構、³⁾株式会社プローブ工房

P79 水素交換速度観測を利用したファーマコフォア解析の試み

○栗田 順一¹⁾、平尾 優佳¹⁾、西村 善文¹⁾²⁾

¹⁾横浜市立大学生命医科学研究科、²⁾広島大学大学院統合生命科学研究科

P80Y 共晶法による生体分子の Triplet DNP

○佐藤 晴紀¹⁾、宮西 孝一郎²⁾³⁾、根来 誠³⁾⁴⁾、香川 晃徳²⁾³⁾、西山 祐介⁵⁾⁶⁾、中村 浩一⁷⁾、犬飼 宗弘⁷⁾

¹⁾徳島大学大学院創成科学研究科、²⁾大阪大学大学院基礎工学研究科、³⁾大阪大学量子情報・量子生命研究センター、⁴⁾量子科学技術開発機構量子生命科学研究科、⁵⁾理研-JEOL 連携センター、⁶⁾株式会社 JEOL RESONANCE、⁷⁾徳島大学大学院社会産業理工学研究部

P81 親水性ナノ多孔質結晶に閉じ込められた階層的な水分子クラスターの²H-NMR スペクトル解析

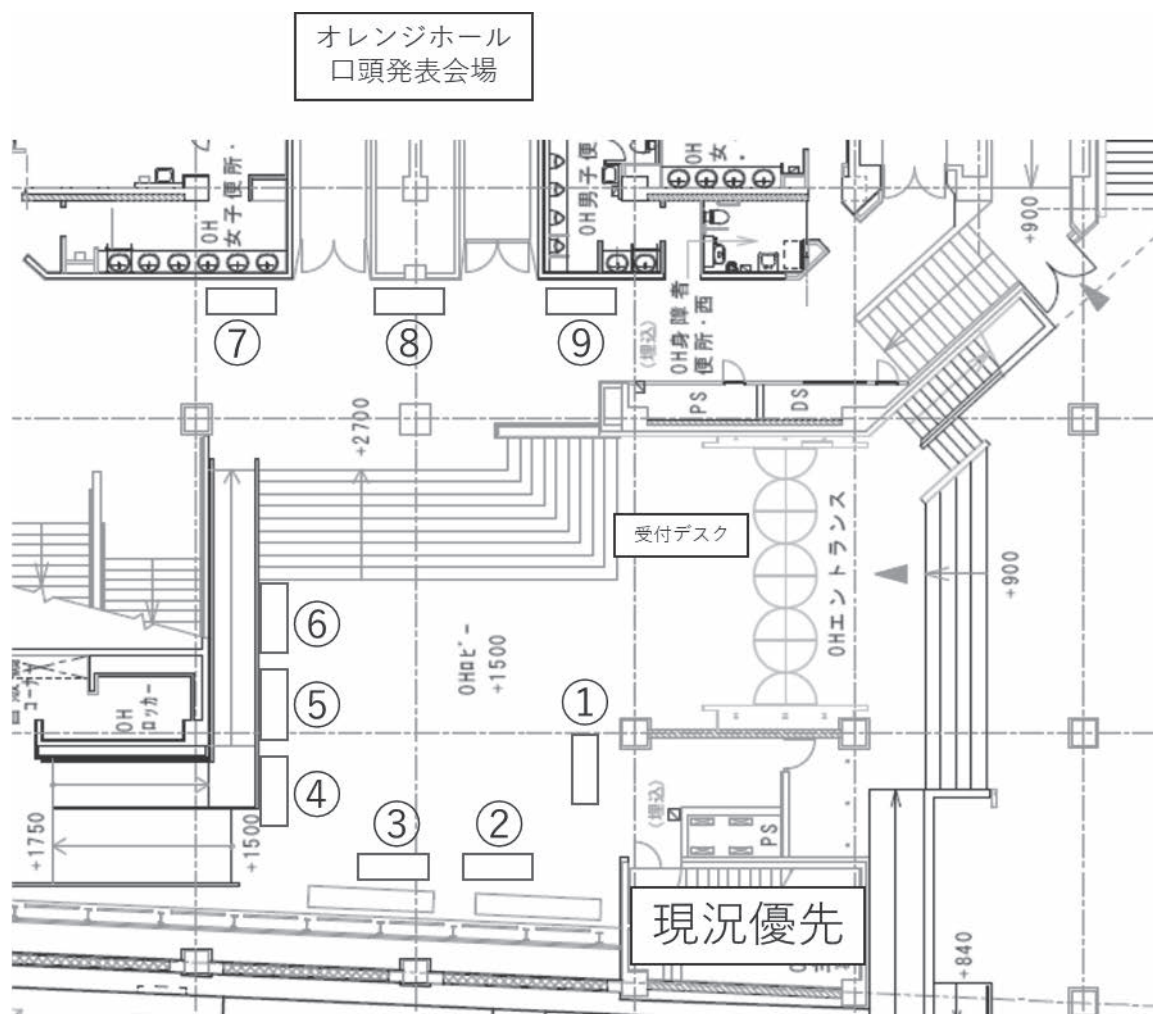
○齊藤 明¹⁾、尾花 駿一¹⁾、並木 智哉¹⁾、小林 文也¹⁾、栗原 拓也²⁾、水野 元博²⁾、田所 誠¹⁾

¹⁾東京理科大学理学部化学科、²⁾金沢大学理工研究域

- P82Y 多孔性配位高分子における二酸化炭素と水の動的挙動と競争吸着**
 ○金子 宗平¹⁾、栗原 拓也²⁾、水野 元博³⁾、中村 浩一⁴⁾、犬飼 宗弘⁴⁾
¹⁾徳島大学大学院創成科学研究科理工専攻、²⁾金沢大学物質化学系、³⁾金沢大学ナノマテリアル研究所、⁴⁾徳島大学大学院社会産業理工学研究部理工学域
- P83 化学シフト温度依存性解析で捉えたポリユピキチン鎖のユニット特異的な構造揺らぎ**
 ○森本 大智¹⁾、Erik Walinda²⁾、白川 昌宏¹⁾、菅瀬 謙治³⁾
¹⁾京都大学大学院工学研究科、²⁾京都大学大学院医学研究科、³⁾京都大学大学院農学研究科
- P84Y 固体 NMR による Zn²⁺結合型 TaHeR の構造解析**
 ○熊谷 咲里¹⁾、鈴木 しぶき¹⁾、長島 敏雄²⁾、山崎 俊夫²⁾、片山 耕大³⁾、神取 秀樹³⁾、川村 出¹⁾
¹⁾横浜国立大学大学院理工学府、²⁾理研 RSC、³⁾名古屋工業大学
- P85 固体 NMR を用いた平面四配位白金(II)錯体の分子運動の解析とその外部刺激応答性**
 ○重田 泰宏¹⁾、水野 元博¹⁾
¹⁾金沢大学ナノマテリアル研究所
- P86Y STD NMR による TiO₂ 粒子と抗インフルエンザウイルスペプチドの相互作用解析**
 ○鈴木 悠斗¹⁾、岡村 英保²⁾、川村 出¹⁾、鈴木 悠²⁾
¹⁾横浜国立大学大学院理工学府、²⁾福井大学学術研究院工学系部門生物応用化学講座
- P87 NMR 分析における液体試料へのアプローチの探索**
 高橋 彩香¹⁾²⁾、○細田 和男³⁾、林 史夫³⁾
¹⁾群馬大学理工学部総合理工学科、²⁾群馬大学機器分析マイスター、³⁾群馬大学機器分析センター
- P88Y 二次構造の異なる組換えクモ糸タンパク質ゲルの NMR 構造解析及び機械的特性評価**
 ○東 孝憲¹⁾、佐藤 健大²⁾、森永 隆志³⁾、佐藤 涼³⁾、岡村 英保¹⁾、鈴木 悠¹⁾
¹⁾福井大学大学院工学研究科、²⁾Spiber Inc.、³⁾鶴岡工業高等専門学校
- P89 π パルストレインを用いた高速 MAS 下での ¹³C-¹³C DARR 測定手法の開発**
 ○松永 達弥¹⁾、石井 佳誉¹⁾²⁾
¹⁾理化学研究所生命機能科学センター、²⁾東京工業大学生命理工学院

- P90Y 高温超伝導バルク磁石表面勾配磁場を用いた拡散 NMR 測定装置の開発
リチウムイオン電池開発に適合する測定装置を目指して**
○菊池 翔¹⁾、坂井 直道¹⁾、村上 雅人¹⁾、横山 和哉²⁾、Tritrakarn Techit³⁾、
岡村 哲至³⁾、高橋 雅人⁴⁾¹⁾、岡 徹雄¹⁾⁴⁾、仲村 高志⁵⁾¹⁾
¹⁾芝浦工業大学大学院理工学研究科、²⁾足利大学工学部、³⁾東京工業大学工学院機械系、⁴⁾理化学
研究所生命機能科学研究センター、⁵⁾理化学研究所環境資源科学研究センター
- P91 フッ素化スルホン酸アイオノマー分散液の高速磁場サイクリング NMR 緩和測定**
○山口 真¹⁾、寺尾 剛¹⁾
¹⁾技術研究組合 FC-Cubic
- P92Y Perdeuterated α -helical membrane protein preparation methods for proton detection MAS solid-
state NMR**
○Xin Zhang¹⁾, Hajime Tamaki¹⁾, Toshimichi Fujiwara^{1,2)}
¹⁾*Institute for Protein Research, Osaka University*, ²⁾*Center for Quantum Information and
Quantum Biology Division, Institute for Open and Transdisciplinary Research Initiatives, Osaka
University*
- P93 High-dimensional ¹H-detected SSNMR for Expeditious Characterization of A β 42 Fibrils**
○Ayesha Wickramasinghe¹⁾, Yiling Xiao²⁾, Yoshitaka Ishii¹⁾²⁾³⁾
¹⁾*RIKEN Center for Biosystems Dynamics Research*, ²⁾*Department of Chemistry, University of
Illinois at Chicago*, ³⁾*School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology*
- P94Y NMR による金属有機構造体の CO₂ 吸着動力学に対する結晶サイズの影響の研究**
○姜 偉明¹⁾、武田 和行¹⁾
¹⁾京都大学理学研究科化学専攻

出展ブース（オレンジホールロビー）のご案内



- ① 日本電子株式会社
- ② 株式会社バイオネット研究所
- ③ 株式会社エルエイシステムズ
- ④ 昭光サイエンス株式会社
- ⑤ ゼネラル物産株式会社
- ⑥ ブルカー・ジャパン株式会社
- ⑦ 株式会社シゲミ
- ⑧ 大陽日酸株式会社
- ⑨ 株式会社エムアールテクノロジー

協賛企業（五十音順）

NMR 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
昭光サイエンス株式会社
ゼネラル物産株式会社
大陽日酸株式会社
中山商事株式会社
日本電子株式会社
株式会社バイオネット研究所
ブルカーージャパン株式会社

第1日目
11月8日 (火)
日本語セッション

Day 1
Tuesday, 8th Nov.
Japanese Sessions

L1-1

^1H - ^{13}C 二重共鳴 NMR のための小型電気-機械-光変換プローブ

○ 富永雄介, 武田和行

京都大学大学院 理学研究科

Electro-mechano-optical NMR probe for ^1H - ^{13}C double resonance

○ Yusuke Tominaga, Kazuyuki Takeda

Graduate School of Science, Kyoto University

We report development of a compact EMO NMR probe compatible with superconducting magnets used in NMR for chemical analysis, demonstrating ^1H - ^{13}C refocused INEPT followed by EMO ^{13}C NMR detection in liquid benzene.

1 Introduction

NMR は物理・化学・生物学などの多岐にわたる分野で構造やダイナミクスの解析に用いられ、強力な分析手法として発展してきた。しかし、NMR は原理的に感度が低い。NMR の発展の歴史は感度向上の手法開発の歴史でもあり、現在もなお、NMR の感度向上は重要な課題である。

我々は、NMR の感度向上をめざして、NMR 信号を光変換する装置の開発を行ってきた。信号の光変換は図 1a に示すような系で行い、ここでは金属が蒸着された高い Q 値を持つ窒化ケイ素薄膜が二つの役割を担う。第一に、蒸着金属は NMR 信号受信回路のキャパシタ電極として組み込まれ、NMR 信号は薄膜の振動に変換される。第二に、蒸着金属はミラーとして用いられ、光の干渉により薄膜の振動を読み取ることができる。光に変換する方法 (Electro-Mechano-Optical で EMO と呼ぶ) では、室温下でも、加わるノイズを限りなく小さくすることができ、NMR の感度を向上することができると考えられている [1, 2, 3]。

通常、光学系は地面振動などの影響を抑えるために、大掛かりな光学定盤の上に構築され、精密なアライメントを要する。しかし、化学分析用の NMR で用いられる均一度の高い超伝導磁場中で EMO NMR 測定を行うためには、限られたスペースの中に光変換系を組み込み、光学装置の精密なアライメントを行い光検出する必要がある。その実現のために、本研究では図 1b のような超伝導磁場内に挿入できる小型な EMO NMR プローブを作成した。そして、リフォーカス INEPT 法を適用し、ベンゼンの ^{13}C NMR 信号を EMO により光変換して取得することに成功した [4]。

2 Design & Fabrication

5 mm×5 mm の大きさの Si 枠に張られた厚さ 200 nm、大きさ 1 mm×1 mm の窒化ケイ素薄膜上に厚さ 40 nm のアルミニウム層を蒸着した。電極がプリントされた大きさ 5 mm×5 mm のプリント基板には、重ねたときに隙間を作るためにアルミニウムを 500 nm 蒸着し、Si 枠上にこのプリント基板を重ね合わせることで薄膜キャパシタを作製した (図 2a)。空気による薄膜の振動の減衰を防ぐために、薄膜は真空下に設置した。

自作の真空チャンバーの設計は図 2b のようになっている。直径 60 mm であり、超伝導磁石のボアに収まるようにしている。真空チャンバーの蓋を閉じるだけで、薄膜キャパシタとの電気的な接触が取れて外部からアクセスできるようになっており、配線は可能な限り短くなっている。

オプトメカニクス, 光変換, INEPT

○ とみながゆうすけ, たけだかずゆき

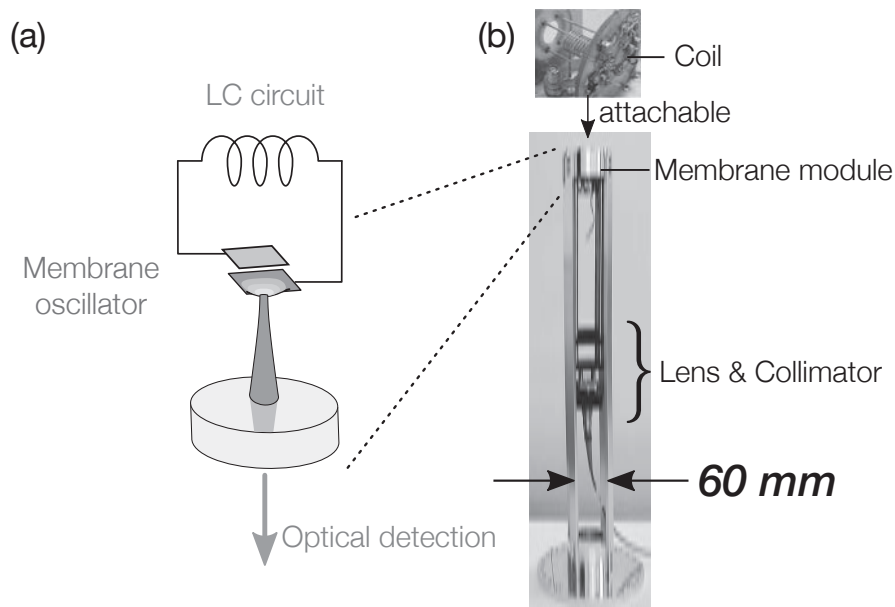


Fig. 1 (a) A schematic diagram of EMO NMR. NMR signals are transduced to the membrane oscillation through the LC circuit. The resulting membrane oscillation is in turn read out optically with the optical interference. (b) A snapshot of the probe for EMO NMR operational inside the bore of a superconducting magnet.

薄膜上の蒸着金属は光共振器のエンドミラーとしても用いる。真空チャンバー内に光共振器のフロントミラーも設置して、共振器長は 2.54 mm に設計してモードマッチングを取った (図 2c)。共振器はなるべく短く、またモノリシックな構造にすることで、安定な光学検出を実現している。ミラーを設置したプレートと真空チャンバー間をシールしている O-リングは、非磁性のばねとしてミラーのアライメントにも利用することができる。

この真空チャンバー内に構成した EMO システムと、NMR 信号の励起・受信用の二重共鳴回路、レーザービーム整形用の光学系とを連ねて NMR 信号を光検出できるようにしたプローブが図 1b に示したものである。

3 Results

4.7 T の磁場における ^1H および ^{13}C のラーモア周波数に対して、NMR 励起・検出用の LC 回路の同調をとり、インピーダンス整合もとった。リフォーカス INEPT で信号増強されたベンゼンの ^{13}C の NMR 信号を ^1H デカップリング下で取得するためのパルスシーケンスは図 3a の通りである。EMO NMR の実施においては、電気-機械結合を誘起するために交流電圧を薄膜キャパシタ上にかけてドライブする必要がある。パルスを照射している間は、パルスが薄膜の振動に変換されないようにドライブの周波数をずらしておき、信号の取得の間だけ信号が変換されるような交流周波数にした。

図 3b,c に示したものは EMO NMR により取得した、リフォーカス INEPT により増強された ^{13}C -labeled ベンゼンの NMR 信号と、そのフーリエ変換スペクトルである。比較のために、同様に励起し受信した信号を光変換せずに、従来の NMR で行われるように電氣的に増幅して取得したのが図 3d,e である。EMO NMR と通常の電氣的な NMR で、得られた信号はほとんど一致していたが、差異も検出の帯域幅の違いによって説明できる。EMO による検出では、薄膜の帯域幅 (約 100 Hz) によって制限されるため、帯域の外ではノイズが非常に小さいが、帯域内では薄膜の熱雑音が観測される。薄膜の熱雑音は、電気-機械結合を大きくすることにより、原理的には小さ

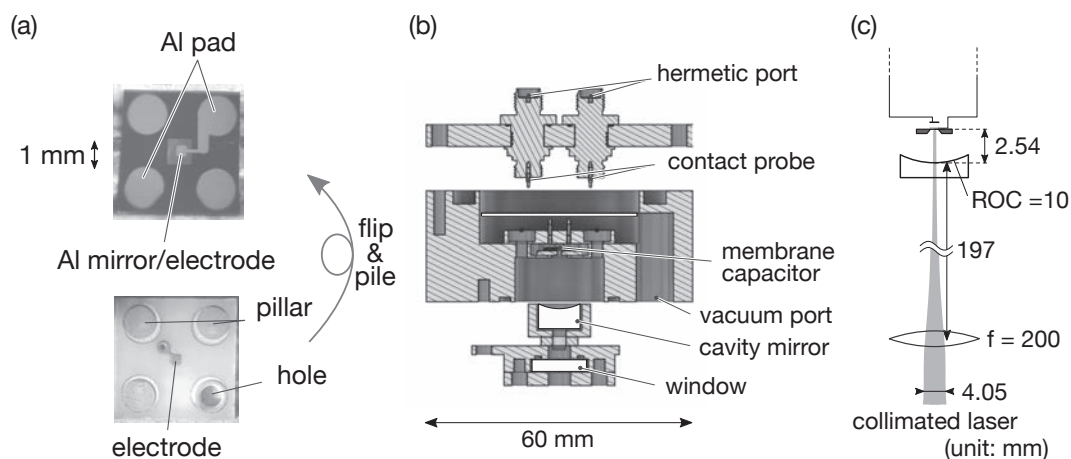


Fig. 2 (a) A 5 mm×5 mm Si frame supporting a 1 mm×1 mm Si₃N₄ membrane, on which an aluminum layer for the capacitor electrode and the optical mirror was made by vacuum deposition. A printed circuit board serving for the counter electrode was piled on the Si frame. (b) Cross sectional view of a cylindrical vacuum chamber containing the membrane capacitor. (c) Design of the optical cavity for a collimated laser beam with an incident beam diameter of 4.05 mm. A concave mirror with a radius of curvature (ROC) of 10 mm and a lens with a focal length (*f*) of 200 mm were combined to form the cavity. (Reproduced from Ref. [4] with permission from the Royal Society of Chemistry.)

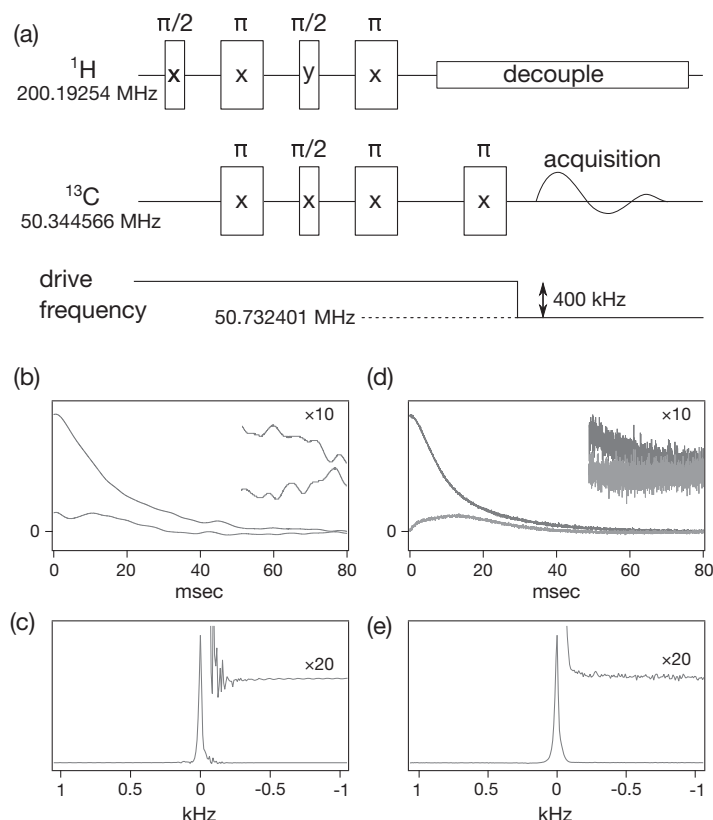


Fig. 3 (a) A pulse sequence for refocused INEPT with ¹H decoupling. (b, c) A refocused INEPT enhanced ¹³C NMR signal and Fourier-transformed spectrum of ¹³C-labeled benzene obtained by the EMO scheme. (d, e) The same signal and spectrum obtained by the conventional electrical detection. (Reproduced from Ref. [4] with permission from the Royal Society of Chemistry.)

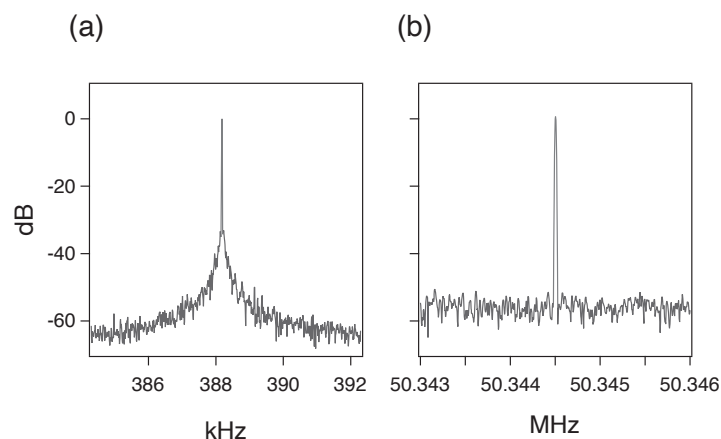


Fig. 4 (a) A power spectrum of an optical signal around the frequency 388.18 kHz of membrane characteristic oscillation, on which the signal at 50.3445 MHz was transduced. (b) A power spectrum of an electrical signal obtained by amplifying the same signal. (Reproduced from Ref. [4] with permission from the Royal Society of Chemistry.)

くすることができる。

EMO NMR と電気的な NMR の感度を直接比較し性能を評価するために、強度のわかっている電気信号をシンセサイザで合成し、連続的に LC 回路内に発生させた。−121.6 dBm の信号を光変換して観測されたパワースペクトルは図 4a であり、同じ信号を電氣的に増幅して観測されたパワースペクトルは図 4b であった。EMO 検出の場合、薄膜の熱振動由来のローレンツ形のスペクトルにより、雑音強度が大きくなっているが、その帯域の外では電気的な検出の雑音よりも小さくなっていることがわかる。したがって、薄膜の熱雑音の寄与を小さくすることができれば、従来の電気的な増幅による検出法に EMO NMR は感度の点で優位になる可能性があることがわかる。

以上のように、広く使用される手法である INEPT と組み合わせた EMO NMR を、超伝導磁石内で行うことに成功したことにより、これまで主に物理学的な興味対象であった EMO NMR を化学分析にも応用する道を開いたといえる。EMO NMR の感度はまだ薄膜の熱雑音に制限されているものの、従来の電気的な方法とも比較可能な領域にあり、今後さらに電気-機械結合を大きくしたり、レーザー冷却の手法と組み合わせたりすることにより、高感度な検出方法としての利用が期待できる。

References

- [1] Kazuyuki Takeda, Kentaro Nagasaka, Atsushi Noguchi, Rekishu Yamazaki, Yasunobu Nakamura, Eiji Iwase, Jacob M Taylor, and Koji Usami. Electro-mechano-optical detection of nuclear magnetic resonance. *Optica*, 5(2):152–158, 2018.
- [2] Yusuke Tominaga, Kentaro Nagasaka, Koji Usami, and Kazuyuki Takeda. Studies on NMR-signal up-conversion from radio-frequency to optical regimes using a lightweight nanomembrane transducer. *Journal of Magnetic Resonance*, 298:6–15, 2019.
- [3] Yusuke Tominaga, Atsushi Mikami, Akiya Iwamura, Koji Usami, and Kazuyuki Takeda. Heating-free, room-temperature operation of a radiofrequency-to-light signal transducer with a membrane oscillator and a built-in metasurface mirror. *Applied Physics Express*, 15(1):012003, 2021.
- [4] Yusuke Tominaga and Kazuyuki Takeda. An electro-mechano-optical NMR probe for ^1H - ^{13}C double resonance in a superconducting magnet. *Analyst*, 147(9):1847–1852, 2022.

L1-2

高温超伝導バルク磁石表面勾配磁場を用いた拡散NMR測定装置の開発

○高橋雅人^{1,2}, 菊池翔², 坂井直道², 村上雅人², 横山和哉³, Tritrakarn Techit⁴, 岡村哲至⁴, 岡徹雄^{1,2}, 仲村高志^{5,2}

1理化学研究所・生命機能科学研究センター

2芝浦工業大学大学院・理工学研究科

3足利大学・工学部

4東京工業大学・工学院・機械系

5理化学研究所・環境資源科学研究センター

Development of a diffusion NMR measurement system using the surface gradient field of a high-temperature superconducting bulk magnet

○Masato Takahashi^{1,2}, Sho Kikuchi², Naomichi Sakai², Masato Murakami², Kazuya Yokoyama³, Techit Tritrakarn⁴, Tetsuji Okamura⁴, Tetsuo Oka^{1,2}, Takashi Nakamura^{5,2}

¹RIKEN Center for Biosystems Dynamics Research

²Graduate School of Engineering and Science, Shibaura Institute of Technology

³Faculty of Engineering, Ashikaga University

⁴Department of Mechanical Engineering, Tokyo Institute of Technology

⁵RIKEN Center for Sustainable Resource Science

Diffusion NMR on the surface of a High-Temperature Superconducting (HTS) bulk magnet has been demonstrated. HTS bulk magnets can generate a strong and stable magnetic field despite their compact body size. The strong static field gradient on the surface can be effectively used for the measurement of low-diffusion coefficients and high spatial resolution instead of no chemical shift information. The high spatial resolution in the direction of the gradient field is realized since the excitation bandwidth is much smaller than the NMR signal bandwidth broadened by the strong static field gradient in the sample. Diffusion NMR with a strong static field gradient has different characteristics compared to commonly used Pulse Field Gradient (PFG) diffusion NMR. These characteristics are suitable for the analysis of the ion mobility in lithium-ion batteries around electrodes.

我々は高温超伝導バルク磁石を用いた拡散NMR測定装置を開発している¹。高温超伝導バルク磁石は、超伝導体の塊であり極低温(40 K以下程度)に冷却し磁場を覚えさせることで強力な磁場を発生させることができる。直径60 mm程度と非常にコンパクトであり、またこれの冷却は交流100 Vの電源を使った家庭用エアコン程度の消費電力である極低温小型冷凍機で賄えるため装置全体が非常にコンパクトとなる。これまでに仲村らが積層したリング状の高温超伝導バルク磁石を用いて、先鋭な溶液NMRスペクトルを取得することに成功している²。

この高温超伝導バルク磁石の利点をより活かした装置を開発するために、拡散NMRに注目した。コンパクトなサイズで強力な磁場が発生しているということは、その表面には強力な勾配磁場が形成されている。高温超伝導バルク磁石、拡散NMR、片側NMR

○たかはしまさと, きくちしょう, さかいなおみち, むらかみまさと, よこやまかずや, とりとらかーんとしつと, おかむらてつじ, おかてつお, なかむらたかし

場が発生していることを意味している。勾配磁場を用いる測定手法としては拡散NMRがある。

現在の拡散NMRはPulse Field Gradient(PFG)を用いて、必要なタイミングだけ瞬間的に勾配磁場を発生させている³が、PFGが発明される前は静磁場勾配で拡散NMRの測定が行われてきた。PFGを用いることによって、NMR信号を取得するタイミングでは均一磁場を利用することができ、これにより化学シフト情報が同時に得られるなど多大な利点がある。しかし、現在では忘れ去られてしまった静磁場勾配による拡散NMR測定にもいくつか利点がある。まず、静磁場勾配ではPFGでは実現できない強力な磁場勾配が達成可能である。強力なPFGは、強力なPFG電源と水冷電磁石により力技で実現しており、現在おおよそ30 T/mが最大値である。一方、本研究では、最初の一步として弱く着磁した高温超伝導バルク磁石ですでに60 T/m程度を実現している。

次に、試料もしくは試料の一部が高い導電性を持つ場合は、PFGによる急激な磁場変動によりその導電性部分に渦電流が発生し勾配磁場分布が崩れてしまう点である。静磁場勾配の場合は磁場が常に一定であるためこのような現象は発生しない。もうひとつは、静磁場勾配によるNMRスペクトルの広幅化が、励起幅よりもはるかに大きいため結果的に静磁場勾配方向に高い空間分解能が得られることである。この点は後ほど詳述する。

NMRは通常高い磁場均一度中で測定が行われることが望ましいため、磁石に囲まれた空間（磁石ボア）の真ん中で測定を行うことが普通である。通常のNMR装置では超伝導磁石のボアにプローブを挿入して測定を行う。すなわち、測定試料のサイズは、磁石ボアよりも（もっと言えばプローブ直径よりも）小さいことが必要となる。一方で試料サイズ・形状に制限なくNMR測定をするためにBlümichらは、永久磁石の表面でNMR測定に挑戦する先駆的な試みを行っており⁴拡散NMR測定も行っている⁵。彼らは自分たちの装置をNMR-MOUSEと呼んでいる。

これらを踏まえ、本研究では高温超伝導バルク磁石が発生する強力かつ安定な静磁場勾配を利用した拡散NMR測定装置の開発を行った。

高温超伝導バルク磁石には、日本製鉄株式会社製のFig. 1に示す直径65 mm、厚さ15 mmのものを用いた。これを直径87 mmの真空容器に収納し小型のGM冷凍機で30 Kまで冷却した。着磁コイルを用いたパルス着磁法^{6,7}により、30分ごとに6回の着磁を行った。着磁コイルの最大電圧は690 V、最大電流は313 Aである。これにより真空容器表面で最大1.83 Tの磁場を得た。

NMR測定には、Fig. 2に示す自作の分光計を用いた。ナショナルインスツルメンツ社製のUSRP-2920はSoftware-Defined Radio(SDR)と呼ばれる、これまでハードウェアで実現されてきた機能をソフトウェアで実現する装置である。この装置を制御するソフトウェアをナショナルイン

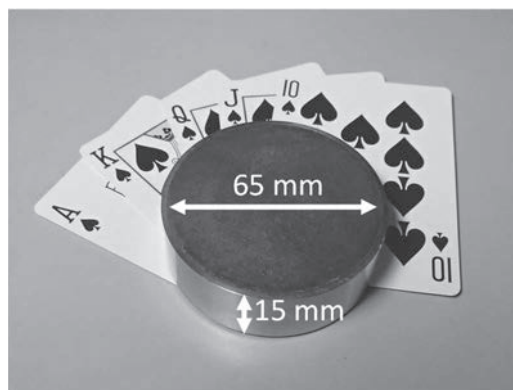


Fig. 1. High-Temperature Superconducting (HTS) bulk material used in this study.

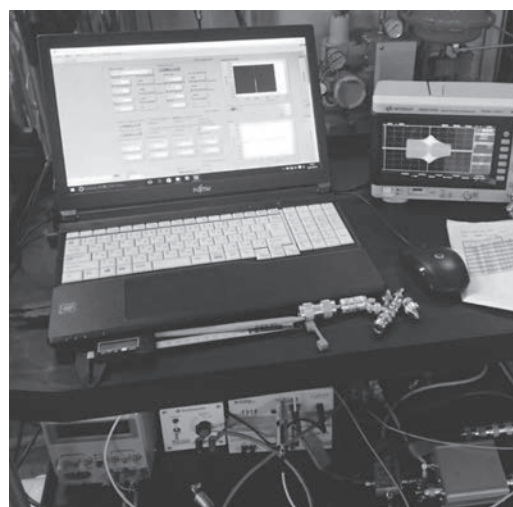


Fig. 2. Home-built NMR spectrometer using Software Defined Radio (SDR), NI USRP-2920.

スツルメンツ社製のLabVIEWとNI-USRPを用いて自作しNMR分光計として利用した。

拡散NMRを測定するプローブとして、外径1.4 mm、内径1 mmのPTFEチューブに銅線を巻き付けることでFig. 3に示すプローブを製作した。測定試料空間は直径1 mm、長さ2 mmである。励起用アンプには1 Wのものを用い、180度パルス長は8 μ sである。測定にはスピンエコーCarr-Purcell-Meiboom-Gill(CPMG)を用いた。静磁場が不均一であるため、NMRスペクトルは超広幅、微弱となる。それを補うためにCPMGを100回繰り返して、エコー信号を積算した。

静磁場勾配における拡散NMRの信号強度比は次の式であらわされる。

$$\ln\left(\frac{S(t_E)}{S(0)}\right) = -\frac{1}{12}\gamma^2 G_0^2 t_E^3 D - \frac{t_E}{T_2} \quad (1)$$

$S(t)$ はエコーの待ち時間 t におけるNMR信号強度、 γ は核磁気回転比、 G_0 は静磁場勾配、 D は自己拡散係数、 T_2 は横緩和時間を示す。エコーの待ち時間 t_E を増やすにつれて信号強度が小さくなる。核磁気回転比 γ 、静磁場勾配 G_0 、エコーの待ち時間 t_E 、拡散係数 D が大きいかほどこの式(1)の減衰率は大きくなる。一方、それとは関係なく横緩和 T_2 で信号が減衰するためエコーの待ち時間を長くすることは得策ではない。そのため静磁場勾配が大きいかほどより小さな拡散係数が測定可能となる。

25°Cにおける水の拡散測定をまず行い、式(1)を適用した。縦緩和の待ち時間を減らすために測定試料の水には硫酸銅を5 mM加えた。25°Cにおける水の拡散係数は $2.3 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$ であることが知られており⁸、これを用いて、静磁場勾配の較正を行った。その結果静磁場勾配の大きさは78 T/mでありこれはホール素子による磁場分布測定の結果とほぼ同じであった。

上記の設定で静磁場勾配を用いた拡散NMR測定を行うとすると、内径1 mmのチューブ内の試料で磁石側とその反対側で磁場は78 T/m*1 mm = 0.078T異なることになる。これは¹Hの共鳴周波数では3.32 MHzに相当する。一方、8 μ sの励起パルスを使用した場合、励起幅は $1/(8 \mu\text{s}) = 125 \text{ kHz}$ となる。これらを合わせるとNMR信号を励起できている空間の厚さは $125 \text{ kHz}/3.32 \text{ MHz} * 1 \text{ mm} = 38 \mu\text{m}$ となる。したがって、RFコイルが巻かれている直径1 mm、長さ2 mmの試料空間のうち実際にNMR信号が発生している空間は、Fig. 3に示すように幅1 mm、長さ2 mm、厚さ38 μ mの空間となる。これによりたとえば励起周波数を125 kHz変更すると、隣の38 μ mずれた空間スライスを選択できることになる。また、高温超伝導バルク磁石では磁場の大きさや分布が非常に安定している（温度依存性、時間依存性がない）ため、測定中にこのスライス位置がずれることがない。これらにより、高温超伝導バルク磁石の静磁場勾配を用いた拡散NMR測定では、磁場勾配方向に高い空間分解能を実現できる。

実際の拡散NMR測定例をFig. 4に示す。ここでは、測定試料としてスクロース（砂糖）50% w/w水溶液を用いた。スクロースの濃度が高くなると粘性が高くなるため拡散係数が小さくなる。また、この状態での水、スクロースの拡散係数の文献値⁹はそれぞれ $5.1 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ 、 $6.1 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ である。本研究ではケミカルシフトが測定できないため、溶媒の水と溶質の砂糖を識別できない。しかし、拡散係数の違いが大きいとFig. 4に示すように折れ曲がった直線となるため、それぞれの

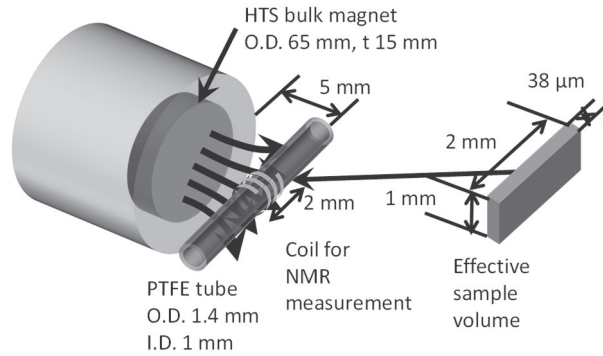


Fig. 3. Schematic view of the setup for diffusion NMR using a single-sided HTS bulk magnet. The HTS bulk magnet generated a strong magnetic field from the round surface.

拡散係数を求めることが可能となる。

今後は装置の改良を進めるとともに、より強い磁場をHTSバルク磁石に着磁する。磁場が強くなれば高感度化（測定時間の短縮）が実現するとともに、静磁場勾配も大きくなる。これにより式(1)に示すように拡散係数、核磁気回転比、 T_2 が小さい場合に対応できるようになる。また上記のように空間分解能が向上する。これらの特徴は ^7Li の拡散測定によるリチウムイオン電池の電極近傍の解析に利用可能であると考えている。また、粘性の高いオイルや生体分子などの T_2 の短い試料を測定対象とすることができる。

References

- (1) M. Takahashi et al., "NMR Relaxometry Using Outer Field of Single-Sided HTS Bulk Magnet Activated by Pulsed Field," *IEEE Transactions on Applied Superconductivity*, vol. 32, no. 6, pp. 1-4, Sept. 2022, Art no. 4602404, doi: 10.1109/TASC.2022.3161247.
- (2) T. Nakamura et al., "Development of a superconducting bulk magnet for NMR and MRI," *Journal of Magnetic Resonance*, vol. 259, pp. 68–75, Oct. 2015, doi: 10.1016/j.jmr.2015.07.012.
- (3) E. O. Stejskal and J. E. Tanner, "Spin diffusion measurements: Spin echoes in the presence of a time-dependent field gradient," *The Journal of Chemical Physics*, vol. 42, no. 1, pp. 288–292, 1965, doi: 10.1063/1.1695690.
- (4) B. Blümich, J. Perlo, and F. Casanova, "Mobile single-sided NMR," *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, vol. 52, no. 4, pp. 197–269, May 2008. doi: 10.1016/j.pnmrs.2007.10.002.
- (5) F. Casanova, J. Perlo, and B. Blümich, "Diffusion Measurements," in *Single-Sided NMR*, Springer Berlin Heidelberg, 2011, pp. 42–47. doi: 10.1007/978-3-642-16307-4.
- (6) U. Mizutani, T. Oka, Y. Itoh, Y. Yanagi, M. Yoshikawa, and H. Ikuta, "Pulsed-field magnetization applied to high-Tc superconductors," *Applied Superconductivity*, vol. 6, no. 2–5, pp. 235–246, Feb. 1998, doi: 10.1016/S0964-1807(98)00106-9.
- (7) T. Oka, "Processing and applications of bulk HTSC," *Physica C: Superconductivity and its Applications*, vol. 463–465, no. SUPPL., pp. 7–13, Oct. 2007, doi: 10.1016/J.PHYSC.2007.03.432.
- (8) R. Mills, "Self-diffusion in normal and heavy water in the range 1-45.deg.," *The Journal of Physical Chemistry*, vol. 77, no. 5, pp. 685–688, Mar. 1973, doi: 10.1021/j100624a025.
- (9) M. Rampp et al., "c,T-dependence of the viscosity and the self-diffusion coefficients in some aqueous carbohydrate solutions," *Carbohydrate research* vol. 328, no. 4 pp. 561-72, 2000, doi:10.1016/s0008-6215(00)00141-5

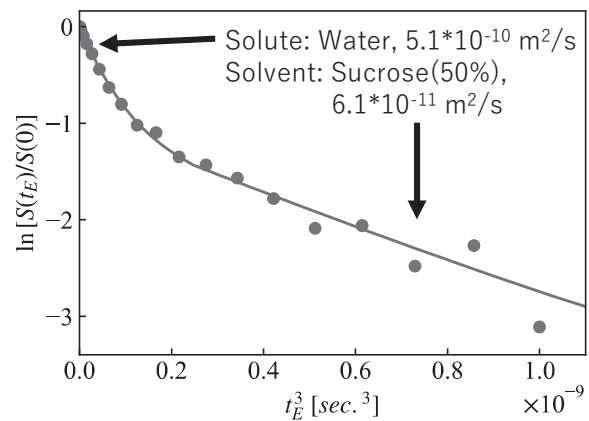


Fig. 4. Measurement example of the mixture. The signal intensity of diffusion measurement on 50% w/w sucrose:water solutions. The solid line is calculated from the reference value⁹.

L1-3

Sec非依存性膜蛋白質膜挿入における大腸菌由来糖脂質MPIaseの作用機構の解明

○野村 薫¹, 森 祥子¹, 大澤月穂¹, 藤川紘樹¹, 西山賢一², 島本啓子¹

1公益財団法人サントリー生命科学財団生物有機科学研究所

2岩手大学農学部

Mechanism of action of MPIase, a glycolipid from *Escherichia coli*, in Sec-independent membrane protein insertion

○Kaoru Nomura¹, Shoko Mori¹, Tsukiho Osawa¹, Kohki Fujikawa¹, Ken-ichi Nishiyama², Keiko Shimamoto¹

¹ Bioorganic Research Institute, Suntory Foundation for Life Sciences

² Department of Biological Chemistry and Food Sciences, Faculty of Agriculture, Iwate University

An endogenous glycolipid, MPIase, in the *Escherichia coli* membrane regulates membrane protein insertion cooperatively with proteinaceous translocons. Here, we focused on the Sec translocon-independent pathway and examined the mechanisms of MPIase-facilitated protein insertion using solid-state nuclear magnetic resonance and fluorescence techniques. Diacylglycerol, a trace component of *E. coli* membrane, reduced the acyl chain mobility in the membrane core region and inhibited the insertion, whereas MPIase restored them. Intermolecular interactions between MPIase and basic amino acids in the protein suggested that the MPIase pyrophosphate attracts the basic residues of the protein toward the membrane surface, which triggers the insertion. Thus, this study demonstrated the multi-faceted approach of MPIase to support membrane insertion of proteins by using its unique molecular structure.

リボソームで翻訳された蛋白質は、Secトランスロコンの助けを借りて膜挿入するSec依存経路と、Secの助けなしに膜挿入するSec非依存経路がある。大腸菌内膜においてはどちらの経路においても、膜に微量に存在するジアシルグリセロール(DAG) (Fig. 1)により抑制された膜挿入が、糖脂質MPIase (Fig. 1)により促進される。我々はこれまでに、Sec非依存性経路に着目し、MPIaseやDAGにより引き起こされる膜物性変化を解析してきた¹。本研究では、さらにMPIaseにより促進されるSec非依存蛋白質の膜挿入メカニズムの解明を行った²。

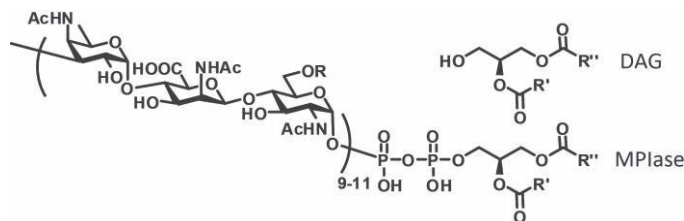


Fig. 1. Structure of MPIase and DAG.
R=Ac or H, R', R''=C16:1, 16:0, 18:1, 18:0

Sec非依存性タンパク質膜挿入, 固体NMR, 糖脂質

○のむらかおる, もりしょうこ, おおさわつきほ, ふじかわこうき, にしやまけんいち, しまもとけいこ

まず、分子量の小さい疎水性蛋白質の固体NMRを用いた膜挿入解析法(Fig. 2)を提案し、MPIase, DAG, そして各種膜脂質が膜挿入に与える影響を評価した。さらに、同様の膜脂質で構成された膜の蛍光スペクトルや蛍光異方性測定を行い、膜表面のパッキングや膜脂質のアシル鎖の運動性を解析し、膜挿入効率との相関を考察した。その結果、膜挿入は膜表面のパッキングと膜内部のアシル鎖の運動性に強い相関があり、膜脂質の主成分であるフォスファチジルエタノールアミン(PE)や微量成分であるDAGはそのコーン型の分子構造により膜内部の運動性を軽減して膜挿入を抑制する一方、逆コーン型のMPIaseは膜に相反する影響を与え、膜挿入を回復させていた。また、膜蛋白質の膜挿入現象は、膜の物理化学的な性質だけでなく、MPIaseと基質蛋白質の間の分子間相互作用にも関係しており、MPIaseの負電荷を持つピロリン酸が基質蛋白質の正電荷を持つリジンやアルギニンの側鎖と静電的な相互作用することで、膜挿入の初期段階で蛋白質を膜近傍に引き寄せていた。以上の様に、MPIaseはそのユニークな分子構造により、蛋白質の膜挿入を様々な形で支えていることを明らかにした(Fig. 3)。

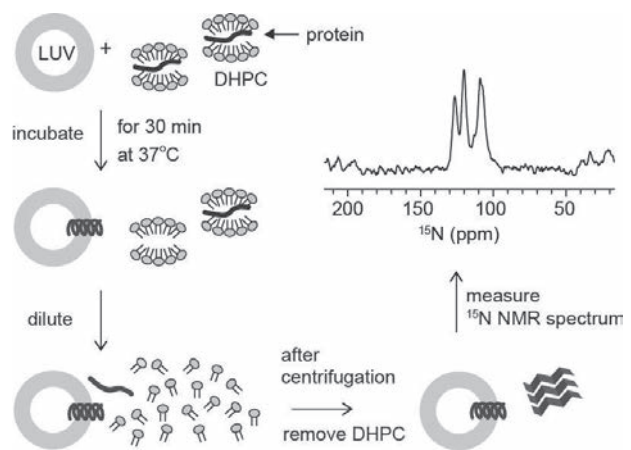


Fig. 2. Procedure for inserting membrane proteins. (top right) NMR spectrum of the pellet obtained from the procedure, showing both inserted and non-inserted protein signals.

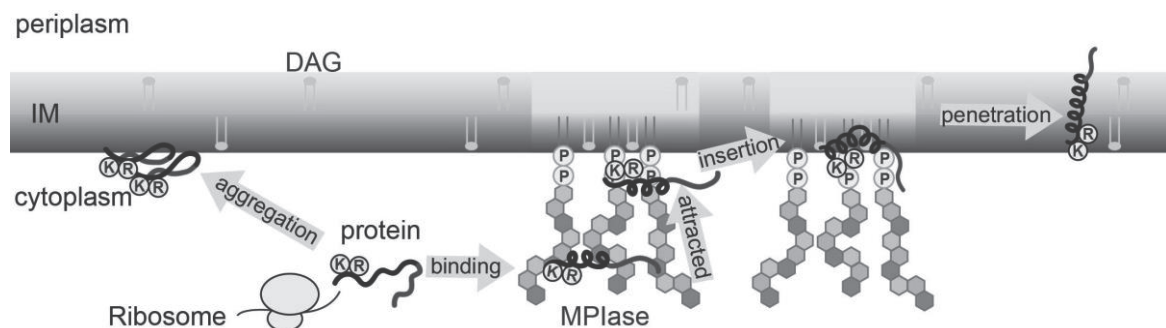


Fig. 3. Schematic model of the membrane insertion of a small hydrophobic substrate protein in *E. coli* membranes.

References

- (1) Nomura, K., Yamaguchi, T., Mori, S., Fujikawa, K., Nishiyama, K., Shimanouchi, T., Tanimoto, Y., Morigaki, K., Shimamoto, K. (2019) Alteration of Membrane Physicochemical Properties by Two Factors for Membrane Protein Integration. *Biophys. J.* 117, 99-110.
- (2) Nomura, K., Mori, S., Fujikawa, K., Osawa, T., Tsuda, S., Yoshizawa-Kumagaye, K., Masuda, S., Nishio, H., Yoshiya, T., Yoda, T., Shionyu, M., Shirai, T., Nishiyama, K., Shimamoto, K. (2022) Role of a bacterial glycolipid in Sec-independent membrane protein insertion. *Sci Rep.* 12, 12231.

L1-4

三次元磁場配向プローブによる微結晶粉末のin situ単結晶NMR

○久住亮介¹, 安井颯¹, 門間啓¹, 和田昌久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 single-crystal NMR of microcrystalline powder by using a home-built probe for magnetically oriented microcrystal suspension

○Ryosuke Kusumi¹, Hayate Yasui¹, Hiroshi Kadoma¹, Masahisa Wada¹, Kazuyuki Takeda²

¹ Graduate School of Agriculture, Kyoto University

² Graduate School of Science, Kyoto University

Micrometer-sized biaxial crystals can be magnetically oriented by a frequency-modulated rotating magnetic field. For complete determination of the chemical shift (CS) tensor via in-situ ¹H-¹³C double resonance NMR of magnetically oriented microcrystal suspension (MOMS), we developed a probe enabling temporal tilt of the axis of modulated-rotation during the period of pulse application and signal acquisition. Rotation patterns of ¹³C CS around the tilted axis obtained from the MOMS of L-alanine allowed complete determination of ¹³C CS tensor.

固体NMRで化学シフト (CS) テンソルを解析すれば, 原子核周りの電子環境の情報が得られる. CSテンソルは, ゴニオメーター付きプローブに単結晶を設置し, 静磁場 B_0 に垂直とした3つの直交軸 (≈結晶軸) 周りに結晶を回転させ, 化学シフトの変化 (単結晶振動パターン) を観測することで決定される¹⁾. この単結晶法はCSテンソルの主値と主軸方向を完全に決定できる有力な手法であるが, 数mmサイズの巨大な単結晶が必要という欠点を持つ. 一方, 我々はこれまでに, 変調回転磁場により三次元配向させた二軸性 (磁化率テンソルの主値 $0 > \chi_1 > \chi_2 > \chi_3$) の微結晶とUV硬化樹脂の複合体 (Magnetically Oriented Microcrystal Alloy, MOMA) が, μm サイズの微結晶からのCSテンソルの決定に有効であることを示した²⁾. さらに, 試料の変調回転が可能な固体NMRプローブを開発し, 液体中で微結晶を三次元磁場配向させた磁場配向微結晶懸濁体 (Magnetically Oriented Microcrystal Suspension, MOMS) について, 媒体を硬化させることなく in situで単結晶振動パターンを観測することにも成功している³⁾. しかしながら, これまでに作製したプローブでは変調回転軸 ($\parallel \chi_3$) が B_0 に直交な方向に固定されており, 観測可能な単結晶振動パターンは χ_3 軸周りのものに限られていた. MOMS法によりCSテンソルを完全に決定するためには, 残る2つの磁化軸周りを含む3つの振動パターンを得るか, もしくは χ_3 軸を一時的に直交方向からずらして一般角周りの振動パターンを得る必要がある.

そこで我々は, 後者のアプローチを採用し, MOMSのための変調回転軸をNMR測定時にのみ傾斜可能な二軸可変型プローブを新たに開発した. 同プローブにより微結晶懸濁体からのCSテンソルの完全決定を試みるとともに, 二次元法との組み合わせによる応用展開の可能性を探索した.

三次元磁場配向プローブ, 微結晶懸濁液, 化学シフトテンソル

○くすみりょうすけ, やすいはやて, かどまひろし, わだまさひさ, たけだかずゆき

二軸可変型プローブは、7.5 mm二重共鳴MASプローブを改造して作製した (Fig. 1) . 試料管の長軸を B_0 と直交させて変調回転させつつ、任意のタイミングで変調回転軸を傾斜可能な機構とした。NMR測定のための磁石および分光計には、300 MHz用超伝導磁石 (7.05 T) とOPENCORE NMR分光計⁴⁾を使用した。L-アラニン微結晶の懸濁液 (10 wt%, 媒体粘度12 Pa·s) をガラス試料管に封入してプローブ内にセットし、NMR磁場下で間欠型の変調回転 (15 rpm で180°回転させ B_0 方向で1 s停止) を印加し微結晶を三次元配向させた。なおMOMSにおいては、微結晶は三次元配向した状態で試料管 (媒体) とともに変調回転した状態となる。そこで、 B_0 と配向した微結晶の χ_1 軸のなす角が θ となった際に、変調回転軸を30°傾斜させ、固体 ^{13}C CP NMR測定を行った。異なる θ について測定を繰り返し、一連のスペクトルを収集した。

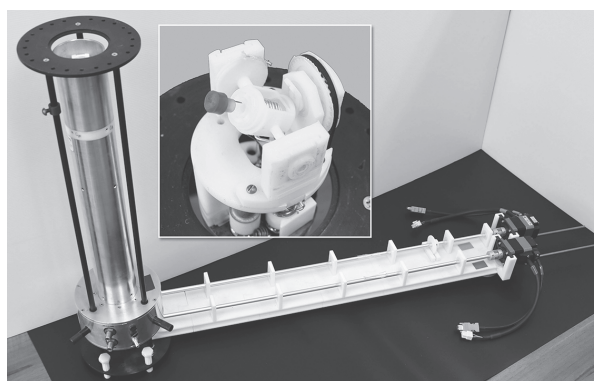


Fig. 1 Photographs of the whole and the head of the developed probe.

得られた固体 ^{13}C CP NMRスペクトルをFig. 2に示す。三次元磁場配向化により先鋭化した ^{13}C 共鳴ピークが検出され、 θ に依存してスペクトルパターンが変化する様子が明瞭に観測された。この結果は傾斜角30°周りの単結晶振動パターンが得られたことを意味している。パターンの解析の結果、カルボキシ炭素の ^{13}C CSテンソルを完全に決定することに成功した。

二次元法を用いた実験では、カルボキシ炭素が ^{13}C ラベル化されたL-アラニン微結晶の懸濁液を使用し、変調回転軸 ($\parallel \chi_3$) は傾斜させずに、混合時間 (200 ms) における試料管の回転により θ を変化させることで異なる θ 間での相関スペクトルを観測した。Fig. 3にその例を示す。混合期における θ の変化に伴い、相関ピークの化学シフトが変化する様子が観測された。単結晶を用いた既往の手法においては、混合期に結晶を回転させることで、複雑な化合物でも振動パターンの帰属を可能とする二次元化学シフトテンソル相関法が提案されている⁵⁾。MOMSにおいても、二次元シーケンスを用いた同様のアプローチが化学シフトの変化の追跡に有効であることが示された。

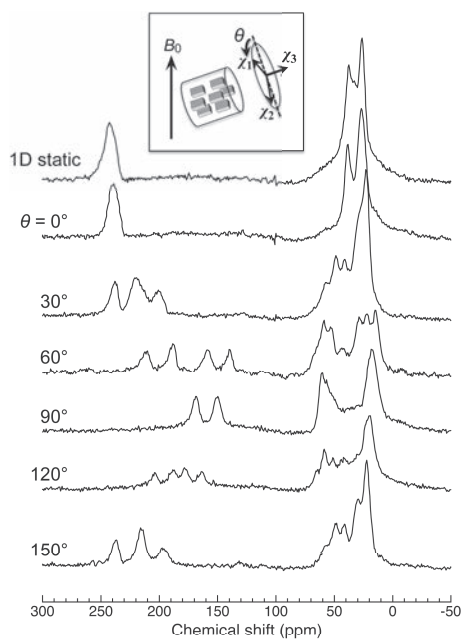


Fig. 2 ^{13}C CP spectra of MOMS of L-alanine under intermittent rotation. θ indicates the direction of the χ_1 -axis with respect to B_0 just before applying the temporal tilt by 30°.

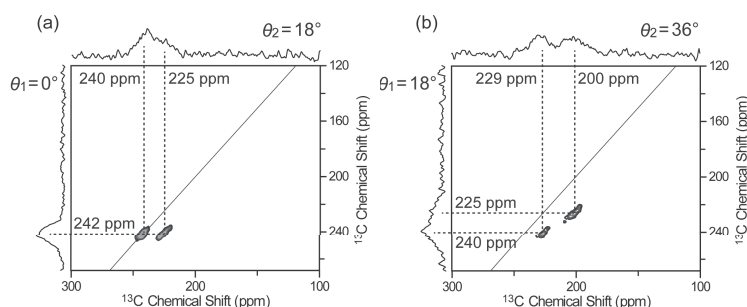


Fig. 3 ^{13}C – ^{13}C correlation spectra of MOMS of L-alanine obtained by starting the sequence at (a) $\theta = 0^\circ$ and (b) $\theta = 18^\circ$. The sample tube was rotated by 18° during the mixing time of 200 ms.

References: 1), C. A. Fyfe, *Solid State NMR for Chemists* (1983); 2), R. Kusumi et al., *J. Magn. Reson.*, **223**, 68 (2012); 3), R. Kusumi et al., *J. Magn. Reson.* **309**, 106618 (2019); 4), K. Takeda, *J. Magn. Reson.* **192**, 218 (2008); 5), M. H. Sherwood et al., *J. Magn. Reson.* **84**, 466 (1989).

L1-5

細胞内構造生命科学にむけたDNP-MAS-NMRの装置・方法論開発と応用

○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 量子情報・量子生命研究センター

Methods and Instruments of DNP-MAS-NMR for In-Cell Structural Life Science

○Yoh Matsuki^{1,2}, Toshimichi Fujiwara^{1,2}

¹ Institute for Protein Research, Osaka University

² Center for Quantum Information and Quantum Biology, Osaka University

We have been developing methods and instruments for high-field (16.4 T), ultra-low temperature (30 K) magic-angle spinning dynamic nuclear polarization NMR (DNP-MAS-NMR) spectroscopy. Combining the closed-cycle helium MAS and cryogenic signal preamplification technologies, the total sensitivity gain of ~4000 is now routinely achievable, paving a way to high-sensitivity in-cell structural study of membrane proteins and amyloid fibrils. In the presentation, we discuss our recent efforts on i) structural analysis of unlabeled compounds and proteins, ii) nanodiamond-based polarizing agents for in-cell DNP, iii) background suppression techniques using the microwave frequency modulation, and iv) analysis of proteins' conformation ensemble in dynamic equilibrium.

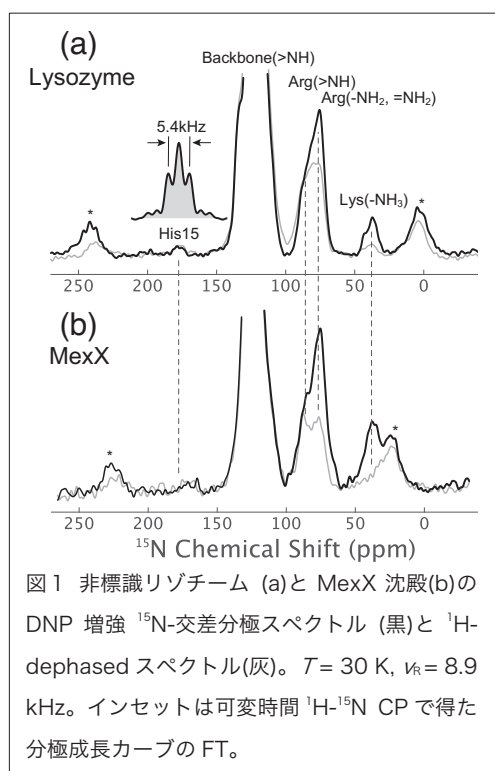


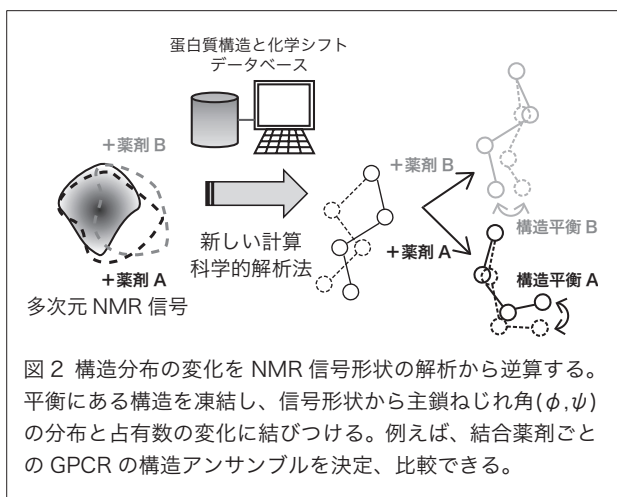
図1 非標識リゾチーム (a)と MexX 沈殿(b)のDNP 増強 ¹⁵N-交差分極スペクトル (黒)と ¹H-dephased スペクトル(灰)。T= 30 K, ν_R = 8.9 kHz。インセットは可変時間 ¹H-¹⁵N CP で得た分極成長カーブのFT。

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の感度を大きく向上できる可能性の
ある技術であるが、高磁場条件での効率低下が問題であ
る。我々はこれまでに、ヘリウムを試料の回転と冷却に用
いる「極低温MAS-DNP法」を開拓[1]、高磁場条件でも高い
感度利得が得られることを示した[2]。また希少なヘリウ
ムを消費せずに極低温(~20 K)MASを長期安定に実現でき
る「完全閉回路」DNPプローブと試料回転システムを開発、
高磁場条件においてもDNP効率を維持しつつ、複雑な分子
系の多次元分解NMR測定を可能にした[3]。閉回路回転シ
ステムの「戻りガス」で信号検出器を冷却し、信号増強
とノイズ抑制を両立できることも示した[4]。これ
らを併せ、現状で総合感度利得はMAS条件、高磁場
(16.4 T, 700 MHz)・高分解能条件で4000倍を超えた。
感度向上のみならず、高分極核スピン特有の「高温近似の
破れ」を積極的に利用する、スピン分極の絶対値計測法[5]
やメソスケール空間選択的高感度化技術[6]も開発した。

本年度は、次のことについて進展があったので報告
する。(i)非標識有機分子や蛋白質試料の計測(図1)、(ii)
強い還元性環境下(例えば細胞内環境)でも失活せずに、広汎な生体分子を高分極化できる、表

動的核分極(DNP)法、高磁場・極低温条件、マジック角試料回転(MAS)、細胞内DNP

○まつき よう, ふじわら としみち



ある。X線、電子線回折法では構造が分布した分子系の解析は困難であるし、水素原子位置の決定も難しいから、DNP-MAS-NMRは相補的な協働解析手段の一つとなる。図1(a, b)に示すのはそれぞれ、鶏卵リゾチーム(14 kDa, ^{13}C 換算で2 nmol)微結晶試料、バクテリアの多剤排出ポンプ蛋白質 MexX (30 kDa, ^{13}C 換算で1 nmol)の沈殿試料の ^{15}N CP スペクトルである。DNPとキュリーの温度効果も含めた総合感度利得はそれぞれ1500倍、400倍で、 ^{13}C スペクトルなら2分、 ^{15}N スペクトルでは30分程度の積算で十分なS/Nが得られた。リゾチーム唯一のヒスチジン(His-15)側鎖の ^{15}N 信号が175 ppm付近に観測されており、1残基感度があるとわかる。シフト値からHis-15は N^{ϵ} がプロトン化した ϵ 型互変異性体であり、可変接触時間 ^{1}N - ^{15}N CP法からH-N距離は1.17Åと計測できた。水素原子位置の精密決定に原理的な誤差がつかまとう電子線回折法(マイクロED)と組み合わせ、例えば薬剤-蛋白質間の水素結合モード決定などに応用する計画だ。現状ではNMRだけで全体的な立体構造解析までは難しいが、残基ごとの二次構造分布、一部残基の側鎖の配座、側鎖アミノ基のプロトン化状態などが、構造分布があっても決定できる。また、構造の乱れた領域や水素原子位置の情報が取れる点で独特の貢献が可能である。

動的平衡にある蛋白質の構造アンサンブル決定法も開発中である(図2)。構造分布を瞬間凍結し、NMR信号の形状から構造アンサンブルを推定する方法で、溶液NMR、X線回折、CryoEMでアクセスできない情報が、例えば細胞内で直接取得できる。構造分布の動的平衡を利用したソフトでプロミスカスな機能発現は、G蛋白質共役受容体(GPCR)、多剤結合性転写因子、アミロイド線維の線維核外領域などで広く見られ、蛋白質作動機構の普遍的なストラテジーの一つかもしれない。この他、ナノダイヤモンドDNP法、背景消去技術などについても最新の進捗を報告する。

[文献]

- [1] Y. Matsuki et al., *J. Magn. Reson.* 225, 1- (2012)
- [2] Y. Matsuki et al., *PhysChemChemPhys* 23, 4919- (2021)
- [3] Y. Matsuki et al., *J. Magn. Reson.* 259, 76- (2015); Y. Matsuki et al., *eMagRes* 7, 9- (2018)
- [4] Y. Matsuki et al., *J. Magn. Reson.* 335, 107139 (2022)
- [5] T. Sugishita et al., *Solid State NMR* 99, 20-26 (2019)
- [6] Y. Matsuki et al., *J. Phys. Chem. C* 124, 18609-18514 (2020)
- [7] M. Takamuku et al., *Neurochem. Int.* 157, 105345 (2022)

[謝辞]

本研究は科学技術振興機構・A-STEP、文部科学省 先端研究基盤共用・プラットフォーム形成事業、科研費・基盤B、蛋白質研究所・新分野開発プログラムによる援助を受けて行われた。

L1-6

DNP-SENS of Metal Oxides and Sulfides

○永島 裕樹^{1*}, Julien Trébosc³, 今 喜裕¹, Yannick Coppel⁵, Myrtil L. Kahn⁵,
Olivier Lafon^{2*}, Jean-Paul Amoureux^{2,4*}

¹産業技術総合研究所 触媒化学融合研究センター, ²University of Lille, CNRS, UCCS, ³University of Lille, CNRS, IMEC, ⁴Bruker Biospin., ⁵LCC-CNRS, University of Toulouse

DNP-SENS of Metal Oxides and Sulfides

○Hiroki Nagashima^{1*}, Julien Trébosc³, Yoshihiro Kon¹, Coppel Yannick⁵, Myrtil L. Kahn⁵,
Olivier Lafon^{2*}, Jean-Paul Amoureux^{2,4*}

¹Interdisciplinary Research Center for Catalytic Chemistry, AIST, ²University of Lille, CNRS, UCCS, ³University of Lille, CNRS, IMEC, ⁴Bruker Biospin., ⁵LCC-CNRS, University of Toulouse

Dynamic nuclear polarization surface-enhanced NMR spectroscopy (DNP-SENS) is a powerful technique that can analyze the surface structure of inorganic nanomaterials, and the observation of quadrupolar nuclei is in great demand. Recently, we have shown that D-RINEPT can polarization transfer from ¹H to quadrupolar nuclei, even in low-gamma and/or distant nuclei. Here, we report the observation of ³³S and ⁶⁷Zn in ZnS for the first time. Another issue is to obtain high-resolution spectra of quadrupolar nuclei with DNP-SENS. Here, the combination of D-RINEPT and MQMAS sequences overcomes this problem and applies it to several nanomaterials (gamma-alumina, ZnO nanocrystals, (ZnO-ZrO₂)/SiO₂ catalysts and BN/SiO₂ catalysts).

固体触媒などに代表されるナノ材料の特性において、材料の表面に局在した特徴的な構造は決定的な役割を持つ。これらのナノ材料の表面構造と特性との相関性を理解した上で、的確な材料設計を進めることは重要である。そのため、表面構造を原子スケールレベルで調べる手段の発展はこれからもナノ材料科学を進展させる鍵となる。固体 NMR は、他の分光法と比べて感度が低く、加えて表面を選択的に観測ができないために、ナノ材料の表面構造の観測にはほとんど利用されてこなかった。近年、低感度を克服する手法として、動的核偏極 (Dynamic Nuclear Polarization: DNP) を利用した固体 NMR の手法が発展した^[1]。DNP-NMR はラジカル溶媒を試料に加えることで、ラジカル分子が試料表面近傍に局在し、表面を選択的に高感度化できる。ラジカル → 溶媒 ¹H 核 → 表面観測核、の流れで表面 NMR 信号を観測する方法は DNP Surface-Enhanced NMR Spectroscopy (SENS)と呼ばれている(図 1a)^[2]。これまでの DNP-SENS の報告は、主に ¹³C, ¹⁵N, ²⁹Si などの核スピン量子数 $I=1/2$ の原子核の観測が中心であり、 $I>1/2$ の四極子核の観測には適用が難しかった。しかし、四極子核は周期律表の 75%程を占め、¹⁷O を筆頭に構造解析上重要な原子核が多く、低感度な原子核が多いため、DNP-NMR の適用が望まれてきた。

¹H と四極子核間の分極移動に対して、我々は DNP-SENS に適した新しい分極移動法 Adiabatic D-RINEPT を開発したことを報告してきた(図 1b)^[3]。Adiabatic D-RINEPT は、これまで困難だった DNP-SENS による低周波数四極子核の観測を可能にした。

DNP-SENS, Metal oxides, Metal sulfides

○ながしま ひろき, とればすく じゅりあん, こん よしひろ, こっぺる やにつく,
かーん みるていーる, らふおん おりびえ, あむるー じゃんぼーる

さらに、我々は Adiabatic D-RINEPT に Multiple Quantum (MQ) MAS を追加した D-RINEPT-MQMAS シーケンスを開発し、DNP-SENS による四極子核の MQMAS スペクトルの測定法を ISMAR で報告した(図 1c)。

本発表では、上記パルスシーケンスを使用した DNP-SENS の金属酸化物や金属硫化物への応用を報告する。Adiabatic D-RINEPT ではこれまで金属酸化物の DNP-SENS スペクトルを観測してきたが、これに加え、今回は Cd フリーの量子ドットとして有望な ZnS ナノ結晶の ^{67}Zn と ^{33}S の DNP-SENS スペクトルの観測結果を報告する。また、D-RINEPT-MQMAS 測定では、 $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ 、アモルファス SiO_2 をはじめ、量子ドットに使用されるドデシルアミン修飾 ZnO に加え、通常の ZnO ナノ粒子の ^{17}O MQMAS の結果を報告する。その他、複合金属酸化物として、 $\text{SiO}_2\text{-Al}_2\text{O}_3$ および $(\text{ZrO}_2\text{-ZnO})/\text{SiO}_2$ の ^{17}O MQMAS 測定結果を示す。

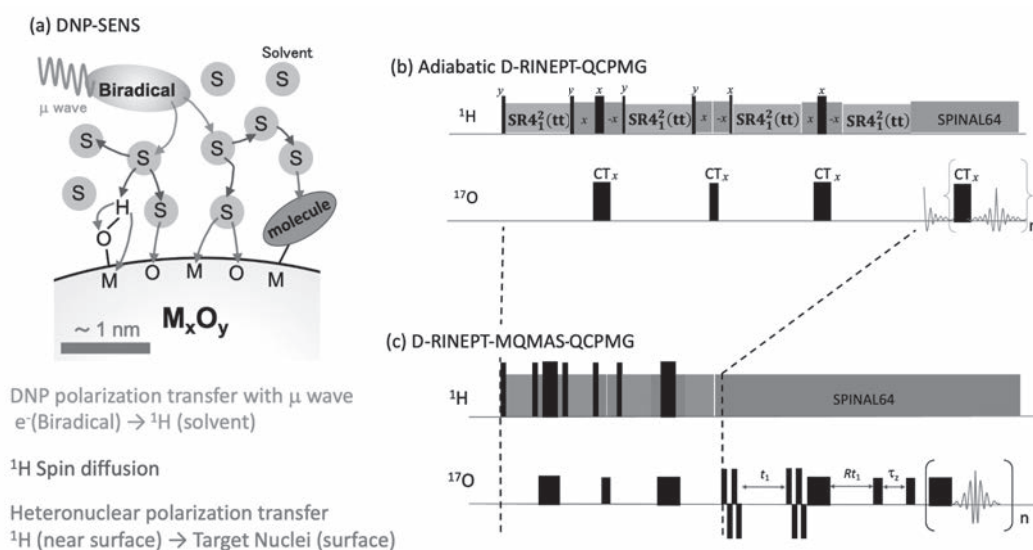


Figure 1. (a) DNP-SENS and Pulse sequence diagram of (b) Adiabatic D-RINEPT-QCPMG and (c) D-RINEPT-MQMAS-QCPMG.

Acknowledgement

本研究は JSPS 科研費 JP 20K15319 の助成を受けたものです。

References

- [1] K.-N. Hu., et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 10844–10845.
- [2] A. Lesage., et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, *132*, 15459–15461.
- [3] H. Nagashima., et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **2020**, *142*, 10659–10672.

L2-1

シアノバクテリアの光センサーにおける脱プロトン化した塩基性アミノ酸の観測

○永江峰幸¹, 飯塚佑介¹, 青山洋史¹, 宮ノ入洋平², 神野智司³, 伊藤隆⁴, 広瀬侑⁵, 三島正規¹

1東京薬科大学・薬学部

2大阪大学・蛋白質研究所

3株式会社CRYO SHIP

4東京都立大学・理学研究科

5豊橋技術科学大学・工学研究科

Observation of a deprotonated basic amino acid in a cyanobacterial photosensor

○Takayuki Nagae¹, Yusuke Iizuka¹, Hiroshi Aoyama¹, Yohei Miyanoiri², Satoshi Kamino³, Yutaka Ito⁴, Yuu Hirose⁵, Masaki Mishima¹

¹ Department of Pharmacy, Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences

² Institute for Protein Research, Osaka University

³ CRYO SHIP Incorporated

⁴ Graduate School of Science, Tokyo Metropolitan University

⁵ Graduate School of Engineering, Toyohashi University of Technology

Cyanobacterial photosensor proteins have a chromophore, phycocyanobilin (PCB), and exhibit a wide range of absorption wavelengths ranging from UV to far-red light. The cyanobacterial photosensor protein RcaE reversibly converts between green and red-absorbing states. To elucidate the mechanism of this absorption wavelength tuning, we are studying its structural features and protonation state using NMR spectroscopy and X-ray crystallography. Recently, we have determined the structures of RcaE in both green and red absorbing states at 1.63 and 1.75 Å resolution, respectively. Furthermore, we succeeded in direct observation of the deprotonated amino group of a lysine residue neighboring to PCB. We have found that deprotonated amino group (-NH₂) of a lysine. This is the first report of the direct observation of deprotonated lysine inside a native protein structure.

シアノバクテリアの光センサータンパク質は色素フィコシアノビルン(PCB)の結合により、紫外光から遠赤色光まで広範な極大吸収波長を示す。シアノバクテリアの光センサーの1つであるRcaEは緑色光吸収型(Pg)および赤色光吸収型(Pr)の二状態間を可逆的に光変換するが、これにはPCBの脱プロトン化/プロトン

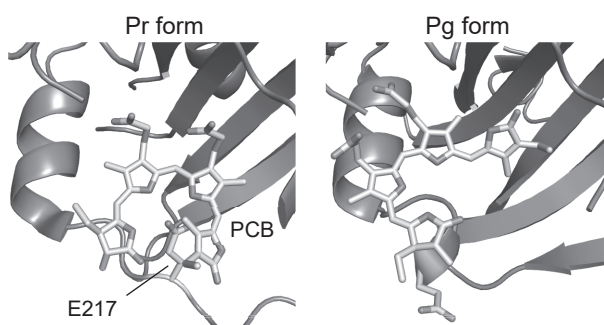


Fig. 1. Structures of RcaE in the Pr and Pg forms. Photoisomerization induces a positional change of PCB in the binding pocket.

脱プロトン化リシン, 光センサー, シアノバクテリオクロム

○ながえたかゆき, いいづかゆうすけ, あおやまひろし, みやのいりようへい, かみのさとし, いとうゆたか, ひろせゆう, みしままさき

化を伴うことが報告されている¹。この吸収波長変換のメカニズムを明らかにするため、我々はNMR分光法とX線結晶構造解析法を用いて光センサーRcaEの構造的な特徴およびプロトン化状態の解析を進めている。これまでにPrおよびPgの両状態について1.63 Åおよび1.75 Åの高分解能で結晶構造決定に成功している。解析の結果、光吸収によってPCB内の二重結合がZ/E異性化し、それに伴いPCBの位置がGAFドメイン内で大きく移動することが明らかになった(Fig. 1)。このPCBの移動は、E217など吸収波長チューニングに重要なアミノ酸残基との相互作用を大きく変えることが明らかとなった。しかしながら、RcaEの光吸収の鍵である水素はX線結晶構造解析では解析困難である。そこでPCBのアミノ基の¹⁵N直接測定を行った。その結果、Prでは4つの窒素原子全てが脱プロトン化していること、Pgでは4つの窒素原子のうち1つが脱プロトン化していることが実験的に明らかになった²。

さらに、PCBだけではなくタンパク質側のNMRスペクトルを測定した結果、PCBが脱プロトン化しているPgにおいて、特異な化学シフトのNMR信号を観測した(Fig. 2(a))。これはPCB近傍に存在するリシン残基の側鎖アミノ基が電荷をもたないNH₂型の状態にあることに由来する。このことはHSQCの¹⁵N軸の分裂からも確認できた(Fig. 2(b))。興味深いことに、PCBがプロトン化しているPrでは、このLys261の側鎖アミノ基は通常のNH₃⁺型になっていた。リシンが中性のNH₂型の状態にあるのは極めて稀で、疎水性コアに人為的にアミノ酸置換を導入した人工タンパク質においてその存在が報告されているのみであり³、天然のタンパク質においてNH₂型のリシンを実験的に直接観測したのは本研究が初めてである。また、¹³Cε標識を施したリシン(SAIL)を用いて、1D ¹³C測定により同位体シフトを観測することによって、NH₃⁺とNH₂を区別する手法⁴を適用したところ、確かにPgではNH₂型となることを確認できた。

References

- [1] Hirose Y., et al. (2013) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110(13), 4974. [2] Nagae T., et al., (2021) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 118(20), e2024583118. [3] Takayama Y., et al., (2008) *J Am Chem Soc.* 130(21), 6714. [4] Takeda, M., et al. (2021) *Magn. Reson.*, 2(1), 223.

謝辞

本研究の多次元 NMR 測定は、文部科学省先端研究基盤共用促進事業「NMR 共用プラットフォーム」(理研横浜)と蛋白研拠点事業 NMR 共同利用研究にご支援いただきました。SAIL 法は甲斐荘正恒 東京都立大学名誉教授にご支援いただきました。

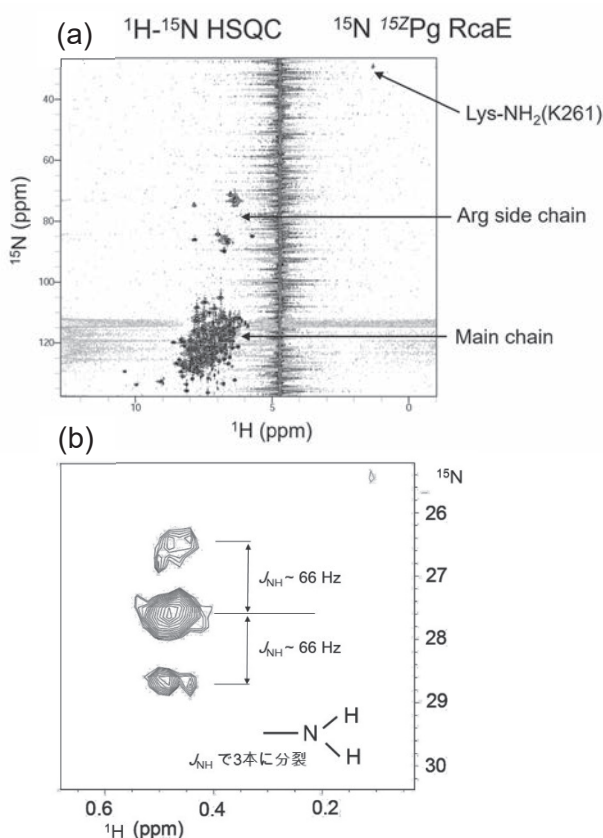


Fig. 2. Detection of Lys-NH₂ (a) ¹H-¹⁵N HSQC spectrum of ¹⁵N labeled RcaE. (b) Close up view of the signal in (a) without ¹H decoupling.

L2-2

In-cell NMR法によるヒト生細胞内における核酸の塩基対開閉ダイナミクスの解析

○山置佑大^{1,2}、永田崇^{1,2}、近藤敬子¹、阪本知樹²、Eladl Omar²、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

Base-pair opening dynamics of nucleic acids in living human cells studied by in-cell NMR

○Yudai Yamaoki^{1,2}, Takashi Nagata^{1,2}, Keiko Kondo¹, Tomoki Sakamoto², Omar Eladl², Masato Katahira^{1,2}

¹ Institute of Advanced Energy, Kyoto University

² Graduate School of Energy Science, Kyoto University

The structural dynamics of nucleic acids in living cells has been considered to be different from those in *in vitro*. Here, we applied the in-cell NMR techniques to various nucleic acids introduced in living human cells and evaluated their structural dynamics. The base-pair opening dynamics of RNA hairpin structure and telomere G-quadruplex (GQ) structure in living human cells were analyzed at base-pair resolution. We found that some G-C base-pairs of hairpin structure and all G-G base-pairs of GQ structure open more frequently in living human cells than *in vitro*. We propose that the higher frequencies of the base-pair opening of hairpin and GQ are caused by non-specific interaction of hairpin and GQ with endogenous proteins.

細胞内は様々な生体高分子が密に混在した分子込み合い環境であるため、核酸構造のダイナミクスが試験管内の希薄な環境下とは異なると考えられる。よく知られた核酸構造のダイナミクスとして、塩基対の開閉運動がある。塩基対の開閉運動は、DNA/RNA 結合蛋白質による核酸認識において重要な役割を果たす。しかしながら、生きた細胞内環境下における塩基対の開閉運動に関する知見はこれまで得られていなかった。本研究では in-cell NMR 法と water magnetization transfer 測定を組み合わせ、ヒト生細胞内において、種々の核酸構造に含まれるイミノプロトンと溶媒の水プロトンとの交換速度を計測することにより、細胞内核酸の塩基対開閉のダイナミクスを解析することを目的とした。

閉じた塩基対中において水素結合を形成しているイミノプロトンは溶媒の水のプロトンとの交換が抑えられている。一方で、塩基対が開き、水素結合が解消された状態からは容易に水のプロトンとの交換が生じる(Fig. 1A)。そのため、イミノプロトンと水のプロトンの交換速度 k_{ex} は塩基対が開裂する速度 k_{open} 、塩基対形成速度 k_{close} 、開いた状態の塩基対からのイミノプロトンの交換速度 $k_{\text{ex,open}}$ を用いて、下記のように表される。

核酸, in-cell NMR, 塩基対開閉ダイナミクス

○やまおきゆうだい, ながたたくし, こんどうけいこ, さかもともき, えらどるおまー, かたひらまさと

$$k_{\text{ex}} = \frac{k_{\text{open}} \cdot k_{\text{ex,open}}}{k_{\text{close}} + k_{\text{ex,open}}} \quad (\text{Eq. 1})$$

本研究では、ヘアピン RNA (hpRNA) およびヒト染色体末端テロメアに存在するグアニン四重鎖(GQ) DNA (teloDNA) (Fig. 1B) について、ヒト細胞内における k_{ex} を測定した。

まず、試験管内で様々な Tris 濃度における $k_{\text{ex}}^{\text{in vitro}}$ の測定を行った。ここで Tris は塩基触媒として働き、 $k_{\text{ex,open}}$ を加速する (Fig. 1A)。高濃度 Tris 存在下 ($k_{\text{ex,open}} \gg k_{\text{close}}$ 条件下) では、 $k_{\text{ex}}^{\text{in vitro}}$ は飽和して一定の値となり、試験管内の塩基対開裂速度 $k_{\text{open}}^{\text{in vitro}}$ に等しくなる。これにより、hpRNA および teloDNA の各塩基対に関し、 $k_{\text{open}}^{\text{in vitro}}$ が得られた (Fig. 1C)。

次に、細胞内において、water magnetization transfer 測定を行い、ヒト生細胞内におけるイミノプロトン交換速度 $k_{\text{ex}}^{\text{in-cell}}$ を求めることに成功した (Fig. 1C)。ここで、Eq. 1 より、次式の関係が導かれる。

$$\frac{k_{\text{ex}}}{k_{\text{open}}} = \frac{k_{\text{ex,open}}}{k_{\text{close}} + k_{\text{ex,open}}} \leq 1$$

$$k_{\text{ex}} \leq k_{\text{open}} \quad (\text{Eq. 2})$$

つまり、 $k_{\text{open}}^{\text{in-cell}}$ は常に $k_{\text{ex}}^{\text{in-cell}}$ よりも大きな値となることが分かる。

hpRNA および teloDNA の各塩基対に関し、 $k_{\text{ex}}^{\text{in-cell}}$ と $k_{\text{open}}^{\text{in vitro}}$ を比較したところ、hpRNA の 2 つの G-C 塩基対および teloDNA のすべての G-G 塩基対について、 $k_{\text{ex}}^{\text{in-cell}}$ が $k_{\text{open}}^{\text{in vitro}}$ よりも高い値を示した (Fig. 1C)。上記の関係式より、この

結果は、ヒト生細胞内において、hpRNA の 2 つの G-C 塩基対および teloDNA のすべての G-G 塩基対に関して、 $k_{\text{open}}^{\text{in vitro}} \leq k_{\text{open}}^{\text{in-cell}}$ である事、即ち試験管内に比べ、細胞内ではより頻繁に塩基対が開裂していることを示している。

さらに、試験管内に比べ、ヒト生細胞内において k_{open} が増大する要因を探るため、hpRNA および teloDNA の両者について、様々な分子込み合い試薬存在下における k_{open} を測定した。その結果、正電荷をもつリゾチーム存在下では、hpRNA および teloDNA の両者について明確な k_{open} の増大が見られた。このことは、細胞内においても、正電荷を有する蛋白質などの内在性の分子が、負電荷を有する核酸分子と相互作用することにより、塩基対の開裂が加速されていることを示唆している。

本研究では、ヒト生細胞内において、hairpin 構造および GQ 構造の一部またはすべての塩基対が試験管内に比べ、細胞内ではより頻繁に開裂していることを示した。この結果は、細胞内においては核酸構造中の塩基対は試験管内よりも高頻度で開き、様々な相互作用を可能にしていることを想像させる。

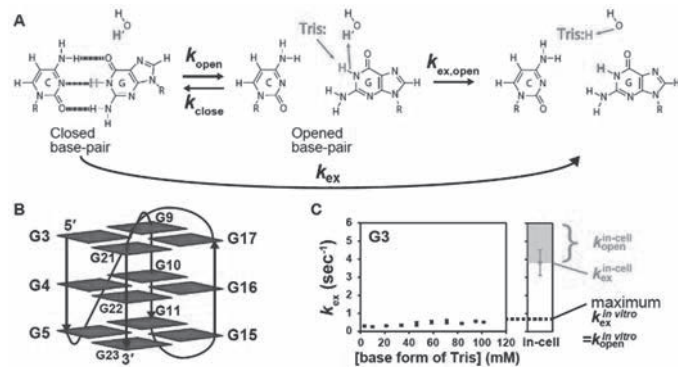


Fig. 1. Imino proton exchange analysis of teloDNA. (A) Scheme of imino proton exchange reaction. (B) GQ of telomere DNA. (C) k_{ex} values of G3 residue in living cells and at various Tris concentrations (*in vitro*).

References

- [1] Yamaoki *et al.*, *Phys. Chem. Chem. Phys.* (2018). [2] Yamaoki *et al.*, *Biophys. Rev.* (2020). [3] Sakamoto *et al.*, *Chem. Commun.* (2021).

L2-3

メチオニン側鎖メチル基の信号観測による細菌べん毛モーター固定子のNa⁺イオン結合による構造変化の解析

○錦野達郎¹, 小嶋誠司², 本間道夫², 宮ノ入洋平¹,

¹大阪大学・蛋白質研究所

²名古屋大学・理学研究科・理学専攻・生命理学講座

Na⁺-induced structural dynamics of the PomAB flagellar stator complex, observed by the spectra of methyl ¹³C in methionine residues.

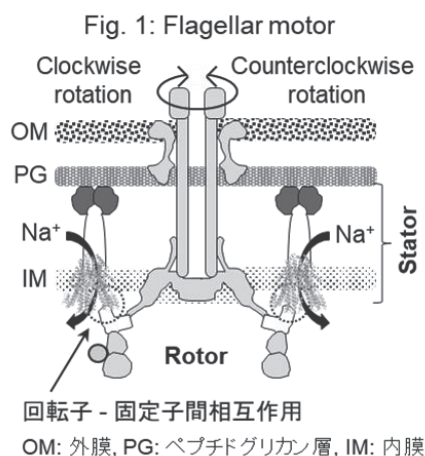
○Tatsuro Nishikino¹, Seiji Kojima², Michio Homma², Yohei Miyanoiri¹

¹Institute for Protein Research, Osaka University

²Division of Biological Science, Graduate School of Science, Nagoya University

The bacterial flagellar motor consists of the rotor and stator, and their interaction is essential to generate torque. The stator in marine *Vibrio* is made up of two membrane proteins, PomA and PomB, and functions as a sodium ion channel. We recently performed structural analyses by single particle cryo-EM and revealed that five PomA and two PomB molecules form the single stator complex, although the mechanism of sodium ion flux is still unclear. To clarify this, we analyzed structural dynamics of PomAB complex induced by sodium ion binding, using solution NMR. We prepared the stator proteins labeled with methyl ¹³C in methionine residues and measured ¹H-¹³C HMQC spectra with or without sodium ion, and found that chemical shift change occurred in several signals. To assign the signals, we have replaced each methionine with isoleucine or leucine, prepared proteins and measured their spectra. Based on the results from those measurements, we will discuss the structural dynamics of the stator induced by sodium ion binding.

細菌のべん毛は、回転モーターを持つ超分子複合体である。モーターは、膜内外に形成される電気化学ポテンシャル差を運動エネルギーに変換することで回転する (1)。このエネルギー変換は、回転子 (Rotor) の一部である C-ring とイオンチャネルとして機能する固定子複合体 (Stator) のイオン流に共役した相互作用によって生じる (Fig. 1)。海洋性ビブリオ菌 *Vibrio alginolyticus* (*V. alginolyticus*) の固定子複合体は、同じオペロンにコードされた 2 種類の膜タンパク質 [PomA, PomB] からなる。大腸菌やビブリオ菌の精製された固定子複合体の生化学的な解析から、複合体中の A サブユニットと B サブユニットの分子比は 4:2 であると考えられていた。しかし、2020 年に PomA/PomB と相同性のある *Campylobacter*, *Clostridium*, *Bacillus* の MotA/MotB 複合体が 5 分子の MotA と 2 分子の MotB から成ることがクライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析により明らかになり、MotB を軸として MotA 5 量体が回転することで C-ring と相互作用しながらイオンを通すモデ



細菌べん毛モーター, 固定子複合体, イオンチャネル, メチオニン ¹³C メチル基標識

○にしきのたつろう, こじませいじ, ほんまみちお, みやのいりようへい

ルが提案された (2,3)。このモデルを証明するために我々も *V. alginolyticus* の固定子複合体の構造をクライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析法で明らかにすることにした。その結果、*V. alginolyticus* の固定子複合体も 5 分子の PomA と 2 分子の PomB から成ることがわかった (Fig. 2)。H⁺ 駆動型の MotAB 複合体では H⁺ 配位位置の同定が困難だが、Na⁺ 駆動型の PomAB 複合体では Na⁺ の検出が可能で作用残基の同定が期待された。しかしながら、単粒子解析法で得られたマップとモデル構造からは正確な Na⁺ の配位位置が特定できなかった。そこで、溶液核磁気共鳴法 (NMR) を用いて固定子複合体を解析することで、Na⁺ の結合により生じる構造変化を明らかにしたいと考えた。固定子複合体は約 200 kDa の分子量を持ち、LB 培地 1 L あたりから 1 mg (~5 μM) の最終精製サンプルを調製することができる。この分子量と収量から一般的なサンプル調製法と測定法では解析が困難であることが予想されたため、複合体中のメチオニン残基のメチル基を 特異的に ¹³C 標識したサンプルを調製し、そのスペクトルを測定することにした (Fig. 3)。PomA 及び PomB にはそれぞれ 17, 16 残基のメチオニンが存在する。Na⁺ の結合に依存した構造変化を明らかにするために、野生型 (WT) 固定子複合体の試料に Na⁺ を含む試料と含まない試料を調製し、得られた 2 次元 ¹H-¹³C HMQC スペクトルを比較した。また、これまでの変異体解析から PomB の膜貫通領域に存在する必須のアスパラギン酸残基 (D24) に Na⁺ が結合することが分かっており、この残基の電荷を中和した D24N 変異体は Na⁺ が結合できず、べん毛モーターが回転しなくなることが分かっている。そこで D24N 変異を持つ試料を調製し、同様に測定を行ったところ、WT のスペクトルと比較して化学シフト変化の見られる信号が存在した。得られたスペクトル中の信号の帰属を行うため、PomA, PomB の膜貫通領域のメチオニン残基をロイシンまたはイソロイシンに置換した変異体試料を調製し、測定を行った。発表では、クライオ電顕単粒子解析で得られた構造情報と合わせて Na⁺ の結合により生じる *V. alginolyticus* 固定子複合体の構造変化について議論する。

Fig. 2: Cartoon model of PomA₅PomB₂

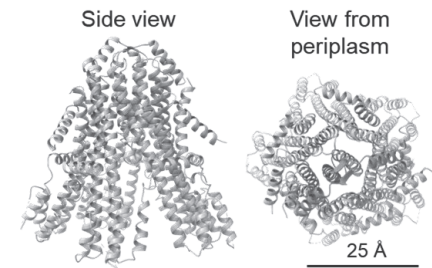
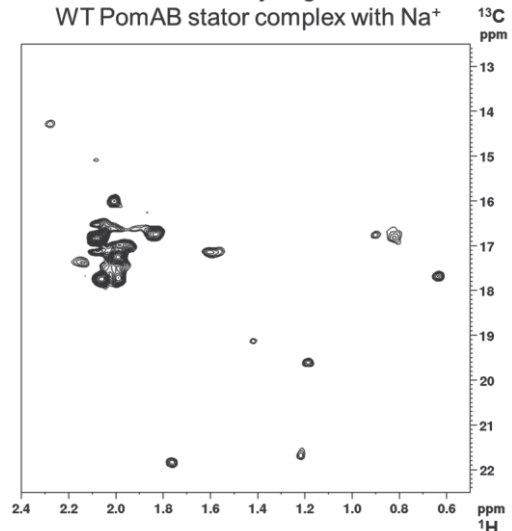


Fig. 3: ¹H-¹³C HMQC spectrum of Met ε methyl region for WT PomAB stator complex with Na⁺



References

- (1) Michio Homma, Seiji Kojima, Tatsuro Nishikino. (2022) Achievements in bacterial flagellar research with focus on *Vibrio* species. *Microbiol Immunol.*, 66, 75-95.
- (2) Mònica Santiveri, Aritz Roa-Eguiara, Caroline Kühne, Navish Wadhwa, Haidai Hu, Howard C Berg, Marc Erhardt, Nicholas M I Taylor. (2020) Structure and Function of Stator Units of the Bacterial Flagellar Motor. *Cell*. 183, 244-257.
- (3) Justin C Deme, Steven Johnson, Owen Vickery, Amy Aron, Holly Monkhouse, Thomas Griffiths, Rory Hennell James, Ben C Berks, James W Coulton, Phillip J Stansfeld, Susan M Lea. Structures of the stator complex that drives rotation of the bacterial flagellum. (2020) *Nat Microbiol.*, 12, 1553-1564.

L2-4

インバース型拡散プローブを用いた合成高分子のDOSY測定

○右手浩一¹, 渡邊一也^{1,2}, 高松京祐¹, 渡邊 颯¹, 徳田規紘¹

1 徳島大学・大学院理工学研究科

2 KURITA EUROPE・GmbH R&D department

DOSY measurements of synthetic polymers using an inverse geometry diffusion probe

○Koichi Ute¹, Kazuya Watanabe^{1,2}, Kyosuke Takamatsu¹, Soh Watanabe¹, Norihiro Tokuda¹

¹ Department of Applied Chemistry, Tokushima University

² R&D department, KURITA EUROPE GmbH

The diffusion coefficient of macromolecules in solution is small. A “diffusion NMR probe system” that can generate a large pulsed field gradient (PFG) is advantageous for the measurement. However, this system has been mainly used for nucleus with low gyromagnetic ratio (such as ⁷Li and ²³Na) and thus is not necessarily optimized for measurement of ¹H nuclei. In this study, ¹H diffusion-ordered two-dimensional NMR (DOSY) experiments were carried out for synthetic polymers with average molecular weights exceeding 1,000,000 in solution using an inverse geometry diffusion probe (maximum PFG intensity of 1700 G/cm). The results for acrylamide-based polymer electrolytes and standard polystyrene-poly(methyl methacrylate) systems are described.

溶液中における高分子の自己拡散係数 (D) は小さい。その測定には大きなパルス磁場勾配 (PFG) を発生できる「拡散プローブシステム」が有利であるが、従来、このシステムは主として ⁷Li や ²³Na のような低磁気回転比核の拡散測定に用いられてきたため、¹H 核の測定には必ずしも最適化されていない。本研究では、

¹H 核の測定に適したインバース型拡散プローブ (最大PFG強度 1700 G/cm) を用いて、重量平均分子量 (M_w) 100万を超える合成高分子のDiffusion-ordered two-dimensional NMR (DOSY) 測定を行った。アクリルアミド系高分子電解質、ならびに、標準ポリスチレン (PS) ・ポリメタクリル酸メチル (PMMA) 混合系の検討結果について述べる。

DOSY測定は、5 mm Diff BBI probeを装着したBruker Avance NEO 400型NMR装置を用い、*bpp-ste-led*パルス系列 (図1) により行った。データ解析にはTopSpin 4.1.4 (Bruker) のCONTIN法、または、NMRnotebook 2.8 with DOSY module 2.7 (NMRtec) の最大エントロピー (MEM) 法を用いた。

カチオン性アクリルアミド系共重合体 (図2) ($M_w = 3.9 \times 10^6$, $M_w/M_n = 3.1$, AETAC/AAm =

アクリルアミド系高分子電解質, 標準ポリスチレン, ポリメタクリル酸メチル

○うてこういち, わたなべかずや, たかまつきょうすけ, わたなべそう, とくだのりひろ

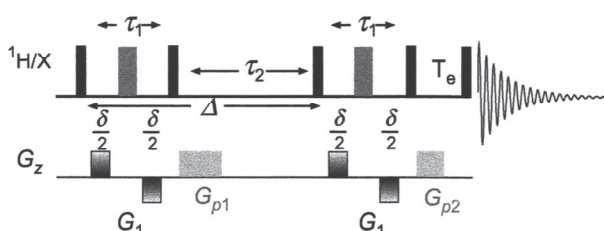


Fig. 1 The *bpp-ste-led* sequence [1].

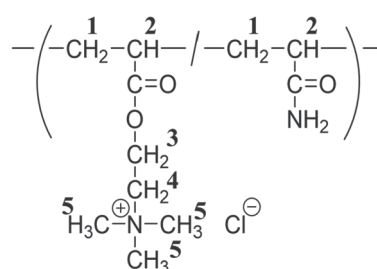


Fig. 2 Structure of acrylamide (AAm) - [2-(acryloyloxy)-ethyl]trimethyl ammonium chloride (AETAC) copolymer.

81.3/18.7) とポリアクリルアミド ($M_w = 1.3 \times 10^6$, $M_w/M_n = 1.6$) の等量混合物をNaCl (1 M) を含む重水に0.2 wt%溶解した試料のDOSYスペクトルを図3に示す。大きなPFGを使って拡散時間 Δ を10 msと短縮できたことで、横緩和時間 T_2 の短いAETAC単位の CH_2 基による共鳴線 (3および4) や主鎖 CH 基による共鳴線 (2) が明瞭に観測されるとともに、 M_w の異なる2つのポリマー成分の D の分布が分離して観測された。

標準PMMA 3種 ($M_w = 1,840, 67,400, 1,677,000$) と標準PS 3種 ($M_w = 2,800, 43,900, 1,260,000$) を等量混合して2 % w/v $o\text{-C}_6\text{D}_4\text{Cl}_2$ 溶液とし、60 °Cで測定したDOSYスペクトルを図4に示す。PMMAの OCH_3 基によるピークと、PSの C_6H_5 基によるピークがそれぞれ3つによく分離されていることがわかる。 OCH_3 基による3つのピークと C_6H_5 基による3つのピークからそれぞれ D の値を読み取り、対応する M 値と両対数プロットしたところ良好な直線関係が得られた(図1右)。PMMAについては $\alpha = -0.643$, PSについては $\alpha = -0.655$ であった。このような内部標準法による多分散PMMAの M_w と M_w/M_n の測定結果については講演当日に述べる。

[1] D. Wu, A. Chen, C. S. Johnson, Jr., *J. Magn. Reson. Ser. A*, **115**, 260 (1995)

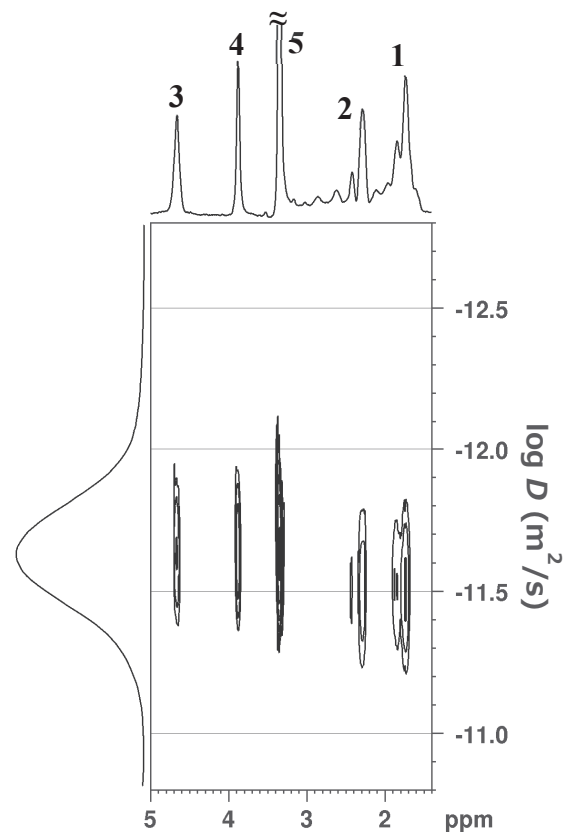


Fig. 3 DOSY contour plots for a mixture of polyacrylamide ($M_w = 1.3 \times 10^6$) and AAm-AETAC copolymer ($M_w = 3.9 \times 10^6$) in 1 M NaCl/ D_2O (0.2 wt%) at 30 °C (Δ 10 ms, δ 3.4 ms, τ_g 0.5 μs , 64 linear G gradient steps, G_1 20 G/cm, G_{64} 1000 G/cm, 128 scans were accumulated per each G step (total time 11 h 23 min).

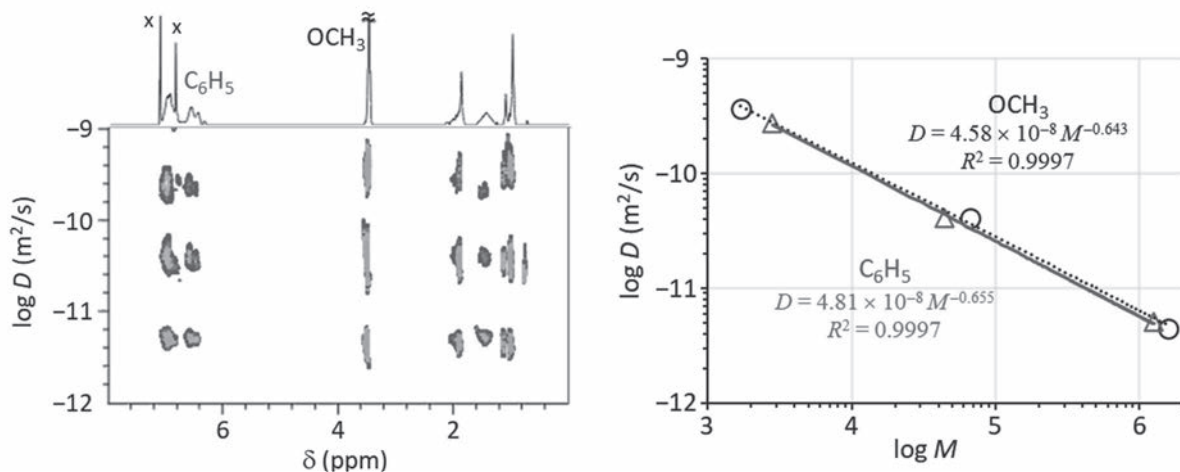


Fig. 4 DOSY contour plots for a mixture of 3 standard PMMA samples (M_w 1,840, 67,400, 1,677,000) and 3 standard PS samples (M_w 2,800, 43,900, 1,260,000) in $o\text{-C}_6\text{D}_4\text{Cl}_2$ (2 % w/v) at 60 °C using the *bpp-ste-led* pulse sequence. The DOSY data was analyzed by the maximum entropy method (MEM). Relevant DOSY parameters are as follows: Δ 12 ms, δ 4.0 ms, τ_g 0.5 μs , 128 linear Q gradient steps (G_1 20 G/cm, G_{128} 1700 G/cm), 64 scans were accumulated per each G step (total time 11 h 23 min). Relationship between M and D obtained by the DOSY-MEM analysis of the mixture. The data for PMMA and PS were determined from the resonances of the methoxy and phenyl groups, respectively.

L2-5

残基特異的LFER関係はポリペプチド鎖のスムーズな構造変化のための物理化学的要件である

○神田大輔¹, 林成一郎¹, 藤浪大輔²

¹九州大学・生体防御医学研究所

²静岡県立大学・薬食生命科学総合学府

Residue-specific free energy relationship is a prerequisite for the smooth conformational changes of polypeptides

○Daisuke Kohda¹, Seiichiro Hayashi¹, Daisuke Fujinami²

¹ Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University

² Grad. Sch. Integr. Pharm. Nutr. Sci., University of Shizuoka

We showed that the combination of the HSQC0 experiment and EXSY+ Π experiment suffices for the accurate determination of *residue-specific* equilibrium constant K and rate constant k values. Using a bioactive peptide, which is in equilibrium between two states in solution, we discovered *residue-specific* LFER (linear free energy relationship): a log-log plot of the K and k values defined a linear relationship between $\log K$ and $\log k$. A retrospective study that collected experimental residue-specific K and k values reported in the past revealed several examples of the residue-specific LFER in wide protein-related phenomena. We suggest that the residue-specific LFER is an experimental proof of the consistency principle, which is a physicochemical basis originally proposed for the ideal folding of globular proteins, and now for the smooth conformational changes. We also succeeded in theoretically deriving the LFER/QFER (quadratic FER) relation from the consistency principle.

NMRスペクトルに2組のシグナルが観測されると2状態が存在することがわかる。EXSY実験を行うと、2状態の間に秒スケールの遅い交換があり、定量的な解析をすると交換速度を決定できる。ポリペプチド鎖の¹⁵N-EXSY実験をすると主鎖アミド基を使った残基ごとの解析が可能である。従来、残基ごとに異なる値が得られても、測定誤差と考えると平均してしまうことが通例であった。これはポリペプチド鎖の構造変化に強い共同性があるという「常識」に基づく。残基ごとの差異の存在を確かめるにはEXSY実験における固有のバイアス（緩和時間 T_1 , T_2 などが状態間で異なる）を厳密に補正したスペクトル測定と解析が必要となる。我々はこの問題を以下の3つの条件を満たすことで完全に解決した⁴。1. 2D ¹⁵N-EXSY実験で2つのオートピーク強度と2つの交換ピーク強度を組み合わせた Π 解析（Miloushev VZ, et al. Structure 16:1195–1205, 2008）を使って、行きの速度定数 k と帰りの速度定数 k' の積 kk' のバイアスがない値を残基毎に決定する。2. HSQC0測定（Hu K, et al. J Am Chem Soc 133:1662–1665, 2011）を使って、平衡定数 $K = k/k'$ のバイアスがない値を残基毎に決定する。HSQC0法はHSQCユニットの個数を1, 2, 3とする測定を3回行い、HSQCユニットの個数0に外挿してバイアスを除去する。3. 十分長い $d1$ 時間（FIDを取り込む時間間隔）を設定する。

黄色ブドウ球菌由来の抗菌性ペプチドであるnukacin ISK-1（27残基）は溶液中でトポロジーの異なる2つの状態の平衡にある^{1,2}。我々はHSQC0+EXSY- Π 実験を行い、さらに測定の誤差を推定するために同一の測定を4回ずつ繰り返して、 $\log k$ vs. $\log K$ プロットを作ると良い直線関係があ

EXSY解析, 自由エネルギー直線関係, コンシステンシー原理

○こうだだいすけ, はやしせいいちろう, ふじなみだいすけ

ることを見出した^{3,4}. 0.5 mMのNukacin ISK-1を使って, すべての測定に要した時間は600 MHz分光計(クライオプローブ付属)を使って3週間であった.

九州大学理学部助教授であった郷信宏によって1983年に提唱された「整合性原理」はタンパク質がスムーズにフォールディングするための物理化学的基盤である. 整合性原理は天然状態中に存在する相互作用だけが折れ畳み過程に寄与することを要請する. 言い換えると, 天然状態に存在しないnon-nativeな構造と相互作用はフォールディング過程には存在しない. これまでに計算シミュレーションを用いた研究で整合性原理の有効性が示されてきたが, 実験データから証明された例はない. Nukacin ISK-1のlog k vs. log Kの直線関係は, データ点が一本のポリペプチド鎖の複数の残基から得られる点で新しいタイプの自由エネルギー直線関係 (Linear Free Energy Relationship; LFER) であり, 一本のポリペプチド鎖を構成するすべての残基が構造変化の最中に「協調関係」にあることを示唆する. この協調現象はスムーズに構造変化するためにポリペプチド鎖が持つべき物理化学的性質であり, 我々は郷によって提唱された「整合性原理」の実験的帰結と考える. ϕ を遷移状態における一方の安定状態の割合とすると, 両対数プロットで2残基がつくる傾き ρ について, 整合性原理から $\rho_{ij} = 0.5(\phi_i + \phi_j)$ が成立することを導ける. これから, 自明な解として直線関係 (LFER) が, 一般解として二次曲線関係 (QFER) が得られる.

Fig. 1aにnukacin ISK-1のプロットを示す. データ点の分布をよく見ると3つのクラスターをつくっている. 立体構造を参照すると同一クラスターに属する残基は空間的に近接していた. 同一クラスターに属する残基は同じ値のK, k, k'を共有しているので, LFER/QFERにおけるクラスターの存在はEnglanderが水素交換実験で見出した "foldon" を平衡系で再発見・再定義したことになる.

ϕ 値は二次曲線の接線の傾きであることを利用すると新しい ϕ 値解析が可能となる (Fig. 1b). Fershtによって提案されたオリジナルの ϕ 値解析とは異なり, QFER- ϕ 解析はアミノ酸変異体を作成する必要がなく, 変異による構造変化の影響を考えなくて良いなどの利点がある.

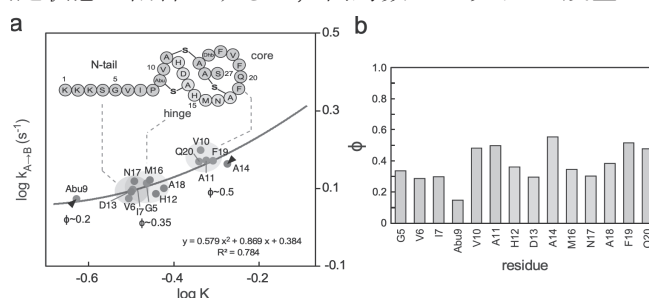


Fig. 1 LFER/QFER analysis of Nukacin ISK-1 (a) The log k vs. log K plot. Three clusters well correspond to the three regions identified in the state B structure: N-tail (Lys1–Abu9), Hinge (His12–Ala18), and Core (Val10, Ala11, Phe19–Ser27). (b) New ϕ -value analysis without mutations.

References

- (1) Fujinami D, Mahin AA, Elsayed KM, Islam MR, Nagao JI, Roy U, Momin S, Zendo T, Kohda D*, Sonomoto K*. (2018) The lantibiotic nukacin ISK-1 exists in an equilibrium between active and inactive lipid-II binding states. *Commun Biol.* **1**:150.
- (2) Fujinami D, Motomura H, Oshima H, Mahin AA, Elsayed KM, Zendo T, Sugita Y, Sonomoto K, Kohda D. (2020) Mosaic Cooperativity in Slow Polypeptide Topological Isomerization Revealed by Residue-Specific NMR Thermodynamic Analysis. *J Phys Chem Lett.* **11**:1934-1939.
- (3) Fujinami D, Hayashi S, Kohda D. (2021) Residue-Specific Kinetic Insights into the Transition State in Slow Polypeptide Topological Isomerization by NMR Exchange Spectroscopy. *J Phys Chem Lett.* **12**:10551-10557; Correction, *ibid* **12**:10766-10767.
- (4) Hayashi S, Kohda D. (2022) The time-zero HSQC method improves the linear free energy relationship of a polypeptide chain through the accurate measurement of residue-specific equilibrium constants. *J Biomol NMR.* **76**:87-94.

L2-6

ATPとタンパク質との弱い非特異的相互作用

西澤茉由², Erik Walinda³, 森本大智², Benjamin Kohn⁴, Ulrich Scheler⁴,
白川昌宏², ○菅瀬謙治^{1,2}

1京都大学・大学院農学研究科

2京都大学・大学院工学研究科

3京都大学・大学院医学研究科

4Leibniz-Institut für Polymerforschung Dresden

Effects of weak nonspecific interactions with ATP

Mayu Nishizawa², Erik Walinda³, Daichi Morimoto², Benjamin Kohn⁴, Ulrich Scheler⁴, Masahiro Shirakawa², ○Kenji Sugase^{1,2}

¹ Graduate School of Agriculture, Kyoto University

² Graduate School of Engineering, Kyoto University

³ Graduate School of Medicine, Kyoto University

⁴ Leibniz-Institut für Polymerforschung Dresden

Adenosine triphosphate (ATP) is an immensely well-studied metabolite as the major chemical energy currency in living systems. Intriguingly, ATP has been recently proposed to act as a hydrotrope that inhibits aggregation of amyloidogenic proteins; however, the underlying mechanism and the general physicochemical effect that coexistence with ATP exerts on proteins remain unclear. By combining NMR spectroscopy and MD simulations, here we observed weak but unambiguously measurable and concentration-dependent noncovalent interactions between ATP and various proteins. The interactions were most pronounced for residues in flexible regions. As shown by solution NMR, a consequence of the ATP-protein interaction was altered hydration of solvent-exposed residues in the protein. Our results suggest that ATP is a general nonspecific binder of proteins. Several complementary biophysical methods further confirmed that, at physiological concentrations of ~5–10 mM, ATP starts to form oligomeric states.

アデノシン三リン酸 (ATP) は、生体内の主要な化学エネルギー通貨として非常によく研究されている生体分子である。近年、ATPはタンパク質の液-液相分離やアミロイド線維化を抑制する生物学的なハイドロトロープであるということが提唱された[1]。興味深いことに、この凝集を抑制する機能はATPの濃度が細胞内程度 (数mM) の場合に発揮され、より低濃度では発揮されない。ATPは一般に生命のエネルギー通貨として認識されているため、このハイドロトロープとしての機能は極めて特異で、そのため多くの研究者に注目されている。しかし、このATPのハイドロトロープとしての機能のメカニズムやATPがタンパク質に及ぼす一般的な物理化学的效果については不明であった。そこで、本研究ではNMRや分子動力学計算 (MD) および各種物理化学的手法によってATPとタンパク質との相互作用様式やATPそのものの物理化学的性質などを解析した。

まずは、ユビキチンを含む3つのタンパク質に対してATPを添加し、その相互作用をNMRで観測した。ATP、ハイドロトロープ、非特異的相互作用

にしぎわまゆ, えりつく・うありんだ, もりもとだいち, べんじゃみん・こーん, うるりっひ・し
えーらー, しらかわまさひろ, ○すがせけんじ

測した。いずれのタンパク質もATP結合タンパク質とは言われないものである。この実験ではできる限り細胞内の条件に近づけるために、ユビキチン濃度を50 μM とし、ATPの濃度を10 mMとした。その結果、ATPの添加によって極わずかであるがユビキチンの化学シフトが変化した (Fig. 1)。ループや二次構造の端など柔軟な領域のとくに疎水的なアミノ酸残基と正電荷を持ったアミノ酸残基が比較的大きい化学シフト変化を示した。ユビキチン以外のタンパク質でも同様な傾向を示した。とは言え、いずれの場合も化学シフトの変化量は小さかったためATPとタンパク質との相互作用は非常に弱いと言える。また特定の領域に化学シフト変化が集中していないため、非特異的な相互作用と考えられる。

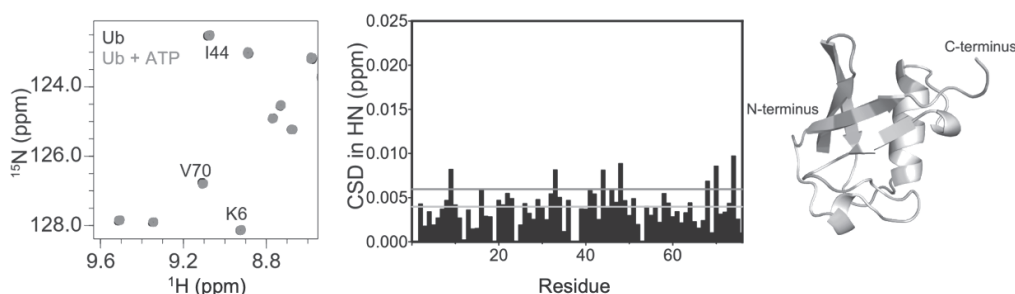


Figure 1 ATP binds weakly to proteins. Expanded region of ^1H - ^{15}N HSQC spectra of ubiquitin measured without (black) and with (gray) 10 mM ATP (left), and normalized chemical shift differences (CSD) due to addition of ATP (middle). The corresponding residues are highlighted on the crystal structure

次にATPの濃度依存的な化学シフト変化を調べたところ、従来の滴定実験で見られる飽和曲線ではなくシグモイド関数様の滴定曲線が得られた (Fig. 2)。このような滴定曲線は相互作用に濃度依存的な協調性がある場合に観測される。ATPのハイドロトロプとしての機能は、ATPの濃度が細胞内濃度で発揮されるが、細胞内のATPの濃度は数 mM程度と言われている。今回の滴定実験でも2 mM程度の濃度から化学シフトが変化し始めたため、やはりATPには濃度依存的な性質があると考えられる。そこで、ATPの濃度依存的な会合状態を、NMRによる並進拡散係数測定、等温滴定カロリメトリー (ITC)、動的光散乱 (DLS)、分子動力学計算により解析した。その結果、ATPが濃度依存的にわずかに自己会合することが分かった。他にもアミドプロトンと水との交換速度を決定できるCLEANEX-PM実験によってATPがタンパク質の水和状態を変化させることを明らかにした。

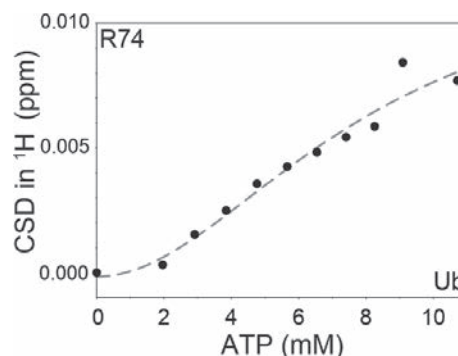


Figure 2 ^1H chemical shift difference (CSD) of the cross-peak of R74 of ubiquitin upon addition of ATP.

以上の結果から、ATPはその濃度が細胞内濃度程度になるとわずかに自己会合し、それがとくに凝集しやすい疎水的なアミノ酸残基を取り囲むことによってタンパク質を安定化させると考えられる。

References

- (1) Patel A., Malinowska L., Saha S., Wang J., Alberti S., Krishnan Y., Hyman A. A. (2017) ATP as a biological hydrotrope. *Science* **356**, 753–756.
- (2) Nishizawa M., Walinda E., Morimoto D., Kohn B., Scheler U., Shirakawa M., Sugase K. (2021) Effects of weak nonspecific interactions with ATP on proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **143**, 11982–11993.

L2-7

Paip2A inhibits translation by competitively binding to the RNA recognition motifs of poly(A)-binding protein C1 and promoting its dissociation from the poly(A) tail

寒河江彪流¹, 横川真梨子¹, 沢崎綾一¹, 石井裕一郎¹, 細田直²,
星野真一², 今井駿輔^{3,4}, 嶋田一夫^{3,4}, ○大澤匡範¹

1慶應義塾大大学院・薬学研究科, 2名古屋立大大学院・薬学研究科, 3東京
大大学院・薬学系研究科, 4理化学研究所・生命機能科学研究センター

Takeru Sagae¹, Mariko Yokogawa¹, Ryoichi Sawazaki¹, Yuichiro Ishii¹, Nao Hosoda², Shin-ichi Hoshino²,
Shunsuke Imai^{3,4}, Ichio Shimada^{3,4}, ○Masanori Osawa¹

¹Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Keio University, ²Graduate School of Pharmaceutical
Sciences, Nagoya City University, ³Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo,
⁴Center for Biosystems Dynamics Research, RIKEN

Eukaryotic mRNAs possess a poly(A) tail at their 3'-end, to which poly(A)-binding protein C1 (PABPC1) binds and recruits other proteins that regulate translation. PABP-interacting protein 2A (Paip2A) effectively inhibits poly(A)-dependent translation by causing the dissociation of PABPC1 from the poly(A) tail; however, the underlying mechanism remains unknown. This study was conducted to investigate the functional mechanisms of Paip2A action by characterizing the PABPC1-poly(A) and PABPC1-Paip2A interactions by ITC and NMR. Based on the results, we propose the functional mechanism for Paip2A: Paip2A initially binds to the RRM2 region of poly(A)-bound PABPC1, and RRM2-anchored Paip2A effectively displaces the RRM3 region from poly(A), resulting in dissociation of the whole PABPC1 molecule.

真核生物の核内で合成されたmRNAは、5'末端にcapが、3'末端にpoly(A)が付加された後、細胞質に輸送される。Poly(A)にはPoly(A)結合タンパク質 (PABPC1) が結合し、PABPC1は様々な翻訳因子と相互作用することで翻訳を調節する。

PABP-interacting protein 2 A (Paip2A) はPABPC1をpoly(A)から解離させることで翻訳を抑制する。Paip2Aはがん化したNIH3T3細胞の増殖を抑制することや、デングウイルスの増殖を抑制することが報告されている。そのため、Paip2AによるPABPC1の解離の分子メカニズムを解明することにより、新たな抗がん剤・抗ウイルス薬の開発に繋がることが期待できる。

PABPC1は636残基からなるタンパク質であり、N末端側にはタンデムに並ぶ4つのRNA認識モチーフ(RRM) を、C末端側にはPABCと呼ばれるドメインを持ち、その間は約170残基のlinkerにより繋がれている (Fig. 1)。

RRM1/2/3/4はpoly(A)と結合し、その解離定数 (K_d) は0.15 nMと、PABPC1全長のpoly(A)との結合の K_d (0.69 nM)とほぼ同等であり、RRM1/2/3/4がpoly(A)結合に主要な役割を果たしている。

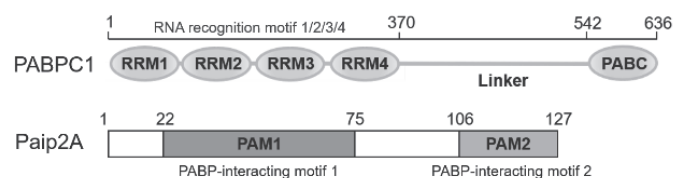


Fig. 1. Domain structures of PABPC1 and Paip2A

poly(A)-binding protein, Paip2A, functional mechanism

さがえたける, よこがわまりこ, さわざきりょういち, いしいゆういちろう, ほそだなお, ほしのしんいち, いまいしゅんすけ, しまだいちお, ○おおさわまさのり

Paip2Aは127残基からなるタンパク質であり、N末端側にはRRMと結合するPABP-interacting motif 1 (PAM1) を、C末端側にはPABCと結合するPABP-interacting motif 2 (PAM2) を持つ (Fig. 1)。PAM1とRRM1/2/3/4との結合の K_d は0.66 nM、PAM2とPABCの結合の K_d は74–400 nMであり、PAM1の方がPABPとの結合親和性が著しく高い。

以上のことから、Paip2AのPAM1とRRMとの相互作用が、Paip2Aによるpoly(A)からのPABPC1の解離に主要な役割を果たしていると考えられている。しかしながら、PABPC1のpoly(A)およびPaip2Aへの結合親和性はどちらも約0.7 nMとほぼ同等であるにもかかわらず、どのようにPaip2Aが効率的にPABPC1をpoly(A)から解離させるかの機構は不明である。そこで本研究では、PABPC1とpoly(A)、および、Paip2AとPABPC1との相互作用を解析することで、Paip2によるpoly(A)からのPABP解離のメカニズムを明らかにすることを目的とした。

Paip2A上のRRM1/2/3/4結合領域の同定

[^{13}C , ^{15}N] Paip2Aを用いた主鎖連鎖帰属を行い、引き続き [^2H , ^{15}N] Paip2Aに対してRRM1/2/3/4を滴定したところ、Paip2Aの残基番号26–83番の ^1H - ^{15}N TROSYシグナルが消失した。このことから、この領域をRRM1/2/3/4結合領域と同定した。以降の解析では、Paip2A(25-83)の領域を用いた。

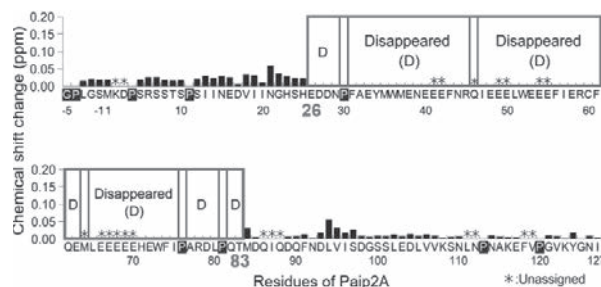


Fig. 2 CSPs of Paip2A upon binding to RRM1/2/3/4

等温滴定カロリメトリー (ITC) による各RRMに対するpoly(A)およびPaip2Aの結合親和性解析

ITCにて、 A_7 と各RRMの相互作用解析を行った結果、RRM1およびRRM4は A_7 との結合による熱量変化は観測されなかった (Table 1)。一方で、RRM2およびRRM3は A_7 との結合による熱量変化が観測され、 A_7 に対するRRM2およびRRM3の結合の K_d は、それぞれ200 μM と4.7 μM であり、ストイキオメトリーはどちらも1:1であった (Table 1)。

また、Paip2A(25-83)と各RRMの相互作用解析を行った結果、RRM1およびRRM4はPaip2A(25-83)との結合による熱量変化は観測されなかった (Table 2)。一方で、RRM2およびRRM3はPaip2A(25-83)との結合による熱量変化が観測され、Paip2A(25-83)に対するRRM2およびRRM3の結合の K_d は、それぞれ、4.0 μM および1.3 μM であり、ストイキオメトリーはどちらも1:1であった (Table 2)。

Table 1 K_d values for the A_7 -RRM interaction

RRM	N^*	K_d (M)
RRM1	N.D.	N.D.
RRM2	1.4 ± 0.1	$(2.0 \pm 0.4) \times 10^{-4}$
RRM3	1.2	$(4.7 \pm 0.3) \times 10^{-6}$
RRM4	N.D.	N.D.

* N : Molar ratio of RRM against A_7

Table 2 K_d values for the Paip2A(25-83)-RRM interaction

RRM	N^*	K_d (M)
RRM1	N.D.	N.D.
RRM2	0.87 ± 0.03	$(4.0 \pm 0.5) \times 10^{-6}$
RRM3	0.87	$(1.3 \pm 0.1) \times 10^{-6}$
RRM4	N.D.	N.D.

* N : Molar ratio of RRM against Paip2A(25-83)

NMRによるRRM2/3上のとpoly(A)結合部位の同定

Poly(A)との結合に関与する RRM2/3 の残基を同定するため、 $[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}]$ RRM2/3 および $[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}]$ RRM2/3-A₁₂ 複合体の ^1H - ^{15}N HSQC 測定、および、各種三重共鳴測定を行い、主鎖シグナルを帰属した。さらに、A₁₂ の添加に伴う RRM2/3 のシグナルの変化を解析し、A₁₂ の添加により大きな化学シフト変化が見られたシグナルに対応する残基を RRM2 および RRM3 の構造上にマッピングした。その結果、それらの残基は、RRM2/3 の各 RRM の β シート側に局在していた (Fig. 3a, b 緑色の残基)。このことは、RRM2/3 の各 RRM の β シート側に poly(A)が結合することを示唆している。

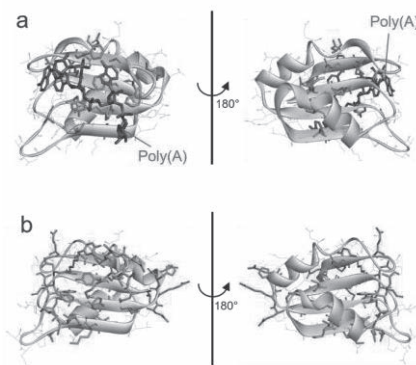


Fig. 3 Mapping of the affected residues of (a) RRM2 and (b) RRM3 in RRM2/3 upon binding to A₁₂

NMRによるRRM2/3とPaip2Aの相互作用解析

Paip2A との結合に関与する RRM2/3 の残基を同定するため、 $[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}]$ RRM2/3 および $[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}]$ RRM2/3-Paip2A(25-83)複合体の ^1H - ^{15}N HSQC 測定、および、各種三重共鳴測定を行い、 ^1H - ^{15}N HSQC スペクトル上に観測された主鎖アミドシグナルを帰属した。さらに、Paip2A(25-83)添加に伴う RRM2/3 のシグナルの変化を解析し、Paip2A(25-83)の添加により大きな化学シフト変化が見られたシグナルに対応する残基を RRM2 および RRM3 の構造上にマッピングした。その結果、それらの残基は、RRM2/3 の各 RRM の β シート側に局在していた (Fig. 4a, b マゼンタの残基)。このことは、RRM2/3 の各 RRM の β シート側、すなわち、RRM2/3 の poly(A)結合部位に Paip2A(25-83)が結合することを示唆している。

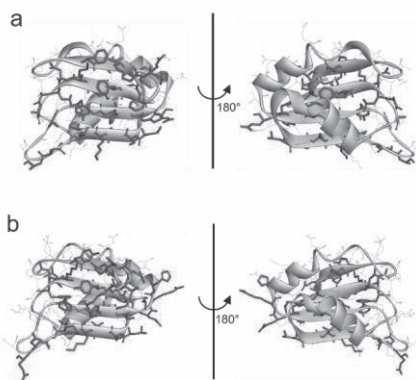


Fig. 4 Mapping of the affected residues of (a) RRM2 and (b) RRM3 in RRM2/3 upon binding to Paip2A(25-83)

NMRによるPaip2A(25-83)とRRM2/3, RRM2, RRM3の相互作用解析

次に、 $[^2\text{H}, ^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}]$ Paip2A(25-83)に対する RRM2/3 の NMR 滴定実験を行った。その結果、Paip2A(25-83)のアミノ酸残基番号 31-79 番の領域に、0.1 ppm を超える大きな化学シフト変化が見られた (Fig. 5)。このことは、Paip2A(25-83)のアミノ酸残基番号 31-79 番の領域が RRM2/3 との相互作用に関与することを示唆している。

さらに、Paip2(25-83)の N 末端の 31-44 番の残基のシグナルが、高磁場および低磁場側に分散して観測された (Fig. 6)。この残基が RRM2 と RRM3 のどちらと相互作用したかを調べるため、 $[^{15}\text{N}]$ Paip2A(25-83)に対する RRM2 および RRM3 の NMR 滴定実験を行った。その結果、RRM2 添加時のスペクトルでは、分散したシ

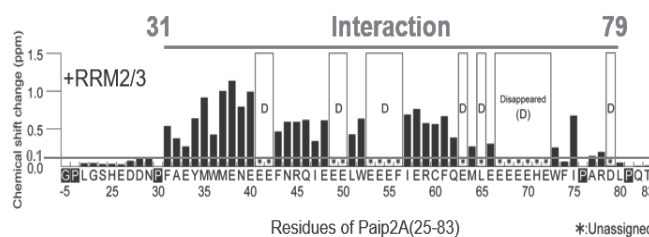


Fig. 5 Affected residues of Paip2A(25-83) upon binding to RRM2/3

グナルは見られなかった (Fig. 6a)。一方で、RRM3 添加時のスペクトルでは、RRM2/3 添加時のスペクトル上に観測された Paip2A(25-83)の N 末端側の残基に由来するシグナルとほぼ同じ位置に、分散したシグナルが見られた (Fig. 6b)。このことは、Paip2A(25-83)の N 末端側の領域が RRM3 と相互作用することを示唆している。

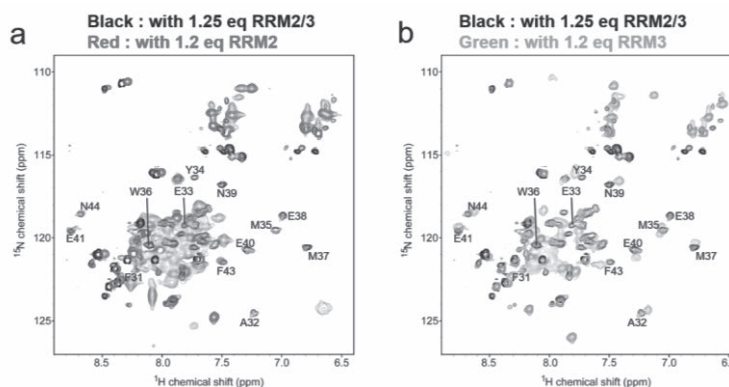


Fig. 6 Spectral overlay of HSQC of Paip2A(25-83) in the presence of (a) RRM2 and (b) RRM3 over HSQC in the presence of RRM2/3

【考察】

本研究より、poly(A)と Paip2A に対する RRM2 の結合の K_d はそれぞれ 200 μ M および 4.0 μ M であり、poly(A)に対する結合親和性に比べ、Paip2A に対する結合親和性が 50 倍大きいことが明らかとなった。このことから、Paip2A は poly(A)より優先的に RRM2 に結合可能であると考へた。また、Paip2A(25-83)は、poly(A)と同様に、RRM2/3 の β シート側に結合した。このことから、Paip2A は PABPC1 の RRM と poly(A)との結合を競合的に阻害すると考へた。以上の結果から、Paip2 による poly(A)からの PABP 解離のメカニズムについて、次のモデルを提唱した。まず、PABPC1 は 4 つの RRM の中でも特に poly(A)に対して親和性の高い RRM2 および RRM3 を主として poly(A)に結合する (Fig. 7a)。そこに Paip2A が存在すると、Paip2A は RRM2 に対する結合親和性が poly(A)より高いため、poly(A)よりも優先的に RRM2 に結合し、RRM2 の poly(A)への結合を競合的に阻害する (Fig. 7b)。さらに、Paip2A は RRM2 にテザリングされることで RRM3 の poly(A)結合部位を効率的に阻害することができる (Fig. 7b)。それにより、PABPC1 が poly(A)から解離する。

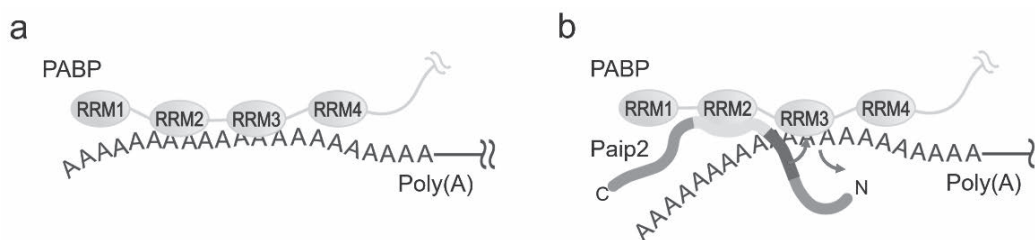


Fig. 7 Proposed model of the dissociation of PABPC1 from poly(A) by Paip2A (a) RRM2 and RRM3 of PABPC1 mainly contribute to the poly(A) binding. (b) Paip2A accesses RRM2 of PABPC1, whose affinity for poly(A) is 50-fold lower than that for Paip2A. Once Paip2A is tethered to RRM2, the local concentration of the adjacent RRM3 binding region of Paip2A increases around RRM3, leading to the effective binding of Paip2A to RRM3 competitively against poly(A).

Reference

Sagae T, Yokogawa M, Sawazaki R, Ishii Y, Hosoda N, Hoshino S, Imai S, Shimada I, Osawa M. (2022) Paip2A inhibits translation by competitively binding to the RNA recognition motifs of PABPC1 and promoting its dissociation from the poly(A) tail. *J. Biol. Chem.* 298 (5) 101844.

L2-8

アデノシンA_{2A}受容体とリガンドの滞在時間を規定する構造基盤の解明

○上田 卓見¹、土田 知輝¹、栗田 政稔¹、水村 拓也¹、今井 駿輔^{1,2}、白石 勇太郎^{1,2}、幸福 裕¹、竹内 恒¹、嶋田 一夫^{1,2}

¹東京大学大学院・薬学系研究科

²理化学研究所生命機能科学研究センター

Structural basis of the residence time of adenosine A_{2A} receptor and the ligands

○Takumi Ueda¹, Tomoki Tsuchida¹, Masatoshi Kurita¹, Takuya Mizumura¹, Shunsuke Imai^{1,2}, Yutaro Shiraishi^{1,2}, Yutaka Kofuku¹, Koh Takeuchi¹, Ichio Shimada^{1,2}

¹ Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo

² RIKEN Center for Biosystems Dynamics Research

Residence time of a drug and its receptor is a key parameter of the pharmacological drug actions. Adenosine A_{2A} receptor and the ligands reportedly exhibit various residence times. However, the mechanism underlying the multi-level residence time remains elusive. Here, we observed NMR signals of alanine and methionine methyl groups in the ligand-binding site of adenosine A_{2A} receptor and its mutants with reduced residence times. Our NMR analyses revealed that spatial arrangement of the E165-H264 salt bridge correlates with the residence time. These findings provide quantitative insight into the residence time and will be helpful for development of drugs with desirable pharmacological actions.

薬物が受容体分子に滞在する時間は、薬物の効果に直結する。血管拡張や炎症反応制御、運動を司る神経伝達に関与するGPCRであるアデノシンA_{2A}受容体 (A_{2A}AR) では、心筋イメージングの薬物としては滞在時間が短い方が副作用を防ぐ上で望ましい一方、パーキンソン病や炎症に対する薬としては滞在時間が長い方が有効性が持続する点で望ましい。A_{2A}ARでは、滞在時間が比較的長いZM241385や比較的短いLUF5834等の滞在時間の異なるリガンドの存在が知られている^{1,2} (Fig.1)。また、ZM241385結合状態のA_{2A}ARの結晶構造では、リガンド結合ポケットの上部にE169とH264が塩橋を形成しており、E169およびH264に近接するT256への変異導入により滞在時間が低下することが知られている¹ (Fig.1)。しかし、滞在時間が比較的短い状態におけるリガンド結合様式が未知であるため、滞在時間を決定する機構は不明である。そこで本研究では、リガンドの滞在時間が様々に異なる条件において、A_{2A}ARのリガンド結合部位の構造を解析して、滞在時間を決定する機構を解明することを目的とした。

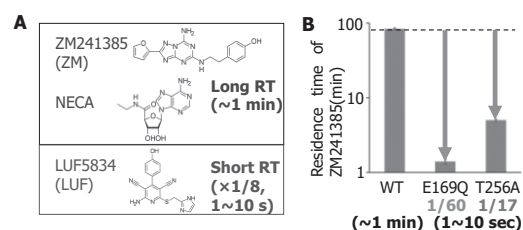


Fig. 1. Residence time of A_{2A}AR and ligands.

A. chemical structures and residence time (RT) of A_{2A}AR ligands^{1,2}. B. Effect of mutations on the residence time of A_{2A}AR and ZM241385¹.

GPCR, 膜タンパク質, 昆虫細胞発現系

○うえだたくみ, つちだともき, くりたまさとし, みずむらたくや, いまいしゅんすけ, しらいしゅうたろう, こうふくゆたか, たけうちこう, しまだいちお

昆虫細胞発現系を用いて、メチオニン残基とアラニン残基のメチル基を選択的に標識したA_{2A}ARを調製して、ZM241385結合状態の¹H-¹³C HMQCスペクトルを測定した。各残基の変異体のスペクトルと比較することで、リガンド結合部位に位置する残基のNMRシグナルを帰属することができた (Fig.2)。次に、滞在時間が1/60程度に低下することが知られている、E169Q変異体のスペクトルを取得した。その結果、A265のシグナルが顕著に¹H低磁場シフトした (Fig. 3A)。結晶構造上では、A265の¹H化学シフトはH264に近接しており、A265の¹H化学シフトはH264の環電流シフトにより規定されると考えられる。したがって、A265の¹H化学シフトはE169-H264の塩橋の状態を反映すること、およびE169A変異体ではこの塩橋が形成されていないことが示唆された。

次に、滞在時間が1/17程度に低下することが知られている、T256A変異体のスペクトルを取得した。その結果、A265の¹H化学シフトは野生型とE169A変異体の中間的な値であった(Fig. 3B)。また、滞在時間がZM241385の1/8程度であることが知られている、LUF5834結合状態におけるスペクトルにおいても、A265の¹H化学シフトは野生型とE169A変異体の中間的な値であった(Fig. 3C)。したがって、T256A変異体およびLUF5834結合状態では、A265のE169-H264の塩橋が部分的に変調していることが示唆された(Fig. 4)。また、上記の状態において、A265の¹H化学シフトとリガンドの滞在時間が良く相関したことから、E169とH264の塩橋の状態が、滞在時間を規定すると考えた。

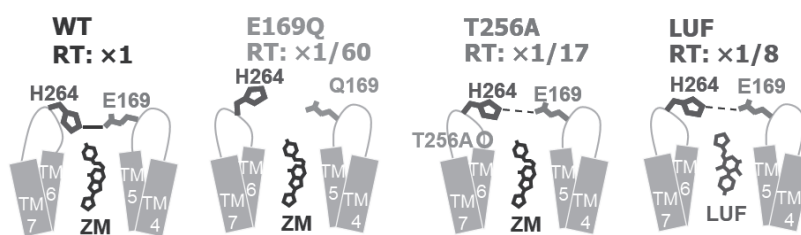


Fig. 4. Schematic diagrams of the conformation of the ligand binding site of A_{2A}AR.

References

- (1) Guo D, et al. (2016) Molecular basis of ligand dissociation from the adenosine A_{2A} receptor. *Mol. Pharmacol.* 89, 485-91,
- (2) Guo D, et al. (2012) Functional efficacy of adenosine A_{2A} receptor agonists is positively correlated to their receptor residence time. *Br. J. Pharmacol.* (2012) 166, 1846-59.

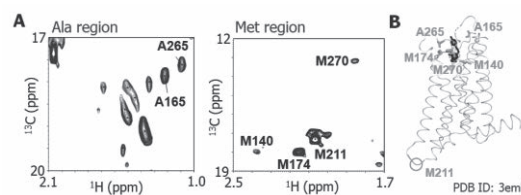


Fig. 2. Resonances from A_{2A}AR in the ZM241385-bound state.

A. Alanine and methionine regions of the ¹H-¹³C HMQC spectra. B. Distribution of the assigned methionine and alanine residues in the crystal structure of A_{2A}AR.

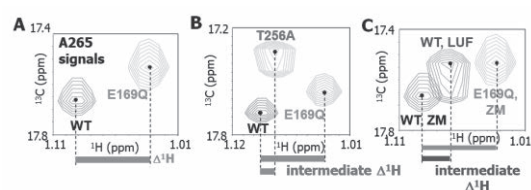


Fig. 3. Overlaid A265 signals of A_{2A}AR under the conditions with various residence times.

A. A_{2A}AR and A_{2A}AR/E169Q in the ZM241385-bound state. B. A_{2A}AR, A_{2A}AR/E169Q, and A_{2A}AR/T256A in the ZM241385-bound state. C. A_{2A}AR and A_{2A}AR/E169Q in the ZM241385-bound state and A_{2A}AR in the LUF5834-bound state.

第2日目
11月9日（水）
英語セッション

Day 2
Wednesday, 9th Nov.
English Sessions

L3-1

Mapping the per-residue surface electrostatic potential of CAPRIN1 along its phase separation trajectory

○Yuki Toyama (外山 侑樹)¹⁻³, Atul Kaushik Rangadurai¹⁻⁴, Julie D. Forman-Kay^{2, 4}, and Lewis E. Kay¹⁻⁴

¹ Department of Molecular Genetics, University of Toronto

² Department of Biochemistry, University of Toronto

³ Department of Chemistry, University of Toronto

⁴ Hospital for Sick Children, Program in Molecular Medicine

Mapping the per-residue surface electrostatic potential of CAPRIN1 along its phase separation trajectory

○Yuki Toyama¹⁻³, Atul Kaushik Rangadurai¹⁻⁴, Julie D. Forman-Kay^{2, 4}, and Lewis E. Kay¹⁻⁴

¹ Department of Molecular Genetics, University of Toronto

² Department of Biochemistry, University of Toronto

³ Department of Chemistry, University of Toronto

⁴ Hospital for Sick Children, Program in Molecular Medicine

The surface charges of biomolecules can significantly affect how they interact with each other, including, in some cases, whether they can undergo liquid-liquid phase separation. One example is the RNA binding protein CAPRIN1, an important component in membraneless organelles involved in RNA processing. Focusing on the C-terminal intrinsically disordered, positively charged region of CAPRIN1, we have mapped out at a residue specific level the role of electrostatics in phase separation promoted by the addition of ATP. We show that the propensity of CAPRIN1 to form condensates is coupled to its neutralization and formation of intermolecular contacts. Our results highlight the interplay between repulsive electrostatic forces and favorable inter-chain interactions in regulating the formation of CAPRIN1 condensates.

1. Introduction

CAPRIN1 is found in membraneless organelles such as stress granules, P bodies, and mRNA transport granules, where it plays an important role in regulating RNA processing. The C-terminal region of the CAPRIN1 has been shown to phase separate *in vitro*. The primary sequence of this C-terminal intrinsically disordered, phase-separating region of CAPRIN1 (hereafter referred to as CAPRIN1) is divided into N- and C-terminal Arg-rich regions, and a middle region that is depleted in arginines but rich in aromatic residues (Fig. 1A). CAPRIN1 has 15 Arg residues, a pI of 11.5 and a charge of +13 at physiological pH. Not surprisingly, therefore, phase separation requires the addition of salt to screen unfavorable electrostatic interactions; alternatively, the phase separation of CAPRIN1 can be promoted by adding negatively charged molecules such as ATP or RNA to a CAPRIN1 solution. Recent exciting advances in NMR spectroscopy provide an avenue for the *de novo* experimental determination of near-surface electrostatic potentials (ϕ_{ENS}) in biomolecules with atomic resolution, and under a wide range of ionic strengths and solvent condition¹. With the availability of methods for measuring near-surface electrostatic potentials of proteins, here we established quantitatively the important role of electrostatics in controlling the phase separation of CAPRIN1, by monitoring how ϕ_{ENS} “evolves” during the ATP-induced phase separation process.

Intrinsically disordered proteins, Biomolecular condensates, Paramagnetic relaxation enhancement

2. *De novo* determination of per-residue surface electrostatic potentials of CAPRIN1

Iwahara and co-workers have demonstrated that solution NMR spectroscopy can be used to measure ϕ_{ENS} at each backbone amide¹. This is illustrated schematically in Fig. 1B, where solvent PREs from the positively or negatively charged 2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine-N-oxyl nitroxide (PROXYL) derivatives, 3-aminomethyl-PROXYL and 3-carboxy-PROXYL, respectively, are measured. The measurement of PREs for a pair of differently charged co-solutes provides an avenue for the determination of per-residue ϕ_{ENS} values, via the relation

$$\phi_{ENS} = -\frac{k_B T}{2e} \ln\left(\frac{\Gamma_{2,+}}{\Gamma_{2,-}}\right)$$

where $2e$ is the charge difference between 3-aminomethyl- (+1 e) and 3-carboxy-PROXYL (-1 e), k_B is Boltzmann's constant, T is the absolute temperature, and $\Gamma_{2,i}$ $i \in \{+, -\}$ is the R_2 PRE rate for a given proton measured from either the + or - spin label. Using the measured PRE rates, ϕ_{ENS} values were determined for individual residues in CAPRIN1. Fig. 1C shows the resulting residue-specific ϕ_{ENS} profile. Intriguingly, a positive potential of $\approx +20$ mV was measured in the aromatic-rich regions of CAPRIN1, even though the net charge in this central portion of the protein is small. The positive potential in the middle section of the protein likely reflects the slight imbalance in charge skewed towards positive as well as the dynamic nature of the CAPRIN1 whereby the N- and C-terminal Arg-rich regions contact the central portion of the molecule.

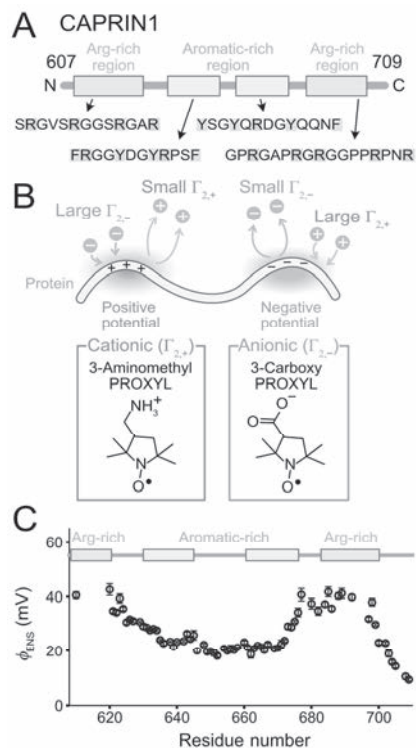


Fig. 1 (A) Schematic diagram of C-terminal region of CAPRIN1. (B) The near-surface electrostatic potential of a charged protein leads to distinct solvent PRE patterns for differently charged PROXYL derivatives. (C) Plot of ϕ_{ENS} values of CAPRIN1 (pH 5.5 and 25 °C).

3. Addition of ATP reduces and ultimately inverts the electrostatic potential of CAPRIN1

Turbidity assays (Fig. 2A), measuring light scattering that accompanies phase separation, as a function of ATP concentration established that addition of ATP to CAPRIN1 solutions promotes phase separation when concentrations of nucleotide in the approximate range of 1~ 60 mM are added, and subsequent re-entry into a mixed state at higher concentrations of ATP (> 60 mM). This is consistent with an important role for electrostatics in the phase separation of CAPRIN1 by ATP (and other negatively charged molecules such as RNA) and has motivated us to investigate how ϕ_{ENS} values change upon the addition of ATP. We measured per-residue ϕ_{ENS} values for CAPRIN1 at a pair of ATP concentrations: 0.8 mM where ATP initiates phase separation, with CAPRIN1 in a predominantly mixed state, and 90 mM where CAPRIN1 has re-entered the mixed state after phase separation (Fig. 2B). We observed a significant decrease in ϕ_{ENS} by 10~30 mV upon the addition of 0.8 mM ATP (the values depending on the ATP/CAPRIN1 ratio), while at 90 mM ATP the surface potential of CAPRIN1 had inverted, becoming negative.

4. Neutral electrostatic potential of condensed phase of CAPRIN1

We were interested in establishing what the surface electrostatic potential is for CAPRIN1 in the condensed phase of the demixed state, as the experiments recorded on the mixed state CAPRIN1 sample

suggest that, while ϕ_{ENS} must be small, values that are slightly positive, slightly negative, or completely neutral would be possible. An ATP-induced demixed sample was prepared using a bulk concentration of 3 mM ATP, with two distinct liquid phases (Fig. 2C), including a CAPRIN1-depleted phase on top (dilute phase; 200 μM in protein, 2.5 mM ATP) and a CAPRIN1-concentrated phase on the bottom (condensed phase; 51 mM in protein, 258 mM ATP). Since the bottom phase covers the radio frequency coil for NMR signal detection, signals from the protein-condensed phase could be selectively observed, and the per-residue electrostatic potential of the CAPRIN1 condensate could, therefore, be measured. Fig. 2C shows the ^{15}N - ^1H TROSY HSQC spectrum of CAPRIN1 in the condensed phase recorded using a sample containing 2% ^2H , ^{15}N -labeled protein in an unlabeled CAPRIN1 background (pH 5.5 and 40 $^\circ\text{C}$). Deuteration leads to significant gains in both spectral sensitivity and resolution. The solvent PREs were very similar between the positive and negative PROXYL derivatives across the protein and the surface potential of CAPRIN1 in the condensed phase was close to neutral across the protein (Fig. 2D). Thus, charge neutralization is a prerequisite for forming a stable CAPRIN1 condensed phase.

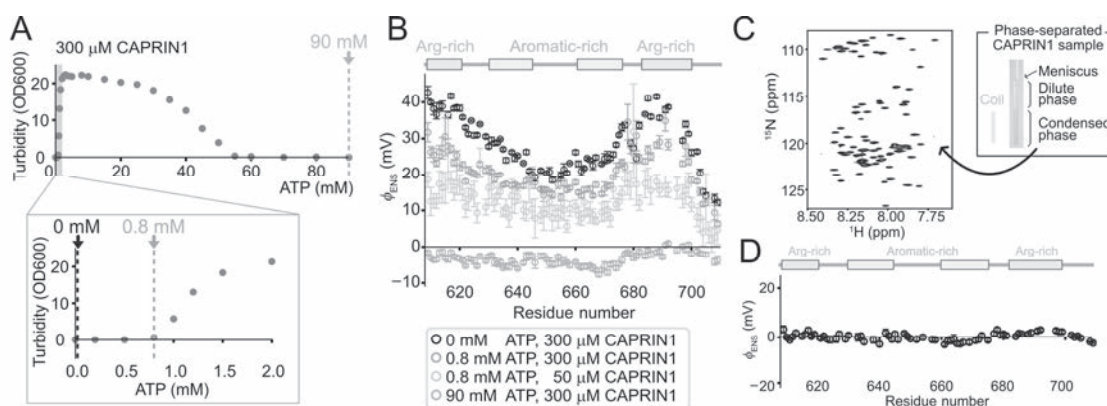


Fig. 2 (A) Turbidity assays measuring phase separation propensities of CAPRIN1 as a function of [ATP]. (B) Plots of ϕ_{ENS} values measured with 0 mM, 0.8 mM (with two different CAPRIN1 concentrations), and 90 mM ATP. (C) ^{15}N - ^1H TROSY HSQC spectrum of a condensed phase CAPRIN1 sample (258 ± 11 mM ATP and 50.6 ± 1.9 mM protein). The NMR sample tube containing the demixed state sample is shown. (D) CAPRIN1 ϕ_{ENS} potentials in the condensed phase.

5. Correspondence between reduced electrostatic potential and intermolecular interactions

We hypothesized that intermolecular contacts between CAPRIN1 chains would concomitantly strengthen along the trajectory towards phase separation by the addition of ATP, as the electrostatic potential of CAPRIN1 decreases, leading to less electrostatic repulsion between proximal molecules. To characterize intermolecular interactions between CAPRIN1 chains, we performed an intermolecular PRE experiment in which a spin-label (TEMPO) was covalently attached to one half of the molecules (not isotopically labeled) and the effects on the spectra of ^{13}C , ^{15}N -labeled molecules in the sample quantified (Fig. 3A). The measurements were also performed in the presence of 0.8 mM ATP, where CAPRIN1 starts to phase separate, and at 90 mM ATP, where the ϕ_{ENS} distribution is slightly negative (Fig. 2B).

In the absence of ATP, no significant intermolecular PREs were observed, consistent with contacts between CAPRIN1 chains being largely suppressed by electrostatic repulsion between the positively-charged molecules (Fig. 3B). In contrast, in the presence of 0.8 mM and 90 mM ATP, significant intermolecular PREs are observed. Notably, the intermolecular PREs, and hence intermolecular contacts, are largest in the presence of 90 mM ATP where the surface electrostatic potential is closest to neutral along the

backbone of the protein (-3.4 mV, on average) and decrease as the surface charge increases (maximum ϕ_{ENS} values of $+40$ mV and $+30$ mV for samples with 0 mM and 0.8 mM ATP, respectively) (Fig. 3B). The observed PREs from A658C-TEMPO were larger in the aromatic-rich portions of the molecule, consistent with our previous intermolecular NOE analyses showing a number of interaction hotspots (residues 624-626, 638-640, and 660-666) localized to these aromatic-rich regions².

5. Discussions

Our results establish that, at least in the positively charged CAPRIN1 system, decreases in ϕ_{ENS} upon addition of increasing amounts of ATP correlate with progression towards the phase-separated state, as illustrated schematically in Fig. 3C. In the absence of ATP, CAPRIN1 has a positive surface potential across the molecule ($>+20$ mV), with maxima at the N- and C-terminal Arg-rich regions of the protein ($\approx+40$ mV). Thus, electrostatic repulsion of proximal chains prevents self-association (Fig. 3C, step I). Upon addition of ATP, the positive surface potential of CAPRIN1 decreases, initially more in Arg-rich regions, showing that ATP interacts initially with the positively charged termini of the protein (Fig. 5, step II). Increasing amounts of ATP eventually lead to accumulation of a condensed phase (demixed state) and neutralization of CAPRIN1 chains (Fig. 3C, step III), where each protein molecule interacts with approximately 5 equivalents of ATP. Neutralization of CAPRIN1 is accompanied by favorable intermolecular interactions connecting neighboring CAPRIN1 molecules, stabilizing the protein-condensed phase (Fig. 3C, step III). Our intermolecular PRE results show a strong correlation between reduction in electrostatic potential and enhanced intermolecular interactions, supporting the model. Further addition of ATP (> 60 mM) leads to re-entrance into a mixed phase. This is accompanied by a charge inversion of CAPRIN1, with a slight negative potential localized to the aromatic-rich regions of the molecule. The net negative potential of the CAPRIN1 chain likely prevents the intermolecular interactions that are required for phase separation, leading to disassembly of condensates (Fig. 3C, step IV). Thus, electrostatics play a central role in modulating the biological functions of this protein, and measurement of electrostatic potentials at each site along its backbone provides an opportunity to understand in more detail the important role of charge in this system.

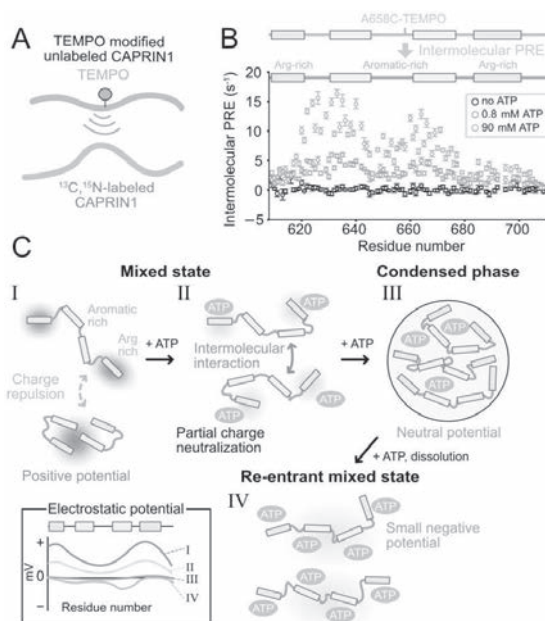


Fig. 3 (A) Schematic of the sample composition used to measure the intermolecular PRE effect. (B) Intermolecular PRE profile from A658C-TEMPO of CAPRIN1. (C) The graphical summary of the role of electrostatic potentials in regulating phase-separation of CAPRIN1.

References

- (1) B. Yu, C. C. Pletka, B. M. Pettitt, J. Iwahara, De novo determination of near-surface electrostatic potentials by NMR. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **118**, e2104020118 (2021).
- (2) T. H. Kim, *et al.*, Interaction hot spots for phase separation revealed by NMR studies of a CAPRIN1 condensed phase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **118**, e2104897118 (2021).

L3-2

GPCRとの相互作用による β -アレスチン1の2段階活性化

○白石勇太郎¹, 幸福裕², 上田卓見², Shubhi Pandey³, Hemlata Dwivedi-Agnihotri³, Arun K. Shukla³, 嶋田一夫¹

1理化学研究所生命機能科学研究センター

2東京大学大学院薬学系研究科

3インド工科大学カンプール校

Biphasic activation of β -arrestin 1 upon interaction with a GPCR revealed by methyl-TROSY NMR

○Yutaro Shiraishi¹, Yutaka Kofuku², Takumi Ueda², Shubhi Pandey³, Hemlata Dwivedi-Agnihotri³, Arun K. Shukla³, Ichio Shimada¹

¹ *Laboratory for Dynamic Structure of Biomolecules, RIKEN Center for Biosystems Dynamics Research (BDR), 1-7-22 Suehiro-cho, Tsurumi-ku, Yokohama, Kanagawa 230-0045, Japan*

² *Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo, Hongo 7-3-1, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan*

³ *Department of Biological Sciences and Bioengineering, Indian Institute of Technology, Kanpur 208016, India*

β -arrestins (β arrs) play multifaceted roles in the function of G protein-coupled receptors (GPCRs). β arrs typically interact with phosphorylated C-terminal tail (C tail) and transmembrane core (TM core) of GPCRs. However, the effects of the C tail- and TM core-mediated interactions on the conformational activation of β arrs have remained elusive. Here, we show the conformational changes for β arr activation upon the C tail- and TM core-mediated interactions with a prototypical GPCR by nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. Our NMR analyses demonstrated that while the C tail-mediated interaction alone induces partial activation, in which β arr exists in equilibrium between basal and activated conformations, the TM core- and the C tail-mediated interactions together completely shift the equilibrium toward the activated conformation. This plasticity of β arr conformation in complex with GPCRs engaged in different binding modes may explain the multifunctionality of β arrs.

β -アレスチン (β arr) は、リガンドが結合し、かつリン酸化を受けたGタンパク質共役型受容体 (GPCR) に結合することで、Gタンパク質依存的なシグナル伝達を終了させるとともに、Gタンパク質非依存的なシグナル伝達を誘起する。 β arrを介したシグナル伝達は、Gタンパク質を介したシグナル伝達とは異なる生理応答を制御しており、 β arrの活性化機構の理解はGPCRを標的とした創薬開発に貢献する。これまでに我々は、GPCRキナーゼによりリン酸化されたGPCRのC末端領域 (C tail) が、膜貫通ドメイン (TM core) と相互作用することでその構造を変化させ、 β arrとの結合に適した構造をとることを示した¹。しかしながら、TM coreやC tailと β arrの相互作用が、 β arrの構造をどのように変化させているかは不明である。そこで本研究では、GPCRのTM coreとC tailが、それぞれ β arrの構造をどのように変化させるかを解明することを目的として、NMRによる構造解析を行った。

Gタンパク質共役型受容体, アレスチン

○しらいしゆうたろう, こうふくゆたか, うえだたくみ, しゅびいばんでい, へむらたでいべでい, あるんしゅくら, しまだいちお

本研究では、 β arrとの結合が増強した β_2 アドレナリン受容体の変異体 (β_2V_2R) を解析に用いた。まず、TM coreの活性化、C tailのリン酸化が β arr1の結合親和性をどのように変化させるかを表面プラズモン共鳴法により解析した。その結果、C tailがリン酸化されていない β_2V_2R と β arr1の特異的な結合は検出されなかった一方で、C tailがリン酸化された β_2V_2R は、 β arr1と解離定数 $K_d = 0.2 \mu M$ で結合することが示された。また、C tailがリン酸化された β_2V_2R と β arr1の親和性は、リガンドによるTM coreの活性化により増強することが示された。

次に、 β_2V_2R のC tail、TM coreとの相互作用により β arr1にどのような構造変化が生じるかを溶液NMR法により解析した。 $[u\text{-}^2H, Ile\delta 1\text{-}^{13}C^1H_3]$ β arr1を調製し、不活性化型に対応する単独状態、活性化型に対応する作動薬結合型リン酸化 β_2V_2R (P-R*) 結合状態の $^1H\text{-}^{13}C$ HMQCスペクトルを比較したところ、主に β arr1のNドメインとCドメインの界面に分布するI31、I168、I207、I214、L241、I314、I317、I386に0.1 ppm以上の顕著な化学シフト差を検出した (Fig. 1)。この結果は、 β arr1の活性化に伴い2つのドメインの相対配置が変化することを示している。C tailとの結合のみで β arr1の構造変化が誘起されるかを調べるために、逆作動薬結合型リン酸化 β_2V_2R (P-R) 結合状態 β arr1の $^1H\text{-}^{13}C$ HMQCスペクトルを測定した。その結果、活性化型のシグナルを示した残基はI158、I241、I317のみであり、I31、I105、I207、I233、I386は不活性化型・活性化型に対応するシグナルが検出された (Fig. 2, Top)。以上の結果は、C tailのみと結合した状態は不活性化型と活性化型を交換しており、活性化型の存在比が低いことを示している。

以上の結果から、GPCRによる β arr1の活性化が、まずGPCR C tailとの強い結合により複合体形成を開始し、続いて起こるTM coreとの弱い相互作用が分子全体の構造変化を誘起する、という2段階の動的な過程であることを提唱する² (Fig. 2, Bottom)。

References

- (1) Phosphorylation-induced conformation of β_2 -adrenoceptor related to arrestin recruitment revealed by NMR. [Shiraishi Y](#), Natsume M, Kofuku Y, Imai S, Nakata K, Mizukoshi T, Ueda T, Iwai H, Shimada I. *Nat. Commun.* (2018) 9:194.
- (2) Biphasic activation of β -arrestin 1 upon interaction with a GPCR revealed by methyl-TROSY NMR. [Shiraishi Y](#), Kofuku Y, Ueda T, Pandey S, Dwivedi-Agnihotri H, Shukla AK, Shimada I. *Nat. Commun.* (2021) 12:7158.

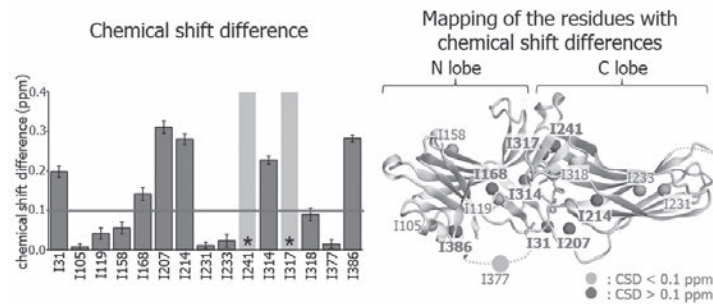


Figure 1 | Chemical shift difference between basal and activated state and mapping of the residues with chemical shift differences

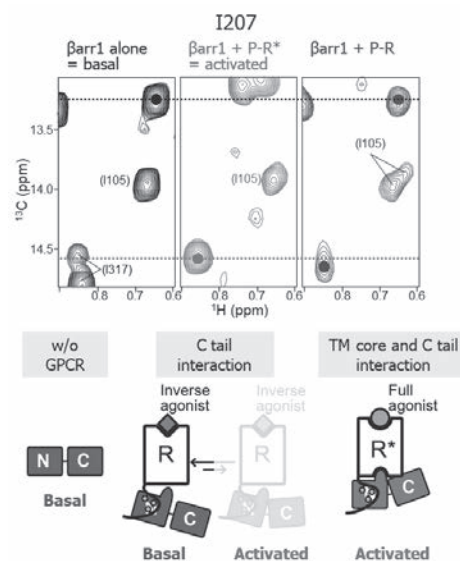


Figure 2 | (Top) Resonances from I207 in basal state, the complex with phosphorylated β_2V_2R bound to the full agonist, and the complex with phosphorylated β_2V_2R bound to the inverse agonist (Bottom) Schematic representation of the conformational activation of β arr1 upon binding to the phosphorylated GPCRs

L3-3

An affinity-driven protonation-coupled substrate transport of a MATE transporter

Koh Takeuchi¹ and Ichio Shimada^{1,2}

¹ Graduate School of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo, Tokyo, Japan

² RIKEN Center for Biosystems Dynamics Research, Yokohama, Japan.

The multidrug resistance (MDR) systems are ubiquitous in life, as the extrusion of cytotoxic compounds is essential for maintaining cellular homeostasis and survival. The MDR activities are often achieved by a system consisting of polyspecific multidrug-binding transcriptional factors and multidrug-efflux transporters, in which increased expression of multidrug-efflux transporters is achieved by binding a range of toxic compounds to multidrug-binding transcriptional factors. Elevated expression of multidrug-efflux transporters in pathogens and cancers constitutes a significant challenge for medication, as it reduces the effects of antibiotics and chemotherapeutic compounds etc.

The multidrug and toxin extrusion (MATE) family is a monomeric 12-transmembrane (TM) multidrug-efflux transporters. Structures of MATE transporters share a unique topology where two lobes of 6-TM bundles (hereafter, we call the TM1-6 and TM7-12 bundles as N- and C-lobe, respectively) form pseudo-dimeric structures that face each other about the membrane normal (Fig. 1). N- and C-lobes are connected by a long intracellular loop (IL6-7, Fig. 1 bottom right in each structure).

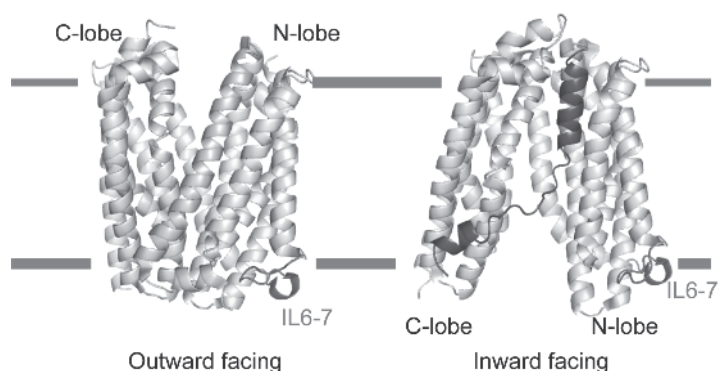


Fig. 1 PfmMATE structures in the OF and IF conformations.

Compound efflux is coupled with H^+ influx in *Pyrococcus furiosus* MATE (PfmMATE). Thus, the transporter is classified as H^+ -coupled antiporters. Most of the MATE structures were solved in the outward-facing (OF) conformations, in which the two lobes interact tightly at the intracellular side forming a large cavity open toward the extracellular/periplasmic side (Fig. 1, left). Especially, the tight mainchain interaction between two conserved Gly residues (Gly96 and Gly309) at the intracellular closing, called the Gly gate, is proposed to stabilize the OF conformation.

Similar to other transporter families, the MATE transporters are considered to transport ligands by an alternating access mechanism, in which a ligand export is coupled with a whole-molecular isomerization between the OF conformation (Fig. 1, left) and the inward-facing (IF) conformation (Fig. 1, right). However, the structural mechanisms of the conformational rearrangements have not been fully elucidated, as only one IF conformation has been reported thus far, and the partially unfolded TM1 conformation observed in the reported IF crystal structure has been criticized as it seems to reflect the packing interactions imposed by crystal contacts between protomers. Thus, the whole structural landscape of the proton-coupled compound transport mechanism of the MATE transporter at a functional condition is not yet conducted. In addition, while some protonation sites that are important for transport activity, such as Asp41 and Glu163, were proposed, the roles of these residues in the proton-coupled substrate antiport are not structurally elucidated.

To address these central issues of the transport mechanism, we carried out the structural and dynamical analyses of PfMATE solubilized in n-dodecyl- β -D-maltoside (DDM) micelle under different pH conditions by using nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. All NMR data were corrected at elevated temperature (50°C), which is more relevant to the protein from a thermophilic bacterium and substantially higher than currently available structural studies.

From the pH-dependent chemical shift change (Fig. 2) and the solvent accessibility deduced from the PRE experiments (Fig. 3), NMR analyses revealed that PfMATE resides predominantly in the OF conformations at neutral pH (pH 6.8) while mostly in the IF conformation at acidic pH (pH 3.7). In the intermediate pH range, PfMATE is under a slow conformational equilibrium between the OF and IF conformations (Fig. 2, middle). In line with these notions, mutation of the glycine gate (Gly86 and Gly309) or the intracellular protonation site (Glu163) shifts the conformational equilibrium toward the IF conformation by disrupting the key interactions that stabilize the OF conformation. In contrast, the disruption of the extracellular protonation site, Asp41, did not alter the conformational equilibrium between the OF/IF conformations. Thus, we concluded that the protonation of Glu163 is critically important for the conformational switch between the OF and IF conformations.

We also found that the binding of substrates, ethidium, is stronger to the IF conformation ($\sim 40 \mu\text{M}$) than that to the OF conformation ($> 1 \text{ mM}$). The same was valid for another substrate, norfloxacin. From this observation, we propose

an affinity-driven export of compounds by PfMATE. Even though the substrates can bind both N- and C-robe sides of cavities, they bind only weakly to the OF conformation. Thus, the compounds dissociate easily from PfMATE in the OF conformation at the last step of the transporting process.

In contrast, the high-affinity compound interaction to the IF conformation biases the substrate interaction occurs mostly on the intracellular side, in an occasion when Glu163 is protonated, and the successive proton release from Glu163 induces the spontaneous switch from the IF to OF conformations. Since Glu163 is in the intracellular side and the presence of the positively charged compounds blocks the proton migration to the OF cavity, the proton release should happen toward the intracellular side. This would explain the coupling of the substrate export and the proton import in the transporter. Thus, our NMR data provide unique evidence to propose that PfMATE export substrates via an affinity-driven proton-coupled antiport mechanism.

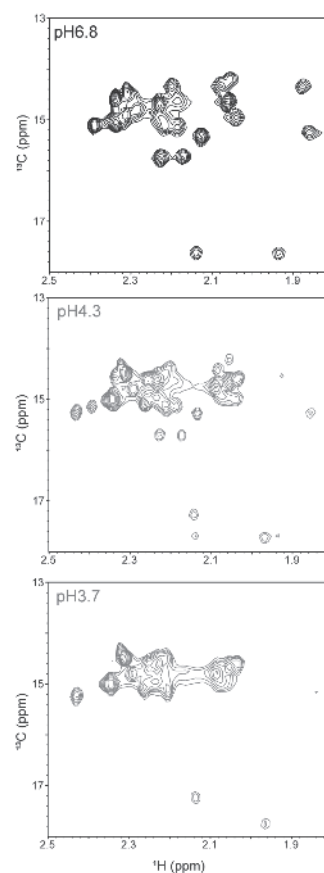


Fig. 2 NMR spectrum of PfMATE at distinct pH conditions.

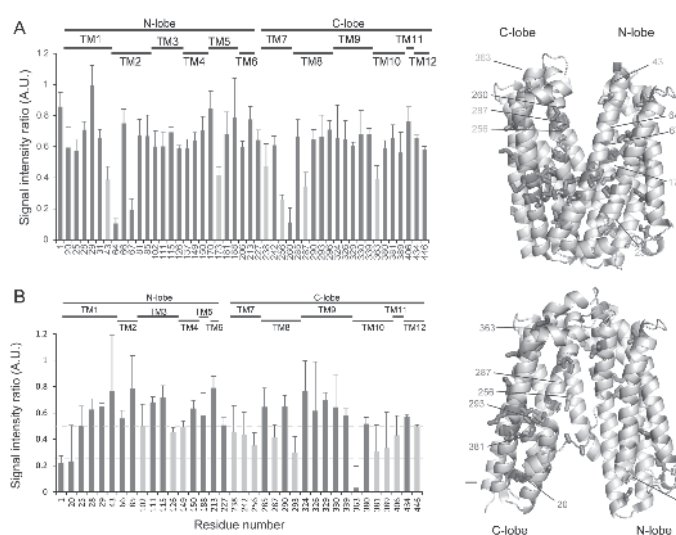


Fig. 3 Solvent PRE experiments of PfMATE at (A) neutral and (B) acidic conditions.

L3-4

Correlation and distance measurements between ^1H and ^{14}N using ^{14}N overtone NMR spectroscopy

○Yusuke Nishiyama^{1,2}

¹ JEOL RESONANCE Inc.

² RIKEN-JEOL Collaboration Center, RIKEN

Inspired by the pioneering work of direct observation of ^{14}N overtone transitions under MAS [1], we have tried to observe $^1\text{H}/^{14}\text{N}$ correlation under fast MAS conditions using a $^1\text{H}/^{14}\text{N}$ overtone HMQC method.[2] (Fig. 1) Since $^1\text{H}-^{14}\text{N}$ overtone coherences build two-times quicker than those of ^{14}N fundamental transitions, use of ^{14}N overtone pulse potentially enhance the sensitivity. In addition, ^{14}N overtone transition is free from the first order quadrupolar broadening, eliminating the necessity of the precise magic angle adjustment unlike fundamental ^{14}N transition. Although $^1\text{H}/^{14}\text{N}$ correlations were successfully observed, the method was suffered from limited excitation width of ^{14}N overtone pulse due to its slow nutation rate and thus long excitation pulse. We come up with the idea to utilize this band-limited nature of ^{14}N overtone pulse to selectively excite coherences between ^1H and a specific ^{14}N nucleus.

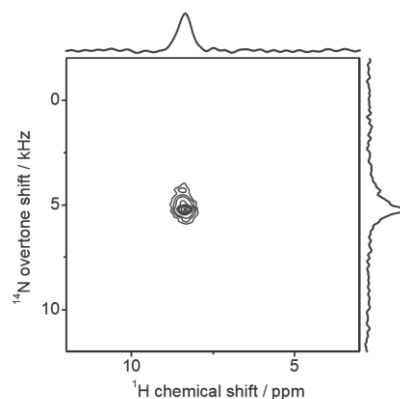


Fig.1 ^{14}N overtone/ ^1H HMQC spectrum of glycine observed at 70 kHz MAS.

N-H distance measurements: Although precise $^1\text{H}-^{14}\text{N}$ distance measurements can be made by using PM-S-RESPDOR experiments by uniformly saturate all the ^{14}N nuclei [3], the presence of multiple ^{14}N sites introduces complexity in data analysis. The use of ^{14}N overtone pulse in S-RESPDOR allows us to selectively determine the distance between a selected $^1\text{H}-^{14}\text{N}$ pair even in the presence of multiple nitrogen sites in vicinity.[4] (Fig. 2)

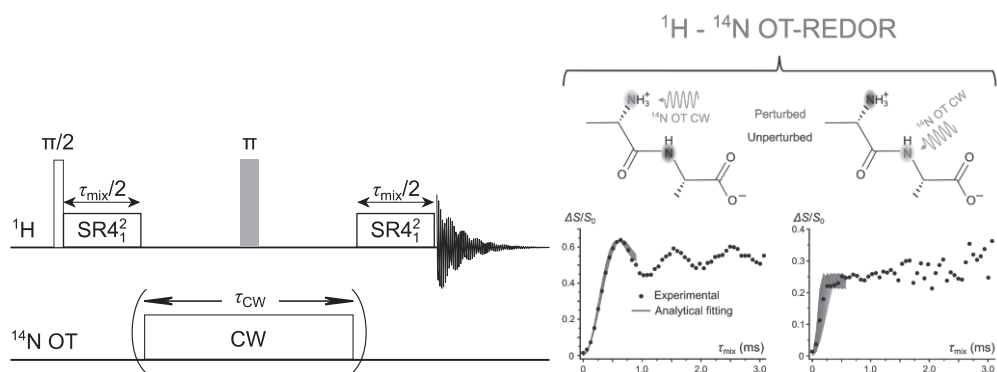


Fig.2 (left) $^1\text{H}/^{14}\text{N}$ OT REDOR/RESPDOR sequence. S' and S_0 are observed with and without ^{14}N OT saturation pulse, respectively. (right) $^1\text{H}/^{14}\text{N}$ OT REDOR/RESPDOR fraction curve observed at two different ^{14}N OT frequencies. Selective distance measurements between NH_3^+ and NH were achieved.

N-H correlation: The selective nature of ^{14}N overtone pulse also allows frequency-swept approach to record frequency response similar to historical CW NMR spectrometers. ^1H - ^{14}N overtone S-RESPDOR gives ^1H resonances only if ^{14}N overtone frequency hits the ^{14}N nucleus which is dipolar-coupled with the ^1H nucleus. Thus, a set of ^1H - ^{14}N overtone S-RESPDOR spectra with varying ^{14}N overtone frequencies provides $^1\text{H}/^{14}\text{N}$ overtone correlation spectra.[5] The method allows highly efficient observation of $^1\text{H}/^{14}\text{N}$ correlations even for remote (non-bonded) ^1H - ^{14}N pairs.

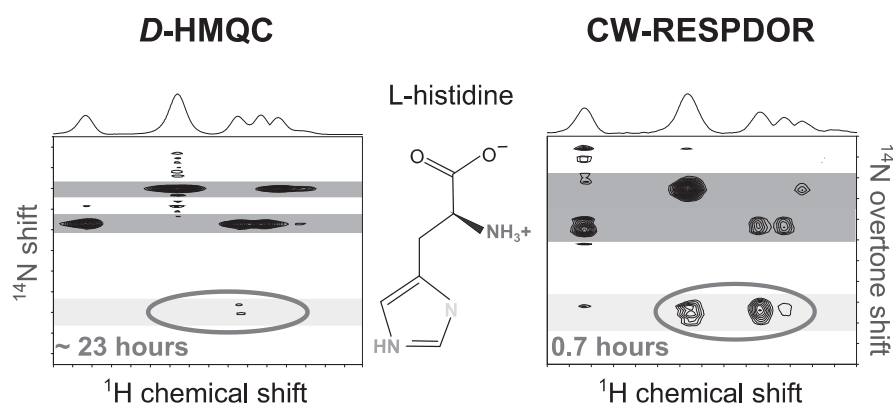
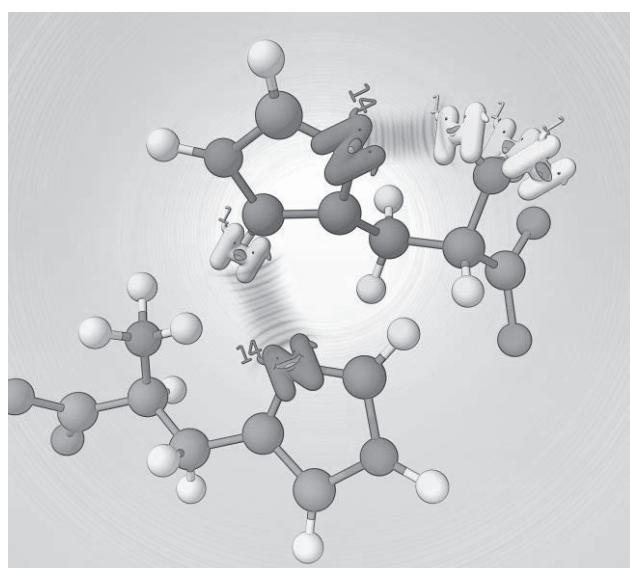


Fig. 3 Comparison of $^1\text{H}/^{14}\text{N}$ correlation spectra observed D-HMQC and RESPDOR. In the RESPDOR approach, ^1H S_0 - S' spectra were plotted at various ^{14}N OT frequencies.

References

- [1] L.A. O'Dell, C.I. Ratcliffe, Chem. Phys. Lett. 514 (2011) 168-173.
- [2] Y. Nishiyama, M. Malon, Z. Gan, Y. Endo, T. Nemoto, J. Magn. Reson., 2013, 230, 160-164.
- [3] N.T. Duong, F. Rossi, M. Makrinich, A. Goldbourt, M.R. Chierotti, R. Gobetto, Y. Nishiyama*, J. Magn. Reson. 308 (2019) 106559.
- [4] N.T. Duong, Z. Gan, Y. Nishiyama, Front. Mol. Biosci., 2021, 8, 645347.
- [5] N.T. Duong, Y. Nishiyama, Phys. Chem. Chem. Phys., 2022, 24, 10717-10726.



L3-5

鉱物におけるカチオンの秩序度及び水素結合：多核 NMR 測定及び第一原理計算による解明

○薛 献宇¹,

¹岡山大学・惑星物質研究所

Revealing cation disorder and hydrogen bonding in minerals via multi-nuclear NMR and first-principles calculation

○Xianyu Xue¹

¹*Institute for Planetary Materials, Okayama University*

Over the years, we have applied a combined approach of solid-state NMR and first-principles calculation to unravel cation (Si/Al/Mg/Zn...) distributions, hydrogen distribution and hydrogen bonding for a large number of important silicate and oxide minerals, in order to help understand their physical/thermodynamic properties and stability. Here, I showcase our latest study on the Si/Al distribution and hydrogen bonding of a nature mineral, ussingite ($\text{Na}_2\text{AlSi}_3\text{O}_8\text{OH}$), which features a unique partially interrupted framework structure and strong hydrogen-bonding. It will be demonstrated that a combined comprehensive NMR and first-principles calculation unambiguously revealed the existence and correlation of Si-Al disorder and OH groups of both stronger and weaker hydrogen bonding than the ordered structure. The ability to clearly reveal the correlation between Si/Al disorder and hydrogen-bonding strength opened up exciting opportunity for greater understanding of crystal chemistry of minerals and inorganic materials.

Introduction

Cation order/disorder and hydrogen-bonding in minerals and related inorganic solid materials are important factors affecting their physical and chemical properties and stability. NMR spectroscopy is a unique tool to provide such information. The utilization of multi-nuclear and multi-dimensional NMR techniques in combination with first-principles calculations greatly enhances the amount of information that can be extracted from minerals and inorganic materials of complicated disorder and defects.

Over the years, we have applied such an approach to unravel cation (Si/Al/Mg/Zn...) distributions, hydrogen distribution, and hydrogen bonding in a large number of important hydrous and nominally anhydrous silicate and oxide minerals, often synthesized at high pressure and temperature to simulate the conditions of the interiors of the Earth (e.g., Xue & Kanzaki, 2009; Stebbins & Xue, 2014; Xue et al., 2016). We recently also demonstrated the usefulness of NMR spectroscopy for the study of cation (Ca/Ba) distribution in calcite mineral (Marugata et al., 2022). Here, I will showcase our latest study on the Si/Al distribution and hydrogen bonding of a nature mineral, ussingite ($\text{Na}_2\text{AlSi}_3\text{O}_8\text{OH}$), which has a unique partially interrupted framework structure and features strong hydrogen-bonding (see Fig. 1).

In the structure of ussingite, there are four tetrahedral (T) sites. T1 & T2 are Q^4 (i.e., having 4 next nearest neighbor (NNN) T sites), and T3 & T4 are Q^3 (i.e., having 3 NNN T sites). The Si/Al distribution of their NNN environments are as the following (in brackets): T1(1T2,1T3,2T4), T2(1T1,2T3,1T4), T3 (1T1,2T2), T4(2T1,1T2). Hydrogen was found to be in the T4-O8-H \cdots O2-T3 configuration, with a short hydrogen-bonding O8 \cdots O2 distance

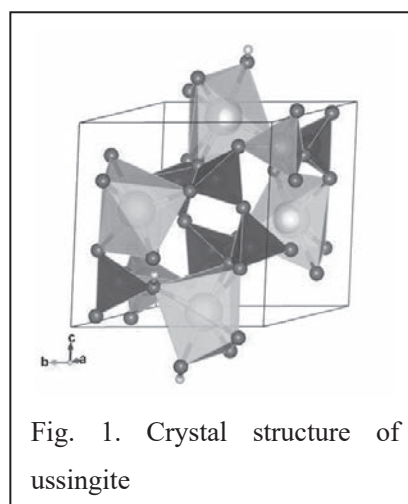


Fig. 1. Crystal structure of ussingite

Keywords: mineral, cation disorder, hydrogen bonding

○ しゅえ しやんう

(2.481 Å) (Williams & Weller, 2012). In the ordered structure, T1 is only occupied by Al, and the other T sites are only occupied by Si. Previous X-ray and neutron diffraction (Rossi et al., 1974; Williams & Weller, 2012; Ribbe, 1974) and ^1H , ^{29}Si NMR studies (Oglesby & Stebbins, 2000; Johnson & Rossman, 2004) gave contradictory conclusions as to whether Al-Si disorder exist, and which site Al is disordered into. As many geologically and technologically important aluminosilicate glasses and melts are of partially depolymerized structures, constraining the Si-Al distribution in ussingite may provide a general crystal chemical understanding of the partition behavior of Al in partially depolymerized aluminosilicate structure. Furthermore, how the Si-Al disorder affects the behavior of strong hydrogen bonding is also of great crystal chemical significance. In this study, I was able to unambiguously clarify the Si/Al distribution and its effect on the hydrogen bonding in ussingite via combined comprehensive NMR measurements and first-principles calculation.

Methods

NMR measurements were performed on a natural ussingite sample from Lovozero alkali Massif, Russia, initially using a Varian 9.4 T Unity-Inova spectrometer and 2.5 mm T3 MAS probe, and subsequently using a Bruker 9.4 T Avance NEO spectrometer and a 3.2 mm MAS probe. First-principles calculations (energy & NMR parameters) were performed with the GIPAW method using the Quantum-ESPRESSO package (v.7.0). Both the ordered ussingite structure and models for Si-Al disorder were studied. For the latter, one pair of Al-Si exchanged between a T1 site and each of its NNN (1T2, 1T3, 2T4), as well as between a pair of remote T1 and T2 sites in a 2x2x2 supercell (256 atoms) with were examined. For each calculation, the crystal structure was first fully relaxed before NMR calculation. The PAW-pseudopotential and PBEsol functional (from the PSLibrary) was used.

Results & Discussion

^1H - ^{29}Si CPMAS NMR of ussingite revealed three main peaks near -84, -88 and -96 ppm, which may be attributed to Q3(1Si2Al), Q3(2Si1Al) and Q4(3Si1Al), corresponding, respectively, to T4, T3 and T2 site in the ordered structure. These main peaks clearly each contain more than one component(s). In addition, weak peaks near -81 and -92 ppm were also revealed, which may be, respectively, attributed to Q3(3Al) and Q3(3Si). These features can be accounted for only by Si-Al disorder between T1 and T2 sites, contrary to previous speculations of disorder between T1 and T3 or lack of disorder. ^1H MAS NMR revealed a main peak near 13.8 ppm (with a shoulder near 13.3 ppm), a group of three partially resolved weaker peaks near 15.8, 15.5, 15.2 ppm, and another weaker peak near 11.0 ppm, similar to that reported for a sample of different locality (Johnson & Rossman, 2004). 2D ^1H DQ MAS NMR confirmed that all these peaks belong to the same structure. Furthermore, 2D ^1H - ^{29}Si HETCOR NMR revealed that there are 4 components for the group of proton peaks near 15 ppm, which are each correlated to two Si of the same number of nSi(3-n)Al neighbors (two of them correlated with two Si(1Si2Al), and the other two with two Si(2Si1Al)), and the proton peak near 11 ppm is correlated to Si(3Al) and Si(3Si). As in the ordered structure, each proton is associated with one Si(1Si2Al) and one Si(2Si1Al), this observation indicates that the extra proton NMR peaks near 15 and 11 ppm are due to OH groups which are either bonded or hydrogen-bonded to a Si site that is next to a disordered T site. Both the ^{29}Si and ^1H NMR data are consistent with about 3% Si-Al disorder. ^{23}Na and ^{27}Al 3QMAS NMR data are also consistent with local structural disorder.

First-principles calculation support the above experimental observation and provide further insight into the relationship between Si/Al disorder and hydrogen-bonding. The calculation revealed that Si-Al exchange between NNN T1-T2 is energetically most favorable and thus the most plausible model; the other models with Si-Al exchange between NNN T1-T3, T1-T4, or remote T1-T2 sites, which are accompanied by formation of Al-NBO (non-bridging oxygen), AlOH and/or Al-O-Al, gave higher energies (by 28~68 kJ/mol), consistent with the known unfavorable formation of Al-NBO and AlOH (relative to Si counterparts) and Al avoidance principle. The calculated ^{29}Si and ^1H chemical shifts of the model with Al-Si exchange between NNN T1-T2 agree well with the observed NMR data and the peak assignment described above. The correlation between the Si/Al disorder and hydrogen-bonding distances is explainable by the transmission of bond strength variation associated with Si/Al disorder to hydrogen-bonding distance variation. To my knowledge, this is the first study that has clearly revealed such a relationship.

In conclusion, this study has unambiguously revealed the presence of about 3% Si-Al disorder between T1 & T2 sites (both Q^4) in ussingite, which is accompanied by the formation of OH of both stronger and weaker hydrogen bonding (larger and smaller ^1H chemical shift). These results provided insights into the partition behavior of Si-Al in partially depolymerized aluminosilicate structure and its relationship with hydrogen bonding strength.

L3-6

Innovations in High-field Protein Solid-state NMR and its Applications to Amyloid- β Fibrils and Other Biomolecules

Ayesha Wickramasinghe,² Tatsuya Matsunaga,² Isamu Matsuda,¹ Mohammad Jafar Tehrani,¹ Hibiki Terami,¹ Yoshiki Shigemitsu,¹ Naohiro Kobayashi,² and Yoshitaka Ishii^{1,2*}

¹School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology, Yokohama, Japan

²BDR Center, RIKEN, Yokohama, Japan

This study presents our ongoing efforts to advance high-field protein solid-state NMR (SSNMR) from two aspects. First, we discuss applications of biomolecular SSNMR to amyloid β fibrils and other systems. Second, we discuss our recent progress in biomolecular solid-state NMR (SSNMR) for resolution and sensitivity enhancement by ¹H-detected SSNMR, ultra-fast magic angle spinning, and use of a high magnetic field.[1, 2] We also demonstrate that traditionally time-consuming 3-5D biomolecular SSNMR is feasible for signal assignments in a nano-mole-scale with this approach.

We first discuss our progress in structural examination of misfolded amyloid- β ($A\beta$) by SSNMR. Increasing evidence suggests that formation and propagation of misfolded aggregates of 42-residue $A\beta_{42}$, rather than more abundant $A\beta_{40}$, provokes the Alzheimer's cascade. Our SSNMR study recently revealed a unique S-shaped structure of $A\beta_{42}$ amyloid fibril for the first time.¹ Here, we discuss the feasibility of characterizing the structure of trace amounts of brain-derived and synthetic amyloid fibrils by sensitivity-enhanced ¹H-detected solid-state NMR (SSNMR) under ultra-fast magic angle spinning (UFMAS).² Data on cryoEM and SSNMR analysis of $A\beta$ fibril and NMR analysis of other biopolymers will be also presented.

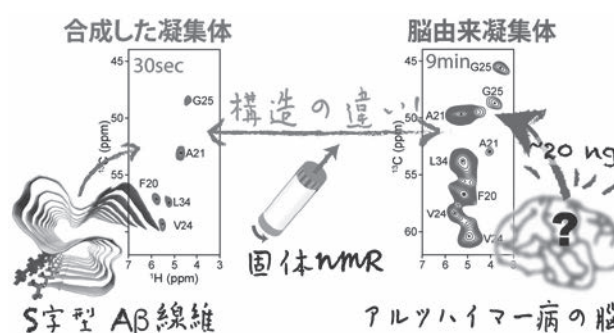


Figure 1. (Right) High sensitivity ¹H-detected ¹H/¹³C 2D SSNMR using UFMAS provided molecular fingerprints of $A\beta_{42}$ fibrils (200 μ g) templated from ~20 ng of brain-derived amyloid fibrils from Alzheimer's patient only after 9-min measurements. (Left) A corresponding 2D spectrum for synthetic $A\beta_{42}$ fibril reveals distinctive spectral features, demonstrating the presence of drastically different molecular structures for brain-derived $A\beta_{42}$ fibril.

Solid-state NMR, ¹H-detection, Ultra-fast MAS, Amyloid

Ayesha Wickramasinghe, Tatsuya Matsunaga, Isamu Matsuda, Mohammad Jafar Tehrani, Hibiki Terami, Yoshiki Shigemitsu, Naohiro Kobayashi, Yoshitaka Ishii○

Second, we discuss our recent progress in resolution and sensitivity enhancement in ^1H -detected biomolecular SSNMR under UFMAS conditions (≥ 80 kHz) in a high magnetic field (^1H frequency ≥ 700 MHz).^{3,4} Our data on protein microcrystal GB1 and A β fibril show that traditionally time-consuming 3-5D biomolecular SSNMR is feasible for signal assignments in a nano-mole scale with this approach. We also discuss novel concepts for drastic sensitivity enhancement by various polarization-transfer schemes using ultra-fast MAS.⁵ The progress of the JST MIRAI project to construct ultra-high field NMR will be briefly outlined.

References:

- (1) Xiao, Y. *et al. Nat. Struct. Mol. Biol.* **2015**, *22*, 499.
 - (2) Wickramasinghe, A. *et al. J. Am. Chem. Soc.* **2021**, *143*, 11462.
 - (3) Wickramasinghe, N. P. *et al. Nat. Methods* **2009**, *6*, 215.
 - (4) Ishii, Y. *et al. J. Magn. Reson.* **2018**, *286*, 99.
 - (5) Matsunaga, T.; Matsuda, I.; Yamazaki, T.; Ishii, Y. *J. Magn. Reson.* **2021**, *322*, 106857.
-

IL-1

NMR-Based Molecular Rheology for the Study of Chain Motion in Complex Polymer Systems

Kay Saalwächter¹, Anton Mordvinkin¹, Marcus Suckow², Diana Döhler³, Frank Böhme², Wolfgang H. Binder³, Ralph H. Colby⁴

¹*Institut für Physik – NMR, Martin-Luther-Univ. Halle, Germany*

²*IPF Dresden, Germany; ³Macromol. Chemistry, MLU Halle, Germany;*

⁴*Penn State U, State College, USA*

Polymeric materials (including biomolecular samples) are characterized by molecular dynamics covering a large timescale range, often accompanied by a complex morphology, comprising phases with different molecular packing and vastly different mobility. Established high-resolution, mostly ¹³C-based solid-state NMR can play out its full power in elucidating these complexities, but at the expense of long experimental times. In this contribution, I summarize the options provided by ¹H low-resolution (possibly low-field) NMR in gathering relevant information on the dynamics of polymer chains.

Dynamic information is mostly encoded in transverse spin evolution governed by the dipolar coupling network [1]. Therefore, methods as simple as *transverse relaxation measurements* can be used to characterize the dynamics qualitatively, e.g. distinguishing between rigid (glassy/crystalline) regions and mobile domains featuring large-scale segmental and chain motion far above the glass transition. In the latter case, the dynamics is characterized by power-law time correlation functions and local motional anisotropy, the latter leading to finite residual dipolar couplings in the ten to few hundred Hz range. Also, these can be probed quantitatively and be used to back up or disprove models in polymer physics aimed at an understanding of e.g. mechanical properties. To this end, *proton multiple-quantum (MQ) NMR* has established itself as a more advanced, better analyzable version of transverse relaxometry [1,2]. The two signal functions provided by this technique can be processed and fitted rather reliably, allowing for a separation of coherent spin evolution due to (residual) dipolar couplings and incoherent transverse relaxation effects [3].

These principles are demonstrated in recent applications focusing on the chain dynamics in transient associating networks, which could possibly be applied as self-healing materials. Specifically, we study the relations between the microscopic chain dynamics and the mechanical behavior of transient elastomers based upon poly(isobutylene), PIB with “sticky” side- or endgroups that form clusters in the nm range. The dynamics of the chains and of the sticky groups were studied by a combination of dielectric spectroscopy (DS), ¹H static MQ as well as high-resolution MAS NMR, and are correlated with the rheological behavior.

The first material platform are butyl rubber ionomers with sparse imidazole-based sidegroups, which show promise as self-healing elastomers [4,5]. For the first time, we have demonstrated a quantitative agreement of the NMR-detected chain relaxation and the rheology results [5],

solid-state NMR, low-resolution multiple-quantum NMR, polymer dynamics

thus confirming the sticky reptation picture [6]. The combined results suggest a hierarchical model of sticker and chain dynamics as depicted in Fig. 1.

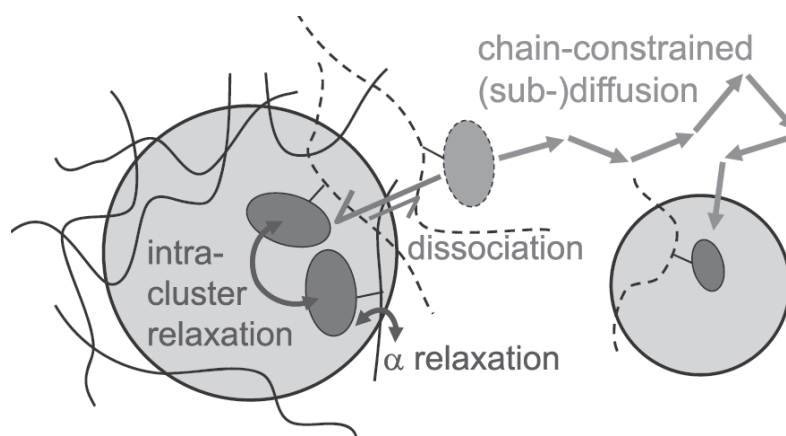


Figure 1. Hierarchy of (thermo)dynamic processes relevant for sticky chain dynamics in self-healing elastomers as elucidated by a combination of ^1H NMR, dielectric spectroscopy and rheology [5].

The second platform are telechelic linear and star-shaped PIBs carrying different hydrogen-bonding moieties [7]. Here we could address the relation between the terminal time of the individual chains and the onset of flow, which turn out to be equal [8]. Therefore, in this case the one theory considering systems with clustered stickers [9] is disproven. The cluster-related relaxation detected by DS is always much faster than the chain relaxation probed by NMR. The overall trends suggest that all relaxations are dominated by a cluster-related activation barrier, but also that the DS-based cluster relaxation cannot be directly associated with the sticker lifetime, in contradiction to the common assignment of the DS-detected process [10]. We thus suggest a reconsideration of the assumptions made in explaining the relationship between molecular-scale and macroscopic dynamics in such transient elastomers.

References

- [1] K. Saalwächter, *Progr. NMR Spectrosc.* **51**, 1 (2007)
- [2] K. Saalwächter, in: G.A. Webb (ed.), *Modern Magnetic Resonance*, Springer, Cham (2017). DOI: 10.1007/978-3-319-28275-6_59-2
- [3] M. Mordvinkin, K. Saalwächter, *J. Chem. Phys.* **146**, 094902 (2020); erratum: *J. Chem. Phys.* **148**, 089901 (2018)
- [4] Das, A. *et al.*; *ACS App. Mater. Interf.* **7**, 20623 (2015)
- [5] Mordvinkin, M. *et al.*; *Macromolecules* **52**, 4169 (2019)
- [6] Stukalin, E.B. *et al.*; *Macromolecules* **46**, 7525 (2013)
- [7] Döhler, D.; Peterlik H.; Binder, W. H.; *Polymer* **69**, 264 (2015)
- [8] Mordvinkin M. *et al.*; *Phys. Rev. Lett.* **125**, 127801 (2020)
- [9] Semenov, A. N.; Rubinstein, M.; *Macromolecules* **35**, 4821 (2002)
- [10] Gold, B.J. *et al.*; *ACS Macro Lett.* **6**, 73 (2017).

IL-2

Non-Covalent Secondary Bonding Interactions Examined via Multinuclear Solid-State Magnetic Resonance

David L. Bryce¹

¹*University of Ottawa, Ottawa, Canada.*

A large proportion of the elements of the periodic table have isotopes amenable to study via NMR spectroscopy. Similarly, in recent years the concept of element-based non-covalent interactions, also known as secondary bonding interactions, has gained traction and attracted much interest in a variety of communities. Analogous to the ubiquitous hydrogen bonds, other interactions such as halogen bonds, chalcogen bonds, pnictogen bonds, and tetrel bonds, for example, have found applications in crystal engineering, supramolecular chemistry, catalysis, and materials science. Here, I will describe our ongoing efforts to characterize and understand these various classes of bonds via multinuclear solid-state NMR spectroscopy. For example, we have applied ^{35/37}Cl, ^{79/81}Br, and ¹²⁷I solid-state NMR and nuclear quadrupole resonance (NQR) spectroscopies to examine the NMR response of a variety of halogen bond donors upon bond formation. ⁷⁷Se and ¹²⁵Te magic-angle spinning (MAS) NMR has been used to understand the impact of chalcogen bonding on the selenium and tellurium chemical shift tensors. ¹²¹Sb quadrupolar coupling constants measured via NQR spectroscopy have been measured and used in a rudimentary NQR crystallographic refinement protocol to obtain structural information on novel materials prepared using mechanochemical approaches. Other recent work from our laboratory includes the in-situ monitoring of halogen bond formation in the solid state via ³¹P MAS NMR. Deuterium NMR has been used to demonstrate the modulation of molecular dynamics via halogen bonded networks in solids. Finally, we will describe a recent comprehensive study of the NMR response of the tin tetrel bond, where in particular $J(^{119}\text{Sn}, ^{35}\text{Cl})$ couplings are shown to be valuable indicators of non-covalent bond formation between tin and oxygen.

IL-3

Studying protein weak interaction by NMR

Nico Tjandra

Biochemistry and Biophysics Center, National Heart, Lung, and Blood Institute,
National Institutes of Health, Bethesda, U.S.A.

High resolution NMR is an invaluable tool to study weak biomolecular interactions. The ability for NMR to provide both structural and dynamic information in a site-specific manner can uniquely be tailored to study such interactions. Relaxation NMR based experiments, such as NMR R_2 dispersion, Chemical Exchange Saturation Transfer (CEST), Dynamic Exchange Saturation Transfer (DEST) and others are designed to probe systems that undergo exchange processes at different time scales. While residual dipolar coupling (RDC) and residual chemical shift anisotropy (RCSA) can provide information on systems containing multiple conformations in equilibrium. Moreover, paramagnetic relaxation enhancement (PRE), and pseudo contact shift (PCS) can also report on the existence of multiple states of a system. This large number of diverse NMR methods to study weak interactions, that span a large range of timescales and differentially sensitive to distances, illustrates the advantage of solution NMR compared to other biophysical or biochemical techniques.

We employed a subset of the above NMR approaches to study a paralog of phosphotransferase systems in *E. coli*. These systems are important in metabolic and stress response processes. These phosphorylation use structurally similar enzyme, Enzyme I^{sugar} (EI^{sugar}) for the sugar import and Enzyme I^{Ntr} (EI^{Ntr}) for the nitrogen regulation. Furthermore, their substrates HPr and NPr for EI^{sugar} and EI^{Ntr} , respectively also have similar fold. Despite similarity in the structures of the enzymes and their substrates these transfer pathways are very specific in forming enzyme-substrate complex that results in phosphorylated substrate and show no reversible phosphotransfer. We used PRE to study the specificity of N terminal of EI^{Ntr} (EIN^{Ntr}):NPr complex formation by evaluating the formation of its encounter complexes. Our PRE data demonstrated the presence of encounter complexes not only between EIN^{Ntr} and its expected substrate NPr, but also with the unexpected substrate HPr (Figure 1). Unlike NPr, HPr occupies encounter sites on EIN^{Ntr} without the ability to form a final stereospecific complex. By occupying the non-productive sites, HPr drives NPr transient interaction towards the productive sites, which are closer to the specific binding site. This has a consequence of enhancing the specific complex formation between NPr and EIN^{Ntr} . Noting that the concentration of HPr is over 150 times higher than NPr in the cell, we postulated that the formation of competitive encounter between structurally similar substrates and a target enzyme can be a mechanism to generate cross-regulation of its activity.

We tested our above proposal for cross-regulation from weak encounter complex formation using a coarse-grained simulation (Figure 2). As it is still not clear whether the encounters involving non-cognate substrate can have a cooperative or competitive role. The results of our simulation confirmed our proposal that encounter complexes can be cooperative or competitive, thus increasing or lowering the effective binding affinity of the specific complex under different conditions. Our findings raised an interesting possibility for organism to take advantage of low affinity interactions to build fine-tuned signaling pathways.

To test the generality of our hypothesis, the use of weak encounter complexes as a mechanism for cross-regulation, we are also studying an enzyme, SixA in the phosphotransfer system of the bacteria. This enzyme

was shown to dephosphorylate NPr, but shows no significant activity towards HPr. Consistent with our hypothesis, titration with either NPr or HPr show chemical shift changes on SixA. The measured chemical shift changes are quite small signifying weak interactions. We confirmed these interactions using PRE. Similar to the observations in the EI^{Ntr} case, the site of interactions between the two substrates don't overlap. More importantly these weak interaction sites are away from the SixA active site. We propose that we are observing the sites associated with the substrates leaving the enzyme active site, which is reflective of its off rate. Since we are seeing different “off” sites for NPr and HPr, it suggests that these two substrates might have cross-regulation as observed for EI^{Ntr} . Future experiments will be aimed at testing this cross-regulation action of NPr and HPr on SixA.

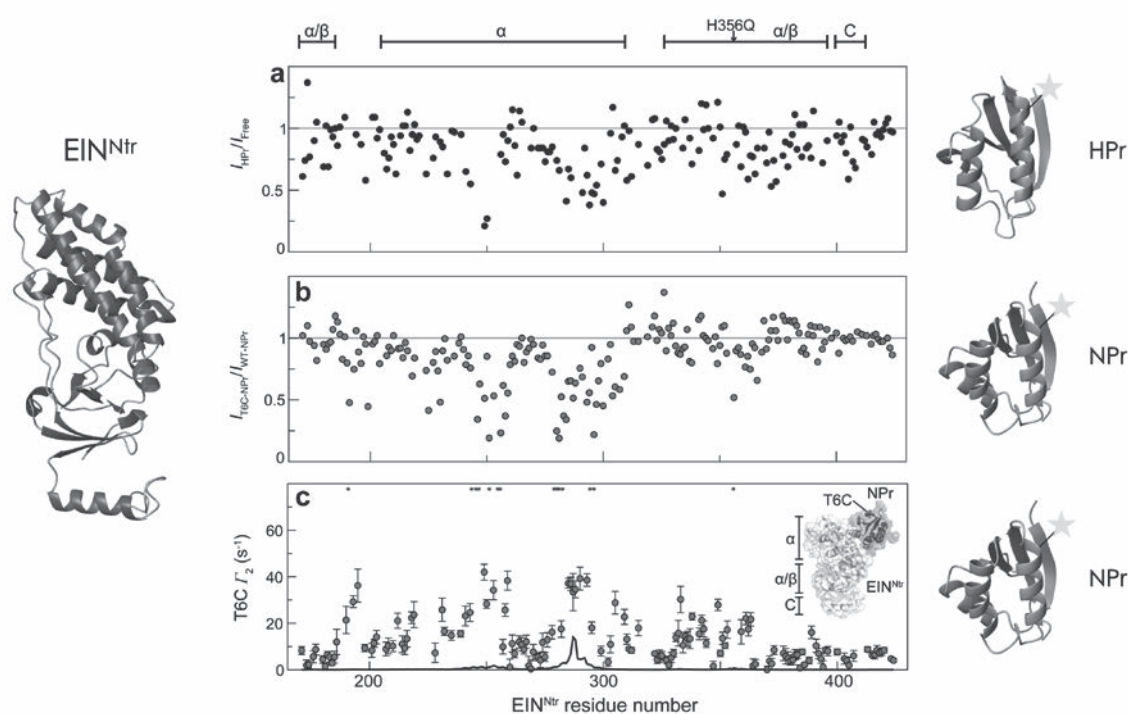


Figure 1. Paramagnetic relaxation enhancement on EI^{Ntr} upon addition of different substrates. a) Normalized intensity between free EI^{Ntr} and after the addition of HPr E5C mutant tagged with MTSL. b) Intensity ratio between free EI^{Ntr} in complex with wild type NPr and EI^{Ntr} in complex with NPr T6C tagged with MTSL. c) The PRE of EI^{Ntr} and NPr T6C-MTSL. The inset shows the structure of the complex between EI^{Ntr} and NPr with the distinct domains of EI^{Ntr} indicated. The sample was reduced using ascorbic acid to serve as the diamagnetic reference. Stars indicate residues which were broadened beyond detection. The enzyme EI^{Ntr} structure is shown on the left, while the structures of HPr and NPr with the location of the MTSL tag are shown on the right. The domains α , α/β , and C-terminal of EI^{Ntr} are marked at the top of the panel a. The mutation site H356Q is also indicated.

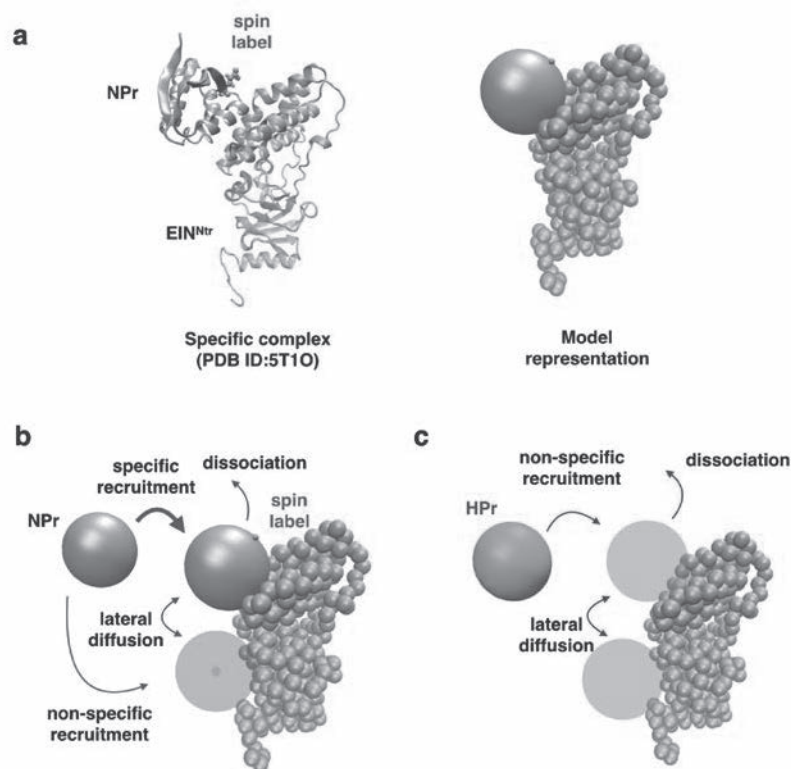


Figure 2. Coarse-grained model of EIN^{Ntr} interaction with NPr and HPr. a) The structure of the complex between EIN^{Ntr} and NPr is shown on the left. The representation of the enzyme and substrate used in the simulation is depicted on the right. Each amino acid in the EIN^{Ntr} is represented by a sphere with an appropriate radius, while NPr or HPr is represented by a single sphere with a radius equaled to their radius of gyration. b) The various processes being considered in the simulation for NPr interaction onto EIN^{Ntr}. The spin label on NPr is shown in orange stick on the left of panel a, and a small orange sphere on the right and in panel b. c) Processes included in the simulation of HPr interaction with the enzyme.

AL-1

Clarification of the GPCR signaling mechanism based on the function-related conformational dynamics

Takumi Ueda¹

¹Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo

Proteins exert their biofunctions with continuously changing their conformations. In relation to this point, solution NMR methods provide quantitative information about the dynamics of proteins over a wide range of frequencies, in aqueous solutions at near-physiological temperatures. I have been utilized NMR for the structural elucidation of the functions of high molecular weight proteins, including signaling of G protein-coupled receptors (GPCRs)¹⁻⁷ and bacterial chemotaxis regulation proteins, conductivity regulation of ion channels⁸, electron transport of photosynthetic membrane proteins⁹, and DNA repair reaction of photolyase.

GPCRs function as receptors of various chemical messengers, including neurotransmitters, hormones, cytokines (chemokines), and metabolites, and more than 30% of current drugs target GPCRs. NMR studies of GPCRs are challenging, because of their huge size, low yield and stability, limited stable isotope labeling method in eukaryotic protein expression systems, which are utilized in GPCR studies, thus the amount of information on the conformational dynamics of GPCRs is limited. To overcome these bottlenecks, we have developed various methods for sample preparation, NMR measurement and data analyses, and applied these methods to observe the function-related conformational equilibrium of GPCRs. For example, we developed methods for determining the rate constants of sophisticated conformational equilibrium models from NMR data using exchange Monte-Carlo algorithm², and methods for the sparse sampling and reconstruction of multidimensional NMR data, leading to > 50% reduction of the measurement time of 2D NMR spectra⁵.

To address the mechanism underlying the unique characteristics in the signal transduction of GPCRs, such as efficacy and biased signaling, we performed NMR analyses of β_2 adrenergic receptor (β_2 AR) and μ opioid receptor (μ OR) bound to ligands with various efficacies and biased factors^{4,7}. Resonances from the residues in the transmembrane region of β_2 AR and μ OR exhibited their chemical shifts, linewidths, and the number of signals dependent on the efficacies of the ligands. Based on these results, we demonstrated that β_2 AR and μ OR exists in equilibrium among multiple inactive and active conformations, and the populations of the active conformation determine the ligand efficacy and biased signaling.

Under the physiological conditions, GPCR are embedded in the lipid bilayer of cells. To address the effects of the lipid bilayer environment on the function and conformational dynamics of GPCRs, we examined GPCRs embedded in the lipid bilayer of reconstituted high density lipoprotein (rHDL). We demonstrated that the population of the active conformation of β_2 AR in rHDL better correlates with the maximum cAMP response of the cells expressing β_2 AR than in micelles⁶. In addition, we examined the effect of lipid composition on the conformation and activities of adenosine A_{2A} receptor (A_{2A} AR)¹. Our NMR analyses revealed that A_{2A} AR in the partial agonist-bound state exists in equilibrium between multiple

G protein-coupled receptor, membrane proteins,

active conformations and an inactive conformation, and that the full agonist drives the equilibrium toward the multiple active conformations. We quantified the G protein activation by A_{2A}AR in rHDLs, and determined that the DHA chains positively modulate the signaling activity of A_{2A}AR. The DHA chains in rHDLs did not affect the equilibrium between the inactive and active conformations, but redistributed the multiple active conformations of A_{2A}AR toward those preferable for G protein binding.

The timescales and populations of the function-related conformational equilibria, determined by NMR, open an avenue for integrating information about the protein structures at atomic resolutions and the real-time observations of the cellular responses via GPCR signaling. For example, a time-course simulation of G-protein signaling, based on the intracellular signaling reaction rates and the exchange rates between the inactive and active conformations of β_2 AR, demonstrated that the β_2 AR agonists induce the β_2 AR activation, G-protein activation, and the increase in cAMP on timescales of milliseconds, hundreds of milliseconds, and seconds, respectively⁶. It is exciting to look forward to the construction of GPCR signaling models that can quantitatively explain real-time cellular responses at atomic resolution.

References

- (1) Mizumura, T., Kondo, K., Kurita, M., Kofuku, Y., Natsume, M., Imai, S., Shiraishi, Y., Ueda, T., and Shimada, I. Activation of adenosine A_{2A} receptor by lipids from docosahexaenoic acid revealed by NMR. *Sci. Adv.* 6, eaay8544 (2020).
- (2) Imai, S., Yokomizo, T., Kofuku, Y., Shiraishi, Y., Ueda, T., and Shimada, I. Structural equilibrium underlying ligand-dependent activation of β_2 -adrenoreceptor. *Nat. Chem. Biol.* 16, 430-439 (2020).
- (3) Shimada I., Ueda, T., Kofuku, Y., Eddy, M., and Wüthrich, K. GPCR drug discovery, integrating solution NMR data with crystal and cryo-EM structures. *Nat. Rev. Drug Discov.* 18, 59-82 (2019).
- (4) Okude, J., Ueda, T., Kofuku, Y., Sato, M., Nobuyama, N., Kondo, K., Shiraishi, Y., Mizumura, T., Onishi, K., Natsume, M., Maeda, M., Tsujishita, H., Kuranaga, T., Inoue, M., and Shimada, I. Conformational equilibrium of μ -opioid receptor determines its efficacies and functional selectivities. *Angew. Chem. Int. Ed.* 54, 15771-15776 (2015)
- (5) Ueda, T., Yoshiura, C., Matsumoto, M., Kofuku, Y., Okude, J., Kondo, K., Shiraishi, Y., Takeuchi, K., and Shimada*, I. Development of a method for reconstruction of crowded NMR spectra from undersampled time-domain data. *J. Biomol. NMR* 62, 31-41 (2015)
- (6) Kofuku, Y., Ueda, T., Okude, J., Shiraishi, Y., Kondo, K., Mizumura, T., Suzuki, S., and Shimada, I. Functional dynamics of deuterated β_2 -adrenergic receptor in lipid bilayers revealed by NMR Spectroscopy. *Angew. Chem. Int. Ed.* 53, 13376-13379 (2014)
- (7) Kofuku, Y., Ueda, T., Okude, J., Shiraishi, Y., Kondo, K., Masahiro Maeda, Hideki Tsujishita, and Shimada, I. Efficacy of the β_2 -adrenergic receptor is determined by conformational equilibrium in the transmembrane region. *Nat. Commun.* 3, 1045 (2012)
- (8) Minato, Y., Suzuki, S., Hara, T., Kofuku, Y., Kasuya, G., Fujiwara, Y., Igarashi, S., Suzuki, E., Nureki, O., Hattori, M., Ueda, T., and Shimada, I. Conductance of P2X₄ purinergic receptor is determined by conformational equilibrium in the transmembrane region, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113, 4741-4746 (2016)
- (9) Ueda, T., Nomoto, N., Koga, M., Ogasa, H., Ogawa, Y., Matsumoto, M., Stampoulis, P., Sode, K., Terasawa, H., and Shimada, I. Structural basis of efficient electron transport between photosynthetic membrane proteins and plastocyanin in spinach revealed using nuclear magnetic resonance. *Plant Cell* 24, 4173-4186 (2012)

AL-2

Atomic-level elucidation of amyloid formation mechanism by NMR spectroscopy

Daichi Morimoto¹

¹Department of Molecular Engineering, Kyoto University

Accumulation of abnormal protein aggregates is a common hallmark of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders; the aggregates mainly consist of protein fibrils, i.e., amyloid fibrils. Despite the growing interest in their pathogenesis, the detailed formation mechanism remains elusive. To elucidate general amyloid formation mechanism, we first investigated the aggregation propensities of ubiquitin chains that often include in protein aggregates observed in neurodegenerative diseases. We found that longer ubiquitin chains were more likely to form amyloid fibrils and our NMR relaxation analysis showed that intracellular ubiquitin binding receptors recognized polyubiquitin fibrils. To analyze formation of polyubiquitin fibrils in more detail, we have developed novel rheological NMR (Rheo-NMR) spectroscopy to observe structural changes of proteins under shear conditions at atomic level and in real time. By using the developed Rheo-NMR spectroscopy, we captured precise structural changes of polyubiquitin chains during their amyloid formation. In addition, recently our Rheo-NMR simultaneously monitored structural changes of the folded and unfolded states of an ALS-related protein SOD1 in the amyloid formation processes.

Abnormal protein aggregation has often been observed in neurodegenerative diseases including Alzheimer's and Parkinson's diseases. Many inclusion bodies associated with neurodegenerative diseases contain ubiquitin, a posttranslational modifier. Although this involvement of ubiquitin has been reported since 1987, due to its extraordinarily high structural stability it remains unclear why ubiquitin is included in the pathological protein aggregates. By using differential scanning calorimetry (DSC), we found that the structural stability of ubiquitin chains decreased with increasing chain length (Fig. 1a)¹. In addition, heat or shear stress induced amyloid formation of polyubiquitin chains although monomeric ubiquitin does not form fibrils (Fig. 1b)¹. Intriguingly, also in cells polyubiquitin chains formed fibrillar aggregates depending on chain length and their aggregates were selectively degraded by autophagy¹. This result indicated that polyubiquitin fibrils were recognized by autophagic receptors. Indeed, an autophagic ubiquitin receptor p62 was colocalized with intracellular polyubiquitin fibrils. In addition, in the presence of polyubiquitin fibrils, ¹⁵N transverse relaxation rates of p62 significantly increased, showing that p62 recognizes the fibrils (Fig. 1c)¹.

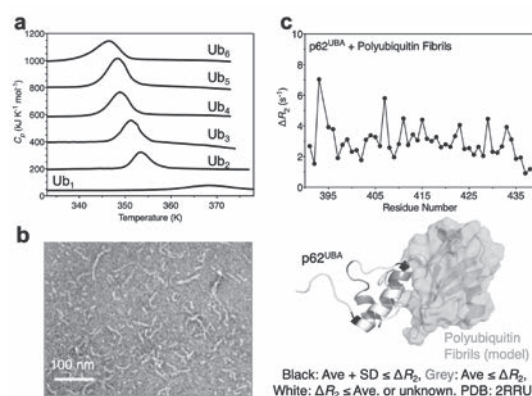


Fig. 1. Amyloid formation of polyubiquitin.

a, DSC curves for polyubiquitin chains of different length. **b**, EM image of polyubiquitin fibrils. **c**, Increase in ¹⁵N transverse relaxation rates of the UBA domain of p62 upon its interaction with polyubiquitin fibrils. Morimoto, *et al. Nat Commun* 2015 modified¹.

To analyze amyloid formation of polyubiquitin in more detail, we developed novel rheological NMR (Rheo-NMR) spectroscopy². Although Rheo-NMR has been established for polymer science in 1990, no Rheo-NMR method had been applied to amyloid studies with sufficient NMR sensitivity. To overcome the sensitivity issue, we established a simple and versatile approach to Rheo-NMR, in which the inner rod connected with a glass stick is inserted into the NMR sample tube in the NMR instrument equipped with a cryogenic probe (Fig. 2a). Only the NMR tube is rotating by application of spinner spinning and the inner glass stick is stationary, producing an outer-rotating Couette cell (Fig. 2b). We observed fibril formation of polyubiquitin in the established Rheo-NMR instrument. Notably, during the fibril formation, we detected the chemical shift changes of the side chains of the residues at the edges of the alpha-helix and loops². Thus, Rheo-NMR has the potential to capture structural changes during amyloid formation *in situ* and at atomic resolution.

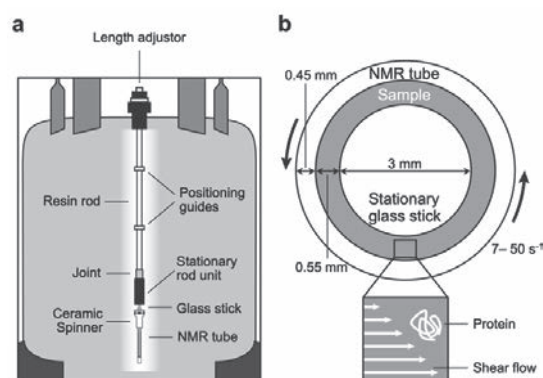


Fig. 2. Novel Rheo-NMR spectroscopy.

a, Schematic diagram of the established Rheo-NMR instrument. **b**, Cross-section of the NMR sample tube in the Rheo-NMR instrument. Morimoto, *et al. Anal Chem* 2017 modified².

By using the established Rheo-NMR, we recently analyzed amyloid formation of an ALS-related protein superoxide dismutase 1 (SOD1)³. Under the moderately denaturing condition, we simultaneously monitored NMR signal decay of folded and unfolded SOD1. The NMR signals of the folded species decreased faster than those of the unfolded one (Fig. 3a) and the 3¹⁰-helix of folded SOD1 was found to be deformed prior to global unfolding. In addition, we continuously measured hydrogen exchange rates between amide protons of SOD1 and water during the amyloid formation. The amyloid-phase-dependent hydrogen exchange profiles identified the residues involved in the core structure formation of SOD1 amyloid oligomers (Fig. 3b).

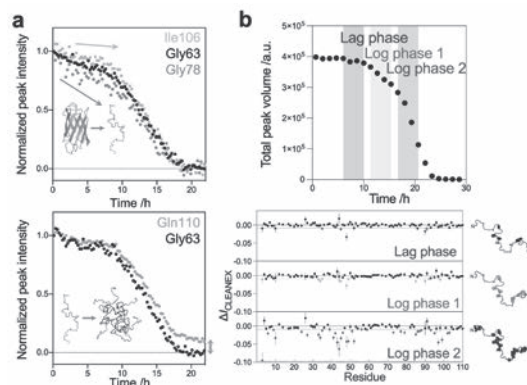


Fig. 3. *In situ* atomic-level monitoring of amyloid formation of SOD1.

a, Peak intensity decay of folded (upper) and unfolded (lower) SOD1 along its amyloid formation. **b**, Change in hydrogen exchange between amide protons of SOD1 and water in the different phases of the amyloid formation. Iwakawa, Morimoto, *et al. J Am Chem Soc* 2021 modified³.

References

- (1) Morimoto D, *et al.* (2015) The unexpected role of polyubiquitin chains in the formation of fibrillar aggregates. *Nat Commun.* 6, 6116.
- (2) Morimoto D, *et al.* (2017) High-sensitivity Rheo-NMR spectroscopy for protein studies. *Anal Chem.* 89(14), 7286-7290.
- (3) Iwakawa N, Morimoto D, *et al.* (2021) Multiple-state monitoring of SOD1 amyloid formation at single-residue resolution by Rheo-NMR spectroscopy. *J Am Chem Soc.* 143(28), 10604-10613.

HL-1

Pulse!

K. Takegoshi

Kyoto Univ. Kyoto, Japan

One of my delights as being an NMR spectroscopist is that I can manipulate coherence and magnetization of nuclear spins by rf pulses at my will (to some extent...). A simple example of such manipulation is found in the one pulse experiment; irradiation of a resonant rf pulse to a spin system at thermal equilibrium converts macroscopic longitudinal magnetization to transverse magnetizations (coherences), some of which evolves to induce current in the rf coil for us to taste. The first and still most active/popular pulse "sequence" may be the Hahn-echo sequence, which can refocus coherences of individual spin packets and form macroscopic transverse magnetization (spin echo). So far, I have developed several pulse sequences, most of which are collated in Table 1. In this commemorative lecture, I would like to explain why and how some of them were produced.

Table 1. Pulse sequences I have developed.

Ref.	Abbreviation	Simple explanation	Year
1)	TREV8	^1H homonuclear decoupling based on the magic echo	1985
2)	TAPF	Modify the Hartman-Hahn condition for low γ	1986
3)	PFCT	Spin echo for AX spin systems	1989
4)	SR-1331	Self-refocused binominal sequences	1989
5)	R2TR	X-X recoupling by rotational resonance in the TR frame	1995
6)	MORE	X-Y recoupling by modulatory resonance	1996
7)	FSLG-m2mm	^1H -X recoupling by LG	1999
8)	RIR	X-X recoupling by resonant interference recoupling	1999
9)	AM-TPPM	^1H decoupling by amplitude-modulated TPPM	2001
10)	DARR	X-X recoupling by dipolar-assisted rotational resonance	2001
11)	NOP	NOE to replace CP in solids	2002
12)	CPNZ	CP via non-Zeeman reservoirs	2007
13)	COCODARR	COSY+DARR (どこやねん)	2008
14)	COMPOSER	CP using composite 0-degree pulses	2009
15)	CPZ	CP among Z magnetizations using COMPOSER	2014
16)	DONUT	^1H decoupling/recoupling under double-nutation irr.	2014
17)	OD-CPZ	Rotational resonance for ^1H -X heteronuclear pairs	2017

References

- 1) Takegoshi, K. and C. A. McDowell (1985). "A "Magic Echo" Pulse Sequence for the High-Resolution NMR Spectra of Abundant Spins in Solids." Chem. Phys. Lett. **116**: 100-104.
- 2) Takegoshi, K. and C. A. McDowell (1986). "Cross Polarization Using a Time-Averaged Precession Frequency. A Simple Technique to Reduce Radiofrequency Power Requirements for Magnetization Transfer Experiments in Solids." J. Magn. Reson. **67**: 356-361.
- 3) Takegoshi, K., et al. (1989). "A Perfect Spin Echo in a Weakly Homonuclear *J*-Coupled Two Spin-1/2 System." J. Magn. Reson. **84**: 611-615.
- 4) Takegoshi, K., et al. (1989). "Self-Refocused Binominal Pulse Sequence for Solvent Suppression." J. Magn. Reson. **85**: 198-202.
- 5) Takegoshi, K., et al. (1995). "Rotational Resonance in the Tilted Rotating Frame." Chem. Phys. Lett. **232**: 424-428.
- 6) Takegoshi, K., et al. (1996). "Modulatory resonance recoupling of heteronuclear dipolar interactions under magic angle spinning." Chem. Phys. Lett. **260**: 331-335.
- 7) Takegoshi, K. and T. Terao (1999). "¹³C-¹H dipolar recoupling under very fast magic-angle spinning using virtual pulses." Solid State Nucl. Magn. Reson. **13**: 203-212.
- 8) Takegoshi, K., et al. (1999). "¹³C-¹³C polarization transfer by resonant interference recoupling under magic-angle spinning in solid-state NMR." Chem. Phys. Lett. **307**: 295-302.
- 9) Takegoshi, K., et al. (2001). "¹H decoupling with third averaging in solid NMR." Chem. Phys. Lett. **341**: 540-544.
- 10) Takegoshi, K., et al. (2001). "¹³C-¹H dipolar-assisted rotational resonance in magic angle spinning NMR." Chem. Phys. Lett. **344**: 631-637.
- 11) Takegoshi, K. and T. Terao (2002). "¹³C nuclear Overhauser polarization nuclear magnetic resonance in rotating solids: Replacement of cross polarization in uniformly ¹³C labeled molecules with methyl groups." J. Chem. Phys. **117**: 1700-1707.
- 12) Ohashi, R., et al. (2007). "Cross polarization via the non-Zeeman spin reservoirs under MAS." Solid State Nucl. Magn. Reson. **31**: 115-118.
- 13) Fukuchi, M. and K. Takegoshi (2008). "Combination of ¹³C-¹³C COSY and DARR (COCODARR) in solid-state NMR." Solid State Nucl. Magn. Reson. **34**: 151-153.
- 14) Fukuchi, M., et al. (2009). "Efficient Cross-Polarization Using a Composite 0° Pulse for NMR Studies on Static Solids." J. Magn. Reson. **196**: 105-109.
- 15) Kamihara, T., et al. (2014). "COMPOZER-based longitudinal cross-polarization via dipolar coupling under MAS." J. Magn. Reson. **245**: 94-97.
- 16) Takeda, K., et al. (2014). "Proton decoupling and recoupling under double-nutation irradiation in solid-state NMR." J. Chem. Phys. **141**: 224202-224201-224208.
- 17) Kamihara, T. and K. Takegoshi (2017). "Rotational resonance for a heteronuclear spin pair under magic-angle spinning in solid-state NMR." J. Chem. Phys. **146**: 154202-154201-154213.

HL-2

Tips to prevent aggregation and denaturation of proteins/peptides in solution NMR

Kaori Wakamatsu

Gunma University, Kiryu, Gunma, Japan.

Aggregation of proteins/peptides is one of the annoying problems in solution NMR studies. At higher temperature, in which better resolution and sensitivity are expected, proteins tend to aggregate more rapidly. In addition, titration experiments to determine the residues involved in the intermolecular interaction are often hindered by the formation of non-specific large aggregate particles, although each component may be stable and in a monomeric state in solution in the absence of the interacting partner. In this talk, I would like to share, with you, tips to prevent aggregation (and denaturation) of proteins, peptides, and their complexes.

There are many causes that lead to the aggregation of proteins under conditions specific to NMR. 1. Silicate in D₂O; long year ago, silicate was employed to precipitate proteins for concentration. 2. Surface of glass NMR tubes; silanol groups on very clean glass surface bind to peptide bonds. 3. Chemical shift reference compounds containing silicon atom such as DSS; DSS is reported to bind with peptides containing a high amyloidgenic A β ₁₋₄₀. These problems are prevented: 1. by passing D₂O through mixed-bed ion-exchange resin, 2. by passivating the glass surface with dichlorodimethylsilane followed by quenching with methanol, 3. by using dioxane or DMSO as the reference.

The (co-)aggregation of proteins and peptides containing the sequence with high amyloidgenic tendency may be prevented by using solvents of low ionic strength (to increase repulsive electrostatic interactions), by appending Gly residue, or by adding non-detergent sulfobetaines (NDSBs, Fig. 1), more specifically, choline-O-sulfate (COS) to the solvent.

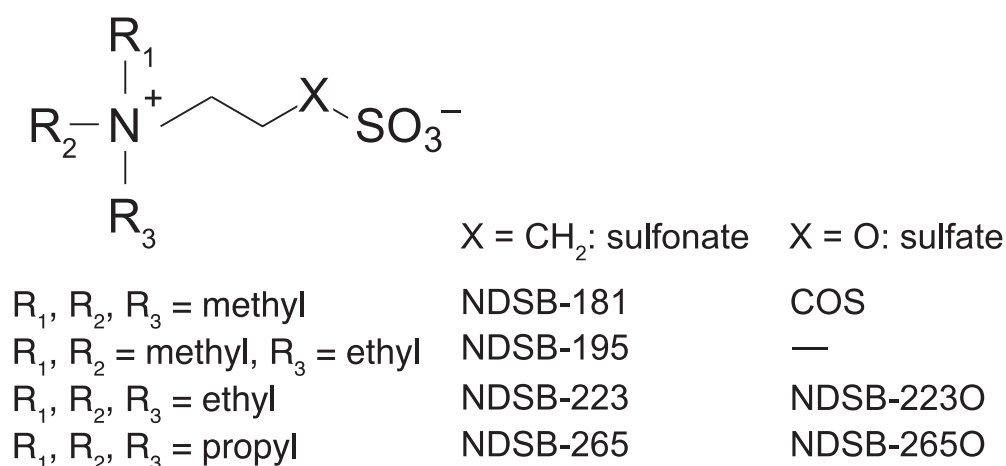


Fig. 1. Structure of NDSBs

The effect of NDSB-195 to facilitate the mild solubilization of proteins was reported by Vuillard et al. in 1995. His group later reported chemical synthesis of various NDSBs and their favorable effects: prevention of denaturation and aggregation of proteins, facilitation of protein refolding and crystallization. We synthesized other NDSBs in a somewhat systematic manner, containing ammonium groups of different sizes and a sulfate group rather than the original sulfonate group (Fig. 1), to compare their effects on denaturation, aggregation, and refolding of proteins. It should be kept in mind that denaturation and aggregation are different phenomena and different precautions are needed.

As for the prevention of denaturation of soluble proteins (hen egg white lysozyme, RNase A, and cytochrome c), the strongest effect was observed for NDSB-181, which contains the smallest ammonium group and a sulfonate group. Its stabilizing effect is stronger than that of the most effective natural compatible osmolyte, trimethylamine-N-oxide (TMAO). On the other hand, m2 muscarinic acetylcholine receptor (m2R), one of GPCRs was best stabilized by NDSB-2650, which contains largest ammonium group and a sulfate group both in the non-solubilized (membranous) and the detergent-solubilized states. NDSBs with smaller ammonium group and a sulfonate group, such as NDSB-195, stabilized m2R, but their effects are weaker than NDSB-2650. In contrast to soluble proteins, not all GPCRs were stabilized by NDSBs or osmolytes: Mu opioid receptor was stabilized by NDSBs like m2R, but β_2 -ADR and bacteriorhodopsin were destabilized by any of NDSBs and by osmolytes. The reason for these differential effects on membrane proteins is elusive at present.

As for the prevention of aggregation of soluble proteins, the strongest effect was observed for NDSB-2650 but this compound has a strong denaturing effect on soluble proteins. I would like to recommend NDSB-181 and -195 for the prevention of aggregation of proteins (not peptides), because these compounds exhibit both anti-aggregation and anti-denaturation effects.

The strong effect of COS to prevent aggregation of proteins and peptides containing the sequence with a high amyloidogenic tendency may well be ascribed to the large negative charge of a sulfate group compared with a sulfonate group. This large negative charge will promote the association of COS to peptide bonds, preventing the amyloid-like association of peptide segments. The addition of COS enabled the successful titration analysis of the binding of a spinophilin fragment and an α_{2A} -ADR fragment, the latter containing an amyloidogenic sequence.

One may suspect that the addition of NDSBs have adverse effects on NMR measurements and the interaction of biomolecules. However, properly purified NDSBs do not affect pulse widths because they do not affect the ionic strength of the solution. Their specific viscosity is much smaller than that of glycerol. The apparent dissociation constant (K_d) of the interaction of NDSB-195 with acidic fibroblast growth factor ranged from 0.04 to 3 M; sufficiently strong interactions (with $K_d < 1$ mM) will not be affected by NDSBs. In fact, the activation of $G\alpha_{i1}$ by m2-R was not affected by NDSBs. Noises originating from strong proton resonances of NDSBs can be eliminated by deuterating NDSBs; at least deuterated COS is commercially available. In addition, deuterated COS can be easily recycled after experiments.

第3日目
11月10日（木）
日本語セッション

Day 3
Thursday, 10th Nov.
Japanese Sessions

L4-1

Gタンパク質共役型受容体 β_2 ARのリガンド依存的活性化機構

○今井駿輔¹, 横溝智貴^{1,2}, 幸福裕², 白石勇太郎¹, 上田卓見², 嶋田一夫¹

1 理化学研究所・生命機能科学研究センター

2 東京大学大学院薬学系研究科

Structural equilibrium underlying ligand-dependent activation of β_2 -adrenoreceptor

○Shunsuke Imai¹, Tomoki Yokomizo^{1,2}, Yutaka Kofuku¹, Yutaro Shiarashi¹, Takumi Ueda², Ichio Shimada¹

¹ RIKEN BDR

² Department of Pharmaceutical Science, The University of Tokyo

G-protein-coupled receptors (GPCRs) are seven-transmembrane proteins mediating cellular signals in response to extracellular stimuli. Although three-dimensional structures showcase snapshots that can be sampled in the process and nuclear magnetic resonance detects conformational equilibria, the mechanism by which agonist-activated GPCRs interact with various effectors remains elusive. Here, we used paramagnetic nuclear magnetic resonance for leucine amide resonances to visualize the structure of β_2 -adrenoreceptor in the full agonist-bound state, without thermostabilizing mutations abolishing its activity. The structure exhibited a unique orientation of the intracellular half of the transmembrane helix 6, forming a cluster of G-protein-interacting residues. These results provide a structural basis for the dynamic activation of GPCRs and shed light on GPCR-mediated signal transduction.

Gタンパク質共役型受容体 (GPCR) は7回膜貫通型の膜タンパク質であり、細胞外側への作動薬の結合によって活性化すると、細胞内側でGタンパク質やアレスチンといった種々のエフェクターと相互作用することによって、細胞内にシグナルを伝達する。これまでの溶液NMR解析から、GPCRの活性を理解するためには、時間軸の要素を考慮した構造 (動的構造) の観点が必須であることが示されている[1]。一方、これまでにX線結晶構造解析やクライオ電子顕微鏡解析によって解かれたさまざまなGPCRの立体構造は、活性を失わせるような熱安定性変異の導入や細胞内側への抗体やGタンパク質の結合によってGPCRが安定化された条件でのみ解析されている。このため、種々のエフェクターと相互作用する、作動薬結合状態で活性化したGPCRの構造は、GPCRの機能にとって本質的に重要な状態であるにも関わらず、未だ完全には理解できていない。そこで本研究では、作動薬が結合して活性化した状態のGPCRが多数のエフェクターと相互作用できる機構を明らかとすることを目的として、作動薬結合状態GPCRの溶液NMR解析を行った[2]。

まず、GPCRの一種 β_2 アドレナリン受容体 (β_2 AR)のLeuの主鎖アミド基を、 α 位と β 位を重水素化した[2,3,3-²H,¹⁵N]-Leuを用いて選択的に¹⁵N安定同位体標識し、その¹H-¹⁵N TROSYスペクトルを測定した。その結果、計28残基のLeuに対して、活性を阻害する逆作動薬結合状態では23個の、活性を賦活する作動薬結合状態では19個のシグナルが、それぞれ観測された。これら全てのシグナルを変異体解析により帰属し、常磁性緩和促進 (PRE) 効果による構造解析に用いた。細胞内側のH8ヘリックス上のI334をCysに置換したI334C変異体を調製し、スピンラベル試薬MTSLによって部位選択的に修飾した。導入したスピンラベルからの距離を反映する、常磁性効果による横緩和速度

膜タンパク質、Gタンパク質共役型受容体、常磁性緩和促進効果

○いまいしゅんすけ, よこみぞともき, こうふくゆたか, しらいしゅうたろう, うえだたくみ, しまだいちお

の増分 Γ_2 を算出した結果、逆作動薬結合状態においては対応する結晶構造から逆計算した値とQ-factor 0.15と一致したのに対し、作動薬結合状態では、作動薬とGタンパク質が結合した β_2 ARの結晶構造から逆計算した値とはQ-factor 0.46と一致しなかった。この結果は、作動薬結合状態の β_2 ARの構造が、既存の立体構造では説明できないことを示している。そこで、I334に加えて β_2 ARの細胞内側に存在するA59, T136, N148, L266をそれぞれCysに置換した計5種類の変異体を調製し、そのMTSL修飾体に観測されるPRE効果を、作動薬結合状態において観測した。得られた計86個の Γ_2 値を距離

拘束条件として、GPCR構造間で変化の大きい膜貫通ヘリックス(TM)6を可動域としたsimulated annealing構造計算を行ったところ、Q-factor 0.23と実験値を満たす構造が得られた(**Fig. A**)。得られた構造において、TM6はその細胞内側が90度回転し、TM3,5,7と接するという、既知のGPCR構造にはない特徴を有していた。この回転によってTM6上のGタンパク質結合残基がTM3,5上のGタンパク質結合残基とクラスターを形成することから、これが作動薬が結合した状態のGPCRがGタンパク質と結合できる要因であることが示された(**Fig. B**)。合わせて、作動薬結合状態において化学交換によって広幅化するLeu残基は、膜貫通領域のエフェクター結合部位を含む領域に存在することから、作動薬結合状態においてこの領域に顕著な運動性や構造多型が存在することも明らかとなった。9箇所の熱安定性への変異の導入により活性を失った β_2 ARでは作動薬結合状態においても残基数に対応するシグナルが観測されたことから、この領域の運動性は、GPCRが種々のエフェクターと結合し活性化する機能に直結するものであることが示された。このような機能上重要な動的性質が、その構造をX線回折法やクライオ電子顕微鏡にて決定することが困難な要因である可能性がある。これに対し本研究では、生理的条件にあるタンパク質をそのままの状態を観測できる溶液NMR法によって、これまで不明であった作動薬結合状態のGPCRの構造を、その機能に相関した運動性を抑制せずに可視化することができた。

References

- [1] Shimada I, Ueda T, Kofuku Y, Eddy MT, Wüthrich K, *Nat Rev Drug Discov* (2019) 18:59
- [2] Imai S, Yokomizo T, Kofuku Y, Shiraishi Y, Ueda T, and Shimada I., *Nat Chem Biol* (2020) 16:430

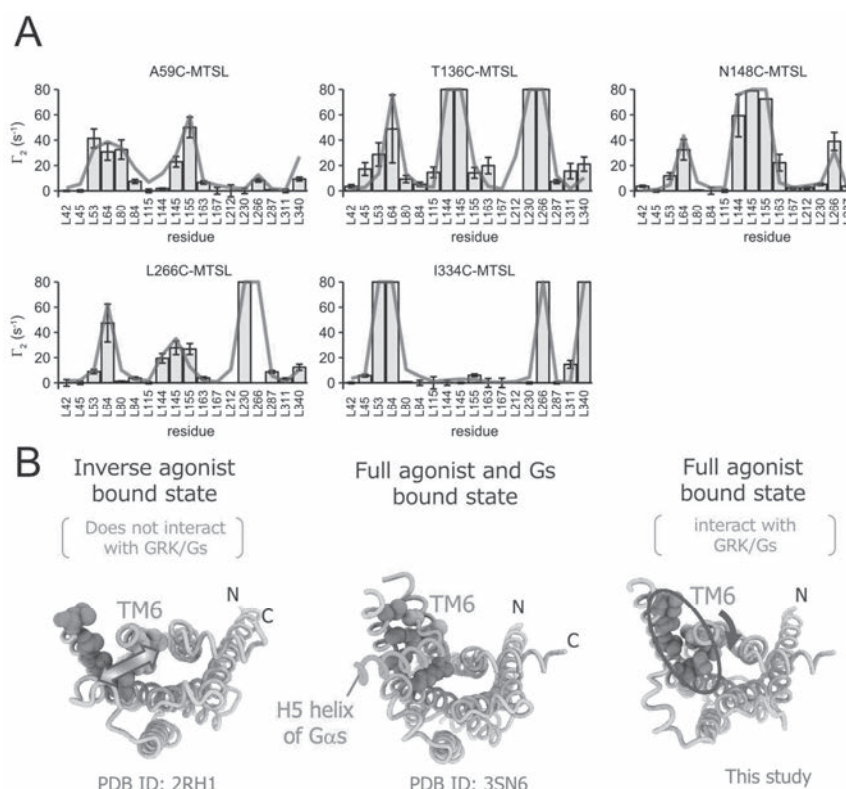


Fig. A: PRE analyses of β_2 AR in the full agonist-bound state. Bar and line graphs represent the experimental and back-calculated Γ_2 values, respectively. **B: Intracellular views of the β_2 AR structures.** Spheres represent the residues that interact with the G proteins.

L4-2

ヒト細胞を用いたin-cell NMR: タンパク質の立体構造および運動性の解析

○古板恭子¹, 児玉高志^{1,2,3}, 杉木俊彦¹, 赤木謙一², 物部容子², 榎園能章³, 門田典子⁴, 中村光咲⁴, 服部良一¹, 猪俣晃介^{5,6}, 白川昌宏⁵, 枋尾豪人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 医薬基盤・健康・栄養研究所
- 3 京都大学・理学研究科
- 4 横浜国立大学・大学院工学研究院
- 5 京都大学・工学研究科
- 6 理化学研究所・生命システム研究センター

In-cell NMR study using human cells: Analysis of protein three-dimensional structure and dynamics

○Kyoko Furuita¹, Takashi S. Kodama^{1,2,3}, Toshihiko Sugiki¹, Ken-ichi Akagi², Yoko Monobe², Yoshiaki Enokizono³, Noriko Monden⁴, Misaki Nakamura⁴, Yoshikazu Hattori¹, Kohsuke Inomata^{5,6}, Masahiro Shirakawa⁵, Hidehito Tochio³, Toshimichi Fujiwara¹ & Chojiro Kojima^{1,4}

¹ *Institute for Protein Research, Osaka University*

² *National Institute of Biomedical Innovation, Health and Nutrition*

³ *Department of Biophysics, Graduate School of Science, Kyoto University*

⁴ *Graduate School of Engineering Science, Yokohama National University*

⁵ *Department of Molecular Engineering, Graduate School of Engineering, Kyoto University*

⁶ *RIKEN Quantitative Biology Center*

In-cell NMR techniques enable us to analyze the structure and dynamics of proteins in living cells. However, when human cells are used, such analysis has been difficult because of the difficulty in obtaining high-quality NMR spectra. In this study, we have developed a highly efficient protein electroporation method, which dramatically increases NMR signal intensity of the proteins introduced in human cells. Using this method, ¹H-¹⁵N SOFAST-HMQC spectra of proteins in HeLa S3 cells were obtained in 1 min. Moreover, the three-dimensional structures of a model protein, the B1 domain of the *streptococcal* immunoglobulin G (GB1) in HeLa S3 cells were successfully determined, and its longitudinal and transverse relaxation times were successfully obtained. The structure of GB1 in HeLa S3 cells was basically the same as in buffer, but the ¹⁵N relaxation times were quite different.

【はじめに】 In-cell NMR 法を用いると、生きた細胞内のタンパク質の構造や運動性を直接解析することができる(1)。しかしヒト細胞内ではこれまで高品質のNMR スペクトルを得ることが難しく、こうした解析は困難であった。本研究で我々はヒト細胞内のNMR スペクトルの信号強度を劇的に増加させる高効率のエレクトロポレーション法を開発した。その結果、HeLa 細胞 In-cell NMR, 立体構造, 運動性

○ふるいたきょうこ, こだまたかし, すぎきとしひこ, あかぎけんいち, ものべようこ, えのきぞのよしあき, もんでんのりこ, なかむらみさき, はっとりよしかず, いのまたこうすけ, しらかわまさひろ, とちおひでひと, ふじわらとしみち, こじまちょうじろう

に導入したタンパク質の ^1H - ^{15}N SOFAST-HMQC スペクトルが1分で得られるようになった。また、モデルタンパク質GB1 のヒト細胞内立体構造決定および緩和パラメータの取得に成功した。

【材料と方法】 In-cell NMR 試料の作成のため、前処理したHeLa S3 細胞を高濃度の ^{15}N -標識あるいは ^{13}C , ^{15}N -標識GB1タンパク質溶液に懸濁し、NEPA21 (ネッパジーン株式会社) でエレクトロポレーションを行った。その後細胞を培地で洗浄し、遠心分離により回収した。回収した細胞はin-cell NMR バッファー (80% DMEM high glucose containing 10% FCS, 10% D $_2\text{O}$) で30% スラリーとなるように懸濁し、4 mm径のシゲミ試料管に充填した。

すべての測定はTXIクライオプローブを装備したAVANCE II 800 MHz NMR 装置を用い、310 K で行った。細胞内GB1 の化学シフトの帰属および構造決定のため、 ^1H - ^{15}N SOFAST-HMQC, 3D BEST-type HNC(3 時間), 3D BEST-type HN(CO)CA (8 時間), 3D BEST-type HNCA (7.5 時間), ^{13}C (aliphaticあるいはaromatic)-edited ^1H - ^1H NOESY (5.5 時間)および ^{15}N -edited ^1H - ^1H NOESY (5.5 時間)を測定した。 ^1H - ^1H NOESYは間に ^1H - ^{15}N SOFAST-HMQCを挟んで繰り返し測定し、直後の ^1H - ^{15}N SOFAST-HMQCスペクトルが初期と大きく変化していないものを足し合わせた。また、緩和解析のために ^{15}N R_1 , ^{15}N R_2 および ^1H - ^{15}N 異種核NOE の測定を行った。化学シフトの帰属およびピーク強度の測定にはNMRFAM-Sparky を用いた。構造計算にはCYANA 3.98.13 を用いた。

【結果】 HeLa S3 細胞内に導入したGB1について約2分で良好な ^1H - ^{15}N SOFAST-HMQCスペクトルを取得できた (Fig. 1)。また、一連のスペクトルを用いて化学シフトの帰属を行ったところ、98.2%, 98.2%, および 94.6%の ^{15}N , $^{13}\text{C}\alpha$ および $^{13}\text{C}'$, また、98.2% の $^1\text{H}^{\text{N}}$ および64.6%のその他の ^1H の帰属に成功した。決定した主鎖化学シフトからTALOS+プログラムにより得られた主鎖二面角と、各種 ^1H - ^1H NOESYスペクトルから得られた距離制限情報を用いて立体構造計算を行ったところ、主鎖RMSDが0.69 Åの精度で立体構造が決定された。決定した細胞内GB1の立体構造をPBS中で決定したin vitroのGB1の立体構造と比較したところ、基本的に同じであることが分かった (Fig. 2)。次に残基ごとの ^{15}N R_1 , ^{15}N R_2 および ^1H - ^{15}N 異種核NOEの値を決定し、PBS中の値と比較した。その結果、 ^{15}N R_1 およびNOEには目立った違いがなかったが、細胞内ではPBS中と比べて ^{15}N R_2 の値が顕著に大きいことが分かった。発表では構造決定法、決定した細胞内立体構造および細胞内緩和パラメータの詳細について考察とともに報告する。

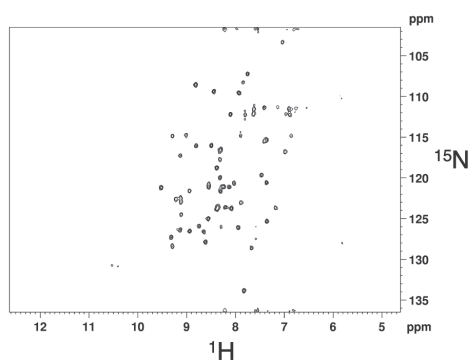


Fig. 1. The ^1H - ^{15}N SOFAST-HMQC spectrum of GB1 in living HeLa S3 cells measured in 2 min.

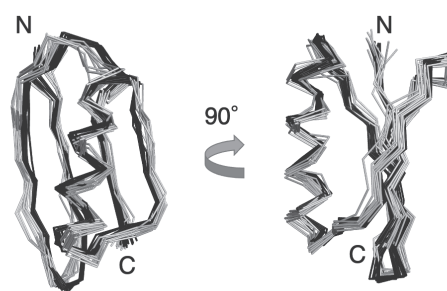


Fig. 2. Superimposed view of the 10 lowest-energy structures of the GB1 in living HeLa S3 cells (gray) and those in PBS buffer (black).

References

- (1) Theillet, F. X. In-Cell Structural Biology by NMR: The Benefits of the Atomic Scale. *Chem. Rev.* **122**, 9497–9570 (2022).

L4-3

高圧力NMR法による大腸菌ジスルフィド結合形成酵素DsbAの還元状態非依存的な構造揺らぎの発見

○北原亮^{1,2}, 山本純也², 北沢創一郎¹, 宮ノ入洋平³, ビスワ モハンディー⁴, マーチン スカンロン⁵

1立命館大学・薬学部

2立命館大学大学院・薬学研究科

3大阪大学・蛋白質研究所

4シドニー大学 分析研究所

5モナッシュ大学 薬学研究科

High-pressure NMR reveals redox-independent conformational fluctuation near the active site of *Escherichia coli* DsbA

○Ryo Kitahara^{1,2}, Junya Yamamoto², Soichiro Kitazawa¹, Yohei Miyanoiri³, Biswaranjan Mohanty⁴, and Martin Scanlon⁵

¹College of Pharmaceutical Sciences, Ritsumeikan University, 1-1-1 Nojihigashi, Kusatsu 525-8577, Japan

²Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Ritsumeikan University, 1-1-1 Nojihigashi, Kusatsu 525-8577, Japan

³Institute for Protein Research, Osaka University, 3-2 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

⁴Sydney Analytical Core Research Facility, The University of Sydney, Sydney, New South Wales 2006, Australia

⁵Monash Institute of Pharmaceutical Sciences, Monash University, 381 Royal Parade, Parkville, 3052, Victoria, Australia

EcDsbA, is a disulfide-bond oxidoreductase enzyme, which is localized in the periplasmic space of *Escherichia coli* and is essential for bacterial virulence. Gram-negative bacteria lacking a functional DsbA enzyme have been shown to be avirulent in mouse infection models (Heras, B. et al. Nat. Rev. Microbiol. 7, 215-225, 2009; Landeta, C. et al. Nat. Microbiol. 3, 270-280, 2018). Therefore, *EcDsbA* is target in the development of antivirulence drugs. DsbA catalyzes the formation of disulfide bonds in substrate proteins via a CXXC motif at its active site, that cycles between oxidized (disulfide), reduced (di-thiol), and substrate-bound forms. Here, using high-pressure NMR spectroscopy, we report the pressure dependent conformational fluctuations of oxidized and reduced *EcDsbA*, and *EcDsbA* in a complex with a small molecule that binds in an internal cavity near its active site. In the oxidized and reduced DsbA, non-linear responses of ¹H^N and ¹⁵N chemical shifts associated with pressurization were observed to a similar extent at similar sites, including the active site. The non-linear response may be explained by the change in conformational equilibrium with pressurization. Since this non-linear response was significantly attenuated for the complex, we hypothesize that the internal cavity plays a role in the pressure-dependent conformational change that is observed for *EcDsbA*. These findings may contribute to our understanding of the importance

DsbA, 圧力, キャビティー

○きたはらりょう, やまもとじゅんや, きたざわそういちろう, びすわもはんていー, まーていんすかんろん

of this internal cavity in the mechanism of DsbA, and thereby help to guide the future development of more potent small molecule inhibitors of EcDsbA.

大腸菌のペリプラズム空間に存在するDsbAはチオレドキシソフォールドを有するジスルフィド結合導入酵素であり (Fig. 1), 活性部位のCXXCモチーフが酸化型, 還元型, 基質結合型と構造変化する. DsbAの欠損, 失活はバクテリアに毒性をもたらすことから, 抗菌薬開発における重要なターゲットである¹⁻³.

我々は, 酸化型, 還元型DsbAに加え, 阻害薬候補化合物との複合体DsbAについて, 高圧力NMR法を用いて2500気圧までの範囲で立体構造の圧力応答について研究を行った. 酸化型と還元型では, 加圧に伴う¹Hと¹⁵N化学シフトの非線形応答が活性部位を含む同様な部位で同程度に観測された (Fig. 2). また, 加圧と共に酸化型と還元型の化学シフト値が近くなった. 一般に静水圧に対する線形応答は最安定状態内での力学的圧縮に対応し, 非線形応答はコンフォメーション平衡の変化で説明できる. つまり, 化学シフトの圧力応答の結果から, 酸化型と還元型で同様なコンフォメーションへ転移したと考えられる. また活性部位の分子内空洞 (キャビティー) に阻害剤が結合することで, 非線形応答は顕著に減弱することから, キャビティーが活性部位の構造転移を可能にしていると言える.

類鼻疽菌では, 酸化型DsbAにのみ活性部位で高い¹H-*R*₂緩和分散が観測されることから, 還元状態依存的な機能的ダイナミクスと考えられてきた⁴. しかし, 大腸菌DsbAではどちらの状態でも同様な圧力応答が観測され, 阻害剤の結合で応答が減弱することから, 活性部位周辺の運動は還元状態に非依存的で, キャビティーを源としたダイナミクスとわかった.

References

- (1) Heras, B. et al. (2009) DSB proteins and bacterial pathogenicity. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 215-225.
- (2) Landeta, C. et al. (2018) Disulfide bond formation in prokaryotes. *Nat. Microbiol.* 3, 270-280.
- (3) Adams L. A. et al. (2015) Application of Fragment-Based Screening to the Design of Inhibitors of *Escherichia coli* DsbA. *Angew. Chem. Int. Ed.* 54, 2179-2184.
- (4) Nebl, S. et al. (2020) NMR fragment screening reveals a novel small molecule binding site near the catalytic surface of the disulfide–dithiol oxidoreductase enzyme DsbA from *Burkholderia pseudomallei*. *J. Biol. NMR* 74, 595-611.

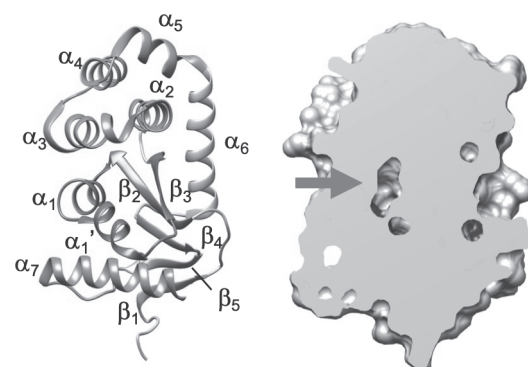


Fig. 1. Architecture of *E. coli* DsbA structure (oxidized form) (PDB ID: 1FVK) represented by a ribbon(left) and a surface model (right). An internal cavity near the active site is indicated by an arrow.

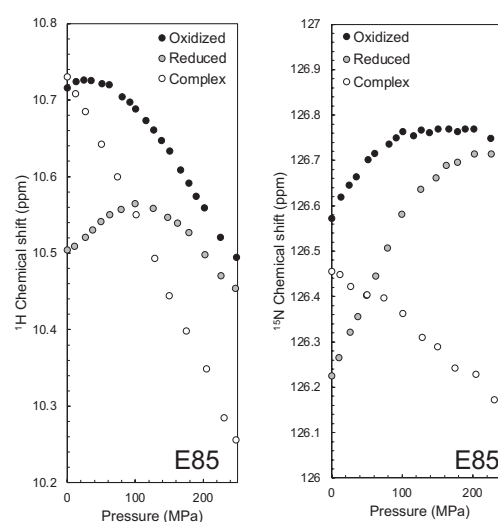


Fig. 2. Pressure-induced changes in ¹H and ¹⁵N chemical shifts of E85 of *E. coli* DsbA.

L5-1

NMR Spectra Recognition with Neural Networks and Deep Learning

○山内一夫¹, 宋子豪², 甘莉², 蔣佳稀², 胡知彦², 大西裕季², 熊木康裕², 相沢智康²

¹沖縄科学技術大学院大学・機器分析セクション

²北海道大学・大学院先端生命科学研究院

NMR Spectra Recognition with Neural Networks and Deep Learning

○Kazuo Yamauchi¹, Zihao Song², Li Gan², Jiayi Jiang², Zhiyan Hu², Yuki Ohnishi², Yasuhiro Kumaki², Tomoyasu Aizawa²

¹Instrumental Analysis Section, Okinawa Institute of Science and Technology

²Faculty of advanced life science, Hokkaido university

The demand of simple and accurate chemical/biological analysis using analytical instruments by non-experts is increasing. One of the typical examples is COVID-19 test by PCR by medical professionals. In such analytical works, it is important to build a system that does not depend on the abilities of a person involved in all aspects of "sample preparation", "measurement," and "data analysis" to have reliable results (Figure 1).

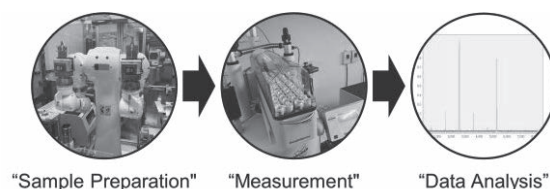


Figure 1: Basic Components ("sample Preparation", "Measurement," and "Data Analysis") of Instrumental Analysis Work.

NMR as an analytical technique is no exception. The "sample preparation" for NMR is an inherently relatively simple step, while other analytical methods often require chemical pre-treatment, modification, or separation. NMR sample can basically be dissolved in a solvent, or measured as it is, which is a great advantage of NMR. As for "measurement", it is possible to measure many samples in a short time with the same condition, thanks to the continuous efforts of instrument manufacturers to develop and sale new models.

The most classical method of NMR "data analysis" is to assign each peak, to identify the functional group, and finally to identify the compound from the functional groups, which are all based on the researcher's knowledge. Basically, this assignment procedure is the same for very small compounds to large proteins. However, this method is not very independent. It is highly dependent on a person who works on the analysis, there will be an immense difference of "data analysis" for the NMR professional and non-professional in this classical "data analysis" method. Alternatively, there are also other methods of "data analysis" besides this type of classical assignment method. For example, there is a method using a database, but NMR spectra analysis is still under development compared to other spectroscopy methods (e.g., Mass Spectrometry). Another method is using principal component analysis (PCA) in metabolomics NMR for the analysis of NMR data, but it is limited and is not yet a universal method for analyzing all NMR spectra.

In this study, we are trying a different approach to NMR "data analysis" using machine learning to recognize spectra. Machine learning has been widely used and utilized in many fields in recent years, include recognition of handwritten characters, structure prediction of synthetic compounds in chemistry, structure

Machine Learning, solid state NMR spectra, metabolomics NMR spectra

○やまうちかずお, そんずはお, かんり, しょうかき, こしげん, おおにしゅうき, くまきやすひろ, あいざわともやす

prediction from MS spectra in analytical chemistry, or metabolomics prediction in NMR. We use the same approach as handwriting recognition to classify NMR spectra using neural networks of machine learning.

^{13}C solid state NMR FID data for adamantane (175), glycine (151), and alanine (69) were used as a library for this study. These data were measured under various experimental conditions (Table 1). All FID data were Fourier transformed on Topspin4.0.9 with 8k real data points (SI=8k) to obtain a spectrum with only approximate phase correction. A total of 8k intensity points were obtained for each spectrum, and one spectrum was treated as an 8k-dimensional vector. These data were used to construct and validate a neural network. Computation was performed using core-i5 3210M, 16GB RAM windows 10 PRO laptop computer. Data analysis platform/software was KNIME, with Python (anaconda) in the background, and the neural network library, Keras, was used.

To build the neural networks, number of nodes in the input layer is 8K, which is equal to SI, and the number of nodes in the output layer is 2 which is adamantane and glycine used for “Adamantane or Glycine recognition” (adam-gly case). Addition to this, 3 hidden layers with 128 nodes for each hidden layer are used as the first trial (Figure 2). Totally random library data were used to build a neural network with random selection of 70% (223) as trainer and 3% (14) as parity. The remaining 27% (89) were used as testing. “Adamantane or Glycine or Alanine recognition” (adam-gly-ala case) were also performed using the same manner.

As the summary of testing results, 85 out of 89 data gave right answer in the adam-gly case and 97 out of 108 data were correct in the adam-gly-ala case, and the accuracy was 96% and 90%, respectively. Cohen's kappa, which is used to evaluate the agreement of machine learning, was 0.908 and 0.836, respectively. Furthermore, the accuracy by changing the number of layers in the hidden layer, the number of nodes in the hidden layer, and the number (percentage) of trainer data for the optimization of this neural network. To reduce the computational cost and to avoid over-learning, 3 hidden layer, 32 nodes in the hidden layer, and 70% trainer data (that is, as many as possible) was found to be appropriate "with this adam-gly case".

This work showed an example of using the recognition of the NMR spectrum itself as a method of data analysis and we found that NMR data is an "affordable" data size and easy to handle, from a machine learning perspective, and it can achieve over 90% recognition rate even this easy trial. This example is for very simple NMR spectra of pure chemicals, but this method, spectrum recognition using machine learning, will not limit only this case. In the presentation, we will also show an example of actual samples.

As the next step, it is necessary to optimize machine learning so that more accurate recognition of NMR data. In addition, the only major challenge is that it needs many NMR data even lower sensitivity than other analytical methods, so it may require to develop the new measurement method and the hardware for it.

Table 1 : NMR Data Library for Neural Network Work

Number of NMR Data	395 sample data (adamantane;175, glycine;151, alanine;69)
NMR Experiment Condition	
Instrument:	300MHz, 400MHz, 500MHz, 600MHz, 800MHz, 900MHz
Sample Volume (rotor diameter):	1mm, 1.3mm, 2.5mm, 3.2mm, 4mm, 7mm
Spinning Speed:	0Hz to 60kHz
Method:	solid state ^{13}C spectra (CPMAS, DDMAS, etc.)
Spectra Width:	varied (roughly and typically 300ppm to -50ppm)
Number of Scans:	varied

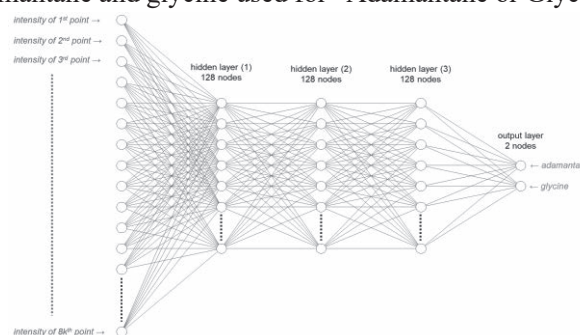


Figure 2: Schematic Illustration of Neural Network Architecture. (8K input layer nodes, 3 hidden layers with 128 nodes for each hidden layers, two output layers are shown as the example)

L5-2

MOF配位子の回転と関連したCO₂の吸着ダイナミクス

○栗原 拓也¹、犬飼 宗弘²、水野 元博^{3,4}

1金沢大学理工研究域

2徳島大学大学院社会産業理工学研究部

3金沢大学ナノマテリアル研究所

4金沢大学新学術創成研究機構

Dynamics of adsorbed CO₂ related to rotational motion of ligands in a metal–organic framework

○Takuya Kurihara¹, Munehiro Inukai², Motohiro Mizuno^{3,4}

¹ Graduate School of Natural Science and Technology, Kanazawa University

² Graduate School of Technology, Industrial and Social Science, Tokushima University

³ Nanomaterials Research Institute, Kanazawa University

⁴ Institute for Frontier Science Initiative, Kanazawa University

Metal–organic frameworks (MOFs) are promising porous materials for CO₂ capture and separation. Investigation of the adsorption and diffusion dynamics of CO₂ in MOFs is essential for understanding the CO₂ capture mechanism and improving the separation performance. In this work, by conducting solid-state NMR under 0–1 MPa CO₂ atmosphere, we show that CO₂ adsorption and diffusion are affected by the variable steric hindrance of rotative ligands in the narrow pores of a MOF. ¹³C CSA pattern and ²H quadrupolar line shape analyses revealed that adsorbed CO₂ hinders the ligand rotation. ¹³C exchange NMR observed very slow CO₂ diffusion related to the mobility of the ligands.

Introduction

金属–有機構造体 (MOF) および多孔性配位高分子 (PCP) は細孔を有する金属錯体であり、CO₂をはじめとした温室効果ガスの分離などへの応用が期待されている。骨格を形成する金属イオンと配位子の組み合わせにより多彩な構造が設計可能であり、これまでに数多くの構造が合成され、またそのガス吸着のメカニズムが研究されてきた。MOF細孔中では、配位子のフェニル基等がしばしば回転運動をすることが知られている。こうした運動は細孔の形状を変化させるため、ガス分子の吸着・拡散ダイナミクスに影響を与え、したがってMOFのガス分離能に関わる可能性がある。しかしながら、ゲスト吸着が配位子の運動性に影響する様子は観測されているものの、配位子の回転がゲスト分子のダイナミクスに影響を与えるかどうかは、これまでに明らかにされていなかった。本研究では、cavity部位とそれらを連結するwindow部位から成る1次元細孔を持つMOFであるCID-Me ([Zn(5-methylisophthalate)(4,4'-bipyridyl)]_n; Fig. 1) に注目し、window部に位置する配位子bpyの回転運動と細孔中に取り込まれたCO₂の吸着・拡散ダイナミクスの相関を、ガス雰囲気下における固体NMR測定により検討した。¹³Cおよび²H NMRによる運動性の解析から、CO₂吸着に伴う配位子の運動性の低下により、CO₂の拡散速度の低下が生じることを明らかにした。^[1]

Materials and Methods

CID-Meは既報^[2]に従い合成した。²H測定用に重水素化したbpyを用いた試料も作製した。固体金属–有機構造体、ガス吸着ダイナミクス、ローター配位子

○くりはらたくや、いぬかいむねひろ、みずのもとひろ

NMR測定は7 Tの磁場において、JEOL 4 mm HX MASプローブを使用して行った。ガス雰囲気下における測定のため、我々が以前開発した高圧ガス下MAS測定システム^[3]をベースに、JEOL 4 mm 試料管と同形のジルコニア製気密MAS試料管、および専用のガス封入用配管を作製し用いた。試料管中のCO₂圧力は0–1 MPaとし、¹³C測定時には¹³C濃縮CO₂ガス (¹³C 99%) を使用した。

Results and Discussion

CID-Me中に吸着したCO₂の¹³C MASスペクトルをFig. 2aに示す。測定した圧力0.03–1 MPa (各cavityにCO₂が1-2個吸着に相当) 全てにおいて、化学シフト異方性 (CSA) に由来するサイドバンドパターンが観測され、吸着によりCO₂の運動性が制限されていることが読み取れる。CO₂が細孔中でwobbling運動をしていると仮定し、サイドバンドパターンのフィッティングから得た見かけのCSA値よりwobbling角の平均値を求めたところ、吸着量の増加に伴い角度が32°から24°へと減少した。cavity内のCO₂の数が増えることで立体障害を受け、運動が制限されたと考えられる。この吸着したCO₂による立体障害は、window部の配位子bpyの回転運動にも影響し得ると考え、続いて0–1 MPaのCO₂圧力下で²H測定を行いbpyの運動状態を解析した。bpyは4-siteフリップ運動をしており、0および0.03 MPa (cavity内のCO₂が0および1個) ではその速度は10⁶ Hzであった。圧力が増加すると速度のオーダーが減少し、1 MPa (cavity内のCO₂が2個) では10² Hzまで低下した。吸着したCO₂がbpyの回転運動にも影響を与えていることを示唆している。

細孔のwindow部はbpyの回転運動に伴い2.5–3.4 Åの範囲で変化し、CO₂分子の大きさが3.3 Å程度であることから、bpyの運動やその速度の変化はCO₂の細孔内拡散に影響を与えると予想される。そこで、¹³C交換NMRによるCID結晶内の吸着CO₂とCID結晶外のCO₂ガスの交換速度から、拡散速度を検討した。非常に長いタイムスケールの交換であったため、0.03および1 MPaで¹³CO₂を吸着させたCID-Meを同圧力の非同位体濃縮CO₂ガス下に一定時間晒し、交換によって減少する¹³CO₂の信号強度の時間変化を解析するという方法を用いた。得られた¹³C信号の強度変化に対してexp曲線でフィッティングを行い(Fig. 2b)、0.03 MPaでは3.5×10⁻⁴ Hz、1 MPaでは7.0×10⁻⁵ Hzという交換速度を得た。実験に用いた試料の結晶サイズから、拡散係数は10⁻¹⁴ m²/s前後と計算された。これは一般的なMOF中のCO₂の拡散係数10⁻⁸–10⁻¹⁰ m²/sと比較して非常に遅いと言え、bpyの回転による細孔径変化がCO₂の拡散に影響を与えていることを示唆している。bpyの回転速度が大きく低下する1 MPaにて交換速度も低下したことも、bpyの回転とCO₂の拡散がある程度協同的に起きていることを示している。

今回の結果は配位子の立体障害の効果が大きく現れる狭い細孔のMOFで得られたものだが、より大きな細孔のMOFでもガス吸着量の増える高圧下では、同様の現象によりガス分子の拡散が阻害され分離能低下につながる恐れがある。また逆に、配位子の回転を利用してガス分子の拡散速度を制御できる可能性を示す結果が得られたと考えられる。

[1] T. Kurihara et al., *J. Phys. Chem. Lett.* 2022, 13, 7023.

[2] M. Inukai et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* 2018, 57, 8687.

[3] M. Inukai et al., *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2020, 22, 14465.

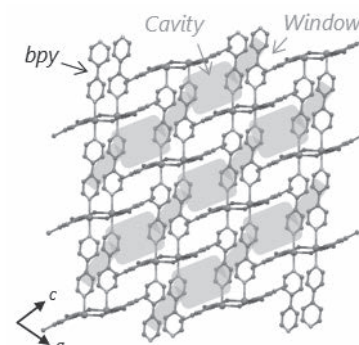


Fig. 1 Crystal structure of CID-Me.

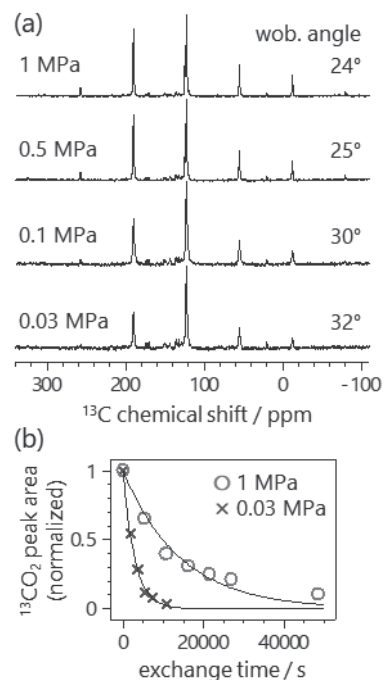


Fig. 2 (a) ¹³C MAS spectra of CID-Me under ¹³CO₂. (b) Results of ¹³CO₂ exchange experiments.

L5-3

常磁性CeF₃のフッ化物イオン伝導の固体NMR解析

○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

Solid-state NMR studies on fluoride-ion conduction pathways in paramagnetic CeF₃

○Miwa Murakami¹, Atsushi Mineshige²

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

²Graduate School of Engineering, University of Hyogo

To unravel the ion conducting pathways among the three crystallographically inequivalent sites (F1, F2, and F3) in CeF₃, high-resolution MAS NMR spectra of ¹⁹F in CeF₃ at -40 ~ 240 °C are analyzed on the bases of the calculated dipolar coupling tensor between ¹⁹F and paramagnetic electron spins at Ce³⁺. Clearly resolved sideband manifolds for F1~F3 at 240 °C indicate that ion exchange among the three sites is not fast enough to affect the ¹⁹F spectrum, whereas F1 motion is suggested by its broader linewidth. Further, we show that addition of only 0.1 % Sr²⁺ in CeF₃ (Ce_{1-x}Sr_xF_{3-x} (x = 0.001)) brings significant effects on F-ion mobility. While the F2 and the F3 manifolds are not affected by Sr-doping at 0 °C, the F1 manifold is affected appreciably. Further a part of the F2 and most of the F3 manifolds are merged into the F1 signal at 240 °C. The preference of the exchange pathways in CeF₃ is thus consistent with that postulated for LaF₃, that is, F1-F1 exchange occurs first followed by F1-F3, and F1-F2 exchange is most restricted.

1. 目的

フッ化物イオン伝導体として知られるタイソナイト型CeF₃は、古くからNMRによるダイナミクス研究が行われているが、Ce³⁺の常磁性により¹⁹F-NMRスペクトルの解析は困難であるため、Fの運動性に関して複数の説が提唱されていた。本研究では、まず、磁場強度/試料回転速度/測定温度の適切な組合せを適用することにより、タイソナイト型構造中の3種類のFサイトF1(12g)、F2(4d)、F3(2a)の信号を分離観測し、次に、得られた線形を、不対電子-¹⁹F核間の双極子相互作用や化学シフトの異方性を取り入れた線形シミュレーションで詳細に解析することにより、各Fサイトの帰属を確立した。さらに少量Srをドーピングした試料について同様の解析を行うことにより、各Fサイト間の運動性の違いを評価した。

2. 実験

試料は原料をボールミリングにより粉砕・混合後、1000°Cで焼成して作製した。¹⁹F NMRはOpenCore NMR分光計 (4.7 T; ¹⁹Fの共鳴周波数は188.4 MHz) を用い、測定温度は-40~240 °C、試料回転速度は23および35 kHzで測定した。

3. 結果と考察

Fig.1にMAS 35 kHzで測定した0°Cの¹⁹F NMRスペクトルとシミュレーション結果を示す。CeF₃のNMR線形を決める最も大きな相互作用は3価のセリウムの常磁性電子と¹⁹F核の双極子相互作用であり¹⁻³、結晶構造を基に、とあるFイオンから5 nm以内のCe³⁺の不対電子を考慮して異方性を計算した。次に影響が大きいのは¹⁹Fの化学シフトの異方性であるが、これは計算の難易度が高いため、ここでは、実測のスペクトルと合うように補正值として入れた。¹⁹F-¹⁹Fの双極子相互作用は、高速MASにより充分低減できていると考えた。結晶構造中の組成比を用いたFig.1上のCeF₃の計算スベ

○むらかみみわ, みねしげあつし

クトルは実測をよく再現しており、F1~F3の帰属を確定できた。100°Cまでは、CSAが温度変化しないとして実測のスペクトルを再現することができたことから、100°C以下ではFの運動が遅く線形に影響しないことが分かった。Srを0.1%ドーピングした試料 (Fig.1下) では、F2とF3の線形には変化はなく、F2とF3の運動が無視できるほど遅いことが分かる。一方、F1は線形変化が観測され、運動によるものと考えた。Fig.2にMAS 23 kHz、240°Cで測定したCeF₃と $x = 0.001$ の試料のスペクトルとシミュレーション結果を示す。CeF₃では、F1信号の相対強度がサイトの比より小さくなっている。これはF1の運動によるスピンスピン緩和時間の減少で説明できる。 $x=0.001$ 試料では、F1同士の交換や異なるサイト間の交換によりF1の線形自体がCeF₃とは異なっている。また、F3の信号強度もF1との交換により小さくなっている。これらの線形解析から、まず、F1間の交換が起こり、温度上昇でF3が交換に参加し、最後にF2が参加するということが示された⁴。次に、フッ化物イオンの運動を詳細に検討するために、最も運動性が高いF1に着目して、F1のみが運動している0 °C (Fig.1下) で解析を進めた。F1の信号は極端に広幅化していることから、F1の運動の周波数が異方性の3~10倍になっていると推定した。そこで、交換速度は異方性の5倍と考えて、500kHzと推定した。さらに、一回の交換でF1が最近接距離だけ移動するとして、拡散係数を求めて、Nernst-Einstein式と実測の伝導度の値からキャリア、つまり、F1の濃度を求めたところ、単位胞辺り12個と実際のF1の濃度と良く一致する値を得た。従って、0 °Cでのイオン伝導はF1のみによることを示すことができた。

References

- (1) A. Nayeem and J.P. Yesinowski, *J. Chem. Phys.* **89**, 4600 (1988).
- (2) F. Wang and C.P. Grey, *Chem. Mater.* **9**, 1068 (1997).
- (3) M. Murakami et al., *J. Magn. Reson.* **231**, 66 (2013).
- (4) M. Murakami and A. Mineshige, *J. Phys. Chem. Solids* **161**, 110432 (2022).

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) の委託事業RISING2 (JPNP16001) およびRISING3 (JPNP21006) の結果得られたものです。4.7 Tの磁場の利用は、京都大学理学部の竹腰清乃理先生にご協力いただきました。

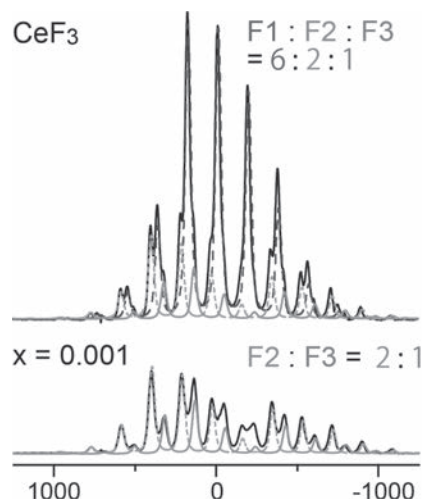


Fig. 1. ¹⁹F MAS NMR spectra of CeF₃ and Ce_{1-x}Sr_xF_{3-x} ($x = 0.001$) observed at 0 °C (the black line). The individual calculated spectra are also shown for F1 (blue long-dashed), F2 (green short-dashed), and F3 (orange).

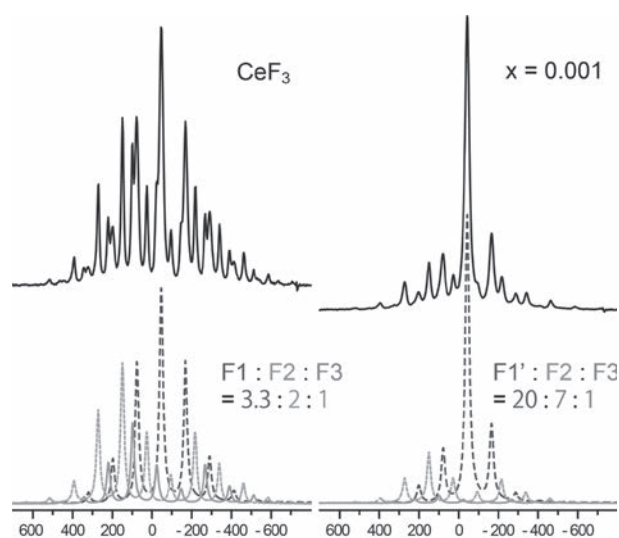


Fig. 2. Same as Fig.1 except for temperature (240 °C).

L5-4

固体NMRによる有機EL発光材料の定量的非晶構造解析

○梶 弘典、鈴木 克明
京都大学・化学研究所

Quantitative amorphous structure analysis of organic light-emitting materials by solid-state NMR

○Hironori Kaji, Katsuaki Suzuki

Institute for Chemical Research, Kyoto University

In recent years, thermally activated delayed fluorescence (TADF) materials have attracted significant attention as a new type of emitter in organic light-emitting diodes (OLEDs). This is because TADF can convert originally dark triplet excitons into light through reverse intersystem crossing (RISC). TADF molecules have donor-acceptor (D-A) structures to allow the RISC process, and the torsion angle between the D and A segments is extremely important for the TADF performance. However, the torsion angle between the D and A units has not been analyzed in detail because organic materials in OLEDs are in an amorphous state. Here, we analyzed the torsion angle of DACT-II, a representative of excellent TADF molecules, in the amorphous state by solid-state heteronuclear multiple-quantum correlation (HMQC) NMR experiment. The experimentally-obtained HMQC spectrum was well reproduced by a simulated one with widely distributed torsion angles.

現在、我々は「有機発光材料およびデバイスのハイスループット開発」[1,2]、「有機発光材料の精密量子化学計算」[3]、「電荷輸送マルチスケールシミュレーション」[4]、「有機ELのNMR解析」[5-7]、の4つを柱として、有機ELに関する研究を進めている。今回、我々が設計した有機EL発光材料であるDACT-II(図1) [1] に対し、固体NMRによる精密解析を行った。

【熱活性化遅延蛍光 (TADF)材料の設計と開発】 有機ELは電流注入により光を得るデバイスである。両電極からホールと電子が注入され、発光層においてそれらが再結合することにより励起子が生成する。この時、一重項励起子 (S_1) と三重項励起子 (T_1) が 25% : 75%の比率で生成するが、従来の蛍光材料を用いたデバイスでは、 T_1 は熱として失活してしまうため、全励起子のうち最大でも25%しか光に変換することができなかった。しかし、 S_1-T_1 間のエネルギー差 (ΔE_{ST}) を小さくすることにより、室温での熱エネルギーで T_1 から S_1 へのいわゆる逆項間交差 (RISC) が可能になると予想され、実際にその現象に基づく、TADFとよばれる発光材料が開発された[8]。図1のDACT-IIにより、電流励起による励起子を100%光に変換することが実験的にも示され[1]、現在、TADFに関する材料開発、基礎研究が世界中で活発になっている。

【固体HMQC測定による非晶構造解析】 従来、有機物質においては不可能であったこのRISCを実現するためには、上述の通り、 ΔE_{ST} をできるだけ小さくする必要がある。 ΔE_{ST} は、分子におけるHOMOとLUMOを空間的に分離することに、より小さくできることが理論的に明らかとなってお

有機EL, 発光, 固体HMQC

○かじひろのり, すずきかつあき

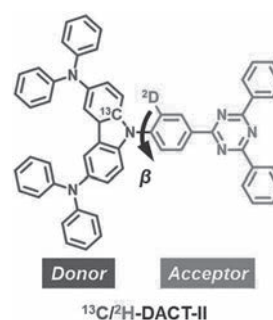


Fig. 1. Structure of DACT-II.
Double label is only for NMR measurements.

り、TADF分子は電子ドナー性セグメント(D)とアクセプター性セグメント(A)を結合させることにより設計されてきた。図1に示す通り、DACT-IIもその構造を有している。このD-A結合型分子においては、DとAを繋いでいる結合のねじれ角(図1の β)はHOMOとLUMOの重なりに影響し、 ΔE_{ST} を大きく変化させる。 β は、スピン軌道相互作用、振動子強度、 S_1 のエネルギー準位にも影響するため、RISCにおけるスピン反転、輻射緩和、発光色にも変化をもたらす。そのため、この β を定量的に解析することは、TADF分子およびデバイス特性の理解に極めて重要である。しかしその一方で、有機材料はデバイス中で非晶状態にあるため、その解析は

困難な状況にある。本研究では、図1に示した ^{13}C と ^2H をダブルラベルしたDACT-IIの非晶試料に対し、固体 ^{13}C - ^2H HMQC測定を行った。この測定では、ラベル部位間の配向相関、したがって、その間のねじれ角を分布も含めて解析することが可能である[9]。図2に $^{13}\text{C}/^2\text{H}$ -DACT-IIのHMQCシミュレーションスペクトルを示す。ねじれ角の変化によりスペクトルが大きく変化し、精度の高い解析が可能であることがわかる。図3aには、実測スペクトルを示す。このスペクトルは、単一の β では再現できず、図3bに示した最適フィットから、D-A間のねじれ角は、図3cの角度分布を有することが明らかとなった。

謝辞：本研究は、JSPS科研費 JP20H05840 (学術変革領域研究「動的光エキシトン」)、Core-to-Coreプログラムにより助成された。

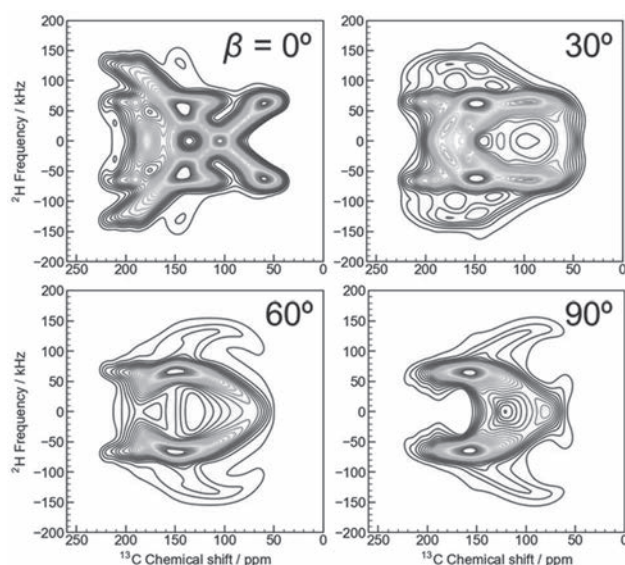


Fig. 2. Simulated HMQC spectra of $^{13}\text{C}/^2\text{H}$ -DACT-II.

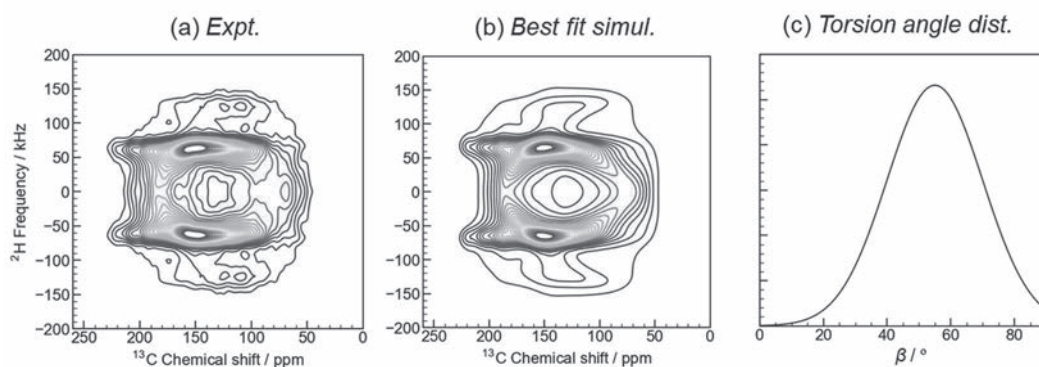


Fig. 3. Experimental and best fit simulated MQC spectra of $^{13}\text{C}/^2\text{H}$ -DACT-II.

References

- [1] H. Kaji, H. Suzuki, T. Fukushima, K. Shizu, K. Suzuki, S. Kubo, T. Komino, H. Oiwa, F. Suzuki, A. Wakamiya, Y. Murata, C. Adachi, *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 8476.
- [2] Y. Wada, H. Nakagawa, S. Matsumoto, Y. Wakisaka, H. Kaji, *Nat. Photon.* **2020**, *14*, 643.
- [3] K. Shizu, H. Kaji, *Commun. Chem.* **2022**, *5*, 53.
- [4] S. Kubo, H. Kaji, *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 13462.
- [5] F. Suzuki, T. Fukushima, M. Fukuchi, H. Kaji, *J. Phys. Chem. C* **2013**, *117*, 18809.
- [6] T. Fukushima, J. Yamamoto, M. Fukuchi, S. Hirata, H. H. Jung, O. Hirata, Y. Shibano, C. Adachi, H. Kaji, *AIP Advances* **2015**, *5*, 087124.
- [7] K. Suzuki, S. Kubo, F. Aussenac, F. Engelke, T. Fukushima, H. Kaji, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 14842.
- [8] H. Uoyama, K. Goushi, K. Shizu, H. Nomura, C. Adachi, *Nature* **2012**, *492*, 234.
- [9] H. Kaji, K. Schmidt-Rohr, *Macromolecules* **2001**, *34*, 7382.

L5-5

測定中にパラメータを自律的に選択することで高精度を目指す 適応的NMR測定法

○葛西卓磨¹、木川隆則¹

¹理化学研究所・生命機能科学研究センター

An adaptive method for high-precision NMR by autonomously selecting experimental parameters during the measurement

○Takuma Kasai¹, Takanori Kigawa¹

¹RIKEN Center for Biosystems Dynamics Research

NMR analyses of challenging samples are often obstructed by insufficient sensitivity. Optimization of the experimental parameters may improve precision of the analyses; however, the optimization itself may be difficult in such cases. Here we propose an adaptive method to optimize the experimental parameters during the measurement, applied for chemical exchange saturation transfer (CEST) as an example. In conventional CEST experiments under high-sensitivity situations, it is usual to utilize equally spaced irradiation offsets, most of which are redundant for the estimation of the exchange parameters. On the contrary, in the proposed method, the machine resource is devoted to experimental conditions with higher information content. To achieve this, we developed an iterative procedure with Bayesian inference. Within each iteration, we firstly estimate prior probability of the parameters using the data observed so far. Secondly, expected information gain is calculated for each experimental condition candidate. Finally, the best condition is selected for the next measurement. Since it can also be applied to various types of experiments, we believe this strategy should expand targets and application areas of NMR.

NMRは分子のさまざまな特性を解析できる方法であるが、対象分子の物理的性質によって濃度を上げることができなかつたり、信号がブロードであったりなどの理由でNMRスペクトルの感度が低い場合には、解析結果の精度が限られる。このような場合、NMR測定パラメータの最適化により測定データの質を向上させ、解析結果を改善することが望まれる。しかし、その最適化のための測定が困難であったり、測定を始めてみないと最適化のための情報が得られなかつたりする場合には、測定中にパラメータ最適化をおこなう「適応的NMR測定」が有効であると考えられる。前者の例として、感度の低い1次元NMR測定中に縦緩和時定数 T_1 の情報を合わせて取得し励起角を最適化する方法を昨年報告した¹。

後者の例として、占める割合が小さいために直接観測できない分子状態（以下「B状態」という）との化学交換を、多数を占める状態（以下「A状態」という）の分子を通じて観測する手法であるchemical exchange saturation transfer (CEST)法が挙げられる。従来型のCEST法では、通常、周波数オフセットを数十点にわたって一定の間隔で変えながら弱い摂動パルス照射し（Fig.1上）、A状態の共鳴を観測する。A状態の化学シフトだけでなく、B状態の化学シフトで照射した場合にも、観測される信号強度の低下があり（Fig.1上）、このことがB状態の存在を証明する。また、周波数に対する強度の応答を理論式にあてはめることで、B状態の存在割合や、交換速度等の情報を得ることができる。このとき、A・B両状態の化学シフトから遠い周波数の観測点は、化学交換に関する情報をもっておらず、測定する必要性は低い。感度が十分な場合はこの方法が良いが、感度が測定パラメータ最適化、ベイズ推定、情報理論

○かさい たくま、きがわ たかのり

低い場合には、従来型CESTのように、あらゆる周波数に測定資源を均一に投入して測定するよりも (Fig.1中)、A・B両状態の化学シフトの近傍など、化学交換に関する情報をより多くもつ観測点に集中的に測定資源を投入し、積算回数を増やしたほうが (Fig.1下)、目的とする化学交換パラメータを最終的に精度よく求めることができると思われる。B状態の化学シフトを測定前に知ることはできないので、どのような観測点に測定資源を投入すべきかは測定開始後に決める。

では、どのような基準に基づいて観測点を選択したらよいだろうか。従来型のCEST測定では、数十点の観測点 (オフセット) をすべて1回ずつ測定するとあらかじめ決めて測定を開始し、開始後に測定条件を変更することはない。適応的CEST測定では、1回測定するごとにそれまでのデータにもとづいて次の観測点を決める、iterativeな方法がよいと思われる。また、感度が悪い場合には、最も当てはまりのよいパラメータのみを求める点推定よりも、パラメータの確率分布を求めるベイズ推定のほうが、パラメータの推定精度も知ることができて

よい。提案法では、iterationごとに、それまでに観測したデータからパラメータの確率分布 $p(\theta)$ をマルコフ連鎖モンテカルロ(MCMC)法によりベイズ推定する。仮に観測点 x を選んだときに測定値 \hat{Y} が得られるとすると、事後確率分布は $p(\theta|\hat{Y})$ となる。 \hat{Y} の観測により得られる知識を、2つの確率分布の差異をあらわす指標であるカルバック・ライブラー情報量 $D_{KL}(p(\theta|\hat{Y})||p(\theta))$ で見積もることとする。 \hat{Y} は将来の観測値であるため、 \hat{Y} について期待値をとった量 $\mathbb{E}_{\hat{Y}}[D_{KL}(p(\theta|\hat{Y})||p(\theta))]$ が、観測点 x を選んだ時に得られる知識の期待値ということになる。この量は相互情報量 $I(p(\hat{Y});p(\theta))$ に等しく、事前確率分布 $p(\theta)$ からのMCMCサンプルを用いて計算できる。このようなアルゴリズムにより、iterationごとに、次に最も多くの知識を獲得できそうな観測点を選び、測定を進めていく。

Fig.2に提案法のコンピュータシミュレーションの一例を示す。iterationが進むにつれて、最大事後確率(maximum-a-posteriori; MAP)推定値が正解に近づき、信用区間も狭くなることから、化学交換パラメータの推定精度・確度が上がっていることがわかる。講演では、シミュレーションおよび実測データにより、パラメータ推定精度・確度を従来型CESTと比較する。

Reference

- (1) T. Kasai and T. Kigawa (2021), "In-measurement T_1 estimation for adaptive optimization of the excitation angles and the recycling delays to improve NMR sensitivity", ISMAR-APNMR-NMRSJ-SEST2021, Osaka, Japan.

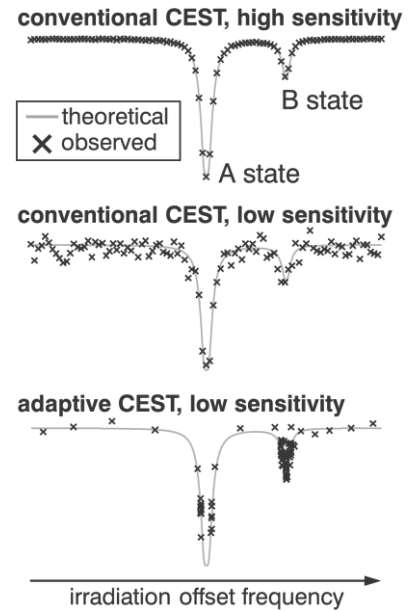


Fig. 1. Conventional and adaptive CEST experiments.

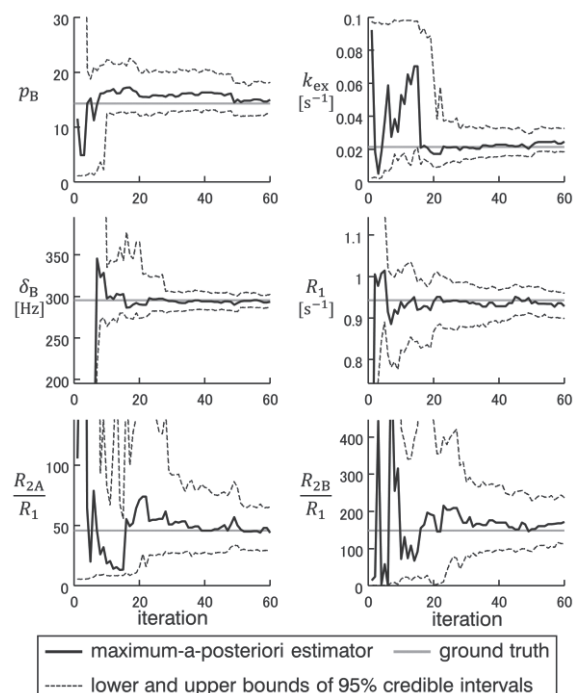


Fig. 2. An example of simulated adaptive CEST.

L5-6

生体試料の卓上NMR装置による分析手法の検討

○相沢智康¹, 宋子豪¹, 甘莉¹, 蔣佳稀¹, 胡知彦¹, 大西裕季¹,
長田誠司², 久米田博之¹, 熊木康裕¹, 山内一夫³

1北海道大学・大学院先端生命科学研究院

2中山商事株式会社

3沖縄科学技術大学院大学 機器分析セクション

Study of analysis techniques using benchtop NMR for biological samples

○Tomoyasu Aizawa¹, Zihao Song¹, Li Gan¹, Jiayi Jiang¹, Zhiyan Hu¹, Yuki Ohnishi¹, Seiji Osada²,
Hiroyuki Kumeta¹, Yasuhiro Kumaki¹, Kazuo Yamauchi³

¹ Faculty of advanced life science, Hokkaido university

² Nakayama Co.,Ltd.

³ Instrumental analysis section, Okinawa institute of science and technology

Superconducting high-field nuclear magnetic resonance (NMR) is one of the leading methods in metabolomics. It is increasingly attracting attention because of its ability to obtain highly reproducible data with simple sample preparation. However, compared to its use in the research field, its use in clinical testing and the food industry has remained limited. This is partly due to the high cost of high-field NMR systems and the high hurdles in accessing the systems themselves. In this presentation, we report the results of analysis of oligosaccharides in human breast milk and metabolites in stools of DSS enteritis model mice as a basic study of NMR metabolome analysis using a bench-top NMR system, which is becoming increasingly sophisticated.

「低分子代謝物（メタボライト）」を網羅的に解析するメタボロミクス（メタボローム解析）は疾病の原因分析等の医学分野での研究や技術開発を中心に進展してきた。近年では、複雑な組成を持つ農林水産物・食品の成分分析等の産業分野への応用研究も増加している。超伝導高磁場核磁気共鳴（NMR）装置を用いた解析は、代表的なメタボロミクス手法の1つであり、容易な試料調製で再現性の高いデータが得られることなどから、ますます脚光を浴びている。しかしながら、研究分野での利用と比較して、臨床検査や農林水産・食品産業分野への応用は、まだ限定的にとどまっている。これは、高磁場NMR装置は高額であり、超伝導維持のための液体ヘリウム等の冷媒の供給などの管理作業が必須で、装置そのものへのアクセスのハードルが高いことも一因であると考えられる。

そこで我々は、近年急激に高性能化が進む卓上NMR装置を利用し、NMRメタボロミクス解析を行うという課題に取り組んでいる。卓上NMR装置は強力なレアアース永久磁石の利用や、高度な電子制御といった最新技術の導入等により、急激に高性能化が進んでいる。磁場の均一化技術の進展により、高度な溶媒消去も可能となり、水を含む生体系試料への応用も可能になったことから、メタボロミクスへの応用の可能性も大きく膨らんでいる。

benchtop NMR, metabolomics

○あいざわともやす, そんずはお, かんり, しょうかき, こしげん, おおにしゅうき, おさだせいじ, くめたひろゆき, くまきやすひろ, やまうちかずお

卓上NMR装置を用いて、高度に代謝産物の同定・定量解析を行う技術を確立するためには、低感度で分解能が低いスペクトルからどのように高度な情報を引き出すかという課題をクリアする必要がある。本発表では、超伝導高磁場NMRによる母乳や便等の生体試料の解析結果との比較等により、卓上NMRのメタボロミクス分野への応用の可能性についての検討について報告する。

(1) ヒト母乳中のメタボライトの解析

ヒト母乳中の主要な低分子代謝物の1つに糖があげられ、乳児のエネルギー源として重要であるラクトースのみならず、多種類のヒトミルクオリゴ糖 (HMO) が含まれることが知られている。HMOは、ラクトース、脂質に次いで含量の多い固形成分であり、蛋白質よりも高濃度で含まれる。特に初乳中での含量が多く、他の栄養成分とは異なり、小腸での消化や吸収を受けずに大腸まで到達することで、有用腸内細菌の増殖や定着の促進などの腸内細菌叢の形成、有害細菌やウイルスの付着の防止に寄与すると考えられている。また、一部の吸収されたHMOは、炎症性サイトカインの発現の抑制等を介して、免疫機能の調節にも関与することなども報告されている。

現在まで150種類を超えるHMOの化学構造が報告されているが、その中で2'-フコシルラクトース (2'-FL) は、母乳中に最も多く含まれるHMOの1つであり、通常その重量の25%程度を占める。しかし、2'-FLの分泌には、 α -(1, 2)-フコシルトランスフェラーゼをコードするFUT2遺伝子が関与しており、この酵素を合成できる分泌型と、合成できない非分泌型の母親が存在する。2'-FLの工業的な大量生産が可能となったことで、海外では市販の人工乳への添加も開始されていることから、分泌型・非分泌型の判別や母乳中に含まれるその濃度の定量は臨床的にも重要な意味を持つと考えられるが、未だ簡便な定量法は確立されていない。

そこで本研究では、60 MHzの卓上NMR装置を用いた、母乳中のHMOの分析について検討した。2'-FLのフコースユニットのメチル基のピークを解析することにより、そのドナーの分泌型・非分泌型を明確に判別することに成功した。さらに、同様にフコースユニットを有する主要なHMOである、3-フコシルラクトース (3-FL) やラクト-N-フコペンタオース-I (LNFP-I) を解析に加えることで、超伝導高磁場NMR装置と良い相関のある定量的な解析結果を得ることに成功した。

(2) DSS腸炎モデルマウス便中のメタボライトの解析

従来、生体試料のメタボロミクスの対象としては、血液や尿などの体液が多く用いられてきた。しかしながら、近年、腸内細菌叢の宿主の恒常性の維持への重要性が明らかになってきたことから、便試料を対象とした解析例も増加している。便試料を対象としたメタボロミクスでは、その試料調製や前処理の簡便さ等から、NMRによる解析は特に優位な点が多いと考えられる。

本研究では、潰瘍性大腸炎と類似の症状を引き起こす、デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 誘導性腸炎モデルのマウス由来の便試料を用いて、卓上NMR装置による疾患の判別分析やメタボライトの定量に関する基礎的な検討を行った。DSS腸炎モデル群とコントロール群の便から、緩衝液添加と攪拌、遠心のみのごく簡便な方法で抽出した水溶画分を対象として、800 MHzの超伝導高磁場及び60 MHzの卓上NMR装置を用いた測定を行い、ノンターゲットでの多変量解析を行った。その結果、いずれの装置のスペクトルを用いても、体重減少等の重篤な症状がみられる前に、DSS腸炎モデル群とコントロール群の判別が可能であることが明らかになった。また、両群を区別する重要な代謝産物として同定された酢酸を対象にして、卓上NMRスペクトルからの定量法について検討し、信頼性の高い結果を得ることに成功した。

L5-7

NMR解析を用いた解糖系酵素PGKの環境適応的活性制御による解糖系調節機構

○八木宏昌¹, 葛西卓磨¹, Elisa Rioual¹, 池谷鉄兵², 木川隆則¹

¹理化学研究所・生命機能科学研究センター

²東京都立大学・理学部

Glycolysis control mechanism by the catalytic regulation of PGK depending on intracellular environment analyzed by NMR spectroscopy

○Hiromasa Yagi¹, Takuma Kasai¹, Elisa Rioual¹, Tepei Ikeya², Takanori Kigawa¹,

¹RIKEN, Center for Biosystems Dynamics Research

²Department of Chemistry, Graduate School of Science, Tokyo Metropolitan University

Control of glycolytic flux plays an important role in the energy production and metabolic homeostasis in cells. Phosphoglycerate kinase (PGK) catalyzes the reversible phosphotransfer to generate 3-phosphoglycerate (3PG) and ATP in glycolysis. PGK controls glycolytic flux according to the intracellular [ATP]/[ADP] ratio; however, its molecular mechanism remains unknown. Herein, we report a protein-level regulation of human PGK reaction by switching ligand-binding cooperativities between adenine nucleotides and 3PG, which is finely tuned to appropriately respond to the changes in the intracellular [ATP]/[ADP] ratio. Our findings reveal a molecular mechanism intrinsic to human PGK controlling glycolytic flux by rapid adaptation to changes in the intracellular environment.

解糖系は生体が持つエネルギー獲得のための中心代謝経路であり、その流量（解糖流量）は細胞環境によって厳密に制御されている。また多くの癌細胞では解糖系が亢進し解糖流量の増大が見られる。そのため、細胞の環境変化に呼応した解糖流量の調整機構を正確に理解するには、解糖系を構成する各酵素の活性制御機構を細胞内あるいは細胞環境に近い状態で解析する必要がある。解糖系中心酵素の一つであるホスホグリセリン酸キナーゼ（PGK）は、ADPにリン酸を付加することでATPを合成し、同時に3-ホスホグリセリン酸（3PG）を産出する。また糖新生ではその逆反応を担い、両方向へのリン酸転移反応を触媒する酵素である。PGKの反応機構に関しては、反応時定数や基質結合定数などの生化学的データを結晶構造に落とし込むことで理解されてきた。しかしながら、これまで解かれた結晶構造の多くは生理状態からかけ離れた条件下で解析されており、必ずしも生体内で起こる反応機構を正しく反映しているとは限らない。また、細胞内における活性制御機構も全く理解されていない。

そこで本研究では、生理条件下の溶液NMR 解糖系、酵素活性制御、基質結合協同性

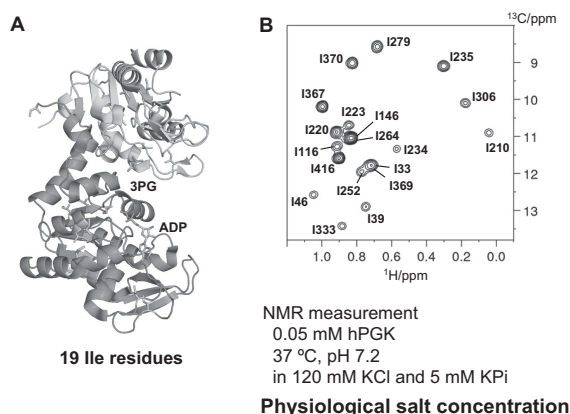


Fig. 1 Ile δ^1 -[$^{13}\text{C}\text{H}_3$]-labeled hPGK. (A) Structure of hPGK (PDB ID: 2XE7). (B) ^1H - ^{13}C HMQC spectrum of Ile δ^1 -[$^{13}\text{C}\text{H}_3$]-labeled hPGK.

○やぎひろまさ, かさいたくま, えりざりおーる, いけやてっぺい, きがわたかのり

とin-cell NMRを用いて、ヒト由来PGK(hPGK)の基質結合状態解析を行なった。hPGKに含まれる19個のイソロイシン (Ile) 残基の δ メチル基を ^{13}C 核で選択標識し、HMQC (Methyl-TROSY) 測定による基質滴定実験を行った(Fig. 1)。その結果、PGKに対する基質の結合親和性は塩濃度に大きく影響され、特に生理塩濃度における3PGの結合親和性は、非生理塩濃度と比べ1000倍程度も弱くなることが判明した。さらに、基質結合に対する全てのIle残基の化学シフト変化量を使ったグローバル化学シフトフィティングの結果、3PGとMgADPには負の結合協同性が、一方、3PGとMgAMPPNP (ATPアナログ) には正の結合協同性があることが明らかになった。

次に、こうした基質の結合協同性がPGKの反応機構にどのように影響するかを検証するため、PGK反応のリアルタイム計測を行った。その結果、3PGとMgADPの負の結合協同性は3PGのPGKからの乖離を促進し、一方、3PGとMgAMPPNPの正の結合協同性は3PGの乖離を一部阻害していることが明らかになった。さらに、バイオリアクターを活用したin-cell NMRを使って、実際の細胞中でのPGKの基質結合状態を観測した結果、ATP枯渇状態では3PGが解離したMgADP結合状態をとるのに対し、通常状態では3PGが一部結合した状態にあることが判明し、リアルタイム計測の結果とよく一致した(Fig. 2)。

今回明らかにした各基質の結合定数と基質結合協同性を用いて、様々なATP/ADP濃度比における基質結合状態のシミュレーションを行った結果、hPGKはヌクレオチドと3PGの基質結合協同性を巧みに利用し、細胞内のATP/ADP濃度比に応じて触媒反応を制御していることが明らかになった(Fig. 3)¹。このことは、hPGKは細胞内ATP濃度を感知しながら自身の活性をコントロールし、それによって解糖流量を調節していることを示唆している。さらに、この基質結合協同性は生理塩濃度下で最適に発揮できるよう精巧にチューニングされており、その自由エネルギー差は非常に小さいことが明らかになった。これらのことから、今回明らかになった制御機構は、これまで考えられてきた転写制御による酵素量の増減によるものとは異なる、細胞内環境変化に迅速に対応するよう両方向への反応を触媒する酵素そのものに備わった、タンパク質レベルでの新たな制御機構だと考えられる。

今回明らかにした各基質の結合定数と基質結合協同性を用いて、様々なATP/ADP濃度比における基質結合状態のシミュレーションを行った結果、hPGKはヌクレオチドと3PGの基質結合協同性を巧みに利用し、細胞内のATP/ADP濃度比に応じて触媒反応を制御していることが明らかになった(Fig. 3)¹。このことは、hPGKは細胞内ATP濃度を感知しながら自身の活性をコントロールし、それによって解糖流量を調節していることを示唆している。さらに、この基質結合協同性は生理塩濃度下で最適に発揮できるよう精巧にチューニングされており、その自由エネルギー差は非常に小さいことが明らかになった。これらのことから、今回明らかになった制御機構は、これまで考えられてきた転写制御による酵素量の増減によるものとは異なる、細胞内環境変化に迅速に対応するよう両方向への反応を触媒する酵素そのものに備わった、タンパク質レベルでの新たな制御機構だと考えられる。

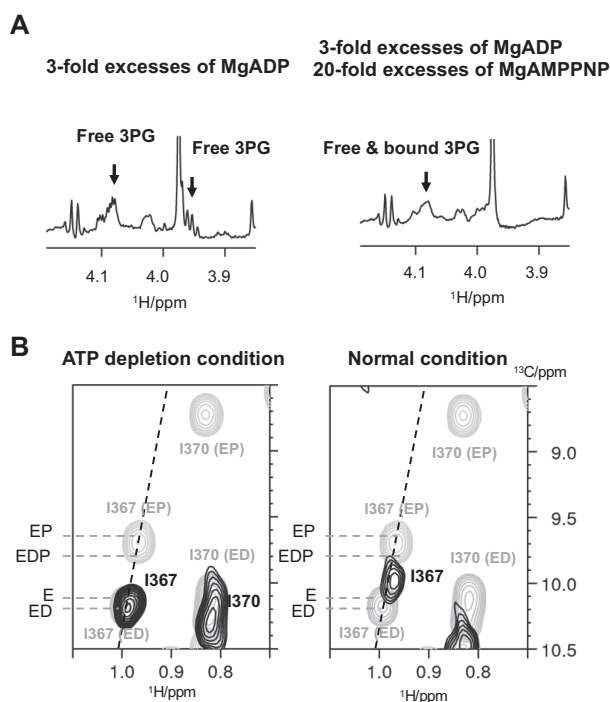


Fig.2, (A) Real-time monitoring of hPGK catalytic reaction and (B) comparison of the in-cell NMR spectra of Ile δ^1 -[^{13}C]-labeled hPGK delivered into HeLa cells.

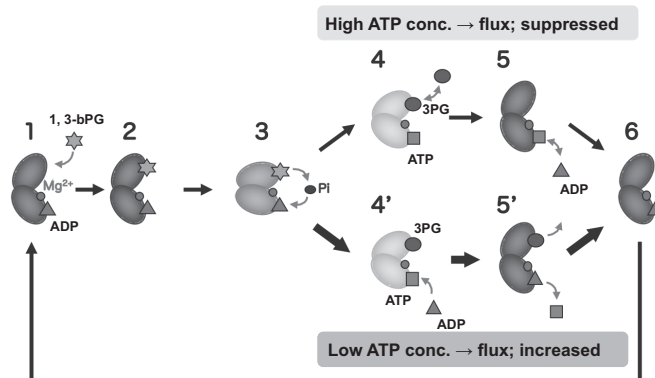


Fig. 3 Schematic representation of the catalytic scheme of hPGK

References

- (1) Yagi, H., *et al.* (2021) Molecular mechanism of glycolytic flux control intrinsic to human phosphoglycerate kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118, e2112986118

ポスター発表要旨

Poster Abstracts

P1

B型肝炎ウイルスX蛋白質 (HBx) のC末側欠失変異体ペプチドと抗アポトーシス蛋白質Bcl-x_Lの相互作用のNMR解析

○楠英樹¹, 坂本泰一², 河野俊之³, 若松馨⁴, 浜口功¹, 永田崇⁵

1 国立感染症研究所 次世代生物学的製剤研究センター

2 千葉工業大学 先進工学部

3 北里大学 医学部

4 群馬大学大学院 理工学府

5 京都大学 エネルギー理工学研究所

NMR analysis of the interaction between the C-terminal-truncated hepatitis B virus X protein (HBx) peptide and anti-apoptotic protein Bcl-x_L

○Hideki Kusunoki¹, Taiichi Sakamoto², Toshiyuki Kohno³, Kaori Wakamatsu⁴, Isao Hamaguchi¹, Takashi Nagata⁵

¹Research Center for Biological Products in the Next Generation, National Institute of Infectious Diseases

²Faculty of Advanced Engineering, Chiba Institute of Technology

³Kitasato University School of Medicine

⁴Graduate School of Science and Technology, Gunma University

⁵Institute of Advanced Energy, Kyoto University

Chronic hepatitis B virus (HBV) infection is a worldwide health problem, because this infection causes liver diseases including hepatocellular carcinoma (HCC). HBV has the multifunctional protein, HBV X protein (HBx, 154 residues), which can interact with the anti-apoptotic protein Bcl-x_L via its BH3 motif. Importantly, this interaction leads to HBV replication and induction of apoptosis. By contrast, a C-terminal-truncated HBx, *e.g.*, residues 1–120 poses a higher risk for HBV-related HCC development than intact HBx. However, the interaction manner remains unclear. In this study, to elucidate the detailed interaction mode, we used a C-terminal-truncated HBx BH3 motif peptide [residues 101–120; HBx(101–120)] as a model peptide and analyzed the interaction by NMR and ITC. Our results demonstrated that the Bc-x_L-binding mode of HBx(101–120) is different from that of the HBx BH3 motif peptide.

序論

慢性的なB型肝炎ウイルス (HBV) 感染は肝がんを発症するリスクが高いことから社会問題となっている。HBV蛋白質の1つであるX蛋白質 (HBx) は多くの宿主因子と相互作用し、多機能性を示す。例えば、HBxはそのBH3モチーフにある3つの疎水性残基 (Trp120, Leu123, Ile127) を介してBcl-x_Lの疎水性コアに結合し、HBV複製、細胞死、肝がんを含む肝病変を誘発する [1, 2]。一方で、肝がん組織で見られるHBxのC末側欠失変異体 (残基1–120) は細胞増殖および腫瘍形成を促す[3]。しかし、この変異体がBcl-x_Lとどのように相互作用するかは未解決のままである。本研究では、HBxのC末側欠失変異体ペプチド[残基101–120 ; HBx(101-120)]をモデルとして、Bcl-x_Lとの相互作用を核磁気共鳴 (NMR) と等温滴定カロリーメトリー (ITC) で解析した。その結果、この変異体ペプチドは、HBx BH3モチーフペプチドとは異なる結合様式でBcl-x_Lに結合することが示唆された。

B型肝炎ウイルスX蛋白質, Bcl-x_L, NMR相互作用解析

○くすのき ひでき, さかもと たいいち, こうの としゆき, わかまつ かおり, はまぐち いさお, ながた たかし

結果と考察

以前、我々は、HBx BH3モチーフペプチド[残基101–136; HBx(101–136)]がBcl-x_Lの疎水性コアに結合すること、その結合親和性 (K_d) が89 μ MであることをNMR滴定実験から解明した[4]。そこで、本研究でも同様に、HBx(101–120)がBcl-x_Lのどの部分に結合するかをNMR滴定実験で調べた。¹⁵Nで安定同位体標識したBcl-x_L溶液にHBx(101–120)溶液を0.5, 1, 2, 4, 8当量となるよう添加し、各2D ¹H-¹⁵N HSQCスペクトルを測定した。その結果、HBx(101–120)の濃度を徐々に上昇させることによって Bcl-x_Lのアミドシグナルの変化が観測された。HBx(101–120)の存在下で有意な化学シフト変化を示したBcl-x_Lのアミノ酸残基をBcl-x_L構造にマッピングしたところ、HBx BH3ペプチドが結合する同じ疎水性コアに集中していた。このことから、HBxのC末欠失変異体ペプチドはHBx BH3モチーフペプチドと同じBcl-x_Lの表面に結合していることが示唆された。

次に、ITCで、HBx(101–120)とBcl-x_Lの K_d を調べた。その結果、HBxのC末欠失変異体ペプチドはHBx BH3モチーフペプチドより約2.5倍弱く結合することが分かった。HBx BH3モチーフペプチドは、重要となる3つの疎水性残基 (Trp120, Leu123, Ile127) を介してBcl-x_Lと結合するが、HBx(101–120)は唯一Trp120残基しか持たない。そこで、HBx(101–120)のどの部分がBcl-x_Lとの結合に関与しているかを調べるため、¹⁵Nで安定同位体標識したHBx(101–120)溶液にBcl-x_L溶液を0.5, 1, 2, 4当量添加し、各2D ¹H-¹⁵N HSQCスペクトルを測定した。その結果、Ala110からTrp120で有意な化学シフト変化を確認した。この結果から、C末欠失変異体ペプチドは、HBx BH3モチーフペプチドとは異なるアミノ酸残基を介してBcl-x_Lと相互作用している可能性が示唆された。

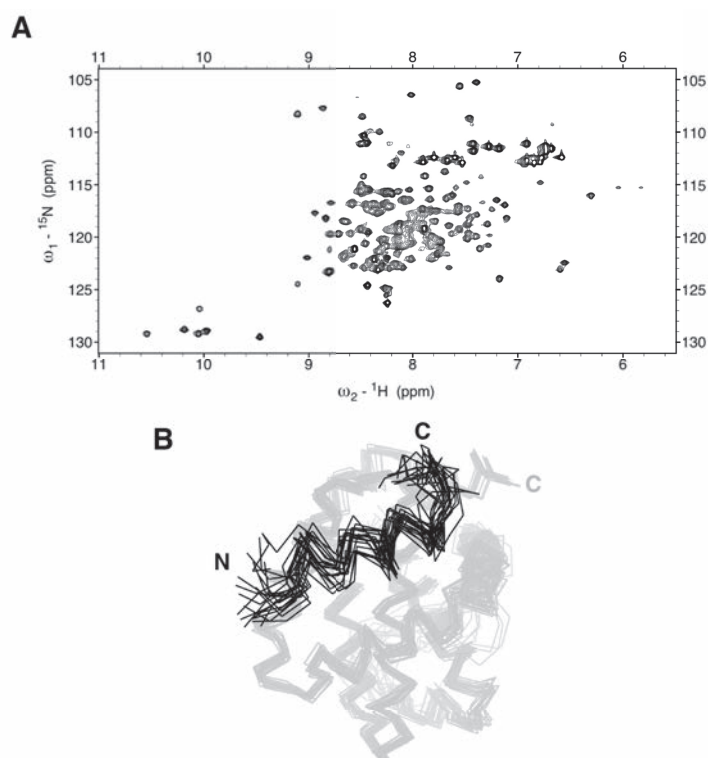


Fig. 1. (A) 2D ¹H-¹⁵N HSQC spectrum of HBx(101–120)-(GS)₅-Bcl-x_L and **(B)** 20 NMR complex structures of HBx(101–120)/Bcl-x_L. HBx(101–120) and Bcl-x_L are shown in black and gray, respectively.

現在、HBx(101–120)とBcl-x_Lの詳細な結合様式を解明するため、HBx(101–120)とBcl-x_Lをグリシンとセリンの5つの繰り返しリンカーで繋げた融合蛋白質 [HBx(101–120)-(GS)₅-Bcl-x_L] を調製し、NMR複合体構造解析を実施している。その複合体構造から、NMR滴定実験で示唆されたように、HBx(101–120)がAla110からTrp120内にあるアミノ酸残基を介してBcl-x_Lの疎水性コアに結合している可能性が示唆された (Fig. 1)。現在、この複合体構造の精密化を進めている。

References

- [1] Geng *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 109 (2012) 18471-18476.
- [2] Zhang *et al.*, Nat Commun 10 (2019) 3192.
- [3] Ma *et al.*, Clin Cancer Res 14 (2008) 5061-5068.
- [4] Kusunoki *et al.*, Biochem Biophys Res Commun 518 (2019) 445-450.

P2Y

フルオロキノロン化合物とRNAとの相互作用解析：近接する塩基対の影響の解析

○一條 梨花¹, 上村 孝², 河合 剛太¹

¹千葉工業大学, ²株式会社 Veritas In Silico

Interaction between fluoroquinolone derivatives and RNA: effect of base pairs adjacent to the bulge out residues

○Rika Ichijo¹, Takashi Kamimura², Gota Kawai¹

¹Chiba Institute of Technology, ²Veritas In Silico Inc.

Interaction analysis between small molecules and RNA are important for the RNA-targeted drug discovery. We have demonstrated, by NMR, that a fluoroquinolone derivative, KG022, interacts with the RNAs in the vicinity of the bulge residue, with preferring C and G as the bulge residues¹⁾. In order to further characterize the interaction between KG022 and RNA, base pairs adjacent to the bulge-out residue were mutated. In the present study, RNAs with variations in the 3' side of the bulge-out G residue were analyzed to find that AU and GC base pairs are preferred to UA and CG base pairs.

序論

本研究では、RNA をターゲットとした低分子創薬をめざし、フルオロキノロン誘導体である KG022 (Fig. 1A) に着目した解析を進めている。KG022 と RNA との相互作用を明らかにするため、NMR 法による相互作用解析を行っている。これまでの解析により、KG022 は C バルジあるいは G バルジを持つ RNA と相互作用することが示されている

¹⁾。これまでの研究では Fig. 1B に示す RNA を用いていたため、5 塩基からなるループの揺らぎが大きくその部分の構造が収束しなかったため、本研究では安定な UUCG ループに変更した RNA を用いた (Fig. 1C)。RNA-C-3AU-uucg と RNA-G-3AU-uucg のそれぞれの複合体の立体構造計算を行った結果、以前と同様に KG022 のシクロプロパン環と隣接するような構造をとっていた。そこで、バルジアウト残基の近傍の塩基対を変更した RNA を C バルジと G バルジでそれぞれ設計し、NMR スペクトルの解析および立体構造計算を進めている。

今回は、バルジアウト残基の3'側の塩基対を変更したGバルジのRNAをGシリーズとし、各RNAのNMR解析を行い、さらに各RNAにKG022を添加した際のスペクトルを比較した。

フルオロキノロン, RNAターゲット創薬

○いちじょうりか, かみむらたかし, かわいごうた

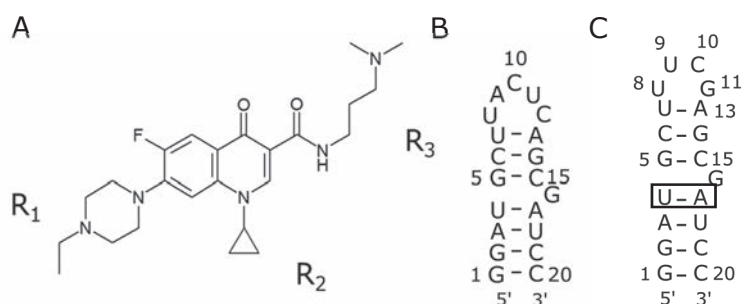


Fig. 1. KG022 and Design of model RNAs

A: a fluoroquinolone derivative, KG022, B: RNA-G, C: RNA-G-3AU-uucg. The base-pair at the 3' side of the bulge-out residue was mutated.

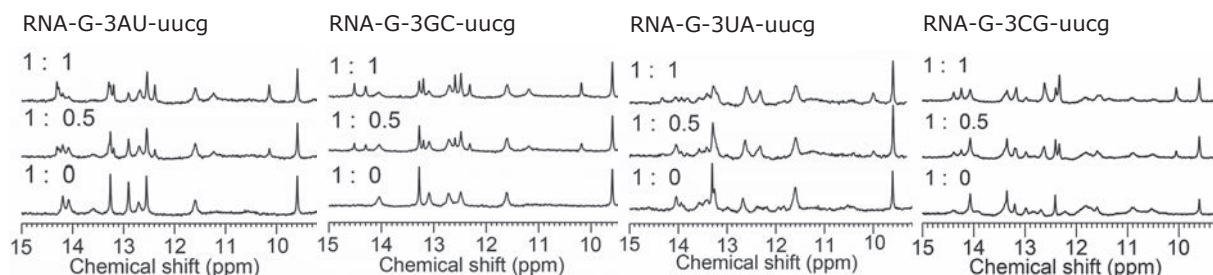


Fig. 2. Imino proton spectra of the model RNAs

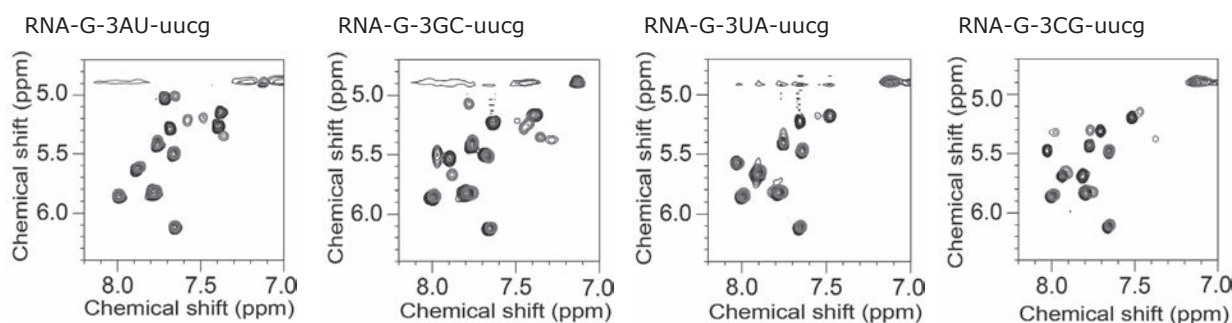


Fig. 3. HOHAHA spectra of the model RNAs

方法

RNA 試料は北海道システムサイエンス株式会社に委託合成した。溶媒として 5%重水 (99.98 atom%, 大陽日酸社) および 50 mM 塩化ナトリウム含む 20 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.5) を用いた。AvanceNeo600 分光計 (Bruker 社) を用いて 288 K で測定を行った。

結果

それぞれの RNA に KG022 を添加した際のイミノプロトンスペクトルを比較すると、バルジアウト残基の 3'側が AU 塩基対である RNA-G-3AU-uucg およびそれを GC 塩基対に変えた RNA-G-3GC-uucg では複合体のシグナルが明確に観測されたが、RNA-G-3CG-uucg および RNA-G-3UA-uucg ではシグナルがややブロードであり、塩基対特異性があることが確認された (Fig. 2)。

添加前と添加後の HOHAHA スペクトルを比較すると、いずれの RNA でも一部のシグナルが変化していた (Fig. 3)。RNA-G-3CG-uucg では KG022 の添加によりシグナルが増えており、一方、RNA-G-3UA-uucg ではいくつかのシグナルが消失した。

考察

イミノプロトンスペクトルと HOHAHA スペクトルの解析から、KG022 がバルジアウト残基と末端に結合していることが示唆された。このうちバルジアウト残基との相互作用は、3'側の塩基対によって影響を受けている可能性がある。

今後は、RNA-G-3AU-uucg と RNA-G-3GC-uucg についての複合体の立体構造を決定し、これと RNA-G の複合体の構造と比較することによって、G シリーズの各 RNA と KG022 の結合様式を明らかにしたい。また、C シリーズについても解析を進めている。

参考文献

1. Nagano, K., Kamimura, T. and Kawai, G., *J. Biochem.* **171**, 239-244 (2022).

P3

水溶液試料における Pure Shift 測定の試み

○高橋征三、河合剛太

千葉工大・大学院生命科学研究科

Pure shift NMR of absorption-mode lineshapes has become one of the standard techniques for suppressing multiplets. Although a number of techniques have been proposed, the Zangger and Sterk (ZS) and PSYCHE methods seem to be the best choice for now. However, these techniques are not applicable to the aqueous solutions where a strong solvent signal co-exists with weak signals of interest. We found additional signal refocusing is quite effective for suppressing the solvent signal in addition to the pre-saturation

$^1\text{H-NMR}$ において Shift 情報と J-結合を分離する試みは昔からの課題で、いわゆる J-resolve 2次元 NMR 法の出現以来、多くの試みが行われてた。とくに J-resolve 2次元法がパワースペクトルしか得られないことから、信号の重なりを正しく評価できる吸収モードでスペクトルを得る手段が求められた。しかし提案された方法は何れも感度の低下という致命的な欠点を抱え、いずれも実用化には困難をともなった。1997年に Zagger と Sterk は選択パルスと磁場勾配を組み合わせる方法で初めて実用的な方法を提案した。彼らのアイデアをもとに Manchester グループは PSYCHE 法を提案し、現在は用途に応じてこれら 2つの方法が使われている。

しかしこれらの方法は、原理的にスピネコー間隔を変えて FID をブロック単位で取り込む方法であり、実際は信号の減衰が安定しないため図 1 に示すように、FID 信号は不連続に接続されてしまう。Xチャンネルを連続になるようパラメータを調整することはできても、Yチャンネルの信号と同時に調整することは不可能であることが分かった。ソフトで連続につないでも結果は芳しくなかった。

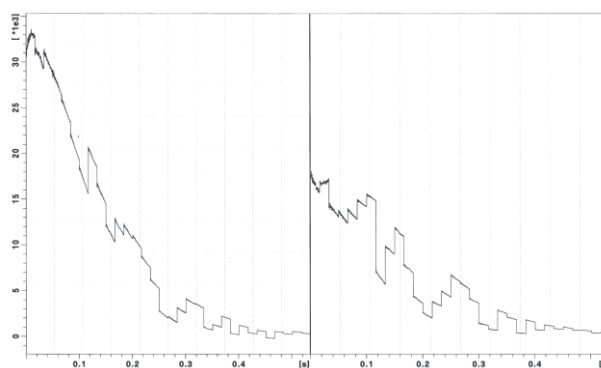


Fig.1 Typical FID of an aqueous sample reconstructed by PSYCHE method. Left and right show X and Y channel signals, respectively.

Pure shift NMR, 水溶液 パルス列

○たかはしせいぞう、かわいごうた

そこで Presaturation を試みたが、Delay が大きくなると信号が回復し正常な FID の再構成が困難であることが分かった。いくつかの試行の後、PSYCHE パルスに refocus パルスと chirp パルスを加える方法が最も効果的であることが分かった。(図 2)

この方法で H₂O 信号抑制が不十分な場合は、50uW 程度の presaturation をすると十分な果が得られた。

図 3 に 1.3mg/0.5mL で測定した L-フェニルアラニンの結果を示す。一番上のスペクトルは積算なしで測定した参照データを示す。真ん中のスペクトルは同一濃度の重水溶液における Modified PSYCHE スペクトルである。完全に溶媒信号が抑制されていることが分かる。下の図は軽水溶液の結果である。この場合 1uW の pre-saturation をかけた。水信号が若干残っているため、感度は重水中の約半分に低下している。

refocus パルス列を繰り返しても顕著なスペクトルの改善は見られなかった。結論として、信号の強度比が大きく異なる時は、FID が連続に繋がらないため、見かけ上の S/N 比が低下する。従って何らかの方法で強度を抑える必要があり、refocus パルスと chirp パルスの組み合わせは一つの有効な方法であることが分かった。

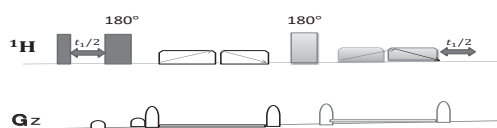


Fig.2. Modified PSYCHE pulse sequence for H₂O solutions. Refocus and Chirp pulse are added. It is preferable to add another pre-saturation pulse for further suppression of H₂O signal.

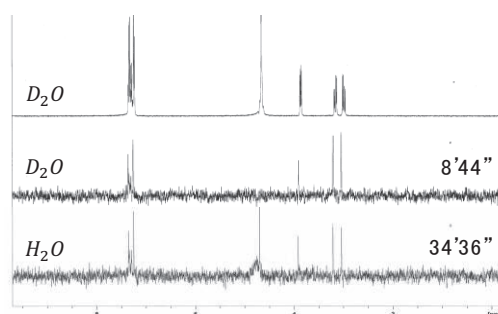


Fig.3. Spectra of L-Phe(1.3mg/0.5mL) are shown in D₂O and H₂O. The result shows a substantial decrease in sensitivity comparing to the normal spectrum, and H₂O. solution loses another factor of 2 than D₂O solution.

Development of an MRI methodology for polymeric thin films by scanning *ex-situ* solid-state NMR with needle-like paramagnetNatsuki KAWABATA¹ and Naoki ASAKAWA¹¹Graduate School of Science and Technology, Gunma University

Abstract: NMR measurement has become one of evaluation methods for the structural and molecular dynamics of materials, and various strategies have been developed so far. However, most of these methods require strict experimental conditions with low cost-effectiveness, such as extremely low temperature, high vacuum, and large-scale equipment, etc. Furthermore, most of the strategies often fail to lift restriction on limits the measurable sample geometry. Therefore, using a custom-built scanning NMR instrument, we have developed a simple methodology for low-cost multidimensional magnetic resonance imaging(MRI) for polymer thin films, which aims at reduction of the restrictions on sample geometry using *ex-situ* measurement. In this paper, one-dimensional(1D) imaging in the depth direction of a multiple layered thin film, 2D imaging in the depth and one direction on the surface, and comprehensive 3D imaging of the depth and the film surface are explored, respectively.

緒言

材料の構造・分子ダイナミクス評価法の一つとして NMR 測定が用いられる。現在、パルス磁場勾配(PFG)法は、パルス状の磁場勾配の印加により、高分解能スペクトルの取得は可能となることから最も普及している。しかし、電子デバイスといった固体試料に対するイメージングおよび拡散計測を行うには磁場勾配強度が不足するケースが多いことから、超伝導磁石周縁部磁場勾配(SFF)法や anti-Helmholtz 法などといった、強力な静的磁場勾配を用いた様々な NMR イメージングおよび拡散計測法が開発されている。しかし、いずれの手法も、大規模な設備・極低温・真空などの装置上の厳しい条件が必要とされ、高コストとなる傾向にある。また、測定のターゲット距離スケールが固定さ

キーワード：高分子薄膜, 静的磁場勾配, MRI
○かわばたなつき, あさかわなおき

れているため、材料科学で重要とされるマルチスケールでの評価を犠牲にしているという問題点がある。したがって、様々な距離スケールでの実験に対応し、かつ低コストで簡便な材料イメージング法の開発が望まれている。これまで我々は、ネオジム磁石近傍の強力な磁場勾配に着目し、平板ネオジム磁石による静的磁場勾配を利用した *ex-situ* 固体 NMR イメージング測定を行い、高分子多層膜に対する深さ方向のイメージングに成功している[1]。今回は先の手法を改良し、多次元イメージングを実現すべく、平板ネオジム磁石よりも局所的な磁場勾配を印加可能な針状常磁性体をネオジム磁石に接触させた短針を用いることにより、自作の走査型 *ex-situ* 固体 NMR による薄膜材料のイメ

ージング法の確立を目指した(Fig.1(a))。

結果・考察

多次元イメージングへの展開を見据え、まず、試料深さ方向に対する一次元イメージング法の確立を目指し、一次元 ^{19}F MRI 測定を行った。測定には poly(tetrafluoroethylene)[PTFE]/Al/PTFE の三層膜を用いた。ここで、PTFE は ^{19}F 源、Al はスペーサーとして機能する。実験には、Hahn のスピンエコー法を用い、スペクトルを静磁場の関数として取得した。その結果、二層の PTFE 由来の二つの異なる ^{19}F シグナルを観測し、その間には Al によるブランク部分が見られた(Fig.2(a))。これは、実際の試料の深さ方向の構成と一致しており、本手法を用いた試料深さ方向に対する一次元 MRI 測定に見

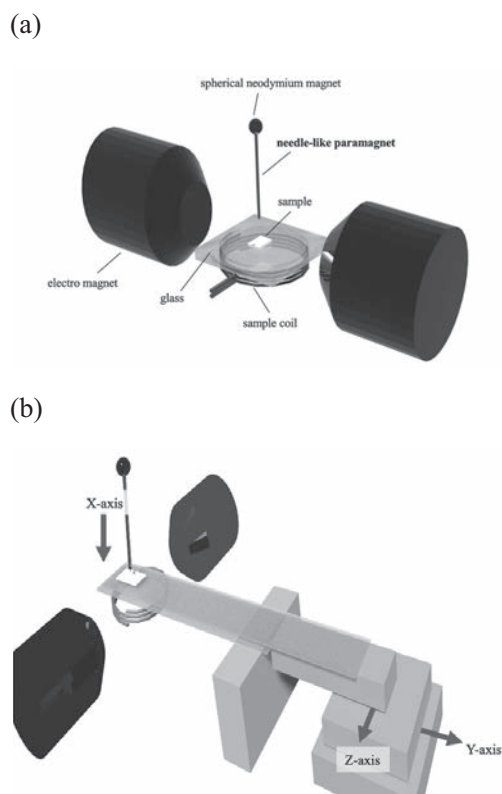


Fig.1 Schematic of the probe head and its peripheral for NMR/MRI equipment for 1D(a) and 2 and 3D imaging(b).

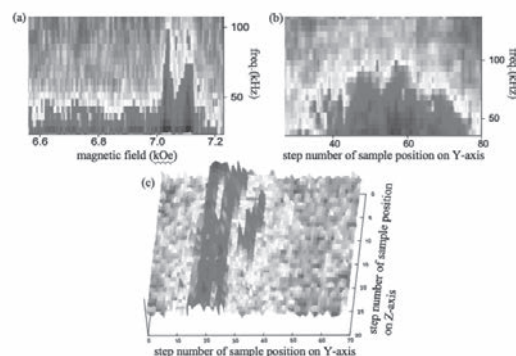


Fig.2. Typical ^{19}F NMR/MRI imagings for 1D(a), 2D(b), and 3D(c), respectively.

通しが立ったといえる。

続いて、膜面一軸方向と膜深さ方向に対する二次元 ^{19}F MRI 測定を試みた。その目的のために、試料を磁極間ベクトルと垂直方向に微小な距離 ($100\ \mu\text{m}$) をステップ状に移動させつつ MRI 測定を行うことが可能な走査機構を自作した(Fig.1(b))。測定試料には、1mm 間隔で四つの山と三つの溝のストライプを刻んだ PTFE 膜を用いた。実験の結果、試料と対応する四つの山が観測された(Fig.2(b))。以上より、本手法を用いた膜面方向と膜深さ方向に対する二次元 MRI 測定にも見通しが立ったといえる。

さらに、1.4 mm 間隔で三つの山と二つの山を刻んだ PTFE 膜に対して、膜表面と深さ方向の網羅的な三次元測定も行った。その結果、走査領域が試料の一部ではあるが、試料と対応する形状のスペクトルを得ることができた(Fig.2(c))。これより、空間分解能を計算すると、試料深さ方向に対しては約 $50\ \mu\text{m}$ 、磁極と垂直な方向に対しては約 $100\ \mu\text{m}$ という値が得られた。

今後、実験条件の更なる最適化を目指す。

[1] N.Asakawa and T.Obata, *Polym.J.*, 44, 855(2012).

P5

片側開放型NMRによる建築材料の含水率の原位置・非破壊計測にむけて

○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

Nondestructive in-site moisture quantification of building materials by single-sided NMR

○Yoshito Nakashima¹

¹National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

A portable single-sided NMR surface scanner was applied to the nondestructive quantification of the moisture in slaked lime plaster samples. The lightweight sensor unit (≈ 4 kg) developed is potentially capable of probing a portion ≈ 1 cm beneath the plaster wall of the architectural heritage. Measurements of a drying plaster plate sample were successfully performed in a laboratory to monitor the CPMG signal decrease with decreasing sample weight. Thus, the single-sided NMR system is a promising in-situ nondestructive tool for the maintenance and remediation of the cultural heritage made of plaster.

はじめに

老朽化した、あるいは施工直後の建造物では、建造物表面にある建築・地盤材料の体積含水率を原位置で非破壊センシングしたいニーズがある。このニーズに合わせるために、プロトン核磁気共鳴を原理とする片側開放型のNMR物理探査装置を開発している。その基本性能を紹介するとともに、とくに城郭などの世界遺産・国宝級建築物で多用されている漆喰の現場での水分計測を意識した室内実験を報告したい[1]。

実験

片側開放型の計測システムをFig. 1に示す（屋外ノイズレベルの計測を兼ねた試運転風景）。ネオジム磁石と高周波コイルからなるセンサーユニットの重量は約4kgである。

平面型の高周波コイルから1cm程度離れた空間に静磁場が約100mTの均一な領域が生成されるように設計されており、そこが感度領域になる。このセンサーユニットの磁気回路はNMR信号強度を支配する重要な開発要素であり、約130万回の静磁場シミュレーションをへて寸法や磁場強度を最適設計したうえで新規に製作した。その結果、以前のセンサーユニット[2]に比べて感度領域の体積を約60

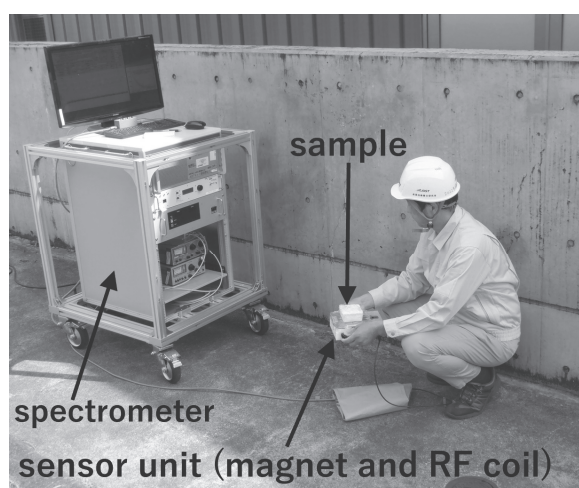


Fig. 1. Performance test of the scanner system in the open air. A water-saturated porous plaster sample is being measured.

片側開放型NMR，低磁場時間領域プロトンNMR，原位置・非破壊検査

○なかしまよしと

%増やすことに成功した。

さて、漆喰は消石灰が主成分であるが、消石灰が大気中の二酸化炭素と反応することで強度が発現するので、水と混練して壁に塗った後に微少空隙が早く乾くことが重要である。したがって、塗りたてのwetな状態の漆喰壁の内部の乾燥状態を現場で非破壊でモニタリング計測することは、城壁などの修繕の施工管理として重要である。このことを意識した上で、多孔質漆喰プレート of 乾燥過程のモニタリングを室内で実施した。最初は完全に水で飽和していた漆喰プレートのサンプル（体積含水率約44vol%）を乾燥機で50°Cで乾燥させつつ、定期的にFig. 2aのコイルの上に置いてCPMGパルスシーケンスでプロトン横緩和波形を共鳴周波数4.5MHzで計測した。エコー間隔は0.3ms、RFパルス幅は0.06ms、信号積算回数は512回、シーケンスの繰り返し間隔は800msであった。

結果と考察

CPMG波形の経時変化をFig. 2bに示す。期待通り、乾燥が進行していくとゼロ時刻に外挿したCPMG波形の信号強度が低下していく（空隙水が蒸発して逃げていく）様子が確認できた。図は省略するが、乾燥によるサンプルの重量減とCPMG信号強度の低下は高い相関を認められた。なお、Fig. 2bでは乾燥に伴いT2値の低下も確認できるが、その理由は、漆喰中のさまざまなサイズの微少空隙のうち比較的大きなサイズの空隙（T2が長い）中の水（free water）が優先的に蒸発していくことが原因と思われる。ほかにも、漆喰の凍害の検出を意識した室内実験にも成功した（空隙水の凍結膨張による空隙サイズの増大をT2値の上昇として検出できた）[1]。このように片側開放型NMRによる非破壊表面スキャンの漆喰系建築物のメンテナンスへの有効性が確認できた。

片側開放型NMRは、建築・土木に限らず食品[2]など現場での非破壊・非侵襲計測が求められる他の分野にも広く応用が期待できる。片側開放型NMRの人的交流ネットワークを立ち上げたので[3]、この分野に興味ある人の参入を歓迎したい。

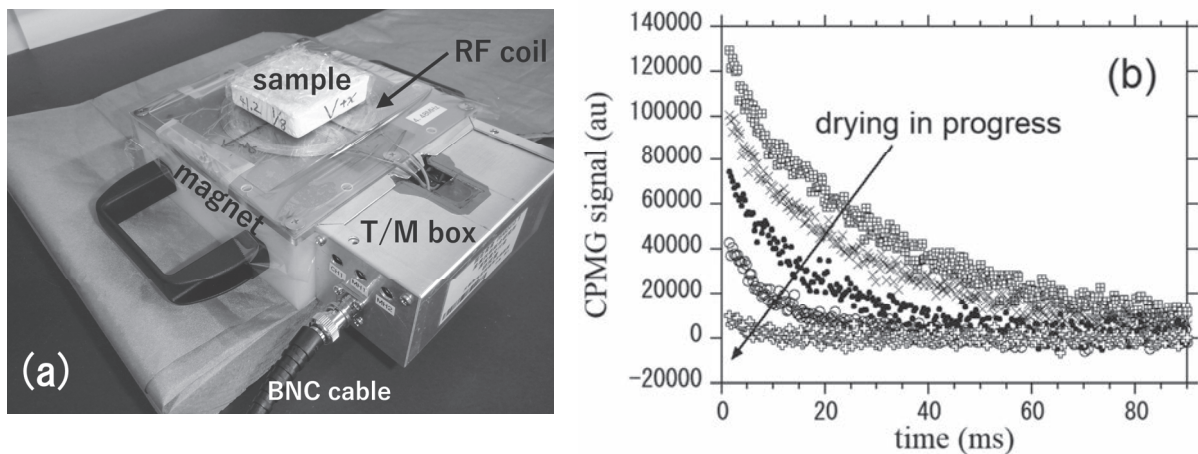


Fig. 2. Monitoring of a drying plaster plate sample in a laboratory. (a) Snapshot. The same sensor unit as Fig. 1 was used. (b) Examples of the obtained CPMG data.

References:

- [1] Y. Nakashima (2022) Jpn. J. Appl. Phys. (submitted).
- [2] Y. Nakashima and N. Shiba (2021) Int. J. Food Prop. 24, 1722-1736.
- [3] NMRニューズレター1090号（2022年7月13日）【片側NMR同好会へのお誘い】
https://www.nmrj.jp/pdf/nl/20220713_1090_1.pdf

P6Y

X染色体不活性化に關与するXist-SHARP複合体の相互作用解析

○長谷川拓矢¹, 柳沢耕太¹, 鈴木拓巳², 中島弘稀², 永江峰幸³, 青山洋史³, 三島正規^{2,3}, 坂本泰一¹

¹千葉工業大学 先進工学研究科

²東京都立大学院 理学部

³東京薬科大学 薬学部

Interaction analysis of the Xist-SHARP complex involved in X chromosome inactivation

○Takuya Hasegawa¹, Kota Yanagisawa¹, Takumi Suzuki², Hiroki Nakajima², Takayuki Nagae³, Hiroshi Aoyama³, Masaki Mishima^{2,3}, Taiichi Sakamoto¹

¹ Faculty of Advanced Engineering, Chiba institute of technology

² Graduate School, School of science, Tokyo Metropolitan University

³ School of Pharmacy, Tokyo University of Pharmacy and Life Science

X-Chromosome Inactivation (XCI) in human is known to compensate for the difference in gene expression between female and male and requires a long non-coding RNA called X inactivation specific transcript (Xist) RNA. Xist RNA has six repeat regions (A~F) in its 17 kb sequence and A repeat region is thought to be recognized SMRT/HDAC-associated repressor-protein (SHARP). Previously, some NMR analyses of SHARP or the A repeat of Xist RNA have been performed, but the detail of the interaction between Xist RNA and SHARP are unknown. In this study, we are trying to reveal the interaction using NMR.

ヒトは、男性ならXY、女性ならXXの組み合わせの性染色体を持っている。それぞれの性染色体の遺伝子量としては、X染色体が1000個程度に対して、Y染色体が50個程度である。そのため、男女間で遺伝子量の差が生じる。この遺伝子量の差を補償するために、女性のXXのうち一方のX染色体を不活性化する機構としてX染色体不活性化が存在する。そして、この機構に關与する long non-coding RNA として X inactive specific transcript RNA (Xist) RNAが明らかになっている。Xist RNAは、17kbの配列中に6つのrepeat領域(A~F)を持っている。そのうち、A repeat領域にSMRT/HDAC-associated repressor-protein (SHARP)タンパク質が結合することが明らかになっている (Fig. 1)。SHARPタンパク質は、N末端のRNA結合モチーフとC末端のSpen paralog and ortholog C-terminal (SPOC)ドメインより構成されており、SPOCドメインについては三島らによって立体構造が報告されている¹⁾。また、Duszczykらによって、Xist RNAのA repeat領域のNMR解析が行われ、A repeat領域が多量体化するモデルが報告されている²⁾。しかし、Xist RNAとSHARPタンパク質の複合体の形成機構は明らかになっていない。そこで本研究では、NMRを用いてXist-SHARP複合体の形成機構を解明することを目的にしている。

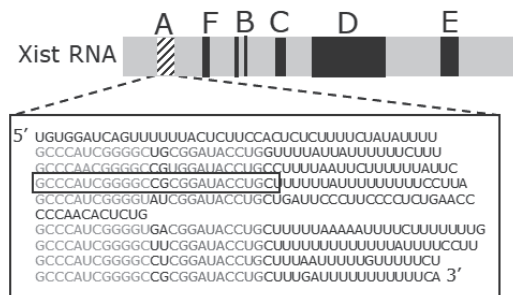


Fig. 1 A-repeat region of Xist RNA

Xist RNAは、17kbの配列中に6つのrepeat領域(A~F)を持っている。そのうち、A repeat領域にSMRT/HDAC-associated repressor-protein (SHARP)タンパク質が結合することが明らかになっている (Fig. 1)。SHARPタンパク質は、N末端のRNA結合モチーフとC末端のSpen paralog and ortholog C-terminal (SPOC)ドメインより構成されており、SPOCドメインについては三島らによって立体構造が報告されている¹⁾。また、Duszczykらによって、Xist RNAのA repeat領域のNMR解析が行われ、A repeat領域が多量体化するモデルが報告されている²⁾。しかし、Xist RNAとSHARPタンパク質の複合体の形成機構は明らかになっていない。そこで本研究では、NMRを用いてXist-SHARP複合体の形成機構を解明することを目的にしている。

Xist RNA, SHARP タンパク質, 溶液NMR

○はせがわ たくや, やなぎさわ こうた, すずき たくみ, なかじま ひろき, ながえ たかゆき, あおやま ひろし, みしま まさき, さかもと たいいち

【方法】

本研究では、A repeat領域内の一部をXist_29としてNMR解析に用いた(Fig.2). また、Xist_29に含まれる2つのstem loopのうち、5'末端側をXist_loop1、3'末端側をXist_loop2として用いた。Xist_29については、T7 RNA polymeraseを用いた試験管内転写法で調製し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動により精製した。Xist_29を¹³Cと¹⁵Nで標識した試料についても同様に調製した。A8, G11, A21およびA23を残基特異的に安定同位体標識したXist_29について、大陽日酸社に委託合成した。また、Xist_loop1およびXist_loop2については、北海道システムサイエンス社に委託合成した。測定用の溶媒については、限界ろ過膜(Sartorius社)を用いて20 mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH6.5)に交換した。測定には、AVANCE600 NMR 分光計(Bruker Biospin社)を用いた。

【結果および考察】

初めに、Xist_29、Xist_loop1 および Xist_loop2 について軽水中での NMR 測定を行い、NOESY スペクトルを用いてイミノプロトンシグナルを帰属した。その結果 Xist_29 では、G19 と U26 のイミノプロトンの間に特徴的な強い NOE が観測され、C5:G12, C6:G13, C7:G14 および C18:G27, G20:C25 がステムを形成していることが示唆された。さらに Xist_loop1 では、C5:G12, C6:G13, C7:G14 がステムを形成していることが示唆された。また、Xist_loop2 では、C18:G27, G19:U26, G20:C25 がステムを形成していることが示唆された。

次に重水中でのNMR測定を行い、Xist_29のNOESYスペクトルを用いてH8, H6, H5 および H1'のシグナルの連鎖帰属を試みた。また、A8, G11, A21 および A23を残基特異的に安定同位体標識した試料を用いて、H8, H6, H5 および H1'のシグナルの帰属を進めたが、一部のシグナルがブロードニングしてしまい、全残基の帰属が困難であった。そこで、Xist_29 を分割した Xist_loop1 および Xist_loop2 の NOESY スペクトルの連鎖帰属を行った。その結果、Xist_loop1 は G12 以外の残基の H8, H6, H5 および H1'のシグナルを帰属することができ、A8 の H2 と G12 の H1'の間に NOE シグナルが観測された。このことから、Xist_loop1 の A8 と G12 の塩基がスタッキングしていることが示唆された。また、Xist_loop2 は全残基を帰属することができた。現在、Xist と SHARP の相互作用について、解析を行っている。

参考文献

- 1) Mikami S., et al., *Structure* **22**: 35–46 (2014).
- 2) Duszczuk M.M., et al., *RNA* **17**: 1973–1982 (2011).

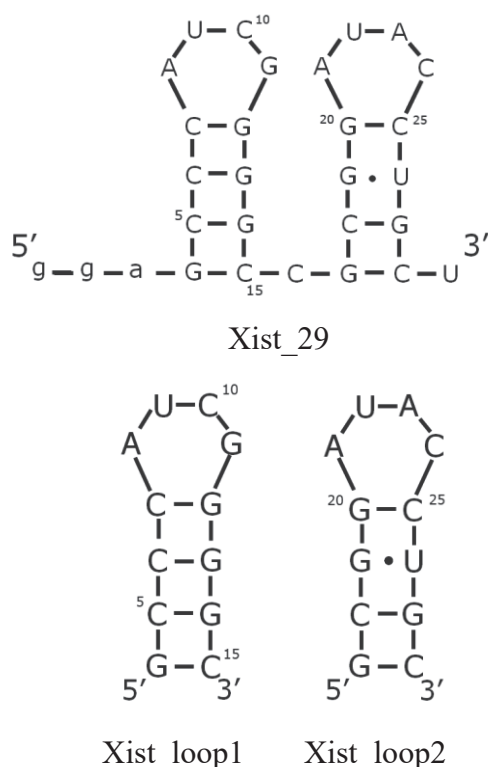


Fig. 2 Secondary structures of Xist_29, Xist_loop1, and Xist_loop2

P7

高精度リングング評価方法の開発

○山本航輝¹, トリトラカーン テシット¹, 高橋雅人², 岡村哲至¹

¹東京工業大学 工学院 機械系

²理化学研究所 生命機能科学研究センター

Development of evaluation method on ringing

○Kouki Yamamoto¹, Techit Tritrakarn¹, Masato Takahashi², Tetsuji Okamura¹

¹Department of Mechanical Engineering, Tokyo Institute of Technology

²Laboratory for NMR Engineering and Structural Science, RIKEN Center for Biosystems Dynamics Research

“Ringing” is still one of the large problems in FT-NMR to observe quadrupolar or low γ nuclei in solid-state NMR. Not only such measurements but also large RF coils in MRI or RF coils with high quality factors, such as High-Temperature Superconducting (HTS) RF coils, suffer from ringing. Some devices such as a Q switch or some special pulse sequences have been developed to shorten “dead time”. However, this problem still has been unsolved. We have developed the evaluation methodology to analyze the origin of ringing using our home-build spectrometer. This method can observe the ringing that looks like an NMR signal and which part makes ringing in the circuit to improve NMR probes and spectrometers.

NMR/MRI 装置開発における課題の 1 つにリングングがある。リングングは RF パルスの送信と同時に生じ、自由振動減衰(FID)に歪みを生じさせ NMR 信号を不明瞭にするアーティファクトである。一般にリングングが減衰し消滅するまでの時間をデッドタイム(不感時間)として対策をお行うが、その長さ分の信号強度が低下する。スピネコーを用いるとしても可能な限りデッドタイムは短いことが望ましい。固体 NMR での四極子核や低周波核、低天然存在比で信号強度が小さい場合、MRI のような大型の RF コイル、高温超伝導 RF コイルのように Q 値が高い場合などでデッドタイムが長くなり、緩和時間と同等になってしまうためこの問題に直面しやすい。

デッドタイム短縮のための研究では、これまでに Q スイッチや合成パルスシーケンスが主に提案されている。Q スイッチは一時的に Q 値を低減させプローブのリングングエネルギーを効率的に減衰させることができるが、プローブ外で発生したリングングへの対処ができないことや、一般的にアクティブ素子が使用されるため、切り替え時の過渡効果により再びリングングが生じる可能性があることへの懸念がある。また、合成パルスシーケンスは数学的手法により FID からリングングを減算する狙いがあるが、Gerothanassis¹によると、アコースティックリングングの特性は異なるフリップ角に対して一定でないため、スピネコーとの併用ができない。固体四極子核の検出にはハードウェア面でのリングング対策が理想的である。

本研究では、リングングを評価する装置として自作のNMR分光計を用いた。ナショナルインスツルメンツ社製のUSRP-2920 (Software-Defined Radio(SDR)と呼ばれる、これまでハードウェアで実現されてきた機能をソフトウェアで実現する装置)である。この装置を制御するソフトウェアをナショナルインスツルメンツ社製のLabVIEWとNI-USRPで自作した。これにより柔軟に任意の時刻の信号を測定することができ、また通常の分光計では行えないような作動のさせ方も可

リングング、高温超伝導RFコイル、四極子核

○やまもとこうき, とりとらかーんてしと, たかはしまさと, おかむらてつじ

能である。パワーアンプにはブルカー社製のものを使用し、LNAにはミニサーキット社のZKL-1R5を用いた。従来リングングの評価方法としては、励起パルスやリングング信号をオシロスコープで観察していたが、オシロスコープでは実際のNMR信号のような微弱な信号を観察するには不向きである。一方、本研究で用いた自作分光計では、リングングが発生してから減衰して微弱なNMR信号と同等レベルになるまで連続的に観測することができる。この利点を活かして、リングングの発生源を特定する実験を行った。

これまでの実験からリングングはプローブ内部で最も多く発生するが、リングングの発生源は多岐に渡ることがわかっている。リングングを正確に測定するためには、はじめにプローブ以外の影響を最小限にする必要がある。そこで、プローブの代

わりに50Ω終端抵抗を用いてプローブ外の発生源を検討し対策する手法を提案する。実験はFig. 1に示す回路を用いて行った。今回のDUT(Device Under Test)はRFパルスの周波数で共振する直列共振回路であり、挿入損失は-0.3 dB程度である。DUTを挿入しない場合を基準とし、DUTの挿入による変化について、セラミックコンデンサ(Knowles Syfer MLCCシリーズ)、マイカコンデンサ(Cornell Dubilier CMシリーズ)の2種類を用いて比較実験を行った。

実験で得られたリングングのフーリエ変換スペクトル(絶対値表記)をFig. 2に示す。RFパルスは57.91 MHz, 100 W, 100 μs、積算回数は4096回である。フーリエ変換後の結果を比較しやすくするために最初の15 μsの信号は削除した。積算回数を増やさないとわからない強度であるが、セラミックコンデンサで明確にリングングが増加した。マイカコンデンサでは発生しないことから、使用しているセラミック材料が原因であると予想できる。多結晶強誘電性セラミックはピエゾ効果(圧電効果)を持つため、RFパルスの高電圧がコンデンサ内で機械振動に変換されていると考えている。NMR/MRIでは強力なRFパルスを用い、かつ直後の微弱な信号を測定する。ピエゾ効果についてはある程度セラミックコンデンサメーカーも対策していると想像できるが、想定を超えている使い方になっている可能性がある。

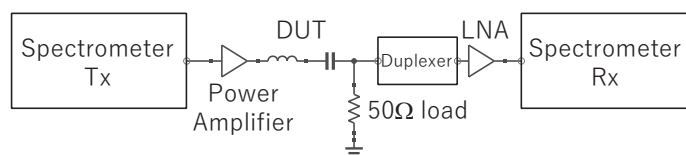


Fig. 1. Schematic of the evaluation circuit.

The ringing intensity generated by DUT(Device Under Test) was investigated using our home-built spectrometer.

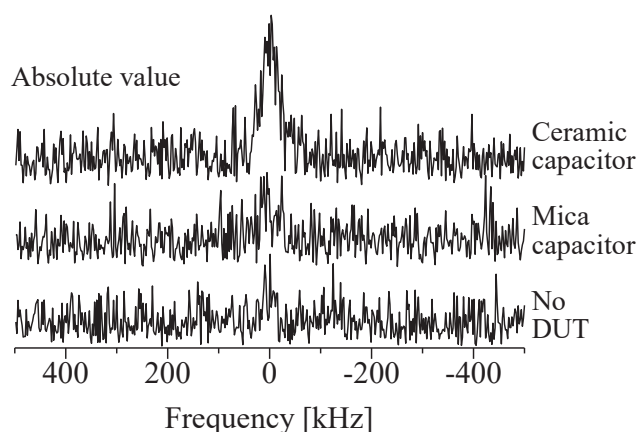


Fig. 2. FT spectra of ringing with DUT.

The applied RF pulse was 58 MHz, 100 W, 100 μs. 4096 transients were recorded and left shift before FT was 15 μs.

References

- (1) I. P. Gerothanassis, Methods Of Avoiding The Effects Of Acoustic Ringing In Pulsed Fourier Transform Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, Progress in nuclear magnetic resonance spectroscopy, Vol. 19, (1987) 267-329

P8Y

Double nutation cross polarization

○王雨¹, 武田和行¹

¹京都大学大学院理学研究科化学専攻

○Yu Wang¹, Kazuyuki Takeda¹

¹Division of Chemistry, Graduate School of Science, Kyoto University

We propose a method for cross polarization (CP) dedicated for low- γ spins, in which double nutation (DONUT) applied at the source, high- γ spins leads to the Hartmann-Hahn condition well suited for the limited nutation rate of the target spins, while the spin-locking field is retained high enough.

Introduction

Cross polarization (CP) is widely used to transfer polarization from one spin species, I , to another, S , and thereby to enhance the magnetization of the latter. In CP, resonant rf fields are applied to both I and S with such intensities B_{1I} and B_{1S} that satisfy the Hartmann-Hahn condition[1] given by $\gamma_I B_{1I} = \gamma_S B_{1S} + n\omega_r$ ($n = \pm 1, \pm 2$), where γ_I and γ_S are the gyromagnetic ratios and ω_r is the spinning speed. The condition indicates that the smaller γ_S is, the higher B_{1S} needs to be. However, application of high rf power is often undesirable. Then, one needs to reduce B_{1I} , paying the price of inefficient spin-locking in the presence of strong homonuclear dipolar interactions among spins I . A challenge in polarization transfer from the abundant spins to low- γ spins arises from these incompatible requirements.

CP using time-averaged precession frequency (CP-TAPF)[2] is one elegant solution realizing reduced nutation speed while keeping the spin-locking field high enough. However, CP-TAPF involves repetitions of abrupt inversion of the phase of the rf irradiation, which may cause significant dephasing of the magnetization. In this work, we propose an alternative CP method dedicated for the low- γ spins, employing the *smooth* rf modulation that allows both slow nutation of spins S and high-enough spin-locking field realized through double nutation (DONUT)[3], i.e., simultaneous nutations around two separate axes.

Principles

DONUT around, say, the x and the z axes, with nutation rates ω_1 and ω_2 is described by a propagator $U(t) = \exp(-i\omega_1 t I_x) \exp(-i\omega_2 t I_z)$. In the interaction representation, the I_z term of the dipolar interaction acquires time dependence with the *mixed* frequencies $\Sigma = \omega_1 + \omega_2$ and $\Delta = \omega_1 - \omega_2$, and is represented as $U^{-1} I_z U = I_z \cos \omega_1 t - (I_+ e^{-i\Delta t} + I_- e^{i\Delta t})/4 + (I_+ e^{-i\Sigma t} + I_- e^{i\Sigma t})/4$. Under continuous rf irradiation at spins S with a nutation frequency ω_{1S} , we obtain the Hartmann-Hahn condition to be

$$\omega_{1S} = \Sigma + n\omega_r \quad (1)$$

$$\omega_{1S} = |\Delta| + n\omega_r \quad (2)$$

We found that the case of Eq. (2), $|\Delta|$, which is compatible with the requirement of the slow nutation rate for spins S , causes double-quantum exchange between I and S if $\omega_1 > \omega_2$. When the z axis is chosen

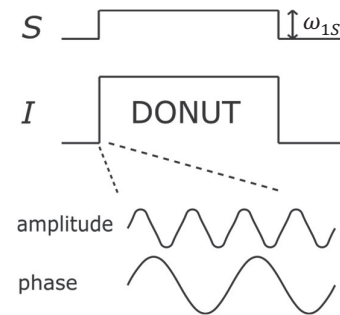


Fig. 1. A pulse sequence for DONUT CP

○おうれいん, たけだかずゆき

for the second-nutation axis, the I_z magnetization is locked. Thus, unlike the conventional CP, the initial $\pi/2$ pulse is not required. The rf Hamiltonian H_{rf} that leads to U is straightforwardly calculated as $H = i\dot{U}U^{-1} = \omega_1 I_x + \omega_2 (I_z \cos \omega_1 t - I_y \sin \omega_1 t)$, whence smooth modulations of the amplitude and phase are obtained to be $\sqrt{\omega_1^2 + \omega_2^2 \sin^2(\omega_1 t)}$ and $\tan^{-1}[-\omega_2 \sin(\omega_1 t)/\omega_1] - \omega_2 \sin(\omega_1 t)/\omega_1$. The pulse sequence for DONUT CP is depicted in Fig. 1.

Results and discussion

Fig. 2 shows ω_{1S} dependence of the ^{13}C magnetization of adamantane under ^1H - ^{13}C DONUT CP. As expected, we observed the enhancement under the conditions given in Eqs. (1) and (2). The negative enhancement with $|\Delta| + n\omega_r$ for $\omega_1 > \omega_2$ confirms the double-quantum nature of polarization transfer, as we predicted theoretically.

With applications to low- γ nuclei in mind, we examined the performance of ^1H - ^{15}N DONUT CP in ^{15}N -labeled histidine for relatively low nutation rates $\omega_{1S}/2\pi < 20$ kHz. As demonstrated in Fig. 3, the ^{15}N magnetization was enhanced with the condition $|\Delta| - \omega_r$ by a factor of 8.8, close to the maximum possible value given by $|\gamma_H/\gamma_N| \sim 10$, whereas CP-TAPF resulted in the deviation of the optimal ^{15}N nutation rate and the smaller enhancement factor.

Summary

DONUT CP offers efficient polarization transfer from the abundant to the low- γ nuclei.

References

- [1] S. R. Hartmann, E. L. Hahn, *Phys. Rev.* *128* (1962) 2042-2053.
- [2] K. Takegoshi, C. A. McDowell, *J. Magn. Reson.* *67* (1986) 356-361.
- [3] K. Takeda, A. Wakisaka, K. Takegoshi, *J. Chem. Phys.* *141* (2014) 224202.

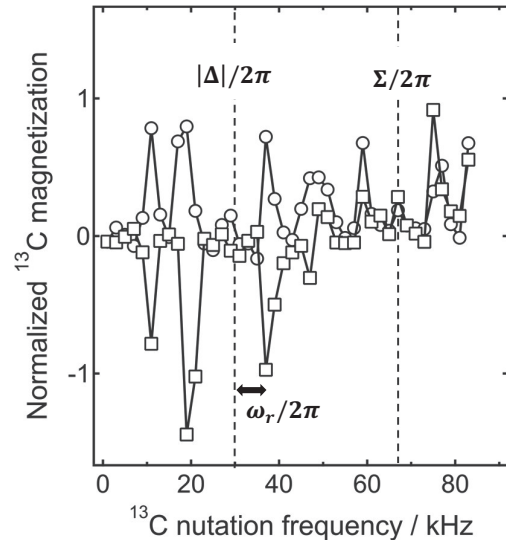


Fig. 2. ^1H - ^{13}C Hartmann-Hahn matching profiles obtained with DONUT CP with rates $(\omega_1/2\pi, \omega_2/2\pi)$ of (20 kHz, 50 kHz) (circles) and (50 kHz, 20 kHz) (squares) in 7 T under MAS at 9 kHz.

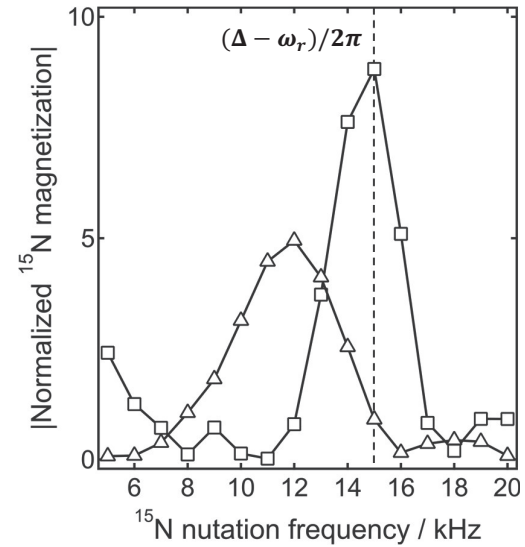


Fig. 3. ^1H - ^{15}N Hartmann-Hahn matching profiles obtained by DONUT CP (squares) with $(\omega_1/2\pi, \omega_2/2\pi)$ of (68 kHz, 30 kHz) and CP-TAPF (triangles) with an average ^1H nutation frequency of 38 kHz in polycrystalline ^{15}N -labeled histidine in 9.4 T under MAS at 23 kHz.

P9

Presaturation pulseを用いた正確な¹H-qNMRの検討

○斎藤直樹¹

¹国立環境研究所 環境リスク・健康領域 基盤計測センター

Study on an accurate ¹H-qNMR with a presaturation pulse

○Naoki Saito¹

¹Center for Environmental Standards and Measurement, Health and Environmental Risk Division, National Institute for Environmental Studies

Presaturation (pre-SAT) remains widely in use since it is one of the simplest techniques having high robustness in solvent suppressions. In the present work, accuracy of ¹H-qNMR with pre-SAT was evaluated and improved. Conventional pre-SAT decreased especially signal areas of analytes near an irradiated water signal, allowing not to accurately determining concentration values of the analytes. The improved method is a fresh dual pre-SAT for analyzing H₂O-rich samples using ¹H-qNMR. The feature of the method is performing another dummy irradiation with a suitable frequency in addition to the irradiation to the water signal. The fresh dual pre-SAT was finally demonstrated using a 10 vol% D₂O/H₂O solution.

【1. はじめに】 近年、¹H-NMRによる定量分析法（以下、¹H-qNMR）の正確さ向上に伴い、生体試料や食品など、多量な軽水を含む試料を用いたNMRメタボロミクス研究がますます増加している。これら試料を測定する際には、軽水シグナルの除去のために、古典的なPresaturation pulse（以下、pre-SAT）の利用をはじめ、pre-SATを併用した1D-NOESY法、WET法などが汎用されている。しかし、得られる定量値の正確さについては、未だ議論されることが少ない[1-3]。そこで、まずはpre-SATを用いた定量測定の正確さを評価すると共に、その正確さ向上を検討した。

【2. 実験】 分析試料にはL-フェニルアラニン、L-バリン、L-グリシンの各認証標準物質（産総研製）のほか、マレイン酸認証標準物質（富士フィルム和光純薬製）を用いた。内標準物質にはDSS-*d*₆認証標準物質（富士フィルム和光純薬製）を、溶媒には重水（D₂O、アイソテック製）および純水（H₂O）を用いた。試料調製にはマイクロ天びんおよびセミマイクロ天びん（メトラー・トレド製）を、測定には5 mm FG/THオートチューンプローブを備えた500 MHzのNMR装置（ECA500、日本電子製）を、解析にはMnova ver.7.0.2およびver.14.1.2（MestreLab製）を用いた。

まず、フェニルアラニン、バリンそれぞれが溶解するD₂O溶液（DSS-*d*₆添加剤）を試料溶液として、残留水¹Hシグナルにpre-SAT照射し、分析対象成分の濃度測定値に生じるバイアスを評価した。次に、このバイアスを排除でき得るpre-SATデュアル照射法（以下、デュアル照射法）を考案し、同溶液を用いて正確さを評価した。その後、グリシンとマレイン酸の両者が溶解する10 vol% D₂O/H₂O溶液（DSS-*d*₆添加剤）を用いて、デュアル照射法の妥当性確認試験を行った。なお、測定は定量測定条件 [測定温度25 °C、フリップ角90°、取込み時間4秒、スペクトル幅500 ppm（デジタルフィルタなし）、積算回数8回あるいは32回、繰返し待ち時間60秒など] で行った。

【3. 結果と考察】 残留水¹Hシグナルへpre-SAT照射し、フェニルアラニン、バリンのα位、β位、γ位あるいはフェニル基それぞれの¹Hシグナルより濃度測定値を求めた（Fig. 1a）。その結果、水 presaturation, qNMR, 正確さ

○さいとうなおき

シグナルからの化学シフト差の絶対値が小さいシグナルほど、大きな濃度低下を示した。この濃度低下は、pre-SAT照射出力の増大により助長され、最大48%に至った (Fig. 1c)。水シグナルからの化学シフト差の絶対値が小さくなるほど、かつ、pre-SAT照射出力が増大するほど、内標準物質に比べて分析対象成分のシグナル面積低下率が著しく増大するためと考えられる。

一方、考案したデュアル照射法は、残留水¹Hシグナルへのpre-SAT照射に加えて、分析対象成分のシグナルごとに適した周波数でのダミーのpre-SAT照射の同時実行を特徴とする (Fig. 1b; α 位¹Hシグナルの例では α を併記した下矢印)。これにより分析対象成分と内標準物質とで、pre-SAT照射によるシグナル面積低下が同等化、相殺され、分析対象成分の濃度測定値をより正しく得ることができる。例えば、フェニルアラニンの α 位¹Hシグナルの場合、通常のpre-SAT照射では最大48%の濃度低下が認められたが、デュアル照射では濃度低下を3%以下に抑制できた (Fig. 1d)。

グリシン (以下、Gly) とマレイン酸 (以下、MA) の両者が溶解する10 vol% D₂O/H₂O溶液を用いた試験では、通常のpre-SAT照射ではGly : 368.2 ± 10.5 (mg/kg)、MA : 456.4 ± 16.0 (mg/kg) となったところ、デュアル照射ではGly : 513.8 ± 21.4 (mg/kg)、MA : 512.4 ± 25.9 (mg/kg; 以上、±標準偏差×2) となり、濃度測定値が調製値 (Gly : 503.1 mg/kg、MA : 506.9 mg/kg) と測定ばらつきの範囲で一致した。これにより、考案したデュアル照射法の妥当性が確認された。

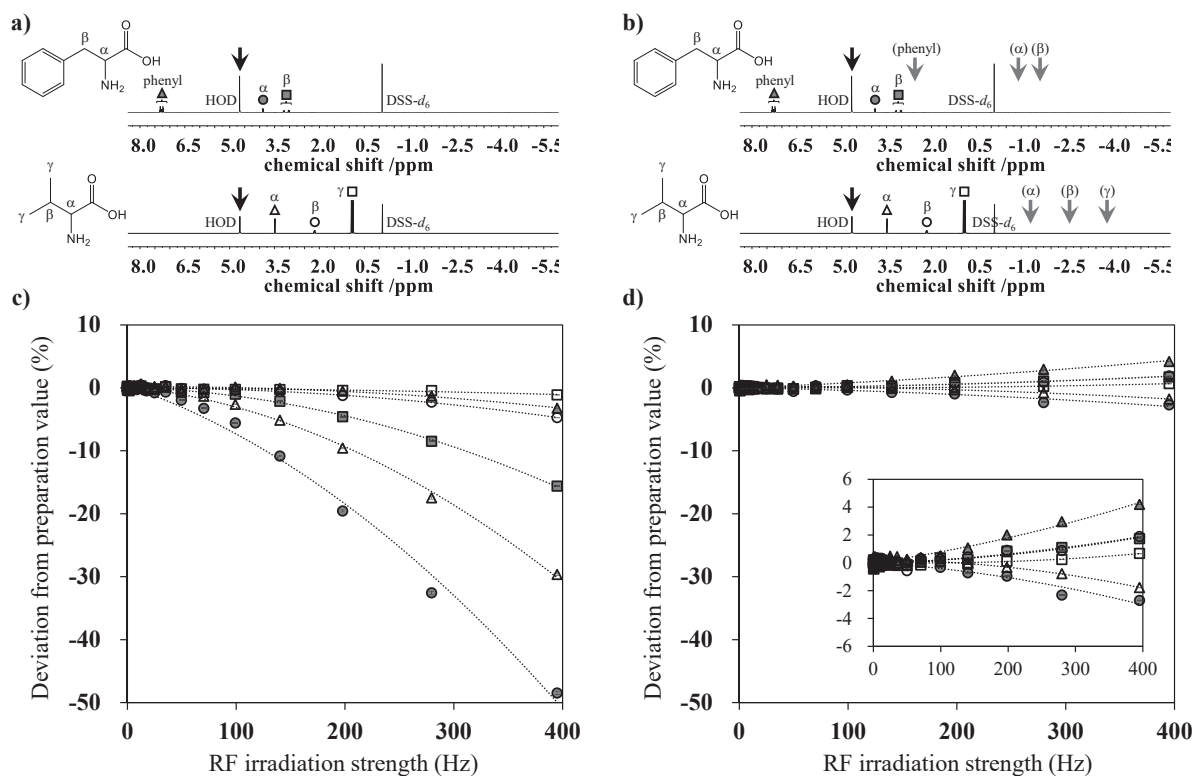


Fig. 1. Changes in measured concentration values by ¹H-qNMR with pre-SAT or dual pre-SAT.

¹H NMR spectra of D₂O solutions obtained using (a) pre-SAT or (b) dual pre-SAT are shown. The maximum range of RF irradiation attenuations for (c) pre-SAT or (d) dual pre-SAT was 112 dB to 40 dB. Error bars show the doubled standard deviation obtained by three repeated measurements at the same attenuation.

謝辞 本研究はJSPS科研費JP22K14710の助成を受けたものです。また、測定には国立環境研究所基盤計測機器のNMR装置を利用しました。

References [1] Mo and Raftery, *J. Magn. Reson.*, **190**(1), 1-6 (2008). [2] 松本ほか, *関税中央分析所報*, (61), 31-44 (2021). [3] Akira et al., *Chem. Pharm. Bull.*, **69**(8), 721-726 (2021).

P10Y 変調したマイクロ波を用いた動的核偏極効率の向上

○張仲良¹, 松木陽^{1,2}, 藤原敏道^{1,2}

1. 大阪大学・蛋白質研究所

2. 大阪大学量子情報・量子生命研究センター

Improvement of dynamic nuclear polarization efficiency using modulated microwave

○Zhongliang Zhang¹, Yoh Matsuki^{1,2}, Toshimichi Fujiwara^{1,2}

¹*Institute for Protein Research, Osaka University*

²*Center for Quantum Information and Quantum Biology, Osaka University*

In magic-angle spinning dynamic nuclear polarization NMR (DNP-MAS-NMR), depending on the microwave irradiation frequency, NMR signal is enhanced positively or negatively. Rapidly frequency modulated microwave allows us to irradiate multiple frequencies. We developed methods to apply frequency modulated microwave to obtain higher DNP-NMR signal enhancement and better spatial selectivity, both being of crucial importance for intra-cellular applications. Our spin dynamics simulation showed irradiation on two of the positive DNP enhancement peaks of Mn(II)-DOTA by turns produced a higher NMR enhancement. And we developed a pulse sequence utilizing both the positive and negative DNP enhancement peaks with frequency modulated microwave to suppress background NMR signals. Simulation on spin diffusion and experiments showed the mechanism and effectiveness of our method.

In-cell NMR uses cells containing interested protein as sample to study the protein structure and function in vivo. However, due to low target protein amount and strong background signal, we need a method to enhance NMR signals and improve its spatial selectivity. Dynamic nuclear polarization (DNP) is a popular technique for NMR signal enhancement. Microwave irradiation of unpaired electron spins in a polarizing agent mixed with the sample transfers the strong electron spin polarization to nuclear spins, leading to the NMR signal enhancement. While it has been difficult to do DNP in-cell due to the rapid reduction reaction of the unpaired electrons, we recently found the dangling-bonds electrons on the nano-diamond surface can function as an efficient polarizing agent in-cell at high-field and ultra-low temperature conditions.

The mechanism of DNP for solid-state NMR under high magnetic field are mainly solid effect(SE) and cross effect(CE). Depending on the microwave irradiation frequency, both SE-DNP and CE-DNP could enhance the NMR signal positively or negatively. Some polarizing agent could have multiple positive and negative enhancement peaks. Rapidly frequency modulated microwave generated by multiple gyrotrons or arbitrary waveform generator could irradiate a sample on multiple frequencies near the main electron spin resonance during one pulse sequence. Such frequency modulated microwave allows us to develop methods to utilize multiple enhancement peaks to obtain higher DNP-NMR signal enhancement rate or better spatial selectivity.

We first explored the possibility of getting higher enhancement rate with
Dynamic nuclear polarization, Modulated microwave

○ちょう ちゅうりょう, まつき よう, ふじわら としみち

frequency modulated microwave. One potential case is using Mn(II)-DOTA as polarizing agent. Compared to organic radical polarizing agent, Mn(II)-DOTA will not be reduced in cellular environment thus suitable for in-cell NMR, yet it suffers from usually low enhancement rate. The ESR spectrum of Mn(II)-DOTA has a sextet splitting due to isotropic hyperfine interaction. Thus the SE-DNP frequency profile shows six positive and six negative enhancement peaks. Our idea is to irradiate multiple enhancement peaks within one SE-DNP experiment. Spin dynamics simulation showed that microwave irradiation at two of the positive SE-DNP enhancement peaks by turns produced a higher NMR enhancement rate than the conventional single frequency SE-DNP. With enough microwave power, this improvement was up to 83% in the NMR signal under our parameter setting.

We next developed a pulse sequence to suppress background NMR signals to improve spacial selectivity, utilizing both the positive and negative DNP enhancement peaks with frequency modulated microwave (Fig. 1). Signals from molecules around the polarizing agent, such as within several nano-meters, should be enhanced due to the switching between positive and negative DNP with an inversion pulse in-between. While for background NMR signal coming from area far away from polarizing agent, whose build-up is mainly due to the relaxation, should be saturated towards 0 with the repetition number n taken a enough large value. Simulation on nuclear spin diffusion showed the mechanism of our method. A preliminary experimental test of this idea was conducted with nanodiamond as polarizing agent in glycerol glass matrix. The ^{13}C spins inside the nanodiamond close to the surface dangling bonds play the role of target. The ^{13}C spins of glycerol scattered in the sample play the role of background. The difference of spectra of two individual positive and negative DNP could be viewed as experiment with $n = 1$. The experimental result showed that the contrast of the target signal over the background signal improved by 160%, indicating the effectiveness of our method (Fig. 2). We will also examine the possible distance range for the spacial selection with simulations and experiments.

Overall, we developed methods using modulated microwave to obtain higher DNP-NMR signal enhancement rate or better spatial selectivity, paving a way to apply DNP-MAS NMR to intra-cellular structural biology of amyloids and membrane proteins.

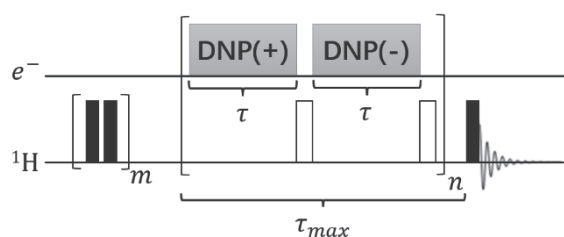


Fig. 1. Pulse sequence for background signal suppression

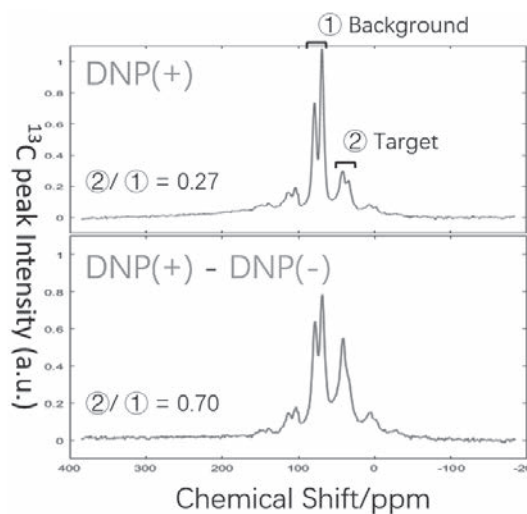


Fig. 2. ^{13}C NMR spectra of nanodiamond-embedded glycerol matrix to demonstrate the background suppression

P11

磁場掃引SWIFTによる3次元MRI

○澤田永¹, 武田和行¹

¹京都大学 大学院理学研究科

3D field-swept SWIFT MRI

○Haruka Sawada¹, Kazuyuki Takeda¹

¹Division of Chemistry, Graduate School of Science, Kyoto University

A variant of SWIFT (Sweep Imaging with Fourier Transformation) MRI employing magnetic-field sweep instead of the conventional frequency sweep requires the actual profile of the swept magnetic field for accurate data reconstruction and thereby artifact-free imaging.

SWIFT (Sweep Imaging with Fourier Transform)^{1,2}法はMRI撮像法の一つであり、騒音が小さく T_2 が短い系にも適用できるという特徴をもつ。SWIFTでは傾斜磁場の存在下で得られるrapid scan NMR信号を処理して画像を取得する。rapid scanには周波数掃引が用いられる。一方、磁場掃引を用いてSWIFTを実行すれば、超電導rfコイルやElectro-Mechano-Optical (EMO) NMRモジュールなどの狭帯域の検出器を用いたMRI撮像が実現すると期待されている³。

これまでに、磁場掃引型のSWIFTを用いたMRIが報告されているが、撮像は2次元にとどまり、またアーティファクトによる画像のひずみも大きかった³。ここで我々は、磁場掃引SWIFTによる3次元MRI撮像と、磁場掃引に起因するアーティファクトの除去について報告する。

本研究では、直径20 mmのコイルを用いた300 MHz帯共振回路とともに、傾斜磁場コイルと磁場掃引コイル(Fig. 1)を自作し、7 Tの超電導マグネットとMRI仕様に改造したOpencore NMR⁴分光計を用いてFig. 2に示す磁場掃引SWIFTシーケンスを実行し、8.9 mmのガラス球に満たしたCuSO₄水溶液の撮像実験を行った。また、画像を構成するために必要

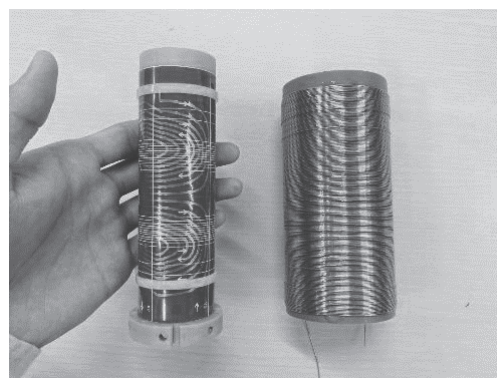


Fig. 1. A snapshot of home-made field-gradient (left) and field-sweep (right) coils.

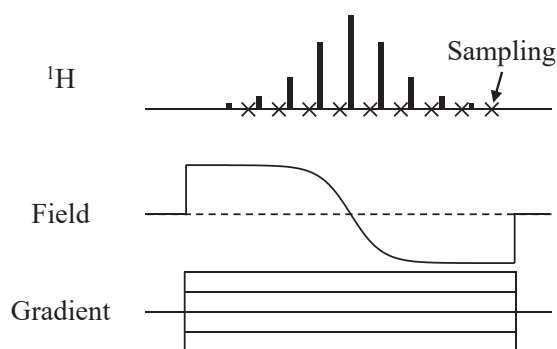


Fig. 2. A pulse sequence for field-swept SWIFT.

○さわだはるか, たけだかずゆき

なdeconvolution、データ補間、および3次元フーリエ変換を行うために、オープンソースソフトウェアOpencore NMR Process⁵を拡張した。

我々は、磁場掃引の制御信号の形状と、実際に発生する磁場の時間依存性には相違があり、画像に大きなアーティファクトが発生する要因となっていることに気づいた。そこで我々は、Fig. 3(a)に示すように、傾斜磁場をかけずに磁場掃引しながら¹Hシングルパルス測定を行い、得られたFID(Fig. 3(b))から、実際に発生している掃引磁場の時間依存性を求めた(Fig. 3(c))。これを用いてrapid scanデータのdeconvolution処理を行い、gridding^{6,7}による補間、3次元フーリエ変換を経て、Fig. 4に示すひずみやアーティファクトのない画像を得ることができた。

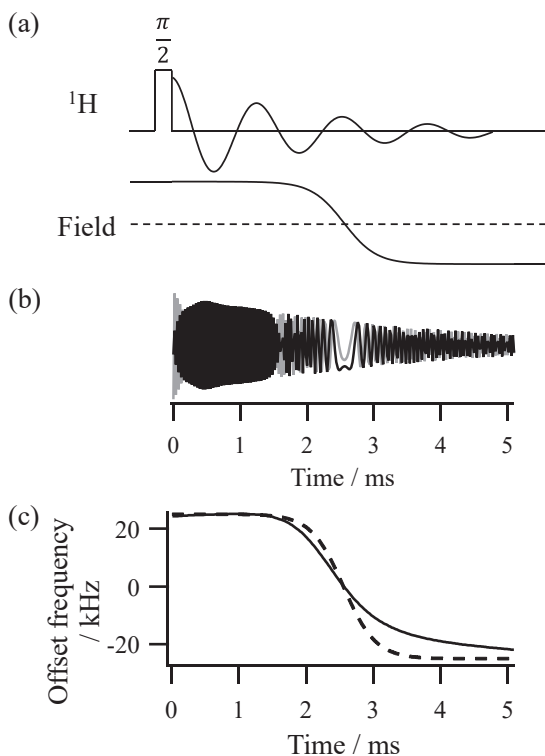


Fig. 3. (a) A pulse sequence used to monitor the profile of the swept field. (b) The in-phase (black) and the quadrature (gray) components of a ¹H FID in water with the field sweep applied during acquisition. (c) The actual (solid line) and the programmed (broken line) profiles of the swept field.

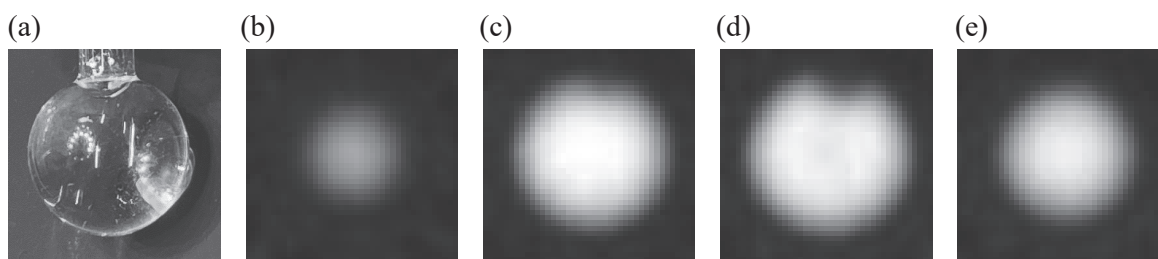


Fig. 4. (a) An 8.9 mm spherical phantom filled with 0.2 M aqueous solution of CuSO₄ (b-e) MR images obtained with field-swept SWIFT.

References

- [1] D. Idiyatullin, C. Corum, J.-Y. Park, M. Garwood, J. Magn. Reson. 181 (2006) 342-349.
- [2] D. Idiyatullin, C. Corum, M. Garwood, J. Magn. Reson. 251 (2015) 19-25.
- [3] 小林洋太, 竹腰清乃理, 武田和行, 第58回 NMR討論会 (2019) YP21.
- [4] K. Takeda, J. Magn. Reson. 192 (2008) 218-229.
- [5] <https://opencorenmr.github.io/opencorenmr-docs/>
- [6] Jackson JI, Meyer CH, Nishimura DG, Macovski A, IEEE Trans. Med. Imaging 10 (1991) 473-478.
- [7] Pipe JG, Menon P, Magn. Reson. Med. 41 (1999) 179-186.

P12

同軸チューブを用いたqNMRにおける測定管ロット管理の重要性

○小倉立己^{1,2}, 若山正隆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

Tube lot-control improves the accuracy of coaxial tube qNMR

○Tatsuki Ogura^{1,2}, Masataka Wakayama¹

¹ Institute for Advanced Biosciences, Keio University

² Shonai Regional Industry Promotion Center

Coaxial tube NMR enables to analyze without mixing two solutions and to reuse of the solution for other experiments. Since the effective volume ratio measurement is essential for coaxial tube qNMR, the tube lot-control must be improving the accuracy and repeatability. Here, we evaluated the effective volume ratio of each tube lot in various diameters of inner tubes using different solutions. As result, using φ2.5 mm inner tubes recorded high repeatability of analyses. The tube lot-control is also necessary for enhancing the quantification.

【序論】 定量NMR (qNMR) はサンプル中の¹H数がピーク面積と比例関係にあることを利用した分析法であり、質量分析計 (MS) や赤外分光法 (IR) とは異なり、濃度既知の一つの定量標準物質から様々な物質の定量解析が

可能である。qNMR法の一つである同軸チューブ法は2本の測定管を組み合わせる使用できることから、通常のNMR測定と異なり、2種の異なる溶液を混合することなく一つのNMRスペクトル上で分析可能である。この定量した溶液は対象物質以外の不純物が混入していないため、他測定機器における定量測定の標準溶液や生物応答試験などへと容易に再利用できる。

NMRにおいて、測定に必要な溶液量 (有効容積) は検出コイルにおける検出可能領域と考えられるが、装置ごとに検出コイルの大きさは異なる。同軸チューブqNMR法は内管、外管の有効容積比が解析に必要となるが、その測定法については確立されていなかった。我々はこれまで、重量測定法およびqNMR法を用いた有効容積比測定法の構築してきた (Fig. 1) (ISMAR-APNMR2021、第3回定量NMR研究会)。その過程において、内管・外管容積比をロットごとに管理することで定量精度の向上の可能性が示唆された。本研究では内管径の異なる同軸チューブの各ロットにおける有効容積比をqNMR法により算出し、同軸チューブ内管径およびロット管理に関して考察した。

定量NMR, 同軸チューブ, 測定管ロット

○おぐらたつき, わかやままたか

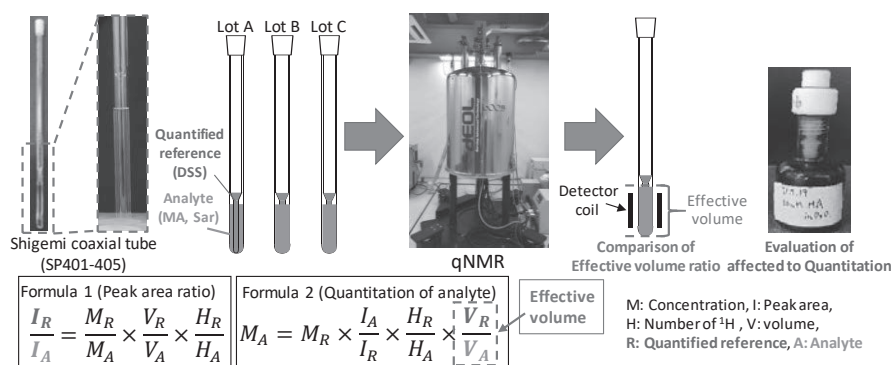


Figure 1. The scheme of coaxial tube qNMR using individual lot-controlled coaxial tube sets.

【方法】qNMR用の標準物質としてDSS-*d*₆、対象物質としてMaleic acid (MA)、Sarcosine (Sar) をそれぞれ用意し、分析用セミマイクロ天秤でそれぞれ秤量した。秤量した各試薬をD₂O溶媒で溶解し、終濃度が10mM (DSS)、50mM (MA, Sar) となるように調製した。調製した溶液のうち、MAとSarは市販の500mg/L DSS標準溶液(2.233mM)との混合溶液をqNMR解析し、定量値を求めた。また10mM DSS溶液は定量した50mM MA溶液との混合液を調製し、qNMRによる定量値算出を行った。測定管としてシゲミ製の同軸チューブ(内管下部外径: φ1.7~3mm)を各3セット用い、内管、外管それぞれについてロット番号を表記した。各内管には定量済みの10mM DSS溶液、外管には50mM MAまたはSar溶液をそれぞれ充填し、qNMR法を用いた有効容積比測定に用いた。

qNMR測定にはJeol製の600MHz NMRを用い、¹³Cデカップリング ¹H-NMR測定を行った。測定条件として、装置温度25°C、緩和時間60秒、積算回数32回で測定を行った。得られたデータはDeltaソフトウェア(ver.5.3.1, Jeol製)を用いて解析し、各ピークの面積値を取得後、有効容積比測定を実施した。

【結果・考察】ロット間の有効容積比のバラつきを評価するため、各同軸チューブにおける有効容積比を算出した。ロット間の有効容積比の変動係数(CV)はφ3mm内管が0.7%で最も低く、内管径が細くなるに従いCVが増大した(Table 1)。このことから、同軸チューブを用いたqNMRではロットごとの有効容積比を決定する必要があると考えられた。

MAおよびSarを用いて算出した各同軸チューブの有効容積比を比較し、有効容積比測定の再現性を確認した(Table 2)。φ2.5mm内管を用いた場合の有効容積比の偏差は2.2%以下と最も小さく、そのほかの内管径ではロットによって有効容積比が2.5%以上異なっていた(Table 2. 網掛け)。各測定のピーク面積値から測定安定性を評価した結果、φ2.5mm内管使用時が最も測定間のCVが小さかった。以上の結果から、同軸チューブを用いたqNMRにおいて、ロット管理されたφ2.5mm内管を用いることで、定量性の高い解析が可能になると考えられた。

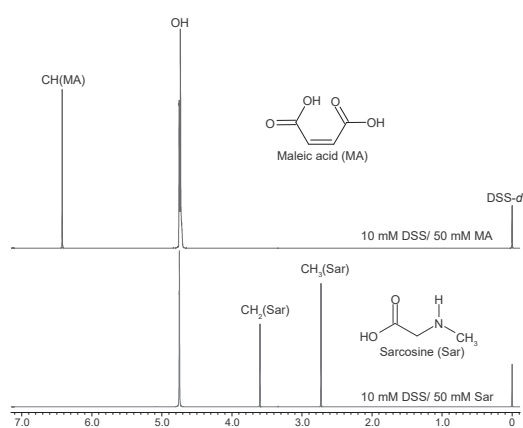


Figure 2. ¹H-qNMR spectrum of DSS/MA and DSS/Sar using φ2.5 mm coaxial tube.

Table 1. Effective volume ratio of coaxial tubes (Inner tube: DSS, Outer tube: MA).

Inner tube o.d. (mm)	Tube lot								*Effective volume ratio (V_R/V_A) was calculated using changed formula 2 in Fig 1.
	1		2		3		All		
	Mean ± SD	CV (%)	Mean ± SD	CV (%)	Mean ± SD	CV (%)	Mean ± SD	CV (%)	
1.7	0.098 ± 0.001	0.917	0.102 ± 0.001	0.544	0.096 ± 0.001	0.985	0.099 ± 0.003	2.744	
2	0.165 ± 0.000	0.298	0.160 ± 0.001	0.654	0.159 ± 0.000	0.233	0.161 ± 0.003	1.711	
2.5	0.304 ± 0.001	0.236	0.306 ± 0.001	0.425	0.315 ± 0.001	0.229	0.308 ± 0.005	1.553	
3	0.710 ± 0.001	0.167	0.701 ± 0.002	0.241	0.699 ± 0.003	0.432	0.703 ± 0.005	0.745	

Table 2. Deviation of effective volume ratios calculated from Sar and those from MA analyses.

Inner tube o.d. (mm)	Combination of molecular structure	Deviation of V_R/V_A of Sar/MA (%)		
		Lot 1	Lot 2	Lot 3
1.7	Sar (CH ₃) /MA (CH)	1.46	-6.09	2.19
	Sar (CH ₂) /MA (CH)	1.84	-5.73	2.57
2	Sar (CH ₃) /MA (CH)	-2.39	1.76	2.69
	Sar (CH ₂) /MA (CH)	-1.98	2.09	3.02
2.5	Sar (CH ₃) /MA (CH)	1.91	0.93	0.79
	Sar (CH ₂) /MA (CH)	2.20	1.32	1.08
3	Sar (CH ₃) /MA (CH)	1.23	3.26	2.69
	Sar (CH ₂) /MA (CH)	1.61	3.63	2.82

*The deviation was calculated from following formula.

$$\text{Deviation (\%)} = 100 - \frac{\text{Average } \frac{V_R}{V_A} \text{ of Sar}}{\text{Average } \frac{V_R}{V_A} \text{ of Mar}}$$

P13

高磁場 B_1 不均一分布でのヒト脳 1H MRS代謝物定量化法の開発

○渡邊英宏¹, 高屋展宏¹, 斎藤直樹¹

¹ 国立研究開発法人 国立環境研究所 環境リスク・健康領域

Development of quantitative measurement methods of metabolites on 1H MRS in human brain under inhomogeneous B_1 at high field

Hidehiro Watanabe¹, Nobuhiro Takaya¹, Naoki Saito¹

¹Health and Environmental Risk Division, National Institute for Environmental Studies

The method for measurement of metabolite concentrations in 1H MRS in a human brain at high B_0 field was proposed. A water phantom as a reference and a human brain area measured separately. The ratio of the reception sensitivities between uniform areas in the phantom and in the human brain can be computed from measured B_1 's. The ratio between the VOI and the uniform area in the human brain can be computed by our previously reported ratio map method. Then, metabolite concentrations in the VOI can be calculated. Our method was demonstrated in the phantom experiments using metabolite mixtures.

1. はじめに

非侵襲に局所領域からの 1H スペクトル測定が出来る 1H MRS では、高磁場 MRI を利用することで高感度、ピークの高分解の特徴を有する質の良いスペクトルの取得が期待出来る。このため、分析用 NMR スペクトロメーターと同様、高磁場は定量測定に有利である。しかし、測定対象が共鳴周波数の電磁波波長と同程度となる高磁場 MRI では、RF コイルに起因する B_1 分布不均一性だけでなく、測定対象が誘電体であることに起因する、つまり被検体由来の B_1 不均一分布が生ずる。このため、外部標準試料を設置して、この換算から絶対定量化、すなわち濃度定量化を行うためには、この B_1 不均一分布を考慮する必要がある。

これに対して、近年、様々な B_1 強度分布測定法が提案、開発されている。これを利用して B_1 分布を測定し、外部標準試料の位置と局所領域の測定位置との感度差を考慮すれば、濃度換算が出来そうである。一方、MRI のみならず NMR も含めた磁気共鳴測定に関して、近年、送信 B_1 と受信 B_1 が異なり、それぞれ B_1^+ , B_1^- と表せることが分かってきている¹。我々の 4.7T MRI での実験からも、生理食塩水を封入した球ファントムの送信 B_1 分布と受信 B_1 分布が相異なる

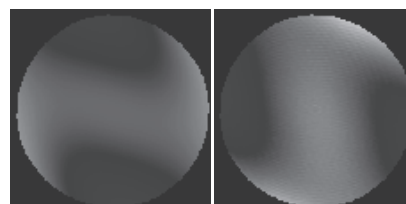


Fig. 1 Transmission field (left) and reception field (right) of a sphere phantom filled with saline measured at 4.7T.

様子が測定されている (Fig. 1)。上述の B_1 強度分布測定は、送信 B_1 分布を測定する方法である。一方、受信 B_1 分布、すなわち受信感度は、NMR 信号に乗じて測定されるため、Fig.1 に示す様な均一試料以外では測定することが出来ない。このため、感度差を求めることが出来ず、高磁場 MRI では外部標準試料を用いる方法を利用出来ない。

そこで、ヒト脳では内部水標準法という方法を用いて絶対定量化を行っている。この方法では、ヒト脳内で例えば前頭葉領域などの限定された関心領域 (VOI) から取得された水スペクトル

ヒト脳 1H スペクトル, 高磁場, 絶対定量化

○わたなべひでひろ, たかやのぶひろ, さいとうなおき

ル面積と、VOI内の含水量との関係を用いる。含水量は、VOI内の灰白質、白質、脳脊髄液の領域を分画して、それぞれの含水量既報値から算出する。しかし、疾患などの含水量変化が想定される場合に利用が出来ない、VOI内の受信感度分布の考慮が必要などの問題があった。今回、この問題を解決するために、我々がこれまでに報告してきた画像均一領域での送信 B_1^- と受信感度の同等性を利用した、ヒト脳内代謝物スペクトルの絶対定量化法を提案、開発し、ファントム実験を行ったので報告する。

2. 方法

提案法では、濃度基準ファントム（水（55.55 M）を封入）とヒト脳でそれぞれ測定を行い、 B_1^+ 比を算出する。これまでの我々の報告から高磁場でも均一領域で B_1^+ と B_1^- が同等であり、それぞれの均一領域での B_1^+ 比が B_1^- 比（受信感度比）に一致する（Fig. 2）。ヒト脳での均一領域とVOI領域との受信感度比は、我々がこれまでに開発した比率マップ法²を用いて算出する。これらの関係から、基準ファントムの均一領域とヒト脳内VOIでの受信感度比が算出出来る。この換算結果と、基準ファントムの均一領域で測定した水スペクトル面積から、ヒト脳VOIで水（濃度55.55 M）を測定した場合のスペクトル面積が算出出来る。従って、代謝物スペクトル面積から濃度定量化が可能となる。

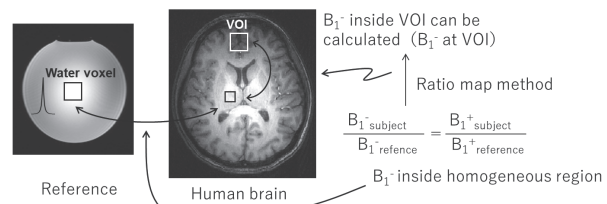


Fig. 2 Proposed quantitation method of metabolites in human brain ^1H MRS.

提案法を実証するため、ヒト全身用4.7T MRI（Agilent製）を用いてファントム実験を行った。RFコイルには、送受信兼用TEM体積コイルを用いた。対象ファントムとして10 mMのNAA、Crの混合溶液を封入した小ファントムを入れた大円筒ファントム、基準ファントムとして生理食塩水を封入した球ファントムを用いた。 B_1^+ 測定には位相法でのイメージング、 B_1^- 測定には断熱パルスSEイメージング法、スペクトル測定には8mlのVOIからSTEAM法を用いた。基準ファントムの均一領域での水スペクトル、対象ファントムのVOIでの代謝物スペクトルを取得し、提案法を用いて代謝物濃度を算出した。

3. 結果

基準ファントムと対象ファントムの均一領域での B_1^+ は、それぞれ、0.218 KHz、0.213 KHz と測定された。対象ファントム内の B_1^- 比較では、均一領域と VOI 領域との比率が 0.649 となった。基準ファントムの均一領域での水スペクトル面積が 79.4 であり、この結果、対象ファントムの VOI で、55.55 M の濃度試料に対して、スペクトル面積 $0.213/0.218 \times 0.649 = 50.3$ のスペクトルが測定される換算となった。この関係を利用して、取得された STEAM スペクトルから NAA、Cr の濃度を求めた結果、それぞれ 10.7 mM、11.1 mM と算出され、試料濃度に近い値が得られた。

4. まとめ

提案する方法は、高磁場での ^1H MRS 定量化に有用である。比率マップ法を用いて受信感度比を算出することでヒト脳 ^1H MRS に適用可能であり、絶対定量化が期待出来る。

References

- (1) Hoult DI., The principle of reciprocity in signal strength calculations – a mathematical guide. *Concepts Magn. Reson.* 2000;12:173-187.
- (2) Watanabe H., Takaya N., Mitsumori F. Non-uniformity correction of human brain at high field by RF field mapping of B_1^+ and B_1^- . *J. Magn. Reson.* 2011;212(2):426-430

P14Y

CGGリピート結合薬剤ナフチリジンダイマーによるDNA認識機構のNMR解析

○櫻林修平^{1,2}, 古板恭子¹, 山田剛史², 藤原敏道¹, 中谷和彦², 児嶋長次郎^{1,3}

1 大阪大学蛋白質研究所, 2 大阪大学産業科学研究所,

3 横浜国立大学大学院工学研究院

DNA recognition mechanism of naphthyridine dimer, a CGG repeat-binding drug, analyzed by NMR

○Shuheki Sakurabayashi^{1,2}, Kyoko Furuita¹, Takeshi Yamada², Toshimichi Fujiwara¹, Kazuhiko Nakatani¹, Chojiro Kojima^{1,3}

1 Institute for Protein Research, Osaka University, 2 SANKEN, Osaka University,

3 Graduate School of Engineering Science, Yokohama National University

More than 40 neurodegenerative disorders are caused by expansions of simple sequence repeats in the human genome. Fragile X syndrome is a repeat expansion disease caused by the aberrant CGG repeat expansions in an *FMRI* gene. Naphthyridine dimer is a synthetic small molecule binding to d(CG_n/CG_n) triad found in the hairpin structure in CGG repeats. In this study, the binding of **ND** to a double-stranded DNA (dsDNA) containing a d(CG_n) triad (**GG1**) was investigated by NMR spectroscopy. NMR titration experiments indicated that there are two different binding modes for the **GG1-ND** complex; the most stable structure (**GG1:ND** = 1:2 complex) and the transient structure (**GG1:ND** = 1:1 complex). Based on the structure and thermal stability of each complex, the DNA recognition mechanism of **ND** was discussed.

Keyword: DNA, ミスマッチ塩基対、低分子

【序論】

ヒトゲノム中のC_nXG配列の異常伸長によって生じる神経変性疾患はリピート病と呼ばれ、これまでに40種類以上が知られている。リピート病の1つである脆弱X症候群は、*FMRI*遺伝子上のCGGリピートの異常伸長が原因とされている。リピート病に対する治療戦略として、最近リピートDNA中のヘアピン構造を安定化させる低分子がリピート長を短縮することが明らかになっており、DNA認識分子によるリピート病の根治治療が期待されている¹。合成低分子ナフチリジンダイマー(**ND**, Fig.1A)はCGGリピートが形成するd(CG_n/CG_n)モチーフに結合することが知られており²、治療薬や診断のための分子プローブとしての応用が期待される。

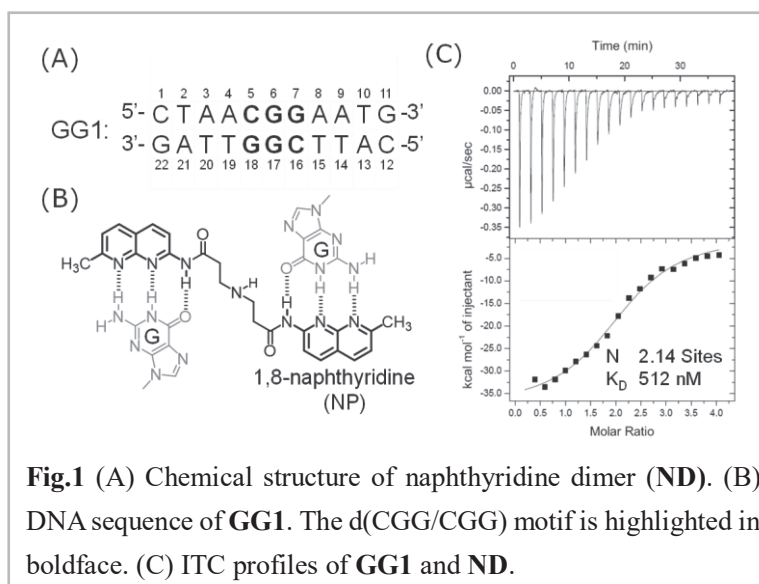


Fig.1 (A) Chemical structure of naphthyridine dimer (**ND**). (B) DNA sequence of **GG1**. The d(CG_n/CG_n) motif is highlighted in boldface. (C) ITC profiles of **GG1** and **ND**.

DNA、ミスマッチ塩基対、低分子

○さくらばやし しゅうへい、ふるいた きょうこ、やまだ たけし、ふじわら としみち、なかに かずひこ、こじま ちょうじろう

ND は 1,8-naphthyridine (NP) 部位がグアニンと相補的な水素結合を形成し、ワトソン-クリック様の塩基対を形成することで DNA を配列選択的に認識する。これまでに、等温滴定型カロリメトリー (ITC) 測定によって1つの d(CG₂/CG₂)モチーフに対して2つの **ND** 分子が結合することが示唆されているが (Fig.1C)、詳細な分子認識のメカニズムは不明である。本研究では、CGG ヘアピン構造中に見られる d(CG₂/CG₂) 配列を含む二重鎖 DNA (**GG1**, Fig1B) と **ND** の複合体を NMR によって解析した。滴定実験より、**ND** は d(CG₂/CG₂) 配列に対して、2通りの結合様式をとり、それぞれが最安定構造 (**GG1:ND** = 1:2、以降 **1:2 複合体**) と過渡的構造 (dsDNA:ND = 1:1、以降 **1:1 複合体**) であることが分かった。それぞれの複合体の立体構造に加え、熱安定性や化学交換の解析を行い、低分子 **ND** による DNA 配列の認識メカニズムに関する考察を行った。

【方法】

NMR測定は全て5%D₂Oを含むpH 6.8のリン酸ナトリウム緩衝液中で行った。溶媒除去には1-1 echo、excitation sculpting、または3-9-19パルスを用いた。滴定実験では、0.1 mMの**GG1**溶液に対して**ND**を1等量ずつ滴下し、1D ¹H スペクトルのイミノプロトン領域 (10-15 ppm) をモニターした。最安定構造 (1:2複合体) の立体構造解析には、2等量の**ND**を混合した2 mMの**GG1**溶液を用いた。¹H-¹H NOESY (混合時間は30および200 msec)、TOCSY、DQF-COSY、¹H-³¹P HSQC、¹H-¹⁵N HSQC (¹⁵N標識した**ND**を使用) およびnatural abundance ¹H-¹³C HSQCスペクトルを測定し、NMRFAM-Sparkyを用いてスペクトルの帰属を行った。NOESYスペクトル (混合時間は200 msec) を基に計算プログラムMARDIGRASを用いた。残余双極子相互作用 (RDC) は、配向剤としてPfl phageを添加し、芳香族の¹³C-¹Hカップリングの分裂幅の差異を求めることによって値を得た。計算プログラムCNS version 1.3を用いて、RDCを含まない拘束条件のもとシミュレーテッドアニーリングを行い、100構造計算したうちのNOEおよび二面角の違反がない上位30構造に対してRDCの拘束条件を加えて計算を行った。計算に用いた詳細な拘束条件はtable 1にまとめた。過渡的構造 (1:1複合体) の解析は、1等量の**ND**を混合した2.7 mMの**GG1**溶液を用いて、最安定構造の場合と同様に各種2次元NMR測定を行い、帰属を行った。NMRスペクトルを基に、分子モデリングパッケージMacroModel (Schrödinger) を用いてモデリングを行った。

【結果】

① NMR 滴定実験

GG1に**ND**を滴下し、イミノプロトン領域 (10~14 ppm) の1D ¹H スペクトルを観測することで複合体形成を追跡した (Fig. 2)。**ND**を**GG1**に対して2等量滴下した地点でシグナル変化が飽和したことから、この地点では1:2複合体のみが形成されていることが分かった。また**ND**を1等量滴下した地点では、1:2複合体とは別に1:1 (= **GG1:ND**) 複合体が形成されていることが分かった。**ND**の添加に伴い10~12.5ppmに新たなピークが出現し、NPとグアニン間での水素結合の形成が示唆された。フリーのDNA、1:1複合体、1:2複合体はNMRのタイムスケールにおけるslow exchangeのパターンを示した。

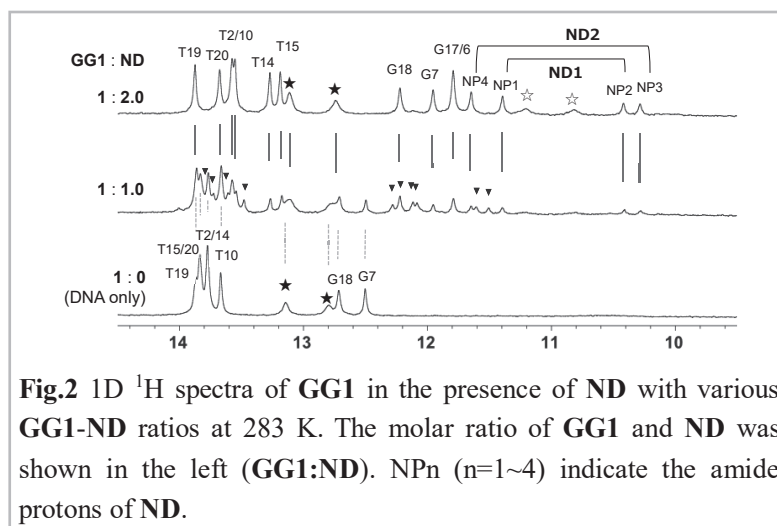


Fig.2 1D ¹H spectra of **GG1** in the presence of **ND** with various **GG1:ND** ratios at 283 K. The molar ratio of **GG1** and **ND** was shown in the left (**GG1:ND**). NPn (n=1~4) indicate the amide protons of **ND**.

② 複合体の熱安定性

滴定実験より、ND を 1 等量滴下した状態では、フリーの DNA と 1:1 複合体、1:2 複合体の 3 種の化学種が存在することが分かった。この条件下で、様々な温度で測定を行うことで、それぞれの熱安定性を調べた。その結果、30 から 40 °C の間で、フリーの DNA と 1:1 複合体は二重鎖が解離しているのに対し、1:2 複合体は 40 °C 地点でも安定に存在することが明らかになった。このことから、熱安定性は、フリーの DNA \approx 1:1 複合体 < 1:2 複合体となることが分かった。

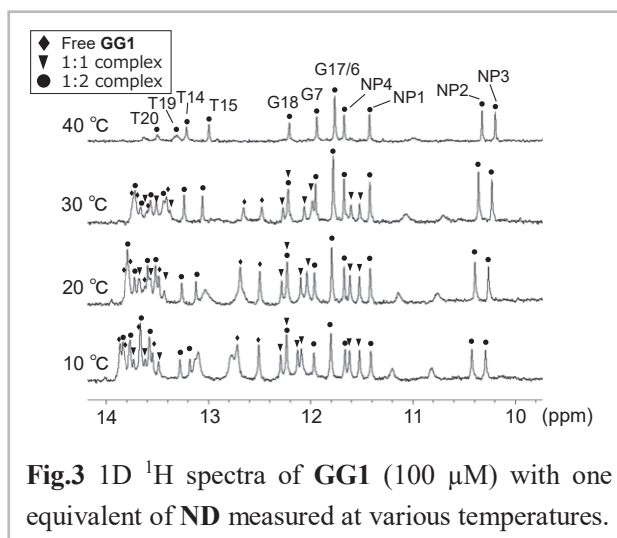


Fig.3 1D ^1H spectra of GG1 (100 μM) with one equivalent of ND measured at various temperatures.

③ 最安定構造 (1:2 複合体) の解析

GG1 に ND を 2 当量添加して測定した 2D NMR スペクトルの帰属を行った。別途 ^{15}N 標識した ND を化学合成し、 ^1H - ^{15}N HSQC 測定を行うことで (Fig. 4)、リガンド由来のピークを同定した。なお、②の熱安定性の検討において、低温ではフリーの DNA および 1:1 複合体のスペクトルへの寄与が懸念されたため、立体構造解析用の NMR 測定はすべて 40 °C で行った。立体構造計算の計算条件を table1 に、計算によって得られた複合体構造の重ね合わせを Fig.5 に示した。最安定構造である 1:2 複合体では、1 つの d(CG/CGG)モチーフに対して、2 分子の ND が結合し、シトシンのフリップアウトが生じることが分かった。

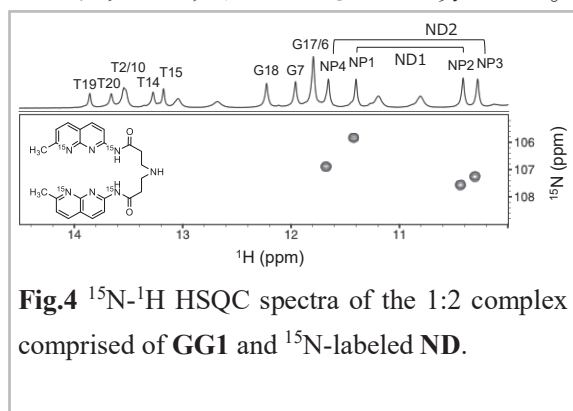


Fig.4 ^{15}N - ^1H HSQC spectra of the 1:2 complex comprised of GG1 and ^{15}N -labeled ND.

Total distance constraints	364
Intra residue	90
Inter residue	102
Intermolecular (ND-DNA)	42
H-bond	68
Planarity	12
Dihedral constraints	184
RDC	17
RMSDs to mean structure of the 30 calculated structures	
All atom (Å)	1.38 \pm 0.32
Back bone (Å)	0.97 \pm 0.16

Table 1. Structural statistics of the 1:2 GG1-ND complex.

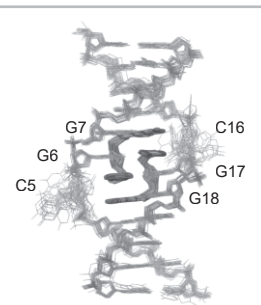


Fig.5 The NMR structure of the 1:2 GG1-ND complex.

④ 過渡的構造 (1:1 複合体) の解析

ND を 1 等量滴下した状態 (フリーの DNA と 1:1 複合体、1:2 複合体の 3 種が存在する状態) で、二次元 NMR 測定を行い解析を行った。1:2 複合体では、5 番および 16 番のシトシンは二重鎖からフリップアウトしていたのに対し、1:1 複合体ではこれらのシトシンはグアニンと塩基対を形成していることが確認された。 ^1H - ^{31}P HSQC スペクトルにおいては、 ^{31}P のケミカルシフトが

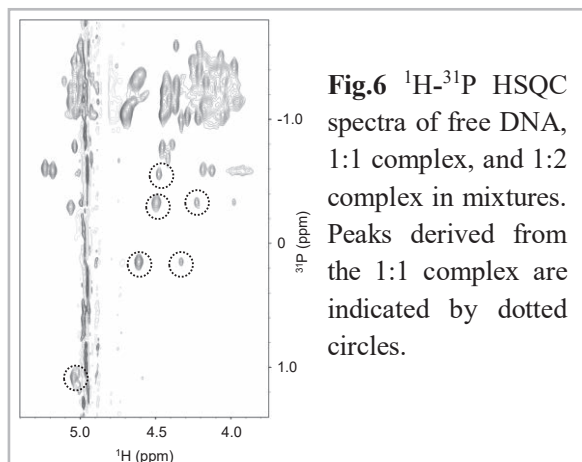


Fig.6 ^1H - ^{31}P HSQC spectra of free DNA, 1:1 complex, and 1:2 complex in mixtures. Peaks derived from the 1:1 complex are indicated by dotted circles.

顕著に低磁場シフトした 1:1 複合体由来のピークが見られた (Fig.6)。また NOESY スペクトル中で、フリーの DNA と 1:1 複合体との間での化学交換由来のピークが観測された。

【考察】

① 過渡的構造と最安定構造の安定性について

熱安定性に関しては、フリーの DNA \rightleftharpoons 1:1 複合体 < 1:2 複合体となっていることが分かった。d(CGG/CGG)モチーフにおいて、フリーの DNA では 2 つの C-G 塩基対と 1 つの G-G ミスマッチ塩基対が形成されているが、1:1 複合体では 2 つの C-G 塩基対と 2 つの G-NP 塩基対が、また 1:2 複合体では 4 つの G-NP 塩基対が形成されている。リガンドの結合においては、不安定な G-G ミスマッチ塩基対が解消および、新たな NP-グアニン間の水素結合形成が寄与していると考えられる。加えて、ナフチリジン環は 2 つの 6 員環からなる 2 環式化合物であるため、前後の塩基とのスタッキングが有利であることも複合体安定化に寄与していると考えられる。

1:1 複合体と 1:2 複合体では、塩基対の数は同じであるが、リン酸骨格に生じる歪みの大きさが異なる。1:1 複合体では ND の挿入に伴い、リガンド結合部位のリン酸ジエステル結合が引き伸ばされる。一方で、1:2 複合体ではシトシンがフリップアウトしているため、リン酸骨格の歪みが蓄積が防がれている。そのため、1:2 複合体は 1:1 複合体に比べて熱的に安定であると考えられる。実際に ^1H - ^{31}P HSQC スペクトルにおいて、1:1 複合体では ^{31}P の顕著な低磁場シフトが見られており、リン酸骨格が標準的な構造から逸脱していることが示唆されている。

② NDのDNA認識メカニズム

複合体の結合様式および想定される DNA 認識機構を Fig.7 に示した。NOESY スペクトルにおいてフリーの DNA と 1:1 複合体との間で交換ピークが観測されたことから、フリーの DNA と 1:1 複合体との活性化障壁は低く、速やかに 1:1 複合体へ移行すると考えられる。インターカレーターの前後のワトソン-クリック塩基対は不安定になることが知られており、1:1 複合体においても同様に、G-NP 塩基対の前後の C-G 塩基対は不安定になっていると予想される。この不安定な C-G 塩基対に対し 2 分子目の ND が挿入し構造変化が起こることによって、最終的に最安定な 1:2 複合体が生じると考えられる。

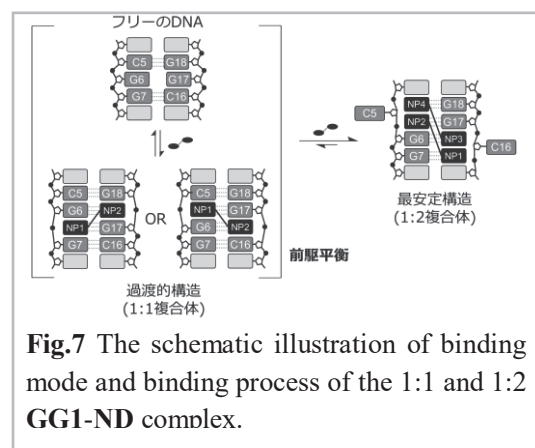


Fig.7 The schematic illustration of binding mode and binding process of the 1:1 and 1:2 GG1-ND complex.

【結論】

d(CGG/CGG)配列を認識する薬剤NDとDNAの相互作用をNMRによって解析した。最安定な1:2複合体に加え、過渡的に形成される1:1複合体のそれぞれの立体構造、熱安定性および化学交換を解析し、薬剤によるDNAの認識メカニズムを考察した。

【参考文献】

- (1) Nakamori, M., *et al.* (2020) A slipped-CAG DNA-binding small molecule induces trinucleotide-repeat contractions in vivo. *Nat. Genet.* 52, 146–159.
- (2) Nakatani, K., *et al.* (2001) Recognition of guanine-guanine mismatches by the dimeric form of 2-amino-1,8-naphthyridine. *J. Am. Chem. Soc.* 123, 12650–12657.

P15

昆虫細胞発現系におけるアラニン選択標識法の開発

○幸福裕¹, 横溝智貴¹, 今井駿輔¹, 白石勇太郎¹, 五十嵐俊介², 山口秀幸², 水越利巳², 鈴木榮一郎^{2,3}, 嶋田一夫¹

1 東京大学・大学院薬学系研究科

2 味の素株式会社

3 社団法人日本バイオ産業情報化コンソーシアム

Deuteration and selective labeling of alanine methyl groups of β_2 -adrenergic receptor expressed in a baculovirus-insect cell expression system

○Yutaka Kofuku¹, Tomoki Yokomizo¹, Shunsuke Imai¹, Yutaro Shiraishi¹, Shunsuke Igarashi², Hideyuki Yamaguchi², Toshimi Mizukoshi², Ei-ichiro Suzuki^{2,3}, Takumi Ueda¹, Ichio Shimada¹

¹ Graduate School of Pharmaceutica Sciences The University of Tokyo

² Institute for Innovation, Ajinomoto Co., Inc.

³ Japan Biological Informatics Consortium (JBIC)

G protein-coupled receptors (GPCRs) exist in equilibrium between multiple conformations, and their populations and exchange rates determine their functions. However, analyses of the conformational dynamics of GPCRs in lipid bilayers are still challenging, because methods for observations of NMR signals of large proteins expressed in a baculovirus-insect cell expression system (BVES) are limited. Here, we report a method to incorporate methyl-¹³C¹H₃-labeled alanine with > 45% efficiency in highly deuterated proteins expressed in BVES. Application of the method to the NMR observations of β_2 -adrenergic receptor in micelles and in nanodiscs revealed the ligand-induced conformational differences throughout the transmembrane region of the GPCR.

Gタンパク質共役型受容体(GPCR)は、真核生物最大の膜タンパク質ファミリーであり、多くの生理機能に関与する他、創薬標的としても重要である。近年のNMR解析などにより、GPCRは複数の構造間を交換する動的平衡状態にあり、その平衡のシフトは、シグナル伝達などの機能を制御することが明らかになってきた¹。一方で、GPCRの発現には昆虫細胞-バキュロウイルス発現系(BVES)が必要であることから、安定同位体標識法に制限があり、脂質二重膜中のGPCRの構造平衡を高い空間分解能で解析することは困難である。これまで、我々は、BVESにおける高度な重水素化とメチオニンメチル基選択的な¹³C¹H₃標識を開発し、GPCRのNMR解析に適用してきた²。本研究では、これに加えて、アラニンメチル基の選択的な¹³C¹H₃標識が可能な方法を確立した³。

安定同位体標識, 昆虫細胞発現系, 膜タンパク質

○こうふくゆたか, よこみぞともき, いまいしゅんすけ, しらいしゅうたろう, いがらししゅんすけ, やまぐちひでゆき, みずこしとしみ, すずきえいいちろう, うえだたくみ, しまだいちお

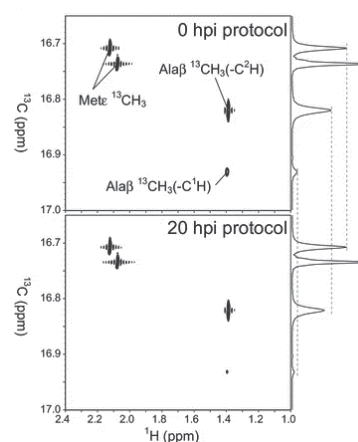


Fig. 1. Alanine-selective ¹³C¹H₃-labeling of thioredoxin with deuteration in BVES.

¹H-¹³C HSQC spectra of thioredoxin expressed in BVES with two different protocols.

メチルトROSY法を用いて、アラニンのメチル基由来のNMRシグナルを高感度に観測するには、アラニンメチル基が高い標識率で $^{13}\text{C}^1\text{H}_3$ 標識されていることに加えて、アラニン α 位が高度に ^2H 標識されることが重要である。BVESにおいては、昆虫細胞は高濃度の重水中では生育しないことから、軽水を用いた培地が必要である。この時、細胞内のトランスアミナーゼ活性により、 α 位が ^2H から ^1H に戻ってしまうことが課題であった。そこで、プロトコルの最適化をおこない、安定同位体標識アラニンとトランスアミナーゼ阻害剤を、バキュロウイルス感染後20時間で添加することとした。この条件では、アラニンメチル基の $^{13}\text{C}^1\text{H}_3$ 標識率が46%であり、そのうち α 位が ^2H 標識された割合が92%であることから、高感度観測に十分な標識率であると結論した(Fig. 1)。

この手法を用いて、GPCRの一種である β_2 -アドレナリン受容体($\beta_2\text{AR}$)のNMR解析をおこなった。14種類のアミノ酸残基を ^2H 標識し、メチオニンとアラニンのメチル基に選択的に $^{13}\text{C}^1\text{H}_3$ 標識を導入した試料を調製し、ナノディスクの脂質二重膜中に再構成した上で、 ^1H - ^{13}C HMQCスペクトルを測定した。その結果、メチオニンメチル基のNMRシグナルに加えて、22残基のアラニン残基に概ね対応する数のNMRシグナルが観測された(Fig. 2)。このことから、本手法を持ちることで、膜貫通領域を含めた $\beta_2\text{AR}$ の分子全体から構造情報を得ることができると結論した。本手法は、約300 kDaに相当する、ナノディスク中のGPCRにも適用可能であることから、他の多くの真核生物由来膜タンパク質のNMR解析に有効であると考えている。

References

- (1) Shimada, I. *et al.* (2019) GPCR drug discovery: integrating solution NMR data with crystal and cryo-EM structures. *Nat Rev Drug Discov* 18, 59–82.
- (2) Kofuku, Y. *et al.* (2014) Functional dynamics of deuterated β_2 -adrenergic receptor in lipid bilayers revealed by NMR spectroscopy. *Angew Chem Int Ed Engl* 53, 13376–13379.
- (3) Kofuku, Y. *et al.* (2018) Deuteration and selective labeling of alanine methyl groups of β_2 -adrenergic receptor expressed in a baculovirus-insect cell expression system. *J Biomol NMR* 71, 185–192.

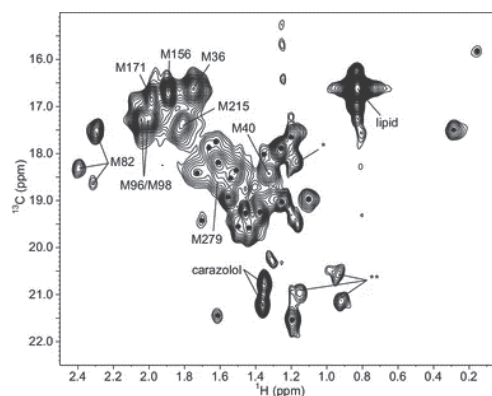


Fig. 2. Observations of $\beta_2\text{AR}$ alanine resonances in nanodisc lipid bilayers.

^1H - ^{13}C HMQC spectrum of alanine- and methionine-selective $^{13}\text{C}^1\text{H}_3$ -labeled $\beta_2\text{AR}$ in lipid bilayers of nanodisc, bound with an inverse agonist, carazolol.

P16

マテリアルリサイクルの高度化を指向した汎用プラスチックフィルム of 固体NMR解析

○田中真司¹, Phanthong Patchiya², 杉田知子¹, 八尾滋²
1産業技術総合研究所・触媒化学融合研究センター
2福岡大学・工学部

Solid-state NMR analysis of abundant plastic films toward efficient material recycling

○Shinji Tanaka¹, Phanthong Pachiya², Tomoko Sugita¹, Shigeru Yao²
1 Interdisciplinary Research Center for Catalytic Chemistry, AIST
2 Department of Engineering, Fukuoka University

The plastic waste issue has stimulated recent development of recycling method for abundant plastics. The material recycling method, in which waste plastics are recycled by simple melting and remolding, enables a low-cost and scalable process, yet the deterioration of mechanical properties hampered the application toward versatile plastic items. We have recently found that appropriate processing conditions enable a restoration of mechanical properties comparable to virgin material. Our next aim is to clarify the mechanism for restoring mechanical properties of HDPE films. Herein, we demonstrated that ¹³C longitudinal relaxation time (T_1) of HDPE films evaluated from high-field solid-state NMR analysis is a useful parameter to elucidate the relationship of inner structure of HDPE and its mechanical properties.

【諸言】

近年、プラスチックゴミによる環境汚染問題が顕在化し、リサイクル技術の高度化が求められている。廃棄された汎用プラスチックを選別・洗浄したのち、熔融・再成型する手法はマテリアルリサイクルと呼ばれ、比較的 low cost でのリサイクルが可能である。しかし、再生プラスチックはバージン品よりも機械的物性が低下する問題があり、この主要因は長期使用によるポリマー鎖の化学劣化と考えられてきた。我々は最近、廃プラスチックを適切な条件で熔融混練することで、バージン品と同等の機械的物性を示すプラスチックを再生できることを見出している¹。すなわち、物性低下の要因は化学劣化ではなくポリ

マー高次構造の変化に起因すると考えられた。この物性再生メカニズムを検証するために、種々の条件でせん断処理したHDPEフィルムを用いて、内部構造と機械的物性の関係を検証したところ、結晶層と非晶層の間に存在する中間層の比率と相関があることを見出した²。そこで本研究では、HDPEの内部構造と機械的物性の相関に関する知見を深めるために、固体NMRによる緩和時間測定を活用することで、各層のポリマー運動性と機械的物性の関係を調べた。

【実験の詳細】

本研究に用いたHDPEフィルムは、市販のHDPEペレットをタブレット化し、レオメータを用いて種々の条件でせん断処理した後、厚さ100 μmにプレス成型することで作製した。プレス後のフィルムは徐冷 (SC)、あるいは急冷 (Q) した。また、比較としてバージンペレットをそのままプレ

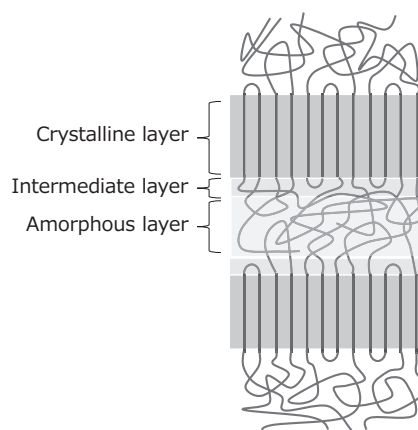


Fig. 1. Inner structure model of HDPE

○たなかしんじ, ぱんとんぱちや, すぎたともこ, やおしげる

ス成型によりフィルム化したものも作製した。これらの処理条件の異なる合計9種類のHDPEフィルムを研究に用いた。固体NMRは400 MHz (^1H 核) 磁石、3.2mm用HXプローブを用いた。パルスシーケンスはCP付き ^{13}C inversion recovery法 (Torchia法) を用い、MAS 4 kHz、CP接触時間500 μs 、測定温度75°Cとした。サンプルはフィルム状態でローター内に充填したものを用いた。

【結果と考察】

HDPEの75°Cにおける ^{13}C CPMASからは、33 ppmのメインシグナルとともに31 ppmにシグナルが観測され、それぞれ結晶層PE+中間層PEと非晶層のPEに由来することが知られている³。

Fig 2には、Torchia法によるHDPE (Virgin SC) の ^{13}C NMR測定から得られたスペクトルを示す。

^{13}C 縦緩和時間 (T_1) 解析において、33 ppmのシグナルの二成分フィッティングによって結晶層、中間層それぞれの T_1 を導出した。せん断履歴及びフィルム冷却温度の異なる9種類のHDPEフィルムについて、結晶層と中間層の ^{13}C 核 T_1 をFig 3にまとめた。結晶層の T_1 は、フィルムを急冷 (Q) した場合には短くなっていた。フィルムを徐冷 (SC) した場合、せん断強度に依存せずバージンサンプルと同等の T_1 を示した。一方、中間層の T_1 はせん断後には概ね低下しており、結晶層と同様に急冷した場合に短くなる傾向が見られた。この温度領域において、 ^{13}C 核の T_1 はPEのポリマー鎖の運動性と負の比例関係にあるため、 T_1 の長さはポリマー鎖の運動性の低さを示している。つまり、急冷したサンプル中に含まれるPEポリマー鎖は、結晶層、中間層ともに概ね運動性が高くなっていることを示唆していた。

これらの種々のHDPEフィルムサンプルについて、得られた T_1 と機械的物性値の相関関係を検証した。その結果、破断伸びは結晶層及び中間層の T_1 と負の相関関係を示し、ヤング率は中間層の T_1

と正の相関関係を示した。すなわち、中間層のポリマー運動性が機械的物性値の変化を理解する上で重要なパラメータであることを明らかとなった。

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 (JPNP20012) の結果得られたものです。

References

- (1) Okubo, H. *et al. Polymers* **2021**, *13*, 1058. (2) Phanthong, P. *et al. Appl. Sci.* **2021**, *11*, 8436. (3) Kitamaru, R. *et al. Macromolecules* **1986**, *19*, 636

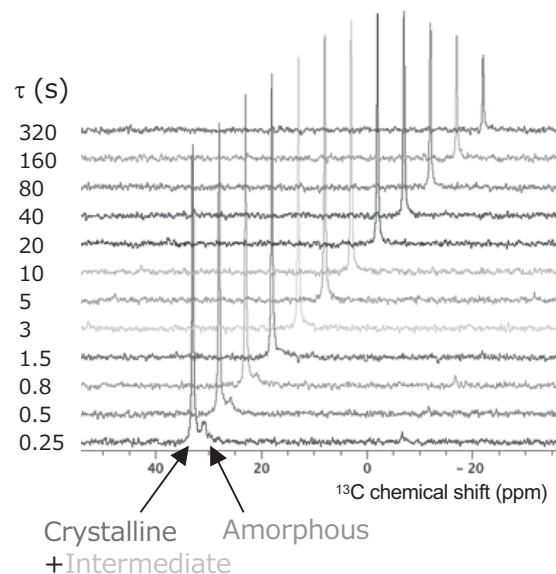


Fig. 2. ^{13}C NMR spectra of HDPE collected using Torchia's pulse sequence.

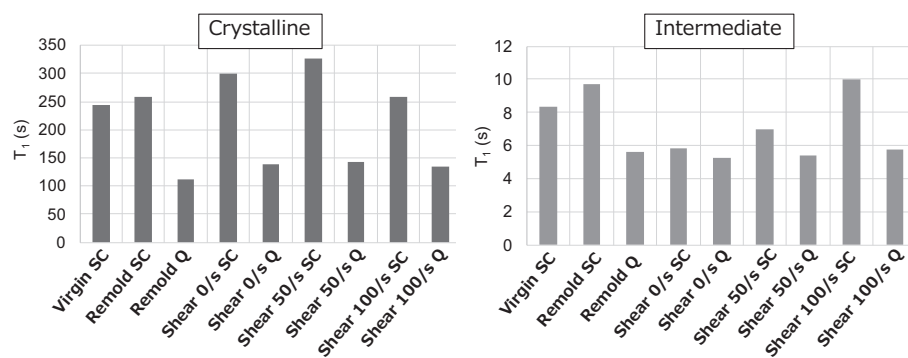


Fig. 3. T_1 values of various HDPE films. Values obtained from crystalline layer (left) and intermediate layer (right) were shown.

P17

定量NMR用認証標準物質

(フタル酸水素カリウム, NMIJ CRM 4603-a)の開発

○山崎太一、清水由隆、北牧祐子、中村哲枝、鮑新努、伊藤信靖

産業技術総合研究所・物質計測標準研究部門

Development of certified reference material for quantitative NMR (Potassium hydrogen phthalate, NMIJ CRM 4603-a)

○Taichi Yamazaki, Yoshitaka Shimizu, Yuko Kitamaki, Satoe Nakamura, Xinnu Bao and Nobuyasu Ito
National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST) / Research Institute for Material and Chemical Measurement

Quantitative NMR can be quantified based on atomic nuclei, so it is possible to obtain quantitative values with metrological traceability by using a reference material different from the substance to be measured. Until now, certified reference materials of potassium hydrogen phthalate (PHP) (NMIJ CRM 3001-c, NIST SRM 84I, etc.), which are highly water-soluble, have been widely used in quantitative NMR using heavy water as the solvent, but the certified purity is not the "purity as acid" used in quantitative NMR. However, certified purity is the "purity as acid" used in the quantitative NMR. However, certified purity is not the mass fraction used in quantitative NMR such as "purity as acid. Therefore, it was not recommended to use it strictly as a reference material for quantitative NMR. So, we developed NMIJ CRM 4603-a as a certified reference material for quantitative NMR with PHP purity as the certified value. In this presentation, we will introduce the details of the evaluation method to determine the certified value in this certified reference material.

定量 NMR は原子核を基準に定量できるため、測定対象物質とは異なる標準物質を利用して、計量計測トレーサビリティが確保された定量値を得ることができる分析法として普及し、JIS や日本薬局方などの公定法でも利用されてきている。一方、定量 NMR で用いられる標準物質には、高純度で多様な溶媒への溶解性や異なる化学シフト値を持つものなど、複数種類の標準物質が供給されていることが望ましい。当グループでは、有機溶媒系の標準物質として 3,5-ビス(トリフルオロメチル)安息香酸(NMIJ CRM 4601)と 1,4-ビストリメチルシリル-2,3,5,6-テトラフルオロベンゼン(NMIJ CRM 4602)を開発してきた。しかし、これらの物質は水溶性が低く、水系の分析では利用することが難しいという課題があった。重水を溶媒とした定量 NMR では、水溶性の高いフタル酸水素カリウム(PHP)の認証標準物質 (NMIJ CRM 3001-c、NIST SRM 84I 等) が標準物質として広く利用されていたものの、認証されている純度は、「酸としての純度」など定量 NMR で使用される質量分率などではないため、厳密には定量 NMR 用の標準物質として用いることが推奨されていなかった。このため、今回、定量 NMR 用認証標準物質として、PHP 純度を認証値とした NMIJ CRM 4603-a を開発した。本発表では、認証値決定のための評価方法の詳細について紹介する。

定量NMR、認証標準物質、フタル酸水素カリウム

○やまざきたいち、しみずよしとか、きたまきゆうこ、なかむらさとえ、ばおしんぬ、いとうのぶやす

開発した NMIJ CRM 4603-a の純度決定スキームを Fig. 1 に示す. 本標準物質の純度測定には2つの測定を用いた. まず, 類似有機不純物, 残留溶媒, 無機成分, 水分等の微量な不純物を個々に定量して,

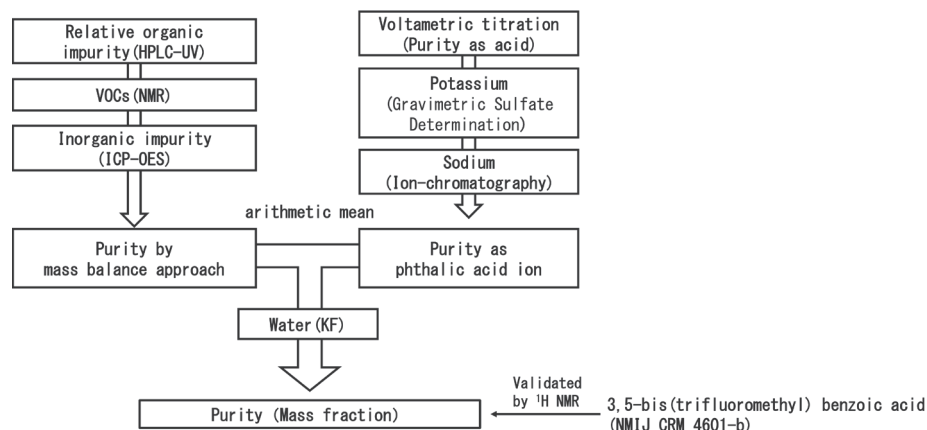


Fig. 1. Scheme of purity assessment for determination of certified values

引くことで純度を決定する差数法によって決定した純度を1つ目の純度として用いた. また, 電量滴定による酸として算出した純度とカリウムおよびナトリウムを定量して推定したフタル酸イオンとしての純度から決定した純度を2つ目の純度値として用いた. この差数法による純度とフタル酸イオンとしての純度の相加平均値(0.9998 kg/kg)をフタル酸水素カリウムの純度とした. また, 純度値に対する計量計測トレーサビリティを確保するために, 純度決定における不確かさの評価を行った. 純度の合成標準不確かさには, 各純度評価法及びその方法間差, 均質性, 安定性に起因する不確かさを合成して見積もり, 認証値を (0.9998 ± 0.0003) kg/kg (包含係数, $k=2$) と決定した. Fig.2には開発したNMIJ CRM 4603-a を示す. 既存の定量NMR用認証標準物質を基準にした本フタル酸水素カリウムの純度測定値は, (0.9997 ± 0.0006) kg/kg (包含係数, $k=2$) であり, 認証値と良好に一致したことから認証値の妥当性が確認されるとともに定量NMR用の標準物質として用いても問題ないことを確認することができた.

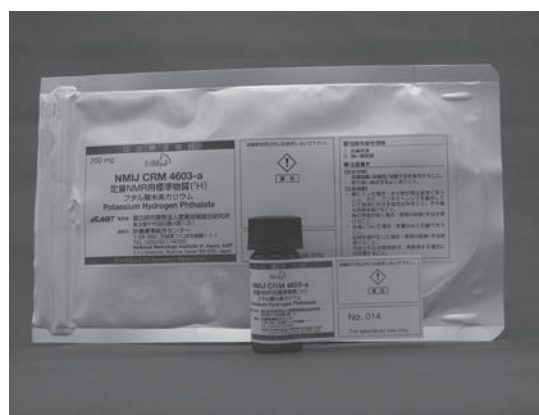


Fig. 2. Certified reference material for quantitative NMR (Potassium hydrogen phthalate, NMIJ CRM 4603-a)

P18Y

光照射溶液NMR技術を用いたプロトンポンプ型ロドプシンRxRの暗状態および光反応サイクル中間体における構造特性解析

○鈴木里佳¹, 廣西麗加¹, 小島慧一², 須藤雄気², 長島敏雄³, 山崎俊夫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.岡山大学大学院 学術研究院医歯薬域 薬学系

3.理化学研究所 生命機能科学研究センター

Structural characterization of *Rubrobacter xylanophilus* rhodopsin RxR in the unphotolyzed state and photointermediates using photo-irradiation solution state NMR spectroscopy

○Rika Suzuki¹, Reika Hironishi¹, Keiichi Kojima², Yuki Sudo², Toshio Nagashima³, Toshio Yamazaki³, Hideo Takahashi¹

¹ Graduate School of Medical Life Science, Yokohama City University

² Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Institute of Academic Research, Okayama University

³RIKEN, Center for Biosystems Dynamics Research

Exchangeable protons and their relating hydrogen bonds play important roles in structures and functions of biomolecules. However, it is not easy to directly observe them especially in the case that those protons are under rapid hydrogen exchange with solvent water, such as oxygen-bound protons. Therefore, NMR structural analyses for oxygen-bound protons were limited so far.

In this study, we employed light-driven proton-pumping rhodopsin from the eubacterium *Rubrobacter xylanophilus*, RxR, showing high stability against heat and chromophore retinal as a target molecule, and utilized the solution NMR approaches to obtain local structural information about the hydrogen bonding network around the retinal Schiff base on the unphotolyzed (dark-adapted) state and the light-adapted state (photointermediates). ¹H NMR spectra showed three exchangeable proton resonances originating from Y49, D108, and Y178 for the unphotolyzed state of RxR, which means that those OHs are buried and involved in stable hydrogen bonds. The utilization of photo-irradiation NMR approaches clarified the correlation between RxR in the unphotolyzed state and photointermediates. These results insisted hydrogen bonds related to Y49 and Y178 and the strong interaction between W75 and D205 in the light-adapted state were critical for the RxR activity.

[Introduction]

生体分子の構造維持とその機能発現には、タンパク質中の交換性水素が関与する水素結合やその変化が重要な役割を果たす。一方で、これら交換性水素は、モル単位で存在するバルク水と交換するため、その交換速度の如何によっては、それらを直接的に観測することは容易ではない。溶液¹H-NMR測定では、バルク水との交換が抑制されているアミド水素を検出する研究は盛んに行われているが、酸素原子に結合した水素原子 (OH / COOH) については、その速い交換速度のため直接観測は容易でなく、分子内部で水素結合を形成している水素原子を検出した研究報告が

膜タンパク質, 溶液NMR法, 光照射NMR技術

○すずきりか, ひろにしれいか, こじまけいいち, すどうゆうき, ながしまとしお, やまざきとしお, たかはしひでお

数例存在するのみである^{1,2}。本研究では、好熱真正細菌*Rubrobacter xylanophilus*由来で、光駆動プロトン輸送活性を有するロドプシンRxR³を解析対象とし、RxRの暗状態、および光反応中間体における水素結合ネットワークに関わる交換性水素の検出を中心とする局所構造解析を行い、RxRの機能発現に関わる構造状態の解明と、その構造維持に関与する残基の役割を理解することを目指した。

[Results and Discussion]

1. 分子内部に存在する水素結合を形成する OH/COOH 由来シグナルの観測

界面活性剤 β OG で可溶化した ¹⁵N 標識 RxR の ¹H-NMR 測定を 45°C で行ったところ、11~12 ppm の低磁場にシグナルが 2 つ観測された (Fig. 1A)。¹⁵N-filtered ¹H-NMR 測定を行ったところ、さらに 9.6 ppm にシグナルが 1 つ観測された (Fig. 1B)。化学シフト値より、これらのシグナルは OH 基、または COOH 基由来のシグナルである可能性が考えられた。

アミノ酸残基置換体を用いた NMR 解析により、これらのシグナルはレチナル近傍の水素結合ネットワーク (Fig. 2) に関与する Y49、Y178 とその近傍に存在する D108 由来であることが明らかになった。この結果より、これらの残基は、分子内部で強固な水素結合を形成しており、RxR の暗状態の構造維持に重要な残基であることが考えられた。一方、プロトン受容基の D85 やプロトン放出基の E187 由来のシグナルは観測されておらず、強固な水素結合を形成していない状態である、または脱プロトン化状態であることが考えられた。

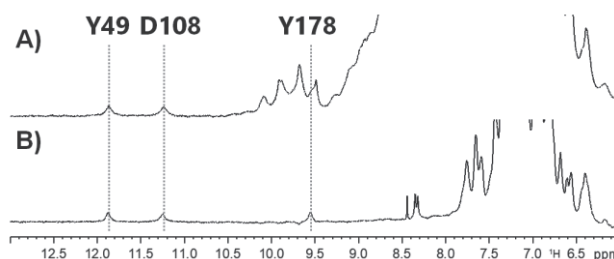


Fig. 1 1D NMR spectra of [¹⁵N] RxR in β -OG micelles. (A) ¹H-NMR spectrum. (B) ¹⁵N-filtered ¹H-NMR spectrum.

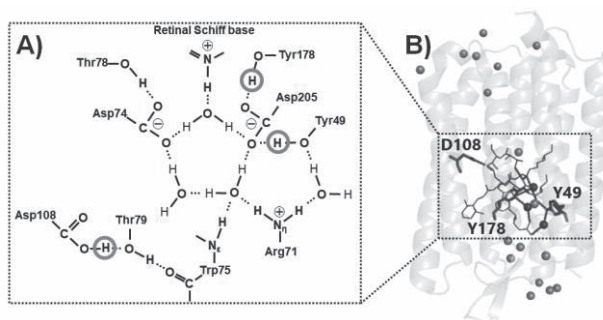


Fig. 2 Schematic of hydrogen-bonding networks around retinal (A) as inferred from the crystal structure of RxR (B, PDB:6KFQ)

2. H/D 交換実験による暗状態において観測された交換性水素のキャラクタリゼーション

観測された交換性水素のキャラクタリゼーションを目的とし、H/D 交換実験を行った。その結果、Y49、D108 由来のシグナルと Y178 由来のシグナルには H/D 交換速度に違いがあることが示された (Fig. 3)。Y49、D108 由来のシグナルは、試料を重水置換した直後のスペクトルで観測されなかったことから、 10^{-3} sec^{-1} 以上の H/D 交換速度であることが推定される一方で、Y178 由来のシグナルの H/D 交換速度は、経時変化の解析結果より $4.5 \times 10^{-6} \text{ sec}^{-1}$ で

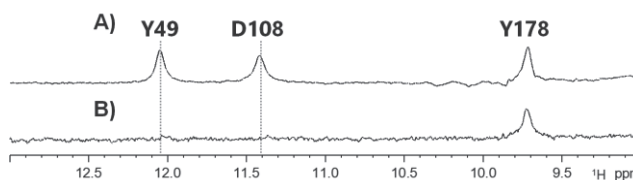


Fig. 3 H/D exchange experiment on RxR. ¹⁵N-filtered ¹H-NMR spectra of [¹⁵N] RxR in H₂O buffer (A) and after 7 hours in D₂O buffer (B).

あった。一方で、CLEANEX-PM 測定を実施したところ、バルク水からこれらの交換性水素への磁化移行は検出されなかったことから、水分子との交換速度は $< 10^{-1} \text{ sec}^{-1}$ であることも推定された²。分子内で強固な水素結合を形成している状態でも、H/D 交換反応が起きることが示され、同じ水素結合ネットワークに存在する残基でも H/D 交換速度に違いがあることが明らかとなった。

3. 水素結合ネットワークに関与するアミノ酸置換体の NMR 測定と輸送活性評価

レチナール近傍の水素結合ネットワークの核となる残基であり、プロトン輸送に直接関与する D74 と D205 のアミノ酸置換体の NMR 測定を行うと、Y49、Y178 由来のシグナルが消失することが判明した (Fig. 4)。D74 のアミノ酸置換体 D74N RxR はプロトン輸送活性を有しておらず、D205N RxR のプロトン輸送活性は野生型の 4 分の 1 以下であることが報告されている⁴。本実験結果より、交換性水素が検出された Y49 および Y178 は、推定される水素結合ネットワーク内で D74、D205 と相互作用し、機能発現を維持する重要な役割を有していると推定された。

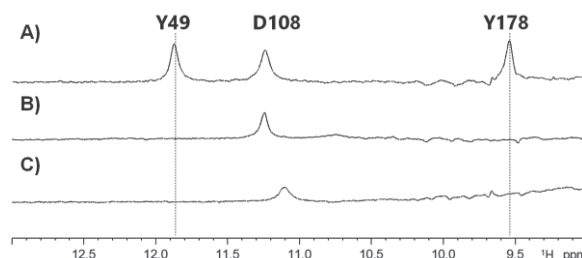


Fig. 4 ^{15}N -filtered ^1H -NMR spectra of $[^{15}\text{N}]$ RxR (A) and the counterion mutants; D74N RxR (B) and D205N RxR (C).

4. 光照射 NMR 測定⁵による光反応サイクル中間体由来シグナルの検出

RxR のレチナールの吸収極大近傍の波長 525 nm の光を照射した ^{15}N -filtered ^1H -NMR 測定を行ったところ、3 つの交換性水素シグナルの強度が低下し、新たなシグナルが観測された。光照射後の待機時間 (d21) を変化させた時間分解計測の結果、光照射 NMR で新たに観測したシグナルは 20~30 ms の寿命の中間体由来であることが示された (Fig. 5A)。光反応サイクル解析結果と考え合わせると、光照射測定により検出されている状態は、光反応における後期中間体であると考えられた。

光照射 NMR 測定によって観測された新たなシグナルの由来を明らかにするため、混合期 (50 ms) に光を照射した ^{15}N -filtered ^1H - ^1H EXSY (SC-NMR) 測定を行った (Fig. 5B)。その結果、Y49 由来のシグナルは 0.4 ppm、Y178 由来のシグナルは 1.0 ppm の高磁場シフトしたシグナルと相関ピークを示し、後期中間体状態でも水素結合が維持されていることが示唆された。その一方で、D108 由来のシグナルは観測されず、D108 が形成している水素結合は不安定な状態になっていると考えられた。

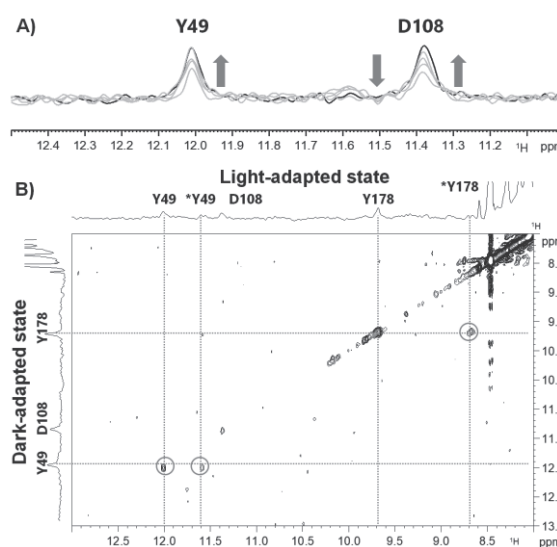


Fig. 5 (A) Time-resolved ^1H -NMR spectra of $[^{15}\text{N}]$ RxR (gray; d21= 1, 10, 16, 24, 36 msec, black; d21 = 100 ms). (B) ^{15}N -filtered ^1H - ^1H EXSY (SC-NMR) spectrum of $[^{15}\text{N}]$ RxR with the light irradiation during the mixing time.

5. 光照射 NMR 測定において観測された低磁場シフトしたシグナルの解析

光照射下で ^1H -NMR 測定を行ったところ、12.7 ppm 付近に、 ^{15}N -filtered ^1H -NMR では観測されなかった NH 由来シグナルが観測された (Fig. 6 A)。低磁場シフトした NH 由来のシグナルの同定に向けて光照射下での ^1H - ^1H EXSY (SC-NMR) 測定 (Fig. 6 B) を行った結果、検出された NH 由来のシグナルは Trp 側鎖由来であることが示唆された。アミノ酸残基置換体により Trp 側鎖由来シグナルの帰属を行った結果、retinal 近傍に存在する W75 の側鎖由来シグナルが後期中間体において 3.0 ppm の顕著な低磁場シフトをしていることが示された。

RxR と相同性の高い bacteriorhodopsin (BR) の光反応中間体の時間分解結晶構造では、暗状態に比べ、後期中間体では、BR W86 (RxR W75) の側鎖インドール窒素が、BR D216 (RxR D205) 側鎖に接近することが報告されている⁶。RxR の光照射 NMR 測定で観測された W75 の低磁場シフトは、後期中間体状態において W75 と D205 との距離が暗状態よりも近づき、水素結合が強固になったことに起因すると推定された。W75 のアミノ酸置換体のフラッシュフォトリシス解析では、野生型と比べて後期中間体の時定数が長くなることが示されており、W75 と D205 の相互作用は後期中間体構造形成に重要な役割を果たすことが示唆された。

[Conclusion]

本研究では、通常、観測が困難と考えられている酸素原子に結合した交換性水素が、プロトンポンプロドプシンの活性部位近傍で観測されており、それらが機能上重要な水素結合ネットワーク形成に寄与していることを明らかにした。さらに、暗状態、光反応中間体におけるこれら交換性水素由来シグナルの相関が明らかになるとともに、活性部位近傍 W75 の側鎖 NH は光反応中間体において顕著な低磁場シフトし、強固な水素結合に寄与することが推定された。これら、Y49、Y178、W75 といった残基は、他のプロトンポンプロドプシンにおける保存性が高く、これらの残基に関する知見は普遍性が高いものと考えている。

[References]

- (1) Sigala PA Tsuchida MA, Herschlag D. (2009) *PNAS*. **106**, 23.
- (2) Baturin SJ, Okon M and McIntosh LP. (2011) *J Biomol NMR*. **51**, 379.
- (3) Kanehara K, Yoshizawa S, Tsukamoto T and Sudo Y. (2017) *Sci. Rep.* **7**, 44427.
- (4) Kojima K, Ueta T, Noji T, Saito K, Kanehara K, Yoshizawa S, Ishitaka H and Sudo Y. (2020) *Sci. Rep.* **10**, 282.
- (5) Nagashima T, Ueda K, Nishimura C and Yamazaki T. (2015) *Anal Chem.* **87**, 22.
- (6) Borshchevskiy V et al. (2022) *Nat Struct Mol. Biol.* **29**, 5.

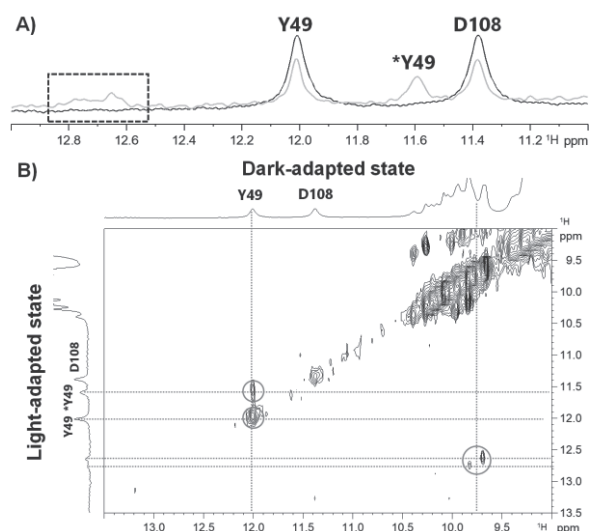


Fig. 6 (A) ^1H -NMR spectra of the dark-adapted state (black) and the light-adapted state (gray). The resonance originating from Trp indole NH is surrounded by dotted-line box. (B) ^1H - ^1H EXSY (SC-NMR) spectrum of ^{15}N RxR with the light irradiation period prior to the NOESY pulse scheme.

P19

CO₂のダイナミクスを通じた多孔性配位高分子の構造転移過程の解析

○曾利惟恵¹, 栗原拓也¹, 雨森翔悟², 重田泰宏², 井田朋智¹, 水野元博^{1,2}

1 金沢大学大学院自然科学研究科

2 金沢大学ナノマテリアル研究所

Study of structural transition process of a porous coordination polymer through observation of adsorbed CO₂ dynamics

○Yue Sour¹, Takuya Kurihara¹, Yasuhiro Shigeta², Syogo Amemori², Tomonori Ida¹, Motohiro Mizuno^{1,2}

1 Graduate School of Natural Science and Technology, Kanazawa University

2 Nanomaterials Research Institute, Kanazawa University

Porous coordination polymers (PCPs) have been studied as gas-adsorption materials. Flexible PCPs frequently show adsorption-induced pore-expansion behavior called “gate opening”. The gate-opening phenomenon has been attracted attention as a useful property for gas separation because of its gas-selective feature. However, the mechanism of guest-induced structural transition in gate opening has not been sufficiently understood. In this study, we investigated gate-opening mechanism of a PCP through dynamics of adsorbed CO₂ by solid-state ¹³C NMR. Analyses of ¹³C chemical shift anisotropy (CSA) and T₁ relaxation times indicate that the structural transition of the PCP gradually progresses from crystallite surface to core with increasing CO₂ pressure.

【序論】多孔性配位高分子(PCP)は、金属イオンと配位子から成る多孔性金属錯体であり、ガス吸着材料として研究されている。配位結合などの比較的弱い相互作用からなる柔軟な骨格を持つため、一部のPCPはゲートオープンと呼ばれる、あるガス圧で細孔径の拡大を伴う結晶構造転移が生じ、ガス吸着量が急増する現象を示す。吸着する分子によってゲートオープンの起きる圧力が異なるため、ガス分離に有用な特性として注目されている。ゲートオープンではガスがPCPと相互作用することで、構造を形成する配位子間相互作用の様子が変化し、構造転移が生じる^[1]。一方で、どのようにガスがPCPと相互作用して構造転移が進行するのか、その過程は明らかではない。本研究では、CO₂に対してゲートオープンを示すCID-5

([Zn(4,4'-bipyridine)(5-NO₂-isophthalate)]_n, Fig. 1)^[2]に対し、CO₂雰囲気下における固体NMR測定を行い、吸着するCO₂のダイナミクスの解析を通じた構造転移のメカニズムの解明を試みた。

【実験】CIDは既報に従い合成した^[2]。CO₂雰囲気下粉末XRD測定(波長0.7999 Å)はSPring-8にて行った。固体NMR測定は7 Tの磁場においてMAS速度を4 kHzとして実施した。Oリングの付いたスクリュー式キャップを備えた自作試料管をガス導入用ライン中でふたをすることで^[3]、¹³CO₂ (¹³Cガス雰囲気下固体NMR, 多孔性配位高分子, ゲートオープン

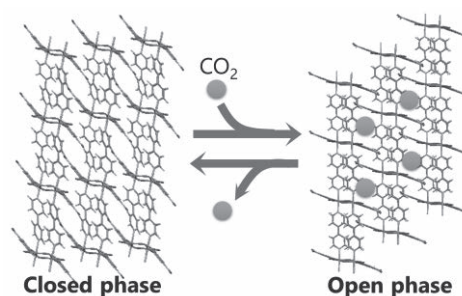


Fig. 1. Crystal structures of CID-5 (pore-closed and -open phases).

○そうりゆえ, くりはらたくや, しげたやすひろ, あめもりしょうご, いだともり, みずのもとひろ

99%)下における ^{13}C 測定を行った。 CO_2 吸着等温線(Fig. 2a)よりガス圧は0 MPa、ゲートオープン直前・最中・直後の0.14, 0.29, 0.44 MPa、および、吸着量が飽和している0.79 MPaの5点に設定した。

【結果・考察】 CO_2 雰囲気下XRD測定の結果をFig. 2bに示す。0.300 MPaを境にXRDパターンが変化したことから、吸着等温線に示される通り0.3 MPa付近において構造転移が起きていることを確認した。転移の進行途中にあたる0.300 MPaでは、転移前のclosed構造と転移後のopen構造のパターンが混在し、2相が混在していることが読み取れる。

^{13}C 1-pulse MAS測定により、吸着した CO_2 の運動状態を解析した。 ^{13}C スペクトルには全圧力下でスピニングサイドバンド信号が観測された。(Fig. 3) これは CO_2 がCIDと相互作用、つまりは吸着し運動が異方的に制限されていることを示している。 CO_2 の吸着状態を調べるために、サイドバンド信号に対し化学シフト異方性(CSA)の解析を行った。(Table 1) 各圧力下で見かけのCSAの値に大きな違いはなかったことから、細孔を持つopen構造と細孔が閉じたclosed構造(0.14 MPa)で CO_2 の吸着状態は近いことがわかる。つまり、構造転移前である0.14 MPaにおいても CO_2 が細孔内に吸着していると示唆される。XRDパターンでは0.14 MPaはclosed構造であるが、XRDでは見えない結晶粒子の表面付近のみがopen構造に転移しており、その細孔に CO_2 が吸着していると考えられる。

次に、0.300 MPaのopen構造とclosed構造の2相が混在している状態について、 CO_2 の ^{13}C T_1 緩和時間より解析を行った。closed構造とopen構造に転移した2種類の結晶粒子が混在している状態を仮定しclosed構造である0.14 MPaの T_1 とopen構造である0.79 MPaの T_1 の2つの値を用いたdouble expでは、0.29 MPaにおける T_1 緩和の様子を再現できなかった。そのため、1つの結晶粒子内に転移した部分(open構造)と転移していない部分(closed構造)が共存した状態であると考えられる。各圧力の T_1 はsingle exp曲線で解析でき、また圧力増加に伴い長くなった。これは、気体の CO_2 と吸着した CO_2 の間で交換が起き T_1 が平均化されているためであり、吸着した CO_2 の割合が増えるにつれて T_1 が長くなったと考えられる。以上より、CIDにおいて構造転移はガス圧の増加とともに、結晶表面から中心部へ向かい徐々に進行していくことが示された。

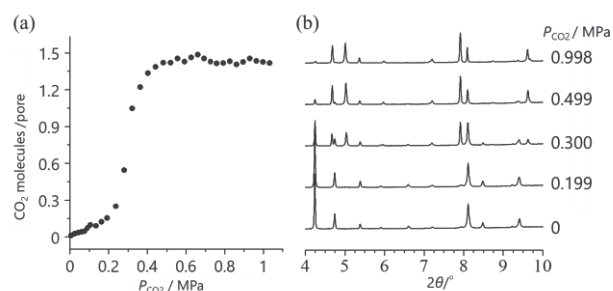


Fig. 2. (a) CO_2 adsorption isotherm and (b) synchrotron powder XRD pattern under 0-1 MPa CO_2 .

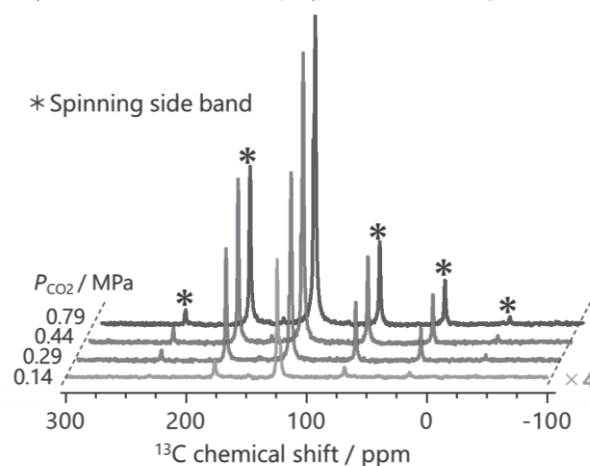


Fig. 3. ^{13}C 1-pulse MAS spectra of CID under different CO_2 pressures.

Table 1. The results of CSA analysis and T_1 relaxation time of adsorbed CO_2 .

P_{CO_2} / MPa	δ_{iso} / ppm	δ_{aniso} / ppm	T_1 / s
0.14	122.2	-105.3	0.34
0.29	122.7	-110.2	1.37
0.44	122.7	-109.3	1.59
0.79	122.7	-105.9	2.41

References

- (1) H. Yang et al., ACS Cent. Sci. 2018, 4, 1194–1200.
- (2) S. Horike et al., Chem. Sci. 2012, 3, 116–120.
- (3) T. Kurihara et al., J. Phys. Chem. Lett. 2022, 13, 7023–7028

P20Y

酸素同位体および高感度固体¹⁷O NMRによる石炭の酸化反応機構解析

○畑友輝^{1,4}, 奥下慶子¹, 高橋貴文¹, 金橋康二², 齋藤 公児³, 則永 行庸⁴

1 日本製鉄株式会社 先端技術研究所

2 日鉄テクノロジー株式会社

3 日鉄総研株式会社

4 名古屋大学 化学工学システム専攻

Oxidization mechanism analysis using isotope oxygen gas and high sensitivity solid state ¹⁷O NMR spectra for coal.

○Yuki Hata^{1,4}, Keiko Okushita¹, Takafumi Takahashi¹, Koji Kanehashi², Koji Saito³, Koyo Norinaga⁴

¹ Advanced Technology Research Laboratories, Nippon Steel Corporation

² Nippon Steel Technology Co., Ltd.

³ Nippon Steel Research Institute Corporation

⁴ Department of Chemical Systems Engineering, Graduate School of Engineering, Nagoya University

For direct observation of oxygen functional groups generated during oxidation reaction and analysis of the oxidation mechanism, coal was treated at 40 – 150 degree C under ¹⁷O₂ atmosphere. Solid state ¹⁷O MAS NMR spectra of the oxidized coal were acquired by using oldfield echo pulse sequence. Since the ¹⁷O MAS NMR spectrum acquired by single pulse sequence suffered from distortion caused by ringing phenomenon, the oldfield echo pulse sequence was used to eliminate the spectral distortion. As a result, two kinds of oxygen functional groups generated by oxidation were observed. Based on the quantitative analysis of ¹⁷O MAS NMR spectra, it was found that the amount of oxygen functional groups increased with an increase of oxidation temperature. Furthermore, pjMATPASS sequence revealed aldehyde group generated in oxidized coal by eliminating the spinning side band (ssb) interference from ¹⁷O MAS NMR spectra.

[1] 緒言

省CO₂排出やコスト競争力向上に向けて、今後、低品位の石炭やバイオマスの活用が一層求められる。一方、低品位の石炭やバイオマスは自然発熱し易い性質があり、この発熱に起因した大規模な火災や事故が古くから知られており¹⁾、十分な対策が必要である。自然発熱の抑制法確立や安全な管理技術構築には自然発熱現象を化学的に理解する必要があり、そのためには、酸化反応による石炭の分子構造変化に関する知見が必要である。Wangら²⁾はFT-IRやXPSを用いて、酸化反応時の酸素官能基生成を見出した。また、内田ら³⁾は、¹⁸O₂濃縮ガス雰囲気下で石炭を酸化させた際、発生した主なガスは¹⁶Oを含むCO およびCO₂であったことから、雰囲気中の¹⁸Oは石炭内部に固定されることを示した。しかしながら、この固定された酸素が、石炭の酸素官能基に取り込まれた明確な証拠は得られていない。本研究では、固体NMR法により石炭中の酸素を直接観測することで、雰囲気酸素が取り込まれる化学構造を解明すると共に、その情報を基に酸化反応機構を検討することを目的とした。通常、天然石炭に存在する酸素官能基は殆ど¹⁶Oであり、NMRで観測可能な¹⁷Oは、僅か0.038%に過ぎない。そのため、天然石炭では¹⁷Oの測定感度が不足し酸素官能基の観測は不可能である。そこで、¹⁷Oを石炭中に濃縮することを着想し、¹⁷O₂雰囲気下で酸化炭を調製した。

¹⁷O, 高感度, Cryo

○はたゆうき, おくしたけいこ, たかはしたかふみ, かねはしこうじ, さいとうこうじ, のりながこうよう

これまでに、一部をラベル化したタンパク質⁴⁾ やスラグ⁵⁾ などの ^{17}O NMR スペクトル測定例はあるが、石炭への適用例は無い。また、 ^{17}O は共鳴周波数が低いため、NMR スペクトル測定時には、リングングによってスペクトルのうねりが生じやすく、測定が困難な核種である。本研究では、 ^{17}O NMR 測定時のパルスシーケンスを工夫し、スペクトルのうねりの抑制を試みた。

[2] 実験

自然発熱性が高い石炭を $150\ \mu\text{m}$ 以下に粉碎し、 $80\ ^\circ\text{C}$ で12時間真空乾燥させ、酸化前の石炭試料を得た。さらに、石炭試料と $^{17}\text{O}_2$ を反応させるために作製した専用のガラス製のセルに、酸化前石炭粉末試料 $0.5\ \text{g}$ と $1.0\ \text{atm}$ の ^{17}O ガスを充填した。次に、石炭試料と ^{17}O ガスを充填したセルを定温電気炉に入れ、それぞれ $40, 60, 80, 100, 120, 150\ ^\circ\text{C}$ で6日間酸化させることにより酸化炭を得た。

固体 ^{17}O MAS NMR 測定には、静磁場強度 $16.45\ \text{T}$ (^{17}O の共鳴周波数： $84.829\ \text{MHz}$) の超電導マグネット、JEOL ECA 700 分光計を用いた。試料管由来の ^{17}O バックグラウンドシグナルを排除するため、 Si_3N_4 製の $4\ \text{mm}\phi$ 試料管および CPMAS Probe を用いた。また、プローブの筐体振動に伴うリングングを低減し、スペクトルのうねりを抑制するため、Oldfield Echo 法⁶⁾ を用いた。Oldfield Echo 法は、基本的には Hahn Echo⁷⁾ 法と同様であるが、16段階の位相回しを使用したパルスシーケンスである。試料回転周波数は $18\ \text{kHz}$ 、RF パワーは $156.25\ \text{kHz}$ 、パルス繰り返し時間は $0.2\ \text{s}$ に設定し、外部標準として H_2^{17}O を用いた。エコーの時間は回転同期させ $\tau_1 = \tau_2 = 55.56\ \mu\text{s}$ 、積算回数は 108320 回に設定した。さらに、 ^{17}O -Multiple Quantum Magic Angle Spinning (MQMAS) NMR スペクトル測定⁸⁾ し酸素官能基を帰属することで、より詳細な酸化反応機構の解明を試みた。 ^{17}O 3QMAS NMR スペクトル測定には Soft pulse added mixing (SPAM) 3QMAS シーケンスを用いた。試料回転周波数は $18\ \text{kHz}$ とし、ハードパルス (HP1, HP2) を RF 強度 $200.3\ \text{kHz}$ にて $\text{HP1} = 4.2\ \mu\text{s}$, $\text{HP2} = 1.2\ \mu\text{s}$ とし、ソフトパルス (SP1) は、RF 強度 $66.7\ \text{kHz}$ にて $\text{SP1} = 15\ \mu\text{s}$ とした。また、 t_1 の取り込み時間は $1.28\ \text{ms}$ 、観測幅は $72\ \text{kHz}$ 、パルス繰り返し時間は $0.2\ \text{ms}$ に設定し、 1072000 回積算した。高感度固体 ^{17}O MAS NMR 測定には、静磁場強度 $18.8\ \text{T}$ (^{17}O の共鳴周波数： $108.488\ \text{MHz}$) の超電導マグネット、Bruker ASCEND 800 分光計、 $3.2\ \text{mm}\ \phi$ Cryo-MAS-Probe を用いた。試料回転周波数は $15\ \text{kHz}$ 、RF パワーは $172.4\ \text{kHz}$ 、積算回数は $16,000$ 回に設定した。ここでは、projection Magic Angle Turning – Phase Adjusted Spinning Sideband (pjMATPASS)⁹⁾ のパルスシーケンスを用い、スピニングサイドバンドの消去を検討した。このときのパルス繰り返し時間は $0.5\ \text{s}$ に設定した。また、比較のために Hahn Echo のパルスシーケンスを用いて ^{17}O MAS NMR スペクトルを取得した。このときのパルス繰り返し時間は $0.5\ \text{s}$ に設定した。

[3] 結果および考察

Fig. 1 に酸化炭の ^{17}O NMR スペクトルを示す。図中の黒線および赤線は、それぞれ Single Pulse, Oldfield Echo 法で測定したスペクトルである。これにより、Oldfield Echo 法で測定することによって、リングングが解消されることがわかった。また、Fig.2 から、酸化炭には少なくとも2つのグループの酸素官能基 (site A, B) が、 $40\ ^\circ\text{C}$ の低温においても生成したと考えられる。なお、化学シフト値⁴⁾ から site A はアルコールや過酸化物、site B はアルデヒド基やカルボキシル基である可能性が示唆された。さらに、酸化温度の上昇に伴いスペクトルの S/N 比が向上したことから、石炭に吸着した酸素量が増加したことがわかった。このことは、同じ酸化時間の下では、酸化温度の上昇に伴い酸化が進むことを示唆しており、過去知見²⁾ とも一致した。また、Oldfield echo 測定によって得られた1次元の NMR スペクトル

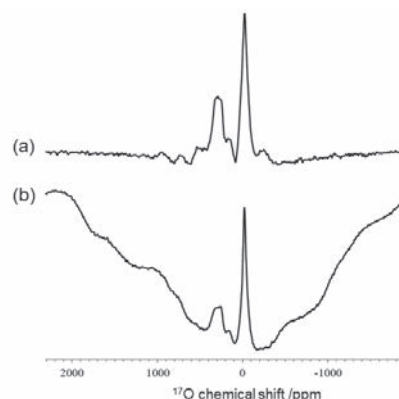


Fig. 1 ^{17}O MAS NMR spectra of oxidized coal acquired by (a) Oldfield Echo and (b) Single Pulse.

からは、酸化温度の上昇に伴う新たな酸素官能基の形成は観測されなかった。さらに、酸化炭に生成した site A/site B の比率を Fig. 3 に示した。その結果、site A/ site B は 40, 60, 70 °C では約 0.6 だったが、温度上昇に伴い site A/ site B は上昇し、80, 100, 120, 150 °C では 1.0, 1.1, 1.2, 1.4 となった。過去知見¹⁾では、石炭と反応した外部由来の酸素は、まず、アルコールや過氧化物として石炭中に固定化され、続いて、これらがアルデヒド基やカルボキシル基へと変化すると考えられていることから、本実験は site A が酸化反応の進行とともに site B へと変化した可能性が示唆され、Wang らが示した石炭の酸化反応機構²⁾を支持する結果となった。

次に、60°C および 150°C で調製した酸化炭の ¹⁷O 3QMAS NMR スペクトルを Fig.4 (a), (b) に示す。60°C で調製した酸化炭には、主にヒドロキシ基と、二重結合性の酸素のみが ¹⁷O であるカルボキシル基が生成したことがわかった。一方、150°C で調製した酸化炭には二重結合性の酸素、および、単結合性の酸素の両者が ¹⁷O であるカルボキシル基が生成したことがわかった。このことから、60°C で生成したカルボキシル基の多くは元来石炭に含まれるヒドロキシ基またはアルデヒド基由来であるのに対し、150°C で生成したカルボキシル基は酸化によって生成したヒドロキシ基がさらに酸化されて生成したものであることが判明した。

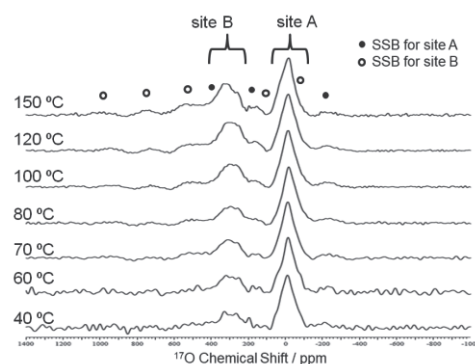


Fig. 2 ¹⁷O MAS NMR spectra of oxidized coal.

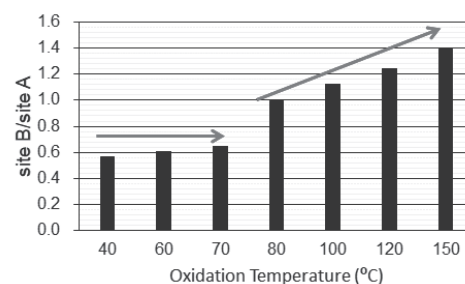


Fig. 3 Estimated site B / site A ratio in oxidized coal.

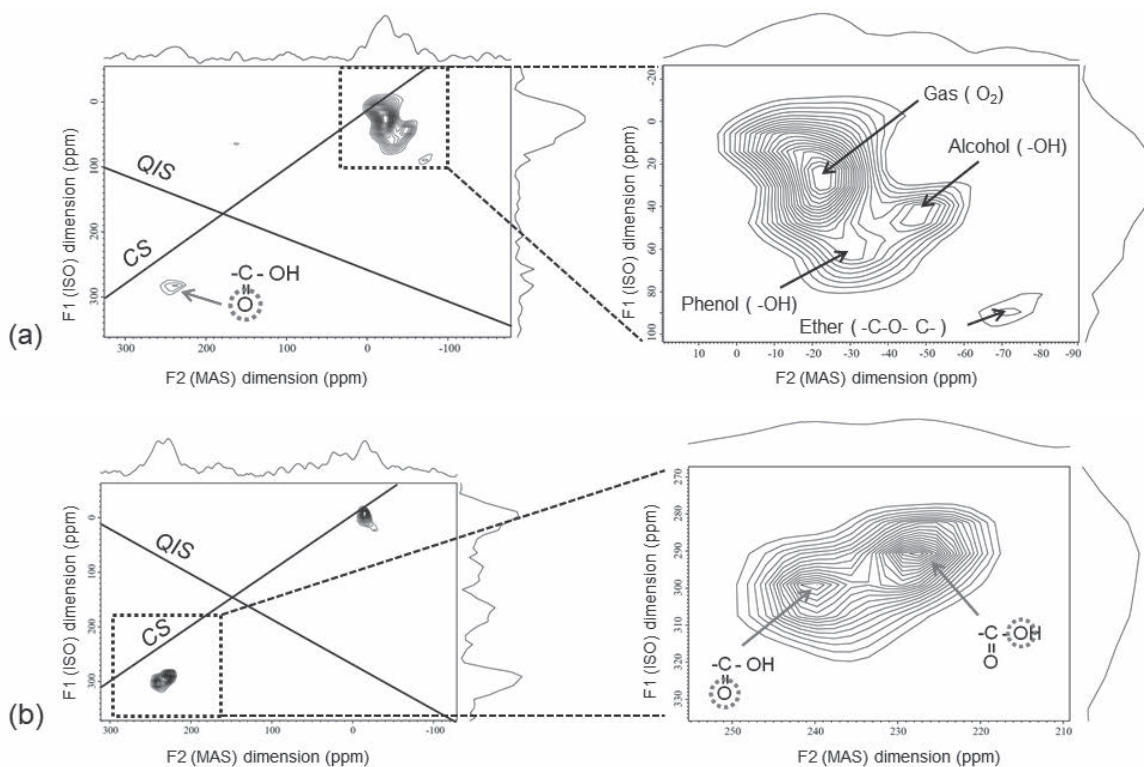


Fig. 4 ¹⁷O 3QMAS NMR spectra of oxidized coal prepared at (a) 60°C and (b) 150°C.

さらに、Cryo-MAS-Probe を用いて pjMATPASS で測定したところ、Fig.5 に示す SSB が消去された ^{17}O NMR スペクトルを 35 時間で取得でき、室温プローブと比較すると約 1/8 に短縮できた。その結果、site B にはカルボキシル基だけでなくアルデヒド基由来のシグナルも明確に確認できるようになった。アルデヒド基は、Hahn Echo 法ではスピニングサイドに埋もれて観測出来ていなかったため、pjMATPASS によって初めて観測できたとと言える。

以上のことから、 $^{17}\text{O}_2$ 雰囲気下で調製した酸化炭の ^{17}O MAS NMR 測定により、酸化によって新たに生成した酸素官能基を直接観測でき、石炭の酸化反応機構を詳細に検討できるようになった。

[4] 結言

石炭を $^{17}\text{O}_2$ 雰囲気下で酸化させ、固体 ^{17}O MAS NMR スペクトル測定を行った。Oldfield Echo 法で測定したところ、リンギングの少ない良好なスペクトルが得られ、酸化炭には少なくとも二種類の酸素官能基 Site A, B が生成したことがわかった。酸化温度を変化させたところ、生成した酸素官能基の種類に変化はなかったが、取り込まれた雰囲気由来の酸素の結合位置が異なり、また、高温ほど生成量が多いことがわかった。さらに、Cryo-Mas-Probe による高感度化や pjMATPASS のパルスシーケンスの採用によるスピニングサイドの消去、 ^{17}O -MQMAS 等高分解能 2 次元 NMR スペクトル測定による酸素官能基の同定によって、詳細な石炭の酸化反応解析が進むと考えられる。従って、 $^{17}\text{O}_2$ 濃縮ガスを用いた試料調製と固体 ^{17}O MAS NMR スペクトル測定の組み合わせは、石炭の酸化反応機構を解析する上で重要なツールになると考えられる。

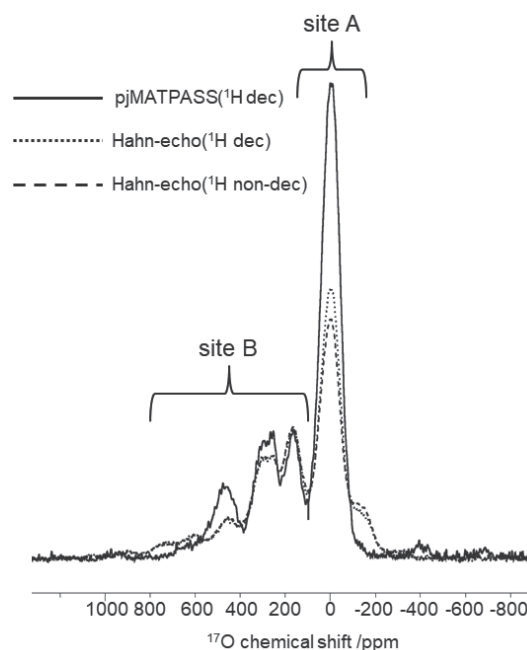


Fig. 5 ^{17}O MAS NMR spectra of oxidized coal at 80°C acquired by (a) pjMATPASS with ^1H decoupling, (b) Hahn echo with ^1H decoupling and (c) Hahn echo with non- ^1H decoupling sequence.

References

- 1) I. Miyagawa, Y. Yamada, J. Inaba, *Nenryokyokaishi*, **1929**, 8, 883.
- 2) H. Wang, Z. D. Bogdan and E. M. Kennedy, *Progress in Energy and Combustion Science*, **2003**, 29, 487.
- 3) M. Uchida, *Dissertation*, **2018**, 49.
- 4) G. Wu, *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, **2008** 52, 118.
- 5) K. Kanehashi, K. Shimoda, K. Saito, *Tetsu-to-Hagane*, **2009**, 95 321.
- 6) A. C. Kunwar, G. L. Turner and E. Oldfield, *Journal of magnetic resonance*, **1986**, 69, 124.
- 7) H. Y. Carr, E. M. Purcell, *Physical Review*, **1954**, 94, 630.
- 8) J. P. Amoureux, C. Fernandez and S. Steuernagel, *Journal of magnetic resonance*, **1996**, 123, 116.
- 9) I. Hung, I. Zhou, F. Pourpoint, C. P. Grey and Z. Gan, *J. Am. Chem.Soc.* **2012**, 134, 1898.

P21

Magnetically manipulated goniometer

○上出友哉¹, 武田和行¹

¹京都大学大学院理学研究科化学専攻

Magnetically manipulated goniometer

○Tomoya Kamide¹, Kazuyuki Takeda¹

¹Division of Chemistry, Graduate School of Science, Kyoto University

We propose a strategy to reorient magnetically oriented crystals in an arbitrary direction with respect to the external magnetic field, opening the possibility of applying magnetically oriented microcrystal suspension (MOMS) to characterization of anisotropic nuclear spin interactions.

[Introduction]

磁化率異方性を有する結晶は、変調回転磁場を用いて配向させることができる。実際に強磁場を回転させることは技術的に困難であるが、代わりに、静磁場中で結晶を浮かせた粘性媒体を入れた試料管を変調回転させると、一定時間の後に試料管に固定された座標系で結晶が3次元配向する[1]。一方、NMR測定による核スピン相互作用テンソルのキャラクター化に 응용するためには、外部磁場に対する結晶の配向をコントロールすることが必要である。磁気配向に用いる試料回転機構をそのまま用いて、配向が熱的に散逸していく過程よりも十分手早くNMR測定を行うことで、回転パターンを測定することができる。しかし、回転パターンを測定できるのは配向のための試料回転軸周りに限られる。ここで我々は、磁氣的に配向した結晶を外部磁場に対して任意の方向に傾けてNMR測定を行うことのできるアプローチを提案する。

[Principle]

ここでは反磁性結晶における磁化率テンソルの主値 χ_1 , χ_2 , χ_3 の大小関係が、 $0 > \chi_1 > \chi_2 > \chi_3$ であるとする。試料管に固定された座標系において、変調回転磁場の軌跡を楕円で近似すると、結晶は楕円の長軸が χ_1 軸、短軸が χ_2 軸、そして回転軸が χ_3 軸に一致する方向に傾く。よって、一定時間の後に磁気配向が達成されると、 χ_3 軸が試料の回転軸方向に揃う。その後、 χ_3 軸周りの回転パターンを測定することは容易である。さらに、 χ_3 軸に垂直な軸の周りにも回転を施すことができるようにするためのアイデアを図1に示す。

magnetic susceptibility (磁化率), single crystal (単結晶), Magnetically Oriented Microcrystal Suspension (MOMS)

○かみでともや, たけだかずゆき

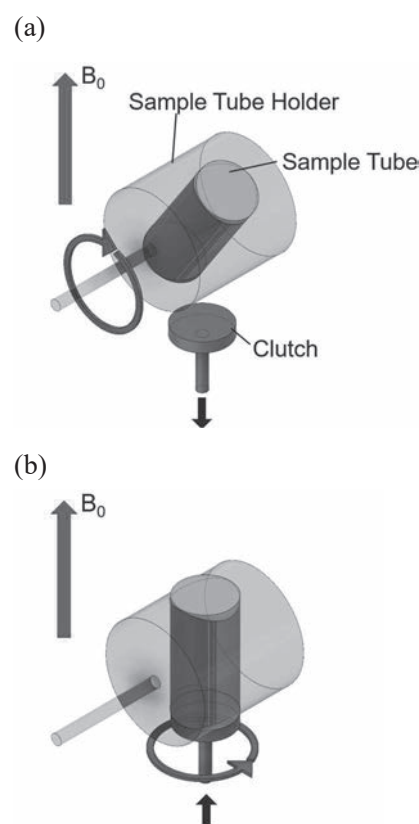


Fig. 1. A proposed scheme for (a) magnetic alignment of crystals with frequency modulated rotation of the sample together with the holder, followed by (b) another rotation of the inner sample tube alone.

結晶を浮かせた粘性媒体を入れる試料管を、試料管ホルダーに入れ、試料管ホルダーを磁場に垂直な軸周りに変調回転させる。ホルダーの変調回転の仕方に選択肢があり、試料から見た磁場の近似的な楕円回転の長軸を試料管の方向に設定すれば、クラッチによって χ_1 軸を回すことができる。また短軸を設定すれば、 χ_2 軸を回すことも可能となる。したがって、磁場に対して任意の方向に配向できる。

[Development]

まず、磁気配向を再現するためのプローブを開発した。回転の駆動のためにステッピングモータを導入し、*arduino*を用いて制御した。ステッピングモータは超電導磁石の直下から約1 m離して配置し、シャフトとユニバーサルジョイント、および傘歯車を介して磁場中の8 mmの試料管に伝達した。

コイルは300、75、20 MHz帯で三重にインピーダンスマッチングさせ、7 Tで ^1H - ^{13}C - ^{14}N 三重共鳴を行えるようにした。図2に、磁気配向させ取得した10% $1\text{-}^{13}\text{C}$ L-アラニンの単結晶の ^{13}C および、グリシンの単結晶の ^{14}N のスペクトルの例を示す。

クラッチの開発と、磁気配向システムとの統合が今後の課題である。

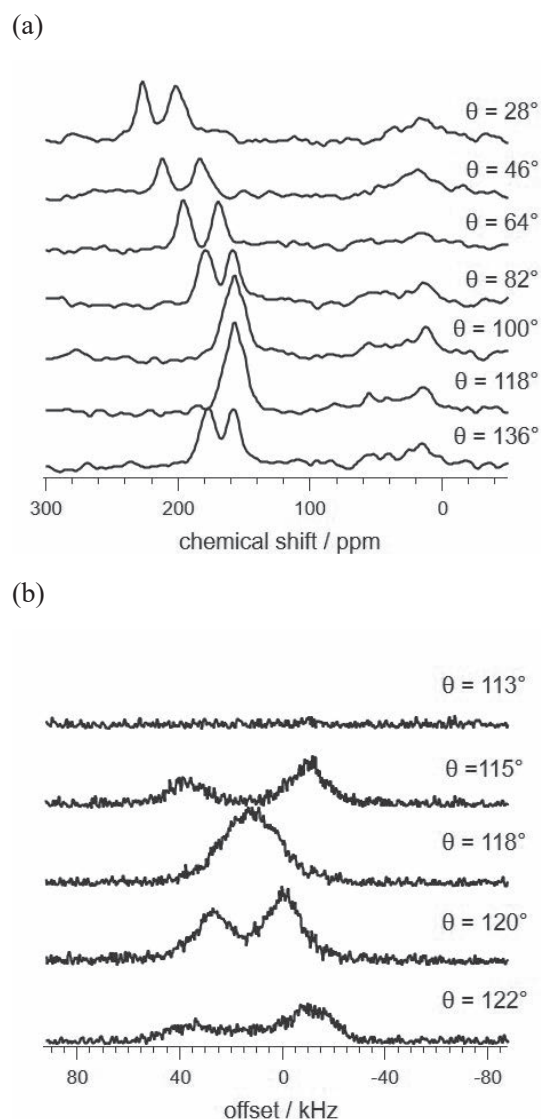


Fig. 2. (a) ^{13}C NMR spectra of a magnetically oriented single crystal of 10% $1\text{-}^{13}\text{C}$ L-alanine. (b) ^{14}N NMR spectra of magnetically oriented single crystal of glycine. The data were acquired in 7 T at room temperature for various angles θ between the χ_1 axis of the magnetic-susceptibility tensor and the external field.

Reference

[1] Kusumi R, Kadoma H, Wada M. *et al.*, *Journal of Magnetic Resonance* 309 (2019) 106618.

P22Y

遺伝的アルゴリズムによるRFコイルの最適化設計及び評価法の開発

○ トリトラカーン テシット¹, 山本航輝¹, 高橋雅人², 岡村哲至¹

¹東京工業大学 工学院 機械系

²理化学研究所 生命機能科学研究センター

Development of optimization design and evaluation method for RF coils using genetic algorithms

○ TRITRAKARN Teshit¹, YAMAMOTO Kouki¹, TAKAHASHI Masato², OKAMURA Tetsuji¹

¹Department of Mechanical Engineering, Tokyo Institute of Technology

²Laboratory for NMR Engineering and Structural Science, RIKEN Center for Biosystems Dynamics Research

An electromagnetic field simulation that can apply genetic algorithms to optimize the shape of RF coils for NMR/MRI was developed. C++ is used to calculate the B_1 magnetic field from an arbitrary coil geometry to predict the 90-degree pulse length and signal intensity. The optimization of the planar RF coil was demonstrated to obtain the NMR signal most efficiently from the combination of 2^{50} wires in the coil. The signal intensity of the designed RF coil and a dimensionally optimized solenoid coil with the same sample volume size were compared to evaluate the performance in the simulation and the NMR measurement. The signal intensity ratio against the optimized solenoid coil named "Optimized Solenoid signal strength Ratio (OSR)" is proposed as a new evaluation parameter of RF coils. The demonstration experiments were performed by ^{14}N NMR measurement using a 500 MHz NMR magnet and a home-built spectrometer.

NMR/MRIの測定においてRFコイルは不可欠である。RFコイルに求められる性能はいかに測定試料に強くかつ均一な高周波磁場を照射できるかが重要であり、それにもっとも適した形状はソレノイドRFコイルである。ただし、実際のNMRでは試料の形状はさまざまであり、また用途によってRFコイルが配置できる空間が制限されるため、その都度RFコイルの形状をデザインする必要がある。このような形状の最適化をシミュレーションによって行う方法のひとつとして、遺伝的アルゴリズム (Genetic algorithms, GA) があげられる。

遺伝的アルゴリズムは進化論的な考え方に基づいてデータを操作し、最適解を探索手法である。要素が多くなると指数関数的に組み合わせ数が多くなる組合せ最適化問題を解決するために特に使われている。RFコイル形状の最適化設計を組み合わせ問題に変換できれば、遺伝的アルゴリズムを導入することで考えられるほぼ無限の組み合わせから短時間で効率的に最適解を導くことができるメリットはある。

NMR/MRIのRFコイルの形状を遺伝的アルゴリズムを用いて最適化を行う研究報告^{1,2}がこれまでにあったが、ある特定の形状のコイルインダクタンス L の計算式を用い、決まったコイル形状の配置やサイズのパラメータしか最適できない制約が存在したため、最適化できるコイル形状が限定されていた。

遺伝的アルゴリズム, RFコイル, 最適化ソレノイド信号強度比

○トリトラカーン テシット, 山本航輝, 高橋雅人, 岡村哲至

本研究では、任意のRFコイル形状について最適化設計ができるように、汎用性のある形で遺伝的アルゴリズムが適用できる電磁界シミュレーションを開発した。磁場分布の計算には先行研究と同様直流モデルを用いているため、波長が問題にならない（コイル長さが $\lambda/4$ より短い）、つまり低周波数もしくは小型のRFコイルに適用可能である。例として基板RFコイルの形状を決める無数の線電流の組み合わせから、漏れ磁場を減らすことによってFilling Factorを向上させ、最も効率よくNMR信号を得ることができる形状の決め方を案内する。

計算に使うPCの負担と時間を減らすために、単純化した直流モデルを採用する。基本的な流れは、任意のRFコイル形状を決める線電流のベクトルを配置し、ビオ・サバルの法則で線電流が作る磁場ベクトル B を計算する。コイルのインダクタンス L は全空間のそれぞれの格子点の磁場エネルギーの積分から求めるためどのようなコイル形状でも対応できる。RFコイルから B_1 を照射するときとその後のスピンの挙動はブロッホ方程式によって計算され、励起された磁化からRFコイルが受信できるNMR信号強度はレシプロシティの原理で求める。

また、Houltによると、任意の試料体積量でもっとも効率よくNMR信号を得るソレノイドRFコイルの最適な形状は全長/直径=0.8、ピッチ/線径=1.5である³。設計したRFコイルの性能を公平に評価するには、同試料量で形状最適化したソレノイドRFコイルから得たNMR信号強度と比較する。この比率を「最適化ソレノイド信号強度比」（Optimized Solenoid signal strength Ratio, OSR）呼び、RFコイルの新しい評価法として提案する。

遺伝的アルゴリズムはデータ（解の候補）を遺伝子で表現した「個体」を複数用意し、適応度の高い個体を優先的に選択して交叉・突然変異などの遺伝的操作を繰り返しながら個体を進化させ、適応度を最大化する個体の解を探索するアルゴリズムである。適応度関数は解の候補を定量化し、特定の遺伝子が他の遺伝子より優れていることを示す関数である。本研究は遺伝子をコイル形状を決める線電流に、適応度関数として最適化ソレノイド信号強度比を用いる。

本研究のシミュレーションはC++のオブジェクト指向の設計思想に基づいてコイル形状を決める線電流クラス、磁場クラス、試料クラス、核スピクラス、信号クラス、それと全体を統一するNMRシミュレーションクラスで管理するため、今回用いた遺伝的アルゴリズムライブラリー⁴と融合しやすい。

具体的な遺伝的アルゴリズム解析モデルの初期状態(Fig. 1)は静磁場中心の座標(0, 0, 0)に直径 D の2次元の円形の試料空間を設定し、基板RFコイルの形状を決める右、左向きの線電流は黒矢印で示す。遺伝的アルゴリズムの遺伝的操作を行うために、線電流の状態を2桁の2進数ビットと連動させる。yz対称の拘束条件を設定することによって、線電流の本数が100から50本になり、遺伝的アルゴリズムで 2^{50} (1.12×10^{15}) の組み合わせから効率よく最適な組み合わせを調べることになる。0世代目には50個のビットの組み合わせ(個体)を100個（100匹）ランダムに生成し、それぞれの状態のビットの組み合わせからのRFコイルの線電流に変換し、生成される磁場 B_1 とインダクタンス L を計算する。また、90度パルス長のときの磁化ベクトルからNMR信号強度とOSRを計算し、大きい順に並べる。次世代に進化するときには遺伝的操作の選択、交叉、突然変異を行い、その新しい組み合わせからまたNMR信号とOSRを計算し、

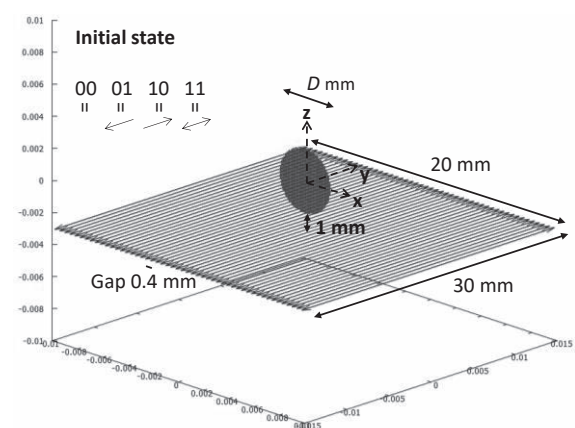


Fig. 1. The initial state of GA model

The presence or absence of line current is expressed by 2-digit binary bits.

大きい順に並べる。設定した世代までこのような計算の流れを繰り返す。初期状態のランダムな組み合わせによっては計算結果は最大値ではなく極大値に留まって終了することがあるため、2000世代と5000世代までそれぞれ2回ずつ計算を行い、NMR信号強度とOSRが最大になる結果を選ぶ。計算に使用したPCはCPUがAMD Ryzen 9 3900X 3.80GHzで、22 cores で並列計算できるようにOpenMPを使用した。計算時間は1000世代あたり1~1.5時間ほどかかる。約1000世代でOSRが一定になり、極大値から抜けだせなくなるが、突然変異で極大値から最大値をもたらす組み合わせに辿り着くことがあるため、世代数を余裕持って5000世代まで計算を行っている。

遺伝的アルゴリズムから求めた最適な線電流は繋がっていない状態(Fig. 2)であるためこのままだと基板RFコイルが作れない。そこで、自作のPython Scriptでこの組み合わせを維持しつつ作製可能な渦巻のパターンに変換した。遺伝的アルゴリズムを行ったときは試料がxz面のみ存在するが、実際はy軸方向に試料を増やしたほうが基板RFコイルの磁場が有効活用でき、OSRの改良に繋がる。そのため、変換したRFコイル渦巻パターンに対して試料長さを可変する(Fig. 3)ことでさらにOSRを最適化することができる。

OSRを最大にする試料形状（直径 D と長さ l ）とそれに対応する基板RFコイルを決めるために、 D を2から9mm、 l を20から30 mmまで変化させてOSRを計算した。OSRが最大（約0.19）になる最適な試料の形状は D が3 mmで l が28 mmのときであり、その条件に対応する最適な基板RFコイルの形状はFig. 3. に示す。

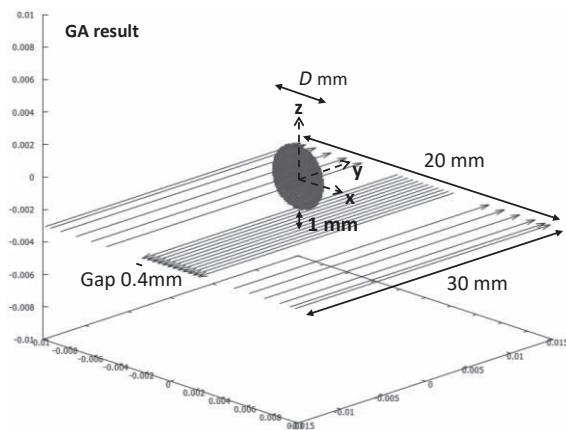


Fig. 2. The optimal combination of line current from 2000th generation of GA when sample diameter D is 3 mm

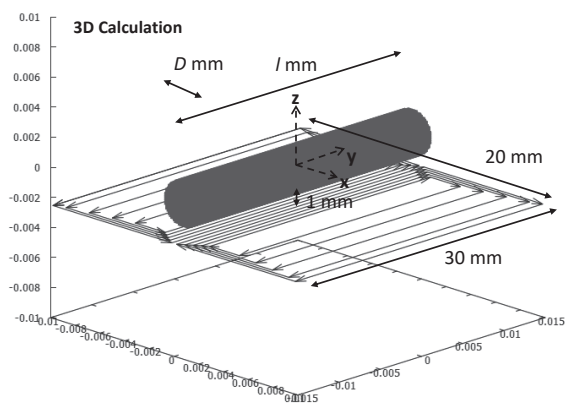


Fig. 3. The spiral planar RF coil pattern which converted from line current and the sample with length l in 3D model for OSR calculation

基板RFコイルは銅箔基板のFR-4 を用いてLPKF c100/hf基板加工機で加工した(Fig. 4)。試料ケースには内径が3 mmのストローを用いた。基板RFコイル用の試料形状の直径が3 mm、長さが28 mmであるため、同試料体積量（ $2 \times 10^{-7} \text{ m}^3$ ）になるような最適ソレノイドRFコイルは直径が8.2 mm、長さが6.5 mmである。ソレノイドRFコイルは、巻き枠を3DプリンタForm3で製作し直径0.4 mmの錫メッキ銅線を巻いた。

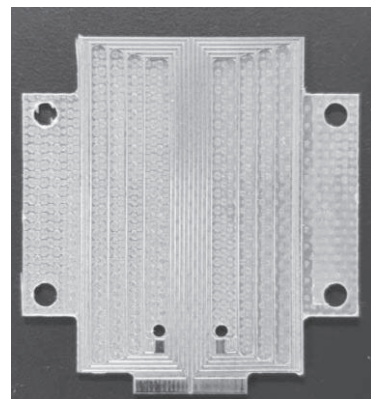


Fig. 4. The spiral planar RF coil made from FR-4 PCB

シミュレーションと比較するためのNMR測定にはOxford社500 MHz NMR Magnetと自作の分光計を用いた。測定試料には塩化アンモニウム NH_4Cl 粉末を用い、 ^{14}N の90度パルス長を予測する。測定条件は室温、共鳴周波数は36.12 MHz、積算回数は4096回である。

T_1, T_2 の影響を排除するために、基板RFコイルとソレノイドRFコイルの90度パルス長が同じ160 μs になるように励起パルス強度を調整した。また、金属球の挿入による共振周波数の変動量からRFコイルが作る磁場 B_1 を測定する手法とも比較した。

Table 1. The results of experiment and simulation

Coil Type	Q factor	Power [W]	90P(metal ball)[μs]	90P [μs]	Experiment		Simulation		
					Signal	OSR	90P [μs]	Signal [V]	OSR
Solenoid	115.9	0.56	160.0	160	40.78		155	3.06E-05	
Planar coil	53.4	10	161.1	160	7.75	0.19	138.6	6.14E-06	0.20

表1から実験とシミュレーションの結果がほぼ一致しており、シミュレーションの妥当性が確認でき、遺伝的アルゴリズムを用いたRFコイルの最適化設計が実証できた。遺伝的アルゴリズムの最適化によって基板RFコイルの場合でもソレノイドの約0.2倍の信号強度が得られる。ただし、ソレノイドRFコイルのFilling Factorが0.297に対して基板RFコイルが0.038 (0.13倍) であるため、同じ励起パルス強度であれば基板RFコイルはソレノイドRFコイルに比べ90度パルス長が約4倍長くなる。

今回は簡単な直線かつ2次元の線電流の基板RFコイルモデルを紹介したが、線電流を3次元的に配置し、短い線電流を繋げて曲線に例えることは可能である。使用可能な B_0 空間や試料の T_1, T_2 などのパラメータを考慮したモデルや、送受部と受信部が分離する複雑な系でも対応できる。また、遺伝的アルゴリズムの評価パラメータのOSRを使うことでコイル形状だけでなく試料空間の最適化もできる。

References

- (1) P. Andris, I. Frollo, Optimisation of Nmr Coils By Genetic Algorithms, Meas. Sci. Rev. 2 (2002) 13–22.
- (2) J.R. Hadley, C.M. Furse, D. Parker, RF coil design for MRI using a genetic algorithm, Appl. Comput. Electromagn. Soc. J. 22 (2007) 277–286.
- (3) D.I.H. Ching-Nien Chen, Biomedical Magnetic Resonance Technology, Institute of Physics Publishing, 1995
- (4) O. Mallet, GALGO-2.0, (2019). <https://github.com/olmallet81/GALGO-2.0>.

P23

イネ粒重を抑制する TGW6 の阻害剤開発を目指した¹⁹F NMR フラグメントスクリーニング

○赤羽根健生¹、長門石暁²、津本浩平³、廣津直樹¹、加藤悦子⁴

1 東洋大学大学院 生命科学研究科

2 東京大学 医科学研究所

3 東京大学大学院 工学系研究科

4 東洋大学 食環境科学部

¹⁹F NMR Fragment Screening for the antagonist development of TGW6 which inhibit the grain weight in rice.

○Tatsuki Akabane¹, Satoru Nagatoishi², Kouhei Tsumoto³, Naoki Hirotsu¹, Etsuko Katoh⁴

1 Graduate School of Life Sciences, Toyo University

2 The Institute of Medical Sciences, The University of Tokyo

3 School of Engineering, The University of Tokyo

4 Department of Food and Nutritional Sciences, Toyo University

¹⁹F NMR has high sensitivity and large chemical shift. Fragment Based Drug Discovery (FBDD) using ¹⁹F NMR is an efficient method for drug discovery. It is also known that the introduction of fluorine atom(s) into compounds improve the potency and permeability of drugs. In crop science, THOUSAND-GRAIN WEIGHT 6 (TGW6), which negatively regulates the number of the grain weight in rice, has been focused as a target of breeding. We hypothesized that the chemical intervention strategy for the specific inhibition of TGW6 might also increase the grain size and yield. In this study, we explored the fragment compound that might bind to TGW6 using ¹⁹F NMR. We also evaluated these hit fragments by binding assay and computational analysis.

【背景】 ¹⁹F NMR は、¹H NMR と同等の高い検出感度と広範囲な化学シフト (>200 ppm) を有するなどの特長を持つ。近年 ¹⁹F NMR を用いた Fragment based drug discovery (¹⁹F NMR FBDD) の有用性が報告されている (Vulpetti et al. *J. Am. Chem. Soc.* 2009, Ikeda et al. *J. Med Chem.* 2021)。

FBDD は、一般的に分子量の小さなフラグメント化合物 (分子量 >250 Da 程度) と標的タンパク質の弱い相互作用を検出するため、緩和時間を利用して相互作用を感度よく検出できる NMR が有効である。また、創薬において、フッ素は薬効や細胞浸透性などを向上させるため、フッ素 ¹⁹F NMR、フラグメントスクリーニング、T₂ filtering

○あかばねたつき、ながといしさとる、つもとこうへい、ひろつなおき、かとうえつこ

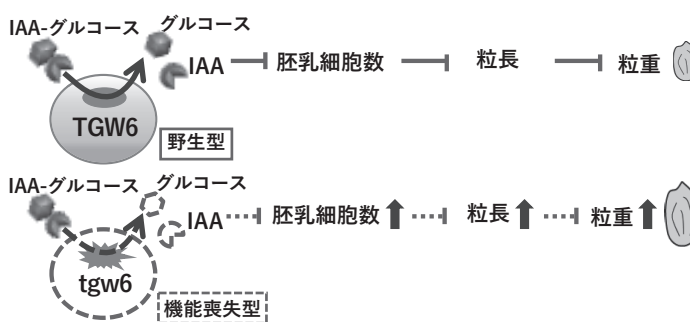


Fig.1 Inhibition of grain weight by TGW6

含有化合物の有効性が注目されている。実際に、現在までに開発された医療用薬剤のうち約 20% がフッ素原子を含んでいる。以上のことから、フッ素含有フラグメント化合物を対象にした ^{19}F NMR FBDD は、有効な薬剤探索手法の一つと言える。

一方、イネの THOUSAND-GRAIN WEIGHT 6 (TGW6) は、収量構成要素の一つである粒重を抑制する酵素であり、その酵素機能の喪失によって圃場での玄米収量を約 15%増加させる (Fig.1, Ishimaru and Hirotsu et al. *Nat. Genet.* 2013)。タンパク質の機能喪失によって収量が増加することから、TGW6 の特異的阻害剤 (アンタゴニスト) を開発することができれば、様々な品種で TGW6 の遺伝的機能喪失を再現し、収量を増加させることが期待できる。本研究では、 ^{19}F NMR FBDD による候補化合物の探索を行った。また、 ^{19}F NMR FBDD の有効性を検証するために、得られたヒット化合物と TGW6 の結合実験や計算科学を用いた評価解析を行った。

【方法】 ^{19}F NMR によるスクリーニングは Bruker AV500 (Billerica, MA) を用いて、T2 filtering 実験による測定を行った。キシダ化学 (Osaka, Japan) オリジナルビルディングブロックのフッ素含有フラグメント化合物をフッ素原子の数 CF_1 、 CF_2 、 CF_3 によってそれぞれ 100、50、33 μM になるように調製した。10 μM TGW6 の添加の有無によるシグナル強度の減衰率をもとにフラグメント化合物の評価を行った。得られたヒット化合物について、UNCLE (Unchained labs, Pleasanton, CA) を用いた Thermal shift assay を行った。27.6 μM の TGW6 溶液にヒット化合物を終濃度 55.0 μM になるように添加し、15°Cから 75°Cまで加温した際のトリプトファンの蛍光強度の変化を測定した。TGW6 の変性温度中点 (T_m 値) を算出し、化合物の有無による TGW6 の熱安定性の変化をもとにタンパク質-リガンド相互作用を評価した。ヒット化合物のクラスタリング解析には Cresset を用いた。

【結果】 TGW6 の添加によってシグナル強度が 45%以上減衰したフラグメント化合物をヒット化合物とした。1134 化合物のスクリーニングを行い、6 種のヒット化合物を選抜した。これらの構造を比較すると、ニトロフェニル基を持った化合物とインドール環を持った化合物の 2 種類に分類することができた。前者のうち 1 種の化合物 (CK0-00681) は 100%のシグナル強度の減衰を示したが、その他の 5 種の化合物のシグナル強度の減衰率はいずれも 50%前後であった (Table1)。Thermal shift assay を行なった結果、PK0-38511 と PK0-38501 の 2 つのヒット化合物で T_m 値の上昇を確認することができた。それらのフラグメント化合物は TGW6 の酵素反応物であるインドール酢酸 (IAA) と酷似した構造を持っているため、TGW6 の活性部位に結合し、タンパク質の熱安定性を上昇させたことが考えられる。本発表では、計算科学を用いてヒットフラグメントのフィンガープリント解析による分子類似性を評価と、その結果をもとにしたクラスタリング解析の結果についても併せて報告する。

Table1 Hit fragments and T_m shift

ID	Chemical Name	MW	Δ intensity (%)	T_m Shift
CK0-00681	2-[(2-Fluoro-4-nitrophenoxy)methyl]tetrahydrofuran	241.21568	-100	-
CK0-02991	1-(3-Fluoro-2-nitrophenyl)piperidin-4-ol	240.23092	-57.9	-
PK0-38511	2-(7-Fluoro-1H-indol-3-yl)acetic acid	193.17442	-50.3	↑
PK0-38501	2-(4-Fluoro-1H-indol-3-yl)acetic acid	193.17442	-46.5	↑
PK0-42071	3,3,3-Trifluoro-2-(5-fluoro-1H-indol-3-yl)propanoic acid	261.17239	-46.0	-
CK0-03011	4-(2-Fluoro-4-nitrophenoxy)tetrahydro-2H-pyran	241.21568	-45.4	-

P24Y

ベンチトップNMRによる炎症性腸疾患モデルマウスのメタボロミクス研究

○宋子豪¹, 大西裕季¹, 長田誠司², 甘莉¹, 蔣佳稀¹, 胡知彦¹, 久米田博之¹, 熊木康裕¹, 中村公則¹, 綾部時芳¹, 山内一夫³, 相沢智康¹

1 北海道大学大学院 生命科学学院

2 中山商事 (株)

3 沖縄科学技術大学院大学 機器分析セクション

Application of benchtop NMR for metabolomics study of Inflammatory Bowel Diseases using DSS-induced colitis model mice

○Zihao Song¹, Yuki Ohnishi¹, Seiji Osada², Li Gan¹, Jiayi Jiang¹, Zhiyan Hu¹, Hiroyuki Kumeta¹, Yasuhiro Kumaki¹, Kiminori Nakamura¹, Tokiyoshi Ayabe¹, Kazuo Yamauchi³, Aizawa Tomoyasu¹

¹ Graduate School of Life Science, Hokkaido University

² Nakayama Co., Ltd.

³ Instrumental Analysis Section, OIST

Metabolomics has shown its potential of recognizing diseases and identifying biomarkers. Indeed, high-field NMR equipped with superconducting magnet represents one of the routinely used techniques for metabolomics study. However, further application for medical purposes or field research are restricted by its low accessibility. In this study, we applied low field, benchtop NMR (60 MHz) based on permanent magnet to characterize the alteration of metabolic profile of feces sample obtained from the DSS-induced ulcerative colitis model mice. Non-targeted multivariate analysis successfully discriminated the DSS-induced group from the healthy control and showed high comparability with high field NMR (800 MHz). In addition, the concentration of acetate could be accurately quantified with based on 60 MHz NMR spectra.

[Introduction] Metabolomics targets at comprehensive measurement of metabolites. It has been applied to identify key biomarkers and investigate the pathogenesis of various human diseases. High-field NMR spectrometer (400 MHz or higher) based on superconducting magnet has been one of the most routinely used techniques for metabolomics studies while further applications for medical purposes and field researches are restricted because of its large size, substantial investment and requirement of cryogenic fluids maintenance and well-trained staff. Correspondingly, the newly developed cryogen-free, low-field, benchtop NMR based on compact permanent magnets may solve these problems and represent a new approach for metabolomics studies for its small size and low running cost. Previous studies have detected common markers of type 2 diabetes [1-2] and tuberculosis [3] using urine sample by benchtop NMR. Nevertheless, the feasibility of benchtop NMR for metabolomics studies has not been universally verified and the shortcomings of low sensitivity and resolution need to be solved. Therefore, we applied the low-field, benchtop NMR for identifying and characterizing the metabolic profile of feces sample of DSS-induced colitis model mice.

benchtop NMR, metabolomics, feces

○そん ずはお、おおにし ゆうき、おさだ せいじ、かん り、しょう かき、こ しげん、くめた ひろゆき、くまき やすひろ、なかむら きみのり、あやべ ときよし、やまうち かずお、あいざわ ともやす

[Method] Six mice were divided into control group and DSS-induced group and cultivated for 7 days. 3.5% of DSS was added into the drink water for DSS group mice to induce colitis. The feces sample were collected each day for measurement by both 800 MHz and 60 MHz NMR using water suppression pulse.

[Results] **Fig. 1** shows representative ^1H NMR spectra of fecal extracts from a healthy mouse. Comparing with 800 MHz spectra and database, nineteen metabolites were annotated

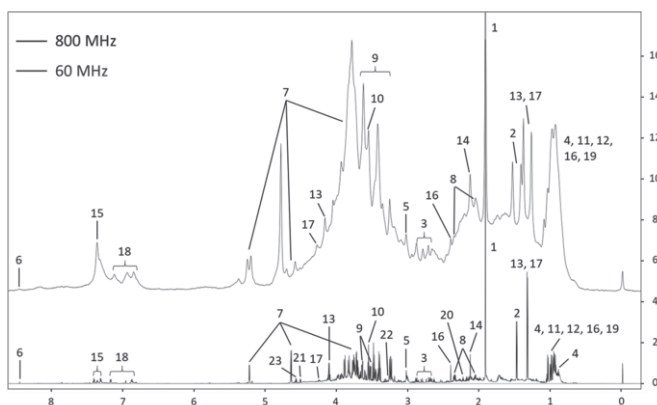


Fig. 1. ^1H NMR spectra of mouse feces obtained by 60 MHz (up) and 800 MHz (down) spectroscopy.

on the 60 MHz spectra. Binning was exported using the total area of the spectra line of 0.04 ppm and Pareto-scaling was applied. Non-targeted multivariate analysis was utilized to examine the discriminant ability of this model and the OPLS-DA score plot of day 2~5 was shown in **Fig. 2**, suggesting statistical significance for the separation of DSS and healthy group. Importantly, it showed similar metabolic profile with 800 MHz. Next, we quantified the concentration of acetate, which appears to be a key biomarker. The concentration of acetate based on 60 MHz NMR spectra was quantified by curve fitting method and compared with the routine method by using 800 MHz. No significant error was found between low field and high-field data. According to **Fig. 3**, the concentration of acetate in DSS-induced group was significantly higher than the control group at day 5. In summary, our study presented the potential benchtop NMR for the rapid diagnosis of Inflammatory bowel diseases (IBD) using DSS-induced model mice.

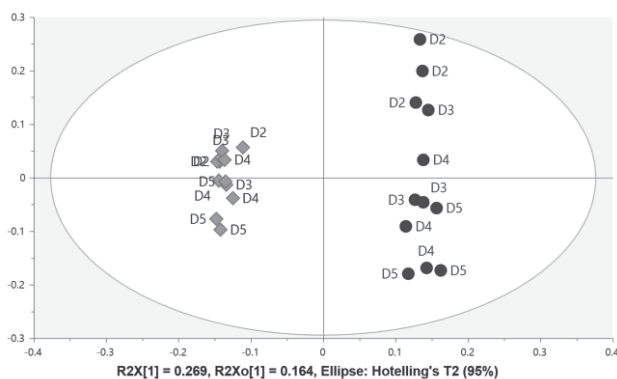


Fig. 2. OPLS-DA score plot of mice feces of control group (diamond) and DSS group (circle) from day 2 to day 5 acquired on 60 MHz NMR spectrometer.

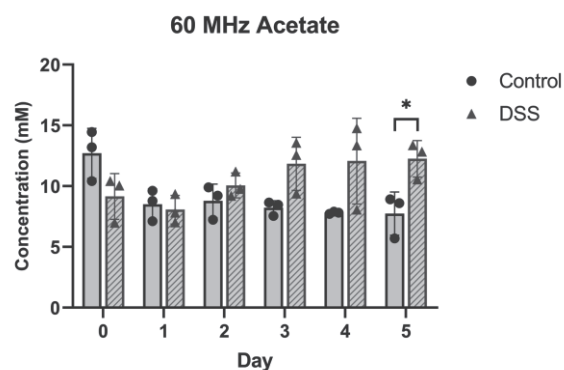


Fig. 3. The concentration of acetate in the mice fecal sample quantified by curve fitting method. *: $p < 0.05$

References

- [1] Percival BC, et al. Low-Field, Benchtop NMR Spectroscopy as a Potential Tool for Point-of-Care Diagnostics of Metabolic Conditions: Validation, Protocols and Computational Models. *High Throughput*. 2018;8(1):2.
- [2] Leenders J, et al. Benchtop Low-Frequency 60 MHz NMR Analysis of Urine: A Comparative Metabolomics Investigation. *Metabolites*. 2020;10(4):155.
- [3] Izquierdo-Garcia JL, et al. Discovery and validation of an NMR-based metabolomic profile in urine as TB biomarker. *Sci Rep*. 2020;10(1):22317.

P25

ヒトNMRデータのフェデレーテッドラーニング

○藤村礼¹, 山田隼嗣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・環境資源科学センター

³名古屋大学大学院・生命農学研究科

Federated learning using human NMR data

○Rei Fujimura¹, Shunji Yamada², 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

Although NMR produces data they are compatible across institutions, it is not easy to collect medical data from the perspective of individual personal information, and there are many preprocessing issues involved in integrating data generated by multiple institutions in a distributed manner. Therefore, in this study, we examined federated learning for human NMR data, which integrates learning models created based on distributed data. Preprocessing was examined to manage and utilize the distributed human NMR data. Furthermore, we focused on lipoproteins, which are potentially involved in cardiovascular events but are difficult to analyze due to their broad spectra, and examined the application of non-negative sparse coding (NNSC).

【背景】

近年、実験科学や理論科学とならぶ新たな科学であるデータサイエンスが注目を浴びている。病院や各研究機関にて収集された医療データの活用が期待されている。NMRは、簡易なサンプル準備で混合物の組成を評価でき、機関間互換性のあるデータを生成できる。しかし、ヒトNMRデータの収集は個人情報保護の観点で容易ではない。また、多機関で測定されたデータの統合にあたっての前処理においても課題がある[1]。本研究では、分散型のヒトNMRデータの管理・活用に向けての前処理を行う[2]。また、データそのものを収集するのではなく、分散的に管理されたデータをもとに作られた学習モデルを統合するフェデレーテッドラーニングをヒトNMRデータにおいて検討する(Fig.1)[3]。NMRにより心血管イベントに関与しているリポタンパク質に注目した研究が行われているが、スペクトルがブロードになり、解析が困難である[4]。そこで、ブロードなスペクトルに対してピーク分離法Non-negative sparse coding (NNSC)の適用を検討する[5]。各スペクトルの特徴づけや疾患との関連性、外的要因による健康状態の変化を捉える。

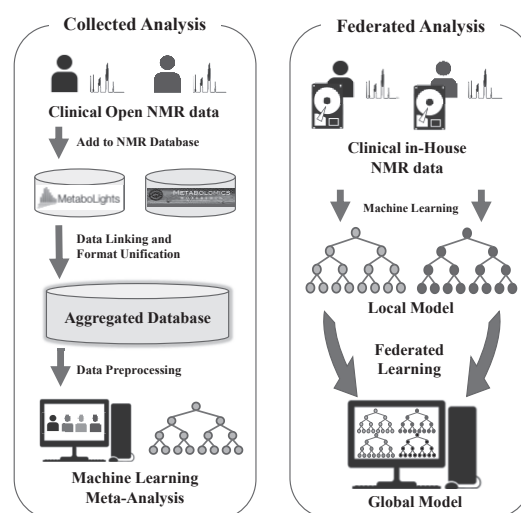


Fig.1. Conceptual diagram of collected and federated analysis for human NMR data.

Left: collected analysis. Right: federated analysis.

超分子複合体, 機関間互換性, 分散型データ活用

○ふじむられい, やまだしゅんじ, きくちじゅん

【方法】

Collected Analysisとして、NMRのオープンデータベースであるMETABOLOMICS WORKBENCH[6], MetaboLights[7]にてヒト血漿NMRデータセットを1つずつ収集した。

NMRパラメータ(ACQUSファイル)から、磁場強度、スペクトル幅、積算回数、ポイント数を確認し当ラボ内データ[8]と関連のあるデータを選定した。異なるNMRパラメータを持つデータを統合するために、Pythonのnmrglueを用いてアポダイゼーションなどの前処理の検討を行い(Fig.2), NNSCを適用した。ピーク分離した成分に対し、アノテーションを行った。作成したデータセットに対して、目的変数を症状の有無とし、ランダムフォレスト解析を行った。

【結果・考察】

オープンデータベースおよびラボ内から収集した10個のヒト血漿NMRデータセットについて、磁場強度やポイント数を始めとしたNMRパラメータをACQUSファイルから読み取り[9]、パラメータをリスト化した。当ラボが所有する慢性疲労患者と対照被験者における ^1H NMRスペクトルについて、リポタンパク質領域のピーク分離を行い、ランダムフォレストを用いて疾患の有無における重要因子を探索した(Fig.3)。VLDLは患者と対照を判別するのに最も重要であった。この結果は、以前に報告された可変重要度分析の結果が一致していた。精度の検証のため、過学習、汎化性能、交差検証、ハイパーパラメータの最適化について検討する。また、Federated Learningを行うために、分散型のデータに対し機械学習を行い、ローカルモデルを作製し、複数のローカルモデルに対し機械学習を行う事でグローバルモデルを作製する。

Collected AnalysisとFederated Analysisでそれぞれ作成された学習モデルの性能を比較することで、Federated Analysisの有用性を検討する。今後、Collected Analysisの前処理、Federated Analysisの検討を目指す。

References

[1] Schober. D., et al., *Anal. Chem.*, **90**, 649-656, 2018. [2] Buendia, P., et al., *Bioanalysis*, **11**, 1139-1155, 2019. [3] Tedeschini, BC., et al., *IEEE Access*. **10**, 8693-8708 2022. [4] Masuda, R., et al., *Anal Chem*, **94**, 4426-4436, 2022. [5] Yamada, S., et al., *ACS Omega*, **4**, 2261-2269, 2019. [6] Sud, M., et al., *Nucleic Acids Res.*, **44**, D463-D470. [7] Huag, K., et al., *Nucleic Acids Res.*, **48**, D440-D444, 2020. [8] Kitami, T. et al., *Sci. Rep.* **10**, 1-12 (2020). [9] Hara, K., et al., *Processes* **10**, 1264(2022).

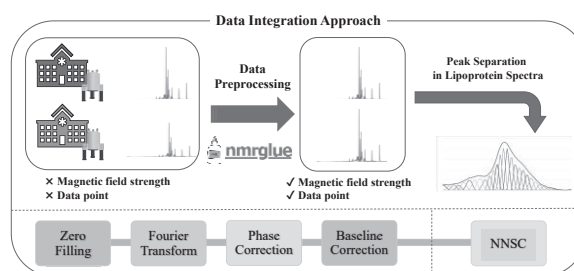


Fig. 2. NMR data integration approach.

Top: Integrated approach for NMR data acquired with different parameters. Bottom: Flow of the process including preprocessing.

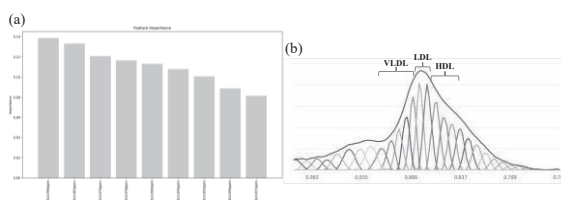


Fig. 3. Searching for key factors in disease by random forest using lipoprotein NMR spectra

(a) Importance factors extracted by random forest.
(b) Peak separation of lipoprotein spectrum.

P26Y

^{14}N NMRにおける磁場依存性: 高磁場の方が有利か?

○魚返祐太郎^{1,2}, 西山裕介^{1,2}

^{1,2} JEOL RESONANCE, RIKEN-JEOL連携センター

B_0 field dependence of ^{14}N NMR: Higher the better?

○Yutaro Ogaeri^{1,2}, Yusuke Nishiyama^{1,2}

^{1,2} JEOL RESONANCE, RIKEN-JEOL Collaboration Center

It is recently shown that ^1H - ^{14}N overtone (OT)-RESPDOR efficiently probes ^1H - ^{14}N spatial proximities. Despite the common believe that higher B_0 field is beneficial to NMR, it is not clear whether high B_0 field is preferable to ^{14}N OT, since the OT nutation frequency is inversely proportional to B_0 field. In this study, we performed ^1H - ^{14}N OT-RESPDOR experiments at several different magnetic fields and clarified the B_0 field dependence of the detection efficiency. Experimental results showed that the detection efficiency of ^1H - ^{14}N OT-RESPDOR is independent of the B_0 field strength and size of quadrupolar coupling, provided the ^{14}N OT pulse lengths are optimized.

【背景】

窒素原子は、様々な分野において重要な元素であるが、そのNMR測定は一筋縄にはいかない。窒素原子には ^{14}N と ^{15}N の二種類のNMRアクティブな核が存在するが、 ^{15}N の天然存在比は1%以下であり、天然存在比での観測は長時間の積算を必要とする。それに対し、 ^{14}N は99%以上の天然存在比を持つものの、四極子相互作用を持つ整数スピン($I = 1$)であるため直接測定は困難であった。しかしながら、高速の試料回転のもとで ^1H による間接測定を用いることで、数分程度での高感度測定が実現した。近年、Larmor周波数の2倍の周波数を用いた ^{14}N overtone (OT) RESPDOR NMR¹により長距離の相関信号を高感度で測定できることが報告された。一般的に高磁場が感度・分解能の面で有利であると言われていたのに対して、磁場強度の効果は ^{14}N OTにおいては明確ではない。これは、高磁場においては ^{14}N OTのnutation frequencyがかえって低くなるためである。では低磁場の方が良いかといえば、線幅が広がるため、感度の低下につながる可能性がある。本研究では複数の異なる強さの磁場において ^1H - ^{14}N OT-RESPDORの実験を行い、検出効率の磁場依存性を明らかにすることを目的とした。

【パルスシーケンス】

Fig.1に ^1H - ^{14}N OT-RESPDORのパルスシーケンスを示す。 ^1H - ^{14}N の双極子相互作用がSR4シーケンスにより回復されるが、 ^1H の π パルスによってリフォーカスする。この参照信号を S_0 とする。一方で、二つのSR4リカップリングブロックの間で ^{14}N の共鳴周波数の二倍 (OT) のパルスを打つことにより、双極子相互作用のリフォーカスを妨げることができる。この信号を S' とする。 ^{14}N の近傍にある ^1H の信号は S_0 と S' の差として現れる。この S_0 - S' スペクトルを様々な ^{14}N OTオフセットに応じてプロットすることで、 ^1H - ^{14}N 相関スペクトルが得られる。

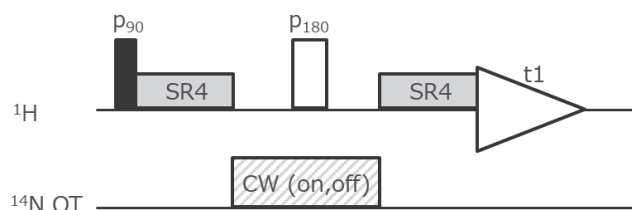


Fig.1 pulse sequence of ^1H - ^{14}N OT-RESPDOR
Signal is recorded with(S')/without(S_0) the ^{14}N saturation pulse.

高速MAS, ^{14}N NMR

○おがえりゆうたろう、にしやまゆうすけ

【結果】

9.4および14.1, 16.5, 21.1 Tの各磁場において、様々な ^{14}N OTパルスの長さで ^{14}N OT RESPDOR測定を行い、各磁場における検出効率が最大となる ^{14}N OTパルス幅およびその時の検出効率を求めた。比較のために、各磁場において同じ ^{14}N OT B_1 強度を用いた。サンプルは、N-Acetyl Alanine ($C_{Q(\text{NH})} = 3.4$ MHz, C_Q は四極子カップリング定数) (Fig.2 A) を用いた。その結果、磁場を大きくするほど検出効率が最大となる ^{14}N OTパルス幅が長くなること (Fig.3)、最大検出効率はどの磁場においても ^1H スピンエコー信号の10%前後になるということが分かった (Fig.4)。

次に、N-Acetyl Alanineとは異なる大きさの四極子を持つ窒素原子を含むorthorhombic L-Histidine ($C_{Q(\text{NH})} = 1.8$ MHz, $C_{Q(\text{NH}_3^+)} = 1.2$ MHz) (Fig.2 B) を用いて、N-Acetyl Alanineと同様の実験により検出効率を求め、比較した。その結果、L-HistidineのNHシグナルおよび NH_3^+ シグナルの両方についても検出効率は磁場の大きさによって変化せず、10%前後の検出効率を示した (Fig.4)。

【考察】

^{14}N OTの励起は2次の四極子相互作用によって起こるため、nutaton frequencyは C_Q^2/ω_0 に比例する。すなわち低磁場において、あるいは大きな四極子を持つ ^{14}N 原子においてnutaton frequencyが高くなる。実際にFig.3にみられるように同じ B_1 強度でも低磁場では短いパルスで最大強度が得られている。一方で ^{14}N OT線幅は、 C_Q^2/ω_0 に比例する二次の効果に比例する。 ^{14}N OTパルスの励起範囲は狭く、低磁場あるいは大きな四極子のもたらす広い線幅のすべてを励起できず感度が低下する可能性がある。しかしながら実験結果はこの可能を否定しており、励起効率の磁場・四極子の大きさによる効果は観測されなかった。詳細な解析を行うと、いずれの場合においてもSR4リカップリングにより信号強度が1/2になり、 ^{14}N OT-RESPDORによりさらに1/5、総計で10%の信号のみが残っていることが分かった。

以上の議論より、熱平衡磁化に対しての ^{14}N OT-RESPDORの励起効率は磁場・四極子に依存しないことが分かった。もともと、高磁場では熱平衡磁化が大きくなるという点および線幅が細くなるという点において望ましい。

Fig.4 filtering efficiency of ^1H - ^{14}N OT-RESPDOR

The filtering efficiency of each nitrogen atom / B_0 field is shown. Blue: Histidine NH_3^+ (1.2 MHz) Red: Histidine NH (1.8 MHz) Green: N-Acetyl Alanine (3.4 MHz)

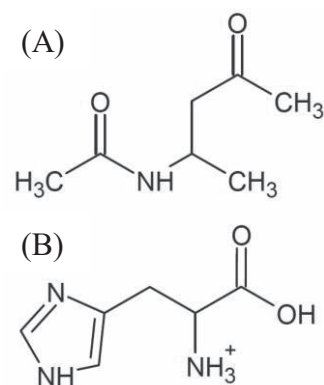


Fig.2 Chemical structure of N-Acetyl Alanine (A) and orthorhombic L-Histidine (B)

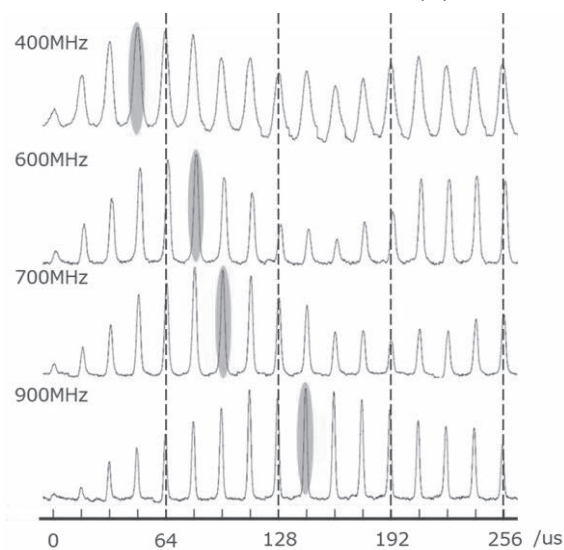
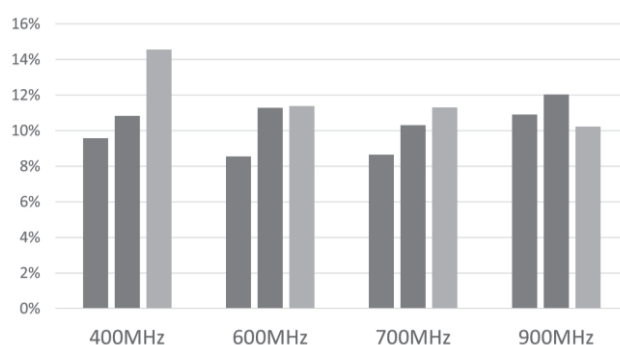


Fig.3 Relation of NH signal intensity of N-Acetyl Alanine and pulse widths of ^{14}N OT pulse.

Intensity of NH signal with each ^{14}N OT pulse width is arrayed. Intensity of the maximum efficiency of each B_0 field is marked in red.



References

1. Duong, N. T. & Nishiyama, Y. Detection of remote proton-nitrogen correlations by ^1H -detected ^{14}N overtone solid-state NMR at fast MAS. *Physical Chemistry Chemical Physics* (2022) doi:10.1039/d2cp00155a.

P27

多核固体NMRを用いた高炉セメント中性化挙動の解析

○高橋貴文¹, 諸岡 等¹, 大塚勇介²

¹日本製鉄株式会社

²日鉄高炉セメント株式会社

Multi-nuclear solid state NMR analysis on carbonation behavior of blast furnace slag cement

○Takafumi Takahashi¹, Hitoshi Morooka¹, Yusuke Otsuka²

¹Nippon Steel Corporation

²Nippon Steel Blast Furnace Slag Cement Co., Ltd.

Using Ground blast furnace slag (GGBS) cement can save energy consumption and decrease the amount of CO₂ emission since a part of clinker of BFS cement is substituted by fine particles of BFS that has been produced in an iron making process. Based on the estimation under accelerated condition, one of the disadvantages of BFS cement is considered to be low durability against carbonation. Recent findings, however, suggest that carbonation under accelerated condition would not adequately follow reaction under real atmospheric one. In this study, chemical structural changes of BFS cement under atmospheric and accelerated condition were investigated by using multi-nuclear solid state NMR. It was found that carbonation under accelerated condition could deteriorate the property of BFS cement more than that in atmospheric condition.

1. 緒言

高炉セメントは、高炉水砕スラグを粉砕して得られた高炉スラグ微粉末と、普通ポルトランドセメントを混合して製造される。この製造方法によって、原料およびエネルギーの消費が抑えられ、石灰石の熱分解等に起因するCO₂の排出量も抑制されるため、高炉セメントは省CO₂・省エネに資する材料と捉えられている。また、その化学的抵抗性の高さ、アルカリシリカ反応抑制効果および長期強度の増進等の長所を活かし、土木工事、建築基礎等に使用されており、今後も堅調な需要が期待される。一方で、高炉セメントは普通ポルトランドセメントに比べて中性化速度が速く、大気環境下での耐久性に劣るとされてきた。近年、供用期間87年のコンクリート構造物の鋼材腐食に関する調査が行われた結果、鋼材腐食への影響は中性化より水の浸透の影響が大きいことが判明し、高炉セメントの耐久性評価の見直しが議論されている¹。さらに、高炉セメントに関しては、耐久性評価のための促進環境試験が、実際の大气環境下での中性化とは異なる可能性も指摘されており²、実体の解明が必要とされている。以上の点を踏まえ、本研究では、中性化試験条件が化学構造に与える影響を検証するため、促進環境下および大気環境下で中性化処理を行った高炉セメント硬化体について、多核固体NMR法による化学構造解析を実施した。

2. 実験方法

高炉セメントは、研究用ポルトランドセメントに対し高炉スラグ微粉末を85mass%添加・混合して作製した。試料の化学組成をTable 1に示す。上記高炉セメントと水を水/固比=60%で混合した後、20°C・7日間封緘養生（サイズ：5mm×10mm×50mm）した。その後、封緘養生試料を、室内（大気）環境（20°C, 60%RH, 0.04%CO₂）および促進環境（20°C, 60%RH, 5.0%CO₂）で、それぞれ100%中性化処理した。中性化完了時期は、フェノールフタレイン液染色法により硬化体内部が

多核固体 NMR、高炉セメント、中性化

○たかはし たかふみ、もろおか ひとし、おおつか ゆうすけ

着色されないことを根拠に判断し、アセトンを用いたD-Dry法により水和停止し、分析試料とした。なお、中性化完了材齢は、室内環境：14日、促進環境：7日であった。

Table 1. Chemical composition of blast furnace cement (BFS) pastes.

	Chemical composition [mass%]												
	SiO ₂	Al ₂ O ₃	Fe ₂ O ₃	CaO	MgO	SO ₃	Na ₂ O	K ₂ O	TiO ₂	P ₂ O ₅	MnO	Cl	ig.loss
B85	30.97	12.66	0.78	47.41	4.84	2.02	0.52	0.16	0.26	0.28	0.02	0.003	0.28

2.1. 固体NMR測定

2.1.1. ²⁹Si MAS および ²⁹Si{¹H}CPMAS スペクトル測定

固体²⁹Si MAS NMRスペクトル測定は、静磁場9.4T(¹H 共鳴周波数400.265MHz、²⁹Si 共鳴周波数79.521MHz) JEOL-ECA400分光計を用いて実施した。二重共鳴8 mmφプローブを用い、回転周波数7kHz、パルス幅 1.09μs (18°パルス)、緩和時間を考慮し、繰り返し時間 9 s、積算回数10000回とした。²⁹Si{¹H} CPMASスペクトル測定も上記と同様の磁場、回転数を用いて実施した。¹H の90°パルス幅 5.1μs、繰り返し時間5s、積算回数28000回、contact time 0.2 ms、とし、Hartmann-Hahn条件を満たすようRF強度を設定した。

2.1.2. ²⁷Al MAS & 3QMAS NMRスペクトル測定

²⁷Al MAS NMRスペクトル測定は、静磁場16.4T(²⁷Al共鳴周波数182.24 MHz)の下で、JEOL-ECA700分光計、4mmφ3QMASプローブを用いて実施した。全ての測定について、回転周波数は18 kHzとした。²⁷Al MASスペクトルを測定する際には、定量性を確保するため、パルス幅1 μs (18°パルス)、繰り返し時間を 3 sとし、6400回の積算を実施した。3QMAS測定は、DQF-SPAMシーケンス³を用いて行った。

2.1.3. ¹H MAS & ¹H DQMAS NMR スペクトル測定

固体¹H MAS NMRおよび¹H DQMAS NMRスペクトル測定は、静磁場18.8T(¹H 共鳴周波数800 MHz Bruker-AVANCE800分光計を用いて実施した。測定には二重共鳴対応0.7mmφプローブを用いた。¹H MAS NMRスペクトル測定は、回転周波数100 kHzの下で、バックグラウンドシグナルを十分に下げためDEPTHシーケンス⁴を用い、90°パルス幅 1.2 μs、繰り返し時間 15 s、積算回数3200回の条件で実施した。¹H DQ (Double Quantum) MAS スペクトルは、BABA16シーケンス⁵を用いて、パルス幅 1.2 μs、繰り返し時間3s、各t₁での積算時間を192回とした。

3. 結果および考察

²⁹Si MAS NMR スペクトルおよび²⁹Si{¹H}CPMAS スペクトルを **Fig. 1** に示す。封緘養生7日では、SiO₄四面体の多重度が Q¹および Q²のネットワーク構造から構成されており、これは、カルシウムシリケート水和物 (Calcium Silicate Hydrate: C-S-H) および一部未水和の Alite (3CaO・SiO₂)、Belite(2CaO・SiO₂)の存在を示している。²⁹Si MAS スペクトルから分かるように、促進環境中性化後には、明らかにこれら Q¹および Q²の比率が低下し、新たに Q⁴構造が生成していることが分かる。これは、水和物が分解される際に、Si-O-Si のブリッジ構造が切断され、エネルギー的に安定化するよう、四面体が網目状に成長したことを示している。この Q⁴相当領域はスペクトルの半値幅が大きく構造的な分布を示しており、結晶相ではなく非晶質であることが強く示唆される。池田ら⁵は、C-S-H には無いが、これと類似した構造を有するトバモライトの炭酸化(中性化)過程を研究し、トバモライトの分解による非晶質シリカゲルの生成に言及しており、今回の観測結果もこれと整合的である。

²⁹Si{¹H}CPMAS スペクトルより、全ての試料について Q¹相当領域のシグナルは著しく減衰して

おり、これは、H原子が近傍に存在しない、即ちクリンカーであることを示している。また、促進環境と室内環境を比べると、室内環境下において、多重度が低く、元々のセメント水和物が残存していると考えられる。

Si の化学構造情報より、促進環境では高炉セメント中の水和物の分解が促進され、室内環境での中性化に比べ、劣化が過剰に進行することが示唆された。

この仮説を検証するため、 ^{27}Al MAS と ^1H MAS の解析を実施した。

^{27}Al MAS NMR スペクトルを Fig. 2 に示す。これらのスペクトルより、封緘養生 7 日後には、化学シフト 0~10ppm の 6 配位 Al 領域に、Monosulphate ($\text{Ca}_4\text{Al}_2\text{O}_6\text{SO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) , Ettringite ($\text{Ca}_6\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3(\text{OH})_{12} \cdot 26\text{H}_2\text{O}$) , 表面吸着 Al (推定) が観測された。また、4 配位 Al も観測されており、これは C-S-H の SiO_4 四面体において、Si を置換したものと考えられる。さらに、存在量は非常に少ないが、5 配位 Al も観測された。

促進環境中性化後には、中性化前に存在した Ettringite が消失し Monosulphate も大幅に減少するなど、6 配位 Al 構造を有するセメント水和物がほとんど分解していた。その一方で、化学シフト 40~80ppm 付近の 4 配位 Al は増大していた。これは、セメント水和物中に存在していた 6 配位 Al が、水和物の分解に伴い 4 配位 Al に構造変化したためと考えられ、 Q^4 構造を有する反応生成物の一部を構成している可能性がある。また、Fig. 2 から明らかのように、この 4 配位 Al の比率は、促進環境の方が室内環境より高かった。この傾向と整合するように、室内環境の試料では、Ettringite が一部残存し、Monosulphate の残存比率も高いことも分かった。

以上のように、Al の化学構造情報からも、促進環境と室内環境では構造に差異があり、促進中性化は高炉セメントの劣化をより進行させることが強く示唆された。

さらに、各試料の ^1H MAS NMR スペクトルおよび ^1H DQMAS スペクトルを Fig. 3 に示す。

全ての試料に共通して観測されるのは、主に化学シフト 4~8 ppm 付近の広幅なピーク (X)、2

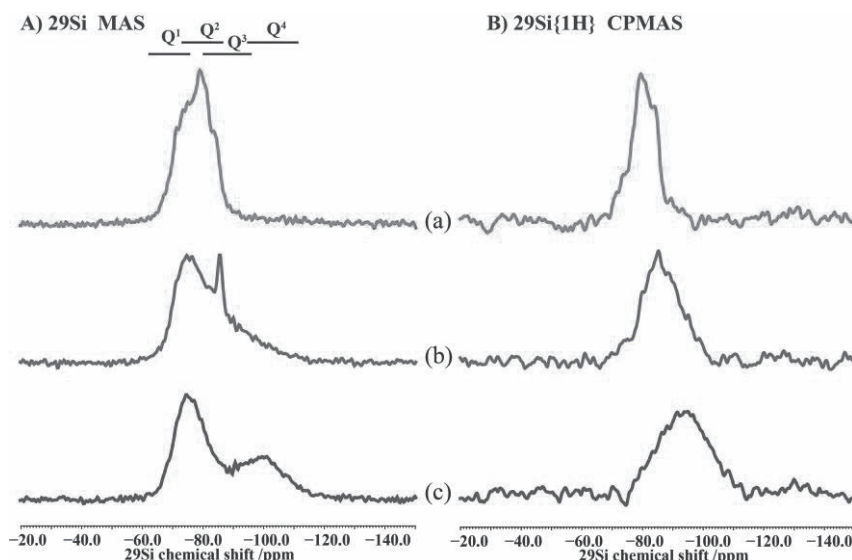


Fig. 1. Summary of ^{29}Si MAS and $\text{Si}\{^1\text{H}\}$ CPMAS NMR spectra of GGBS cement pastes before and after carbonation. (a) :sealing cure. (b): atmospheric carbonation, (c): accelerated carbonation.

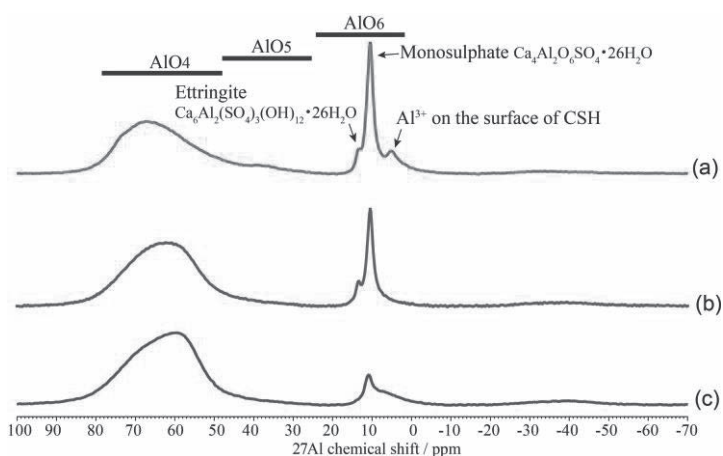


Fig. 2. Summary of ^{27}Al NMR spectra of GGBS cement pastes before and after carbonation. (a):sealing cure. (b):atmospheric carbonation, (c): accelerated carbonation.

ppm 付近の比較的先鋭的なピーク(Y)、さらには 1 ppm 付近のピーク(Z)の計 3 つのピークである。このうち、ピーク X に関しては、セメント試料中に結合水等で存在している水分子 (H₂O) と考えられる。一方、ピーク Y および Z に関しては、C-S-H, Ettringite および Monosulphate 等の OH 基や水分子に由来するものと考えられる。

中性化した試料 ((b)および(c)) では、Y, Z のピーク強度が低下し、相対的に X のピーク強度が増加した。(b)と(c)の比較より、室内環境(c)の方が、ピーク Y および Z の強度が高く、促進環境(b)に比べて水和物が残存していたことを示唆している。この点は、これまでに示した Si および Al の化学構造解析結果とも一致する傾向である。

また、¹H DQMAS NMR スペクトルより、観測された H サイトは、全般的に他のサイトとの相関が殆ど無いか、非常に微弱であることが分かった。中性化前(a)と室内環境中性化後(c)では、¹H MAS スペクトル(A)の Y と Z に相当する領域において微弱な相関が捉えられていたが、Fig. 3 に示すように促進中性化後にはその相関は失われ、H₂O や OH 基の相互作用はより一層低下していることが示唆された。このように、H の化学構造情報からも、促進環境と室内環境の違いが認められ、促進中性化は大気中性化よりも高炉セメントに対し大きなダメージを与える可能性が示された。

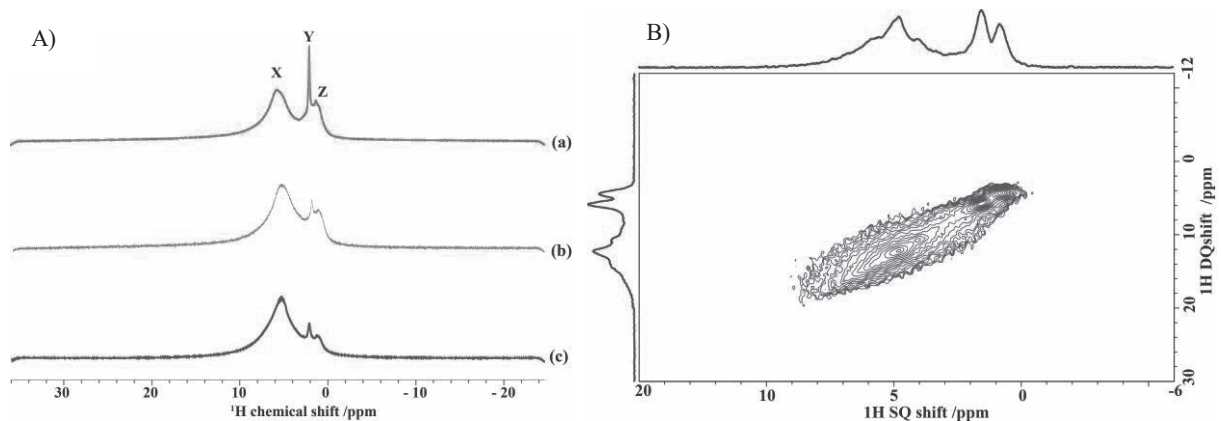


Fig. 3. Summary of A) ¹H MAS NMR spectra for (a) sealing cure, (b) atmospheric carbonation, (c) accelerated carbonation, and B) ¹H DQMAS NMR spectrum of carbonation under accelerated condition.

4. 結言

今回調査対象とした高炉セメント硬化体(GGBS 置換率 85%)については、固体 NMR による化学構造解析の結果、促進中性化と大気中性化では化学構造変化が明らかに異なり、促進環境では水和物の分解が促進され、実際の大气環境よりも過度に劣化が進むことが判明した。したがって、高炉セメントに対する促進中性化試験は、実環境の中性化反応を単純に加速化しただけなく、より大きなダメージをもたらし、このことが、高炉セメントの耐久性の過小評価に繋がっている可能性がある。

References

- (1) 松岡弘大、仁平達也、伊藤正憲、山田久美 (2015) コンクリート工学年次論文集 37 1351-1356. (2) von Greve-Dierfeld, S., Lothenbach, B., Vollpracht, A. *et al. Mater Struct* 53, 136 (2020). (3) Z. Gan, and H.T. Kwak *J. Magn. Reson.* 168 (2004) 346-351. (4) D. G. Cory, and W. M. Ritchey, *J. Magn. Reson.* 80 (1993) 128-132. (5) W. Sommer, J. Gottwald, D.E. Demco, and H. W. J. Spiess, *J. Magn. Reson. A* 113 (1995) 131, (6) Y. Ikeda, Y. Yasuike and Y. Takashima (1991) *J. Cer. Soc. Jpn* 99, 423-426.

P28Y

卓上NMRを用いた母乳中のラクトースの定量

○蔣佳稀¹, 胡知彦¹, 甘莉¹, 宋子豪¹, 大西裕季¹, 長田誠司², 久米田博之¹, 熊木康裕¹, 山内一夫³, 相沢智康¹

¹ 北海道大学・大学院生命科学院

² 中山商事(株)

³ 沖縄科学技術大学院大学・機器分析セクション

Quantification of lactose in human breast milk using benchtop NMR

○Jiaxi JIANG¹, Zhiyan HU¹, Li GAN¹, Zihao SONG¹, Yuki Ohnishi¹, Seiji Osada², Hiroyuki Kumeta¹, Yasuhiro Kumaki¹, Kazuo Yamauchi³, Tomoyasu Aizawa¹

¹Grad. Sch. Life Sci., Univ. Hokkaido

²Nakayama Co.,Ltd.

³Instrumental Analysis Section, OIST

Human breast milk is the primary source of nutrition for neonates. Changes in the lactose concentration of breast milk have an essential impact on the growth of children. NMR is an attractive technology for quantifying lactose, and the recent emergence of benchtop NMR may address the high purchase and maintenance costs of high-field NMR and can be used by point-of-care facilities. In this study, we investigated a protocol for the determination of lactose in breast milk by bench-top NMR. The reliability of the benchtop NMR was demonstrated by comparing the results of lactose quantification in breast milk using benchtop NMR with 800 MHz NMR.

Overview

In comparison to high-field NMR using expensive-superconducting coils, benchtop NMR uses permanent magnets, which results in reduced investment and maintenance costs and a smaller size. However, on the other hand, as shown in Fig. 1, the resolution and sensitivity of benchtop NMR is much lower than those of high field spectrometers. Furthermore, because benchtop NMR is a newly developed device, there are no

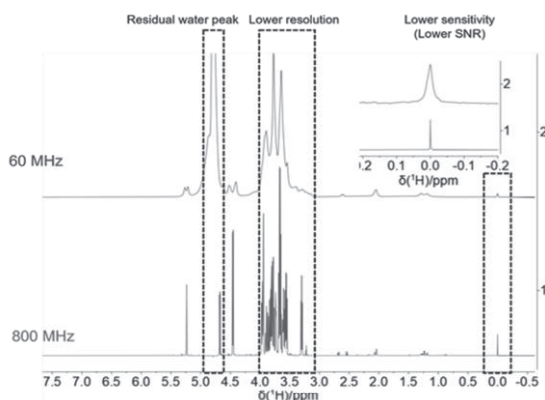


Fig. 1 Comparison of ¹H spectra between 800 MHz NMR and 60 MHz NMR of the same breast milk samples.

Benchtop NMR, Quantification, Human breast milk

○しょう かき, こ しげん, かん り, そん ずはお, おおにし ゆうき, おさだ せいじ, くめた ひろゆき, くまき やすひろ, やまうち かずお, あいざわ ともやす

well-established protocols. Therefore, in this study, a detailed examination of the conditions related to measurement and analysis was conducted to determine the concentration of lactose in breast milk using bench-top NMR.

Methods and results

The selection of the power of the pre-saturated pulse can greatly affect the accuracy of the quantification results since the residual water signal will overlap with the lactose peaks. By comparing the spectra of the lactose standard sample obtained after applying pre-saturation pulses of different powers, as shown in Fig. 2, it was found that the use of an appropriate pre-saturation pulse could effectively suppress the water signal, with only a minor effect on the rest of the spectrum.

Next, the method of using TSP as an internal standard and the method of quantification using calibration curves built using standard lactose samples without using an internal standard were examined.

The lactose standard curves were built using the spectra area of α -Lactose H1 peak and lactose bulk ring region of the lactose gradient samples. The obtained standard curves were applied to quantify lactose in 18 human breast milk samples.

As shown in Fig.3, the dependability of using benchtop NMR for lactose quantification was demonstrated by comparing the quantification results with those of the 800 MHz NMR equipment.

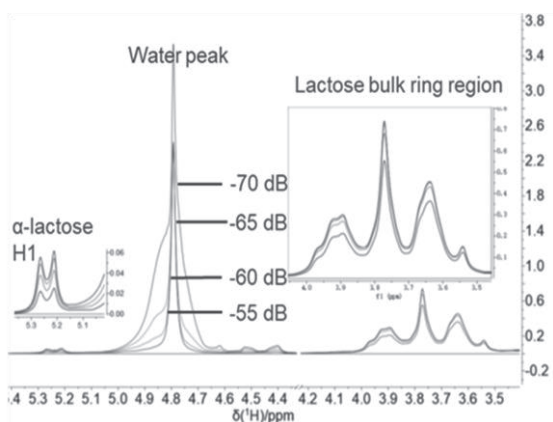


Fig. 2 impact of different pre-saturated pulse power settings on the spectra of 100 mM lactose standard samples.

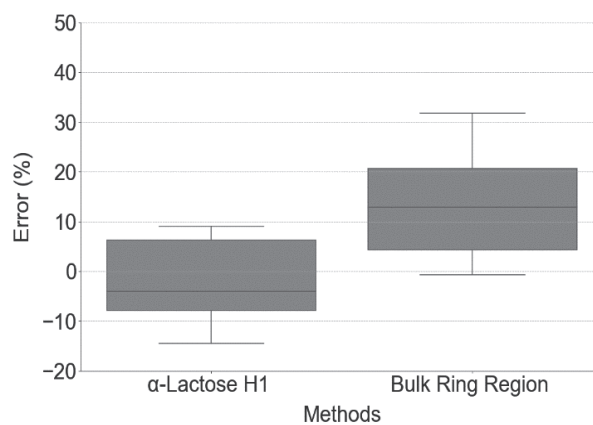


Fig. 3 Errors in the quantification results of lactose concentration in human breast milk using benchtop NMR.

P29

Aggregation kinetics and Structural Insight of α -synuclein Monomers Cross-seeded with β -amyloid Fibrils.

○ Li Bing Kee¹, Takayuki Kamihara^{1,2}, Tatsuya Matsunaga², Yoshiki Shigemitsu¹, Isamu Matsuda¹, and Yoshitaka Ishii^{1,2}

¹*School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology, Yokohama, Japan.*

²*Advanced NMR Development & Application Team, BDR Center, RIKEN, Yokohama, Japan.*

Amyloid proteins, such as β -amyloid ($A\beta$) and α -synuclein (αS), misfold into amyloid oligomers and fibrils, are the common characteristics of various neurodegenerative diseases. Dementia with Lewy bodies (DLB) and Parkinson's disease (PD) are neurodegenerative disorders resulting from the accumulation and aggregation of αS and the formation of Lewy bodies (LB) in brain. Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disorder resulting from the abnormal assembly and misfolded $A\beta$ and the development of amyloid plaques. Recent studies suggested that misfolded $A\beta$ are frequently observed in DLB and PD patients, implying a possible cross talk between αS and $A\beta$ aggregation. In this research, we monitor the aggregation kinetics of αS monomers in the presence of $A\beta$ fibril "seed" using Thioflavin T (ThT) fluorescence assay, while examining the morphology of αS fibrils via transmission electron microscopy (TEM). We will also report the impact of the cross-seeding on structures of the resultant fibrils characterized by solid-state NMR (SSNMR).

The major pathological hallmark of PD is abnormal accumulation and aggregation of αS protein in the form of Lewy bodies. Recent studies reported that misfolded αS exhibits structural differences in various neurodegenerative diseases such as PD, DLB, and multiple system atrophy (MSA) [1,2,3]. AD is characterized pathologically by deposition of $A\beta$ plaques and formation of neurofibrillary tangles by tau protein. Recent studies indicated co-existence of αS and $A\beta$ pathologies in many AD patients, suggesting possible interaction between αS and $A\beta$. [4] One hypothesis that explains the interaction is that αS and $A\beta$ may exert cross-seeding effect from one to the other and can promote the aggregation [5,6]. Cross-seeding, which is also known as heterologous seeding, occurs when the polymerization of one amyloid protein is catalyzed by aggregates of a different amyloid protein [7]. However, unlike self-seeding, in which aggregates of the same amyloid protein are used as seed, the mechanisms of misfolding and aggregation of αS in various cross-seeding conditions remain unclear. Also, there is a lack of studies on the structural details of amyloid fibrils derived from such cross-seeding interactions using SSNMR.

In this study, the effects of cross-seeding on αS misfolding kinetics was monitored by incubating αS monomer in the presence of $A\beta 40$ fibril by ThT fluorescence, which selectively detects formation of amyloid fibrils. The results were compared with those for unseeded and self-seeded αS samples.

alpha synuclein, cross-seeding, SSNMR

○ キー リビン、かみはら たかゆき、まつなが たつや、しげみつ よしき、まつだ いさむ、いしい よしたか

The morphologies of the cross-seeded fibrils were inspected by TEM in comparison with those for self-seeded α S samples. We will also discuss the structural differences of self-seeded and cross-seeded fibrils observed by SSNMR, which may provide some new insight into the correlation between AD and PD pathogenesis.

References

- [1] Heise, H., Hoyer, W., Becker, S., Andronesi, O. C., Riedel, D., & Baldus, M. (2005) Molecular-level secondary structure, polymorphism, and dynamics of full-length α -synuclein fibrils studied by solid-state NMR. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102 (44),16871-15876.
- [2] Tuttle, M., Comellas, G., Nieuwkoop, A., Covell, D., Berthold, D., Kloepper, K., Courtney, J., Kim, J., Barclay, A., Kendall, A., Wan, W., Stubbs, G., Schwieters, C., Lee, V., George, J., & Rienstra, C. (2016) Solid-state NMR structure of a pathogenic fibril of full-length human α -synuclein. *Nat Struct Mol Biol* 23, 409–415.
- [3] Schweighauser, M., Shi, Y., Tarutani, A., Kametani, F., Murzin, A., Ghetti, B., Matsubara, T., Tomita, T., Ando, T., Hasegawa, K., Murayama, S., Yoshida, M., Hasegawa, M., Scheres, S., & Geodert, M. (2020) Structures of α -synuclein filaments from multiple system atrophy. *Nature* 585,464-469.
- [4] Marsh, S. E., & Blurton-Jones, M. (2012). Examining the mechanisms that link β -amyloid and α -synuclein pathologies. *Alzheimer's research & therapy*, 4(2), 11.
- [5] Paramita, C., Kailash, P. P., Bibin, G. A., Kriti, D., & Karunakar, K. (2019) Amyloid cross-seeding raises new dimensions to understanding of amyloidogenesis mechanism. *Ageing Research Reviews*, 56, 1568-1637.
- [6] Ono, K., Takahashi, R., Ikeda, T., & Yamada, M. (2012). Cross-seeding effects of amyloid β -protein and α -synuclein. *Journal of neurochemistry*, 122(5), 883–890.
- [7] Subedi, S., Sasidharan, S., Nag, N., Saudagar, P., & Tripathi, T. (2022) Amyloid Cross-Seeding: Mechanism, Implication, and Inhibition. *Molecules*, 27(6):1776.

P30

Solution-state polyubiquitin binding specificity exhibited by the extended NZF domain of LUBAC component HOIL-1L

Erik Walinda¹, Kenji Sugase², Naoki Ishii², Masahiro Shirakawa², Kazuhiro Iwai¹, Daichi Morimoto²

¹*Department of Molecular and Cellular Physiology, Kyoto University*

²*Department of Molecular Engineering, Kyoto University*

The transcription factor nuclear factor- κ B (NF- κ B) is an essential regulator of gene expression in inflammatory signaling pathways, including innate and adaptive immune responses. Due to its central role, NF- κ B is sometimes referred to as a “master switch” of inflammatory responses. Before activation of NF- κ B signaling at the plasma membrane, the NF- κ B protein complex resides in the cytosol in an inactive form due to binding to inhibitor of κ B (I κ B) proteins. Activation of the canonical NF- κ B pathway starts with binding of extracellular inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor α (TNF α) or interleukin-1 β to their plasma membrane receptors, thereby triggering complex downstream signaling cascades which involve various types of ubiquitin chains of different linkages including Lys63- and Met1-linked polyubiquitin. The Met1-linked “linear polyubiquitin chain” is specifically synthesized by the linear ubiquitin chain assembly complex (LUBAC) which consists of the catalytic HOIP E3 ubiquitin ligase and two accessory proteins SHARPIN and HOIL-1L; formation of these linear polyubiquitin chains contributes to activation of NF- κ B promoting cell survival and, in addition, NF- κ B independently protects against cell death. Linear ubiquitin chains are known to be specifically bound by several “linear polyubiquitin receptor proteins” including NF- κ B essential modulator (NEMO) via its UBAN domain, A20 via its ZF7 domain, and HOIL-1L via its NZF domain and all these interactions are thought to be important in the regulation of NF- κ B signaling. Here, we used NMR spectroscopy (Fig. 1) and isothermal titration calorimetry to dissect the interaction of one of these proteins, HOIL-1L (via its NZF domain), and linear polyubiquitin chains in solution to provide a biochemical venue toward the understanding of HOIL-1L NZF-dependent NF- κ B regulation in health and disease.

In 2011 a crystal structure of the HOIL-1L NZF domain in complex with linear diubiquitin (Fig. 2) revealed that this NZF domain had unique characteristics within its family, namely, the presence of an α -helical tail at the C-terminal end of the domain (2). This tail was indeed found to be a key functional determinant in establishing specificity towards linear ubiquitin chains. As such, it is now well accepted that the HOIL-1L NZF domain including this NZF-tail (residues 190-250 for mouse HOIL-1L) selectively binds to M1-linked polyubiquitin chains and that this interaction modulates the degree of NF- κ B activation in cells. However, recent experimental

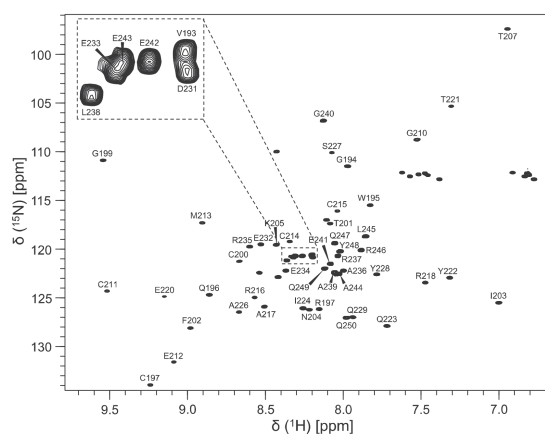


Fig. 1. NMR resonance assignments of the mouse HOIL-1L NZF domain. Solution protein NMR spectroscopy was used to assign ¹H, ¹³C, and ¹⁵N resonances the NZF domain of HOIL-1L in free (shown) and ubiquitin-bound (not shown) forms to provide a foundation for functional studies. (Modified from reference (1))

evidence from solution scattering and computational studies indicates marked similarities between (free) K63- and M1-linked chains such as being able to form similarly open and extended conformations in solution owing to the proximity of the K63 ϵ -amino group and the M1 terminal α -amino group. This suggested that – in solution – the conformational flexibility in the K63-linked chain might allow it to coil into an “linear polyubiquitin-like” conformation, which might allow it to interact with HOIL-1L NZF in a similar manner.

Therefore, to reassess the polyubiquitin binding specificity of HOIL-1L NZF in solution and in an atomic-resolution manner, we obtained ^{15}N -isotope labeled purified protein samples and conducted solution NMR titration experiments. In titration experiments using K63-linked diubiquitin, weak residual binding of to HOIL-1L NZF domain was observed. For example, residues C197, F202, I203 and E212 of the NZF core showed clearly detectable chemical shift changes upon raising the diubiquitin to NZF molar ratio. However, overall, the binding affinity was deemed to be weak, as all observed chemical shift changes were in the fast-exchange regime on the NMR timescale and least-squares fitting of the chemical shift changes as a function of the concentrations yielded a K_d of approximately 130 μM , whereas specific ubiquitin binding often occurs with K_d values in the range of 1 – 10 μM . Thus, these results agreed with the previously described overall weak (mono-)ubiquitin binding tendency of the NZF domain family.

In stark contrast, NMR titration experiments using linear diubiquitin indicated a highly specific high-affinity binding process. In this case, NMR amide resonances either showed significant broadening over the course of the titration (i.e., intermediate exchange regime on the NMR timescale) or started to disappear in the free state to then reappear in the bound state (i.e., slow exchange regime on the NMR timescale). For instance, the signal corresponding to R218 gradually disappeared in the free state and then reappeared in the bound state, while F202 and I203 showed gradual chemical shift changes albeit with marked line-broadening over the course of the titration. These two residues map to the distal ubiquitin binding site in the reported co-crystal structure, which explains their large chemical shift perturbation and line broadening upon interaction with linear diubiquitin. Similarly, T207 and E212, residues on the proximal Ub-binding site exhibited tremendous line broadening at intermediate molar ratios. Overall, we conclude from these titration experiments that the crystal structure explains many, yet not all aspects of solution-state ubiquitin binding.

To gain further insight into possible mechanistic details into linear ubiquitin binding specificity, we also determined the yet-missing solution structure of the free NZF domain of HOIL-1L, compared its structural rigidity in its free and linear ubiquitin bound states, and conducted isothermal titration calorimetry, as well as site-directed mutagenesis experiments.

References

- (1) Ishii N *et al.* (2019) NMR resonance assignments of the NZF domain of mouse HOIL-1L free and bound to linear di-ubiquitin. *Biomol NMR Assign.* 13.1: 149-153.
- (2) Sato Y *et al.* (2011) 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.* 108.51: 20520-20525.

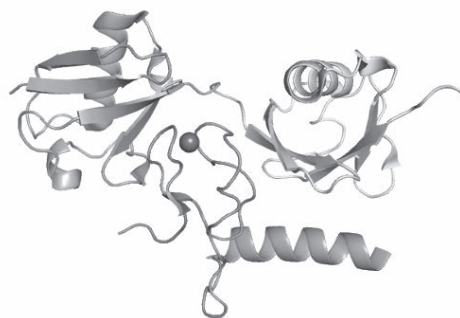


Fig. 2. The HOIL-1L NZF/linear diubiquitin co-crystal structure (PDB ID 3B08; ref. (2)) explains many aspects of the binding process, yet NMR spectroscopy appears to unveil additional details in solution. Sphere, Zn^{2+} ion.

P31

固体NMRとMDシミュレーションによるヒトカルシトニンの変異とクルクミン添加による線維形成阻害機構の解明

○内藤 晶¹, 伊藤一渡邊 ひかり² 豊田修平¹, Javkhlantugs Namsrai^{1,2}, 川村出¹, 上田一義¹

¹横浜国立大学・大学院工学研究院

²国立モンゴル大学・工学応用科学科

Fibril inhibition mechanism of human calcitonin by mutation and addition of curcumin as revealed by solid state NMR and MD simulation

○Akira Naito¹, Hikari Itoh-Watanabe¹, Shuhei Toyoda¹, Namsrai Javkhlantugs^{1,2}, Izuru Kawamura¹, Kazuyoshi Ueda¹

¹ Graduate School of Engineering, Yokohama National University

² School of Engineering and Applied Science, National University of Mongolia

Human Calcitonin (hCT) is known as an amyloid forming peptide. We have investigated that hCT fibrils form cross β -sheet structure and Y12, F16, F19 and F22 play important role for the interaction between β -strands in fibrils using solid-state NMR spectroscopy and MD simulations. It is also investigated that hCT fibrils are formed by taking two step autocatalytic reaction mechanism with nucleation (k_1) and fibril elongation (k_2) steps. In this study, firstly fibril formation kinetics were investigated with TL-hCT (Y12L, F16L, F19L) mutants. Experimental results indicate that the rate of fibril elongation step was significantly slowed, indicating that the fibril elongation process is inhibited by the mutation. Second, fibril forming kinetics of hCT by addition of curcumin was investigated and the results indicate that the fibril nucleation rate was significantly increased. This result indicates that curcumin actually inhibit the fibril nucleation step.

[序]

ヒトカルシトニン(hCT)は32アミノ酸残基からなるペプチドホルモンで、甲状腺で分泌されて骨の代謝調節に重要な役割を果たしている。一方、hCTはアミロイド様線維を形成することが知られており、このアミロイド線維は甲状腺髄様ガンを誘発することが報告されている。我々はこれまで、hCTの線維構造や線維形成機構を解明する研究を行ってきた(1-4)。hCTにより形成されたアミロイド線維について固体NMR分光法を用いて線維構造を解析した結果、Fig. 1 に示すように中性溶液中で形成した線維は逆平行 β -シート構造を形成しており、Y12, F16, F19, F22の芳香族アミノ酸残基が β -ストランド間で相互作用を形成し、線維の安定化に寄与していることが明らかになった。さらに本研究ではhCTアミロイド線維形成反応機構の解明を行ってきた。hCTのアミロイド線維形成はモノマーのhCTが凝集して線維中間体を形成する反応(速度定数: k_1)を経て、次に中間体の表面が触媒となり中間体表面にhCTモノマーが線維に伸長していく反応(速度定数: k_2)により線維が成長していく2段階自己触媒反応機構により解析できることを示してきた(1)。

固体NMR、ヒトカルシトニン、線維形成阻害機構

○ないとうあきら、いとうわたなべひかり、とよだしゅうへい、なむずらいじゃぶからんたぐす、かわむらいずる、うえだかずよし

本研究ではこれまでの研究成果をもとに線維形成を阻害する機構について詳しい検討を行った。1番目はhCTの線維構造の安定化に芳香族アミノ酸残基が寄与していることから、この芳香族アミノ酸(Y, F)をLに変異したTL-hCT(Y12L, F16L, F19L)について線維形成反応機構を解析した。2番目にクルクミンが芳香族アミノ酸と相互作用することから、クルクミンを加えたhCT溶液中で起こるhCTの線維形成反応機構について解析した。これらの結果から得られたhCT線維形成阻害機構について報告する。

[hCTアミロイド線維の構造解析(1),(2),(3)]

hCTは中性溶液中で短時間のうちに線維を形成し沈殿を生成した。選択的に同位体標識した $[^{13}\text{CO}]\text{Phe22}$, $[^{13}\text{C}_3]\text{Ala31}$ -hCT, および $[^{13}\text{CO}]\text{Gly10}$, $[^{13}\text{C}_3]\text{Ala26}$ -hCTの線維についてCP-MAS 固体NMR信号を観測したところ、G10-F22の領域で β -シートを形成していることが判明した((1), Figure 1a)。さらに $[^{13}\text{CO}]\text{Phe16}$, $[^{15}\text{N}]\text{Phe19}$ -hCTの線維について ^{13}C - ^{15}N 原子間距離をREDOR法により測定した結果、Phe16, Phe19が近接する逆平行 β -シート構造を形成することが判明した(2)。この構造についてMDシミュレーションを用いて構造計算を行い、その相互作用を解析した結果、 β -ストランド間で、F16-F19(π - π 相互作用), D15-K18 (静電相互作用), Y12-F22 (π - π 相互作用) を持つことが判明した((3), Figure 1b)。

[hCTアミロイド線維形成反応機構の解析(1),(4)]

hCTの線維形成反応の時間変化をCP-MASの信号強度変化で観測した結果、Figure 2aに示す信号強度変化が観測された。ここで、CP-MAS信号の時間変化はhCTの線維形成過程を示している。この信号強度の時間変化は一定の遅延時間の後に強度の増加が観測された。このような線維形成反応は線維中間体(核)を経て、線維伸長反応が起こっていることを示している(4)。この反応を2段階自己触媒反応機構を用いて解析した。モノマー状態のhCTの濃度をA,線維状態のhCTの濃度をBとして反応速度を解析した(1)。1段階目の中間体(核)の形成反応は

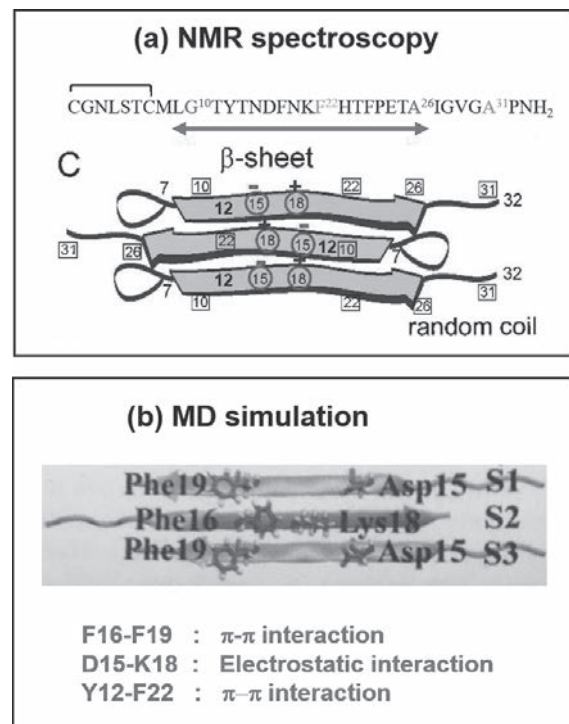


Fig. 1: Structures of hCT fibril. (a) Cross β -sheet structure was formed as revealed by solid-state NMR. (b) Interaction were formed between β -strands (F16-F19; π - π interaction, D15-K18; electrostatic interaction, Y12-F22; π - π interaction) at pH 7.5. (3)

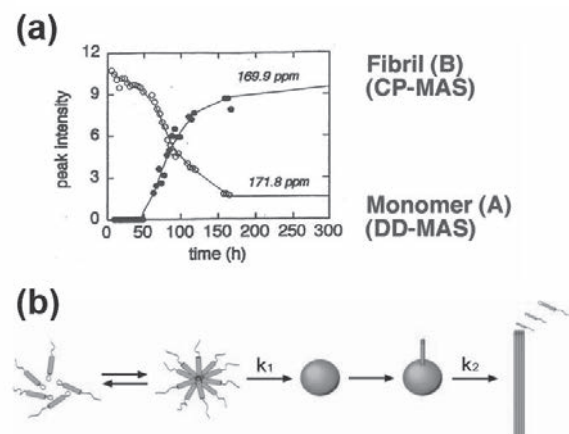


Fig. 2: hCT fibrillation mechanism. (a): Time course of CP-MAS (fibril) and DD-MAS (monomer) NMR signal intensities. (b): Fibrillation process of hCT in neutral solution. The k_1 is rate constant of nucleation step and k_2 indicates fibril elongation step (1), (4).



2段階目の線維伸長反応は



これら2つの反応を組み合わせた速度式は

$$\frac{d(f)}{dt} = k_1(1-f) + k_2af(1-f) \quad [3]$$

となり、その一般解はEq. [4]となる。

$$f = \frac{\rho \{ \exp[(1+\rho)kt] - 1 \}}{\{ 1 + \rho \exp[(1+\rho)kt] \}} \quad [4]$$

ここで、f: Fraction of B, a: Initial concentration of B, $s = k_1/k$, $k = ak_2$ である。

Eq. [4] を用いて、核形成速度定数(k_1)、線維伸長速度定数(k_2)を求めた。

[TL-hCT(Y12L, F16L, F19L)変異体における線維形成阻害機構の解明 (3)]

構造解析の節で述べたように芳香族アミノ酸残基Tyr12, Phe16, Phe19は線維の安定化に寄与していることが予想された。そこで、Y, FをLに変異したTL-hCT (Y12L, F16L, F19L) 変異体を用いて線維形成速度過程を解析した。Figure 3, Table 1に示すように、TL-hCTの核形成速度(k_1)はhCTと比較して大きな変化はないが、線維伸長速度定数(k_2)についてTL-hCTはhCTに比べて大きく減少していることが観測された。芳香族アミノ酸残基は逆平行 β -シート構造の安定化に寄与していることから、芳香族アミノ酸のY, F からLへの変異は線維の安定性を下げるため、線維伸長過程が阻害されたものと考えられる。

[クルクミンによるhCT線維形成阻害機構の解明]

クルクミンは芳香環を分子中に含むため α -ヘリックス構造をもつhCTモノマーにクルクミンがどのような相互作用を持つのかをMDシミュレーションにより検証した。その結果、Figure 4に示すようにhCTヘリックス構造に存在するF16, F19, H20は

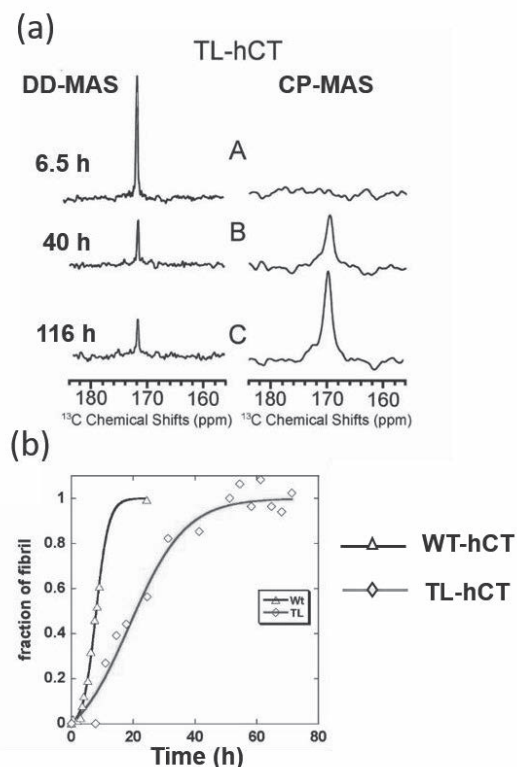


Fig. 3: Fibrillation mechanism of TL-hCT mutant. (a) Time courses of DD-MAS (monomer) and CP-MAS (fibril) signals of TL-hCT mutant. (b) Time course of signal intensities (fraction of fibril) of hCT and TL-hCT (3).

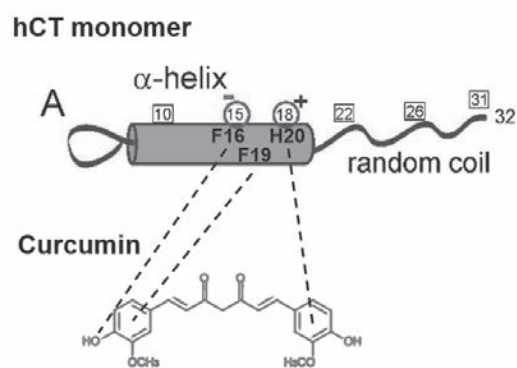


Fig.4: Interaction of curcumin with hCT monomer revealed by MD simulation. Interaction between hCT monomer and curcumin are forming T-shaped π - π (F19-Cur), CH-O (F16-Cur) and parallel π - π (H20-Cur) interactions.

クルクミンと相互作用をしていることが示された。そこでTL-hCTについてクルクミン存在下での線維形成速度解析を行った。その結果、Table 2に示すように、クルクミンの存在下ではhCTの核形成速度定数(k_1)がクルクミンが無添加の状態に比べて格段に遅くなることが判明した。一方、線維伸長速度定数(k_2)には大きな変化が見られなかった。この結果はクルクミンがhCTモノマーと相互作用を持つため、hCT同士で凝集して核を形成する速度が遅くなったものと考えられる。すなわちクルクミンはhCTの核形成過程を阻害することが明らかになった。

Table 1: Rate constants of fibril formation kinetics for hCT and TL-hCT (3).

	k_1 (s ⁻¹): Nucleation	k_2 (s ⁻¹ M ⁻¹): Elongation
WT hCT	2.79 x 10 ⁻⁶	2.29
TL-hCT	3.40 x 10 ⁻⁶	2.98 x 10 ⁻³

Table 2: Rate constants of fibril formation kinetics for hCT in the presence of curcumin.

	k_1 (s ⁻¹): Nucleation	k_2 (s ⁻¹ M ⁻¹): Elongation
hCT	3.84 x 10 ⁻⁶	0.318
hCT + DMSO (30%)	1.25 x 10 ⁻⁸	0.442
hCT + DMSO (30%) + curcumin (0.210 mM)	3.13 x 10 ⁻¹⁰	0.294

[まとめ]

本研究ではhCTアミロイド線維形成の阻害機構について2つの場合を検討した。第1の場合、線維の安定化に寄与するY,FをLに変異したTL-hCT (Y12L, F16L, F19L)変異体について阻害機構を検討したところ、線維伸長過程を阻害することが判明した。第2の場合、多くのペプチドやタンパク質と相互作用を持つことが知られているクルクミンを添加した状態でのhCT線維形成阻害機構を検討した。その結果、クルクミンはhCTモノマーと相互作用を示し、hCT同士の凝集を阻害する、すなわちhCTの核形成過程を阻害することが判明した。

References

- (1) M. Kamihira, A. Naito, S. Tuzi, A. Y. Nosaka, H. Saito. (2000) Conformational transition and fibrillation mechanism of human calcitonin as studied by high-resolution solid-state ¹³C NMR. *Protein Science* 9, 867-877.
- (2) A. Naito, M. Kamihira, R. Inoue, H. Saito. (2004) Structural diversity of amyloid fibril formed in human calcitonin as revealed by site-directed ¹³C solid-state NMR spectroscopy. *Magn. Reson. Chem.* 42, 247-257.
- (3) H. Itoh-Watanabe, M. Kamihira-Ishijima, N. Javkhantugs, R. Inoue, Y. Itoh, H. Endo, S. Tuzi, H. Saito, K. Ueda, A. Naito. (2013) Role of aromatic residues in amyloid fibril formation of human calcitonin by solid-state ¹³C NMR and molecular dynamics simulation. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 15, 8890-8901.
- (4) H. Itoh-Watanabe, M. Kamihira-Ishijima, I. Kawamura, M. Kondoh, M. Nakagoshi, M. Sato, A. Naito. (2013) Characterization of the spherical intermediates and fibril formation of hCT in HEPES solution using solid-state ¹³C-NMR and transmission electron microscopy. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 15, 16956-16964.

P32Y

酸化チタンナノシートと非界面活性剤スルフォベタインを用いた蛋白質のRDC測定手法開発

○板坂佑真¹、小籠蒼¹、古板恭子²、杉木俊彦²、若松馨³、内田紀之⁴、石田康博⁴、相田卓三⁵、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

3 群馬大学大学院 理工学府

4 理化学研究所 創発物性科学研究センター

5 東京大学大学院 工学系研究科

Development of RDC measurement method for protein using titanium oxide nanosheets and non-detergent sulfobetaines

○Yuma Itasaka¹, Aoi Kokago¹, Kyoko Furuita², Toshihiko Sugiki², Kaori Wakamatsu³, Noriyuki Uchida⁴, Yasuhiro Ishida⁴, Takuzo Aida⁵, Toshimichi Fujiwara², Chojiro Kojima^{1,2}

1 Graduate School of Engineering Science, Yokohama National University

2 Institute for Protein Research, Osaka University

3 Graduate School of Science, Gunma University

4 Center for Emergent Matter Science, RIKEN

5 Department of Chemistry and Biotechnology, School of Engineering, The University of Tokyo

Residual dipolar coupling (RDC) provides long-range distance information and orientations of internuclear vectors with respect to the magnetic field. RDC is valuable for structure determination, validation, and dynamics analysis of proteins. The measurement of RDC values requires the weak alignment of the macromolecule in the magnetic field. Various alignment media have been utilized to align protein molecules. To determine the orientation of bond vectors accurately from RDC, five independent alignments are required. In this study, we utilized new perpendicular alignment media, titanium oxide nanosheets (TiNSs), for protein RDC measurement with the protein stabilizer, non-detergent sulfobetaine (NDSB).

【序論】

残余双極子相互作用(RDC)は、ロングレンジの距離情報や核間ベクトルの角度に関する情報を与え、蛋白質の構造解析や検証、ダイナミクスの解析に利用されている。溶液状態にてRDCを測定するためには、蛋白質を磁場中で配向させる必要がある [1]。蛋白質の磁場配向には磁場配向剤が利用されている。RDCから核間ベクトルの配向を正確に決定するためには、5つの独立した配向情報が求められるが [2]、磁場配向剤の種類に制限があることや適用条件の違いが5つの配向情報を得る上で障害になっている。より多くの配向情報を得るため、これまでに多くの磁場配向剤が開発されてきた。近年、酸化チタンナノシート(TiNSs)が磁場に対して垂直に配向することが確認され、磁場配向剤としての利用が検討されている [3-5]。TiNSs中の重水分子が0-90 °Cの幅広い温

残余双極子相互作用、酸化チタンナノシート、非界面活性剤スルフォベタイン

○いたさか ゆうま、こかご あおい、ふるいた きょうこ、すぎき としひこ、わかまつ かおり、うちだ のりゆき、いしだ やすひろ、あいだ たくぞう、ふじわら としみち、こじま ちようじろう

度範囲にて、150 Hz程の極めて大きな四極子分裂を与えることから、従来の配向剤に比べ、広い温度範囲でより大きなRDC値が取得できると期待されている [3-5]。しかし、TiNSsには蛋白質を吸着する性質があり、簡便に蛋白質のRDCを測定する手法は知られていない。本研究では、蛋白質の安定化効果や可溶化効果を持つ非界面活性剤スルフォベタイン(NDSB) [6] に着目し、TiNSsを用いて簡便に蛋白質のRDC値を測定する手法を開発したので報告する。

【実験】

大腸菌発現系により、 ^{15}N 標識したプロテインGB1 ドメイン(GB1)を発現・精製した。磁場配向剤 TiNSsと蛋白質安定化剤 NDSB-195 (Fig. 1a)を添加したGB1サンプルにおいて、 ^1H - ^{15}N IPAP-HSQC測定、 ^1H - ^{15}N HSQC測定を行った。NDSB類ではNMRでの利用例が多く報告されているNDSB-195を初め、NDSB-211、-221、choline-*O*-sulfate (COS)を使用し、NMR測定を行った。IPAP-HSQCスペクトルから取得したRDC値は、PALESソフトウェア [7] を用いて計算値との相関を確認し、測定手法の信頼性を相関係数(R)と Q factorで評価した。NMR測定はBruker AVANCE III HD 500 MHzの装置を使用し、308 Kで行った。

【結果・考察】

① TiNSsとNDSB-195を用いたRDC測定

TiNSsに ^{15}N 標識GB1を混合したところ、いくつかの残基のシグナルが消失した。そこでTiNSsにNDSBの1種であるNDSB-195を加え ^{15}N 標識GB1を混合した。1.0 M NDSB-195共存下ではシグナルの消失は見られず、GB1のRDC値の決定が可能であり、測定値と計算値の R が0.9以上かつ Q factorが0.2以下と非常に強い相関が得られた (Fig. 1b)。さらに、HSQCスペクトルはGB1のみのスペクトルとよく一致しており、蛋白質の構造へ及ぼす影響が小さいことが分かった (Fig. 1c)。これらの結果より、NDSB-195を混ぜるだけで信頼度の高いRDCが得られることが分かった。

NDSB-195以外のNDSB類であるNDSB-211、NDSB-221、choline-*O*-sulfate (COS)を用い、NDSB-195と同様にRDC値を決定したところ、 R 、 Q factorともに非常に強い相関が得られた (Table 1)。これらはNDSB類がTiNSsを用いたRDC測定に有効であることを示している。

NDSB類の濃度を1.0 Mと2.5 Mに調製し、HSQC測定、RDC測定を行った。その結果、2.5 M NDSB類を混合したGB1のHSQCスペクトル上で、ループ領域に位置する残基の顕著な化学シフト変化が見られた。一方で、PALESによる解析は二次構造に限定しており、1.0 M NDSB類の使用時よりわずかに劣るものの、 R 、 Q factorともに強い相関が得られた (Table 1)。

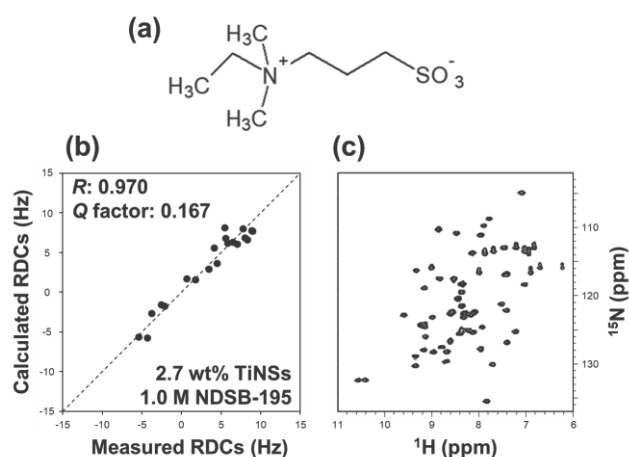


Fig. 1. (a) Chemical structure of NDSB-195. (b) Correlation plot of measured and calculated RDCs. (c) ^1H - ^{15}N HSQC spectrum of GB1 with TiNSs and NDSB-195.

② メカニズム解析・相互作用モデル

本手法では、TiNSsとNDSB-195を併用することでRDC測定を実行したが、TiNSsとNDSB-195がそれぞれGB1にどのような影響を及ぼすか調査した。

TiNSsのみを使用した測定では、RDC測定値と計算値の相関が弱く、HSQCスペクトル上にて、 β 2ストランドの表面残基やループの残基にてシグナルが消失していた。このシグナルの消失から、GB1の β 2ストランドの表面でTiNSsと相互作用を形成していることが示唆された (Fig. 2a)。弱い相関は、この相互作用により、少なくとも2つ以上の配向軸が存在したためだと考えられる。また、NDSB-195のみを使用した測定では、HSQCスペクトル上で、近接した領域に存在する3つの残基で顕著な化学シフト変化が確認された。これらの情報を基に、HADDOCK [8]によってGB1-NDSB-195複合体のモデル構造を構築した (Fig. 2b)。この様にTiNSs、NDSB-195ともに単独で使用した際には、GB1との相互作用の存在が示唆された。

TiNSsとNDSB-195を同時に使用した測定では、HSQCスペクトル上でシグナルの消失が見られなくなり、GB1とTiNSsの相互作用を抑制したことが示唆された (Fig. 2c)。NDSB-195使用時に見られた化学シフト変化が抑制されていることから、NDSB-195はTiNSsに吸着していると考えられる。NDSB-195を添加することによってGB1とTiNSsの相互作用が抑制されたため、RDCの測定値と計算値に非常に強い相関が得られたと考えられる。

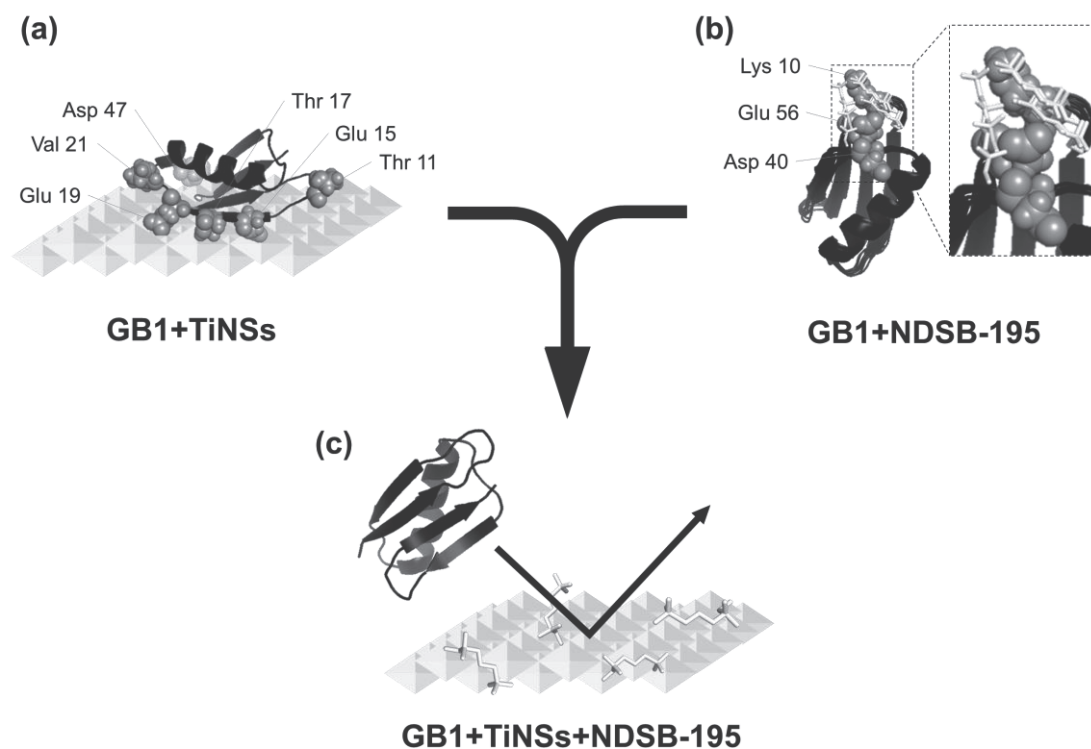


Fig. 2. Schematic illustration of intermolecular interactions between GB1, TiNSs, and NDSB-195. (a) Interactions between GB1 and TiNSs. Interaction sites are shown by sphere representation with residue name. (b) Interactions between GB1 and NDSB-195 mapped on the HADDOCK-derived structural model of GB1 complex with NDSB-195. Interaction sites are shown by sphere representation with residue name. (c) No interaction between GB1 and TiNSs in the presence of NDSB-195.

③ アライメントテンソルの比較

TiNSsは磁場中で、磁場に対して垂直に配向することが確認されている [5]。RDC測定に広く利用されている磁場配向剤のPfl phageやバイセルは磁場に対して平行に配向しており、垂直配向かつ広く利用されている磁場配向剤はほとんどなかった。TiNSsの垂直配向に対して、NDSB類の添加に伴う影響や実際に垂直配向であるかを調査するため、PALESから得られたアライメントテンソルの比較を行った (Table 1)。その結果、4種のNDSB類の添加でGB1の配向に変化は生じていないこと、平行配向のPfl phageと比較して D_a の符号が反転していることから垂直配向であること、などが明らかとなった [9]。

Table 1. Alignment tensors of GB1 by using various measurement methods

	D_a (Hz)	Rhombicity	Euler angles	R	Q factor
TiNSs	-4.18	0.463	(130, 68, 214)	0.870	0.436
TiNSs+1.0 M NDSB-195	-4.97	0.439	(121, 81, 221)	0.970	0.167
TiNSs+1.0 M NDSB-211	-5.27	0.319	(119, 80, 223)	0.959	0.182
TiNSs+1.0 M NDSB-221	-5.21	0.440	(118, 82, 219)	0.974	0.158
TiNSs+1.0 M COS	-4.81	0.345	(116, 78, 227)	0.967	0.159
TiNSs+2.5 M NDSB-195	-5.37	0.543	(122, 81, 216)	0.945	0.264
TiNSs+2.5 M NDSB-211	-4.84	0.504	(124, 81, 221)	0.960	0.196
TiNSs+2.5 M NDSB-221	-5.72	0.584	(127, 93, 205)	0.951	0.249
TiNSs+2.5 M COS	-3.50	0.495	(118, 77, 225)	0.971	0.167
Pfl phage	5.62	0.410	(118, 83, 219)	0.970	0.169

【結論】

本研究では、酸化チタンナノシートを蛋白質のRDC測定へ適用するため、非界面活性剤スルフォベタインを用いた。酸化チタンナノシートへの蛋白質の吸着を非界面活性剤スルフォベタインが抑制することで、信頼度の高いRDC値が取得できる。本手法は、垂直配向の磁場配向剤から構造情報を得る新たなRDC測定手法の1つとして期待される。

【参考文献】

- [1] N. Tjandra and A. Bax, *Science* (1997), **278**, 1111-1114.
- [2] J. Tolman and K. Ruan, *Chemical Reviews* (2006), **106**, 1720-1736.
- [3] N. Uchida *et al.*, 第 56 回 NMR 討論会 (2017), L2-1, 36-37.
- [4] N. Uchida *et al.*, 第 58 回 NMR 討論会 (2019), L3-3, 102-103.
- [5] N. Uchida *et al.*, *Japanese Patent No.* 6792268 (2020).
- [6] L. Xiang *et al.*, *Journal of Magnetic Resonance* (2008), **194**, 147-151.
- [7] M. Zweckstetter, *Nature Protocols* (2008), **3**, 679-690.
- [8] G. van Zundert *et al.*, *Journal of Molecular Biology* (2016), **428**, 720-725.
- [9] J. Lprieau *et al.*, *Journal of the American Chemical Society* (2008), **130**, 7536-7537.

P33

α -グルコシダーゼ阻害物質を含むクワ葉の投与によるマウス腸内環境への影響のNMRメタボロミクス解析

○甘 莉¹, 稲村 勇雅¹, 宋 子豪¹, 大西 裕季¹, 熊木 康裕¹, 相沢 智康¹
1北海道大学・大学院生命科学院

NMR metabolomics of administration of mulberry leaves containing α -glucosidase inhibitors on the intestinal environment of mice

○Li Gan¹, Yuga Inamura¹, Zihao Song¹, Yuki Ohnishi¹, Yasuhiro Kumaki¹, Tomoyasu Aizawa¹
1 Graduate School of Life Science, Hokkaido University

Mulberry leaf is considered as a functional food in many Asian countries. Previous studies have reported that the mulberry leaf shows anti-hyperglycemic, anti-oxidative, and anti-inflammatory effects. However, the effect of mulberry leaf on fecal metabolites is poorly understood. In this study, we conducted nuclear magnetic resonance-based metabolomics on control and mulberry leaf powder (MLP)-treated mouse feces across 9 weeks of treatment to reveal the effect of MLP intake over a long period. Carbohydrates, amino acids, and propionate were found to significantly ($P < 0.01-0.05$) alter upon MLP treatment. In the MLP-treated group, levels of glucose and all amino acids were lower after week 5, while maltose increased clearly after week 5. Propionate was higher from week 1 to 4. These results may suggest that the gut microbiota of mouse might be modulated gradually by continuous treatment with MLP. The study provides significant insights into the effects of long-term intake of MLP and provides a basis for further investigation in therapeutic application of MLP.

【緒言】日本、中国、タイを含むアジア諸国で栽培されてきたクワの葉にはポリフェノール等が多く含まれており、抗炎症作用等が報告されている (P.Y. Chao, *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, 2013)。また、グルコース類似体であるデオキシノジリマイシン (DNJ) が含まれていることから、強力な α グルコシダーゼ阻害作用を持つことも知られている。過去の研究ではDNJ投与による血糖値の上昇抑制やインスリン抵抗性の改善が報告されており (Q. Liu, *Molecules*, 2015)、クワの葉の摂取が2型糖尿病の予防方法としても注目され、研究が多く成されている。しかし、クワ葉の投与時に大きく影響を受けると推定される腸内の細菌叢や代謝物に関する研究は殆ど無い。特に腸内代謝物は宿主と腸内細菌叢との作用で生じ、宿主に大きく影響を及ぼす為、その網羅的な解析であるメタボロミクス解析の有用性は高いと考えられる。そこで、本研究では試料調製が簡便であり、代謝物の定量性が高いという特徴がある核磁気共鳴装置 (NMR) を用いたメタボロミクス解析により、長期間クワ葉粉末を投与したC57BL/6マウスの糞便中の代謝物の解析を行った。

クワ葉, メタボロミクス, マウス糞

○かん り, いなむら ゆうが, そん ずはお, おおにし ゆうき, くまき やすひろ, あいざわ と
もやす

【結果・考察】9週間にわたり1日2回、マウスにクワ葉粉末を投与し、対照群とクワ葉粉末 (MLP)投与群のそれぞれの糞便から水溶性の代謝物を抽出し、NMR測定を行った(Fig. 1)。

Chenomx NMR Suite 8.2 (Chenomx Inc.)を用いて39種の代謝物の同定・定量に成功した。主な成分は炭水化物 (グルコース、マルトース、ガラクトース)、アミノ酸 (アラニン、BCAA、グルタミン、グリシン等)、有機酸 (酪酸、プロピオン酸、酢酸等)であった。マルトースは投与開始直後の1週目からMLP投与群のみで増加し、5週目で最大となった (Fig. 2)。これに対してグルコースは5週目以降で減少傾向が見られた。これらの結果はクワ葉に含まれる α -グルコシダーゼ (マルターゼ) 阻害作用を持つDNJの効果は投与直後から徐々に現れ、5週目以降で顕著に効果が現れた事を示唆している。また、マルトースは5週目以降減少傾向がみられることから、腸内細菌叢にマルトース利用性の菌が増加している可能性が示唆された。アミノ酸は両群でどちらも減少傾向にあったが、5週目以降ではMLP投与群の全てのアミノ酸が対照群より明らかに減少しはじめた。これらの結果から、5週間以上の投与により宿主や腸内細菌叢による蛋白質の分解やアミノ酸の取り込みが変化すると推定される。有機酸についてはTCA回路代謝物 (コハク酸、フマル酸)を含めて、殆ど変化が見られなかった。これらの結果を総括すると、継続的なクワ葉の摂取は腸内細菌叢に影響を与えることで、腸内代謝物を変化させ、腸内環境に影響を与える可能性が示唆された。今後は宿主組織を対象にしたNMRメタボロミクス解析も行う予定である。

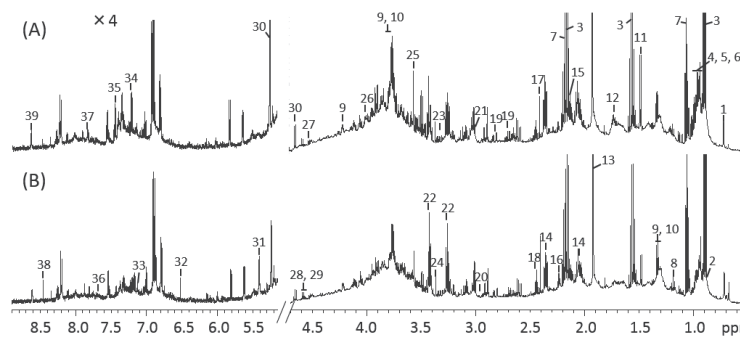


Fig. 1. ^1H NMR spectra of mouse fecal extraction obtained from control (A), MLP-treated (B).

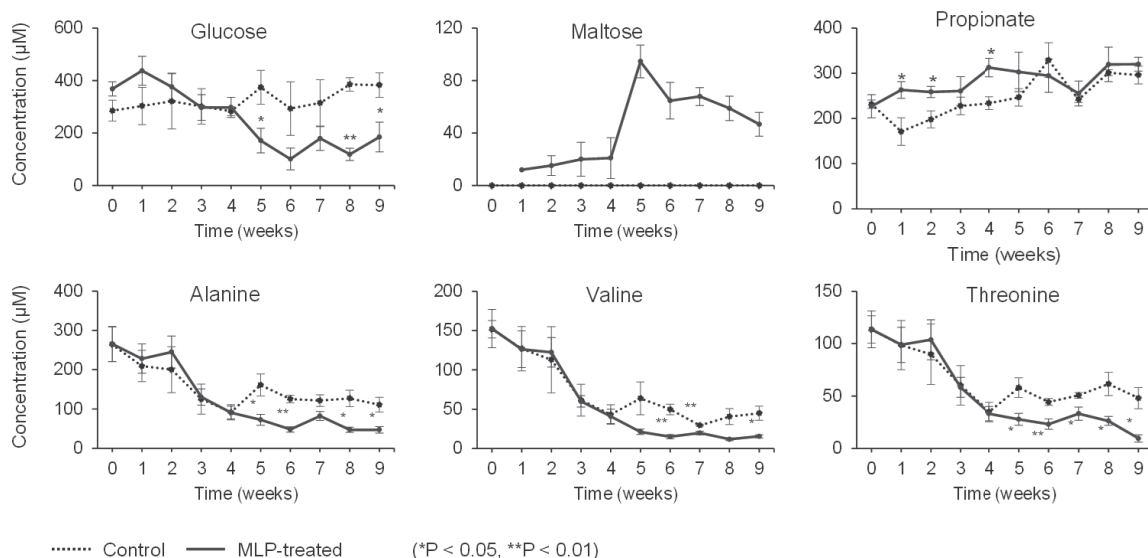


Fig. 2. Time course quantitative values of control (dotted line) and MLP-treated (solid line) mouse feces. Values are mean \pm SEM. Asterisk indicates significant difference between control and MLP-treated (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

P34Y

NMR analysis of 2'-fucosyllactose in human breast milk

○胡知彦¹, 蔣佳稀¹, 甘莉¹, 宋子豪¹, 大西裕季¹, 長田誠司², 久米田博之¹, 熊木康裕¹, 山内一夫², 相沢智康¹

¹北大・院生命科学

²中山商事(株)

³沖縄科学技術大学院大学 機器分析セクション

NMR analysis of 2'-fucosyllactose in human breast milk

○Zhiyan Hu¹, Jiayi Jiang¹, Li Gan¹, Zihao Song¹, Yuki Ohnishi¹, Seiji Osada², Hiroyuki Kumeta¹, Yasuhiro Kumaki¹, Kazuo Yamauchi³, Tomoyasu Aizawa¹,

¹Grad. Sch. Life Sci., Univ. Hokkaido

²Nakayama Co.,Ltd.

³Instrumental Analysis Section, OIST

Human breast milk (HBM) is the primary source of newborn infants. 2'-fucosyllactose (2'-FL) and 3-fucosyllactose (3-FL) are the main components in human milk oligosaccharides (HMOs), which facilitate gut integrity and benefit for brain. The secretion of 2'-FL relates to the FUT2 gene, which encodes the α -(1,2)-fucosyltransferase. Another FUT2 gene-related HMO is lacto-N-fucopentaose I (LNFP-I), while 3-FL is not related. Mothers who can produce the enzyme are regarded as secretors, otherwise as non-secretors. In this study we investigated a new technique to analyze these HMOs in HBM using a 60 MHz low-field benchtop NMR spectrometer. By analyzing peaks from methyl groups in fucose, we succeeded in clearly distinguishing between secreted and non-secreted donors using a 60 MHz NMR system. Furthermore, we succeeded in obtaining quantitative results for HMO that correlated well with a superconducting high-field NMR system.

Introduction

2'-FL promotes immune development in the gut in a child's early years and helps infants suffer from less upper respiratory tract infections. 3-FL could reduce the risk of gut microbiota imbalance caused by undesirable harmful bacteria.

The secretion of 2'-FL and LNFP-I depends on the FUT2 gene, which encodes α -(1, 2)-fucosyltransferase. This enzyme catalyzes the addition of fucose to HMOs, and the mother is referred to as secretory or nonsecretory depending on the presence or absence of its enzyme synthesis capacity. Determining which group a mother falls into may be clinically meaningful.

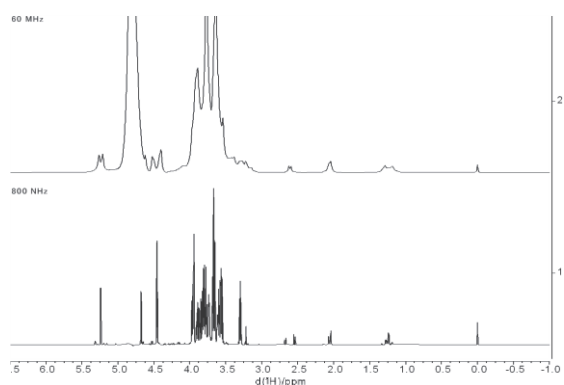


Fig. 1 800 MHz and 60 MHz ¹H NMR spectra of a representative HBM sample.

60 MHz NMR shown upper, 800 MHz shown lower.

Benchtop NMR, 2'-FL, Human milk oligosaccharides

○こしげん, しょうかき, かんり, そうですね, おおにしゆうき, おさだせいじ, くめたひろゆき, くまきやすひろ, やまうちかずお, あいざわともやす

In this study, we applied a method for quantifying HMOs in HBM using NMR spectroscopy, particularly a benchtop NMR spectrometer with a permanent magnet. NMR spectrometers that high-field NMR spectrometers using superconducting magnets have been conventionally used for the analysis of HMOs, which have the advantage of high sensitivity, high resolution. However, its large size and maintenance such as refrigerant supply do not suit clinical use in hospitals and nursing care facilities. Thus, simpler and less expensive devices such as benchtop NMR spectrometers are expected to be available. We used a 60 MHz benchtop NMR system to determine the presence or absence of 2'-FL and other HMOs. We report on the results of the determination of the presence or absence of HMOs, including 2'-FL, and their quantitative techniques using a 60 MHz benchtop NMR system.

Results and discussion

Thirty-seven samples of HBM obtained from 37 sample donors who were hospitalized immediately after delivery were analyzed by NMR, of which are in Fig. 1 shown the representative example. The used detection region for both 800 MHz and 60 MHz were the signals from the methyl group for fucosyl unit. For 800 MHz NMR, the peaks of 2'-FL, 3-FL, and LNFP-I were 1.249-1.222 ppm, 1.211-1.179 ppm, 1.255-1.231 ppm, respectively. For 60 MHz benchtop NMR, the peaks of 2'-FL, 3-FL, and LNFP-I were 1.37-1.07 ppm, 1.32-1.05 ppm, 1.39-1.08 ppm.

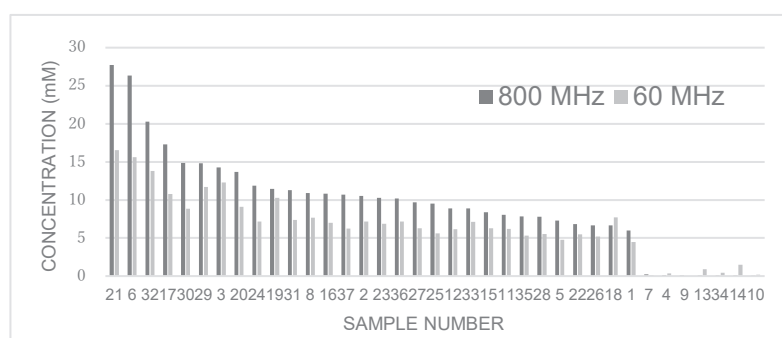


Fig. 2 The concentration of 2'-FL quantified by 800 MHz and 60 MHz.

Quantification result of 60 MHz shown the same result of distinguishment of secretor status as 800 MHz.

Quantitative analysis of each HMO was performed using Chenomx software. Standard sample solutions of each HMO were prepared and an in-house database for 800 MHz and 60 MHz NMR spectra was constructed. Then, the peaks in the methyl region were separated by manual fitting operations, and quantitative analysis of each HMO was performed. For 2'-FL detected by 800 MHz, sample numbers 7, 4, 13, 34, 9, 14, 10 showed quite low level of concentration of 2'-FL (Fig.2), less than 0.5 mM. For the other 30 samples, the concentration was between 30 and 5 mM. It was easy to distinguish the secretor and non-secretor status.

For 2'-FL detected at 60 MHz, the determination of secretor or not was like that at 800 MHz, with 7 samples being non-secretor and 30 samples being secretor. For LNFP-I, clear discrimination between secretor and non-secretors was possible, even though its absolute concentration was much lower than that of 2'-FL. 3-FL showed a negative correlation compared with the concentration trends of 2'-FL and LNFP-I. Although the enzyme responsible for 3-FL is different from 2'-FL and LNFP-I, its synthetic substrate is common, suggesting that competition may be occurring in the synthetic process.

Comparing the concentration detected by 800 MHz and 60 MHz, all the three HMOs showed a linear positive correlation between 800 MHz and 60 MHz. These results indicated that 60 MHz benchtop NMR can be applied as a bedside diagnostic technique that can quantify HMOs as well as whether the maternity.

P35

ナノダイヤモンドを分極剤として用いたDNP-MAS-NMRの生体分子への応用

○加藤賢¹, 田巻初¹, 杉下友晃¹, 藤原敏道^{1,2}, 松木陽^{1,2}

1 大阪大学 蛋白質研究所

2 大阪大学 量子情報・量子生命研究センター

Application of nanodiamond-based polarizing agent for DNP-MAS-NMR to biomolecules

○Ken Kato¹, Hajime Tamaki¹, Tomoaki Sugishita¹, Toshimichi Fujiwara^{1,2}, Yoh Matsuki^{1,2}

¹ Institute for Protein Research, Osaka University

² Center for Quantum Information and Quantum Biology, Osaka University

Dynamic nuclear polarization (DNP)-NMR is a method for enhancing the NMR signal intensity by transferring the polarization from the electron spin to the nuclear spin. The organic radicals such as nitroxide radical are widely used in DNP polarizing agent. However, nitroxide-based polarizing agent rapidly degraded due to the strongly reducing environment such as *in-cell* condition. Novel DNP polarizing agents with high reduction resistance are required. Nanometer scale diamond particles have a lot of unpaired electrons from surface dangling bonds. These unpaired electrons on nanodiamond are expected to be used as DNP polarizing agent in reduction condition due to their high chemical/physical stability. However, it has not been reported that DNP-NMR measurements of biomolecule with nanodiamond-based polarizing agent under high magnetic field and magic angle spinning (MAS) conditions yet. In this presentation, we will report of ESR and DNP-MAS-NMR measurement of nanodiamond in reduction condition and its application to proteins.

動的核分極 (DNP) -NMR法は、磁気回転比の大きい電子スピンの熱分極を核スピンのに移すことによりNMRを高感度に測定する手法である。DNPの分極剤にはニトロキシドラジカルに代表されるような有機ラジカルが広く使われているが、その反応性の高さから例えば細胞内といった還元的环境ではラジカルが素早く失活するといった問題があり¹、耐還元性を有する分極剤の開発が望まれている。ナノダイヤモンドは生体適合性が高いナノ材料として、細胞内のリアルタイム計測が可能な蛍光プローブや温度/pHセンサーへの応用を目指した研究が盛んに行われている。ナノメートルスケールのダイヤモンド粒子は比表面積が大きいと、表面ダングリングボンドに由来する多数の不対電子を有しており、その不対電子を分極源としてダイヤモンド内部の天然存在比の¹³Cや周囲溶媒の¹HのNMR信号を増強した例が報告されている²。ナノダイヤモンドのダングリングボンドの不対電子は高い化学的/物理的安定性を有するため細胞環境内においてもDNP分極剤としての利用可能だと期待されるが、構造解析を志向した高磁場かつマジック角試料回転 (MAS) 条件での生体分子のDNP-NMR測定例は報告されていない。本発表ではナノダイヤモンド分極剤の生体利用を目指して、ESR測定によるナノダイヤモンドの電子スピンの耐還元性の検証と還元剤存在下におけるナノダイヤモンド分極剤を用いたDNP-MAS-NMR測定、およびナノダイヤモンド分極剤を用いたタンパク質のNMR信号の増強の試みについて報告する。

DNP-MAS-NMR, 分極剤開発, ナノダイヤモンド

○かとうけん, たまきはじめ, すぎしたともあき, ふじわらとしみち, まつきよう

アスコルビン酸存在下でのTEMPOLラジカルとナノダイヤモンドのESRスペクトルとその時間変化をFig. 1に示す。アスコルビン酸還元環境ではニトロキシドのESR信号は20分ほどで減衰したが、アスコルビン酸濃度が100倍高い環境においてもナノダイヤモンドのESR信号は失活しなかった。また、グルタチオン存在下および大腸菌ライセート存在下ではTEMPOLラジカルESR信号の減衰が観測されたが、ナノダイヤモンドのESR信号は失活せず、高い耐還元性を有することが明らかになった。また、ナノダイヤモンドをDNP分極剤として用いて、アスコルビン酸存在下でグリセロールの ^{13}C -DNP-NMR測定を行った。DNP-MAS-NMR測定は所属研究室で開発された閉回路ヘリウムガスMAS-DNPプローブシステム³を使用し、静磁場 $B_0 = 16.4\text{ T}$ 、MAS速度 $\nu_R = 5\text{ kHz}$ 、温度 $T = 30\text{ K}$ の条件で、直径 $\phi = 3.2\text{ mm}$ ローターを用いて実験を行った。

電子スピンを励起する $\nu = 460\text{ GHz}$ のサブミリ波照射によって、グリセロールとダイヤモンド内の ^{13}C 炭素のNMR信号の増強が観測された。いずれのNMR信号もアスコルビン酸共存下でも同様の信号の増強が観測され、還元的環境下においてもナノダイヤモンドの表面電子をDNP分極剤として利用できることが示された。

また、ナノダイヤモンド表面の化学修飾によって同位体標識したモデルタンパク質と結合した系 (Fig. 2a) やリガンドを介してアミロイド線維に特異的に結合した系 (Fig. 2b) においてもDNP-MAS-NMR測定による選択的な信号の増強を試みている。これらの詳細は当日、討論する予定である。

References

- (1) M. Azarkh, O. Okle, P. Eyring, D. R. Dietrich, M. Drescher, *J. Magn. Reson.* **212**, 450–454 (2011).; K. M. McCoy, R. Rogawski, O. Stovicek, A. E. McDermott, *J. Magn. Reson.* **303**, 115–120 (2019).; R. Ghosh, R. Dumarieh, Y. Xiao, K. K. Frederick, *J. Magn. Reson.* **336**, 107150 (2022).
- (2) E. Rej, T. Gaebel, T. Boele, D. E. J. Waddington, D. J. Reilly, *Nat. Commun.* **6**, 8459 (2015).; C. O. Bretschneider, Ü. Akbey, F. Aussenac, G. L. Olsen, A. Feintuch, H. Oschkinat, L. Frydman, *ChemPhysChem* **17**, 2691–2701 (2016).; E. Rej, T. Gaebel, D. E. J. Waddington, D. J. Reilly, *J. Am. Chem. Soc.* **139**, 193–199 (2017).
- (3) Y. Matsuki, S. Nakamura, S. Fukui, H. Suematsu, T. Fujiwara, *J. Magn. Reson.* **259**, 76–81 (2015).; Y. Matsuki, S. Nakamura, T. Idehara, J. Fukazawa, T. Fujiwara, *J. Magn. Reson.* **264**, 107–115 (2016).; Y. Matsuki, S. Nakamura, F. Hobo, Y. Endo, H. Takahashi, H. Suematsu, T. Fujiwara, *J. Magn. Reson.* **335**, 107139 (2022).

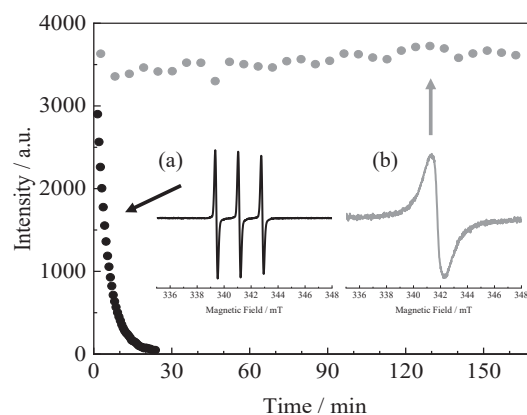


Fig. 1. Decay profiles of the ESR spectral intensity of TEMPOL (black) and nanodiamond (gray) at room temperature in the ascorbate solution. (Insert; a) Typical ESR spectrum of TEMPOL. (Insert; b) Typical ESR spectrum of nanodiamond water dispersion.

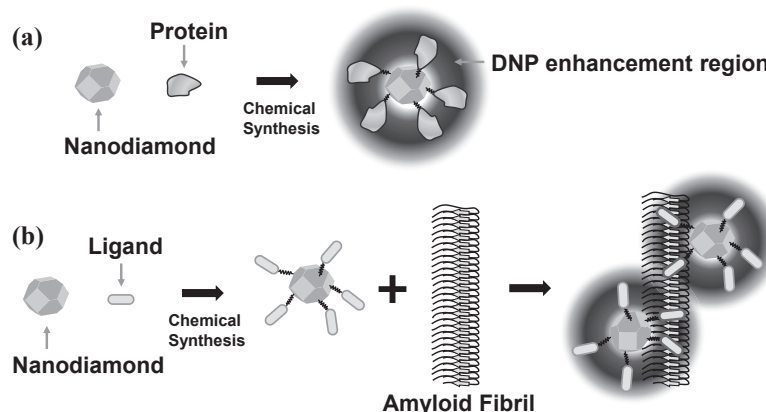


Fig. 2. Schematic diagram of nanodiamond binding protein (a), and amyloid fibril (b).

P36Y

時間領域NMRを用いた生分解性材料の運動性・親水性評価に基づく組成最適化

○山田隼嗣¹, 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

Composition optimization based on water-immobility evaluation of biodegradable materials using time-domain NMR

○Shunji Yamada¹, Yuuri Tsuboi¹, Jun Kikuchi^{1,2,3}

¹RIKEN Center for Sustainable Resource Science

²Graduate School of Medical Life Science, Yokohama City University

³Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University

As the sustainability of the global environment is emphasized, the development of environment-friendly materials, such as dealing with the problem of marine plastics, is flourishing. The material parameter space is huge, and efficient search is an issue. Time-domain NMR (TD-NMR) provides material property information via the complex T_2 relaxation curves resulting from multiple mobility. In this study, we used TD-NMR to evaluate the binding state of water (water-immobility) in oligomer synthesized with various monomer compositions immersed in seawater. We acquired NMR data using various pulse sequences such as magic sandwich echo (MSE), double quantum filter (DQ), magic and polarization echo (MAPE) and Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG). The T_2 relaxation curves were separated into two components, water-bound oligomers, and free water. Machine learning methods such as random forest, generative topography mapping regression and Bayesian optimization can explore oligomers with desired water-immobility.

1. 背景・目的

地球環境の持続可能性が重視される中、海洋プラスチック問題への対処など環境配慮型材料開発が盛んである[1]。材料パラメータ空間は膨大であり、探索の効率化が課題である。時間領域NMR(TD-NMR)は、 T_2 緩和時間により複数の運動性に由来する複合的な信号を提供する[2,3]。以前の研究では、魚肉中の結合水と自由水の特性についてTD-NMRの緩和曲線の機械学習が有効であった[4]。本研究では、モノマー組成を変えた様々なオリゴマーを用いて、オリゴマーを海水に浸すことで運動性・親水性情報を評価した(Fig.1)。Solid-Echo、Magic sandwich echo (MSE)、Double quantum filter (DQ)、Magic and polarization echo (MAPE)、Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG)など各種パルス系列のNMRデータを取得し、 T_2 緩和時間からオリゴマーの水不動態、自由水の割合を算出した。 T_2 緩和時間から得る水不動態指標を用いて、高い水不動態を持つオリゴマー組成を探索した。高水不動態を持つオリゴマーの重要因子探索をするために、ランダムフォレスト(RF) [5]、Generative topography mapping regression (GTMR)[6]を用い、組成候補から高い水不動態を持つ可能性が高い候補を予測するためにBayesian optimization (BO)[7]を適用した。

T_2 緩和時間, 生分解性材料, 組合せ最適化

○やまだしゅんじ, つばいゆうり, きくちじゅん

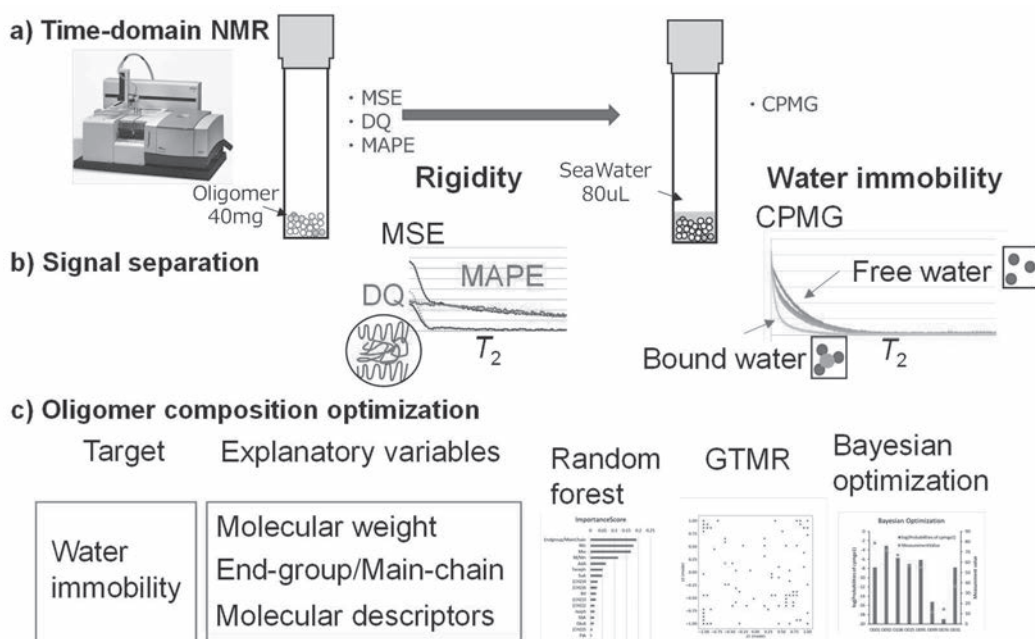


Fig. 1. Oligomer composition optimization with desired water-immobility using time-domain NMR. (a) MSE, DQ, MAPE and CPMG data were acquired by time-domain NMR. (b) T_2 relaxation times were separated based on the mobility and water-immobility of oligomers. (c) Random forest and GTMR were used to search for important factors from molecular weights, terminal ratios, and molecular descriptors for water immobility, and Bayesian optimization was used to optimize compositions.

2. 方法

2.1. サンプル準備

オリゴマー材料は、14種類のモノマーから、2つまたは3つのモノマーを組み合わせ、121種類の組成で合成した。オリゴマーサンプルは粉碎してNMR実験に使用した。

2.2. 時間領域NMR分析

40 mg を直径 10 mm のチューブに入れ、チューブ内を N_2 で置換した後、MSE、MAPE、DQ を測定した。オリゴマーの水不動性を評価するために、オリゴマー材料を海水に浸した。海水に1日浸した後、CPMGを測定した。

2.3 ゲル浸透クロマトグラフィー分析

サンプルの分子量は、Shodex GPC K-805L カラムを備えた HLC-8420GPC (東ソー、東京、日本) 装置を使用したゲル透過クロマトグラフィー (GPC) 分析によって決定した。クロロホルムを溶離液として使用し、サンプル濃度は 5 mg/mL とした。測定時のカラム温度は40 °C、サンプル注入量は100 μ L、流速は1.0 mL/minで行った。検量線にはポリスチレン標準を使用した。

2.4 高水不動性オリゴマーの重要因子探索および組成の最適化

T_2 緩和曲線の水不動指数とオリゴマー構造との関係は、RF、GTMRを使用して分析した。オリゴマーの分子構造の記述子は、RDKit を使用して生成した。 T_2 緩和曲線の水不動性指数を高い候補のオリゴマー組成を予測するために、BOを用いた。

3.1. 結果・考察

3.1. T_2 緩和曲線の分離

TD-NMR を使用した T_2 緩和曲線を取得した。TD-NMR によって得られた T_2 緩和曲線を分離することにより、オリゴマー材料の結合水と自由水の割合を計算することができた(Fig.2)。芳香族ジカルボン酸モノマーを含むオリゴマーは、他のジカルボン酸モノマーを含むオリゴマーと比較して硬質成分が多かった (Fig.2a)。コハク酸とアジピン酸を含むターポリマーは、他のオリゴマーを含むオリゴマーよりも硬い成分が少なかった。芳香族ジカルボン酸とアジピン酸を含むターポリマーは、芳香族ジカルボン酸を含むオリゴマーと比較して、水結合成分が多かった (Fig.2b)。

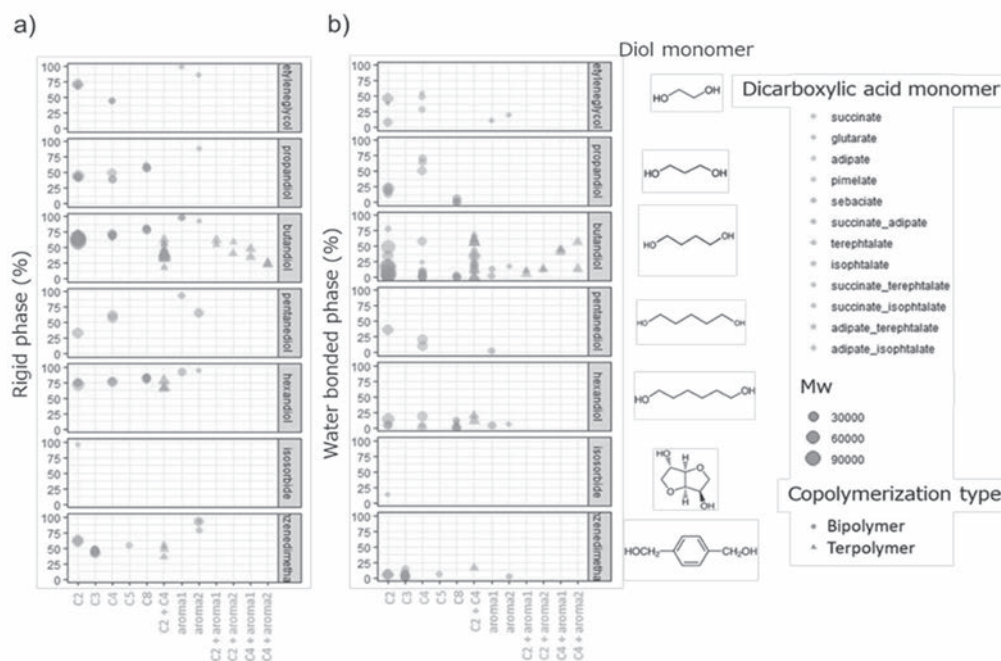


Fig. 2. Calculation of the ratio of hard and water bound phases of oligomers.

The fraction of hard phase (a) and water bound phase (b) of oligomers was calculated.

3.2. ランダムフォレストによる高水不動態オリゴマーの重要因子探索

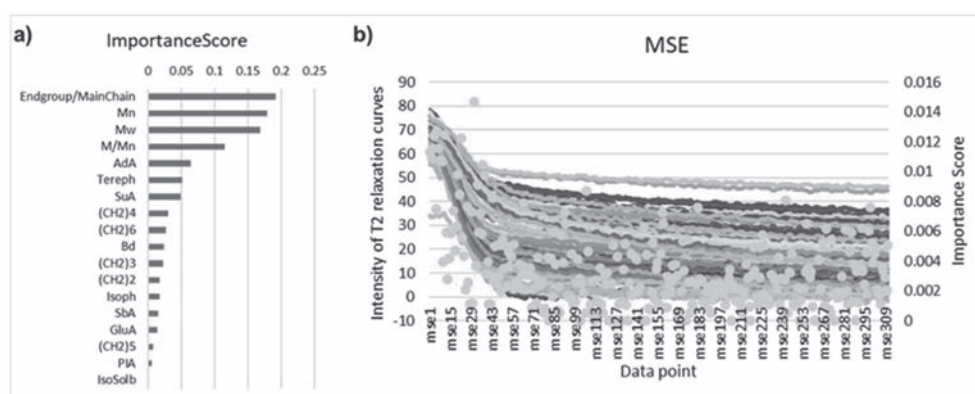


Fig. 3. Exploring important factors of highly water-immobile oligomers by random forest.

Using random forest, we calculated the importance of oligomer composition, terminal ratio, molecular weight (a), and T_2 relaxation curve of MSE (b) with water immobility as the objective variable.

オリゴマーの水不動態にとって重要な要因を調べるために、ランダム フォレストにより変数の重要度を計算しました (Fig.3)。水不動態としてCPMGの第一成分の割合を目的変数とした。分子量、主鎖に対する末端の比率、およびオリゴマー組成データにおける水結合成分の比率の重要性は、主鎖に対する末端の比率で最も高く、続いて分子量、コハク酸、コハク酸が高い値であった (Fig.3a)。MSE データにおける水結合成分の割合の重要性は、遷移曲線の前半が高かった (Fig.3b)。

3.3. Generative topographic mapping regressionによる高水不動態オリゴマーの重要因子探索

GTMR を実行して、目的の水不動態を持つオリゴマーを検索しました (Fig.4)。水不動態の指標として、CPMG の第 1 成分の割合をターゲット変数として使用しました。データ空間の中で、水結合成分50%であり、テレフタル酸を50%含むオリゴマーの座標を算出し(Fig.4a)、その T_2 緩和曲線 (Fig.4b)と、RDKitの分子記述子(図 4c)、オリゴマーの組成の候補(図 4d)を予測できた。

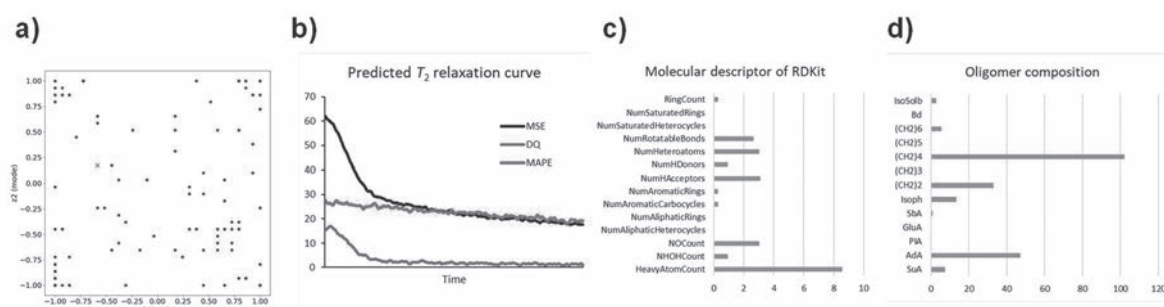


Fig. 4. Exploring important factor of highly water-immobile oligomers by generative topographic mapping regression.

Using GTMR, we mapped the data space (a), predicted T_2 relaxation curves (b), molecular descriptors of RDKit (c), and oligomer composition (d) using water immobility and composition as objective variables.

3.4. ベイズ最適化による高水不動態オリゴマーの組成予測

高い水不動態を持つオリゴマーの組成を最適化するために、シミュレートされた候補オリゴマー組成を使用してベイズ最適化を実行した (Fig.5)。水不動態の指標として、CPMG の第 1 成分の割合をターゲット変数として使用した。高い水不動態が期待されたサンプル (O001, O092, O108, O025, O095) は、CPMGの実測値においても結合水の割合は高い値であった。

5. References

- [1] J. Kikuchi, S. Yamada, *Rsc Adv.*, **11** (2021) 30426-30447. [2] P. Nicolella, et al., *Soft Matter*, **18** (2022) 1071-1081. [3] D. Besghini, et al., *Appl Sci*, **9** (2019) 1801. [4] Y. Date, et al., *BMC Chem*, **15** (2021) 13. [5] A. Takamura, et al, *Sci. Rep.*, **11** (2021). [6] S. Yamada, et al., *Int. J. Mol. Sci.*, **22** (2021) 1086. [7] R. Yamawaki, et al., *Appl. Sci.*, **11** (2021) 2820.

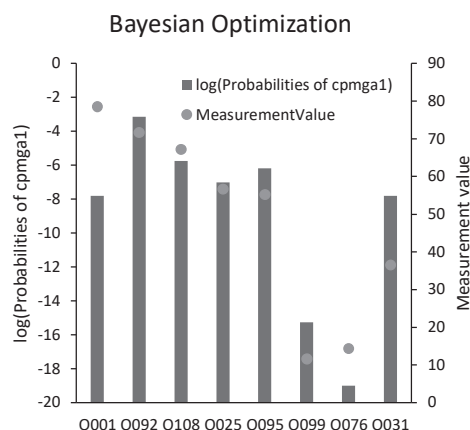


Fig. 5. Optimization of highly water-immobile oligomer composition by Bayesian optimization.

The higher the expected value, the higher the measured value.

P37

医薬品の原料粉末における結晶形の定量評価を目的とした T_2 緩和に対する部分的最小二乗回帰の適用

○岡田康太郎¹, Yuya Chiba¹, Yoshihiro Hayashi², Shungo Kumada², Yoshinori Onuki¹

¹富山大学 薬学部 製剤設計学講座

²日医工株式会社

Applying partial least squares regression to T_2 relaxation curves for predicting the crystalline form content of active pharmaceutical ingredient in physical mixtures

○Kotaro Okada¹, Yuya Chiba¹, Yoshihiro Hayashi², Shungo Kumada², Yoshinori Onuki¹

¹Laboratory of Pharmaceutical Technology, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, University of Toyama

²Nichi-Iko Pharmaceutical Co., Ltd.

This study applied partial least squares (PLS) regression to nuclear magnetic resonance (NMR) relaxation curves to quantify the free base of an active pharmaceutical ingredient powder. We measured the T_2 relaxation of intact and moisture-absorbed physical mixtures of tetracaine free base (TC) and its hydrochloride salt (TC·HCl). The obtained T_2 relaxation curves were analyzed by PLS regression. The entire measured whole of the T_2 relaxation curves was used as input variables and analyzed by PLS regression to quantify the content of TC in the moisture-absorbed TC/TC·HCl. Based on scatterplots of theoretical versus predicted TC, the obtained PLS model exhibited acceptable coefficients of determination and relatively low root mean squared error values for calibration and validation data. The statistical values confirmed that an accurate and reliable PLS model was created to quantify TC in even moisture-absorbed TC/TC·HCl. The bench-top low-field NMR instrument used to apply PLS regression to the T_2 relaxation curve may be a promising tool in process analytical technology.

【背景】医薬品における有効成分の結晶形は、有効性および安全性に影響を与えるため、重要な評価項目である。当研究室では、時間領域NMR法を利用した、固形混合物における結晶形の定量評価を進めてきた。一連の研究から、ソリッドエコー法により測定された T_2 緩和時間は、含まれる有効成分の結晶性を定量的に評価できることを明らかにしてきた^{1,2}。しかし、 T_2 緩和時間の算出過程において、フィッティング解析に用いる理論式では、項数やオフセット項の選択に経験的な判断を要する。

【目的】本研究では、 T_2 緩和の曲線を用いて、低分子量の有効成分における結晶形の定量評価を行うことを目的とし、ケモメトリックスの一種である部分的最小二乗 (partial least squares ; PLS) 回帰を T_2 緩和の解析に適用した。さらに、吸湿した水が本手法に及ぼす影響を評価するため、吸湿した混合物を調製し、同様の解析を行った。なお、PLS回帰では、 T_2 緩和の曲線を構成する測定点を、説明変数として扱った。

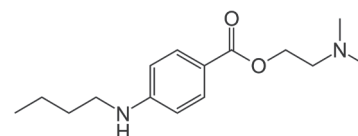


Fig. 1. Chemical structure of tetracaine free base (TC).

T_2 緩和, 医薬品, ケモメトリックス

○おかだこうたろう, ちばゆうや, はやしよしひろ, くまだしゅんご, おおぬきよしのり

【方法】市販のテトラカインフリー体 (TC)、テトラカイン塩酸塩 (TC·HCl) を質量比20%刻みで混合し、物理混合物とした。また、物理混合物を25°C94%RHにて保存し、吸湿した物理混合物とした。調製した各物理混合物の T_2 緩和は、低磁場NMR装置 (minispec mq20、Bruker) によりソリッドエコー法を用いて、それぞれ、5回測定した。

PLS回帰はJMP® Pro 16 (SAS institute) を用いて行った。説明変数を T_2 緩和の曲線を構成する測定点とし、目的変数を物理混合物に含まれるフリー体の割合とした。取得した5つの T_2 緩和のうち4つをcalibration set、1つをvalidation setとした。calibration setを用いて回帰モデルを作成し、validation setを用いて回帰モデルの検証を行った。モデル精度の指標として、variable importance in projection (VIP) 値、決定係数 (R^2) および二乗平均平方根誤差 (RMSE) を用いた。

【結果・考察】最初に、TC/TC·HClの物理混合物について、測定・解析を行った。PLS回帰の結果、validation setにおいて、 R^2 は0.998、RMSEは1.587であり、物理混合物に含まれるフリー体の割合を精度良く予測できた。

次に、吸湿が回帰モデルの予測精度に与える影響を検証するため、吸湿したTC/TC·HClの物理混合物について、同様の測定・解析を行った (Fig. 2a)。PLS回帰の結果、validation setにおいて、 R^2 は0.999、RMSEは1.304であり、未吸湿の物理混合物と同様に、含まれるフリー体の割合を予測可能であった (Fig. 2b)。

吸湿した物理混合物の場合、VIP値は T_2 緩和挙動の全域で高い値を示し (>0.8)、特に0–0.03 msの領域で相対的に高い値を示した (Fig. 2c)。0–0.03 msは、有効成分自体に由来する領域であり、作成された回帰モデルは妥当であると考えられる。一方で、0.03–0.3 msは吸湿した水に由来する領域であり、この領域においてもVIP値は0.8以上と高い値を示したことから、回帰モデルは有効成分および吸湿した水の両方に基づき作成されたことが判明した。

以上から、ソリッドエコー法から得られた T_2 緩和に対し、PLS回帰を適用することで、吸湿の有無を問わず、物理混合物に含まれる有効成分の結晶形を定量できることを明らかにした。

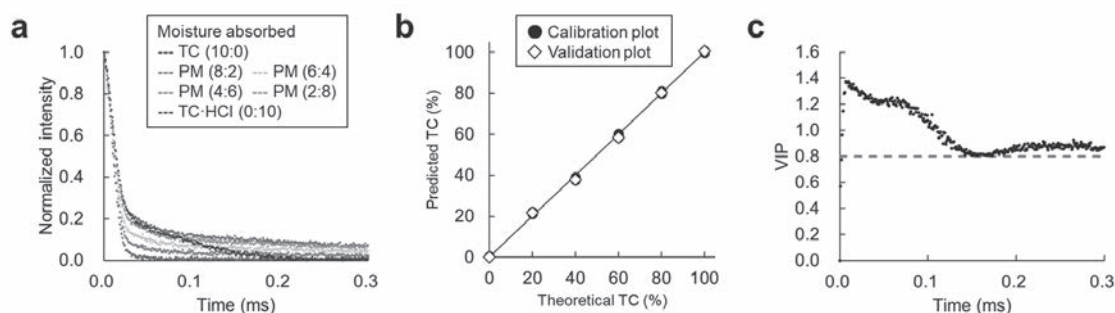


Fig. 2. (a) T_2 relaxation curves of moisture-absorbed physical mixture (PM) of tetracaine (TC) and tetracaine hydrochloride (TC·HCl), (b) scatterplots of theoretical TC versus predicted TC content by partial least squares (PLS) model, (c) variable importance in projection (VIP) values of input variables of the PLS models to determine TC content. Input variables correspond to the acquisition time of T_2 relaxation curves.

References

- (1) Okada et al. (2019) T_2 Relaxation Study to Evaluate the Crystalline State of Indomethacin Containing Solid Dispersions Using Time-Domain NMR. *Chem. Pharm. Bull.* 67, 580–586.
- (2) Okada et al. (2020) Quantitative Evaluation of the Crystallinity of Indomethacin Using ^1H T_2 Relaxation Behaviors Measured by Time Domain NMR. *J. Pharm. Sci.* 109, 2257–2584.

P38Y

エチレンアイオノマーの構造と熱劣化過程に関する 固体NMR法とESR法による研究

○三影昇平¹, 中澤千香子¹, 浅野敦志¹

¹防衛大学校・応用化学科

Structure and degradation process of an ethylene ionomer investigated by solid-state NMR and ESR

○Shohei Mikage¹, Chikako T. Nakazawa¹, Atsushi Asano¹

¹Department of Applied Chemistry, National Defense Academy

Annealing effect of Na⁺ cation on structure and degradation of ethylene ionomers was investigated by the high-resolution solid-state ¹³C NMR and ESR. The ¹³C CPMAS NMR and T₁^C experiments showed that the regularity of the orthorhombic crystal is improved and that the crystallinity increased after annealing at 65°C. The temperature-dependent ¹³C NMR spectra showed that the peak intensity decreases with temperature (beyond 55°C) and disappeared at 86°C, while the orthorhombic crystal remains at the temperature. The ¹³C CPMAS NMR spectra after heat-treatment at 200°C showed the appearance of new signals assigned to various esters with heating period. The ESR spectra detected that the radicals increase significantly with degree of neutralization. The expected thermal degradation process was discussed from both peak changes of NMR and ESR.

<緒言>

メタクリル酸 (MAA) とエチレン鎖 (E) からなるランダム共重合体 (EMAA) は、MAA部位の解離したカルボキシ基 (COO⁻基) と金属イオンが静電相互作用により凝集することで、イオン会合体 (イオンクラスター) を形成する。このイオン会合体が強い架橋点として存在することで、強靱性や耐衝撃性などの物性が向上することが知られている¹⁾。EMAAやEMAAアイオノマーのDSC曲線には、65°C近傍に秩序-無秩序転移によるとされる吸熱ピークが観測されることが知られている。温度可変NMRスペクトルの解析などから、この吸熱ピークの由来について検討した。さらに、200°Cの高温熱処理で起こる架橋反応に対するイオン会合体の影響を固体高分解能¹³C CPMAS NMR法とESR法を用いて検討した。

<実験・解析>

EMAAとEMAAアイオノマーは、三井・デュポンポリケミカル社より提供された。どちらも質量比で15 wt%のMAA部を有し、アイオノマーはカルボキシ基のx %がNa⁺イオンで中和されている (EMAA-xNa)。熱処理はセラミックホットプレートを用いて空気雰囲気下200±5°Cで行った後、液体窒素で急冷して熱処理の進行を止めた。

固体高分解能¹³C NMR スペクトルは、Varian社製NMR Systems 400WB を用いて測定した。¹H核の90°パルス幅は3.7 μs、交差分極 (CP) のラジオ波強度は¹H側が54.3 kHz、¹³C側が55.6 kHz、¹Hデカップリング (DD) のラジオ波強度は67.6 kHz、MAS 速度は6または7 kHz に設定して室温で測定した。ESRスペクトルは、BRUKER社製の卓上型電子スピン共鳴装置 (EMXnano) を用いてエチレンアイオノマー、緩和時間、ラジカル

○みかげしょうへい, なかざわかこ, あさのあつし

掃引磁場中心を 343.86 ± 0.12 mT、掃引時間30 s、積算回数256回に設定し、室温で測定した。示差走査熱量測定 (DSC) は、PerkinElmer社製DSC 8500を用いて測定した。昇温降温ともに $2^\circ\text{C}/\text{min}$ で 20°C から 130°C までの範囲で窒素雰囲気下で行った。パージ窒素ガス流量は 20 ml/minである。

<結果・考察>

Fig. 1に、EMAAとEMAA-54NaのDSC測定の結果を示す。熱処理前では、 60°C 近傍に小さな吸熱ピーク (T_i) と 90°C 付近に CH_2 鎖の結晶相の融解に起因する吸熱ピーク (T_m) の2つのピークが観測される (黒線)。 T_i よりもわずかに高い 65°C で60分間アニーリングした後にDSC測定すると (赤線)、EMAAとEMAA-54Naともに T_i ピークが 70°C 付近までシフトする。このような温度履歴による CH_2 鎖の結晶相の変化を観測するため、温度可変 ^{13}C CPMAS NMRスペクトルを測定した。ここでは、アニーリング前後のEMAAとEMAA-54Naの固体高分解能 ^{13}C CPMAS NMRスペクトルをFig. 2に示す。アニーリング前のスペクトルに注目すると、 33 ppm付近に結晶相由来の CH_2 ピーク、 31 ppm付近に非晶相由来の CH_2 ピークが観測された。結晶相由来の CH_2 ピークは、 $T_1\rho$ の測定途中における減衰傾向から、3つの成分で構成されていると考えられた。 33.9 ppmのピークは単斜晶 (Monoclinic)、 33.4 ppmのピークは COOH 基あるいはイオン会合体近傍に位置する CH_2 基、 32.8 ppmのピークは斜方晶 (Orthorhombic) に帰属されると考えられた。アニーリング後のスペクトルでは、斜方晶ピークが顕著に増加した。また、温度可変NMRスペクトルからは、単斜晶が 70°C 付近で顕著に減少し、その後消失した。すなわち、 T_i の一因は単斜晶の融解にあることが示唆された。さらに、アニーリング前後での $T_1\rho$ 値の変化を比較してみると、単斜晶ではほとんど変化がないのに対し、斜方晶では $T_1\rho$ 値の長い成分がEMAAで 8.7 ± 0.7 sから 24 ± 2 s、EMAA-54Naで 6.4 ± 0.8 sから 21 ± 2 sと長くなっていることが分かった。熱処理後に斜方晶が増加したこと、 $T_1\rho$ が大幅に長くなったことから、 T_i の吸熱ピークは単斜晶の融解と共にエチレン鎖の秩序-無秩序転移が原因となって出現していると言えた。

次に、 200°C で熱処理したときの架橋反応におけるイオン会合体の影響について調べた。Fig. 3にEMAAおよびEMAA-54Naの固体高分解能 ^{13}C CPMAS NMRスペクトルについて、カルボニル領域を拡大して示した。熱処理前は 185 ppm近傍にMAA部位の COOH 基に帰属されるピークが観測

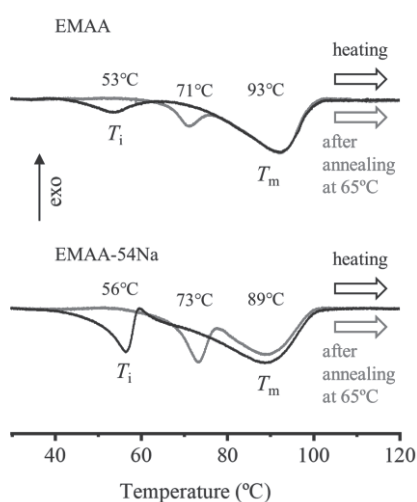


Fig. 1. Observed DSC spectra of EMAA and EMAA54-Na before and after annealing.

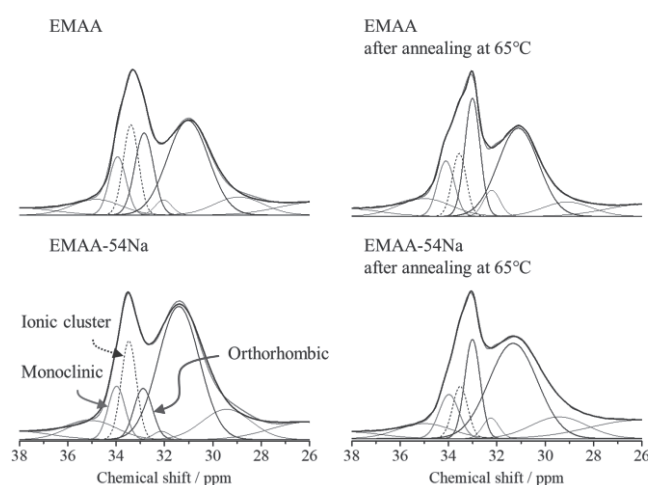


Fig. 2. Observed and expanded solid-state ^{13}C CPMAS NMR spectra for CH_2 region of EMAA and EMAA-54Na before and after annealing.

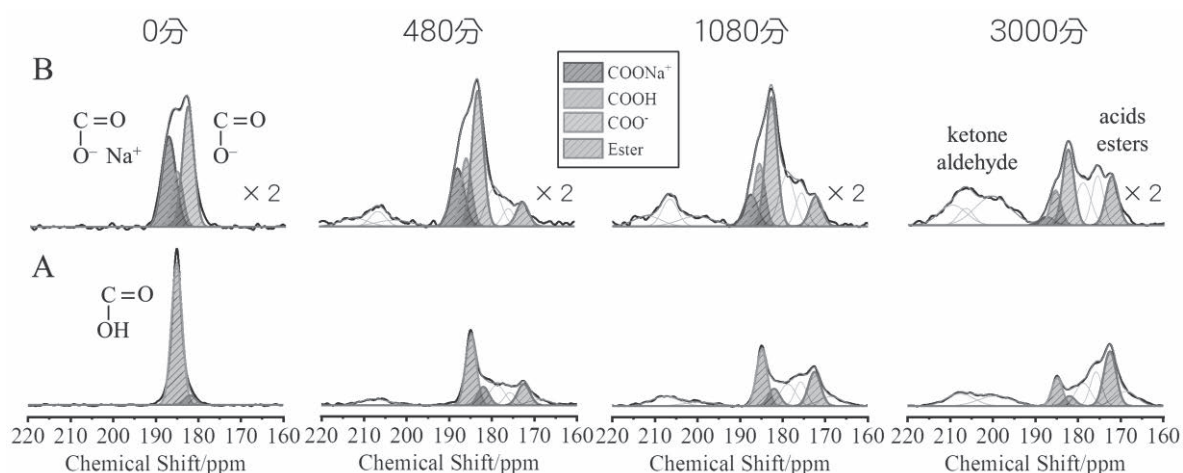


Fig. 3. Observed and simulated ^{13}C CPMAS NMR spectra expanded in the carbonyl region of (A) EMAA and (B) EMAA-54Na before and after heat treatment.

される。EMAA-54Naでは、このピークに加えて、188 ppmに Na^+ と相互作用しているCOOH基 ($\text{COO}^- \text{Na}^+$ 基) ピーク、183 ppmに解離したCOOH基 (COO^- 基) ピークが観測された。熱処理後には210 ppm付近および170 ppm付近を中心に新たなピークが観測された。既報の熱処理ポリエチレンの ^{13}C NMRスペクトルとの比較から、220~190 ppm付近のピークがケトンとアルデヒド、180~165 ppm付近のピークが酸とエステル類であると帰属された²⁾。エステルの発生量は熱処理時間に伴って増大し、EMAA-54NaよりもEMAAの方が多いたことがわかった。一方で、EMAAでは185 ppmのCOOH基ピーク (橙色)、EMAA-54Naでは188 ppmの $\text{COO}^- \text{Na}^+$ 基ピーク (紫色) が熱処理に伴い顕著に減少した。これは、EMAAおよびEMAA-Naのメタクリル酸部位で、熱処理によりラジカルが発生し、架橋反応が進行してエステル基などに变化したためである。次に、熱処理に伴って起こるラジカル生成や、そのラジカル種をより定量的に解析した。

Fig. 4に熱処理時間480分、1080分および3000分の時のEMAAおよびEMAAアイオノマーのESRスペクトルを示す。観測されたピークは一見シングレットピークであり、熱処理時間の増加に伴ってピーク強度が増大した。このピーク強度は、 Na^+ イオンによる中和度が高いほど強く観測された。これはNMRから観測されたエステルピークの増加傾向とは逆の関係である。すなわち、観測されたラジカル量は、エステル基などへの架橋反応に関与していないか、あるいは関与した後に残存したラジカルであると考えられる。

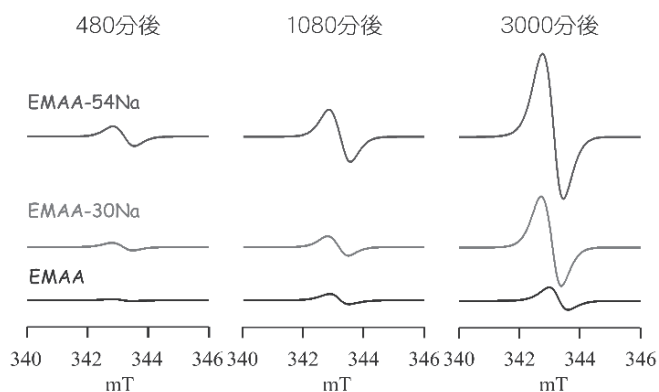


Fig. 4. ESR spectra of EMAA, EMAA-30Na, and EMAA-54Na heated at 200°C.

熱処理中の反応をより詳細に考察するために、熱処理時間の増加に伴うラジカル量の変化に着目した。Fig. 5には、EMAA (黒実線と■) およびEMAA-54Na (青実線と▲) のラジカル量 (スピン量) を熱処理時間に対してプロットした。ラジカルは熱処理時間と共に増加し、EMAAでは2000分、EMAA-54Naでは1300分付近を境に二段階で増加した。また、熱処理当初は2.005付近であったg値が、熱処理に伴い2.003付近まで低下した。カルボニルラジカル ($\text{COO}\cdot$) のg値は2.005、アルコキシラジカル ($\text{CO}\cdot$) は2.004、炭素ラジカル ($\text{C}\cdot$) は2.003に相当することから、少なくとも

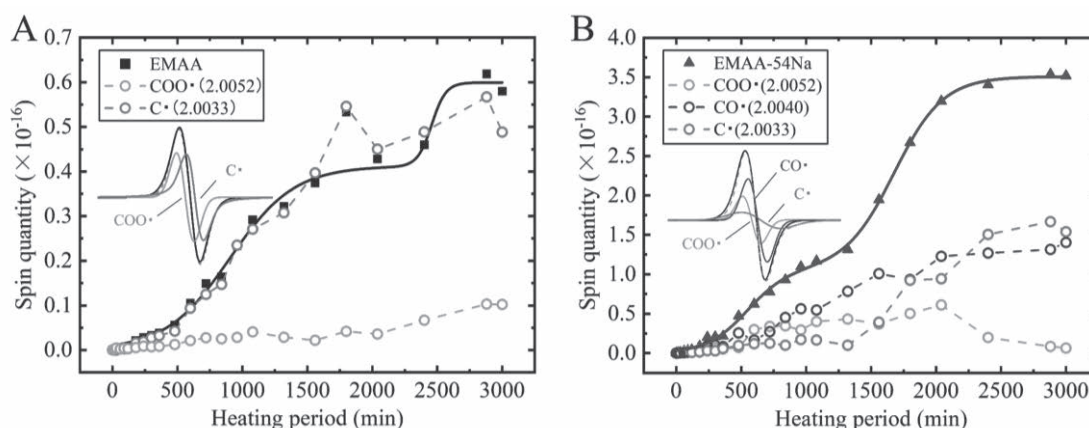


Fig. 5. Spin quantity obtained from peak fitting against the heating period for EMAA (A) and EMAA-54Na (A).

3種類のラジカル発生が示唆される。そこで、実測のESRスペクトルが、この3種類のいずれかのラジカルによると仮定してシミュレーションした。EMAAでは、 $\text{COO}\cdot$ ラジカル（橙色）と $\text{C}\cdot$ ラジカル（緑色）の2種類のラジカル発生を仮定するとうまく再現できた。処理時間2000分付近までは、 $\text{C}\cdot$ ラジカルのスピンの量が顕著に増加し、2000分以降では停滞した。一方で、 $\text{COO}\cdot$ ラジカルは緩やかに増加し続けた。EMAA-54Naでは、3種類のラジカルを仮定するとうまく再現できた。熱処理時間1300分付近までは、 $\text{CO}\cdot$ ラジカル（紫色）、 $\text{COO}\cdot$ ラジカル（橙色）、 $\text{C}\cdot$ ラジカル（緑色）の順にスピンの量が増加したが、1300分以降では $\text{COO}\cdot$ ラジカルのスピンの量増加は停滞し、 $\text{C}\cdot$ ラジカルと $\text{CO}\cdot$ ラジカルが増加した。

以上のNMRとESRの結果から、予想されるラジカル生成反応を検討した (Fig.6)。EMAAでは、熱処理時間の2000分までは、 COOH 基が脱離したり (①)、 $\text{H}\cdot$ の解離や (②) さらに酸化反応が進んで CO_2 が脱離することで (③)、 $\text{C}\cdot$ ラジカルと $\text{COO}\cdot$ ラジカルが生成する。2000分以降では $\text{COO}\cdot$ ラジカルのみが増加し続けたことから、 $\text{H}\cdot$ の解離 (②) のみが継続したと考えられる。これに対し、EMAA-54Naでは、熱処理時間の1300分までは、 $\text{COO}^- \text{Na}^+$ 基から ONa 基が脱離したり (①')、 ONa 基が結合したりすることで (②')、 $\text{COO}\cdot$ ラジカルと $\text{CO}\cdot$ ラジカルの生成が優勢となったと考えられた。1300分以降では、酸化反応がさらに進行することで CO と CO_2 が脱離し (③', ④')、 $\text{C}\cdot$ ラジカルが最も顕著に増加したと考えられた。

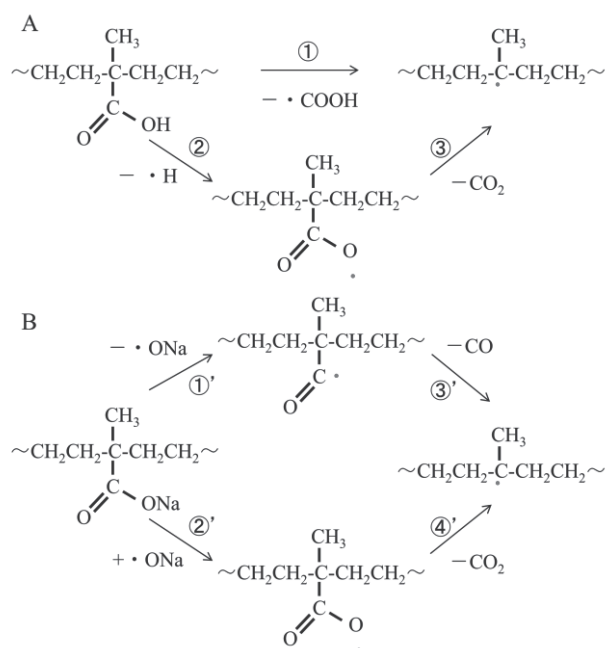


Fig. 6. Expected radical formation reaction for EMAA (A) and EMAA-54Na (B).

<参考文献>

- 1) 矢野紳一、平沢栄作監修、「アイオノマー・イオン性高分子材料の開発」シーエムシー出版 2009.
- 2) R.A. Assink, et al., *Macromolecules*, **33**, 4023-4029, (2000).

P39

グアニン四重鎖への陽イオン結合の位置選択性と交換過程の研究

○寺村琢央¹, 金折賢二¹

1京都工芸繊維大学大学院・機能物質化学専攻

Study on selectivity and exchange processes of cations binding to G-quadruplex

○Teramura Takuo¹, Kenji Kanaori¹

¹Department of Functional Chemistry, Kyoto Institute of Technology

G-quadruplex is a non-canonical structure formed by the folding of G-rich DNA strands. The G-quadruplex has cation binding sites of Na⁺ and K⁺, between the G-quartet planes, and takes different topologies depending on the cations. In this study, we used ¹⁵NH₄⁺ with Na⁺ or K⁺ to analyze the selectivity and affinity of the cations to the binding sites of human telomeric G-quadruplex by chemical exchange cross peaks in the NOESY spectra. High ¹⁵NH₄⁺ affinity binding site exists in the Hybrid-1 type of the G-quadruplex, determined by NOEs between ¹⁵NH₄⁺ and imino protons, and there is difference in the cation selectivity and affinity between the cation binding sites.

【緒言】DNAは標準構造の二重らせん以外にも、グアニン塩基に富んだ領域でグアニン(G)四重鎖と呼ばれる構造を形成することが知られている。G四重鎖はGカルテットと呼ばれるG塩基からなる平面構造を持ち、平面間にNa⁺やK⁺イオンなどの陽イオンが結合できるサイトが存在する。ヒトテロメア配列をもつDNAオリゴヌクレオチドTel26 (d[AAAGGG(TTAGGG)₃AA])は、2つのNa⁺イオンと結合してBasket型G四重鎖 (Tel26-2Na⁺)を形成するが、2つのK⁺イオンと結合するとHybrid-1型G四重鎖 (Tel26-2K⁺)を形成することが知られている¹ (Fig. 1)。結合する陽イオンの半径の違いはG四重鎖の構造変化を引き起こすが、G四重鎖内に2つある結合サイト (A- and B-site in Fig. 1)への陽イオンの親和性の違いや、それらのサイトの陽イオン選択性については報告がない。陽イオン結合によって生じるG四重鎖構造の多型性は、G四重鎖をアプタマーと利用するような生物工学的な研究において重要である。本研究では、Na⁺やK⁺イオンに加えて、¹⁵NH₄⁺イオンを用いて、G四重鎖へのイオンの結合と解離をNOESYスペクトルに現れる化学交換のシグナルによって解析し、2つの陽イオン結合サイトの特徴を明らかにした。

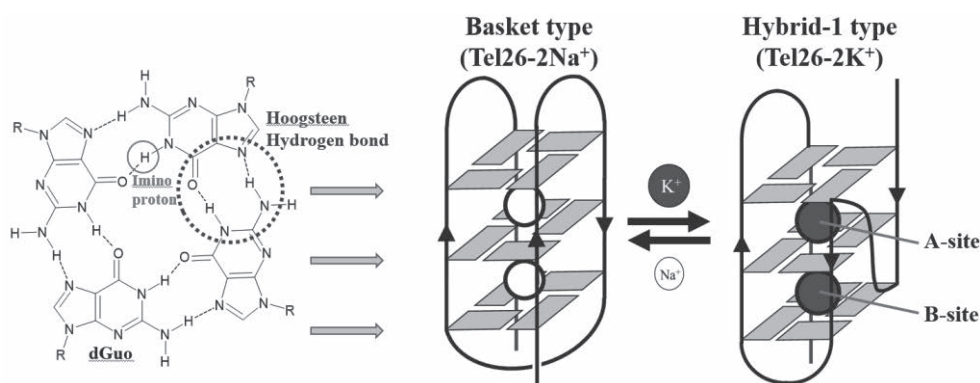


Fig. 1: Hoogsteen hydrogen bonds of G-quartet and schematic structures of G-quadruplex.

グアニン四重鎖, テロメア, 化学交換

○てらむらたくお, かなおりけんじ

【結果・考察】 Tel26-2Na⁺に対してK⁺イオンを加えると、Tel26-2Na⁺のイミノプロトンシグナルが減少し、Tel26-2K⁺とは化学シフトの異なる一組のイミノプロトンシグナルが観測された (Fig. 2の★)。これはTel26にNa⁺とK⁺が1個ずつ結合したTel26-Na⁺, K⁺であると考えられる。さらにK⁺イオンを加えるとTel26-2K⁺のシグナルの強度が上昇した。NOESYスペクトルにはTel26-Na⁺, K⁺とTel26-2K⁺のシグナルとの間に化学交換のクロスピークが観測されたが、Tel26-Na⁺, K⁺とTel26-2Na⁺の間には観測されなかった。このことは、Tel26-Na⁺, K⁺は、Tel26-2K⁺と同じHybrid-1型で、結合したNa⁺がK⁺と交換していることを示している。Tel26-Na⁺, K⁺のイミノプロトンのシグナル本数とTel26-2K⁺との交換のクロスピークから、G四重鎖内の2つの結合サイトのうちのどちらかにK⁺イオンが選択的に結合していることが示唆された。すなわち、Hybrid-1型の構造形成に必要なK⁺イオンは、A-もしくはB-siteのどちらかに優先的に結合し、もう一方の結合サイトにはNa⁺とK⁺イオンのいずれが結合してもHybrid-1型としてG四重鎖構造が安定化されると推測される。

Hybrid-1型G四重鎖へのK⁺イオン結合の位置選択性を明らかにするために、¹⁵NH₄⁺をK⁺イオンのプローブとして使用した。K⁺イオンでHybrid-1型を形成することが報告²されているmutTel24 (d[TTGGG(TTAGGG)₃A]) は、¹⁵NH₄⁺イオン存在下でもG四重鎖を形成した。NOESYスペクトルでのNOEパターンの解析すると、mutTel24-2NH₄⁺はmutTel24-2K⁺と同じHybrid-1型であった。イミノプロトンとのNOEクロスピークからmutTel24-2NH₄⁺の2つの結合サイトに結合する¹⁵NH₄⁺イオンのシグナルが分離して観測された。mutTel24-2NH₄⁺にNa⁺イオンを滴加すると、mutTel24-2NH₄⁺と交換のクロスピークをもつシグナルが新たに観測された。交換のクロスピークが観測されたことでNa⁺イオンの滴加で生じたmutTel24- Na⁺, NH₄⁺もHybrid-1型であることが示された。¹⁵NH₄⁺イオンのシグナルは1本だけが観測され、それとイミノプロトンとのNOEから、A-siteには¹⁵NH₄⁺イオンが結合したままで、B-siteにNa⁺イオンが結合していることが示された。これらのことから、ヒトテロメアG四重鎖は、A-siteへのK⁺イオンの親和性が高く、一旦、A-siteにK⁺イオンが結合するとHybrid-1型がBasket型よりも安定化されると考えられる。

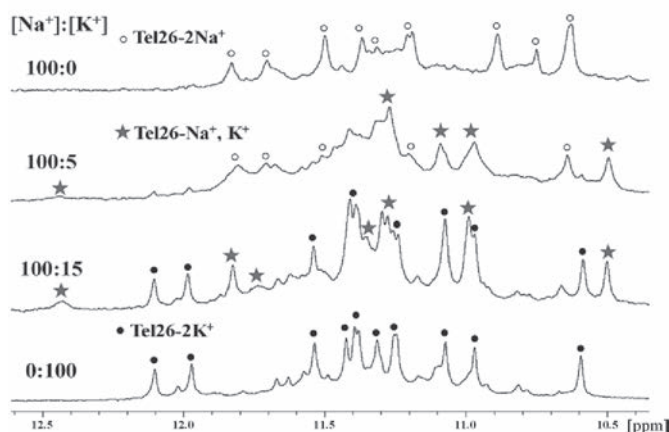


Fig. 2: Imino regions of ¹H NMR spectra of Tel26 in Na⁺ solution in titration experiment of K⁺ at 298 K.

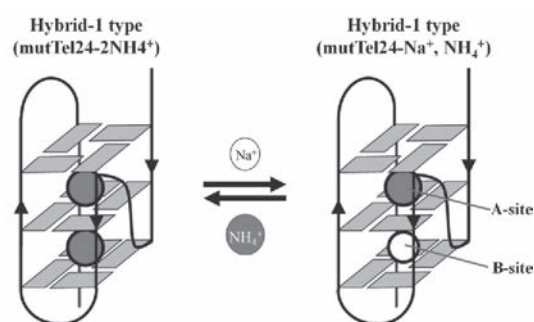


Fig. 3: Schematic diagram interconversions between Na⁺ and NH₄⁺ of Hybrid-1-type G-quadruplexes.

References

- (1) Ambrus, A., *et al.* (2006) Human telomeric sequence forms a hybrid-type intramolecular G-quadruplex structure with mixed parallel/antiparallel strands in potassium solution. *Nucleic Acids Res.* 34, 2723–2735.
- (2) Luu, K. N., *et al.* (2006) Structure of the human telomere in K⁺ solution: an intramolecular (3 + 1) G-quadruplex scaffold. *J Am Chem Soc* 128, 9963-9970.

P40Y

Q値を指標にした外部標準法定量NMR (EC-qNMR) の測定自動化とその定量精度について

○西崎雄三¹, 石附京子¹, 吉村弘伸², 松熊伸也², 朝倉克夫³, 末松孝子², 杉本直樹¹

1 国立医薬品食品衛生研究所

2 株式会社JEOL RESONANCE

3 日本電子株式会社

Automation of external calibration quantitative NMR (EC-qNMR) based on Q value and its accuracy of the quantitative values

○Yuzo Nishizaki¹, Kyoko Ishizuki¹, Hironobu Yoshimura², Shinya Matsukuma², Katsuo Asakura³, Takako Suematsu², Naoki Sugimoto¹

¹ National Institute of Health Sciences

² JEOL RESONANCE Inc.

³ JEOL Ltd.

Quantitative NMR (qNMR) is a highly regarded analytical methodology for purity determination. This methodology has two approaches: internal and external calibration (IC-qNMR and EC-qNMR). Of the two approaches, to obtain accurate quantitative results with EC-qNMR, 90° pulse width (pw90) calibration is necessary before qNMR measurement for each sample. To solve the problem of constraining the operator in front of the NMR instrument for the pw90 calibration, we developed a script that fully automates EC-qNMR according to the method conditions set by the operator: “pw continuous measurement determining pw90”-“qNMR measurement applied the calibrated pw90”. This poster presents the details of the script and the accuracy of quantitative results for EC-qNMR employing the script.

【はじめに】

NMRの応答は相反定理に従う。すなわち、チューニングとマッチング (T&M : Tuning and Matching) により、NMRの検出コイル (プローブ) が測定対象核の共鳴周波数に同調するとき限り、「パルス幅 (pw : pulse width) × ピーク面線 / プロトン数 / モル濃度」はプローブ固有の値 (Q値) となる。2本のNMR管を用いてEC-qNMRを実施した場合、両者の関係性は以下の式 (1) で表すことができる。

$$Conc._A = Conc._C \times \frac{A_A}{A_C} \times \frac{H_C}{H_A} \times \frac{pw90_A}{pw90_C} \quad (1)$$

ここで、*Conc.*, モル濃度 (mol/L) ; *A*, ピーク面積 ; *H*, *A*に由来するプロトン数 ; *pw90*, 90°パルス幅 (μsec) ; 添字A, 分析種 ; 添字C, 基準物質 (内部標準または外部標準)。

EC-qNMRでは、分析種と基準物質が異なるNMR試料管にあるため、それぞれのNMR試料管で、試料の導電性やpw90が異なる。そのため、EC-qNMRで正確な定量結果を得るためには、qNMR測定の前にpw90を校正し、この校正したpw90をqNMR測定条件に反映させることが重要である^{1,2)}。ただし、試料数が多いときはオペレータがpw90校正のためにNMR装置に拘束されると外部標準法, 相反定理, パルス幅校正

○にしぎきゆうぞう, いしづききょうこ, よしむらひろのぶ, まつくましんや, あさくらかつお, すえまつたかこ, すぎもとなおき

いう問題があり、EC-qNMRの実用化に向けた課題となっている。そこで本研究は予めオペレータが設定した測定条件に従い、pw90校正～qNMR測定を自動化するスクリプトを開発したので、その概要について説明する。また、この自動測定スクリプトを用いたEC-qNMRの定量精度についても発表する。なお、開発した自動測定スクリプトは日本電子製JNM-ECA及びECZ分光計（Delta version 5以降）に対応したものである。

【自動測定スクリプトの概要】

NMRでは照射中心のピーク強度をpwに応じてプロットすると、減衰する正弦波が描かれる³⁾。この特性を利用して、自動測定スクリプトのpw90校正には、分光計が自動計算可能なカーブフィッティング（CF）法を採用した⁴⁾。Fig. 1に自動測定スクリプトを使用した際の分光計の内部処理を示す。試料は1.0 mg/mLのジメチルスルホン（in DMSO-*d*₆）を用いた。まず、積算1回の¹H測定を行い、スペクトル中の最も強度の強いピークを探し、pw連続測定の照射中心に設定する。このときのサーチ範囲をオペレータが任意に選択できるように、search offset及びsearch sweepのパラメータを設けた（Fig. 1ではDMSO-*d*₆が照射中心となるようにsearch offset及びsearch sweepを設定している）。次にオペレータが設定したデータ間隔に従ってpw連続測定を行い、全スライスデータから最も強度の強いピークを持つスライスデータを抽出する（Fig. 1ではスライスデータ3となる）。このスライスデータを基準にして、全スライスデータに対する位相補正条件を決定する。位相補正した全スライスデータをアレイデータとして扱ってCFを行う。最後にこのCFで得られたpw90を反映したqNMR測定を行い、自動測定を終了する。Deltaソフトウェア上のパラメータ設定画面は当日に示す。

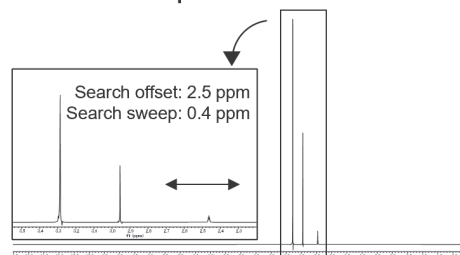
【自動測定スクリプトを用いたEC-qNMRの精度】

分析種に安息香酸（認証純度値：99.8%）、外部標準に3濃度のジメチルスルホン（認証純度値：99.9%）を用いて、自動測定スクリプトを用いたEC-qNMRを実施した。3濃度のジメチルスルホンから値付けた安息香酸の絶対純度は、99.7 ± 0.6%であり、安息香酸の認証純度値と良好に一致した。データの詳細は当日に示す。

【参考文献】

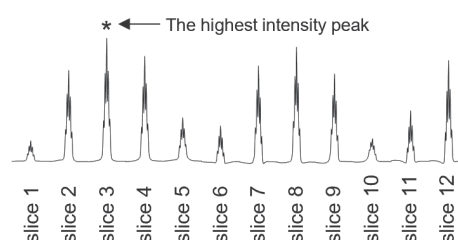
- 1) Burton et al., *Anal. Chem.*, 77, 3123–3131 (2005)
- 2) Nishizaki et al., *Anal. Chem.*, 93, 2733–2741 (2021)
- 3) Keifer. *Concepts Magn. Reason.*, 11, 165–180 (1999)
- 4) Kurimoto et al., *Chem. Lett.*, 34, 540–541 (2005)

◆ ¹H single-pulse acquisition for determining the offset of pw continuous measurement



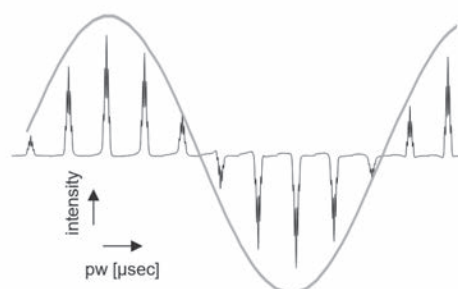
The spectrometer searches for the highest intensity peak in the 2.3–2.7 ppm range. In this case, the highest intensity peak is the solvent peak (DMSO-*d*₆).

◆ pw continuous measurement for the DMSO-*d*₆ peak acquired on-resonance



The horizontally stacked spectra of pw continuous measurement. The spectrometer searches for the 1D slice data having the highest intensity peak (→ slice 3).

◆ Phase correction for all slice data based on slice 3, and CF for determining pw90



This processing and calculation leading to calibrated pw90 is automatically performed within the spectrometer.

◆ qNMR measurements with pw90 calibrated for pw continuous measurement

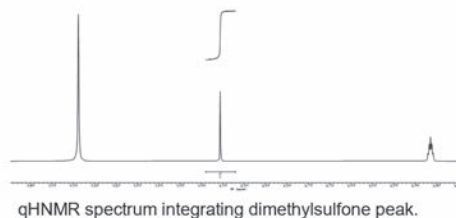


Fig. 1 Spectrometer behavior when performing EC-qNMR employing the script. The sample is 1.0 mg/mL dimethylsulfone in DMSO-*d*₆. The spectrometer was JNM-ECZ600R/S1 (600.67 MHz) equipped cryogenic UltraCOOL (CH) probe regulated at 25 °C.

P41

PFM NMR法によるシンジオタクチックポリスチレンにおける 気体拡散特性の評価

○吉水 広明

名古屋工業大学大学院 工学研究科 工学専攻 生命応用化学系プログラム ソフトマテリアル分野

Temperature-dependent of the gas diffusion properties in syndiotactic polystyrenes containing various crystal phases by PFG NMR

○Hiroaki YOSHIMIZU

Field of Soft Materials, Life Science and Applied Chemistry Program,
Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology

Alpha and mesophase crystalline phases containing syndiotactic polystyrene samples were prepared, and a magnetic field gradient pulse NMR method was applied to investigate the temperature dependence of the self-diffusion coefficient of the gas in the system. From the observed data in this study, some unique gas transport properties of crystals of syndiotactic polystyrene were pointed out.

【緒言】 われわれは、優れた気体分離能と高透過性を同時に発現する可能性が期待される、高度に秩序化された気体拡散経路を提供する高分子結晶体の気体輸送特性について検討している。すなわち、結晶構造を構成する分子間の“すき間”を気体分離に応用する試みである。多くの高分子結晶体では、規則正しい繰り返しコンホメーションをとった分子鎖が林立する凝集様態なので、長軸方向が定義される。気体拡散経路を提供する分子鎖間隙は長軸方向に沿って連続的につながり、一種の“ナノチャンネル”と見做せるような微空間となる可能性が高い。シンジオタクチックポリスチレン(SPS)の α およびメゾフェーズ結晶の分子鎖間隙は、比較的小さな気体分子が入り込めるサイズの空隙である。Fig. 1に、酸素/窒素の気体透過係数比(分離特性)の温度依存を示す。T(A-M)はメゾフェーズ結晶含有試料、 α -RTは α 結晶含有試料、ASPSは非晶試料を指している。ASPSは温度上昇、すなわち透過性を向上させるほど分離特性が下がる、いわゆるトレードオフの関係を示し、一般の無定形高分子膜と同じ傾向を示した。これに対し、結晶構造得を有する試料では、透過と分離の同時向上がみられ、特にT(A-M)はおよそ60 °C以上で分離特性の著しい向上が予測される。この温度依存は可逆的で、化学的な変化ではなく、局所分子運動の特徴的な温度依存に因ると考察される。したがって、拡散係数の温度依存性の評価は重要であり、本研究ではPFG NMR法の適用上酸素や窒素を対象にはできず、 ^1H NMR観測可能な CH_4 と $n\text{-C}_4\text{H}_{10}$ を用いた。

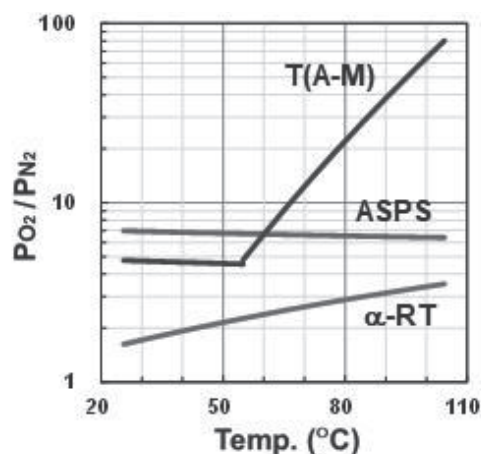


Fig. 1 Permselectivity of O_2 and N_2 vs. temp.

PFG NMR, syndiotactic polystyrene, gas diffusion properties.

○よしみず ひろあき

【実験】 出光興産(株)より供与されたSPSは、そのまま用いた。280 °C以上でプレス製膜したのち、氷水へ投入して非晶膜 (ASPS) を得た。ASPSをトルエンに浸漬してこれが包接された δ 結晶を形成させたのち、アセトン、メタノールの順で二段階に浸漬処理を施して、トルエンが完全に脱離したメゾフェイズ結晶含有膜 (T(A-M)) を得た。272 °Cでプレス製膜し、室温まで徐冷して α 結晶含有膜 (α -RT) を得た。適切な大きさに裁断された試料片を、テフロン製バルブキャップが付いた硬質ガラス製耐圧試料管(市販品)に適量詰めた。室温下で十分時間真空引きをしたのち、所定圧の CH_4 または $n\text{-C}_4\text{H}_{10}$ を導入し、これらの系中における自己拡散係数を ^1H PFG NMRによって決定した。高強度PFG (~ 13 [T/m]) が扱える仕様のJEOL ECA600 NMR分光計を用いた。

【結果と考察】 先ず、SPS各試料に収着した CH_4 と $n\text{-C}_4\text{H}_{10}$ の運動性に関して ^1H NMRスペクトルのピーク線幅から定性的な評価を試みた。すべての試料と気体種で線幅は温度とともに減じたので、収着気体の運動性評価は議論可能と判断した。 $n\text{-C}_4\text{H}_{10}$ の線幅は3試料間で大きな違いはなく、結晶相の存在がこれの運動性に与える影響は少ないと思われる。一方、 α -RTとT(A-M)に収着した CH_4 の線幅は、ASPSでのものに比べ全温度範囲にわたり小さい値であった。これらの観測事実は、 α およびメゾフェイズ結晶は CH_4 を透過可能で、それらでの運動性は非晶質相でのものより高いことを示唆している。また、T(A-M)では約60 °C付近で線幅の温度依存が明瞭に変化し、Fig. 1に示した O_2 や N_2 の透過測定結果に対応した挙動を示した。T(A-M)の特異な温度特性はメゾフェイズ結晶の特性に由来すると思われる。

次に、自己拡散係数の測定を行った。結果をFig. 2にまとめた。これをみると、ASPSと α -RT、T(A-M)における $n\text{-C}_4\text{H}_{10}$ の自己拡散係数値の温度依存はいずれも互いに似通った結果となっている。特筆すべきは、非晶相のガラス転移温度付近以上で温度変化が緩慢になっていることである。系中で拡散する気体の活性化エネルギーが、高分子鎖セグメントの運動性に律せられている様子が伺える。一方、T(A-M)における CH_4 のみ全温度域にわたり値は増大し続けていた。T(A-M)の非晶相における高分子鎖の運動性の変化が反映されないように見えるのは、高温域におけるメゾフェイズ結晶内での CH_4 の拡散性が飛躍的に増大し、非晶相における増加率の低下を補ったためと思われる。この考察は、Fig. 1に示した O_2 や N_2 の透過測定結果と矛盾しない。

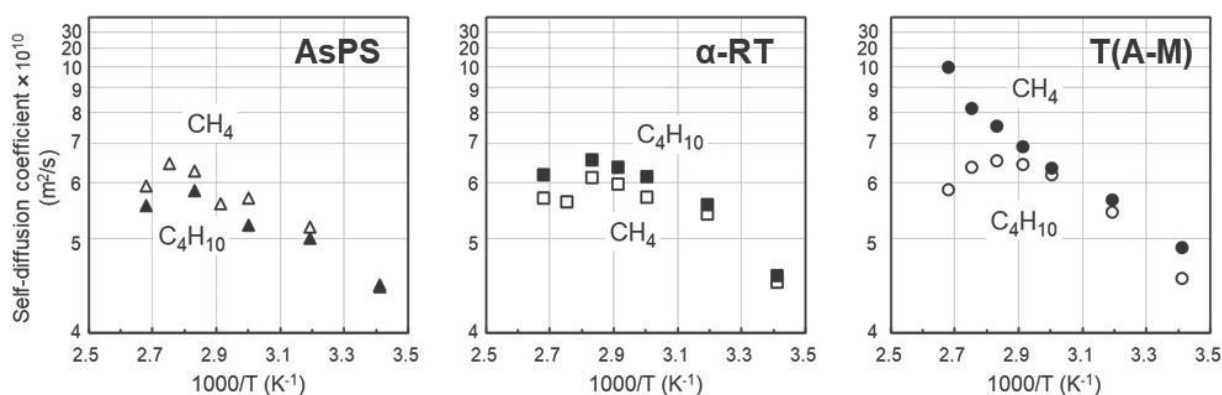


Fig. 2 Arrhenius plots of self-diffusion coefficient of the CH_4 and $n\text{-C}_4\text{H}_{10}$ in SPS samples.

P42Y

14-3-3 ζ による転写因子FOXO3aの阻害メカニズムの解明

○桑山知也¹, 中塚将一¹, 横川真梨子¹, 河津光作¹, 中村吏佐¹,
木村友美¹, 田辺幹雄², 千田俊哉², 齋藤潤³, 佐谷秀行³, 大澤匡範¹
1慶應義塾大学・大学院薬学研究科
2高エネルギー加速器研究機構・物質構造科学研究所
3慶應義塾大学・大学院医学研究科

Structural insights into the inhibitory mechanism of transcription factor FOXO3a by 14-3-3 ζ

○Tomoya Kuwayama¹, Shoichi Nakatsuka¹, Mariko Yokogawa¹, Kosaku Kawatsu¹, Risa Nakamura¹,
Tomomi Kimura¹, Mikio Tanabe², Toshiya Senda², Jun Saito³, Hideyuki Saya³, Masanori Osawa¹
¹ Grad. Sch. Pharm. Sci., Keio Univ. ² Structural Biology Research Center, IMSS, KEK
³ Grad. Sch. Med., Keio Univ.

FOXO3a is a transcriptional factor that induces expression of apoptosis-related proteins. In cancer cells, FOXO3a is phosphorylated and bound by an adaptor protein, 14-3-3 ζ , dissociating from target DNA. This decreases its transcriptional activity, and results in the suppression of apoptosis of cancer cells that leads to malignancy of the cancer. However, previous studies of us and others show the binding affinity of the phosphorylated FOXO3a for DNA is comparable to that for 14-3-3 ζ . Therefore, it remains elusive how 14-3-3 ζ effectively dissociates FOXO3a from DNA. In this study, we have analyzed the interaction mode between 14-3-3 ζ and phosphorylated FOXO3a by chemical shift perturbation and proposed a mechanism of FOXO3a dissociation from DNA by 14-3-3 ζ .

【序論】

FOXO3aは、アポトーシスを促進する転写因子である。多くのがん細胞ではRasの変異を起源とするリン酸化シグナリングが亢進しており、その下流に位置するFOXO3aは、複数個所でリン酸化を受ける。リン酸化されたFOXO3aは、がん細胞で高発現するアダプタータンパク質14-3-3 ζ と結合して標的DNAから解離し、転写因子としての機能が低下する(Fig. 1)。これによりがん細胞のアポトーシスが抑制され、がんの悪性化につながる(Obsil T. et al., *Biochim*

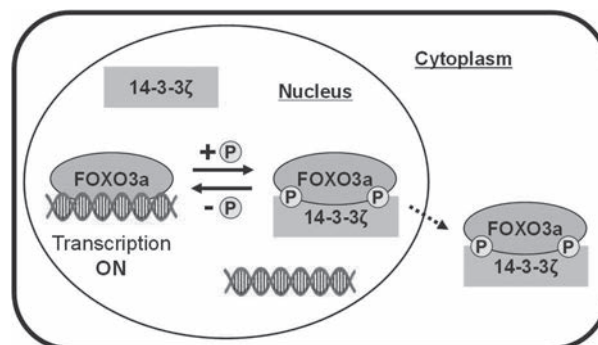


Fig. 1. Phosphorylated FOXO3a loses its transcriptional activity by dissociation from DNA upon binding to 14-3-3 ζ

Biophys Acta., 2011)。したがって、14-3-3 ζ によるFOXO3aの転写活性低下のメカニズムを解明できれば、その相互作用を阻害する新規抗がん剤の創製が期待できる。

がんリン酸化シグナル, FOXO3a, 14-3-3 ζ

○くわやまともや, なかつかしょういち, よこがわまりこ, かわつこうさく, なかむらりさ, きむらともみ, たなべみきお, せんだとしや, さいとうじゅん, さやひでゆき, おおさわまさのり

FOXO3a は673残基からなるタンパク質であり、構造非形成領域に挟まれたDNA-binding domain (DBD, residues 157-253)を有する。このDBDを介して標的DNAに結合し、その解離定数 (K_d) は約 10^{-8} Mである(Fig. 2) (Tsai K.-L. et al., *Nucleic Acids Res.*, 2007)。

14-3-3 ζ は245残基からなるタンパク質であり、9本のヘリックスからなるサブユニットが二量体を形成し、リン酸化されたSer/Thrを含む7残基程度のモチーフに結合する(Fig. 3) (Yaffe M. B. et al., *Cell*, 1997)。14-3-3 ζ は、Thr32とSer253の2か所がリン酸化されたFOXO3a (dpFOXO3a)と結合し、その K_d は約 10^{-8} Mである(Obsil T. et al., *Biochemistry*, 2003)。これまでに14-3-3 ζ とリン酸化ペプチドとの複合体構造は多数報告されているが、リン酸化部位を含む標的タンパク質全体との複合体構造はごく少数の報告例しかなく、dpFOXO3aとの結合様式も不明である(Killoran R. C. et al., *PLoS One*, 2015)。また、dpFOXO3aは14-3-3 ζ とDNAに対する結合親和性がほぼ同等であるにも関わらず、14-3-3 ζ がいかんしてdpFOXO3aをDNAから解離させるのかは不明であった。

そこで本研究では、NMRによりdpFOXO3aと14-3-3 ζ の相互作用様式を解明し、14-3-3 ζ によるdpFOXO3aのDNAからの解離メカニズムの解明を目指した。

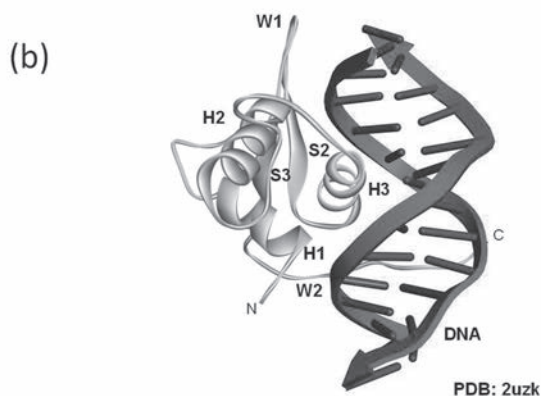
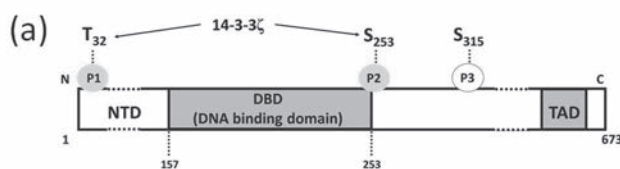


Fig. 2. (a) Domain of FOXO3a
(b) Crystal structure of FOXO3a-DBD / DNA

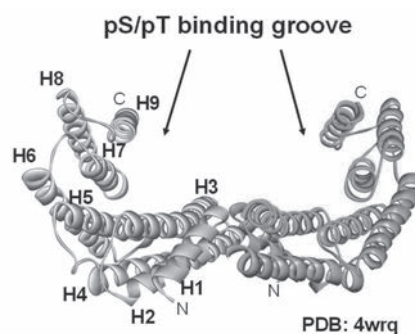


Fig. 3. Crystal structure of 14-3-3 ζ and pS / pT binding groove

【方法】

14-3-3 ζ とFOXO3a (residues 1-284)はそれぞれ大腸菌にて発現し精製した。dpFOXO3aは、市販のAKTを用いてFOXO3aをリン酸化して調製した。次に、 ^{13}C , ^{15}N により標識したFOXO3aおよび ^2H , ^{13}C , ^{15}N により標識した14-3-3 ζ をそれぞれ調製し、三重共鳴により主鎖NMRシグナルの帰属を確立した。また、 ^2H , ^{15}N 標識したdpFOXO3aおよび14-3-3 ζ に対して非標識14-3-3 ζ 、dpFOXO3aをそれぞれ滴定し、 ^1H - ^{15}N TROSYのスペクトル変化を解析した。

【結果】

^2H , ^{15}N dpFOXO3aへの14-3-3 ζ の滴定実験

dpFOXO3a 上の 14-3-3 ζ 結合部位を調べるために、 ^2H , ^{15}N 標識 dpFOXO3a の ^1H - ^{15}N TROSY のスペクトル変化を指標として、14-3-3 ζ の滴定実験を行った (Fig. 4)。14-3-3 ζ の添加に伴い、一部のシグナルに強度減少・消失と新たなシグナルの出現が観測され、両者が直接結合することが分かった。

シグナルが消失した残基は、14-3-3 ζ が結合するとされていたリン酸化部位周辺だけでなく、多くの DBD の残基を含んでいた。そこでそれらを FOXO3a-DBD の構造上にマッピングしたところ DNA 結合界面に存在していたことから、14-3-3 ζ はリン酸化モチーフだけでなく DBD とも相互作用し、DNA の結合を競合的に阻害することが示唆された。

また、別途 DBD の ^1H - ^{15}N HSQC を指標とした 14-3-3 ζ の滴定実験では、fast exchange regime でのスペクトル変化が観測された。化学シフト変化の滴定曲線への fitting から、DBD と 14-3-3 ζ の K_d は約 2 M と推定された(data not shown)。

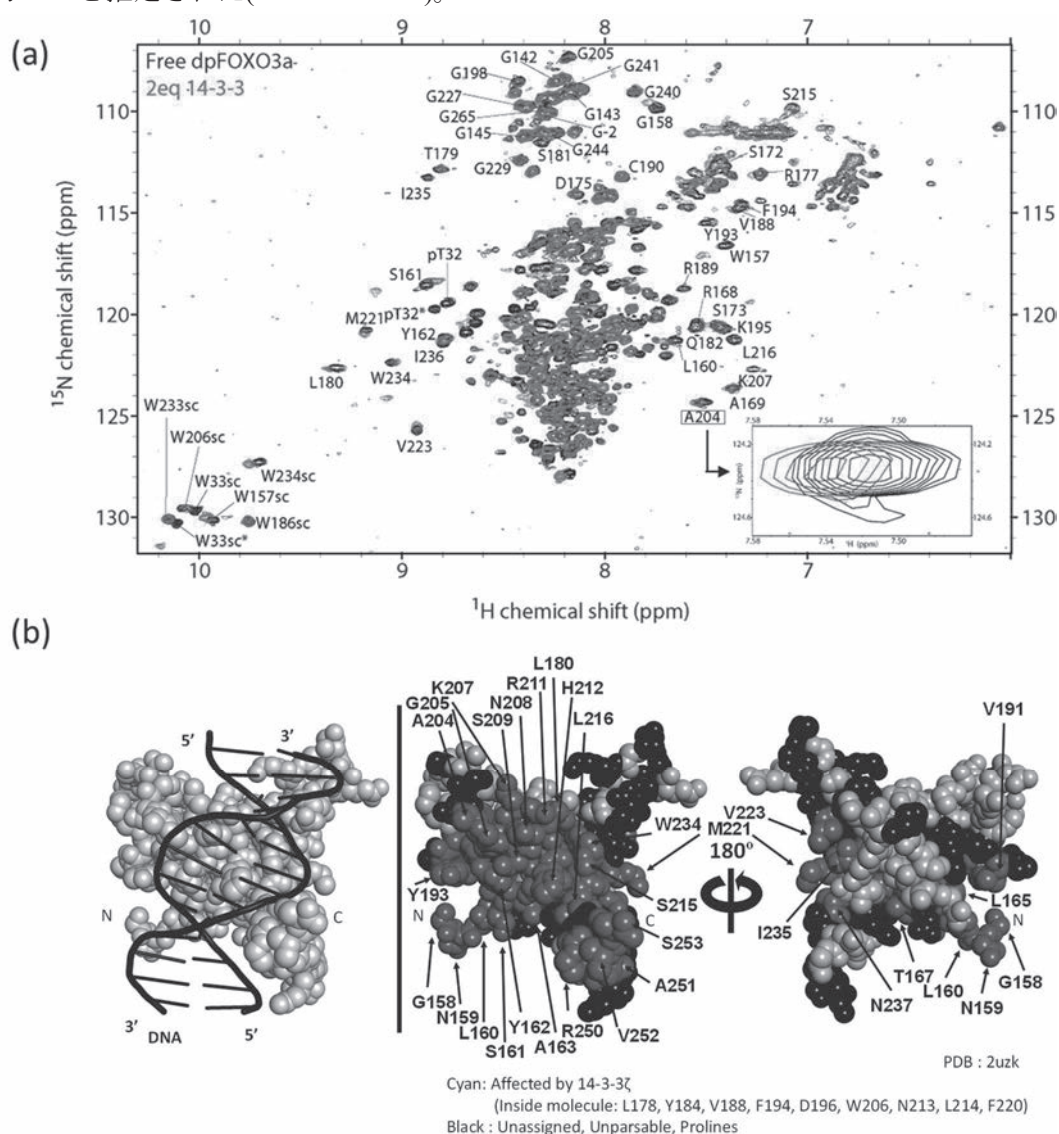


Fig. 4. NMR titration experiments of 14-3-3 ζ into ^2H , ^{15}N -dpFOXO3a

- (a) ^1H - ^{15}N TROSY spectra of dpFOXO3a in the presence and absence of 14-3-3 ζ
- (b) Mapping on the affected residues on the FOXO3a-DBD

$^2\text{H}, ^{15}\text{N}$ 14-3-3 ζ へのdpFOXO3aの滴定実験

14-3-3 ζ 上のdpFOXO3a結合部位を調べるために、 $^2\text{H}, ^{15}\text{N}$ 標識14-3-3 ζ の $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ TROSYのスペクトル変化を指標として、dpFOXO3aの滴定実験を行った。dpFOXO3aを添加に伴い、一部のシグナルにslow exchange regimeでの消失・出現が観測された。これらの残基を14-3-3 ζ の立体構造上にマッピングしたところ、リン酸化モチーフの結合部位である溝の内側だけでなく、その周辺から溝の外側の領域（ヘリックス8と9）に化学シフト変化部位が広がっていた(Fig. 5)。

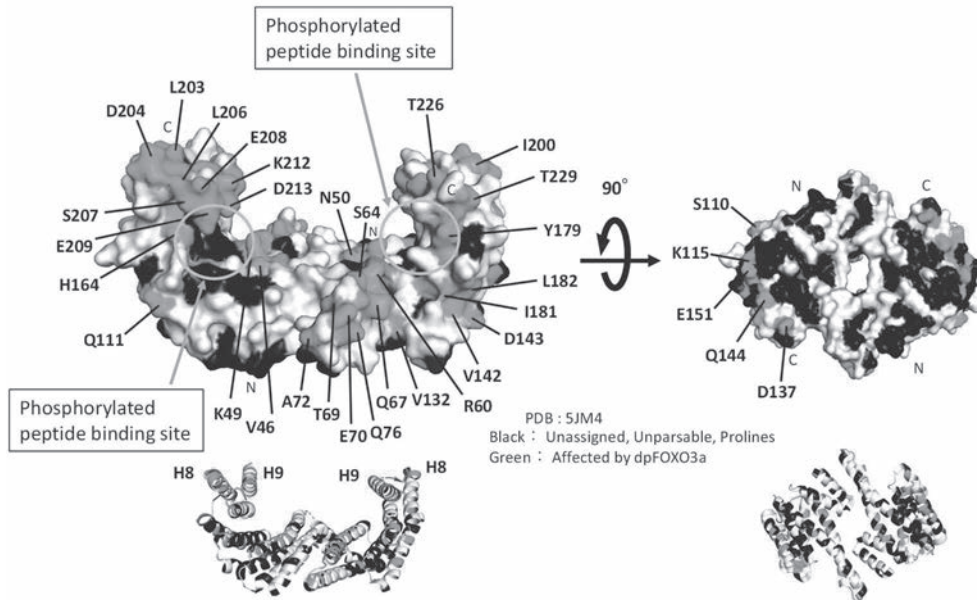


Fig. 5. Mapping of the residues of 14-3-3 ζ affected by dpFOXO3a binding

【考察】

本研究より、dpFOXO3aは、リン酸化モチーフだけでなくDBDのDNA結合界面において14-3-3 ζ のヘリックス8,9と相互作用することが明らかとなり、14-3-3 ζ はこの部位でFOXO3aのDNA結合を競合的に阻害することが示唆された。しかし、dpFOXO3aは標的DNAと14-3-3 ζ の結合親和性は同等であり、かつ、DBDと14-3-3 ζ の結合親和性はDBDとDNAの結合親和性より顕著に低い。それにも関わらず、14-3-3 ζ がdpFOXO3aを標的DNAから競合的に解離させる。我々はそのメカニズムとして、14-3-3 ζ は、dpFOXO3aのDBD両末端側に1個ずつ存在するリン酸化モチーフにより高親和性でつなぎ留められることによってDBD周辺に常に高濃度で存在し、14-3-3 ζ とDBDとの結合が低親和性であってもDNAの競合的な解離を可能とするというモデルを提唱する(Fig. 6)。

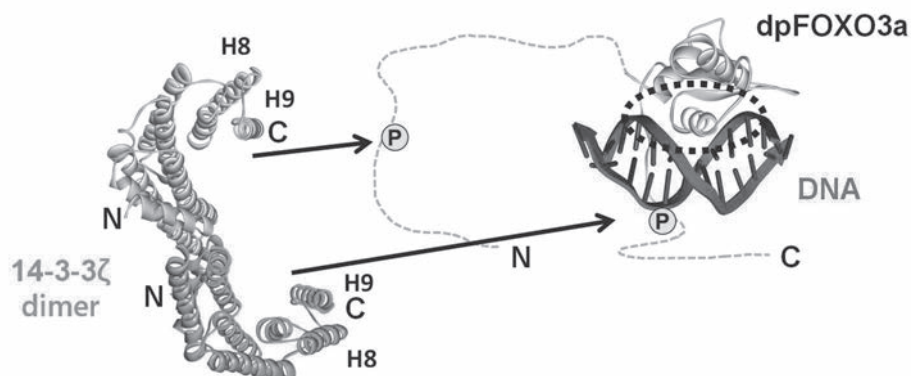


Fig. 6. Proposed model of dpFOXO3a dissociation from DNA by 14-3-3 ζ binding

P43

健全な水循環社会に向けたNMR代謝プロフィールと環境要因のリンク予測

○佐藤莉帆¹, 山田隼嗣², 松本朋子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

Predicting links between NMR metabolic profiles and environmental factors for a healthy water cycle society

○Riho Sato¹, Shunji Yamada², Tomoko Matsumoto², 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 Science, Nagoya University

Marine ecosystems may be affected by various water cycles via human activities, which can be feared to cause eutrophication and lose their biodiversity. However, homeostatic indicators or certain prediction methods for marine ecosystems have not been established yet. In our study, focusing on Tokyo Bay as an example, we try to explore key factors of marine ecosystem homeostasis from NMR metabolic profiles and to predict environmental changes using a Direct method of Linear Non-Gaussian Acyclic Model (DirectLiNGAM) and Random Forest (RF). By evaluating the relationship between material changes in the environmental waters of Tokyo Bay and weather information for the area. We will examine how social activities and environmental conservation should be based on cross-disciplinary linkage prediction.

—背景・目的—

持続可能な社会の実現に向けて、海洋生物多様性と地球環境の変化を将来的に予測し、海洋環境における窒素やリンなど富栄養化および生物多様性の低下を未然に防ぐことはプラネタリーバウンダリーを評価する喫緊の課題である[1]。これまでの研究では、局所的なリンク解析に留まっているのが現状である。核磁気共鳴法(NMR)は、海水や排水などの水環境サンプルの代謝物プロファイリングに利用できる[2,3]。本研究では、グローバルかつローカルな海洋環境と生物多様性の変化予測するために、海水のNMR測定データとオープンデータを活用した気象・海洋の変化を包括的に考慮し、将来的な環境異常と生物多様性の予測、恒常性指標化を目的とする。今回、2017年6月から2018年5月における50日分7項目の気象データと海水をNMR測定して有機物を帰属したデータ86項目を用いて、DirectLiNGAMによる関係性の図示とRFを用いた重要因子の抽出を行った。

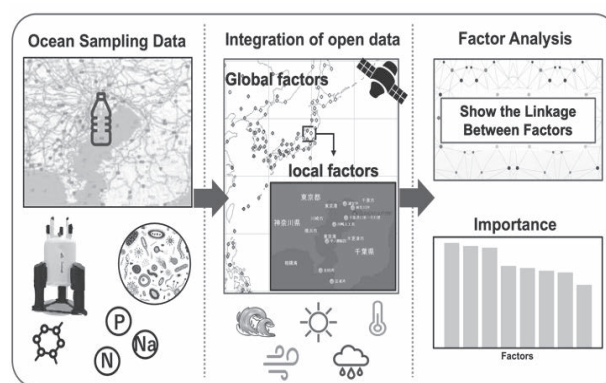


Fig.1. Conceptual diagram

NMR代謝物プロフィール, 東京湾環境水, バイズアプローチ

○さとうりほ, やまだしゅんじ, まつもとともこ, きくちじゅん

—方法—

東京湾環境水として、鶴見区末広町沿岸で採取した2017年6月8日から2018年5月31日までの1年間に採取したサンプルを用いた。NMR測定では、メンブレンフィルターから海中物質・微生物サンプルを調整した[2]。すべての試料はAVANCE II 700 MHz NMR spectrometerを用いて測定した。HSQCと2DJ-respectraを用いて代謝物のアノテーションを行い、SpinAssign29[4]とSpinCouple[5]、およびHMDBデータベース[6]を使用して各ピークの代謝物を帰属した。解析にはDirectLiNGAMとRFを用いた[7]。

—結果と考察—

東京湾で採取されたサンプルについてNMRを用いて測定した全有機物量と7項目の気象データに対し因果の向きを一意に識別するDirectLiNGAMを行った結果、降水量と日照量が全有機物量に対して有意に影響を示した(Fig.2)。特に有機物の増減を時系列で確認したところ、降水量が増加する初夏の時点での全有機物量が増加することが確認された。

この結果を踏まえ、採取された有機物の中でも特に重要なファクターとなっているものを特定するためにRFを用いてImportant Factorの抽出を行った結果、Galの値が最も特徴量としての重要度が大きいことが示された(Fig.3)。次いでメタノールが多く、上位10項目に関してはアミノ酸が大部分を占める結果となった。

両者で得られた結果を総合的に考察すると、全有機物量と降水量および日照量の間には有意な因果関係が見られ、主な有機物はGalやアミノ酸であることが同定された。今後は、時系列に関連した変化、非線形、潜在交絡変数を考慮し、ベイズアプローチについて検討する。

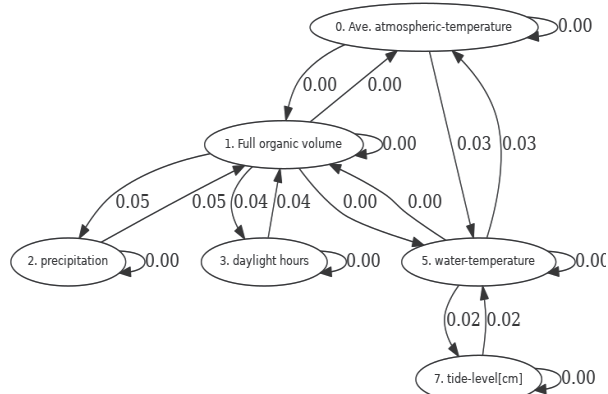


Fig.2. Connection between full organic volume and weather parameters using DirectLiNGAM

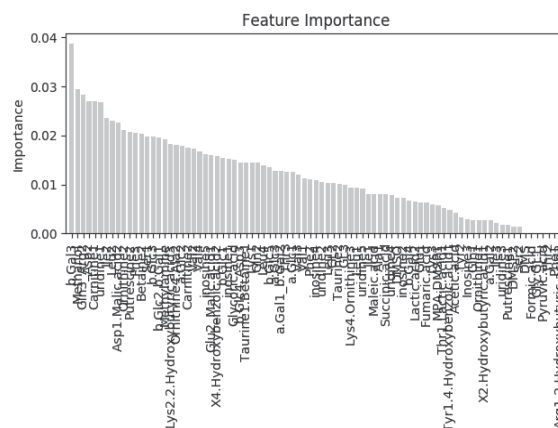


Fig.3. Results of feature importance in full organic volume

References

1. Halpern, B.S. et al. *Nature*, **488**, 615–620 (2012).
2. Yokoyama, D. et al. *ACS Omega*. **7**, 12654–12660 (2022).
3. Oita, A. et al. *Sci. Total Environ.* **636**, 12–19 (2018).
4. Chikayama, E. et al. *Anal. Chem.* **82**, 1653–1658 (2010).
5. Kikuchi, J. et al. *Anal. Chem.* **88**, 659–666 (2016).
6. Wishart, D.S. et al. *Nucleic Acids Res.* **50**, D622–631 (2022).
7. Miyamoto, H. et al. *Sci. Total Environ.* **836**, 155520 (2022).

P44Y

OH信号をもとにしたJ couplingの測定および二面角の計算

○藤村遥¹, 内海博明¹, 笹川拓明¹

¹株式会社JEOL RESONANCE

Measurement of J coupling constants related to the hydroxyl protons and the dihedral angles estimation

○Haruka Fujimura¹, Hiroaki Utsumi¹, Hiroaki Sasakawa¹

¹JEOL RESONANCE Inc.

The hydroxyl proton signals of sucrose are difficult to be detected by the standard NMR measurement condition, however it is known that those are observed in the mixture of water and acetone-d₆ solution at low temperature. Since the conformation of sucrose in aqueous solution is considered to be affected by the hydrogen bond surrounding the hydroxy group, it would be beneficial for structure analysis to investigate its dihedral angle including hydroxy group. In this study, we evaluated the optimal methods for the J coupling constants measurement related to the hydroxyl protons, and estimated the dihedral angles, H-C-O-H and C-C-O-H, from the J coupling constants.

水酸基が含まれる分子の水溶液中の立体構造については、水酸基周りの立体構造の知見が得たいという要求がある。これは溶媒（水）との水素結合等の相互作用により水酸基周辺の立体構造が影響を受けることがあると考えられているからである。通常のNMR測定条件では観測が難しい水酸基の信号であるが、二糖であるスクロース (Fig.1) を水-重アセトン混合溶媒に溶かして低温測定を行うことで、水酸基プロトン信号が観測できることが報告されている¹。水溶液中では、スクロースの水酸基が水と相互作用すると考えられており、水酸基周辺の水素結合が水溶液中のスクロースの立体構造に関与していると推察される。また、観測された水酸基プロトン信号のNOEから核間距離の情報を求めるだけでなく、Jカップリングを読むことにより、水酸基周辺の二面角 (H-C-O-H およびC-C-O-H) が求められることは以前より提案されている。今回、我々は水酸基周辺の二面角 (H-C-O-H およびC-C-O-H) の最適な求め方について、信号の帰属も含め、改めて検討を行った。

サンプルとしては、スクロースを水-重アセトン混合溶媒 (水:重アセトン=2:3) に溶解したものを使用した。プロトンの交換速度を低下させるため、-20°Cの低温条件で水酸基プロトンの観測を行った。その結果、5.3~6.5 ppm付近に水酸基由来と

水酸基, Jカップリング, 二面角

○ふじむらはるか, うつみひろあき, ささかわひろあき

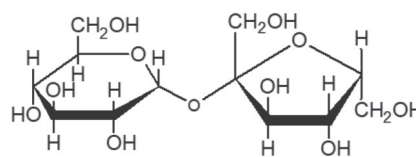


Fig. 1. Sucrose

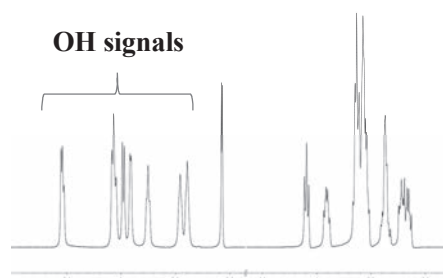


Fig. 2. ¹H spectrum with Perfect Echo WATERGATE

50 mM sucrose in the water and acetone-d₆ solution at -20°C, collected by JNM-ECZL500R.

思われる信号が確認された (Fig.2)。

次にこの測定条件にて新たに観測されたスクロースの信号の帰属を行った。従来、糖の信号の帰属には TOCSY法を用いていることが多い。しかし、本試料では混合溶媒であることと低温条件下での測定のため、線幅が広幅化して信号の重なりが多く、従来のTOCSY法では信号の帰属が困難であった。そこで、スペクトルを単純化するために、Pure shift TOCSY法によってデータを取得した。この手法を用いることで水酸基由来の信号から容易にスクロースの信号の帰属ができた。

Jカップリング値を測定する方法としては、H-C-O-Hの場合はConstant Time DQF-COSY法を使用した。この方法を使用すると、従来のECOSY法よりもシンプルなスペクトルが得られ、容易にJカップリング値 ($^3J_{\text{HCOH}}$) を求めることができた (Fig.3)。一方、C-C-O-Hの場合はCPMG-HSQMBC法を使用し、 $^3J_{\text{CCOH}}$ のロングレンジカップリングの結合定数を求めた。2つの方法により得られたJ結合定数をカープラスの式に照らし合わせ、水酸基周辺の二面角を導き出した²。計算結果から考えられるグルコピラノースの2位のNewman投影図をFig.4に示す。実験条件の検討と様々な測定シーケンスを組み合わせることで、これまで解析が困難と考えられてきた水酸基プロトンを含む二面角に対する知見をNMRにより得ることができた。今後、計算科学との組み合わせにより水溶液中の分子の立体構造の知見がさらに深まることを期待している。

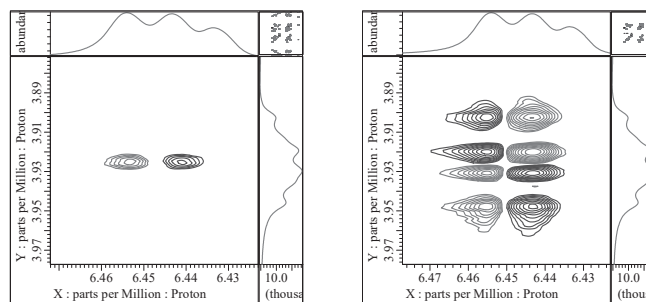


Fig. 3. Constant Time DQF-COSY and ECOSY

These spectra were collected by JNM-ECZL500R.

Constant Time DQF-COSY

x points : 6000, y points : 3000, scans : 16, NUS : 30%

ECOSY

x points : 6000, y points : 3000, scans : 24, NUS : 30%

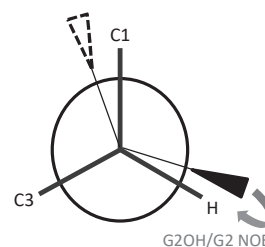


Fig. 4. Newman projection at 2-position of Glucopyranose
NOE correlation between proton and hydroxyl proton at 2-position of Glucopyranose was observed.

References

- (1) Bruce Adams and Laura Lerner (1992)

Observation of Hydroxyl Protons of Sucrose in Aqueous Solution: No Evidence for Persistent Intramolecular Hydrogen Bonds. *J. Am. Chem. Soc.* 114, 4827-4829.

- (2) Hongqui Zhao, et al. (2007)

DFT and NMR Studies of $^2J_{\text{COH}}$, $^3J_{\text{HCOH}}$, and $^3J_{\text{CCOH}}$ Spin-Couplings in Saccharides: C-O Torsional Bias and H-Bonding in Aqueous Solution. *J. Org. Chem.* 72, 7071-7082.

P45

極低温MAS-DNP固体NMRによる多剤結合転写因子QacRの構造分布解析

○田巻初¹, 藤原敏道^{1,2}, 松木陽^{1,2}

1大阪大学・蛋白質研究所

2大阪大学・量子情報・量子生命研究センター

Structural distribution analyses of multidrug-binding transcriptional repressor QacR by ULT MAS-DNP-NMR

○Hajime Tamaki¹, Toshimichi Fujiwara^{1,2}, Yoh Matsuki^{1,2}

¹ Institute for Protein Research, Osaka University

² Center for Quantum Information and Quantum Biology, Osaka University

Structural distribution analyses of proteins are important because conformation ensemble of protein is related to its function mechanism. Ultra-low temperature (ULT) MAS-DNP-NMR has tremendous power for those analyses. However, problems, for example chemical shift calculation accuracy, are remained. Thus, we are developing the techniques using QacR that is a part of multidrug resistance system of *Staphylococcus aureus*. Purpose of this study is revealing structural distribution of QacR derived from its conformational equilibrium between the inductive- and repressive-states by ULT MAS-DNP-NMR. Details those include sample preparation, compounds depending spectral changes and the structural distribution will be discussed.

タンパク質の構造の揺らぎは、タンパク質の機能発揮に重要である。よって、どのようなコンフォメーションをとる分子がどれだけ存在するかを調べる構造分布解析は非常に重要である。構造分布解析において極低温MAS-DNP固体NMRは非常に強力な測定方法であると考えられる。なぜなら試料をヘリウム温度まで冷却することで室温では分子運動により平均化される構造情報をそのまま観測でき、また非常にマイナーなコンフォメーションをDNPにより信号増強して測定できるためである。我々は閉回路ヘリウムガス循環システムによる長期間安定な極低温MASの実現させ、この装置を用いて液-液相分離した α シヌクレインがアミロイド線維化する過程の構造分布変化を捉えることに成功した¹。しかし極低温での化学シフトを室温での測定データを教師データとする既存の化学シフト計算方法では説明しきれない等の問題があり、更なる技術開発が必要である。現在、我々は多剤結合転写因子QacRをモデルとして研究を進めている。

QacRは黄色ブドウ球菌の多剤耐性輸送体遺伝子qacAの転写量を調節するタンパク質である。QacRはリプレッサーでありqacAプロモーターと結合することでその遺伝子発現を抑制し、四級アンモニウム化合物等と結合することで遺伝子発現が誘導される。QacRによる遺伝子発現量調整は、抑制型と誘導型のコンフォメーション平衡のリガンド依存的なバランス変化によって生じる²。抑制型と誘導型ではスイッチングループとよばれる部位の構造が大きく異なるため、QacRは構造分布解析の対象に適している(Fig.1)。本研究の目的はQacRのコンフォメーション平衡がもたらす構造分布を極低温MAS-DNP固体NMRで明らかにすることである。本要旨では極低温MAS-DNP固体NMR測定に向けた試料調製について述べる。

固体NMR, 動的核偏極, コンフォメーション平衡

○たまきはじめ, ふじわらとしみち, まつきよう

実験試料・方法

大腸菌発現系によってHisタグ付加QacR C72A/C141S変異体(以下QacRと表記)の均一 ^{13}C , ^{15}N 標識体を得た。つづいてNiアフィニティおよびサイズ排除クロマトグラフィによってQacRを精製した。固体NMR試料はシッティングドロップ法で微結晶を調製することにより得た。測定にはJEOL RESONANCE ECA-II 600 MHzを用いた。3.2 mmローターを用い、MAS速度は12.5 kHz、サンプル温度は10 °C付近で測定した。

結果・考察

結晶化条件を探索した結果、3 M硫酸アンモニウムを沈殿剤とする条件で再現性良く微結晶が形成されることが確認された。

3 M硫酸アンモニウムを用いて調製した微結晶試料の2D-NCAスペクトルをFig. 2に示した。グリシン残基について4つ程度のピークが確認され、一つのピークを除きC α の化学シフトがランダムコイル値よりも低磁場にシフトしていた。QacRは大部分が α -ヘリックスで構成されており、またループ領域中に一つグリシン残基をもつ。よって得られた微結晶中においてQacRは正しい構造を形成していると考えられる。一方、QacRはグリシン残基を8つもつが観測されたピーク数はそれに満たなかった。これは得られた微結晶中においてQacR主鎖の運動性が部位によって異なることを示唆している。基質を結合していないQacRは抑制型と誘導型の平衡状態にあることから、微結晶中においてもQacRは複数のコンフォメーションをとり、その結果として残基毎に運動性の違いが生じているのではないかと考えられる。

現在、基質結合状態のQacR微結晶調製や極低温MAS-DNP固体NMRでの実験を進めている。それらの詳細は討論会にて発表する予定である。

References

- (1) Takamuku, M. *et al.* (2022) Evolution of α -synuclein conformation ensemble toward amyloid fibril via liquid-liquid phase separation (LLPS) as investigated by dynamic nuclear polarization-enhanced solid-state MAS NMR. *Neurochemistry International* 157, 105345.
- (2) Takeuchi, K., Imai, M., and Shimada, I., (2019) Conformational equilibrium defines the variable induction of the multidrug-binding transcriptional repressor QacR. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116, 19963-19972.

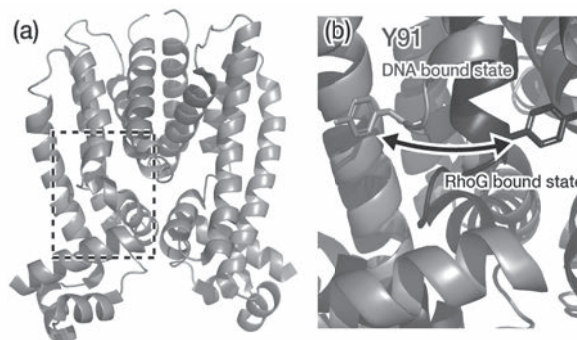


Fig. 1. Crystal structures of QacR.

(a) DNA-bound state structure (PDB ID: 1JT0). (b) Expansion of the switching-loop indicated by the dashed-line box in (a). Light and Dark gray colored structures are DNA and Rho6G bound state (PDB ID: 1JUS), respectively. In both figures, ligands are omitted from the structures for clarity.

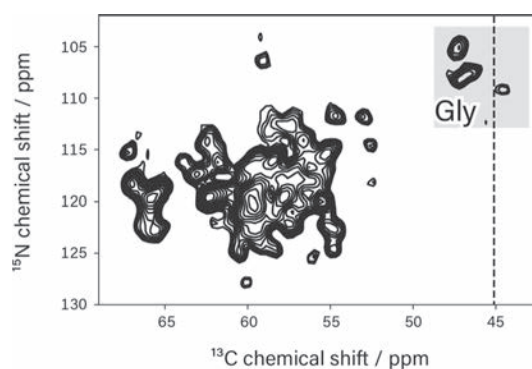


Fig. 2. 2D-NCA spectrum of unligated QacR.

The dashed line indicates random coil chemical shift of Gly $^{13}\text{C}\alpha$.

P46Y

VEGF165に対する人工塩基Dsを含むDNAアプタマーのNMR解析

○長濱友海¹, 染谷龍彦², 坂本泰一¹

1 千葉工業大学・生命科学

2 タグシクス・バイオ株式会社

NMR analysis of DNA aptamers containing artificial base Ds against VEGF165

○Tomomi Nagahama¹, Tatsuhiko Someya², Taiichi Sakamoto¹

¹ Chiba Institute of Technology

² TAGCyx Biotechnologies Inc.

Aptamers are nucleic acid molecules that show high affinity to target molecules, and these can be obtained by the method called SELEX. The aptamers containing artificial base 7-(2-thienyl) imidazo [4,5-b] pyridine (Ds) were reported by Dr. Hirao, and are being developed as aptamer therapeutics (Xenoligo®) by TAGCyx Biotechnologies Inc.. In this study, we performed NMR analysis of the aptamer TAGX-0001_49 that contains Ds. The broadening of Ds signals upon binding to the target protein VEGF165 indicates that Ds is involved in the VEGF165 binding.

【序論】

アプタマーは、Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment (SELEX) 法によって、ランダムな核酸プールの中から標的分子との親和性に基づいて選択することによって得られる核酸分子であり、医薬品の新しいモダリティのひとつとして期待されている。アプタマー医薬品は、抗体医薬品のように標的分子に対して高い親和性と特異性を示すだけでなく、小型化や化学合成が容易であるという利点をもつ。近年、高機能なアプタマーを開発するために、さまざまな人工塩基をアプタマーに組み込むことが試みられている。平尾博士らは、疎水性の人工塩基である7-(2-チエニル)イミダゾ[4,5-b]ピリジン (Ds) を組み込むことで、高親和性のDNAアプタマーの作製に成功し、そのアプタマーは天然塩基からなる核酸プールを用いたSELEX法によって得られたアプタマーに比べて約150倍高い結合力を示すことが報告されている (Fig. 1)^{1,2)}。このアプタマーは、血管内皮増殖因子 (VEGF165) に高い特異性と親和性で結合し、VEGF165とその受容体との結合を阻害する (Fig. 2)。更に、人工塩基であるDsをAに置換することで、VEGF165との結合活性が低下することが明らかとなっている。そこで本研究では、Ds塩基を含むアプタマー (Xenoligo®) が標的タンパク質と高親和性で結合できる要因が疎水性の人工塩基Dsであることを証明するために、Xenoligo® (TAGX-0001_49; Fig. 3) とその標的であるVEGF165との相互作用についてNMR法を用いて解析する。

アプタマー, 人工塩基, VEGF

○ながはまともみ, そめやたつひこ, さかもとたいいち

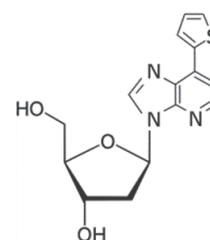


Fig. 1 Chemical structure of Ds

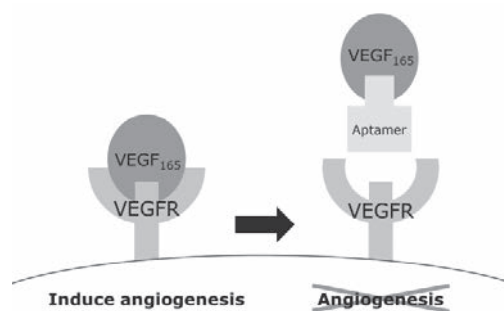


Fig. 2 Inhibition of VEGF165 binding to VEGFR by aptamer

【方法】

Dsを含むTAGX-0001_49とそれを短鎖化したT-00221を化学合成した (Fig. 3) . さらに, T-00221の3つのステムループに相当するオリゴを合成し, T-00221のNMRシグナルの帰属に利用した. VEGF165については, そのヘパリン結合ドメイン (VEGF_HBD) を購入し, TAGX-0001_49との相互作用解析に用いた. 溶媒としてリン酸緩衝生理食塩水 (PBS; 1.1 mM KH₂PO₄, 155 mM NaCl, 3.0 mM Na₂HPO₄, pH 7.4) を用い, 限外ろ過膜を用いて溶媒置換を行った. 600 MHzのNMR分光計 (AVANCE600, Bruker Biospin社) を用い, タンパク質存在下・非存在下中のNOESYスペクトルおよびTOCSYスペクトルを測定した. 測定温度は283 Kあるいは298 Kとした.

【結果および考察】

初めに, TAGX-0001_49のイミノプロトンシグナルを帰属し, VEGF_HBDとの相互作用によるシグナルの変化を解析したところ, T31のシグナルが消失することがわかった. このことから, VEGF_HBDとの結合によりA8:T31の塩基対が不安定化したことが示唆された. さらに, VEGF_HBDとの相互作用をTOCSYスペクトルのシグナル変化により解析した結果, 25番目のDsがほとんど変化しないのに対し, 34番目のDsのシグナルがブロードになった. このことから, Ds34がVEGF_HBDと直接相互作用していることが示唆された. Dsは疎水性が高いことから, TAGX-0001_49のVEGFに対する非常に高い親和性の原因として, 疎水的な相互作用が重要であることが考えられる.

また, TOCSYスペクトルにおいて, C残基のH5/H6のクロスピークについても, 一部のシグナルがVEGF_HBDとの相互作用によってブロードになることが明らかとなった. そこで, シグナルが変化したC残基を明らかにするため, Ds34を含む短鎖化したT-00221 (36残基) を用いて, 非易動性プロトンのシグナルを連鎖帰属した. その結果, A40とG44以外の残基のH8, H6, H5およびH1'に由来するシグナルを帰属することができた. 得られた情報を基にTAGX-0001_49にVEGF_HBDを加えた際にブロードになったC残基のH5/H6のクロスピークは, C35, C36, C37由来のシグナルであることがわかった. 以上のことから, Ds34からステムIIIの近傍にVEGF_HBDが結合することが示唆された.

References

- (1) Kimoto M. *et al.* (2013) Generation of high-affinity DNA aptamers using an expanded genetic alphabet. *Nature Biotechnology* **31**, 453-457
- (2) Kimoto M. *et al.* (2016) Post-ExSELEX stabilization of an unnatural-base DNA aptamer targeting VEGF165 toward pharmaceutical applications. *Nucleic Acids Research* **44**, 7487-7494

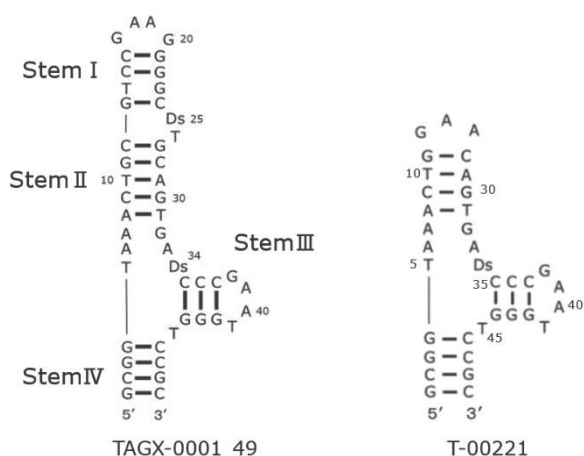


Fig. 3 Secondary structure of the aptamers

P47

固体NMRを用いたアミロイドベータアイソフォームの相互作用の解析

○親泊遼¹, 松田勇¹, 神原孝之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 生命機能科学研究センター

Analysis of amyloid-beta isoform interactions using solid-state NMR

○Ryo Oyadomari¹, Isamu Matsuda¹, Takayuki Kamihara¹, Takaya Ishiguro¹, and Yoshitaka Ishii^{1,2}

¹ Department of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology, Yokohama, Japan

² Advanced NMR Development & Application Team, BDR Center, RIKEN, Yokohama, Japan

Misfolded β -amyloid ($A\beta$) is a peptide that is believed to prompt the onset of Alzheimer's disease (AD). There are two main isoforms in the human brain, 40-residue $A\beta_{40}$ and 42-residue $A\beta_{42}$. Because $A\beta_{42}$ has higher propensity to form amyloid fibril than $A\beta_{40}$ and because misfolding of $A\beta_{42}$ is widely believed to trigger AD, $A\beta_{42}$ fibrils and $A\beta_{40}$ monomers are likely to coexist in the brain at an early stage of AD. In this study, we focused on the interaction between $A\beta_{40}$ monomer and $A\beta_{42}$ fibril and analyzed it using solid-state NMR (SSNMR). We performed SSNMR analysis on samples obtained by incubating ¹³C isotope-labeled $A\beta_{40}$ monomers with unlabeled $A\beta_{42}$ fibers. The results showed that SSNMR analysis can detect structure changes and β -sheet formation of $A\beta_{40}$ upon interaction with $A\beta_{42}$ fibrils.

アミロイドベータ($A\beta$)は主に40–43残基のアミノ酸からなるペプチドで、脳内で異常凝集し線維化することでアルツハイマー病(AD)の原因となると考えられている。脳内には主に40残基の $A\beta_{40}$ と、C末端に2残基を追加した42残基の $A\beta_{42}$ の2つのアイソフォームが存在し、それぞれが異常凝集してできたアミロイド線維の構造は大きく異なることが固体NMRによる解析で示されている^{1,2}。in vitroの実験では $A\beta_{42}$ は $A\beta_{40}$ に比べて線維化が速く、 $A\beta_{40}$ ではなく $A\beta_{42}$ の脳内での凝集がADのリスクファクターと位置づけられているため、初期のADでは $A\beta_{42}$ 線維と $A\beta_{40}$ モノマーが脳内で共存していると考えられる。

$A\beta$ のモノマーが線維を形成する過程では、モノマーからオリゴマーの状態を経過するため、線維形成までに数時間のラグタイムが発生することが、アミロイド線維と選択的に結合し蛍光を発するThioflavinT (ThT)を用いた実験で報告されている。A β モノマーと同種のA β 線維の断片(シード)が混在するとき、ラグタイム無しに線維化を促進することがin vitroの実験によって示されている³。しかし、S字状の分子構造を形成する $A\beta_{42}$ 線維と $A\beta_{40}$ モノマーの共存下では、 $A\beta_{42}$ 線維は $A\beta_{40}$ モノマーの線維化を促進しないと報告されている^{4,5}。 $A\beta_{42}$ 線維と $A\beta_{40}$ の線維の分子構造が異なることが、異なるアイソフォーム間でのクロスシーディングが起こらない原因とされている。そこで本研究では、 $A\beta_{40}$ モノマーと $A\beta_{42}$ 線維の相互作用に着目し、 $A\beta_{42}$ 線維と混合された $A\beta_{40}$ の構造の変化を固体NMRを用いて調べた。

ベータアミロイド

○おやどまりりょう、まつだいさむ、かみはらたかゆき、いしぐろたかや、いしいよしたか

A β 42を化学的に合成し、リン酸ナトリウム緩衝液に溶解させA β モノマー溶液を調製した。A β 42モノマー溶液を室温で回転攪拌することでインキュベーションし、線維化させた後、超音波処理により断片化した。この同位体ラベルしていないA β 42線維断片をシードとして¹³C同位体ラベルしたA β 40モノマー溶液に加え、A β 40が自己集積する前の反応開始1時間後のサンプルを遠心分離により処理して沈殿を回収した。この遠心分離の条件では線維のみが回収されるので、ここで回収されたA β 40サンプルはA β 42線維断片と相互作用していると考えられる。また、A β 40モノマーと相互作用させたために使用したA β 42線維との構造の比較を行うため、¹³C標識したA β 42モノマー溶液に10%の割合でA β 42線維のシードを加え、3日以上経過したサンプルを遠心分離により回収した。線維化の過程は、ThTを用いて記録した。回収したサンプルはJEOL 1 mm試料管に詰め、固体NMRを用いた2次元 ¹³C-¹³C RFDR測定を行った。また固体NMRによる解析では、A β 40モノマーがA β 40線維を形成したものとは異なるクロスピークが確認された。このことからA β 40とA β 42の間で相互作用が起これ、構造変化したことが示唆される。詳細な作用機構については、当日の発表で議論を行う。

References

- (1) A. T. Petkova *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 16742–16747 (2002).
- (2) Y. Xiao *et al.*, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **22**, 499–505 (2015).
- (3) A. T. Petkova *et al.*, *Science*, **307**, 262–265 (2005).
- (4) B. K. Yoo *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **140**, 2781–2784 (2018).
- (5) 石黒ら、第58回NMR討論会、P60 (2019).

P48Y

分子込み合い環境下におけるDNA三重鎖構造の塩基対の開閉ダイナミクスの緩和分散法を用いた解析

○阪本知樹^{1,2}, 山置佑大^{1,2}, 永田崇^{1,2}, 片平正人^{1,2}

¹京都大学・エネルギー理工学研究所

²京都大学・大学院エネルギー科学研究科

Analysis of base pair opening/closing dynamics of DNA triplex structure under molecular crowding environment using relaxation dispersion experiments

○Tomoki Sakamoto^{1,2}, Yudai Yamaoki^{1,2}, Takashi Nagata^{1,2}, Masato Katahira^{1,2}

¹ Institute of Advanced Energy, Kyoto University

² Graduate School of Energy Science, Kyoto University

The formation of DNA triplex structure is reportedly involved in Friedreich's ataxia. Inside the living cell is a molecular crowding environment and the behavior of DNA in such environments is thought to be different from that in dilute solution environments. In this study, we conducted the imino proton-water proton exchange experiment and R1ρ relaxation dispersion experiment to investigate the dynamics of DNA triplex structure in the cell-mimicking environments reconstructed by crowding reagents, Ficoll 70 and PEG 200. The obtained imino proton exchange rates indicated that the base pairs in triplex structure are stabilized by Ficoll 70, and are destabilized by PEG 200. The R1ρ relaxation dispersion experiment suggested that the base pair opening and closing dynamics of DNA triplex structure in a molecular crowding environment is indeed different from that in a dilute solution environment. Our study may contribute to an understanding of the stability and dynamics of triplex structure in the molecular crowding environment such as inside the living cells.

DNAの形成する三重鎖構造は、がんに関連する遺伝子の転写やフリードライヒ運動失調症の発症メカニズムに関与することが報告されており、DNA三重鎖構造を標的とした創薬が期待されている。遺伝子発現制御においては、DNA二重鎖構造の塩基対の開閉ダイナミクスが重要な役割を果たすことが報告されており、そのタイムスケールはミリ秒からマイクロ秒である。

細胞内は分子込み合い環境である。このように希薄溶液とは物理化学的条件の異なる自然環境がDNA三重鎖構造に与える影響を調べるために、種々の親水性高分子を分子込み合い試薬(クラウダー)として利用した細胞内環境模倣系が利用されている。

UVやCDを用いた解析により、細胞内環境模倣系においてはDNA三重鎖構造の熱安定性が希薄溶液環境下とは異なることが報告されている¹。しかし、これらの解析からは塩基対分解能での安定性やミリ秒からマイクロ秒の構造ダイナミクスに与える影響については情報が得られていない。本研究では、NMRを用いて、細胞内環境模倣系におけるDNA三重鎖構造の塩基対分解能の安定性及びミリ秒からマイクロ秒の構造ダイナミクスを明らかにすることで、細胞内の分子込み合い環境がDNA三重鎖構造に与える影響に関する知見を得ることを目的とした。

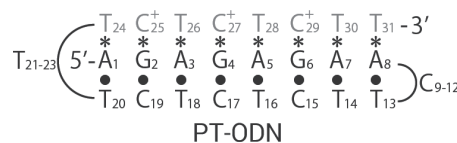


Fig. 1. The sequence and secondary structure of PT-ODN.

核酸, 分子込み合い環境, 緩和分散法

○さかもとともき, やまおきゆうだい, ながたたかし, かたひらまさと

本研究では、*in vitro*及び細胞内²で平行型のDNA三重鎖構造を形成することが報告されているオリゴDNA(PT-ODN) (Fig. 1)を用いた。細胞内環境模倣系の構築にはクラウドーとして一般的に用いられるFicoll 70 およびPEG 200を用いた。各NMR測定においては、核酸の塩基対の状態を敏感に反映するイミノプロトン領域に注目した。

まず、クラウドーがDNA三重鎖構造に及ぼす影響を調べるために、15 v/v%クラウドー存在下および非存在下におけるPT-ODNの1D ¹H NMRスペクトルを比較した。いずれの条件下においても構造の末端部分に対応するシグナルを除いてスペクトルパターンがよく一致していることから、Ficoll 70またはPEG 200存在条件下においても、クラウドー非存在条件下とよく似た平行型三重鎖構造(Fig. 1)が形成されていることがわかった。

次に、DNA三重鎖構造の各塩基対の安定性を評価するために、イミノプロトンと溶媒の水プロトンとの交換速度(k_{1H})の解析を行った。閉じた塩基対中で水素結合を形成しているイミノプロトンは水との交換が抑えられているが、塩基対が開いた状態からは容易に水との交換が生じる。そのため、 k_{1H} は塩基対の安定性を反映する。Ficoll 70及びPEG 200存在下における k_{1H} を得ることに成功した(Fig. 2)。ほぼ全ての塩基対について、クラウドー非存在下に比べてFicoll 70存在下では、 k_{1H} が減少し、PEG 200存在下では k_{1H} が増加した。このことから、平行型DNA三重鎖構造の多くの塩基対は、クラウドー非存在条件下に比べてFicoll 70の添加によって安定化し、PEG 200の添加によって不安定化することが示唆された。この傾向はUVを用いた変性温度(T_m)解析の傾向とも一致した。これらの結果は以下のように考えられる：(1) 親水性高分子であるFicoll 70は排除体積効果を増強し、その結果三重鎖構造が安定化する。(2) 親水性低分子であるPEG 200はDNAに近接し、DNAの水和殻に影響を及ぼすことで三重鎖構造を不安定化する。

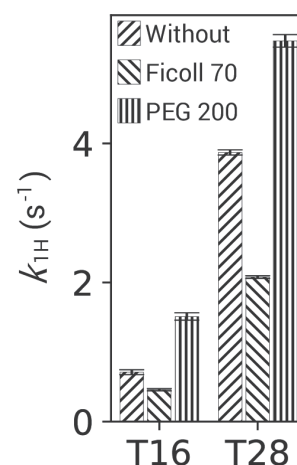


Fig. 2. The representative k_{1H} values for PT-ODN in the absence and presence of either 15 v/v% Ficoll 70 or PEG 200.

次に、クラウドー存在下におけるDNA三重鎖構造のミリ秒からマイクロ秒の構造ダイナミクス、即ち塩基対の開閉頻度に関する情報を得るために、1D ¹H R1 ρ 緩和分散測定を行い、構造変化の速度定数 k_{ex} ($= k_{open} + k_{close}$)を求めた。ここで、 k_{open} は塩基対が開く際の、 k_{close} は塩基対が閉じる際の速度定数を表している。クラウドー非存在条件下およびFicoll 70またはPEG 200存在下において、PT-ODNの平行型DNA三重鎖構造の k_{ex} 値を得ることに成功した。この結果、Ficoll 70及びPEG 200存在条件下においては、クラウドー非存在下と比較して k_{ex} 値が異なることが分かった。この結果は、Ficoll 70及びPEG 200存在条件下においては、平行型DNA三重鎖構造の塩基対の開閉ダイナミクスがクラウドー非存在下とは異なることを示唆している。

本研究では分子込み合い環境下におけるDNA三重鎖構造の塩基対分解能での安定性、ダイナミクスを明らかにするためにクラウドーを利用した細胞内環境模倣系を用いて種々のNMR測定を行った。クラウドーの添加は、DNA三重鎖の構造そのものには大きな影響は与えない一方で塩基対の安定性およびその開閉頻度に影響を与えることが示唆された。これらの結果は細胞内の分子込み合い環境がDNA三重鎖構造に与える影響について理解することに役立つと期待される。

References

- (1) S. Nakano, D. Miyoshi, N. Sugimoto, *Chem. Rev.*, **114**, 2733-2758, 2014
- (2) T. Sakamoto, Y. Yudai, T. Nagata, M. Katahira, *Chem. Commun.*, **57**, 6364-6367, 2021

P49

In-cell NMRによるlinear diubiquitinの*in-situ*立体構造解析

○屋部祥大¹, 田岸亮馬¹, 鴨志田一¹, 美川 務², 猪股晃介¹, 池谷鉄兵¹,
伊藤 隆¹

¹東京都立大学・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

In-situ structure determination of linear diubiquitin by in-cell NMR spectroscopy

○Yoshihiro Yabu¹, Ryoma Tagishi¹, Hajime Kamoshida¹, Tsutomu Mikawa², Kousuke Inomata¹,
Teppei Ikeya¹, and Yutaka Ito¹

¹Department of Chemistry, Tokyo Metropolitan University

²RIKEN Center for Biosystems Dynamics Research

Linear polyubiquitin, in which the carboxyl group of a ubiquitin monomer (Ub) is covalently bound to the α -amino group of another Ub, contributes specifically to the regulation of the NF- κ B pathway that is crucial for inflammation and immune regulation [1]. The 3D structure and dynamics of linear-polyubiquitin may be important for the regulation of a wide range of NF- κ B signalling. X-ray crystallography of linear-diUb, in which two Ub domains are connected between the C- and N-terminus, has demonstrated two different states: closed and opened forms upon relative distances of two Ub domains [2,3,4]. On the other hand, FRET, SAXS, and MD analyses of linear-diUb in solution have reported a semi-close state that is different from the closed and opened states in crystal [5,6], and solution NMR suggested that linear-diUb is in a conformational equilibrium between the open and semi-close forms. In this study, we show the 3D structure of linear-diUb *in situ* by applying in-cell NMR techniques with PREs and PCSs and multi-state structure calculation.

【序論】 ヒトlinear diubiquitin (linear-diUb)は, ubiquitin蛋白質 (Ub, 76アミノ酸残基)が直鎖状に2分子連なった構造を持ち,マルチドメイン蛋白質ととらえることができる. Ubが直鎖状に複数個連なったlinear polyubiquitinは, 炎症や免疫制御に重要なNF- κ B経路の制御に特異的に寄与していることが明らかになっている[1]. 広範なNF- κ Bシグナル制御に関わるlinear polyUbの分子認識機構には, linear polyUbの立体構造やダイナミクスが寄与していると考えられている. しかし, linear-diUbのX線結晶構造解析からは, Ubドメインが近接したclose型と離れたopen型の2状態が[2,3,4], 溶液中におけるFRETやSAXS, MDを用いた解析では, 結晶構造とは異なるsemi-close型が報告されている[5,6]. また, 希薄溶液下でのNMR解析では, open型とsemi-close型のコンフォメーション平衡が示唆された. 一方で, 細胞内におけるマルチドメイン蛋白質のドメイン配向構造や, そのダイナミクスを原子分解能で解析した例はほとんど報告されていない. そこで本研究では, in-cell NMR解析から, 細胞内環境でのlinear-diUbのドメイン間相対配置を決定し, 希薄溶液中と細胞内環境下でのドメイン配向の差異を明らかにすることを目標とした. 細胞内ドメイン間相対配置の決定には, 主にPseudo-contact Shift (PCS)とParamagnetic Relaxation Enhancement (PRE)を構造情報として用い, 複数コンフォメーションを仮定したmulti-state立体構造計算を採用することにした.

In-cell NMR, 常磁性NMR, 蛋白質の立体構造

○やぶよしひろ, たぎしりょうま, かもしだはじめ, みかわつとむ, いのまたこうすけ, いけやてっぺい,
いとうゆたか

【実験】 常磁性金属タグとの結合のためにCys残基を新たに導入したlinear-diUb(S133C)を調製した. 大腸菌内発現系を用いて調製した ^{15}N 標識体を, SLO法によりヒト培養細胞HeLaに導入し, 2D ^1H - ^{15}N SOFAST-HMQCスペクトルを測定することで, in-cell NMR解析のための条件検討を行った. 次に, 常磁性金属結合タグの常磁性効果の強さの評価と, 反応性の検討のために, DO3MA-3BrPyと4PhSO₂-PyMTAをそれぞれlinear-diUbと反応させて性能を比較した.

【結果と考察】 In-cell NMR実験については, 電気穿孔法によるヒト培養細胞(HeLa細胞)へのlinear-diUbの導入に成功し, 細胞内環境でのlinear-diUbスペクトルの高感度観測に初めて成功した(Fig.1). このin-cell NMRスペクトルを希薄溶液中でのスペクトルと比較すると, 希薄溶液中とは異なる新たなピークやピークのシフト変化が主に6つのアミノ酸(K6, A46, H68, K82, A122, H144)で観測された(Fig.2). それらの変化の一部がUbの相互作用部位として知られる領域に存在する残基と一致していたことから, linear-diUbは細胞内でUb結合蛋白質と特異的相互作用していることが示唆された.

常磁性金属結合タグの検討の結果, 反応性の高く, 強いPCS値の得られた4PhSO₂-PyMTAが, in vitroとin-cellの解析に適していると判断した. 現在は4PhSO₂-PyMTAを用いてLn³⁺を導入した試料を用いて, 細胞内PCSとPREを取得する実験を進めている. 得られたPCSおよびPRE情報から, 細胞内環境でのドメイン間相対配置の決定を目指す. さらに, PCSおよびPRE情報を用いたmulti-state立体構造計算法により, 溶液中および細胞内でのドメイン間相対配置の多様な構造を可視化する. これにより, 生理的条件下により近い環境でのlinear-diUbの構造とダイナミクスを明らかにし, 細胞内でのその分子機構を解明することを目指す.

【参考文献】

[1] Tokunaga, F., *J. Biochem.* **154**, 313-323 (2013); [2] Rohaim, A. et al., *Acta. Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **68**, 102-108 (2012); [3] Thach, T.T. et al., *Acta. Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **72**, 524-535 (2016); [4] Komander, D. et al., *EMBO. Rep.* **10**, 466-473 (2009); [5] Ye, Y. et al., *Nature* **492**, 266-270 (2012); [6] Jussupow, A. et al., *Sci. Adv.* **6**, eabc3786 (2020).

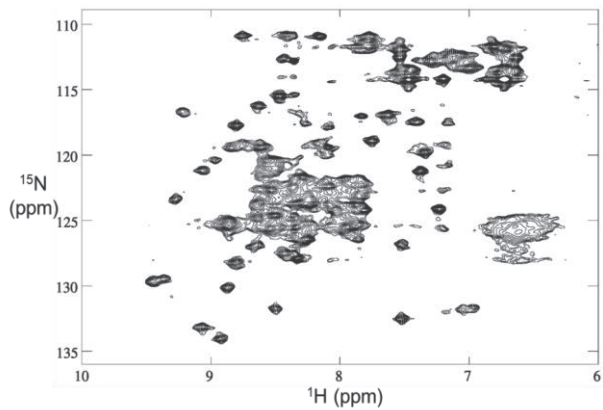


Fig.1 ^1H - ^{15}N SOFAST-HMQC spectrum of ^{15}N -labelled linear-diUb in HeLa cells.

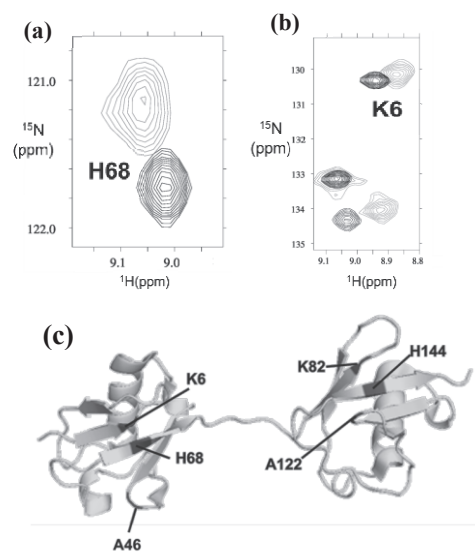


Fig.2 (a) and (b), some ^1H - ^{15}N correlation peaks exhibiting apparent chemical shift differences between *in vitro* (black) and *in cells* (grey). (c), residues showing distinct chemical shift changes (black) mapped onto a ribbon model of the crystal structure of linear diUb (2W9N).

P50Y

化学シフトから推定するヘリックス形成割合

○柳田侑樹¹, 吉田清美², 藤原和夫^{1,2}, 池口雅道^{1,2}

¹創価大学大学院 理工学研究科 生命理学専攻

²創価大学大学院 工学研究科 生命情報工学専攻

Helical structure populations estimated from chemical shifts

○Yuuki Yanagida¹, Kiyomi Yoshida¹, Kazuo Fujiwara¹, Masamichi Ikeguchi¹

¹Department of Biosciences, Graduate School of Science and Engineering, Soka University

²Department of Bioinformatics, Graduate School of Engineering, Soka University

CHIBLΔF is a fragment of β-lactoglobulin corresponding to the residues 97-142. It has a disulfide bond (Cys106-Cys119) and forms α-helices in 98-107 and 114-135 regions. It has been shown that the helices are destabilized when the disulfide bond is cleaved. From this result, we assumed that the loop formation by a disulfide bond reduces the number of conformations that can be taken by the peptide chain in the loop and facilitates the nucleation of the α-helix. To confirm this hypothesis, we constructed three derivatives of CHIBLΔF in which one, three, seven Gly residue(s) was(were) inserted between the residue 109 and 110. We calculated the fractional populations of α-helices formed in these model peptides from secondary chemical shifts. The results showed that the fractional populations decreased with increasing the number of inserted residues and supported our hypothesis.

Introduction

ウマβ-ラクトグロブリンは酸性pH, 塩非存在下において、二次構造を持ちながら、三次構造の崩壊した中間的な変性状態を形成する。その中間状態において、非天然のαヘリックスを形成している領域をCHIBL (core of the helical intermediate of β-lactoglobulin) と名づけた[1]。CHIBLよりF-strand領域を欠失させたCHIBLΔFは、ジスルフィド結合 (Cys106-Cys119)を持ち、98-107と114-135領域にαヘリックスを形成していることが示された[2]。また、これまでに、1)ジスルフィド結合が切断されるとヘリックス含量が減少すること、2)97-110領域と111-138領域に対応する短いペプチド断片はいずれもヘリックスを形成しないこと、3)この2つの断片をジスルフィド結合で連結してもヘリックスは形成されないことが示されている

[2]。これらの結果から、ジスルフィド結合によってループが形成されると、ループ内のペプチド鎖が取りうるコンフォメーション数が減り、ヘリックスの核形成が促進されると考えた。

この仮説を確かめるために、CHIBLΔF (ここではG0と呼ぶ)の残基109と110の間にそれぞれ1つ、3つ、7つのGly残基を挿入した3つの変異体 (G1、G3、G7)を作製し、円二色性(CD)スペクトルを測定した。NMRの結果から二次化学シフトを算出、フォールディング中間体のモデルペプチドに形成されるαヘリックスの形成割合をいくつかの化学シフトから推定する方法で計算し、比較を行った。

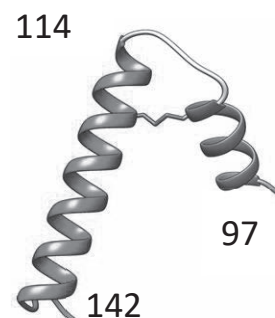


Fig.1 CHIBLΔF

αヘリックス, 二次化学シフト, ジスルフィド結合

○やなぎだゆうき, よしだきよみ, ふじわらかずお, いけぐちまさみち

Methods

G0, G1, G3, G7について190-250 nmのCDスペクトルを測定した。また222 nmで熱転移を測定した。また安定同位体標識をしたサンプルでNMR測定を12°Cで行った。主鎖のアサイメントをするために ^1H - ^{15}N HSQC, HNC(O), HN(CA)CO, CBCA(CO)NH, HNCACB, HBHA(CO)NH, HBHANHスペクトルを測定した。1次シフトに6残基の直鎖状ペプチドの化学シフト[3]を用いて、 $^1\text{H}\alpha$ 、 $^{13}\text{C}\beta$ 、 $^{13}\text{C}\alpha$ 、 $^{13}\text{C}\text{O}$ の2次シフトを算出した。また、 $^1\text{H}\alpha$ 、 $^{13}\text{C}\beta$ 、 $^{13}\text{C}\alpha$ 、 $^{13}\text{C}\text{O}$ 、N、HNの化学シフトをから、 $\delta 2\text{D}$ [4]、ncSCP[5]を用いて二次構造の形成割合を算出した。

Results and Discussion

CDスペクトルの結果 (Fig.2)から挿入するGlyの数が増えるにしたがってヘリックス量が減少していることが確認できた。この結果から、ループ内の残基数が増えると可能なコンフォメーション数が増加し、ヘリックスの核形成確率が低下するという考えに一致した。また、NMRの二次化学シフトの結果から、ヘリックス領域は同一であることが示され、概ね挿入するGlyの数を増やすごとにシフトする量が減少したことが確認できた。

$\delta 2\text{D}$ と ncSCP により算出したヘリックス形成割合 (Fig.3 ,Fig.4)を確認すると、どちらもGlyを挿入したことでループの中でのヘリックスの核形成がしにくくなったこと、Glyを挿入した周囲のヘリックス量が特に大きく減ったが、Glyを挿入した周囲だけが崩壊する、あるいは片側のヘリックスのみが崩壊するのではなく、全体的にヘリックスの形成割合が下がるということが確認できた。従って、Glyを挿入してループ領域を延長したことによってヘリックス末端の自由度が増えたことでヘリックスの核形成がしにくくなったため、ヘリックスをとる分子数が減ったと考えられる。

本研究の結果は、ループの形成によりループ内のペプチド鎖が取りうるコンフォメーション数が減少しヘリックスの核形成が促進される、という仮説を定性的には支持するものであった。CDスペクトルの温度依存性(熱転移)とも比較しながら、ヘリックス形成割合の定量性について議論する予定である。

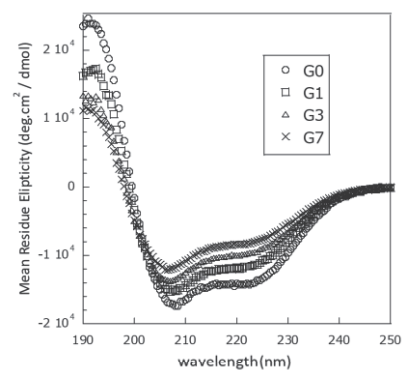


Fig.2 CD spectra

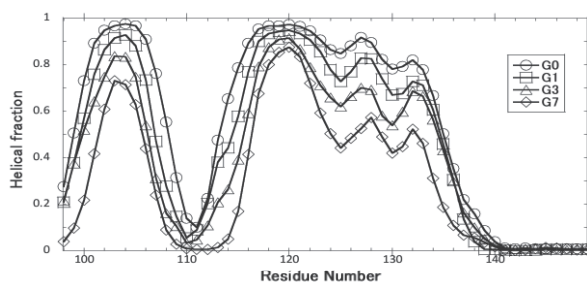


Fig. 3 Helical fraction ($\delta 2\text{D}$)

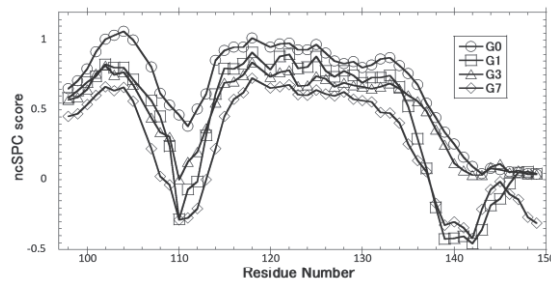


Fig. 4 ncSCP score

References

- [1] Nakagawa, K., Yamada, Y., Fujiwara, K., and Ikeguchi, M. (2007) *J. Mol. Biol.* 367, 1205-1214
- [2] Yamamoto, M., Nakagawa, K., Fujiwara, K., Shimizu, A., and Ikeguchi, M. (2011) *Biochemistry* 50, 10590-10597
- [3] Wishart, D. S., Bigam, C. G., Holm, A., Hodges, R. S., and Sykes, B. D. (1995) *J. Biomol. NMR* 5, 67-81
- [4] Camilloni, C., De Simon, A., Vranken, F., and Vendruscolo, M. (2012) *Biochemistry* 51, 2224-2231
- [5] Tamiloa, K., & Mulder, F. A. A. (2012) *Biochem. Soc. Trans.*, 40, 1014-1020

P51

高圧NMR法によるトランスサイレチンの圧力変性の解析

○粕谷 尚央¹, 山本 京香¹, 赤坂 一之², 金折 賢二¹

1 京都工芸繊維大学大学院・機能物質化学専攻

2 けいはんな文化学会

The analysis of pressure denaturation of transthyretin by high-pressure NMR

○Naohiro Kasuya¹, Kyoka Yamamoto¹, Kazuyuki Akasaka², Kenji Kanaori¹

1 *Department of Functional Chemistry, Kyoto Institute of Technology*

2 *Keihanna Academy of Science and Culture*

Transthyretin (TTR) is a 55 kDa tetrameric protein consisting of 127 amino acid residues. TTR functions as a carrier for holoretinol-binding protein and thyroxine in blood and cerebrospinal fluid. The tetrameric structure dissociates into monomers which aggregate and form amyloid fibrils. The amyloid fibrils are deposited in nerves and organs to cause familial amyloid polyneuropathic disease. The TTR mutant whose Val³⁰ is substituted by Met (V30M) is the most common hereditary mutation. In this study, we analyzed thermodynamic parameters of wild-type TTR and V30M mutant with high-pressure NMR measurements and examined the temperature dependence of ΔG and ΔV of the dissociation to the monomers.

【緒言】

トランスサイレチン (TTR) は127残基のアミノ酸からなる55 kDaの四量体タンパク質で、血液及び脳脊髄液中のホロレチノール結合タンパク質とチロキシンの担体として機能する。TTRに遺伝性変異が起こると、その四量体構造は不安定化されて単量体への解離が促進される。解離した単量体や二量体の凝集体はさらに凝集することでアミロイド線維となり、それが神経や臓器に沈着するとアルツハイマー病などの家族性アミロイド多発性神経障害疾患を発症させる。TTRの遺伝性変異に、アミノ酸配列のうち30番目のValがMetに変異したV30M変異型 (V30M) がある。これは、多くの末梢神経に同時に機能不全を引き起こす多発性神経障害に関連する、最も一般的な遺伝性変異である。野生型TTR (WT) とV30MのX線結晶解析 (Figure 1) では、両者の構造の間には極めて微妙な違いしか報告されておらず⁽¹⁾、静的な構造研究のみでは遺伝性変異の病理解明に繋がるTTRアミロイドーシスの分子メカニズムを理解することはできない。一方、高圧NMR法によ



Figure 1: X-ray structure of wild type TTR.

って、圧力変性の熱力学パラメーターがWTとV30Mで異なることがこれまでに報告されている⁽²⁾。圧力を印加した条件下での変性反応を解析することによって、さまざまな変異体TTRの単量体への解離メカニズムの違いを明確化できる可能性がある。本研究では、遺伝子組替によって得られた野生型と変異型TTRについて、温度を変化させて高圧NMRスペクトルを測定し、得られた圧力変性のスペクトル変化から ΔG および ΔV の温度依存性を再検討した。

トランスサイレチン, 高圧NMR

○かすや なおひろ, やまもと きょうか, あかさか かずゆき, かなおり けんじ

【実験】

TTRを20 mM Tris buffer (pH 7, 90 % H₂O/10 % D₂O)に溶解した。高圧NMR測定にはBruker AV-600を使用し、圧力は0.1~250 MPaの間で変化させた。各圧力における ΔG は、Origin (Light stone) を使用して圧力依存的に変化するNMRシグナル強度を非線形フィットして求めた。各温度での ΔV は、圧力範囲で一定であると仮定して ΔG の圧力依存性を線形フィットして求めた。

【結果・考察】

常圧においてTTRの四量体の線幅の広いシグナルが観測されたが、圧力を印加すると線幅の狭い新たなシグナルが現れ、圧力上昇にともなってその強度は増加した。これは、四量体が単量体へ解離して、分子の運動性が上昇したためと考えられる。シグナル強度の増加曲線はシグモイド型の線形を示し、圧力依存的にギブズエネルギーが減少することが示された。得られたシグモイド型の線形から各圧力における四量体の解離反応の ΔG を求め、 ΔG の圧力依存性から標準状態での ΔG° と ΔV を各温度で求めた。298 KにおけるrWTとrV30Mの ΔG° はほぼ等しかった。298 Kから277 Kまで温度を低下させると、rWTの ΔG° はあまり変化しないのに対し、rV30Mの ΔG° は温度が低下するにつれて大幅に低下した (Figure 2a)。このことは、V30Mは低温においてrWTより単量体の割合が高くなることを意味し、水に溶解させたTTRを冷蔵庫などで長期保存する際には、不可逆的に会合して不溶性の沈殿になりやすいことが示唆された。

298 KでのrWTとrV30Mの ΔV はほぼ等しかった。277~298 KでrV30Mの ΔV はほぼ変化しないのに対し、rWTは温度低下にともなって直線的に減少した (Figure 2b)。このことは、277~298 Kの範囲で温度が低くなるほど、四量体の解離によってrWTの部分モル体積が大きく減少することを意味する。4個の単量体の部分モル体積がrWTとrV30Mで等しく、各温度で一定と仮定すると、rWTの四量体の部分モル体積は温度を低くすると増加するが、rV30Mの四量体の部分モル体積は温度を低くしても変化しないことを示す。両者のX線結晶構造解析ではほとんど差がない⁽¹⁾ことから、rWTとrV30Mの四量体の部分モル体積の温度依存性の違いは、四量体の空隙に入っている水の状態が両者で異なっている可能性が考えられる。すなわち、rV30Mの四量体はサブユニット界面が変化しており、rWTより部分モル体積の小さな構造を持つことから、水和の状態が単量体に近いと考えられる。

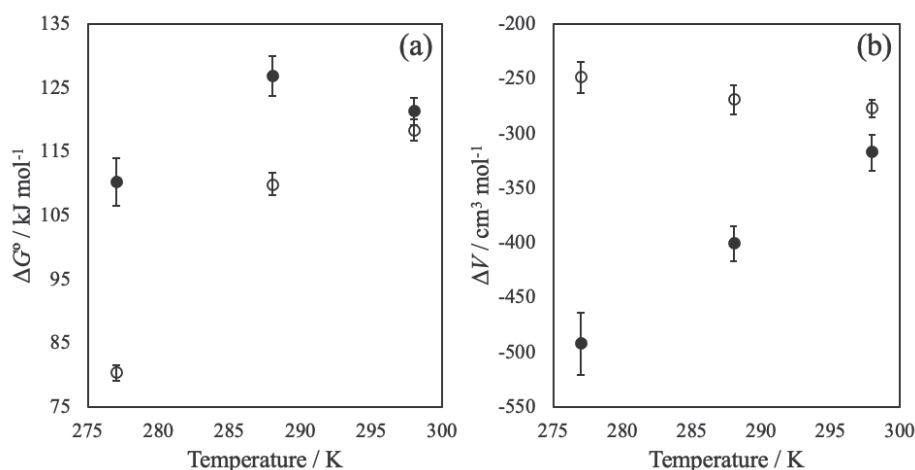


Figure 2: Temperature dependence of (a) ΔG° and (b) ΔV in pressure denaturation of rWT (●) and rV30M (○).

Reference

- (1) Leach et al., *Biochemistry*, **57**, 4421-4430 (2018)
- (2) Niaula, et al., *J. Mol. Biol.*, **320**, 333-342 (2002)

P52Y

スギ及びセイヨウイトスギ花粉由来GRPアレルゲンの立体構造解析

○飯塚友菜¹、鄭靖康¹、久米田博之²、熊木康裕¹、花岡杏美¹、吉川一步¹、中嶋友理枝¹、石原颯馬¹、相沢智康²

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

Structural analysis of GRP allergens from European cypress and Japanese cedar pollen

○Tomona Iizuka¹, Jingkang Zheng¹, Hiroyuki Kumeta², Yasuhiro Kumaki¹, Ami Hanaoka¹, Ichiho Yoshikawa¹, Yurie Nakajima¹, Soma Ishihara¹, Yomoyasu Aizawa²

¹ Graduate School of Life Science, Hokkaido University

² Faculty of Advanced Life Science, Hokkaido University

GRP (gibberellin-regulated protein) allergens from Cupressaceae pollen are cross-reactive with certain fruit GRP allergens, causing pollen food allergy syndrome (PFAS). Structural analysis is important for elucidating the mechanism of PFAS because the similarity of conformation contributes to cross-reactivity. In this study, we carried out overexpression and three-dimensional structural analysis of Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) and European cypress (*Cupressus sempervirens*) GRP. An isotope-labeled sample was prepared using *Pichia pastoris* and subjected to NMR three-dimensional structural analysis. As a result, the three-dimensional structure of the pollen GRP allergen was determined for the first time, revealing a stable structure in which six disulfide bonds are preserved. We compared the structure of peach GRP, which causes PFAS, and examined the causes of cross-reactivity and differences in allergenicity.

【背景】

ヒノキ科の樹木の花粉は、日本のスギ(*Cryptomeria japonica*)、ヨーロッパのセイヨウイトスギ(*Cupressus sempervirens*)など様々な地域で重要なアレルギーの原因となっている。また、花粉と果実等に含まれるアレルゲンの共通エピトープが原因となって引き起こされるPFAS（花粉-食物アレルギー症候群）は、重篤な全身症状を引き起こす場合もあり、詳細な原因解明やより精度の高い診断・治療法の開発が望まれる。

ジベレリン調節タンパク質 (gibberellin regulated protein, GRP) ファミリーに属するCup s 7(セイヨウイトスギ花粉由来)、Cry j 7 (スギ花粉由来) はPFASの原因となるアレルゲン的一种で、モモなどの果物GRPと交差反応性を持つ。GRPは約7 kDa 程度と既知のPFAS原因アレルゲンと比較して低分子ながら、約60残基のコア構造中に高度に保存された6本のジスルフィド結合を有するという特徴がある。Fig.1に示すように、システイン以外の配列保存性も高く、花粉由来と果実由来間においても70%以上の配列類似性を示す。しかし、高い配列相同性を示すにもかかわらずアレルギー性を有しないジャガイモGRP (snakin-1) が知られており、立体構造のわずかな差異がアレルギー性や交差反応性に関与していると考えられている。

そのため本研究ではCup s 7とCry j 7のリコンビナントタンパク質を作製してNMR立体構造解析を行い、エピトープ部位などについて検討した。

ジベレリン調節タンパク質、ジスルフィド結合

○いづかともな、ていせいこう、くめたひろゆき、くまきやすひろ、はなおかあみ、よしかわいちほ、なかじまゆりえ、いしはらそうま、あいざわともやす

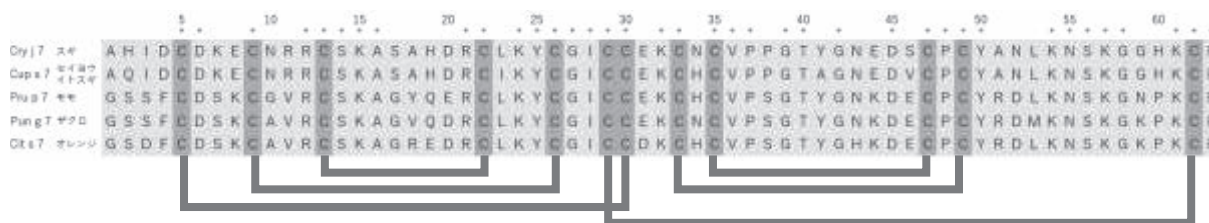


Fig. 1. Multiple sequence alignments of GRP allergens

Sequence alignment of GRP allergens of cedar, cypress, peach, pomegranate, and orange. Cysteines forming disulfide bonds are connected by lines.

【実験】

Cup s 7およびCry j 7の遺伝子をpPIC9ベクターに挿入し、メタノール資化酵母*P. pastoris*を形質転換した。これらのGRPは6か所のジスルフィド結合を形成する複雑な構造を有するため、真核生物である酵母の分泌発現系を選択した。精製は陽イオン交換クロマトグラフィーと逆相HPLCで行った。標識塩化アンモニウムを窒素源として¹⁵N標識を施したりコンビナントタンパク質を生産し、NMR測定に用いた。

精製済の同位体標識Cup s 7、Cry j 7を10% D₂Oに溶解してpH3.0に調製した。標識¹⁵N及び天然存在比の¹³Cを用いた二次元および三次元NMR測定をAVANCE NEO 800 MHz (Bruker) を用いて行った。すべてのアミノ酸残基の主鎖帰属を行ったのち、CYANAのNOE帰属と構造計算により立体構造を決定した。得られた立体構造をもとにDiscoTope2.0を用いてエピトープ部位を予測した。

【結果・考察】

酵母発現系構築に成功し、花粉症患者血清中のIgEとの結合性や天然由来のGRPとの競合実験などから、得られたタンパク質がアレルゲンとしてエピトープを有した立体構造を形成していることを確認した。同位体標識タンパク質は培地1 Lあたり1.0 ~ 1.5 mg得られた。

NMR解析により、Fig.2に示す立体構造が決定され、3本のαヘリックスが6か所のジスルフィド結合で固定された構造が確認された。決定された立体構造をもとにしたエピトープ部位の予測では、3か所の構造的エピトープ部位が1面に集まるような構造がみられ、これらのエピトープ部位が共同して免疫細胞を刺激している可能性が示唆された。

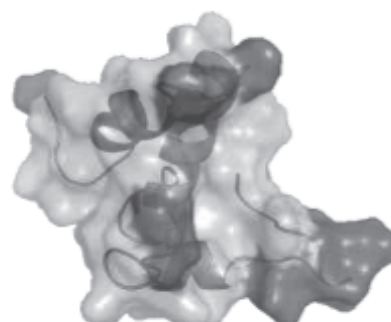


Fig. 2. Determined 3D structure of Cup s 7

Residues with high epitope prediction scores in DiscoTope 2.0 are represented in dark gray color.

P53

プロトン伝導性アルギン酸/2-アルキルイミダゾール複合体の分子運動と局所構造

○細江菜々花¹, 栗原拓也¹, 重田泰宏², 雨森翔悟², 井田朋智¹, 水野元博^{1,2}

¹金沢大学・大学院自然科学研究科

²金沢大学・ナノマテリアル研究所

Molecular Motion and Local Structure of Proton Conducting Alginate Acid/2-Alkylimidazole Composites

○Nanaka Hosoe¹, Takuya Kurihara¹, Yasuhiro Shigeta², Shogo Amemori², Tomonori Ida¹, Motohiro Mizuno^{1,2}

¹ Graduate School of Natural Science and Technology, Kanazawa University

² NanoMaterials Research Institute, Kanazawa University

Alginate acid (AA) /imidazole (Im) composites have been reported as solid electrolytes with high proton conductivity at high temperatures [1]. The reorientational motion of Im is considered to enable efficient proton conduction. However, the molecular motion of Im has not been clarified, the knowledge about it is expected. In this study, AA/Im and AA/2-alkylimidazole (AlkIm) composites were used. We investigated the relationship between the proton conductivity and molecular motion by using solid NMR. At low temperatures, AA/Im showed higher proton conductivity than AA/AlkIm. AlkIm molecules are stationary, but Im molecule is in 180° flip motion at room temperature. Such a difference in the motility of proton carrier molecules is thought to affect proton conductivity.

【序論】

100°C以上で高いプロトン伝導性を示す固体電解質としてイミダゾール(Im)と高分子の複合体が報告されており、その1つにImとアルギン酸(AA)の複合体AA-xIm (x: AAのカルボキシ基に対するImのモル比)がある[1]。AA-xImのプロトン伝導は、Imがキャリアとなるプロトンホッピング(グロータス機構)で支配されており、Imの再配向運動が効率的なプロトン伝導に関与すると考えられている。これらの複合体膜の熱安定性を向上させるためには、プロトンキャリア分子の高温での離脱を防ぐことが必要である。そこで本研究では、アルキル鎖がアンカーとして働くことを期待し、Imの2位に長さの異なるアルキル鎖を有するIm誘導体(AlkIm)とAAの複合体膜AA-xAlkImを調製し、プロトン伝導性と熱安定性を調べた。4種類のAlkIm (Fig 1、左からメチルイミダゾール(MeIm)、エチルイミダゾール(EtIm)、プロピルイミダゾール(PrIm)、ブチルイミダゾール(BuIm))とImを用い、プロトンキャリア分子の構造とプロトン伝導性の関係を調べた。また、固体²H NMR測定によってプロトンキャリア分子の運動を解析し、プロトン伝導メカニズムを考察した。

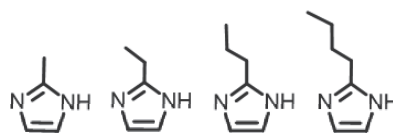


Fig. 1. Structure of alkylimidazoles.

プロトン伝導体, 高分子複合体膜, 固体重水素NMR

○ほそえななか, くりはらたくや, しげたやすひろ, あめもりしょうご, いだともりのり, みずのもとひろ

【実験】

Im及びAlkImとAAを蒸留水中でモル比1:1の割合で混合し、数日間乾燥させることで薄膜を得た。得られた複合体膜を50°Cで24時間真空乾燥し、それぞれの膜について交流インピーダンス法によるプロトン伝導率測定、固体²H NMR測定を行った。固体²H NMR測定は、プロトンキャリアであるIm及びAlkImの重水素化物を用いて作製した複合体膜を試料とし、四極子エコー(QE)法を用い共鳴周波数45.825 MHzで行った。

【結果・考察】

Fig. 2に各複合体膜におけるプロトン伝導率の温度変化を示す。AA-1AlkImは低温ではAA-1Imより低いプロトン伝導率を示したが、約393 K 以上で伝導率が急激に上昇し、423 Kでほぼ等しい値となった。最大の伝導率を示す温度はImとMeImは423 K、EtImとPrImは443 K、BuImは453 Kであった。Imに長鎖のアルキル鎖がつくことでAAから脱離しにくくなることが示唆された。

Fig. 3にAA-1Im、AA-1PrIm、AA-1BuImの²H NMRスペクトルの温度変化を示す。295 Kでは、AA-1PrImとAA-1BuImは静止状態の線形(Pakeパターン)であったが、AA-1Imは静止状態のスペクトルとImの180°フリップのスペクトルの足し合わせで再現された。このことから、ImはAlkImよりも低温から運動が起こっていることが示唆された。このプロトンキャリア分子の高い運動性が、AA-1Imが低温から高いプロトン伝導性を示す一因であると考えられる。AA-1PrImとAA-1BuImについては、353 K以上では静止状態、Im環の180°フリップ、アルキル鎖の回転的振動、等方回転のスペクトルの足し合わせで再現され、393 K以上では等方回転のシャープな成分が支配的となった。等方回転が支配的となった温度はプロトン伝導率が急激に上昇する温度と一致しており、プロトンキャリア分子の運動性の向上が伝導率上昇の一因であると考えられる。

【参考文献】

[1] M. Yamada and I. Honma, *Polymer*. 46, 2986 (2005).

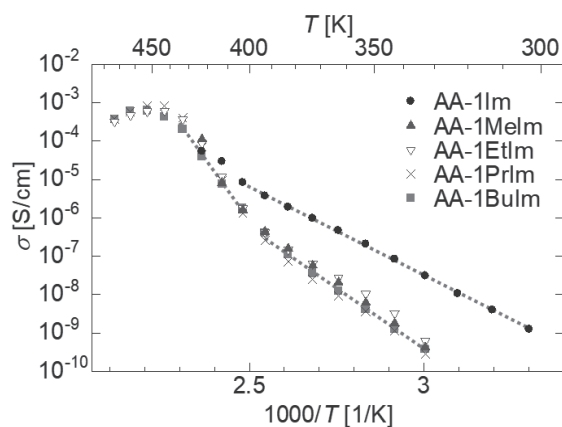


Fig. 2. Temperature dependence of proton conductivity.

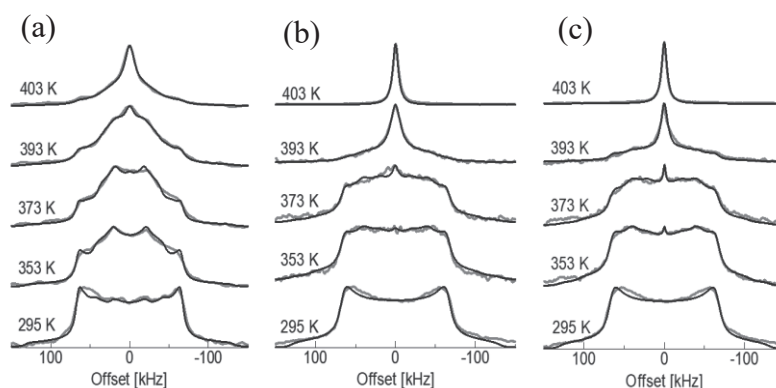


Fig. 3. Temperature dependence of ²H NMR spectra for (a) AA-1Im, (b) AA-1PrIm, (c) AA-1BuIm. Black lines show simulation spectra.

P54Y

K48結合型環状ユビキチン鎖の物性解析

○空田知樹¹, 森本大智¹, ヴァリンダエリック², 菅瀬謙治³

1 京都大学・大学院工学研究科

2 京都大学・大学院医学研究科

3 京都大学・大学院農学研究科

Physical property analysis of cyclic K48-linked ubiquitin chains

○Tomoki Sorada¹, Daichi Morimoto¹, Erik Walinda², Kenji Sugase³

¹Department of Molecular Engineering, Graduate School of Engineering, Kyoto University

²Department of Molecular and Cellular Physiology, Graduate School of Medicine, Kyoto University

³Department of Applied Life Science, Graduate School of Agriculture, Kyoto University

Ubiquitin chains are known to regulate a wide range of intracellular reactions depending on their characteristic chain forms: linear, branched, and cyclic chains. Cyclic K48-linked ubiquitin chains are the only ubiquitin chains that exist in cells as a cyclic form. Although the synthesis mechanism and quantities of cyclic K48-linked ubiquitin chains are studied, their intracellular functions still remain unclear.

We find that cyclic ubiquitin chains show high thermal stability and cleavage resistance due to conformational stabilization. In addition, our NMR and Coarse-grained MD simulation analysis shows that the intrinsic open-closed motion of ubiquitin chains is drastically repressed by the cyclization but cyclic ubiquitin chains have characteristic dynamics relating to the interaction with ubiquitin binding proteins.

細胞内タンパク質であるユビキチンは、ポリマー化され“ユビキチン鎖”を形成することでシグナル分子として機能する。これまでの研究では、直鎖状に伸びたユビキチン鎖 (Fig.1a upper)がタンパク質分解やシグナル伝達などの多様な細胞内現象を制御すると考えられてきた¹。一方、細胞内には分岐構造 (Fig.1a lower left)や環状構造 (Fig.1a lower right)といった特徴的な構造形態を有するユビキチン鎖が多く存在することが知られており、独自の細胞内機能が近年の研究で次々と明らかになっている²。そのため、ユビキチン鎖の機能研究において鎖の構造形態と細胞内機能の関係性が注目されている。

本研究で着目している K48 結合型環状ユビキチン鎖 (以下、環状ユビキチン鎖)は、細胞内で環状構造として存在する唯一のユビキチン鎖である。環状ユビキチン鎖は、ユビキチン鎖合成酵素 E2-25K による K48 結合型直鎖状ユビキチン鎖 (以下、直鎖状ユビキチン鎖)の環化により生成され、この反応は細胞内で起こることが確認されている³。また、興味深いことに、環化の酵素活性は直鎖状ユビキチン鎖の合成よりも高いことが報告されている⁴。このように環状ユビキチン鎖に関して合成機構の解析や細胞内同定が行われているが、細胞内機能の研究は進んでいない。そこで、本研究ではユビキチン鎖の細胞内機能に関わる物性の解析を行い、環状ユビキチン鎖のシグナル分子としての機能性について考察した。

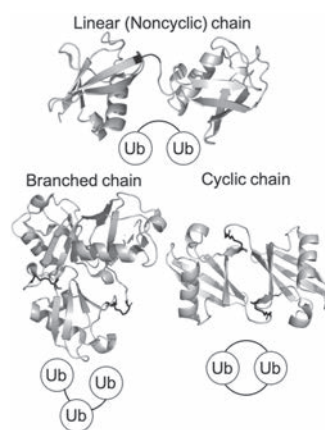


Fig.1. Conformation of ubiquitin chains.

相互作用解析, R₂緩和分散法, MD シミュレーション

○そらだともき, もりもとだいち, ヴァリンダエリック, すがせけんじ

本研究では、環状ユビキチン鎖の特徴的な物性として、高い熱安定性 (Fig.2a)とプロテアーゼ (chymotrypsin)やK48結合型ユビキチン鎖を選択的に切断する酵素 (OTUB1)に対する耐性を見出した (Fig.2b)。これは、環状構造をとることによるユビキチン鎖の構造の安定化に起因すると考えられる。

一方、興味深いことに、環状ユビキチン鎖はOTUB1によってわずかに分解されることが示された。K48結合型のユビキチン鎖は、動的な構造変化により相互作用界面 (I44-centered hydrophobic patch)を露出した構造をとることでOTUB1と相互作用する⁵。環状ユビキチン鎖は相互作用界面を閉じた構造を有していることに加えて、環状構造によって動的な構造変化が抑制されていると考えられる。そこで、溶液NMR法やCoarse-grained MD simulation (Martine)を用いて環状ユビキチン鎖のOTUB1による認識機構を解析した。NMR滴定実験による相互作用解析の結果、環状ユビキチン鎖は直鎖状ユビキチン鎖と同じ相互作用界面を用いてOTUB1と弱い相互作用をすることが示された⁶ (Fig.3a)。また、環状ユビキチン鎖に関して、 R_2 緩和分散法による測定から相互作用界面を中心にミリ秒オーダーの動的な構造変化を有すること (Fig.3b)、さらにMartineによる測定から直鎖状ユビキチン鎖とは異なる相互作用界面を露出した構造をとることが示された。この構造の柔軟性によって、OTUB1との相互作用が可能な構造をとると考えられる。

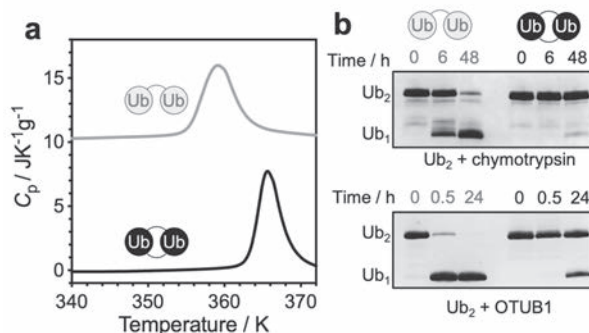


Fig.2. Difference in physical characteristics between noncyclic (grey) and cyclic diubiquitin (black). (a) Differential scanning calorimetry traces of noncyclic and cyclic diubiquitin (Ub₂). (b) Cleavage of noncyclic and cyclic Ub₂ by chymotrypsin (upper) and OTUB1 (lower).

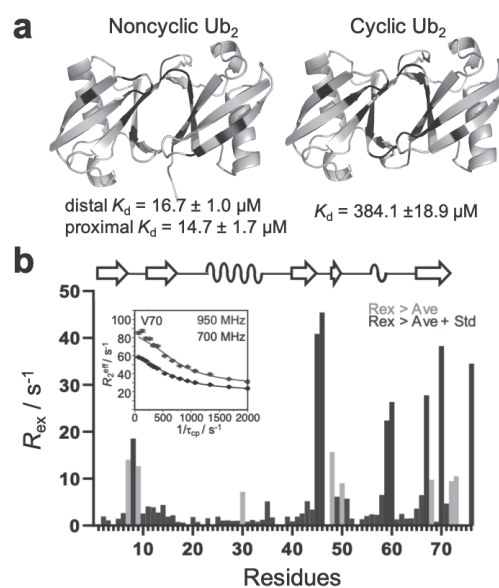


Fig.3. Molecular recognition of cyclic diubiquitin by OTUB1. (a) Interaction residues (black) of noncyclic (left) and cyclic Ub₂ (right). (b) The derived R_{ex} values of cyclic Ub₂.

Reference

- Pickart, C. M. *et al.* Ubiquitin: Structures, functions, mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1695**, 55–72 (2004).
- Ohtake, F. *et al.* The K48-K63 Branched Ubiquitin Chain Regulates NF- κ B Signaling. *Mol. Cell* **64**, 251–266 (2016).
- Sokratous, K. *et al.* Cyclisation of Lys48-linked diubiquitin in vitro and in vivo. *FEBS Lett.* **586**, 4144–4147 (2012).
- Yao, T. *et al.* Cyclization of polyubiquitin by the E2-25K ubiquitin conjugating enzyme. *J. Biol. Chem.* **275**, 36862–36868 (2000).
- Ye, Y. *et al.* Ubiquitin chain conformation regulates recognition and activity of interacting proteins. *Nature* **492**, 266–270 (2012).
- Sorada, T. *et al.* Molecular recognition and deubiquitination of cyclic K48-linked ubiquitin chains by OTUB1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **562**, 94–99 (2021).

P55

In-cell NMRによるKeap1/Nrf2系の研究

○豊田芽生¹, 猪股晃介¹, 末広志織¹, 島海翔¹, 池谷鉄兵¹, 鈴木隆史², 山本雅之^{2,3}, 伊藤隆¹

1 東京都立大学・大学院理学研究科

2 東北大学・大学院医学研究科

3 東北メディカル・メガバンク機構

An in-cell NMR study of the Keap1-Nrf2 system

○Mei Toyoda¹, Kohsuke Inomata¹, Shiori Suehiro¹, Kaito Shima¹, Teppei Ikeya¹, Takafumi Suzuki², Masayuki Yamamoto^{2,3}, and Yutaka Ito¹

¹ Department of Chemistry, Tokyo Metropolitan University; ² Department of Medicine, Tohoku University;

³ Tohoku University Tohoku Medical Megabank organization

The Kelch-like ECH-associated-protein 1 (Keap1) – NF-E2-related factor 2 (Nrf2) system is central to mammalian cellular protection against electrophiles and oxidative stress and is a drug target for disease prevention and treatment. Previous studies have proposed the two-site substrate recognition model for the Keap1-Nrf2 system, known as “Hinge-Latch model”. The Keap1-Nrf2 interaction is known to be altered under “non-stress” or “stress” condition, but the mode has not been examined in detail in intracellular environment. Aiming at understanding the Hinge-Latch model in detail in living cells, we have initiated in-cell and in-diluted solution NMR studies. In-cell NMR spectroscopy is currently the only approach that can provide information of protein behaviours inside cells at atomic resolution. In addition to human cultured HeLa cells, we employed some cell lines with disease background as host cells.

【序論】

Keap1-Nrf2系は、親電子性物質や酸化ストレスのセンサーであり、ユビキチンE3リガーゼのアダプター分子でもあるKeap1と、転写因子Nrf2からなる、生体防御遺伝子群の発現制御システムである。

Keap1二量体はC末端のDC領域(Keap1-DC)を介して、Nrf2のN末端Neh2領域(Nrf2-Neh2)にある2つのモチーフ(DLGとETGE)と結合する。非ストレス条件下では、Nrf2はKeap1を介して迅速にユビキチン(Ub)化され、プロテアソームで分解される。一方ストレス条件下では、Keap1を介したNrf2のUb化が減弱することで分解が回避され、Nrf2は核内移行して標的遺伝子群の転写を誘導する。

Keap1-Nrf2相互作用に関しては、DLGのみが乖離する「門と蝶番モデル」[1,2]が提唱されているが、これを生きた細胞の中で詳細に検証したい。一方で、Keap1-Nrf2結合部位の体細胞変異(がん悪性化に寄与)を有する肺がん細胞株や、p62(Keap1-Nrf2結合を阻害)が蓄積した肝がん細胞株などが確立されており、これら「疾病の背景をもつ」細胞中でのKeap1-Nrf2系の解析にも大きな意義がある。

そこで、生細胞中での蛋白質間相互作用を原子レベルで解析可能なin-cell NMRを適用することで、種々の細胞でのkeap1-Nrf2相互作用の詳細に迫ることを目指した。

In-cell NMR, Keap1-Nrf2系, バイオリアクター

○とよだ めい, いのまた こうすけ, すえひろ しおり, しま かいと, いけや てっぺい, すすき たかふみ, やまもと まさゆき, いとう ゆたか

【実験】

In-cell NMR実験では、大腸菌内発現系を用いて調製した ^{15}N 標識Nrf2-Neh2を、電気穿孔法を用いて細胞内に導入し、新鮮な培養溶液を常に供給することができるバイオリクターシステムを利用しつつ、2D ^1H - ^{15}N SOFAST-HMQCスペクトルの測定を行った。

まず、Nrf2が異常活性化しているがん細胞として、HeLa細胞を使用して実験を行った。この時プロテアソーム分解による影響を確認するために、プロテアソーム阻害剤MG132存在下でin-cell NMR実験を行い、さらにUb化の有無による影響を確認するために、野生型(Nrf2-Neh2-WT)に加えてNrf2-Neh2の7つのLys残基をArgに置換した変異体(Nrf2-Neh2-R7)も用いた。次に、Keap1のNrf2相互作用部位にある変異(Keap1-G333C)によってKeap1-Nrf2相互作用が弱まっているA549細胞[3]と、Keap1が存在しないMEF(Keap1-KO)細胞を使用し、それぞれMG132存在下でin-cell NMR実験を行った。

【結果と考察】

HeLa細胞におけるNrf2-Neh2-WTの実験では、良好なスペクトルの取得には至らなかったが、MG132存在下では、Nrf2-Neh2由来のスペクトルの観測に成功した(Fig.1a)。このことからプロテアソーム分解が影響をおよぼしていることがわかった。

Nrf2-Neh2-R7はUb化が起これないため、MG132なしでも分解されないと予想したが、予想に反して良好なスペクトルは観測されず、Nrf2-Neh2-WT同様、MG132存在下でのみNrf2-Neh2由来のスペクトルの観測に成功した(Fig.1b)。このことから、Ub化の有無に関わらずプロテアソーム分解が関与していることが示唆されたため、以降の実験はMG132存在下で行った。さらに、Nrf2-Neh2-WTと比較すると、Nrf2-Neh2-R7では一部のシグナルの消失が観測された(Fig.1 部分図)。消失は主にNrf2-Neh2のDLGとETGEモチーフで確認されたことから、これはNrf2-Neh2-R7はUb化を阻害されたことによってKeap1二量体(~140kDa)とより強く結合し、見かけの分子量が大きくなったためであると考察した。

さらに、A549細胞のKeap1-G333C変異がKeap1-Nrf2相互作用に影響を与えているかを確認した。Nrf2-Neh2-R7では相互作用の減弱によりHeLa細胞よりも良好なスペクトルが観測できると予想したが、有意な差は見られなかった。この原因として、①A549細胞のKeap1-G333C変異はKeap1-Nrf2相互作用を弱めるのには不十分であった、②Keap1以外の因子がNrf2-Neh2と相互作用している、という2つの可能性が考えられる。①については、希薄溶液中でのNrf2-Neh2-WT/R7とKeap1-WT/G333Cの解析を通してKeap1-Nrf2相互作用におけるG333Cの影響を確認する。また、②について、MEF(Keap1-KO)細胞におけるin-cell NMR実験を通して、Keap1以外の因子の寄与を確認する計画である。

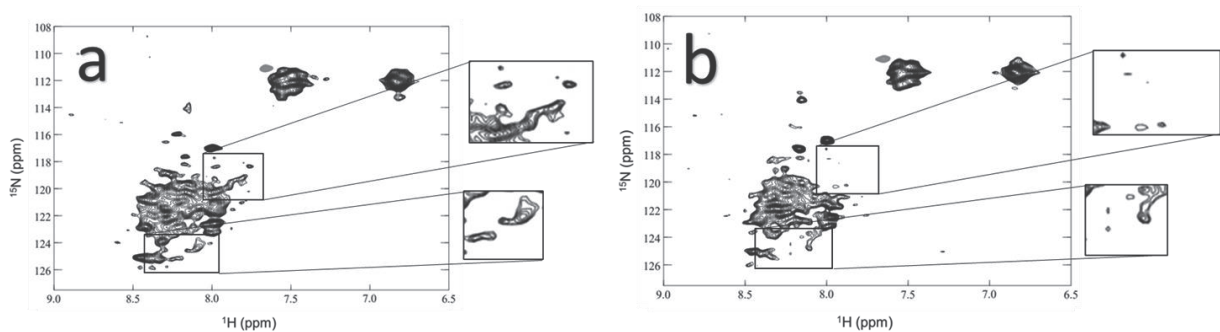


Fig. 1 2D ^1H - ^{15}N SOFAST-HMQC spectra of Nrf2-Neh2-WT (a) and Nrf2-Neh2-R7 (b) in HeLa cells in the presence of a proteasome inhibitor MG-132.

References

- [1] Tong, K.I. *et al. Mol. Cell. Biol.* **27**, 7511-7521 (2007); [2] Horie, Y. *et al. Commun. Biol.* **4**, 576 (2021);
- [3] Singh, A. *et al. PLOS. Medicine.* **3**, e420 (2006).

P56Y

HCVゲノムRNAに存在するキッシングループ構造の解析

○留守めぐみ, 河合剛太
千葉工業大学

Analysis of the kissing-loop structure in HCV genomic RNA

○Megumi Tomemori, Gota Kawai
Chiba Institute of Technology

Interactions between RNAs are known to have important functions. In hepatitis C virus (HCV), the kissing-loop interaction between the 5B-SL3.2 site at the 3' end of the NS5B gene and the Xtail-SL2 site in the 3' untranslated region is known to be involved in translational regulation in the life cycle of HCV. In the present study, the interaction between the model RNAs, 5BSL26 and XSL27 were analyzed by NMR. The solution structures of model RNAs were determined individually, and, then, the formation of the complex was analyzed. It was found that the stem structures in each RNA were retained in the complex, and the formation of inter-molecular stem were confirmed by the analysis of imino proton signals.

序論

本研究ではC型肝炎ウイルス (HCV) のゲノムRNAの複製におけるRNA間相互作用の役割を明らかにすることを目的として、5B-SL3.2とXtail-SL2の間に予想されているkissing-loop 相互作用に着目し、その複合体の立体構造を解析し、相互作用様式を明らかにすることをめざしている。

このために、5BSL3.2から26残基のステムループ構造である5BSL26、XtailSL2から27残基のステムループ構造であるXSL27を設計し (Fig. 1), NMR法による立体構造解析を進めている。今回は5BSL26とXSL27について、それぞれ単体での立体構造を決定したのち、両者を混合した試料を調製し、主としてイミノプロトンシグナルの解析によって複合体の形成を解析した。

方法

非標識RNA試料は、北海道システム・サイエンス社に委託して化学合成した。残基特異的安定同位体標識RNA試料は大陽日酸社に委託して化学合成した。AvanceNeo600分光計 (Bruker社) を用い、溶媒として重水 (99.98 atom%, 大陽日酸社) 5%および50 mM 塩化ナトリウムを含む20 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.5) を用いて、288 KでNMRスペクトルを測定した。RNAの濃度は、0.13 mMから0.29 mMであった。

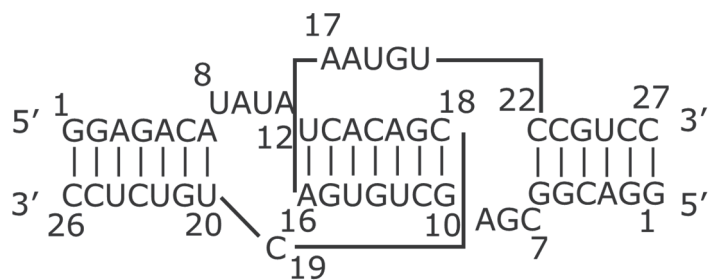


Fig. 1. Possible interaction between 5BSL26 and XSL27

Hepatitis C virus, Kissing-loop interaction

○とめもりめぐみ, かわいごうた

結果

RNA単体の解析：イミノプロトンスペクトルの解析により5BSL26とXSL27はそれぞれ予測された二次構造を形成していることが確認できた。5BSL26では、NOE121個、水素結合の距離情報18個、二面角156個を拘束条件として立体構造計算を行ったところ、r.m.s.d.が 4.530 ± 1.749 （全

体）および 0.336 ± 0.148 （ステム）の構造が得られた（Fig. 2A）。XSL27では、NOE109個、水素結合の距離情報17個、二面角167個を拘束条件として、r.m.s.d.が 6.881 ± 2.906 （全体）および 0.299 ± 0.116 （ステム）の構造が得られた（Fig. 2B）。いずれもループ部分はNOEが少なく構造は収束していなかった。

複合体の解析：複合体ではイミノプロトンシグナル領域において分子間の塩基対に由来するシグナルが観測された（Fig. 3, *）。複合体のNOESYスペクトルから複合体ではAU-GC-AUと連続するシグナルが観測されており（Fig. 4, 線）、Fig. 1に示した分子間のステム構造が形成されていることが示唆された。

考察

5BSL26およびXSL27の単体において形成されていたステム構造は、これらの複合体においても形成されていた。また、Fig. 1の分子間ステムに対応するイミノプロトンシグナルが観測されたことから、5BSL26とXSL27は予想されたキッキング構造を形成していることが示唆された。

複合体の形成には濃度依存性がみられ、0.1 mM程度の試料では複合体に由来するNOEが観測されなかった。非変性条件の電気泳動においても Mg^{2+} 非存在下では複合体が観測されず、安定な複合体の形成には Mg^{2+} が必要であった。

現在は、残基特異的安定同位体標識によって複合体に由来するシグナルの帰属の確認、およびMDシミュレーションによる複合体の安定性の解析を進めている。

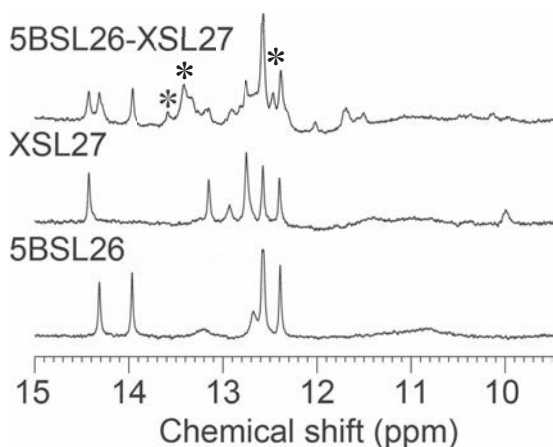


Fig. 3. Imino proton spectra of RNAs.

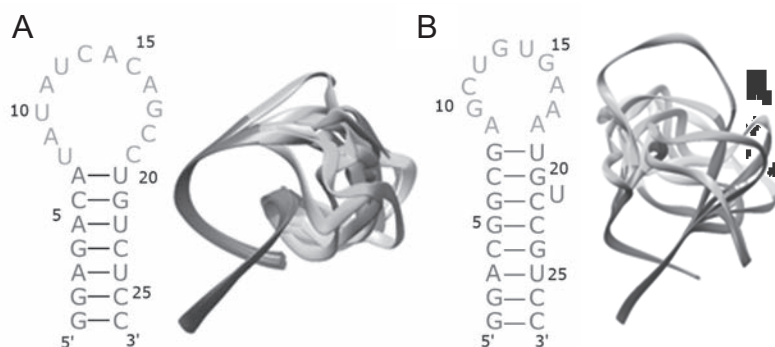


Fig. 2. Secondary structure and the 10 lowest energy structures
A: 5BSL26, B: XSL27. Loop regions are indicated by light gray.

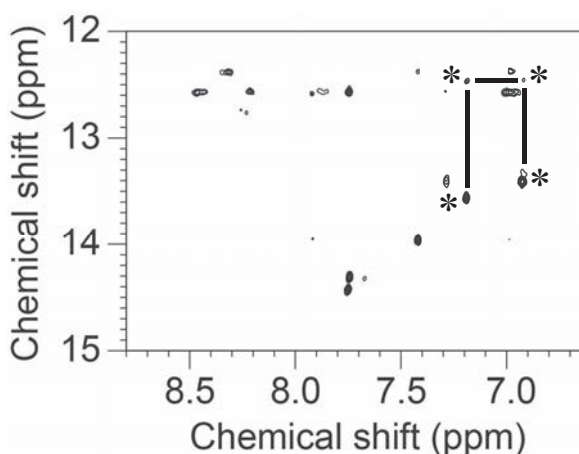


Fig. 4. NOESY spectrum of the complex.

P57

固体NMRを用いたヒト脳由来A β 42線維の研究における試料の最適化と構造解析

○寺見響¹, 重光佳基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 BDR 先端NMR開発・応用研究チーム

Optimization of sample preparation and structural analysis in the research of brain-derived A β 42 fibrils using solid-state NMR

○Hibiki Terami¹, Yoshiki Shigemitsu¹, Isamu Matsuda¹, Yoshitaka Ishii^{1,2}

¹ Department of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology

² Laboratory for Advanced NMR Application and Development, BDR, RIKEN

Alzheimer's disease (AD) is the most prominent form of dementia and has become a social problem as the population ages. Misfolded amyloid- β (A β) peptides accumulated in a brain as senile plaques are considered to be a primary cause of AD. The major isoforms of A β in the brain affected by AD are 40-residue A β 40 and 42-residue A β 42, and A β 42 is considered to be more toxic than A β 40. In our group, we aim to compare structures of A β 42 fibrils using the fibril fragments derived from minimal amount of several AD patients' brain tissues as seeds by sensitivity-enhanced ¹H-detected solid-state NMR. In this presentation, we conduct experiments to optimize fibril extraction from brain tissue using animal brain tissue and synthetic A β 42 fibrils. We will discuss possible structural changes of A β 42 fibrils during the extraction process and the optimization of sample preparation methods, focusing on the structure of synthetic A β 42 fibrils.

アルツハイマー病(AD)は認知症の中で最も主要な疾患で、高齢化に伴い社会問題になっている。アミロイド前駆体タンパク質(APP)からアミロイド β (A β)ペプチドが切り出され、線維状の沈殿として脳内に蓄積することが発症の原因の一つであると考えられている¹。脳内には40残基のA β 40と42残基のA β 42が主なアイソフォームとして存在し、A β 42はA β 40と比較して凝集しやすく神経毒性が強いとされている²。ミスフォールディングしやすく不均一な構造をとりやすいA β 42と比較して、A β 40は実験的に扱いやすいため先行して線維の立体構造解析の研究が進んでいる。AD患者の脳組織由来のアミロイド線維をシードとしてA β 40線維を伸長させると、患者ごとに異なる立体構造を示すことが報告されている³。そのため、アミロイド線維の立体構造とADの症状との間に関係があるかどうか注目されている。また、昨年、当研究室において、脳組織由来のA β 42線維はin-vitroで作製されたA β 42線維と異なる構造を取ることが示された⁴。しかし、患者によるA β 42線維の構造の違い等は明らかになっていない。

当研究室では、高感度の¹H検出固体NMRを用いて複数のAD患者のサブグラム量の最小限の脳組織(0.1–0.2 g)から得たアミロイド線維をシードとしてA β 42線維を作製し、その立体構造を患者ごとに比較しようと試みている。本研究では、動物脳組織および化学合成したA β 42線維を用いて、脳組織からのアミロイド線維抽出の最適化を試みた。合成A β 42線維の構造に着目し、脳組織からの抽出過程におけるA β 42線維の立体構造の変化および線維の抽出方法の最適化について議論する。

アミロイド β , 固体NMR

○てらみひびき, しげみつよしき, まつだいさむ, いしいよしたか

本研究における実験には、食用として市販されている豚の脳を用いた。すりつぶした脳組織に化学合成したA β 42線維の懸濁液を加え、既報に従い⁵アミロイド線維の抽出実験を行った。合成A β 42線維の入った脳組織から、スクロース溶液中での遠心分離、DNaseおよびcollagenaseによる分解、および、1% SDSによる処理を経てamyloid-richな抽出物を得た。得られた抽出物をシードとしてA β 42モノマー溶液に加えてインキュベーションし、“brain-seeded” A β 42線維を作製した。この際、蛍光色素thioflavin T (ThT)を用いて線維形成の過程を追跡した。当日の発表では、実験の最初に加えている化学合成A β 42線維および今回の実験で作製した “brain-seeded” A β 42線維をそれぞれ固体NMR 2D ¹³C-¹³C測定から得られたスペクトルを比較することで、抽出過程における線維の立体構造変化について議論する予定である。

[References]

- (1) Hardy & Higgins. (1992). Alzheimer's Disease: The Amyloid Cascade Hypothesis. *Science*, 256, 184–185.
- (2) Burdick et al. (1997). Preferential adsorption, internalization and resistance to degradation of the major isoform of the Alzheimer's amyloid peptide, A β 1-42, in differentiated PC12 cells. *Brain Res.*, 746, 275–284.
- (3) Lu et al. (2013). Molecular Structure of β -Amyloid Fibrils in Alzheimer's Disease Brain Tissue. *Cell*, 154, 1257–1268.
- (4) Wickramasinghe et al. (2021). Sensitivity-Enhanced Solid-State NMR Detection of Structural Differences and Unique Polymorphs in Pico- to Nanomolar Amounts of Brain-Derived and Synthetic 42-Residue Amyloid- β Fibrils. *J. Am. Chem. Soc.*, 143, 11462–11472.
- (5) Scherpelz et al. (2016). Preparation of Amyloid Fibrils Seeded from Brain and Meninges. *Methods Mol. Biol.*, 1345, 299–312.

P58

持続可能な高分子材料設計を指向したNMR記述子抽出

○北山翔矢¹、横山大稀²、坪井裕理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 環境代謝分析研究チーム

3名古屋大学大学院 生命農学研究科

NMR descriptor extraction oriented to sustainable polymer material design

○Syoya Kitayama¹, Daiki Yokoyama², Yuuri Tsuboi², 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

The commercial products we use in our daily lives have a wide variety of polymer materials, and it is essential to understand their physical and chemical properties to design comfortable usage in human society. In this study, we attempted to extract relationships between physical properties and time-domain (TD)-NMR relaxation curve data of multiple kinds of polymer materials. The relaxation curves and their PCA showed the large variation of the strength in the initial stages of relaxation time within across polymer types, suggesting that polymer structure and chemical properties affected physical properties.

【背景】

近年、日常生活で大量に使用されている高分子材料の資源循環を促進し環境負荷を小さくする動きが強まっている。我々が普段利用する高分子材料には、多種多様な素材が使われており、これらを社会でうまく活用していくためには、各素材の物理・化学的特性を把握することが必須である。こうした多種多様な素材を評価するためには、低コストで素材の特性を分析できる機器を用いて大量のデータをインフォマティクス的手法で扱う必要がある。低磁場 NMR の一種である卓上型 TD-NMR は、高磁場 NMR に比べ設置や維持にかかる費用が安価であり、計測にかかる時間や準備などのコストが低いメリットがあり、大量の試料の物性情報を取得できる。TD-NMR 計測は試料の緩和曲線を計測することで、素材ごとの緩和時間の差異によって対象の固さ等の物性情報を評価することができる。さらに DQ/MAPE/SE/CPMG の異なるパルスプログラムで、ダイナミックレンジの大きな動的情報を抽出できる[1]。そこで本研究では、多種類の高分子材料を試料とし TD-NMR の緩和曲線のデータを用いて、物性情報と材料素材との関連の抽出を試みた。

【方法】

試料には、組成や製造条件の異なる 424 サンプルの高分子材料を用いた。素材の特性をまとめて評価するために、7 種の生分解ポリマー、合成樹脂、ゴムに分類した。生分解性ポリマーの中でも特に PLA と PVA は結晶化度のバリエーションが大きい。また、合成樹脂、ゴムについては異なる組成を持つ複数種類の高分子試料が含まれている。計測は solid-echo 法を用いて行い、取得した緩和曲線を 0.00016 msec ごとにビン化してその強度情報で PCA を行った。

時間領域NMR、構造物性相関、サーキュラーエコノミー

○きたやましょうや、よこやまだいき、つぼいゆうり、きくちじゅん

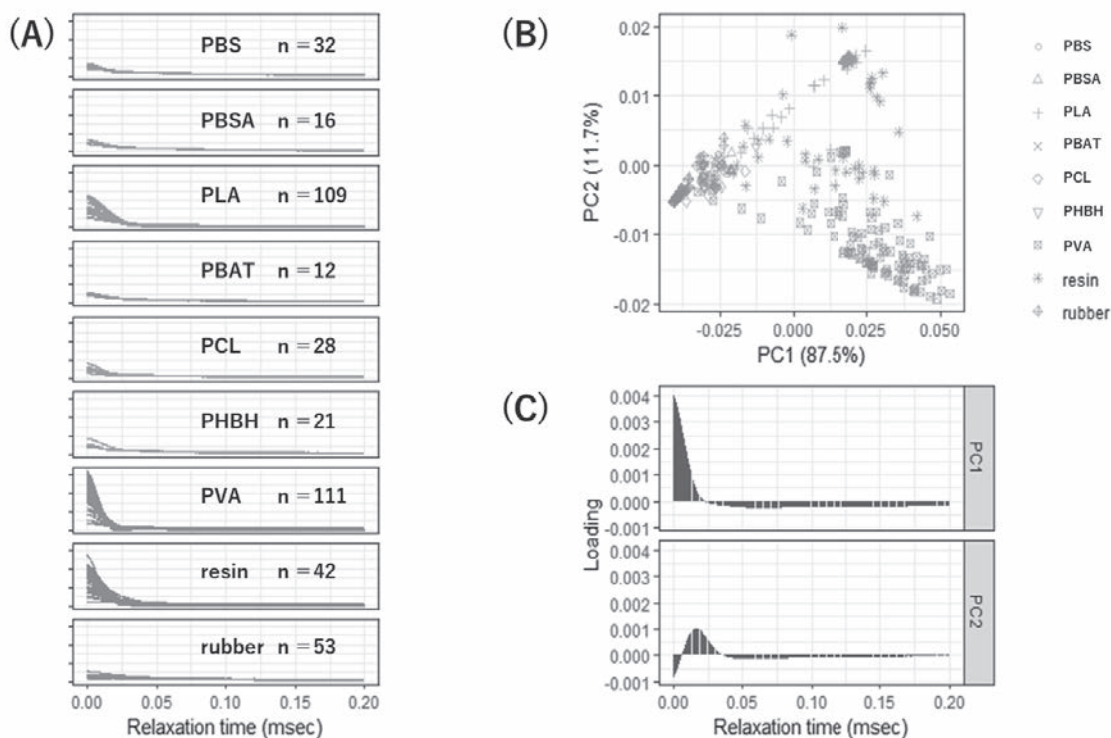


Figure. 1 (A) Relaxation curves of biodegradable polymers, resins, and rubbers, (B) PC1 and PC2 plots highlighted by different materials, (C) Loading of PC1 and PC2.

【結果と考察】

取得した緩和曲線、およびその PCA の結果を素材カテゴリごとに図示した(Fig. 1)。PC1 の寄与率は 87.5%と高く、Loading 図より緩和初期段階(~0.02 msec)の強度が PC 1 軸の変動に大きく寄与していることがわかった。緩和曲線を確認したところ緩和初期段階の強度のばらつきが大きく、緩和初期段階の強度が各高分子素材の特徴を大きく反映していることが示唆された。

PCA プロットを見るとおおまかに素材ごとにまとまった分布を持っているため、材料素材と物性情報との間には関連性があると考えられた。その中でもとりわけ PLA、PVA、合成樹脂のプロット上のばらつきが大きかった。PLA と PVA については結晶化度の大幅に異なる試料を使用しており、結晶化度に応じて分子間の結合力や固さの違いが生じた結果、同じ素材内でも緩和曲線のばらつきが生じたと考えられた。また、合成樹脂と分類した中には多種類の素材を含んでいるため、緩和曲線に違いが生じたと思われる。一方で、ゴムは多種類の素材を含んでいるにも関わらず緩和曲線に大きな違いは見られなかったことから、物性に共通点があると考えられる。以上から、材料素材が試料の物性に関与しており、同素材でも製造過程の違いで異なる物性を持つ場合があると考えられた。

今後は今回測定した物性情報だけでなく、固体 NMR や IR といった多様な機器を用いて得られる情報との関連を抽出することで、材料素材の物性や化学構造との関連についての理解を深めていきたいと考えている。

References

[1] Hara, K., Yamada, S., Kurotani, A., Chikayama, E. and Kikuchi, J. “Materials informatics approach using domain modelling for exploring structure-property relationships of polymers” *Sci. Rep.* 12, 10558 (2022).

P59

NMRによる閉鎖循環式陸上養殖魚の代謝・肉質分析

○丸橋愛美¹, 横山大稀³, 坂田研二³, 寺山慧^{1,2}, 菊地淳^{2,3,4}

1 横浜市立大学理学部生命医科学科

2 横浜市立大学大学院生命医科学研究科

3 理化学研究所環境資源科学研究センター

4 名古屋大学大学院生命農学研究科

Metabolism and meat quality analysis of closed circulation land-based fish by NMR

○Aimi Maruhashi¹, Daiki Yokoyama³, Kenji Sakata³, Kei Terayama², Jun Kikuchi^{2,3,4}

¹ Department of Medical Life Science, Yokohama City University

² Graduate School of Medial Life Science, Yokohama City University

³ RIKEN Center for Sustainable Resource Science

⁴ Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya university

The denitrification process is a key metabolic factor for water circulation systems in land-based aquaculture. We analyzed the impact of Poly butylene succinate-co-butylene adipate (PBSA) filter media toward fish metabolism and fish meat quality using NMR, comparing the fecal and muscle metabolome of *Epinephelus coioides* between the tanks equipped with commercial filter media and those with PBSA filter media.

プラネタリー・バウンダリーは人類が生存できる安全な活動領域とその限界点を定義する指標である。9項目のうち、窒素やリン排出を主とする生物地球化学的循環および生物多様性の低下が限界点を超越しており、富栄養化や生態系破壊などの環境負荷に強く関連している。

閉鎖循環式陸上養殖は飼育水が海へ排出されない点から富栄養化防止に繋がり、生態系保全や環境問題解決の糸口となり得る。ただし、魚から排出される窒素化合物の水槽内蓄積が摂餌率や養殖効率低下の要因となるため、脱窒処理が必要となる。生分解性ポリマーであるポリブチレンサクシネートアジペート(PBSA)ろ材は、付着微生物の脱窒による飼育環境改善が指摘されているものの、魚代謝機構への影響は不明である。そこで本研究は、市販ろ材水槽およびPBSAろ材水槽内で高付加価値魚種であるチャイロマルハタの飼育を行い、魚代謝物の各種NMR計測(2DJ-res, TD-NMR)から、PBSAろ材が魚代謝や肉質へ与える影響を明らかにした。

2つの水槽(市販ろ材(エーハイム社サブストラットプロ)水槽、PBSAろ材水槽)を用意し、2020年9月から2021年10月まで各水槽150匹ずつ飼育を行った。飼育水槽の時系列水サンプルの水質分析を行ったところ、PBSAろ材水槽では窒素濃度が低く維持されたことから、PBSAろ材水槽では脱窒が促進されていることが示唆された。

次に、魚代謝物である糞便および魚肉のNMRスペクトル(2DJ-res)を用いた代謝プロファイリングを遂行したところ、糞便主成分分析では水槽間で顕著な差がなかったのに対し、魚肉主成分分析では市販ろ材水槽の飼育後期(3月以降)にPC2が負の方向に偏っていた(Fig.1)。市販ろ材水槽では飼育水中の硝酸蓄積によってpHが致死限界付近まで低下したために死亡個体数が急増しており、このPC2上の変化はこうした環境ストレスによって魚の代謝が変化したことに起因すると

陸上養殖, 窒素循環, 代謝プロファイリング

○まるはしあいみ, よこやまだいき, さかたけんじ, てらやまけい, きくちじゅん

考えられる。

また、目的変数を魚肉主成分分析のPC2、説明変数を肥満度、水槽、飼育期間として重回帰分析を実施したところ、肥満度が高くPBSAろ材を使用するほどPC2がプラスに偏ることが判明した。さらに、魚肉主成分分析の因子負荷量の結果から、PBSAろ材水槽の魚肉には旨味成分であるイノシン酸 (IMP)、GlycineやThreonineが多く含まれていたことから、PBSAろ材処理により魚肉の肉質が向上する可能性があると考えた。

また、物性評価を行うために、TD-NMR (CPMG法)によるスピンスピン緩和時間(T_2)の測定を行った。 T_2 は分子のブラウン運動や結合の回転を反映しているため、魚肉の硬さや水分状態の評価が可能である。予備試験としてチャイロマルハタおよびジャイアントハタ魚肉を用いて緩和曲線を取得し成分分離を行ったところ、緩和の短い結合水の成分(第1フィッティング成分)と緩和の長い自由水成分(第2フィッティング成分)に分離することで、筋組織中の結合水と自由水の比率を計算することができた(Fig. 2)。他にもDQ/MAPE/SEや T_1 - T_2 相関といったパルスプログラムを適用することで、PBSAろ材処理による魚肉質への影響を検証し、さらに化学組成情報等との関係性を多角的に議論していく予定である。

References

- (1) Mekuchi, M. Sakata, K. Yamaguchi, T. Koiso, M. Kikuchi, J. (2017) Trans-omics approaches used to characterise fish nutritional biorhythms in leopard coral grouper (*Plectropomus leopardus*). *Sci Rep.* **7**, 9372
- (2) Wei, F. Ito, K. Sakata, K. Asakura, T. Date, Y. Kikuchi, J. (2021) Fish ecotyping based on machine learning and inferred network analysis of chemical and physical properties. *Sci Rep.* **11**, 3766
- (3) Date, Y. Wei, F. Tsuboi, Y. Ito, K. Sakata, K. Kikuchi, J. (2021) Relaxometric learning: a pattern recognition method for T_2 relaxation curves based on machine learning supported by an analytical framework. *BMC Chemistry* **15**, 13

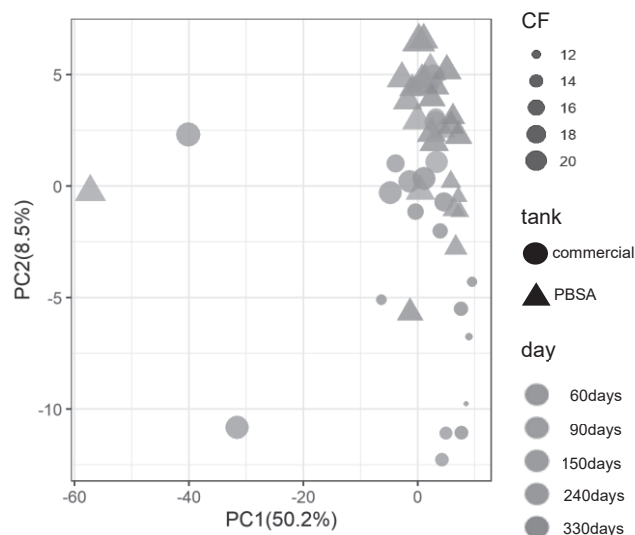


Fig. 1. Principal component analysis of fish muscle metabolome.

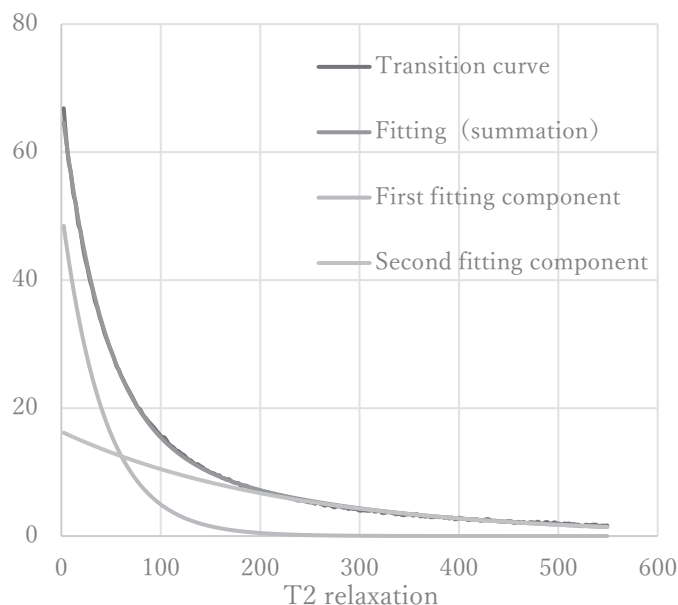


Fig. 2. Measurement of T_2 relaxation time curve of fish muscle metabolome by TD-NMR.

P60

アミノ酸変異と圧力摂動を用いたタンパク質の変性中間体の安定化

○北沢創一郎¹, 若本拓朗², 山本純也³, 小出怜奈³, 北原亮¹

¹立命館大学薬学部

²立命館大学院生命科学部

³立命館大学院薬学部

Amplification of the specific conformational fluctuation of proteins by site-specific mutagenesis and hydrostatic pressure: Outer Surface Protein A

○Soichiro Kitazawa¹, Takuro Wakamoto², Junya Yamamoto³, Reina Koide³, Ryo Kitahara¹

¹ College of Pharmaceutical Sciences, Ritsumeikan Univ. Japan

² Graduate School of Life Science, Ritsumeikan Univ. Japan

³ Graduate School of Pharmacy, Ritsumeikan Univ. Japan

Conformational fluctuation is crucial to protein function. Outer surface protein A (OspA) is comprised of N- and C-terminal globular domains linked by a central single-layer- β -strand. Solution nuclear magnetic resonance (NMR) studies have shown that the central β -strand and C-terminal domain, containing receptor-binding site, are less stable than the N-terminal domain and partially disordered, indicating a presence of the intermediate state between the native folded state and completely unfolded state. In the previous study, we suggested that partial disordering is advantageous for the receptor recognition because the binding site of OspA is exposed to solvent. Herein we demonstrate that amplification of a specific conformational fluctuation by pressure perturbation and site-specific mutagenesis. The salt-bridge-destabilized variant E160D and the cavity-enlarged variant I243A favored the intermediate. The proportion of the intermediate is almost 100% in E160D at 250 MPa. Strategies using a suitably chosen point mutation with high pressure are generally applicable for amplification of specific conformational fluctuation and potentially improve our understanding of the high-Gibbs free energy conformations of proteins.

【緒言】

タンパク質は水溶液中で構造解析から得られる最安定な天然状態ただ一つを取っているわけではなく、構造的に揺らいでおり、その柔軟性が機能発現に寄与している。Outer surface protein A (OspA)はN末端側とC末端側の球状ドメインがsingle-layer- β -strandにより繋がれタンDEM構造を形成した31 kDaのタンパク質である。OspAの中央 β -strand領域からその受容体認識部位が存在するC末端側ドメインまではN末端ドメインと比較すると構造安定性が低いことが水素/重水素(H/D)交換NMR実験や高圧NMR実験などの研究からわかっている。この領域が変性した局所変性状態は、その変性に伴い受容体認識部位が露出し、受容体探索空間が増加することから受容体認識にとって重要な状態であると考えられている¹。しかし、この局所変性状態は分布率が小さいことから観測することは困難であり、その立体構造や構造揺らぎの制御機構の解明は困難である。そこで我々はC末端及び中央領域の安定性に重要なアミノ酸残基を変異させることにより局所変性状態を模倣した変異体の作製を試みた²。

高圧力NMR 局所変性状態 高エネルギー状態

○きたざわそういちろう, わかもとたくろう, やまもとじゅんや, こいでれいな, きたはらりょう

【方法】

C末端領域から中央領域を安定化させているK189-E160間の塩橋の相互作用を減弱させた変異体E160Dを作製した。またC末端ドメインの空隙を拡張させた変異体I243Aを作製した。H/D交換NMR実験、高圧力NMR実験、高圧力トリプトファン蛍光実験によりその構造及び熱力学的安定性を評価した。

【結果・考察】

高圧トリプトファン蛍光実験により野生型および局所変性状態模倣変異体(E160D, I243A)の安定性を見積もった。OspAのトリプトファンはC末端構造ドメイン側である216残基に存在し、タンパク質中に埋没している。そのため蛍光スペクトルの変化はC末端構造ドメインの状態を強く反映する。野生型および変異体の蛍光スペクトルの最大蛍光波長は加圧に伴い高波長側へ移動した(Fig. 1)。これはC末端ドメインが変性しトリプトファンがバルク水に露出したことを示唆する。変異体は野生型と比較すると明らかに低圧で最大蛍光波長の変化が観測されており、C末端ドメインの安定性の低下が示唆された。この結果から局所変性状態の ΔG° は 31 ± 4 (WT), 17 ± 3 (E160D), 11 ± 2 kJ/mol (I243A), ΔV° は -127 ± 16 (WT), -130 ± 20 (E160D), -100 ± 20 mL/mol (I243A)と見積もることができた。E160DおよびI243AはそれぞれWTに比べ200倍(E160D)と2000(I243A)倍まで分布率が増加した。塩橋減弱変異体E160Dの部分モル体積はおおよそ野生型と一致した。その一方、空隙拡張変異体I243Aは、予想とは異なり部分モル体積が減少した。これは空隙周辺の疎水性残基の水和と再配列により、空隙の体積が減少した影響であると考えられる。

高圧力NMR法によるE160Dの解析を行った。E160D変異体は $\beta 1$ - $\beta 7$ に関しては250 MPaまでの範囲で信号強度の減少は見られず(Fig. 2A)、立体構造が天然状態様構造であると考えられる。それに対して $\beta 9$ - $\beta 21$ の中央領域からC末端ドメインは信号強度の減少が見られ(Fig. 2C)、それに伴い変性信号が観測された。それらに挟まれる $\beta 8$ 領域においては114から信号強度の減少が観測されており(Fig. 2B)、114から局所的に変性していると考えられる。E160D変異体は200 MPa以上においてC末端ドメインの天然状態の信号がほとんど完全に消失する(Fig. 2D)。このことから、野生型では250 MPaで80%だった局所変性状態がE160D変異によりほぼ100%まで安定化することに成功した。

References

- [1] R. Kitahara *et al.* *Biophys. J.* **102**, 916-926, 2012.
- [2] Wakamoto *et al.* *J. Phys. Chem. B* **126**, 1868-1875, 2022.

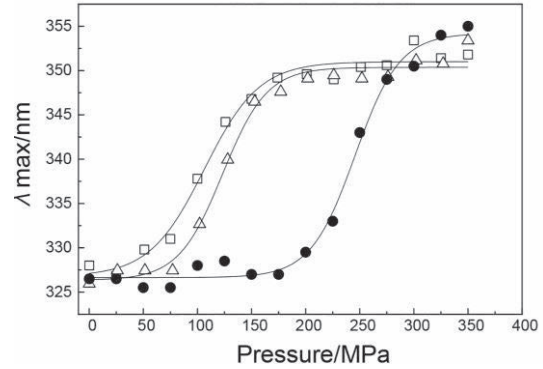


Fig. 1. Pressure-induced changes in the maximum wavelength of fluorescence for WT* (●), E160D (△), and I243A (□) at 313 K.

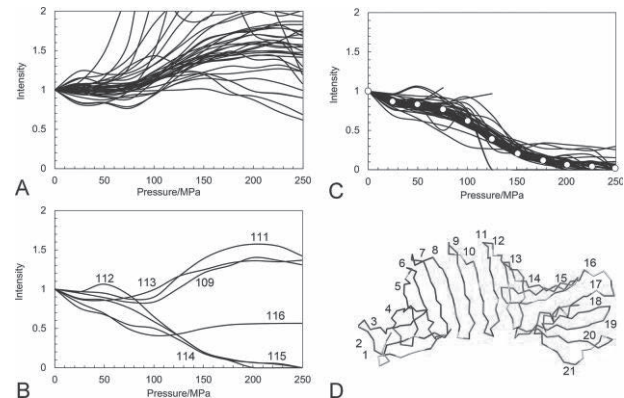


Fig. 2. Pressure-induced changes in the peak intensity of OspA E160D variant. Peak intensities (volumes) in $\beta 1$ - $\beta 7$ (A), $\beta 8$ (B), and $\beta 9$ - $\beta 21$ (C), normalized to those at 0.1 MPa, were plotted as a function of pressure. Open circles indicate average values at different pressure conditions (C). (D) Mapping of residues onto the crystal structure (PDB-ID1OSP, blue, increasing peak intensity or unperturbed by pressure; red, losing intensity by pressure; gray, no data or peak-overlap).

P61

小胞体膜貫通蛋白質VAP-B及びVAP-B-FFAT motif複合体のNMR構造解析

○戸川航¹、古板恭子²、小林直宏³、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

3理化学研究所・放射光科学研究センター

NMR structural analysis of integral endoplasmic reticulum protein VAP-B and VAP-B-FFAT motif complex

○Wataru Togawa¹, Kyoko Furuita², Naohiro Kobayashi³, Toshimichi Fujiwara², Chojiro Kojima^{1,2}

¹ Graduate School of Engineering and Science, Yokohama National University

² Institute for Protein Research, Osaka University

³ RIKEN, RIKEN Spring-8 Center

VAMP-associated protein (VAP), which is a transmembrane protein mainly localized in the endoplasmic reticulum, is involved in intracellular functions by interacting with various proteins located in the organelle membrane or cell membrane. The major sperm protein (MSP) domain on the N-terminal side of VAP is the main interaction region. In mammals, there are two types of VAPs, VAP-A and VAP-B, and the T46I and P56S mutations in the VAP-B MSP domain are thought to be associated with familial amyotrophic lateral sclerosis (fALS)^{2,3}. Therefore, understanding the structure and dynamics of the VAP-B MSP domain comparing to VAP-A is important in elucidating the mechanism of ALS onset and developing therapeutic methods. In this study, we analyzed the three-dimensional structure of the human VAP-B MSP domain and VAP-B-FFAT motif complex by using solution NMR.

【はじめに】

主に小胞体に局在する膜貫通蛋白質である VAMP-Associated Protein (VAP) は、オルガネラ膜あるいは細胞膜が互いに近接した膜接触領域 (MCS) において、様々な蛋白質と相互作用することで細胞内の機能に関与している。VAP の N 末端側にある Major Sperm Protein (MSP) ドメインが主な相互作用領域であり、FFAT motif と呼ばれるアミノ酸配列を含む蛋白質と結合することで脂質輸送の足場の形成や恒常性の維持がなされている。¹ 哺乳類では VAP-A 及び VAP-B の二種類が存在するが、VAP-B MSP ドメインの T46I 及び P56S 変異は家族性筋萎縮性側索硬化症 (fALS) などの神経疾患と関連があると考えられている。^{2,3} 従って、VAP-B MSP ドメインの構造やダイナミクス、相互作用機構を把握し、VAP-A と比較した VAP-B の構造特性や特有の分子機能を考察することは神経疾患発症メカニズムの解明や治療法の開発における基盤的知識として重要であると考えられる。本研究では VAP-B の構造特性や MCS での脂質輸送における蛋白質間相互作用機構を解明することを目的に、溶液 NMR を用いて VAP-B MSP ドメイン及び VAP-B MSP ドメインと Oxysterol Binding Protein (OSBP) の FFAT motif フラグメントの複合体の立体構造解析を行った。

NMRによる構造解析、蛋白質間相互作用、NMR滴定実験

○とがわ わたる, ふるいた きょうこ, こばやし なおひろ, ふじわら としみち, こじま ちょうじろう

【実験手法】

大腸菌による発現系を用いて¹³C,¹⁵N 標識VAP-B MSPドメイン及びOSBP FFAT motifフラグメントをGST融合蛋白質として発現させ、その後アフィニティークロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィーを用いて精製を行った。構造解析に必要な一連のNMR測定を行い、そのデータの解析作業において化学シフトの帰属にはソフトウェアSparky、MagRO-NMRView、及びCYANA (FLYAモジュール) を、構造計算にはCYANAを用いた。また複合体構造解析に関しては、複合体形成時のNMRスペクトルを確認するために¹H-¹⁵N HSQCを利用した滴定実験を行った。得られたNMRスペクトルを参考に複合体の構造解析のためのNMR測定を行い、また、化学シフトの変化から相互作用領域の推定を行った。

【結果と考察】

VAP-BのMSPドメインに関しては2つの α ヘリックスと8つの β ストランドからなる構造が得られた (Figure 1)。既に発表されている結晶構造 (PDBID 3IKK) ⁴と比較したところ、両者の構造はおおむね一致し、今回の溶液構造で新たに検出できた二次構造も存在していた。VAP-B-FFAT motif複合体構造についてのNMR滴定実験では複合体形成時のNMRスペクトルを確認することができ、また、段階的なOSBPフラグメントの添加に伴って複数の残基で化学シフトの大きな変化を観測した (Figure 2)。この化学シフトの変化量を算出したところ、その大きさのトップ5はいずれもVAP-A-OSBP (FFAT motif) 複合体における結合領域⁵に相当する領域に位置していることが判明した。また、これらの中にはfALS発症に関与しているとされるT46残基が含まれており、神経疾患において蛋白質間の結合親和性が低下している可能性が考えられた。発表では複合体の立体構造解析の結果を示し、両蛋白質間の相互作用の詳細について報告する予定である。

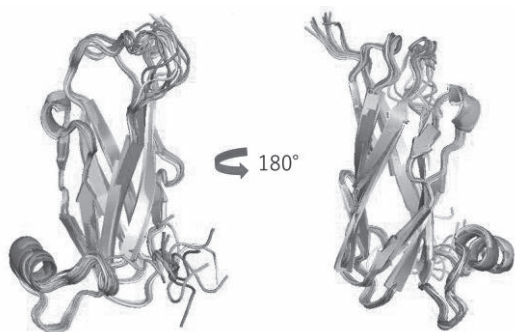


Figure 1 The solution structure of VAP-B MSP domain

Superposition of 10 energetically stable structures obtained from CYANA calculation. RMSD $0.59 \pm 0.12 \text{ \AA}$

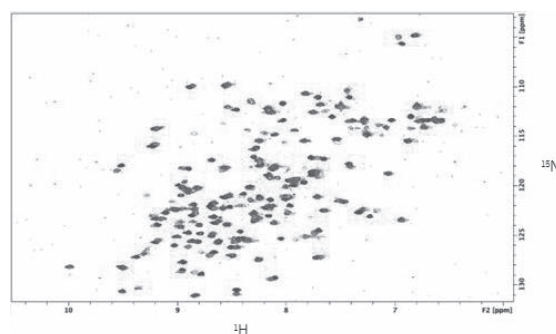


Figure 2 NMR titration experiment

Molar ratios (VAP-B_{MSP} : OSBP_{FFAT}) 1:0 (blue), 1:0.75 (red), 1:2 (green)

References

- (1) D Peretti *et al.*, *Mol. Biol. Cell*, 19, 3871-3884 (2008).
- (2) AL Nishimura *et al.*, *Am J Hum Genet*, 75, 822-831 (2004).
- (3) S Lua *et al.*, *PLoS One*, 6, e27072 (2011).
- (4) J Shi *et al.*, *Biochemistry*, 49, 3887-3897 (2010).
- (5) K Furuita *et al.*, *J Biol Chem*, 285, 12961-12970 (2010).

P62Y

DNP-NMRによるオクタデシルシリルシリカゲル表面におけるアルキルスルホコハク酸分子吸着構造の解析

○笹原久武¹, 鈴木克明², 岡村諭¹, 青野恵太¹, 鈴木不律¹, 梶弘典²

¹花王株式会社

²京都大学化学研究所

DNP-NMR Analysis of Molecular Adsorption of Alkyl Sulfosuccinates on Octadecylsilyl Silica Surface

○Hisamu Sasahara¹, Katsuaki Suzuki², Satoru Okamura¹, Keita Aono¹, Furitsu Suzuki¹ and Hironori Kaji²

¹Kao Corporation, 1334 Minato, Wakayama 640-8580, Japan

²Institute for Chemical Research, Kyoto University, Uji, Kyoto 611-0011, Japan

Sodium bis(2-ethylhexyl)sulfosuccinate (2EH) is known to have excellent wetting properties among various surfactants. The adsorption state of 2EH on hydrophobic octadecylsilyl (ODS) silica particle surface was investigated by DNP-NMR. By mixing 2EH and ODS silica, a downfield shift was observed for the signals in the high-field (55-80 ppm) region and a change in the signal intensity ratio in the low-field (160-180 ppm) region. These changes should be attributed to the enhanced signal of the surface of ODS silica by DNP-NMR. Thus, 2EH could be formed a different association state on the surface of ODS silica than in the bulk.

界面活性剤はひとつの分子中に親水基と疎水基を有する両親媒性分子であり、物質界面に吸着することで界面エネルギーを低下させる。界面エネルギー低下によってもたらされる乳化・分散・濡れ促進（表面改質作用）は様々な産業において活発に利用されている。その中でも濡れは界面活性剤の重要な応用手段である一方で、その制御は複雑である¹。固体表面に吸着した極微量の界面活性剤の分子状態・運動性と界面エネルギーとの関係性は未だ十分に明らかにされていない。本研究ではDNP-NMR法を用いて、ビス(2-エチルヘキシル)スルホコハク酸ナトリウム(2EH)およびその疎水鎖の異なる類縁体(Fig. 1)のオクタデシルシリル(ODS)シリカゲル粒子表面上における吸着状態を直接的に観測することを試みた。2EHは優れた濡れ特性を有するが、その起源や制御因子は明らかになっていない。疎水鎖の異なるジアルキルスルホコハク酸塩類の水溶液は、疎水性固体に対して異なる濡れ特性を示すことから、濡れ特性と固体表面上における各分子の吸着状態の関係性を比較する。

DNP-NMR測定試料として、重水30 mLに界面活性剤20 mMを添加し1 h攪拌後、ODSシリカ30 mgを加え1 h攪拌した。その後、遠心分離にて界面活性剤水溶液を分離し、界面活性剤吸着シリカを作製した。そこに20 mM Amupol in D₂O/H₂O(9/1)を加え、固体NMR用ローターに充填し、測定した。

DNP-NMR, Solid State, Surfactant

○ささはらひさむ, すずきかつあき, おかむらさとる, あおのけいた, すずきふりつ, かじひろのり

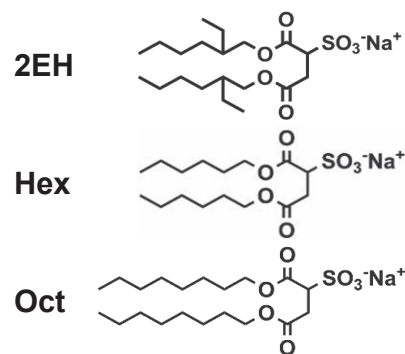


Fig. 1. Molecular structures of alkyl sulfosuccinates used in this study.

固体 NMR を用いた DP/MAS 測定では、2EH, ODS シリカの単独試料（原料）と 2EH を吸着させた ODS シリカ（以下、2EH+ODS シリカ）においてシグナルのシフトや新たなシグナルピークは観測されなかった。これはバルクの 2EH 比率が高く、ODS シリカに吸着した 2EH に由来するシグナルを検出できないためであることを示唆している。そこで、DNP-NMR を用いて感度を向上させることにより、ODS シリカに吸着した 2EH の吸着状態の解明を試みた。

DNP-NMR を用いた MW=on/off 時の 2EH+ODS シリカの ^{13}C CP/MAS スペクトルを Fig. 2 に示す。サンプル調製条件を検討した結果、MW=on/off で約 21 倍のシグナル強度の増大を観測した。特に、50 ppm より低磁場側のシグナルは明確に観測できるようになることがわかった。この結果は、DNP を用いて検出感度を向上させることで、サンプル系中に微量存在する ODS シリカに吸着した 2EH の構造情報をスペクトルとして観測できる可能性を示唆している。

次に、DNP を用いずに測定した 2EH, ODS シリカと 2EH+ODS シリカのスペクトル、および、DNP で感度を向上させた 2EH+ODS シリカのスペクトルを Fig. 3 に示す。DNP による感度増大によって得られる 2EH+ODS シリカのスペクトルでは、原料や DNP を用いない場合には観測されなかったシグナルのシフトを観測した（図中 c, d）。さらにカルボニル炭素由来のシグナル（図中 a, b）は強度比が異なることがわかった。これは ODS シリカとの相互作用によって、2EH がバルクとは異なる構造をとることで、シグナルのシフトを生じていることを示唆している。疎水鎖の根元の炭素に由来するシグナル c のシフト幅が大きいため、ODS シリカに吸着した 2EH はアルキル鎖の根元の炭素が関係するバルクとは異なる構造をとることで、優れた濡れ特性を発現すると推察する。DNP を用いない 2EH+ODS シリカのスペクトルではシグナルのシフトが観測できていないことから、この結果は DNP-NMR を用いることで初めて明らかとなったと考える。

当日は、ODS シリカへの吸着によって生じた 2EH シグナルのシフトがどのような構造変化に起因するかについて議論する。さらに、濡れ性が異なる 2EH の類縁体を用いた場合のシグナルのシフトの有無や、ODS シリカに吸着した時の界面活性剤と ODS シリカの DNP 条件下での緩和時間測定による分子運動性の比較を行い、2EH の優れた濡れ性の発現に重要な因子について検討した内容について報告する。

Reference

(1) Du, A., Mao, J., Wang, D., Hou, C., Lin, C., Yang, X., Cao, H. and Mao, J. Wettability Alteration at a Water-Wet Quartz Surface by a Novel Trimeric Surfactant: Experimental and Theoretical Study. *Journal of Molecular Liquids* 354, 118771 (2022).

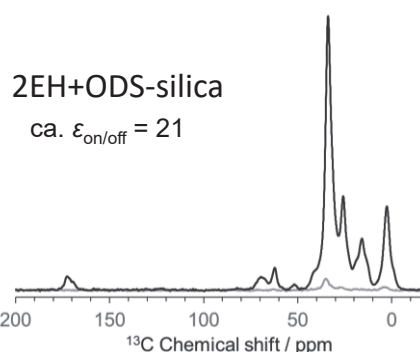


Fig. 2. DNP-NMR spectra of ODS-silica adsorbed with 2EH. Black: MW=on. Gray: MW=off.

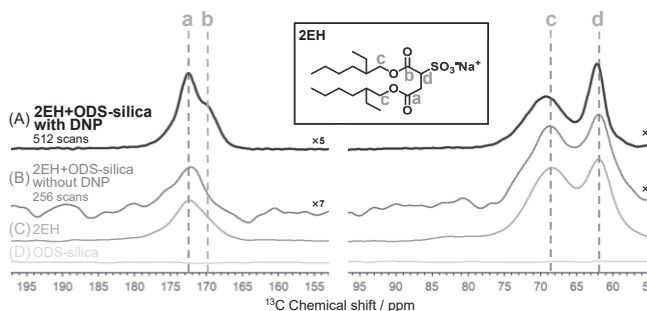


Fig. 3. ^{13}C CP/MAS spectra of (A) 2EH+ODS-silica with DNP, (B) 2EH+ODS-silica without DNP, (C) 2EH without DNP and (D) ODS-silica without DNP.

P63

常磁性NMRを用いた根粒菌マルチドメイン蛋白質FixJの立体構造解析

○大久保里佳¹, 池谷鉄兵¹, 渡邊吏輝¹, 菱倉直樹¹, 三島正規^{1,*}, 猪股晃介¹,
小手石泰康², 澤井仁美², 城 宣嗣², 伊藤 隆¹
¹東京都立大学大学院・理学研究科, ²兵庫県立大学大学院・生命理学研究科
*東京薬科大学・薬学部

A paramagnetic NMR study of a rhizobial multi-domain protein, FixJ

○Rika Okubo¹, Teppei Ikeya¹, Riki Watanabe¹, Naoki Hishikura¹, Masaki Mishima^{1,*}, Kohsuke Inomata¹,
Hiroyasu Koteishi², Hitomi Sawai², Yoshitsugu Shiro², and Yutaka Ito¹

¹Department of Chemistry, Tokyo Metropolitan University; ²Department of Life Science, University of Hyogo; *Present address: School of Pharmacy, Tokyo University of Pharmacy and Life Science

Bradyrhizobium diazoefficiens FixJ is a multidomain protein and involved in a two-component signal transduction system with an oxygen sensor Fix. This system regulates the transcription of nitrogenase and subsequent nitrogen fixation in response to oxygen concentration in a surrounding environment. While the 3D structure of FixJ has been determined by X-ray crystallography, the SAXS data suggested that the global conformation of FixJ in solution is clearly different from that in crystal. To understand the structural basis of the FixJ-FixL regulation mechanism at work in intracellular environment, we first initiated the structure determination of the FixJ monomer in solution. By introducing paramagnetic metal-binding tags at several locations of FixJ we measured PREs and PCSs which provide sufficiently long-range structural constraints for determining domain orientations. Here, we show the current solution structure of FixJ based on the paramagnetic data and discuss the molecular recognition mechanisms of FixJ with FixL.

【序論】

大豆根粒菌のマルチドメイン蛋白質FixJは、酸素センサーであるFixLと二成分情報伝達システムを形成し、酸素濃度に応じたニトロゲナーゼ遺伝子の転写制御を行う。FixJ-FixL情報伝達機構の構造的基盤を明らかにするために、第一段階としてFixJの溶液構造の解析を試みた。全長FixJのX線結晶構造は既に報告されているが[1]、溶液中のX線小角散乱による解析では、N末端のRECドメイン(FixJN)とC末端のDNA結合ドメイン(FixJC)との相対配置が異なる結果が得られていた[1]。そこで本研究では、生理的条件下での構造・機能相関の解明を目指し、溶液NMRを用いたFixJの立体構造決定を試みた。

一般にNOEを用いた解析だけでは、マルチドメイン蛋白質のドメイン間相対配置を決定することは困難である。本研究では、FixJに常磁性金属タグを導入し、paramagnetic relaxation enhancement (PRE)および, pseudocontact shift (PCS)を観測することで得られる長距離の構造情報(約10~40Å)を用いて、立体構造計算を試みた。

【実験】

²H/¹³C/¹⁵N標識FixJ試料をもちいてTROSY型の3D 三重共鳴NMRスペクトルを測定し、主鎖NMR

常磁性NMR, 立体構造, マルチドメイン蛋白質

○おおくぼりか, いけやてっぺい, わたなべりき, ひしくらなおき, みしままさき,
いのまたこうすけ, こていしひろやす, さわいひとみ, しろよしつぐ, いうゆたか

シグナルの帰属を行った。次に、常磁性タグによる化学修飾のために、 ^{15}N 標識をした2つのCys変異体試料C51S/S129C、C51S/S26Cを調製した。この試料にMTSLあるいはランタノイド(Ln^{3+})結合タグDO3MAを導入し、PREとPCSの測定を行った。得られた距離・角度情報を利用して、CYANAプログラムを用いて立体構造計算を行った。ドメイン内の距離拘束は、結晶構造より得た。

また、側鎖 $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ シグナルを帰属し、ドメイン内の距離拘束もNOE由来の距離情報に置き換えるため、 $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 標識試料をもちいて3D ^{13}C -separated NOESY, 3D ^{15}N -separated NOESY, H(CCCO)NH, CC(CO)NH, HCCH-TOCSY, HBHA(CBCACO)NHなどの測定と解析を行った。

【結果、考察および展望】

主鎖NMRシグナルに関しては、プロリン残基を除いた196残基中、152残基(78%)の帰属に成功した(Fig. 1)。この帰属に基づいて解析を行うことで、PREおよびPCS情報を得た。Fig. 2には、FixJ(C51S/S129C)変異体について得られたPREデータを示した。これらPRE由来の距離情報と、PCS由来の距離・角度情報、および結晶構造由来のドメイン内距離拘束を用いてCYANAプログラムを用いて計算を行った結果、結晶構造と有意な差がある立体構造が得られた。

現在、FLYAプログラムを併用することで側鎖NMRシグナルの帰属を行っており、3D NOESYスペクトルの解析によって

溶液状態でのドメイン内距離拘束取得を進めている。さらに、C51S/S142C変異体など新たなCys変異体を調製することで、より多くのPRE、PCS情報を取得し、正確かつ精密な溶液構造の決定を目指す。

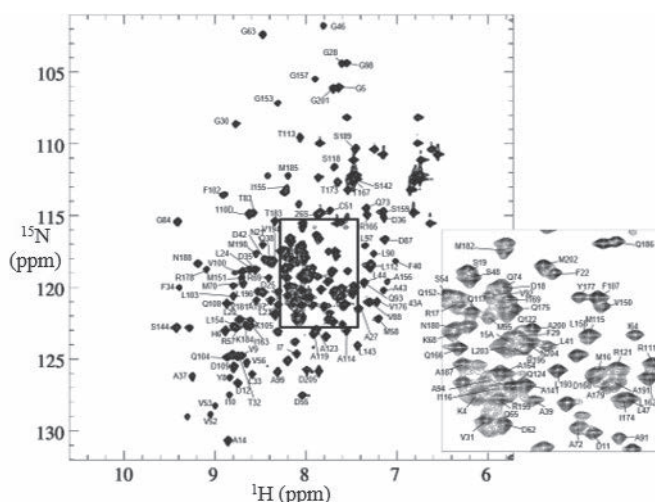


Fig. 1 ^1H - ^{15}N TROSY HSQC spectrum of $^2\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -labelled FixJ at pH 8.0 and 298K.

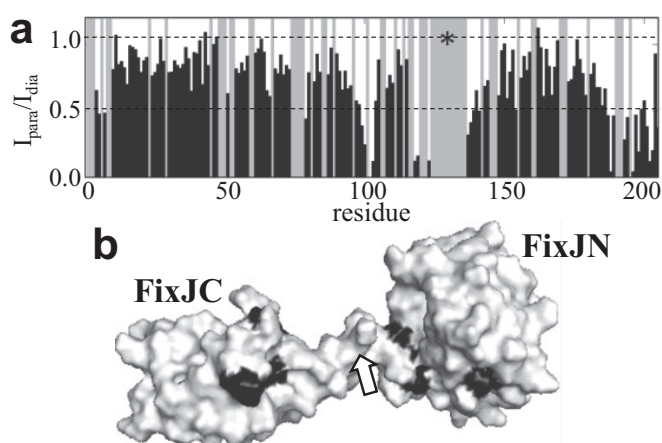


Fig. 2 PRE analysis of FixJ(C51S/S129C). **a**, NMR signal intensity ratio derived from PRE measurement. Unassigned and proline residues are coloured in grey. **b**, The regions where strong PREs were observed (black) are mapped on the current solution structure of FixJ. The asterisk and arrow indicate the position of the paramagnetic centre.

Reference

[1] Wright et al., Sci. Signal. 11, eaaq0825 (2018)

P64Y

残基特異的な熱力学・速度論解析が明らかにする spectrin SH3 ドメインのフォールディング機構

○林成一郎¹, 藤浪大輔², 神田大輔¹

1 九州大学・生体防御医学研究所

2 静岡県立大学大学院・薬食生命科学

Reduced cooperativity of spectrin SH3 domain folding revealed by combined per-residue thermodynamic and kinetic analysis

○ Seiichiro Hayashi¹, Daisuke Fujinami², Daisuke Kohda¹

¹ Med. Inst. Bioreg., Kyushu Univ

² Grad. Sch. Integr. Pharm. Nutr. Sci., Univ. Shizuoka

In our previous NMR study, we found the dispersions of residue-specific equilibrium constants (K) and rate constants (k) of the two-state exchange of an antimicrobial peptide, nukacin ISK-1. The dispersions of K and k imply reduced cooperativity. Interestingly, we discovered a linear free energy relationship (LFER) in the $\log k$ vs. $\log K$ plot. We consider that the residue-based LFER is the physicochemical basis for the smooth conformational changes and provides useful insights into the transition states. One might argue that nukacin is atypical due to the presence of three monosulfide bonds and the high similarity between the two state structures. To address this issue, we conducted the same NMR experiments with an SH3 domain and found that the reduced cooperativity in the case of a simple protein.

黄色ブドウ球菌由来の抗菌性ペプチドである nukacin ISK-1 は溶液中で状態Aと状態Bの2つの構造をとる^[1].

¹⁵Nで安定同位体標識した nukacin ISK-1 の ¹H-¹⁵N HSQC ス

ペクトルを測定すると、同一のスペクトルから2つの状

態に由来するピークが同時に観測される。各アミノ酸

残基に由来するピークを比較すると、2状態間のピーク

強度の比が残基ごとに明らかに異なっていた。これは

完全な共同性を仮定する2状態交換モデルが成り立って

いないことを示している。そこで状態Aと状態Bの2状態

交換についてアミノ酸残基レベルで詳細に調べるため

のNMR実験を行なった。まず、2状態間の平衡定数 K を

求めた。通常、 K はHSQCの2状態のピークの体積比として

求める。しかし、2状態間で緩和速度 R_1 , R_2 が異なる

場合、ピーク強度を使って単純に計算した K は真の値からずれてしまう。本研究では、正確な

平衡定数を求めるためにHSQC0法を用いた。HSQC0法は Markley らのグループによって開発さ

れた2次元NMRの定量的な解析手法であり、パルス系列中の緩和の影響を除くことができる^[2]。

具体的には、通常のHSQCであるHSQC1の測定に加えて、HSQCのパルス系列を2回、3回と

EXSY, HSQC0, 直線自由エネルギー関係

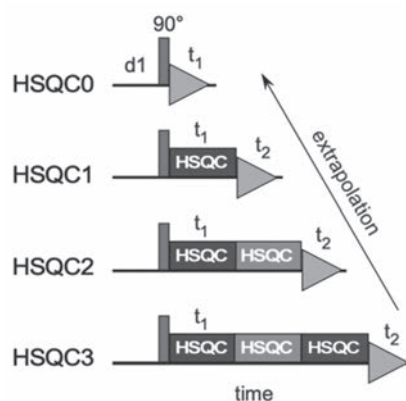


Fig. 1. Schematic of the HSQC0 analysis.

○はやしせいいちろう, ふじなみだいすけ, こうだだいすけ

繰り返した HSQC2 及び HSQC3 の合計 3 種類の測定を行い、その外挿値として真のピーク強度を求める(Fig. 1). HSQC0 法を用いた解析の結果, K はすべての残基で異なる値を示した^[3]. さらに, アミノ酸残基レベルでの交換速度定数 k を EXSY 測定-II解析の組み合わせで決定した^[4]. II解析は Palmer らによって報告された EXSY の解析法であり, 2 状態間の緩和速度の違いをキャンセルすることができる. 交換速度定数も平衡定数と同様にアミノ酸残基間で分布を持つことがわかった. このことから, 一本のポリペプチド鎖内の高い共同性が成り立っていないことが明らかとなった. さらに, $\log k$ vs. $\log K$ プロットを作成すると, アミノ酸残基レベルの直線自由エネルギー関係 (residue-based Linear Free Energy Relationship ; rbLFER) が成り立つことを見出した. 過去に報告されているタンパク質の LFER は各データ点がアミノ酸置換体由来のものである. それに対し, 本研究の rbLFER は“単一のポリペプチド由来する新しいタイプの LFER”であり, 過去に報告例がない. rbLFER は状態 A, 状態 B, 遷移状態の 3 つ状態の関係性を示すものであり, 傾きの値 ρ は反応座標上の遷移状態の位置を表す. 解析できた残基の中には回帰直線からの外れ値は無く, このことから, 遷移状態には non-native 構造が存在しないと考察した.

Nukacin の rbLFER の解析から以上の知見を得ることができたが, nukacin には通常のタンパク質には見られない特殊な翻訳後修飾 (3 本のモノ S 結合) が含まれている. また, 状態 A と状態 B の構造が類似しているために例外的に共同性が低く, そのため rbLFER が見られるのかもしれない. そこで, nukacin と同様の手法を用いて単純タンパク質のフォールディングの NMR 解析を行った. 単純タンパク質として spectrin SH3 ドメインを選定した. ¹⁵N で安定同位体標識した spectrin SH3 ドメインの ¹H-¹⁵N HSQC スペクトルを測定すると, 同一のスペクトル上に天然状態 (F 状態) と変性状態 (U 状態) に由来する 2 組のピークが観測された. HSQC0 と EXSY 測定-II解析を用いて解析を行うと, spectrin SH3 ドメインにおいても K や k は残基間で分布を持ち, 分子内の共同性は完全ではなかった.

References

- [1] Fujinami, D, -Mahin, AA, Elsayed, KM, Islam MR, Nagao JI, Zendo T, Kohda D*, Sonomoto K*. (2018) The lantibiotic nukacin ISK-1 exists in an equilibrium between active and inactive lipid-II binding states. *Commun Biol.* 1: 150.
- [2] Kaifeng Hu, William M. Westler, and John L. Markley. (2011) Simultaneous Quantification and Identification of Individual Chemicals in Metabolite Mixtures by Two-Dimensional Extrapolated Time-Zero ¹H-¹³C HSQC (HSQC0). *Journal of the American Chemical Society.* 133: 1662-1665.
- [3] Miloushev VZ, Bahna F, Ciatto C, Ahlsen G, Honig B, Shapiro L, Palmer AG 3rd. (2008) Dynamic properties of a type II cadherin adhesive domain: implications for the mechanism of strand-swapping of classical cadherins. *Structure.* 16: 1195-205.
- [4] Hayashi S, Kohda D. (2022) The time-zero HSQC method improves the linear free energy relationship of a polypeptide chain through the accurate measurement of residue-specific equilibrium constants. *J Biomol NMR.* 7: 87-94.

P65

重元素のNMR化学シフト濃度変化に関するDFT計算: 相対論効果に基づく観測原子核内での電子スピン密度の現れ

○朝倉由光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

DFT Calculations for Concentration Changes in Heavy-Element Chemical Shifts: Manifestation of Electron Spin Density in Observed Nuclei Based on Relativistic Effects

○Yoshimitsu Asakura¹, Daisuke Kuwahara¹, Naoya Nakagawa¹

¹*Department of Applied Physics, Graduate School of Informatics and Engineering, The University of Electro-Communications*

The NMR chemical shifts for monatomic cations ionized from salt in aqueous solutions often change with the solution concentration. These changes are referred to herein as dilution–concentration (dc) shifts. We calculated the dc shifts for various cations in aqueous nitrate solutions of elements in periods 5 and 6 by the DFT method based on the spin–orbit ZORA Hamiltonian. Furthermore, the electron spin densities of the cations in aqueous nitrate solutions under an external magnetic field were calculated using the matrix/modified Dirac–Kohn–Sham Hamiltonian. We succeeded in clarifying how the dc shifts occur on the hydrated ions of heavy elements.

NMR化学シフト δ は基準物質核と観測核それぞれの核磁気遮蔽定数 σ_{ref} , σ_{sample} の差として定義される。

$$\delta = \sigma_{\text{ref}} - \sigma_{\text{sample}} \quad (1)$$

遮蔽定数 σ は核を取り巻く電子の状態、すなわち分子構造を鋭敏に反映する。いま、塩を溶液に溶かし、電離によって単原子カチオンとなった核の共鳴線を観測する場合を考える。溶液NMRでは古くから、溶液中の塩の濃度によってその単原子カチオン核の共鳴周波数が変化することが報告されてきた。この現象は次の事実によって説明がなされている: (i) 高濃度においては、溶媒分子と錯イオンを形成している単原子カチオンのうち一部が、電離していたアニオンと結合によって新たな錯イオンを形成する。(ii) その錯イオン構造がNMRの時間スケールに比べ十分な速さで元に戻るために平均化された共鳴線が観測される。他方、共鳴周波数の濃度変化の実験値を見ると、重元素の単原子カチオンほど濃度変化の値が大きくなっている傾向が見て取れる。理論的に、 σ は相対論的な項を含んでいるため、上記の傾向には相対論が関係している。我々は、金属硝酸塩を水に溶かした系に着目し、化学シフトに関して量子化学計算を行った。まず観測核である単原子カチオンの周りに水分子のみが結合している水和イオンのモデル(希釈モデル)と、単原子カチオンに対し硝酸イオンが1つ結合した水和イオンのモデル(濃縮モデル)を用意した。2つのモデルを構造最適化したのち、Zeroth order regular approximationハミルトニアンを用いたDFT計算によってそれぞれの遮蔽定数を計算し、その差(dilution–concentration shift, dcシフト) $\delta^{(\text{dc})}$ を求めた。結果をFig. 1.に示す。注目すべきことは、最外殻電子配置が $6s^2$ の重元素においてdcシフトが、3次の摂動(軌道ゼーマン相互作用、スピン軌道相互作用、フェルミ接触相互作用)に由来化学シフト、相対論的量子化学計算、電子スピン密度

○あさくらよしみつ, くわはらだいすけ, なかがわなおや

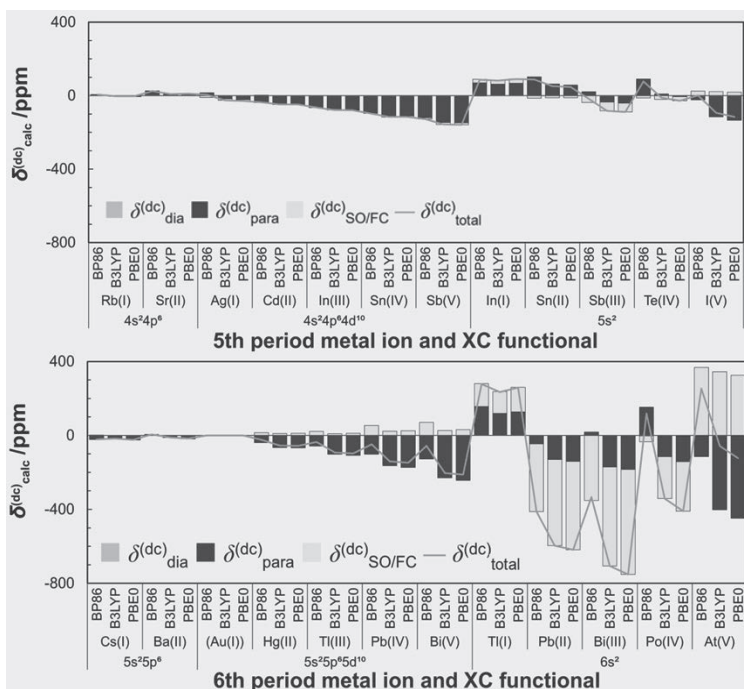


Fig. 1. Calculated dc shifts for monoatomic cations in aqueous nitrate solutions of elements in periods 5 and 6, excluding most of the transition elements.[1]

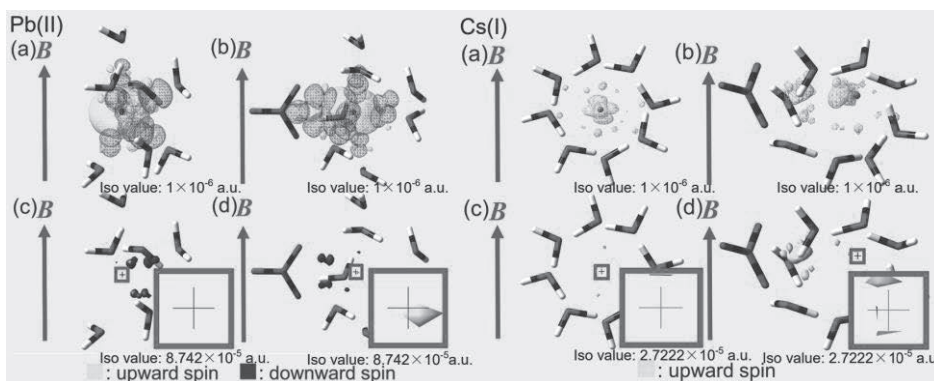


Fig. 2. Fermi contacts between the nuclei of metal ions and spin-polarized electrons in aqueous nitrate solutions.[1]

用いた。Pb(II)の(d) (濃縮モデル)は、電子スピン密度のIsometric valueが 8.742×10^{-5} a. u.の箇所を示しているが、赤枠の拡大図より、上向きスピンの電子と鉛原子核が接触していることがはっきりと見て取れる。この結果はFig. 1.のPb(II)の $\delta_{\text{SO/FC}}^{(\text{dc})}$ のシフト方向と確かに一致している。また $\delta_{\text{SO/FC}}^{(\text{dc})}$ がほとんどないCs(I)では、Pb(II)よりも小さいIsometric valueで核近傍の電子スピン密度がなくなっている、ということも確認できる。以上、本研究は重元素を含む溶液における共鳴周波数の実験データが、分子間の相互作用と相対論効果に大きく支配されていることの一例を示した。測定の再現性のためには、溶質の濃度を記録することが不可欠と言えるだろう。また heavy-atom effect on the light-atom という観点からは、重元素を含む溶液に基準物質を投入することが基準物質のシフトに予期せぬ変化をもたらす、ということにも留意しなければならない。

References

- (1) Y. Asakura, D. Kuwahara, N. Nakagawa, *Journal of Computer Chemistry, Japan -International Edition* 2022, 8, 2021.

する遮蔽定数 $\sigma_{\text{SO/FC}}$ の差 $\delta_{\text{SO/FC}}^{(\text{dc})}$ により決まっていることである。最外殻電子配置 $6s^2$ の重元素にだけこうした特徴が現れる理由は、以下の要素の複合の結果にあると考えた: まず分子構造の変化に起因する要素として、①硝酸イオンとの結合により、2つのモデル間で重元素のマリケン電荷が0.1~0.4ほど変化すること。続いて $\sigma_{\text{SO/FC}}$ のメカニズムに関する要素として、②外部磁場によって価電子軌道に軌道角運動量をもった励起状態が混入し、スピン軌道相互作用によるスピン分極が起こること、③スピン軌道相互作用が原子番号に依存すること、④価電子軌道に強く存在するs性によりフェルミ接触相互作用が生じること、である。

我々はさらにPb(II)とCs(I)を例とし、外部磁場のもとでの分子の電子スピン密度をDFT計算し、可視化した(Fig. 2)。ハミルトニアンにはmatrix/modified Dirac-Kohn-Sham ハミルトニアンを

P66Y ミューオピオイド受容体のアロステリックモジュレーターによる活性化機構の解明

○金子舜^{1,2}, 今井駿輔¹, 浅尾信央^{1,2}, 幸福裕², 上田卓見², 嶋田一夫¹

1 理化学研究所・生命機能科学研究センター

2 東京大学大学院・薬学系研究科

Activation mechanism of the μ -opioid receptor by an allosteric modulator

○Shun Kaneko^{1,2}, Shunsuke Imai², Nobuaki Asao^{1,2}, Yutaka Kofuku², Takumi Ueda², Ichio Shimada¹

¹ RIKEN Center for Biosystems Dynamics Research

² Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo

The allosteric modulators, which bind to nonorthosteric sites to enhance the signaling activities of G-protein-coupled receptors (GPCRs), are new candidates for GPCR-targeting drugs. Our solution NMR analyses of the μ -opioid receptor (MOR) revealed that the MOR activity was determined by a conformational equilibrium between three conformations. Interestingly, an allosteric modulator shifted the equilibrium toward a conformation with the highest activity to a level that cannot be reached by orthosteric ligands alone, leading to the increased activity of MOR. Our NMR analyses also identified the binding site of the allosteric modulator, including the residues contributing to the regulation of the equilibrium. These findings provide insights into the rational developments of novel allosteric modulators.

Gタンパク質共役型受容体 (GPCR) は、米国食品医薬品局承認薬の標的の30%以上を占める、創薬標的として重要な膜タンパク質ファミリーである。GPCR標的薬のほとんどは細胞外にあるリガンド結合ポケットに結合してGPCRを活性化し、この時にどれだけGPCRがシグナルを伝達するかが実際の薬効と相関する。一方、GPCRのリガンド結合ポケットとは異なる部位に結合しそのシグナル伝達活性を上昇させる化合物をアロステリックモジュレーターと呼ぶ。アロステリックモジュレーターがアゴニストと共にGPCRに結合すると、GPCRはアゴニスト単独結合時よりも強く活性化することから、アロステリックモジュレーターはより薬効度の高い薬剤候補として期待されている。これまでにクライオ電子顕微鏡解析やX線結晶構造解析により複数のGPCRについてアロステリックモジュレーター結合時の構造が決定されているものの、これらの構造ではアロステリックモジュレーター添加に伴うGPCRの構造変化は、その結合部位近傍を除いてほとんど観測されていなかった。このことから、より薬効度の高いGPCR標的薬を合理的に設計するうえで、アロステリックモジュレーターの結合によってなぜアゴニスト単独結合時よりもGPCRが強く活性化するのかを理解することが重要な課題であった。

近年、GPCRが複数構造を交換する動的な性質を持ちその動的性質が活性に重要であること、こうした動的性質の解析に溶液NMR法が効果的であることが示されている[1]。そこで本研究では、アロステリックモジュレーターによるGPCRの活性化機構を明らかにするため、代表的なGPCRの1種である μ オピオイド受容体 (MOR) を対象に溶液NMR法による解析を行った[2]。メチオンinメチル基を¹³C標識したMORを調製し、様々なリガンド存在下でのアロステリックモジュレーターBMS-986122添加前後での¹H-¹³C HMQCスペクトルを測定した結果、M283由来のNMRシ

Gタンパク質共役型受容体, solvent PRE, 構造平衡

○かねこしゅん, いまいしゅんすけ, あさおのおあき, こうふくゆたか, うえだたくみ, しまだいちお

グナルが最大で3個観測され各シグナルの存在比が条件により変化したことから、MORのM283近傍が3状態を交換する構造平衡中にあることが示された(**Fig. A**)。各条件でのMORの活性とM283由来の3つのシグナルの存在比の比較から、構造平衡中の3状態がそれぞれ活性の異なる状態を反映しておりその存在比がMORの見かけの活性を規定することが示された。BMS-986122添加時には構造平衡中の最も活性の高い構造の存在比が増加していたことから、BMS-986122がMORの構造平衡をシフトさせることでシグナル伝達活性を上昇させることが示された。

また、MORのメチオニンのうち、M153, M163, M245のNMRシグナルにBMS-986122添加に伴う顕著な化学シフト変化もしくは広幅化が観測されたことから、これらの残基近傍にBMS-986122が結合することが示唆された。これらの残基近傍の分子表面はポケット状の構造を形成しており、このポケットを形成する残基に変異を導入したT162M変異体ではBMS-986122による活性上昇が観測されなくなったことから、BMS-986122がT162近傍のポケットに結合することが示された。

以上の結果より、以下のモデルを提唱する。T162があるTM3は、活性と関連する構造平衡が観測されたM283が存在するTM6と膜貫通領域にて隣接しており、BMS-986122がTM3とTM6の間の相互作用に摂動を与えることでTM6の構造平衡を制御している。細胞外側ポケットに結合するリガンドでは、この膜貫通領域の相互作用領域まで効率的に構造変化を伝播できないためTM6の構造平衡を完全には偏らせることが出来ない一方で、アロステリックモジュレーターは膜貫通領域の相互作用を直接変調することで従来のリガンドよりも活性の高い構造の存在比を増加させ、MORのシグナル伝達活性を上昇させることが出来る (**Fig. B, C**)。これらの結果は、GPCR関連疾患に対する有効な新規治療薬の開発方針を提示するものである。

[1] Shimada I, Ueda T, Kofuku Y, Eddy MT, and Wüthrich K. (2019) GPCR drug discovery: integrating solution NMR data with crystal and cryo-EM structures. *Nat. Rev. Drug Discov.* 18(1):59-82.

[2] Kaneko S, Imai S, Asao N, Kofuku Y, Ueda T, and Shimada I. (2022) Activation mechanism of the μ -opioid receptor by an allosteric modulator. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 119(16):e2121918119.

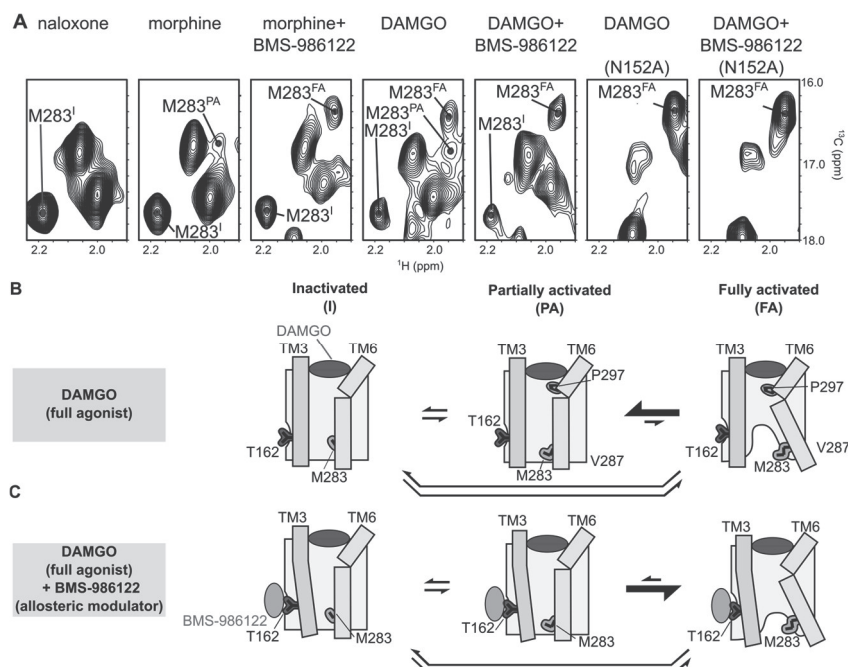


Fig. A. ^1H - ^{13}C HMQC signals from M283 of MOR or N152A variant in the antagonist naloxone-bound, the partial agonist morphine-bound, and the full agonist DAMGO-bound states, in the absence and presence of the allosteric modulator BMS-986122. N152A variant has higher activity than parental MOR. **Fig. B, C.** Models of function-related conformational equilibrium of MOR in the full agonist DAMGO-bound state (B) and the DAMGO-bound state in the presence of BMS-986122 (C).

P67

マルチドメイン蛋白質GRB2とSOS1-PRM領域の相互作用解析

○館野桂太¹, 菅澤はるか¹, 安藤孝史¹, 田端真彩子¹, 美川 務², 猪股晃介¹, 甲斐荘正恒¹, 三島正規^{1,*}, 杉田有治³, 池谷鉄兵¹, 伊藤 隆¹
¹東京都立大学・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, ³理化学研究所・杉田理論分子科学研究室
*東京薬科大学・薬学部

Solution NMR analysis reveals different binding modes on the interaction between a human multi-domain protein GRB2 and human SOS1-PRMs

○Keita Tateno¹, Haruka Sugasawa¹, Takami Ando¹, Maako Tabata¹, Tsutomu Mikawa², Kohsuke Inomata¹, Masatsune Kainosho¹, Masaki Mishima^{1,*}, Yuji Sugita³, Teppei Ikeya¹, and Yutaka Ito¹

¹Department of Chemistry, Tokyo Metropolitan University; ²RIKEN Center for Biosystems Dynamics Research; ³Theoretical Molecular Science Laboratory, RIKEN; *Present address: School of Pharmacy, Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences

Human GRB2 is one of the key mediators in the MAPK signal pathway and transmits a signal from a receptor Tyr kinase on the transmembrane to SOS1, a RAS guanine nucleotide exchange factor (GEF). Recent studies show that GRB2 is also a major component for liquid-liquid phase separation (LLPS) in the MAPK signalling by acting as a scaffold for other proteins. While the interactions among two SH3 domains of GRB2 and ten putative proline-rich motifs (PRMs) in the disordered region of SOS1 are thought to be crucial for the LLPS formation, its molecular recognition mechanism has not yet been revealed experimentally. We therefore investigated the structural basis of the GRB2-SOS1 interaction by NMR titration experiments of GRB2 with SOS1-derived proline-rich peptides as well as the whole disordered region of SOS1 containing all PRMs. Docking simulation based on the experimental data was also performed. Our results suggest that the two SH3 domains of GRB2 and ten putative PRMs of SOS1 interact with different binding affinities and yield complex networks in condensed droplets.

【序論】 ヒトGRB2は、3つのドメイン(NSH3-SH2-CSH3)で構成されるマルチドメイン蛋白質である。GRB2はMAPK経路に属しており、細胞膜上の受容体蛋白質からの刺激をRASのグアニンヌクレオチド交換因子(GEF)であるSOS1に伝える役割を持つ。GRB2の2つのSH3ドメインは、SOS1のC末端天然変性領域にあるproline rich motifs (PRMs)と結合することが知られている。SOS1のPRMとしては10か所(S1-S10)が推定されており[1], GRB2-SOS1複合体形成では、複数の異なる結合を介した多面的な相互作用モデルが提案されている(**Fig. 1**)。近年、GRB2とSOS1は、膜受容体であるLAT (linker for activation of T cells)と3分子で液液相分離(LLPS)を形成することが報告され、これが細胞内シグナル伝達の強弱

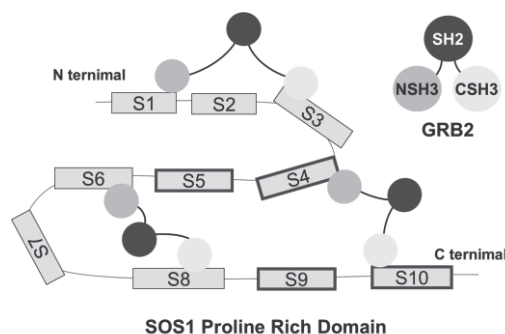


Fig. 1 A schematic illustration of the putative model on the molecular interaction in the LLPS formation via GRB2 and SOS1 proline rich motifs (PRMs). The S1-S10 represent PRMs. The boxes surrounded by bold lines indicate PRMs used as SOS1-derived peptides in this study.

相互作用解析, マルチドメイン蛋白質, LLPS

○たてのけいた, すがさわはるか, あんどうたかみ, たばたまあこ, みかわつとむ, いのまたこうすけ, かいのしょうまさつね, みしままさき, すぎたゆうじ, いけやてつぺい, いとうゆたか

を調節している可能性が示唆されている[2]. こうしたMAPKシグナルの伝達とLLPSの形成には, GRB2-SOS1間の複数の架橋構造が必須であると考えられるが, これまでの報告では, GRB2の各SH3ドメイン単体とSOS1由来のPRMペプチドを用いた解析しかなく[1], 全長GRB2およびSOS1のPRMsを含む領域全体を用いた詳細な相互作用解析が期待されていた.

そこで本研究では, 全長GRB2とSOS1のPRMペプチド, およびSOS1 C末端領域とのNMR滴定実験を行うことで, GRB2の2つのSH3ドメインと, 複数のSOS1 PRMとの協奏的相互作用の解明を試みた.

【実験】 ^{15}N 標識 GRB2 に対する非標識 SOS1 との NMR 滴定実験を行った. SOS1 試料としては, 10 か所の PRM のうち, 結合親和性の高いと予想されている 4 種類のペプチドと, 10 か所すべての PRM を含む SOS1 C 末端領域全体を用いた. 具体的には, 既報を参考に [1], NSH3 ドメインに対して 1-3 番目に高い親和性を持つ S4, S5, S9 ペプチドと, 唯一 NSH3 ドメインより CSH3 ドメインとの結合能が高いとされる S10 ペプチドを選択した. また, GRB2 については, 安定性向上を図るため, 先行研究を参考に 2 つの Cys 残基を置換した GRB2 (C32S/C198A) を用いた [3].

【結果と考察】 SOS1 由来のペプチド滴定実験の結果, 2 つの SH3 ドメイン由来のピークに大きな化学シフト変化が観測された (Fig. 2a). また, TITAN ソフトウェアを用いて 2D 線形解析を行い, 各 SH3 ドメインに対する SOS1 ペプチドの解離定数 (K_D) を計算した (Fig. 2b).

解析の結果, S4, S5, S9 は NSH3 ドメインに, S10 は CSH3 ドメインにより強く結合することがわかった. 得られた K_D の傾向は, GRB2 の SH3 ドメイン単体を利用した既報 [1] の結果と同様であることが分かった.

SOS1 C 末端領域を用いた滴定実験では, 主に GRB2 SH3 ドメインにおいてピークの減衰が観測された (Fig. 3a & 3b). また, ピークの減衰は CSH3 ドメインの残基よりも NSH3 ドメインの残基が優先的に起こることから, SOS1 は CSH3 ドメインよりも NSH3 ドメインと強く結合していることが示唆された. これは, SOS1 内に NSH3 ドメイン特有の結合モチーフ (PxxPxR) がある一方で, CSH3 ドメイン特有の結合モチーフ (PxxxRxxKP) が存在しないという既報の結果を支持するものである.

現在は, 溶液中での GRB2 と SOS1 C 末端領域のより詳細な分子認識機構を明らかにするために, メチル基選択的標識試料を利用した滴定実験や, 実験データをドッキングシミュレーションと組み合わせた解析に取り組んでいる.

【参考文献】 [1] Liao, T.-J. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **142**, 3401-3411 (2020); [2] Su, X. *et al.*, *Science* **352**, 595-599 (2016); [3] Yuzawa, S. *et al.*, *J. Mol. Biol.* **306**, 527-537 (2001).

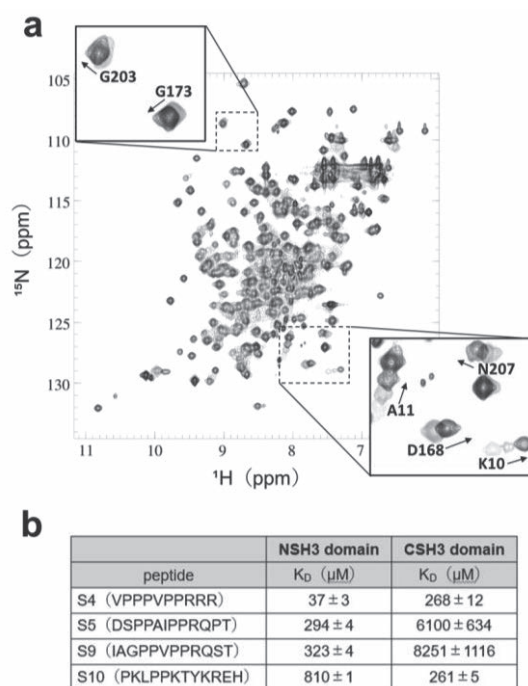


Fig. 2 NMR titration experiment of ^{15}N -GRB2 with SOS1 peptides. (a) Overlays of 2D ^1H - ^{15}N HSQC spectra from multipoint titrations of ^{15}N -GRB2 with S4 peptide. The colour codes showing the molar ratio of GRB2:S4 peptide are as follows: light grey (1:0), grey (1:0.5), and black (1:2). Representative cross peaks exhibiting large chemical shift perturbations are annotated in boxes. (b) K_D values for the SOS1 peptides calculated by using the TITAN software.

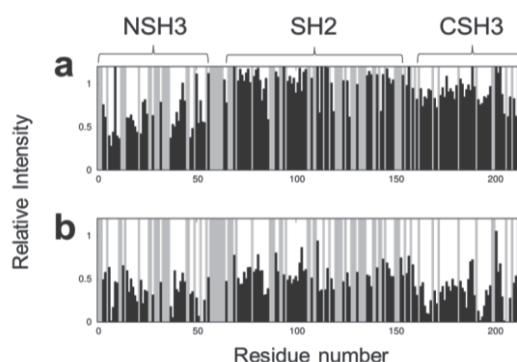


Fig. 3 Intensity ratios from NMR titration experiments of ^{15}N -GRB2 with SOS1 C-terminal disordered region. Unassigned residues are shown in grey. GRB2:SOS1 = 1:0.125 (a) and GRB2:SOS1 = 1:1 (b)

P68Y

常磁性NMRを用いたマルチドメイン蛋白質GRB2の立体構造解析

○安藤考史¹, 菅澤はるか¹, 館野圭太¹, 田端真彩子¹, 美川 務², 宮野入洋平³, 川端庸平⁴, Hisham Dokainish⁵, Weitong Ren⁵, 大出真央⁵, 寺内 勉⁶, 猪股晃介¹, 三島正規⁷, 甲斐荘正恒¹, 杉田有治⁵, 池谷鉄兵¹, 伊藤 隆¹
¹東京都立大学・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, ³大阪大学・蛋白質研究所, ⁴酪農学園大学・食と健康学類, ⁵理化学研究所・杉田理論分子化学研究室, ⁶太陽日酸・SIイノベーションセンター, ⁷東京薬科大学・薬学部

Structure determination of a human multi-domain protein, GRB2, by paramagnetic NMR

○Takami Ando¹, Haruka Sugasawa¹, Keita Tateno¹, Maako Tabata¹, Tsutomu Mikawa², Miyanoiri Youhei³, Youhei Kawabata⁴, Hisham Dokainish⁵, Weitong Ren⁵, Mao Oide⁵, Tsutomu Terauchi⁶, Kohsuke Inomata¹, Masaki Mishima⁷, Masatsune Kainosho¹, Yuji Sugita⁵, Teppei Ikeya¹, Yutaka Ito¹
¹Department of Chemistry, Graduate School of Science, Tokyo Metropolitan University
²RIKEN Center for Biosystem Dynamics Research
³Institute for Protein Research, Osaka University
⁴Department of Food Science and Human Wellness, Rakuno Gakuen University
⁵Theoretical Molecular Science Laboratory, RIKEN Cluster for Pioneering Research
⁶SI Innovation Center, Taiyo Nippon Sanso Corporation
⁷School of Pharmacy, Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences

Human GRB2 is one of the key mediators in the upstream process of the Ras-mediated signal transduction pathway. It consists of three functional domains, nSH3-SH2-cSH3, connecting with flexible linkers. While the 3D structure of GRB2 has been determined by X-ray crystallography, the studies of SAXS and MD simulation have proposed that the relative orientation of the domains and the inter-domain interactions in aqueous solution would be different from that in the crystal. The domain orientation is thought to be responsible for its biological functions and the formation of liquid-liquid phase separation (LLPS) via GRB2. Thus, we performed the protein structure determination of GRB2 using NOEs, paramagnetic relaxation enhancements (PREs), and residual dipolar coupling (RDCs) for inter-domain structural constraints. In addition to the conventional NMR structure calculation, we also addressed the multi-state structure determination since it was considered that various conformations exist in solution due to its flexible linkers.

【序論】 ヒトGRB2(217残基) は原がん遺伝子産物RASが関与するシグナル伝達経路で働くアダプター蛋白質である。3つの機能ドメイン (nSH3-SH2-cSH3) が柔軟なリンカーで繋がれたマルチドメイン蛋白質であり, SH2を介して受容体型チロシンキナーゼと, またSH3ドメインを介してproline rich motifを持つ蛋白質と結合することで情報を伝える。全長GRB2のX線結晶構造は既に報告されているが[1], X線小角散乱 (SAXS) や分子動力学 (MD) シミュレーションの結果からは, 溶液状態では結晶構造と異なったドメイン間相対配置を取る可能性が

立体構造, 常磁性NMR, マルチドメイン蛋白質

○あんどうたかみ, すがさわはるか, たてのけいた, たばたまあこ, みかわつとむ, みやのいりようへい, かわばたようへい, ひしゃむどかいにしゅ, れんうえいとん, おおいでまお, てらうちつとむ, いのまたこうすけ, みしままさき, かいのしょうまさつね, すぎたゆうじ, いけやてっぺい, いとうゆたか

示唆された[2]. また最近, GRB2を介した液液相分離 (LLPS)が複数報告されており, この相分離がシグナル伝達経路の信号強度を調整しているという議論もある[3]. こうしたGRB2を介した相分離の形成と乖離は, GRB2の3つのドメインの溶液中での相対配置が関与していると予想された. そこで本研究では, 生理的条件での構造・機能相関の解明を目指して, 常磁性NMRを用いたGRB2の立体構造解析を試みた. GRB2のドメイン相対配置は, 複数コンフォメーションが存在すると予想されたため, 複数状態を仮定したmulti-state立体構造計算を実行し, GRB2の溶液中でのアンサンブル構造の可視化を目指した. また, SAXSや動的光散乱 (DLS) の測定や, MDシミュレーションを実行し, NMR構造の検証も行った.

【実験】 GRB2試料としては, 2つのCys残基を置換したGRB2(C32S/C198A)を用い, NMR測定はEGFRおよびSOS1由来のペプチド存在下で行った. $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 均一標識試料に加えて, $^2\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 標識試料も調製し, 主鎖 $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 核および側鎖 $^{13}\text{C}^\beta$ 核の帰属のために, HN(CA)CBやHN(COCA)CBなど6種のTROSY型3D 三重共鳴NMR実験を行った. また, 側鎖 $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ 核の帰属のために, HBHA(CBCACO)NH, HCCH-TOCSYなどの実験を, NOE情報の解析のために, 3D ^{13}C -separated NOESY, ^{15}N -separated NOESYを測定した. 感度や分解能の低さから帰属が難しいSH2ドメインやリンカー部位のアミノ酸については, アミノ酸選択的Lys, Leu, Trp標識試料, およびメチル基選択標識試料を調製し, 各種NMRを測定することで帰属情報を補った. RDCは, PF1 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. PREは, Cys残基を新たに導入した3種の変異体A13C, S137C, N208Cを調製し, スピンラベルとしてMTSLを結合させることで取得した. PRE, RDC由来の距離・角度情報に加え, NOE由来の近距離情報, および化学シフト値から推定された二面角拘束情報を利用し, 立体構造計算ソフトウェアCYANAに実装したmulti-state立体構造計算を行った.

【結果と展望】 先行研究の帰属結果[4]も参照して, 3D NMRスペクトルを解析した結果, 約84%の主鎖NMRシグナルの帰属に成功した. 続いて, PREの測定結果(Fig.1)から, MTSLの結合部位を中心に, 複数の領域でPREによるピーク強度の減衰が観測された. 取得した情報を用いてmulti-state立体構造計算を行った結果, 得られたアンサンブル構造は, 3つドメインの相対配置が結晶構造とは大きく異なっていた(Fig.2). この結果から, 溶液状態では結晶中とは異なるドメイン間相対配置を取ることが明らかとなった. 現在, PCS情報の取得も試みており, SAXSやDLS, MDシミュレーションの結果と合わせて解析を進めることで, 溶液中でのより詳細な立体構造解析を目指す.

【参考文献】[1] Maignan, S. et al., Science, 1995, 268, 291-293; [2] Yuzawa, S. et al., J. Mol. Biol, 2001, 306, 527-537; [3] Chung, JK. et al., Biophys. J, 2021, 120, 1257-1265; [4] Yuzawa, S. et al., J. Biomol. NMR, 2003, 27, 185-186.

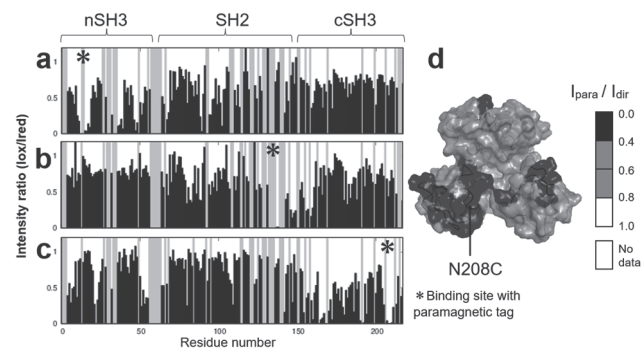


Fig.1 Residue resolved NMR signal intensity ratio derived from PRE measurements. (a) A13C mutant, (b) S137C mutant, (c) N208C mutant, (d) The PREs caused by MTSL-conjugation to GRB2 N208C are mapped on the GRB2 structure.

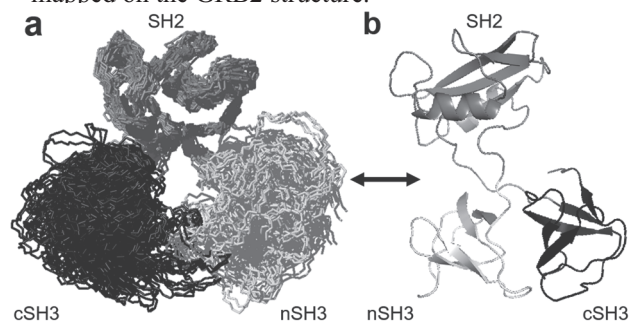


Fig2 (a) GRB2 ensemble structures calculated by multi-state structure calculation. (b) GRB2 crystal structure by X ray (PDB:1GRI). The domain orientation of the ensemble structures is different from the crystal structure.

P69

魚類へのマイクロプラスチック摂餌における代謝プロファイル安定性評価

○松永一太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

Evaluation of metabolic profile stability in fishes upon microplastics feeding

○Itta Matsunaga¹, Kenji Sakata², Jun Kikuchi^{1,2,3}

¹Graduate School of Medical Life Science, Yokohama City University

²RIKEN Center for Sustainable Resource Science

³Graduate school of Bioagricultural Sciences, Nagoya University

In recent years, the discharge of microplastics into rivers and oceans has been pointed out. Previously reported studies in environmental toxicology and other fields have been hypothesis-driven studies using vertebrate and invertebrate animals based on the assumption of biological effects, and there are not many examples of data-driven studies without hypotheses. In this study, we prepared several types and concentrations of feed containing microplastics and fed them to fish, and evaluate NMR metabolic profiles mainly in feces, which can be sampled noninvasively and simply, as well as in fish meat samples after the test. In doing so, we completely discarded the hypothesis of "biological effects" that is often seen in environmental toxicology and attempted to create stability indices using data-driven approaches such as energy landscape analysis.

【背景・目的】マイクロプラスチック(MP)は一般的に5 mm以下のプラスチック粒子と定義され、化粧品やスクラブ剤などに使用されるマイクロビーズと環境中に流出したプラスチック製品が紫外線、熱、風波の影響により細片化したものがある[1]。MPは河川・海洋を含む全球的な分布を示しており[2]、動物プランクトン、魚類[1]、鳥類そして哺乳類を含む水生生物の体内からも検出されており、生態系への影響が存在するという仮定の下で研究されてきた。しかし環境毒性学等の既報研究は、生体影響を前提とした脊椎・無脊椎動物を用いた仮説駆動型研究で、仮説無しのデータ駆動型研究例は多くなく、また現実の環境で測定されたマイクロプラスチック濃度と離れた条件での生体への影響を検討しているものがほとんど

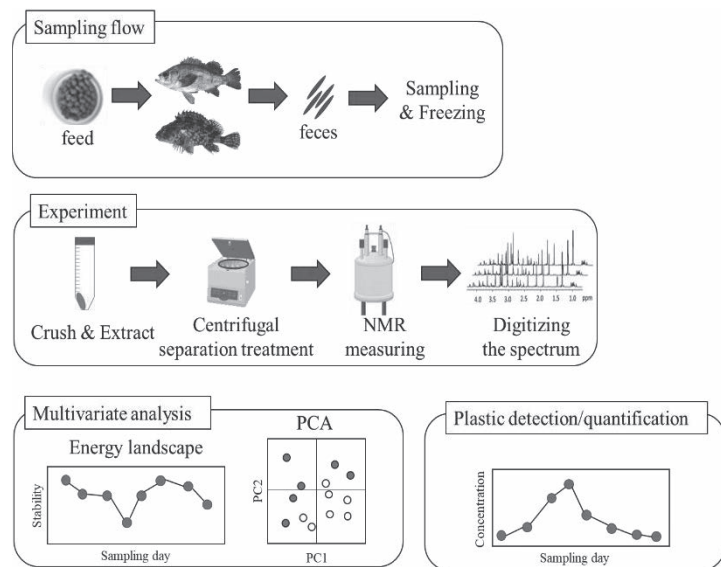


Fig. 1. Experimental scheme of this study.

非侵襲サンプリング、データ駆動型解析、エネルギー地形解析

○まつながいった、さかたけんじ、きくちじゅん

どである[3]。そこで本研究では複数種類のマイクロプラスチックを含む餌を異なる魚種に与え、非侵襲的かつ簡易的にサンプリング可能な糞便を中心に、さらに試験後の魚肉試料も含めてNMRの代謝プロファイルを評価する。この際に環境毒性学で散見される「生体影響がある」仮説を完全に取り払い、エネルギー地形解析等のデータ駆動型アプローチにより、安定性指標化を試みる。

【方法】 カサゴにポリエチレンテレフタレート(PET)濃度0.1%の混合飼料とコントロール飼料(プラスチックを含まない)を摂餌させ、メバルには生分解性プラスチック、すなわちポリカプロラク톤(PCL)、ポリエチレンサクシネート(PES)、ポリヒドロキシ酪酸(PHB)をそれぞれ濃度0.1%で混合させた3種類の飼料とコントロール飼料(プラスチックを含まない)を摂餌させ、糞便試料を採取した。それを凍結乾燥した後粉碎し、KPi/D₂Oに溶かし得られた上清みをNMRサンプルとし、溶液NMR(700 MHz)の2D-Jres計測により水溶性低分子群を計測した。NMRスペクトルを数値化し、統計計算ソフトRにより主成分分析(PCA)を行い、魚類における飼料およびMP入力の出力応答を評価した。既知濃度のPCL試料をクロロホルム溶媒で抽出し、700 MHzのNMRにより得られたシグナル強度を用いて検量線を作成した。糞便試料もクロロホルム画分のNMRシグナルを取得し、作成した検量線から糞便中におけるプラスチック濃度を算出した。

【結果・考察】 カサゴの0.1%PET摂餌実験における糞便代謝物の水溶性低分子群データを使用してPCAを行った結果、PC1軸の正の方向にPET摂餌時の代謝プロファイルが分布する傾向があった(Fig. 2a)。メバルの0.1%PCL、PES、PHB摂餌実験におけるPCA結果はコントロール飼料とMP混合飼料とではほとんど差異がなかった(Fig. 2b)。また

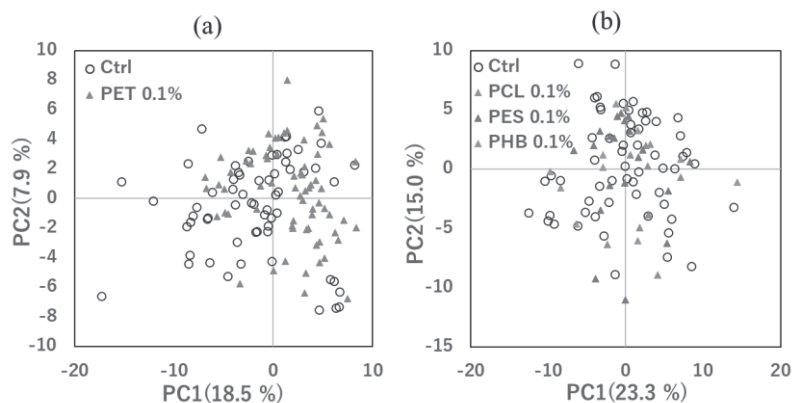


Fig. 2. Profiles of water-soluble fecal components evaluated by PCA. (a) Feeding 0.1% PET, (b) Feeding 0.1% PCL, PES and PHB.

MP検出に関して、PCL摂餌期間中は糞便から高い濃度でPCLが検出されているが、コントロール摂餌期間中は検出されなかった。淡水魚への10 μm以下のMP曝露実験では生体組織への蓄積報告があるが[4]、MPの直径が150~355 μmなら生体組織への蓄積はなく、糞便として排出される可能性があると考えられる。本会ではこれらの結果に加え、糞便中における代謝物のエネルギーランドスケープ解析による生物代謝の安定性評価も報告する。

References

- [1] Tanaka, K., Takada, H. Microplastic fragments and microbeads in digestive tracts of planktivorous fish from urban coastal waters. *Sci Rep* **6**, 34351 (2016).
- [2] Eriksen M, Lebreton LCM, Carson HS, Thiel M, Moore CJ, Borerro JC, et al. (2014) Plastic Pollution in the World's Oceans: More than 5 Trillion Plastic Pieces Weighing over 250,000 Tons Afloat at Sea. *PLoS ONE* **9**(12): e111913.
- [3] Isobe, A., Iwasaki, S., Uchida, K. et al. Abundance of non-conservative microplastics in the upper ocean from 1957 to 2066. *Nat Commun* **10**, 417 (2019).
- [4] Safoura Abarghouei et al. (2021) *Chemosphere* **276**,129977

P70Y

Bullet DNPを用いたピルビン酸の酵素反応実験

○望月佑紀¹, 深澤隼², 根来誠^{2,3}, 北川勝浩^{1,2}, 香川晃徳^{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・量子生命研究センター

3量子科学技術研究開発機構(QST)

Enzyme reaction experiment of pyruvic acid with bullet DNP

○Yuki Mochizuki¹, Jun Fukazawa², Makoto Negoro^{2,3}, Masahiro Kitagawa^{1,2}, Akinori Kagawa^{1,2}

¹ Graduate School of Engineering Science, Osaka University

² Center for Quantum Information and Quantum Biology, Institute for Open and Transdisciplinary Research Initiatives, Osaka University,

³ Institute for Quantum Life Science, National Institutes for Quantum and Radiological Science and Technology

Pyruvic acid plays a significant role in biology. It is known that the production of lactate from pyruvic acid by lactate dehydrogenase (LDH) is more accelerated in cancer cells than in normal cells. A dissolution DNP(d-DNP) system is used to observe the enzymatic reaction in real-time and offers hyperpolarized solution NMR. Recently, a new d-DNP instrument called bullet-DNP has been developed. The key advantages are that transfer of samples in bullet DNP is faster than in conventional d-DNP systems, and the system does not require a large amount of solvent for dissolution. However, real-time enzymatic reaction experiments using the bullet DNP apparatus have not yet been performed. Using our developed bullet-DNP apparatus, we showed time-resolved, enhanced solution ¹³C-NMR spectra of enzymatic reaction from pyruvic acid to lactate by LDH.

[序論]

近年、極低温下でDNPによって高偏極化したサンプルを溶解し、溶液NMRを測定する溶解DNP[1]の開発が活発に行われている。溶解DNPによって低感度核である¹³Cスピンの酵素反応のリアルタイム計測が実現されている。そのなかでもピルビン酸は、がん細胞では乳酸脱水素酵素(LDH)による乳酸の生成が正常細胞に比べ促進されていることが知られているなど生体内において非常に重要な役割を担っている[2]。我々は溶解DNPのなかでも、bullet-DNP[3]と呼ばれる装置の開発に取り組んでいる。通常の溶解DNPでは、極低温下でサンプルを溶解し、溶液転送を行うのに対して、bullet-DNPでは固体状のサンプルを転送し、室温下で溶解を行う。そのため通常の溶解DNP装置と比較するとサンプルの高速な転送と少ない溶媒での高偏極化サンプルの溶解が可能となっている[3]。特にサンプルの希釈量が少ないことは、高価なラジカルや同位体分子の使用量を減らせることと同等であり、重要であると考えている。しかしbullet-DNP装置を用いたリアルタイムな酵素反応実験は未だ行われていない。そこで本研究では我々が開発したbullet-DNP装置を用いて同位体置換した¹³C-ピルビン酸のLDHによる乳酸への酵素反応のリアルタイム測定を行った。

bullet DNP、ピルビン酸、LDH

○もちづきゆうき, ふかざわじゅん, ねごろまこと, きたがわまさひろ, かがわあきのり

[実験結果]

サンプルは偏極源となるBDPAを40 mM添加したスルホランと偏極対象分子の $1\text{-}^{13}\text{C}$ ピルビン酸を1:1の割合で混ぜたものを用いた。このサンプルを液体窒素に滴下し、ガラス状のビーズ($\sim 5\ \mu\text{l}$)を作製し、バレットと呼ばれる円筒状のテフロン容器に入れて高偏極化を行った。1.4 K、4.85 Tでラジカルの濃度、マイクロ波周波数および掃引幅などを最適化し、DNPを行った結果、 ^{13}C スピンの偏極率約50%を達成した。次にこの高偏極化したサンプルの転送、溶解を行った。固体状のサンプルが入ったバレットを高圧ヘリウムガスでDNP用超伝導磁石から液体NMR用超伝導磁石まで転送する (Fig. 1)。転送中の緩和を抑制するために磁場トンネルを用いている。転送後、磁場中心から約40 cm上にある溶媒容器中で、 $400\ \mu\text{l}$ の熱水を用いてサンプルを溶解する。さらに超伝導磁石中心に転送し、その後NMR測定を行う。本研究で作製したbullet-DNP装置では約0.3秒の試料の高速転送が行える。bullet-DNPによる高偏極化されたピルビン酸の溶液中での ^{13}C スペクトル信号強度は熱平衡時と比較して最大で9360倍となり、偏極率は7.5%であった。

bullet-DNPによる酵素反応のリアルタイム計測ではあらかじめ試験管内に入れておいた酵素溶液と高偏極化されたサンプルを溶解した溶液を混ぜることで酵素反応を引き起こす。酵素溶液はL-乳酸デヒドロゲナーゼ ウシ心臓由来 (LDH)、 β -NADH、ウシ血清アルブミン (BSA) を $100\ \mu\text{l}$ のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に溶かしたものである。転送されてきたサンプルを溶かす溶媒には $300\ \mu\text{l}$ のリン酸緩衝液を用いた。bullet-DNPを用いたデモンストレーションでは、ピルビン酸の酵素反応によって生成された乳酸の信号を観測することができた (Fig. 2)。この結果からサンプルと酵素を混ぜてから液体NMRで信号を観測するまでの短いタイムスケールでも酵素反応を起こしていることがわかった。室温NMRの ^{13}C スピンの測定では感度が低く、積算する必要があるため、短いタイムスケールでの酵素反応の様子を観測することができない。しかしbullet-DNPを用いることでリアルタイムでの酵素反応を観測することが可能となった。

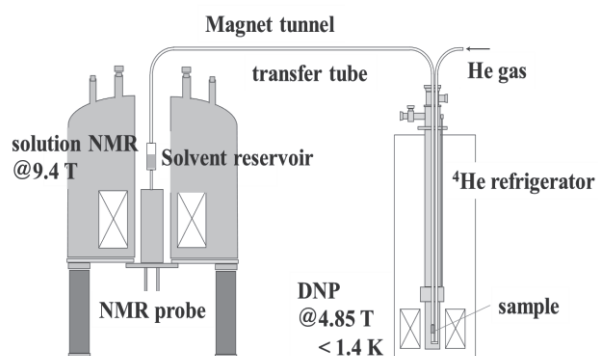


Fig. 1. Schematic diagram of our bullet DNP.

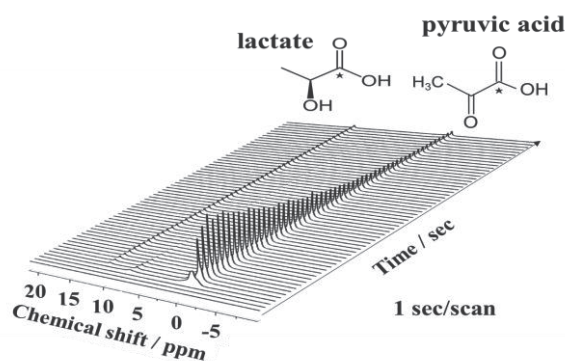


Fig. 2. Time-resolved enhanced solution ^{13}C -NMR spectra for pyruvate acid acquired with a time interval of 1 s.

References

- [1] Ardenkjær-Larsen J.H. *et al.*, PNAS, 100, 18, 10158-10163 (2003)
- [2] Nobu Oshima *et al.*, ScienceDirect, 30, 6, 1798-1810 (2020)
- [3] Karel Kouřil *et al.*, Nature com., 10, 1733 (2019)

P71

ペロブスカイト型酸窒化物の¹⁴N固体NMRの再検討

○野田泰斗¹, 石井桜子¹, 新木聡太¹, 日部雄太¹, 鱒淵友治², 竹腰清乃理¹

¹京都大学大学院・理学研究科

²北海道大学大学院・工学研究科

Revisiting ¹⁴N solid-state NMR of perovskite-type oxynitrides

○Yasuto Noda¹, Sakurako Ishii¹, Souta Shinki¹, Yuta Hibe¹, Yuji Masubuchi², Kiyonori Takegoshi¹

¹ Division of Chemistry, Graduate School of Science, Kyoto University

² Division of Applied Chemistry, Faculty of Engineering, Hokkaido University

We re-examined ¹⁴N solid-state NMR of BaTaO₂N as a representative perovskite-type oxynitride, and found a wide-line spectrum over 2 MHz in contrast to the previous works reporting a single narrow peak at ca. 270 ppm. We conclusively assign the latter to the residual nitrogen gas, which can be removed by heat treatment. The true ¹⁴N NMR spectrum, revealed with both a number of frequency-incremented QCPMG experiments and a long accumulation delay time exceeding 400 s, showed a profile of a slightly asymmetric ¹⁴N quadrupolar interaction, indicating that the nitrogen atoms are off the Ta-N-Ta line in the crystal.

ペロブスカイト型酸窒化物は酸化物では取り得ない多様な局所構造を実現でき、新しい物質群として注目が集まっている[1]。物性や機能の理解には構造解析が欠かせないが、従来の酸化物では極大な構造解析手法であるX線回折法はアニオンが同じ閉殻構造をとるため難しく、分光学的手法も必要となる。様々な組成のペロブスカイト型酸窒化物で¹⁴N固体NMRの測定が行われたが、共通して細い信号が1本だけ270 ppm付近に観測されるのみで、構造や組成に鈍感であり、窒素を含有しているという情報程度しか得られていない[2-4]。以上の点に疑問を持ち、本研究では典型的なペロブスカイト型酸窒化物としてBaTaO₂Nを採用し¹⁴N固体NMRを検討した。

BaTaO₂N粉末を既報の手法[5]を用いてBaCO₃とTa₂O₅の混合物(モル比1.03対1)を100 mL/minのアンモニア気流中で930°C30時間加熱後、アンモニア雰囲気中で冷却することで合成した。全ての¹⁴N固体NMRは14 Tの磁場で自作プローブとOpencore分光計を用いて実施した。塩化アンモニウムを化学シフトの外部標準として用いた。

静止状態のBaTaO₂N粉末の¹⁴N solid echo NMRを待ち時間0.1 sで測定したところ、Fig. 1の黒色線で示すように一本の対称的なピークを270 ppmに観測した。ピーク位置が既報の269.2 ppm[2]に実験の誤差範囲内で一致していることから、観測した信号はこれまで報告されてきたものと同一である。この信号がBaTaO₂N結晶骨格内の窒素に由来するかどうか信号強度の観点から検証した。立方晶であるTiN₃を用いて含有窒素量と信号強度の関係を割り出し、BaTaO₂Nの信号強度を推定したところ、含有窒素量から計算される値の5.0%にとどまった。その細い線幅と12 msという速い縦緩和時間から、信号はBaTaO₂Nではなく高い運動性をもつ分子性物質に由来すると推察した。候補としては、合成雰囲気のアンモニア分子と、BaTaO₂Nは合成後にアンモニア雰囲気中で冷却

ペロブスカイト型酸窒化物, ¹⁴N固体NMR, 広幅

○のだ やすと, いしい さくらこ, しんき そうた, ひべ ゆうた, ますぶち ゆうじ, たけごし きよのり

すると窒素分子が残留する[5]ため窒素分子が考えられる。アンモニアガスと孤立窒素分子の化学シフト値はそれぞれ-55.2 ppm [6]と277.9 ppm [7]であり、窒素分子の可能性が高いと予想した。

実際に窒素分子が残留しているかどうかを検証するため、残留窒素のみを除去する条件[5]でBaTaO₂Nの熱処理を行い、含有窒素量の変化と¹⁴N NMR信号の変化を測定した。その結果、窒素含有量は3.58 wt%から3.38 wt%と5.59%減少し、さらに¹⁴N NMRのピークは消失した (Fig. 1の灰色線)。以上より、これまでBaTaO₂Nであると報告されてきた信号が実は窒素分子によるものと結論した。

酸窒化物骨格内に存在する¹⁴N NMRスペクトルの定量的な観測を飽和付QCPMG法により試みた。実験パラメータはKNO₃を用いて最適化した。待ち時間を430 s、積算回数を32回として連続するエコーを取得したのちにフーリエ変換を行い一つのサブスペクトルを得た。観測周波数を62.5 kHzずらす毎にチューニングと測定を繰り返し、得られたサブスペクトルを重ね合わせてFig. 2に示すような約2 MHzにも及ぶ幅広いスペクトルを得ることに成功した。 T_1 は342 sであった。得られたスペクトル形状は、結晶内サイトの対称性が一軸対称性から低下していることを示している。これはTa-N-Taが直線状に見えているXRDとは異なる結果であり、短距離的には少し折れ曲がったTa-N-Taが不規則に存在することにより、長距離的な平均構造ではTa-N-Taが直線的に見えていることを示している。

以上より、これまでの報告とは異なり、¹⁴N NMRスペクトルはペロブスカイト型酸窒化物のサイト情報を豊富に有しており、局所構造と物性・機能との相関を探る研究への展開が期待される。

本研究はJSPS科研費16H06439と16H06440 “新学術領域「複合アニオン化合物の創製と新機能」”の助成を受けて実施された。

References

- [1] H. Kageyama et al., *Nat. Commun.* **9**, 772 (2018).
- [2] T. Bräuniger et al., *Chem. Mater.* **17**, 4114–4117 (2005).
- [3] Y-II Kim and Y. Park, *Solid State Sci.* **14**, 580–582 (2012).
- [4] N. Cordes et al., *Eur. J. Inorg. Chem.* **2018**, 5019–5026 (2018).
- [5] A. Hosono et al., *J. Eur. Ceram. Soc.* **36**, 3341–3345 (2016).
- [6] P. R. Srinivasan and R. L. Lichter, *J. Magn. Reson.* **28**, 227–234 (1977).
- [7] P. Garbacz et al., *Chem. Phys. Lett.* **699**, 194–198 (2018).

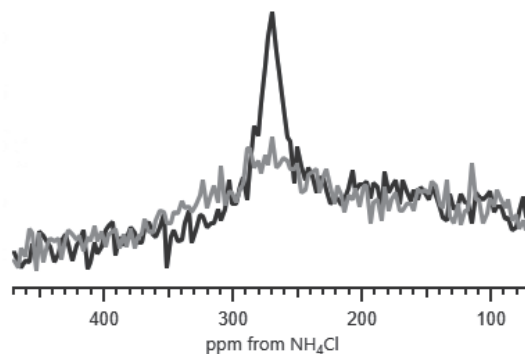


Fig. 1. A ¹⁴N solid-echo spectrum of BaTaO₂N powder before (black line) and after (gray line) heat treatment in N₂ atmosphere.

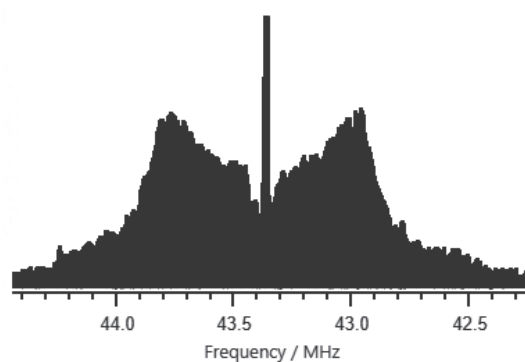


Fig. 2. A ¹⁴N QCPMG spectrum of BaTaO₂N powder before heat treatment. The sharp component is attributed to N₂ gas.

P72

¹³Cおよび¹⁵N標識5-アミノレブリン酸の合成とNMR解析

○青山洋史¹, 飯塚佑介¹, 永江峰幸¹, 広瀬 侑², 三島正規¹

¹東京薬科大学・薬学部

²豊橋技術科学大学・大学院応用化学・生命工学系

Synthesis of ¹³C- and/or ¹⁵N-labeled 5-aminolevulinic acids and their NMR analyses

○Hiroshi Aoyama¹, Yusuke Iizuka¹, Takayuki Nagae¹, Yuu Hirose², Masaki Mishima¹

¹ School of Pharmacy, Tokyo University of Pharmacy & Life Sciences

² Department of Applied Chemistry and Life Science, Toyohashi University of Technology

To analyze the bilin-binding domain of the cyanobacterial chromatic acclimation sensor RcaE in the green-absorbing photoproduct state by NMR, we examined the synthesis of labeled 5-aminolevulinic acid (5-ALA), which leads to labeling with stable isotopes of bilin chromophore.

As a result of investigating the synthesis of unlabeled 5-ALA that protects both the C-terminal and the N-terminal, it was found that Pd-catalyzed Fukuyama coupling reaction between glycine thioester and organozinc reagent is effective. Among them, we found that the target product can be obtained most efficiently when Pd(OAc)₂ and phosphine ligand with cyclohexyl groups are used as catalysts. Finally, three types of isotope-labeled 5-ALA, ¹⁵N-labeled 5-ALA, 1-¹³C, ¹⁵N-labeled 5-ALA, 2-¹³C, ¹⁵N-labeled 5-ALA, were synthesized using this method.

In the ¹H NMR analysis of the three synthesized 5-ALAs with different labeling positions, the coupling constant for the 2-position methylene moiety with ¹³C and ¹⁵N differed depending on the bond distance.

5-アミノレブリン酸 (5-ALA) はクロロフィルやヘム、フィコビルンなどのテトラピロール類緑体の前駆体として、全ての生物に普遍的に存在するアミノ酸の一つである。光合成を行う原核生物シアノバクテリアは植物の葉緑体の起源となった生物であるが、一部のシアノバクテリアは周囲の光の色を感知して色素タンパク質を変化させる補色順化を示すことが知られている。我々はこれらシアノバクテリアの補色順化において光センタータンパク質として働くRcaEの赤色光吸収型分子構造をX線結晶構造解析、分子動力学計算、およびNMRによって解明し、中でも5-ALAから合成されてRcaEの光吸収の中心となるピリン発色団のプロトン化状態の直接観測をNMRによって成功した¹。今回我々は、緑色光吸収型RcaEのピリン発色団周辺におけるタンパク質側のプロトン化状態や立体構造のNMR解析を行うため、安定同位体で標識したピリン発色団を構築するための標識化5-ALAの合成を行った。

標識化5-ALAの合成N末を保護したグリシンのカルボン酸塩化物を経由する方法が既に報告されている²。しかし本法を追試したところ収率が十分ではなく再現性も低いことが分かった。発色団の標識には十分量の標識化5-ALAが必要となるため本法での合成にはリスクが伴うため、新たな合成法の開発に着手した。コスト面から標識化グリシンを出発原料とする合成経路は既知法から変更せず、N末保護化グリシンのカルボキシ基をチオエステル化して有機亜鉛試薬との福山クロスカップリング反応を検討したところ、触媒として酢酸パラジウムとシクロヘキシルホスフィンの組合せを用いることで高い収率と再現性を有する条件を見出した(Fig. 1)。

5-アミノレブリン酸, 福山カップリング反応, 同位体標識化合物

○あおやまひろし, いいづかゆうすけ, ながえたかゆき, ひろせゆう, みしままさき

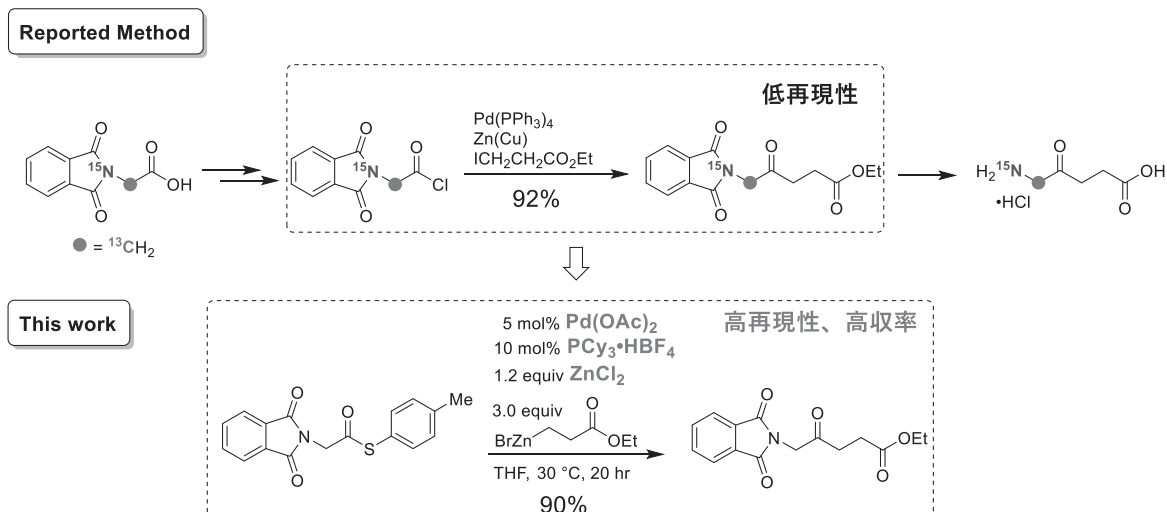


Fig. 1. New method for the synthesis of 5-ALA by Pd-catalyzed Fukuyama coupling reaction.

良好な反応条件を見出すことができたため、実際に ^{15}N 標識、 $^{15}\text{N},1\text{-}^{13}\text{C}$ 標識、 $^{15}\text{N},2\text{-}^{13}\text{C}$ 標識の三種の標識化グリシンを用いて対応する標識化5-ALAの合成を行った。その結果、いずれの原料からも問題なく反応は進行して最終的にグラムスケールで全ての標識化5-ALAを得ることに成功した(Fig. 2)。現在、これら化合物を用いた生化学実験および解析を行っているところである。

上述の三種の標識化5-ALAの合成中間体における ^1H NMR解析では、2位メチレン水素においてプロトンからの結合距離に対応する ^{15}N および ^{13}C とのカップリングが観測された。この観測結果からも、望む位置を同位体で標識化した5-ALAの合成が確認できた。本手法で合成した $^{15}\text{N},1\text{-}^{13}\text{C}$ 標識、 $^{15}\text{N},2\text{-}^{13}\text{C}$ 標識の5-ALAを用いて、M9培地を用いてユニホーム ^{15}N 標識、部分 ^{13}C 標識のフィコシアノビリンをとりこんだRcaEを調製し、HNCOタイプの測定を行うことで、フィコシアノビリンのD環のNHの帰属に成功した。本ポスター発表では、RcaE中のフィコシアノビリンの実際のNMRスペクトル、帰属法についても紹介する。

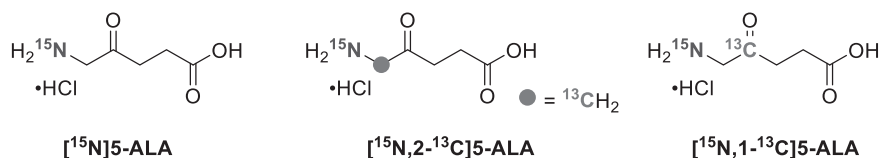


Fig. 2. Structures of isotope-labeled 5-ALAs.

References

- (1) Nagae, T., Unno M., Koizumi, T., Miyanoiri, Y., Fujisawa, T., Masui, K., Kamo, T., Wada, K., Eki, T., Ito, Y., Hirose, Y., and Mishima M. (2021) Structural basis of the protochromic green/red photocycle of the chromatic acclimation sensor RcaE. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *118*, e2024583118.
- (2) Iida, K. and Kajiwara, M. (2002) Synthesis of ^{13}C and ^{15}N multilabeled 5-aminolevulinic acid. *J. Label. Compd. Radiopharm.* *45*, 139–143.

謝辞

本研究のNMR測定は、文部科学省先端研究基盤共用促進事業「NMR共用プラットフォーム」（理研横浜）と蛋白研拠点事業NMR共同利用研究、東京都立大学伊藤隆教授、株式会社CRYO SHIPの神野智司氏にご支援いただきました。

P73

MD計算, 深層学習を活用したタンパク質複合体解析

○小林直宏¹, 小沼剛², 有田恭平², 池上貴久², 山崎俊夫¹

¹理化学研究所横浜事業所 生命機能科学研究センター

²横浜市立大学 生命医科学研究科

Analysis of protein complex using MD simulation and deep learning.

○Naohiro Kobayashi¹, Tusyoshi Konuma², Kyouhei Arita², Takahisa Ikegami², Toshio Yamazaki¹

¹RIKEN Center for Biosystems Dynamics Research, Yokohama

²Graduate School of Medical Life Science, Yokohama City University

Solution NMR analysis of protein complexes provides information on not only protein-protein interactions, but also on the dynamic states and structural changes upon complex formation as well as related to the mechanistic information of their biological functions. There are many cases that cannot be solved by X-ray crystallography or cryo-EM, especially in the case of small protein complexes with low binding affinity or with regions of high mobility within the complex structure. On the other hand, we often encounter the similar difficulty in solution NMR to the samples having poor crystallizing tendency, such as overlapping and line broadening or missing NMR signals. In this study, we report on a case study of two small protein complexes in which deep learning and MD calculations are effectively utilized to expedite complex analysis.

溶液NMRを用いた複合体解析はリガンドとの相互作用について単なる立体構造情報ばかりではなく、結合親和性(Kd), 化学量論, 動的構造変化など豊富な情報を与える. その一方で, 複合体解析ではリガンドとの結合による分子量の増大ばかりではなく, 複合体形成における速度論によるNMR信号の線幅増大あるいは消失などといった困難を伴うケースは多い. これに対してX線結晶解析は分子量の上限は無いものの複合体自体が有する結晶性に依存し, 特にループあるいはN末, C末側に長いテール構造を持つなど機能発現に必要となるが運動性の高い領域を含む場合はそもそも結晶化しない, あるいは有効な電子密度が得られない, 結晶時におけるパッキング効果など意図しない結果をもたらしてしまう事は多い. 近年進歩の激しいクライオ電顕解析においても運動性の高い領域では同様の事象に悩まされる

とともに80~100kDaほどの分子量的な下限は存在する. さて, この5年あまりの間に急速に発展している深層学習はGPUGPUによる超並列計算の高速化に助けられ様々な分野でまさに”人工知能”と言えるレベルの物体認識や機械翻訳などにおいて高い性能を発揮し, 多くの研究分野でも

○こばやしなおひろ, こぬまつよし, ありたきょうへい, いけがみたかひさ, やまざきとしお

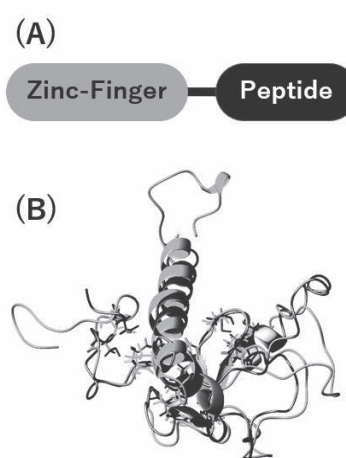


Figure 1. (A) Chimeric protein construct of Zinc-finger and peptide. (B) Overlaid ribbon models of solution structure (gray) determined by NMR and predicted one by AF2 (black). The side-chains involved in binding to three zinc ions are also shown.

成果を与えている。Google DeepMind によって開発され、昨年公開されたAlphaFold2 (AF2) は配列から直接的に立体構造を予測するコンテストであるCASP14において圧倒的な性能を示した(1)。更にはAF2を利用した複合体構造予測までも成功例が示され(2)、AF2を活用した構造生物学研究は今後ますます広がっていくものと思われる。

本研究では難易度の高い複合体解析を深層学習技術やMD計算を活用して解決した1つ目のケースとして、横浜市立大有田らはzinc-fingerタンパク質とIDPペプチドを融合させたキメラ構造体を作成に成功し、高精度なNMR構造を得た。更にAF2による配列から予測された立体構造はNMR構造と主鎖RMSDは収束領域で $\sim 0.9\text{\AA}$ とよく一致した(Fig. 1)。また、得られた複合体構造から機能を阻害すると予想される残基を変異させた構造もAF2により予測し、生化学実験との整合性が得ることに成功した(3)。

2つ目のケースとして横浜市立大小沼らは小さな α -helix タンパク質であるET-domainとCOVID-19の感染に関わる18残基の短いペプチド(P18)との相互作用解析について示すことを見出した。ET-domainとP18とのKdは100~200mMと極めて弱いため、ET-domain:P18 キメラ融合体の作成は成功しなかった。一方でKdの弱さからfast-exchangeによるHSQC滴定実験を行い、ET-domain:P18のKdと複合体形成時における化学シフトを決定することに成功した。高濃度のP18存在下、比較的低温(283K)でのNMR測定によりNMR信号は極めてブロードであるがMagRO_NMRViewJを用いた解析によりET-domain:P18複合体の分子内および分子間NOEを決定することができた。また分子間NOEは重なり合いが激しいためCYANA計算では曖昧な距離制限を緩く適用することで複合体モデルを得た。興味深い事に仮想的なキメラ融合体はAF2により複合体構造予測を実行し、P18が結合するモードとして反平行あるいは平行シート2つのモデルが6:4の比で得られた。平行モデルではP18-Pheによって高磁場シフトするET-domain Ileメチル基の化学シフトを説明することができない。また発表者によって開発された構造から化学シフト推定するツールにより(4)、反平行モデルが正しい事示した。更にAmber20 PEMD (Particle Mesh Ewald)によるexplicit water MD計算を行い、反平行シートモデル構造におけるP18-PheとET-domain Ileが相互作用している状態はエネルギー的に安定であることを示した。

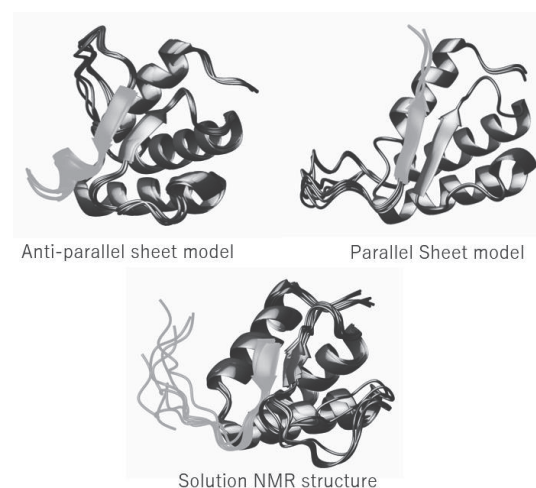


Figure 2. Ribbon models of ET-domain and P19 complex.

Anti-parallel (upper left) and parallel (upper right) sheet models predicted by AF2. The ribbon models determined by solution NMR are also shown (bottom).

References

- (1) Jumper, J. et al., (2021) Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* **596**, 583–589.
- (2) Bryant, P. et al., (2022) Improved prediction of protein-protein interactions using AlphaFold2. *Nat. Comm.* **13**, 1265-1276.
- (3) Hata. K. et al., Structural basis for the unique multifaceted interaction of DPPA3 with the UHRF1 PHD finger. *BioRxiv*.
- (4) Kobayashi, N. et al., ISMAR 2021, Japan.

P74Y

GMPPNP結合型K-Ras4B^{G12V}とRgl2^{RBD}の相互作用解析

○富樫直之¹, 宮田裕貴¹, 亀井 駿¹, 菅澤はるか¹, 美川 務³,
猪股晃介¹, 田仲加代子², 伊藤 隆¹, 池谷鉄兵¹

¹ 東京都立大学・大学院理学研究科

² レスター大学・分子細胞生物学科

³ 理化学研究所・生命機能科学センター

Structural analysis by solution NMR reveals a unique interaction between GMPPNP-bound K-Ras4B^{G12V} and Rgl2^{RBD}

○Naoyuki Togashi¹, Hiroki Miyata¹, Shun Kamei¹, Haruka Sugasawa¹, Tsutomu Mikawa³, Kohsuke Inomata¹, Kayoko Tanaka², Yutaka Ito¹, and Teppei Ikeya¹

¹ Department of Chemistry, Tokyo Metropolitan University, Japan

² Department of Molecular and Cell Biology, University of Leicester, UK

³ RIKEN, Quantitative Biology Center, Japan

K-Ras4B^{G12V}, a proto-oncogene product, plays a role in transmitting important signals related to cell proliferation and differentiation downstream through interaction with various effector proteins such as Raf, PI3K and RalGDS. Recently, it has been reported that the Rgl1/Rgl2-RalB pathway is particularly crucial for RAS-dependent invasiveness of transformed cells¹, and NMR-based competition experiments between several effector proteins and K-Ras have shown a high affinity of Rgl1 upon K-Ras². In this study, we performed the protein structure determination of the RAS-binding domain (RBD) of Rgl2 and titration experiments with ¹⁵N-labelled samples to analyze the interaction between K-Ras4B^{G12V} and Rgl2^{RBD}. These results demonstrated that the conformations and dynamics at the interface between Rgl2^{RBD} and K-Ras4B^{G12V} change when their interaction occurs, suggesting that this recognition mechanism is partially different from that of K-Ras4B^{G12V} and RalGDS.

【序論】原がん遺伝子産物であるK-Rasはアミノ酸189残基からなる21kDaの低分子量GTPaseであり、GTPおよびGDPと強く結合する。このうちGTP結合型のK-RasはRafやPI3K、Ralといった様々なエフェクター蛋白質との相互作用を介して、細胞増殖、遊走、接着、分化、浸潤に関わる重要な細胞内シグナル伝達経路を活性化する。近年、Ras依存性な形質転換細胞の浸潤性については、Rgl1/2-RalB経路が特に重要であることが報告されており[1]、NMRを用いた複数のエフェクター蛋白質とK-Rasの競合実験からは、Rgl1が他のエフェクター蛋白質と比べK-Rasと高い結合親和性を有することが示されている[2]。

本研究では、内在性GTPase活性が著しく低下している発がん性の変異体であるK-Ras4B^{G12V}とRgl1/2の分子認識機構を解明するために、Rgl2のRas-binding domain (RBD) の立体構造決定と、

K-Ras, 立体構造決定, 蛋白質間相互作用解析

○とがしなおゆき, みやたひろき, かめいしゅん, すがさわはるか, みかわつとむ, いのまたこうすけ, いとうゆたか, たなかかよこ, いけやてつぺい

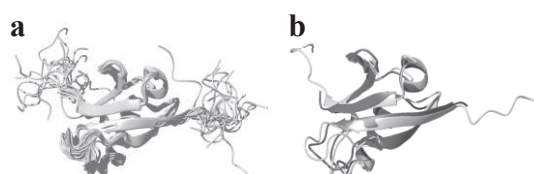


Fig. 1. Superposition of the structures of Rgl2^{RBD}. (a) Superposition of 20 NMR structures of Rgl2^{RBD} (light grey). (b) Superposition of the co-crystal structure of Rgl2^{RBD} with K-Ras4B^{G12V} (grey) and NMR structure of the monomeric Rgl2^{RBD} (light grey).

K-Ras4B^{G12V}とRgl2^{RBD}の相互作用解析を行った。

【実験】Rgl2^{RBD}については、主鎖および側鎖NMRシグナルの帰属と、NOE由来の距離制限を用いた立体構造計算を行い、詳細な溶液構造を決定した。K-Ras4B^{G12V}については、C末端20アミノ酸残基を除去した試料[K-Ras4B^{G12V}(1-169)]を調製し、GTPの非水解アナログであるGMPPNPを結合させた後、主鎖および側鎖NMRシグナルの帰属を行った。次いで、¹⁵N標識体と非標識体のK-Ras4B^{G12V}とRgl2^{RBD}をそれぞれ用意してNMR滴定実験を行い、蛋白質間相互作用解析を行った。

【結果と考察】溶液NMRとX線結晶構造解析による構造解析から、Rgl2^{RBD}は、単体とK-Ras4B^{G12V}との複合体でよく類似した構造であることがわかった (Fig. 1)。一方で、相互作用面と推定される領域の一部で、単体で構造の収束度が低い部分があり、また同時にこの部分は複合体中とはやや異なる立体構造を示していた。このことから、Rgl2^{RBD}は、複合体形成時に結合面の構造とダイナミクスを変化させていることが示唆された。

Fig.2には、K-Ras4B^{G12V}の添加によるRgl2^{RBD}の¹H-¹⁵N HSQC スペクトル変化を示した。K-Ras4B^{G12V}の添加に伴ってシグナル強度の低下と、新たなピークの出現、および化学シフト変化が同時に観測された。これらの結果から、K-Ras4B^{G12V}とRgl2^{RBD}の相互作用が、複数の結合モードからなることが予想された。Fig.3には、シグナル強度低下の変化量をRgl2^{RBD}立体構造上にマッピングした図を示す。解析の結果、Rgl2^{RBD}のピーク強度変化は、K-Ras4B^{G12V}とRalGDSの複合体から予想される相互作用面と類似した領域で見られた。一方で、相互作用部位から離れた領域においても変化が観測された。田仲らによるK-Ras4B^{G12V} - Rgl2^{RBD}複合体の結晶構造の結果[3]と合わせて考察すると、K-Ras4B^{G12V}-Rgl2^{RBD}の相互作用様式は、RalGDSのものとは一部異なっている可能性が示唆された。現在、溶液中での複合体形成における結合モードを明らかにするために、²H/¹³C/¹⁵N-K-Ras4B^{G12V}-Rgl2^{RBD}複合体を用いたK-Ras4B^{G12V}の結合面の解析に取り組んでいる。

【参考文献】 [1] Zago, G. *et al.* Ralb directly triggers invasion downstream ras by mobilizing the wave complex. *Elife* 7, 1-23 (2018).[2] Smith, M. J. & Ikura, M. Integrated RAS signaling defined by parallel NMR detection of effectors and regulators. *Nat. Chem. Biol.* 10, 223-230 (2014)., [3] Mishal, T. Teppei, I. Naoyuki, T. *et al.* K-Ras4B and Rgl2^{RBD} complex highlights a distinct RAS:effector binding mode for guanine nucleotide exchange factors of RalA/B. in preparation.

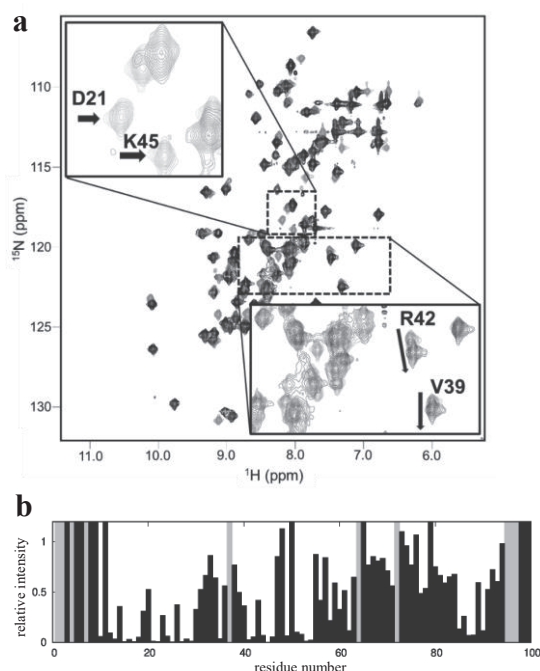


Fig. 2. NMR titration experiment of ¹⁵N-Rgl2^{RBD} with the unlabeled K-Ras4B^{G12V}-GMPPNP. (a) Overlays of 2D ¹H-¹⁵N-HSQC spectra from multipoint titrations of Rgl2^{RBD} with K-Ras4B^{G12V}-GMPPNP. The color codes showing the molar ratio of Rgl2^{RBD}:K-Ras4B^{G12V}-GMPPNP are as follows: light gray (1:0), gray (1:1), black (1:3). Representative peaks showing large chemical shift perturbations and intensity changes are indicated by arrows. (b) Intensity ratios derived from the titration experiment.

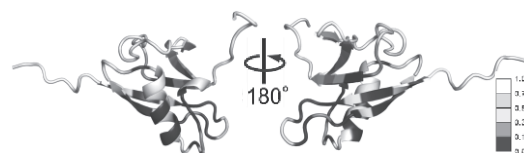


Fig. 3. Peak intensity decay for ¹⁵N-Rgl2^{RBD}. Residues are color-coded by relative peak intensity, as indicated in the color bar, on the ribbon model of the monomeric Rgl2^{RBD}.

P75

NMRを用いたシャルコー・マリー・トゥース病の原因遺伝子産物
ミエリンタンパク質ゼロ (MPZ) の構造解析

○坂倉正義¹, 三尾和弘², 田辺幹雄³

¹横浜市立大学・大学院生命医科学研究科

²産総研・東大・オペランド計測OIL

³高エネ機構・物構研・構造生物

Structural analyses of a Charcot-Marie-Tooth disease-causative gene product, myelin protein zero, using NMR

○Masayoshi Sakakura¹, Kazuhiro Mio², Mikio Tanabe³

¹Graduate School of Medical Life Science, Yokohama City University

²AIST-UTokyo operando OIL

³KEK, IMSS, SBRC

Myelin protein zero (MPZ or P0) is expressed in the peripheral myelin, and functions to adhere two opposing membranes via homophilic interactions between the extracellular domains (ECDs) of the protein. Single amino acid substitutions in ECD impair proper myelin formation, leading to a demyelinating neuropathy, Charcot-Marie-Tooth disease (CMT). However, the mechanisms by which such substitutions induce the disease have not been well understood. In this study, we analyzed the inter-ECD interaction using NMR and found that ECDs interact via the molecular surface including W72, D80, and V84, which was different from those observed in the crystal structure. The fact that W72, D80, and V84 are CMT-related substitutions sites suggests this inter-ECD interaction is related to proper myelin formation and CMT.

ミエリンタンパク質ゼロ (MPZまたはP0) は、末梢神経ミエリンを構成するシュワン細胞の細胞膜上に発現する1型膜タンパク質であり、ミエリンの本体である脂質二重膜多重層の形成・維持において主要な役割を果たす (Fig. 1A-C)。遺伝子変異に伴うMPZ上のアミノ酸残基置換は、ミエリンにおける脂質二重膜多重層の形成不全、および遺伝性末梢神経疾患であるシャルコー・マリー・トゥース病 (CMT) を誘起するが、そのメカニズムには未解明の点が多く残されている。これ

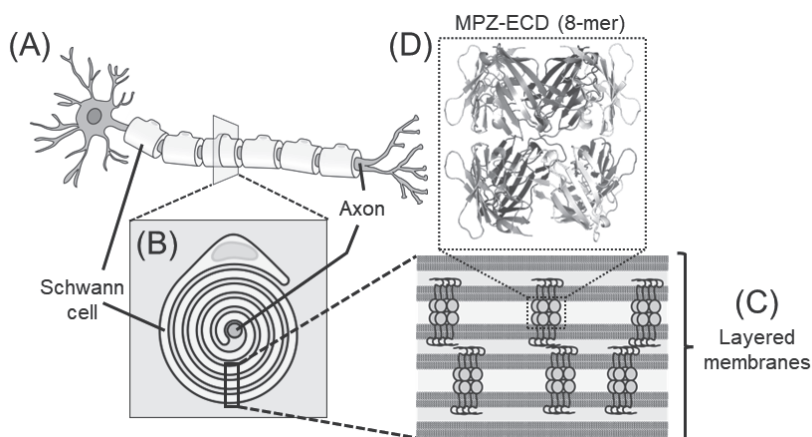


Fig. 1. Multi-layered membranes stacked by MPZ in the PNS myelin. Schematic drawings of (A) peripheral neuron, (B) myelin, (C) membranes stacked by MPZ molecules, and (D) the crystal structure of octameric human MPZ-ECD.

神経疾患, 相互作用解析, 交差飽和法, ミエリンプロテインゼロ

○さかくらまさよし, みおかずひろ, たなべみきお

までに我々は、X線結晶構造解析によりMPZの細胞外ドメイン(ECD)の多量体構造を決定し、結晶中においてECDが3つの異なるタイプのホモ相互作用を形成することを明らかにした。また、ECDの膜接着活性を検出する新しい解析手法(ナノミエリン法)を開発し、結晶中において観測された3つの相互作用のうち、2つの相互作用により連結された8量体が膜接着に必要であることを明らかにした(Fig. 1C-D)。一方、結晶構造で観測されたホモ相互作用界面から外れた分子表面にも、CMT誘起型アミノ酸残基置換部位が存在する。これらの部位におけるアミノ酸残基置換も、何らかのECD間相互作用に影響を与え、CMTに関与する可能性が考えられる。そこで本研究においては、結晶中では形成されないECD間相互作用の検出を目的として、NMRを用いた溶液中におけるECD間相互作用解析を行った。

^2H および ^{15}N 標識を導入したECDを調製し、非標識ECDと1:3のモル比で混合した。このサンプルを用いて交差飽和法により、非標識ECDから標識ECDへの分子間磁化移動を観測した。この結果、Q71、W72、R77、W78、D80、V84を含む連続した分子表面残基において分子間磁化移動に由来するNMRシグナルの減少が観測され、これらの残基がECD間相互作用界面を形成していることが示された(Fig. 2)。一方、 ^{15}N 標識を行ったECDについて、NMRシグナルのECD濃度依存性を解析した結果、交差飽和実験により検出された相互作用形成残基を含む分子表面残基において、ECD濃度依存的な化学シフト変化が検出された。また、この濃度依存的化学シフト変化は、相互作用部位上に存在するW78をAlaに変異させたバリエントでは観測されなかった。以上のNMR実験で検出されたW78を中心としたホモ相互作用領域(以下S相互作用領域と記述する)は、ECD多量体の結晶構造においては分子間コンタクトを形成しておらず、溶液中においてのみ観測される準安定な相互作用部位であると考えられる(Fig. 2B)。

S相互作用領域に含まれるW72、D80、V84はCMT関連アミノ酸残基置換部位であることから、これらの部位におけるアミノ酸置換に伴うS相互作用の変調が、ミエリンにおける脂質二重膜多重層の形成に影響を与える可能性が考えられる。

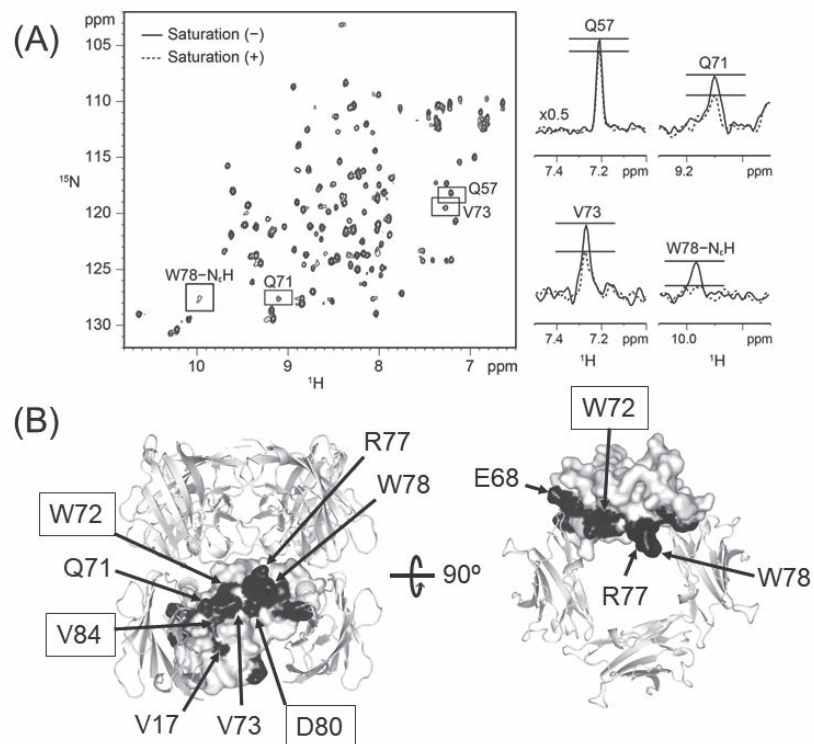


Fig. 2. Inter-ECD interface determined by solution NMR

(A) Superimposed ^1H - ^{15}N HSQC spectra of [^2H , ^{15}N]-labeled ECD with (dashed line) and without (solid line) the irradiation of non-labeled ECD. 1D slices of the spectra for representative residues are shown at right. (B) The NMR-detected interface is mapped on the crystal structure of the 8-meric ECDs. Residues of which signals were reduced more than 30% are shown in black. Some protomers in the 8-meric structure are omitted for clarity. The CMT-related amino acid substitution sites are boxed.

P76Y

炭素材料の表面官能基解析におけるDNP-NMRの利用

○安東映香¹, 鈴木克明², 梶弘典², 仁科勇太¹, 神戸高志¹, 後藤和馬¹

¹岡山大学・大学院自然科学研究科

²京都大学・化学研究所

The use of DNP-NMR for analysis of surface functional groups on carbonaceous materials

○Hideka Ando¹, Katsuaki Suzuki², Hironori Kaji², Yuta Nishina¹, Takashi Kambe¹, Kazuma Gotoh¹

¹ Graduate School of Natural Science and Technology, Okayama University

² Institute for Chemical Research, Kyoto University

Analysis of surface functional groups on carbonaceous materials is important because the functional groups affect properties of the carbon materials. Dynamic nuclear polarizing nuclear magnetic resonance (DNP-NMR) is expected as a powerful tool for analysis of the surface functional groups on carbon materials. However, it has not been considered and applied to the analysis due to the electroconductivity and the microwave absorbance of the carbon, which attenuates the enhancing effect of DNP. In this study, we investigated an availability of DNP-NMR for the analysis of surface functional groups on carbonaceous materials. As results for ¹H-¹³C CPMAS DNP-NMR measuring of graphene oxide (GO) and sucrose-derived carbon, trace amounts of functional groups, which are difficult to measure by conventional NMR, were observed. The enhancement of the signals is related by not only external radicals derived from AMUPol (polarizing agent) but also internal radicals derived from samples.

【序論】

酸化グラフェン(GO)やバイオマス材料由来炭素などの表面官能基を持つ炭素材料は官能基の種類や量により異なる物性を示す。表面官能基を持つ炭素材料の応用には表面官能基の正確な解析が必要不可欠である。現在、炭素表面官能基の解析法としてX線光電子分光法(XPS)や昇温脱離法(TPD)等が主に用いられている。しかしこれらの分析法では各官能基ピークが重なるため各官能基ピークの正確な解析には多くの知識と経験が必要となる。固体核磁気共鳴法(NMR)では各官能基のピークが異なる化学シフト値に出現するためより正確な解析が可能であるが、その感度の低さから微量な官能基の観測が困難であった。近年、NMRの感度を改善する手法として動的核偏極(DNP)を利用したDNP-NMRの研究が行われている。DNP-NMRではマイクロ波(MW)照射によりラジカルの磁化を核に移すことでNMRの感度を向上させる。これまで炭素材料の伝導性やマイクロ波吸収はDNP効果を減少させることが報告されており^[1]、DNP-NMRを用いた炭素材料の直接的な観測は行われてこなかった。しかし、DNP-NMRによる炭素表面官能基の直接的な観測が可能になれば炭素材料研究の発展につながるため、本研究ではGOとスクロース由来炭素の表面官能基をDNP-NMRを用いて観測することで表面官能基の解析法としてのDNP-NMRの有用性を評価した。

【実験】

GOはBrodie法により合成した。電子レンジで20 s加熱して前処理を行った黒鉛1 gに発煙硝酸20 mLと塩素酸カリウム8 gを加え3時間攪拌することで酸化を行った。攪拌後、水250 mLを加え、上澄み液のpHが中性に近づくまで遠心分離を繰り返しGOサンプル(Br-GO)を得た。スクロース由来

動的核偏極核磁気共鳴, 酸化黒鉛, スクロース由来炭素

○あんどうひでか, すずきかつあき, かじひろのり, にしなゆうた, かんべたかし, ごとうかずま

炭素材料は窒素流通下において目的温度(400、600、800 °C)まで10 °C/minで昇温し1時間保持することで作製した(以降では各サンプルをSuC-400、SuC-600、SuC-800と表記)。分極剤として15 mM AMUPol in D₂O:H₂O=9:1溶液を加えたサンプルと加えていないサンプルを準備し、各サンプルの¹H-¹³C CPMAS DNP-NMR測定を行った。また各炭素サンプルのラジカルの状態を探るため電子スピン共鳴(ESR)測定を行った。

【結果と考察】

AMUPol添加Br-GOとAMUPol未添加Br-GOの¹H-¹³C CPMAS DNP-NMRスペクトルをFig. 1に示す。MW onのとき、AMUPolを添加することで55、66、126 ppmのシグナル強度が約2.2倍増強した。これらのピークはそれぞれエポキシ基(C-O-C)、ヒドロキシ基(C-OH)、sp²炭素に帰属される。また、炭素末端のメチル基(CH₃)に帰属される12 ppmのピークに関してのみ高い増強度が観測された。AMUPolを添加しない場合の測定を行った結果、前者の信号強度はMW照射によって半減した一方、後者はAMUPolを添加しなくても増強されていた。ESR測定からは、Br-GOはサンプル内部にラジカルを有することが確認できた。これらの実験からエポキシ基、ヒドロキシ基、sp²炭素に対しては信号強度の増強にAMUPolラジカルが大きく寄与する一方、CH₃に対してはBr-GO自身の内部ラジカルが大きく寄与すると考えられる。

AMUPolを添加した各スクロース由来炭素の¹H-¹³C CPMAS DNP-NMRスペクトルをFig. 2に示す。各サンプルは150 ppmに=CR-OR' (R, R': Hまたは炭化水素基)に帰属されるシオルダー構造を持つsp²炭素のピークを示した。また、SuC-400とSuC-600においてはMW onのときのみ70 ppm付近にC-OHに帰属されるピークが観測された。C-OHのピークはBr-GOにおけるCH₃の場合とは異なりAMUPol未添加時には消失した。

このことから、スクロース由来炭素のC-OHの信号強度増強にはサンプル自身の内部ラジカルではなくAMUPol由来のラジカルが寄与していると考えられる。スクロース由来炭素においてC-OHのシグナルのみ信号強度の増強率が大きかった理由として、AMUPolは親水性であるために親水基であるC-OHと強く相互作用したためであると考えられる。

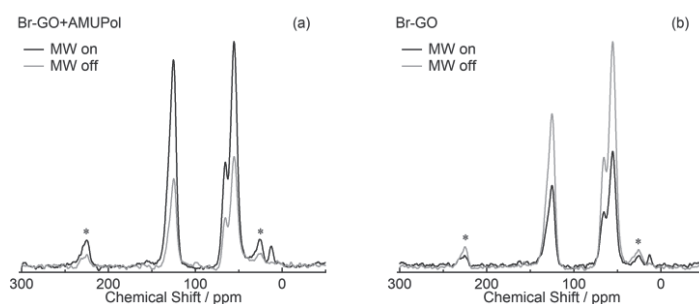


Fig. 1. ¹H-¹³C CPMAS DNP-NMR spectra of Br-GO with AMUPol (a) and without AMUPol (b). Spinning sidebands are marked with asterisks.

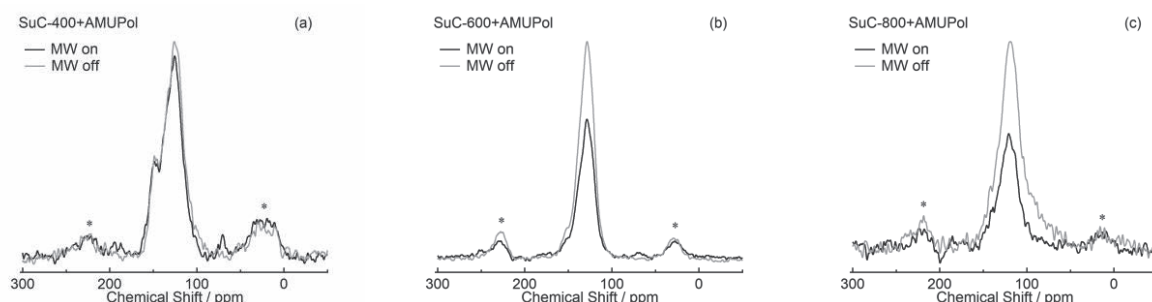


Fig. 2. ¹H-¹³C CPMAS DNP-NMR spectra of SuC-400 (a), SuC-600 (b) and SuC-800 (c) with AMUPol.

References

- [1] A. Svirinovsky-Arbeli, D. Rosenberg, D. Krotkov, R. Damari, K. Kundu, A. Feintuch, L. Houben, S. Fleischer, M. Leskes, *Solid State Nucl. Mag. Res.* **99** (2019) 7-14.

P77

無細胞合成系による β_2 アドレナリン受容体発現とその構造アンサンブルの固体NMR解析

○杉下友晃¹, 田巻初¹, 加藤賢¹, 藤原敏道^{1,2}, 松木陽^{1,2}

¹大阪大学・蛋白質研究所

²大阪大学・量子情報・量子生命研究センター

Expression of β_2 -adrenergic receptor with cell-free synthesis and its conformational ensemble analysis by solid-state NMR

○Tomoaki Sugishita¹, Hajime Tamaki¹, Ken Kato¹, Toshimichi Fujiwara^{1,2}, Yoh Matsuki^{1,2}

¹ *Institute for Protein Research, Osaka University*

² *Center for Quantum Information and Quantum Biology, Osaka University*

β_2 -adrenergic receptor (β_2 AR) is a model protein of G protein-coupled receptors, which has various conformation associated with ligands and the following cascades. Solid-state NMR can be a powerful method for the analysis of these conformational ensembles, which is important for the fundamental elucidation of the GPCR signaling mechanisms. However, selective labeling is necessary for the ensemble analysis in order to avoid the peak congestion and increase the spectral resolution. Cell-free synthesis is a remarkable solution, because it is not affected by cellular metabolism and cytotoxicity of additives. In this poster, we will specifically present ⁷⁷Se NMR measurements of selenomethionine-labeled β_2 AR prepared by cell-free synthesis, which is sensitive to the surrounding chemical environment and provide less peaks than other nuclei, and discuss the conformational ensemble of β_2 AR based on their side-chain analysis.

【背景・目的】

G蛋白質共役型受容体 (GPCR) は様々なリガンドとその結合に伴うカスケードによって、多種多様な生理学的機能に關与する巨大な膜蛋白質ファミリーである。なかでも β_2 -adrenergic receptor (β_2 AR) はGPCR研究初期からそのモデルとして取り上げられてきた研究対象であり、結晶構造解析、クライオ電子顕微鏡、NMRといった、多くの手法によって各種リガンド結合型の構造が提示されている。特に溶液NMRの結果から、 β_2 ARの構造変化はリガンドと構造が1対1で対応するような単純なモデルではなく、実際にはいくつかのコンフォメーション間で構造平衡が存在していることが示唆されている^[1]。しかし、それぞれのリガンド結合状態において β_2 ARが全体としてどのような構造アンサンブルをもっているか、定量的な評価は難しく、未だその詳細は不明である。

固体NMRは蛋白質の構造アンサンブル解析に利用できるポテンシャルはあるものの、低感度、低分解能という技術的制約によって従来その応用先は限定的であった。近年は高磁場動的核分極 (DNP) や高速マジック角試料回転 (MAS) の発展により、感度および分解能の問題が大幅に改善されつつある。その結果、今まではスペクトル線形が広幅になり感度不足で測定できなかった蛋白質のマイナーなコンフォメーション成分を掬い取ることができるようになってきた^[2]。

ただしMASによる分解能向上を考慮しても、特に構造アンサンブルがあるような系ではピーク混雑が避けられない。したがって、サンプル調製時の選択標識デザインが重要になる。ここで問題となるのが、GPCRの発現が一部の例外を除いて、基本的に昆虫細胞や哺乳細胞等の高次発現

固体NMR, 無細胞合成, GPCR

○すぎしたともあき, たまきはじめ, かとうけん, ふじわらとしみち, まつきよう

系に限られる点である。高次発現系ではアミノ基転移酵素等による代謝の関係で標識できるアミノ酸が制限される。その点において、無細胞合成系はアミノ酸代謝によるスクランプリングが起これら、任意の選択標識を行うことが可能である。また標的蛋白質や添加剤に細胞毒性がある場合でも問題がない。したがってNMR測定用のGPCRのサンプル調製に適した系であるといえる。

現在、 β_2 ARの機能と関連する構造アンサンブルについて多角的に分析することを目的として、無細胞合成系によるアミノ酸選択標識 β_2 ARサンプルを高磁場極低温DNP-NMR測定することによって得られる主鎖情報の解析と、セレノメチオニン標識 β_2 ARの高速MAS-NMR測定による側鎖情報の解析を両輪として研究を進めている。特に、今回の発表では後者のセレノメチオニン標識 β_2 ARの ^{77}Se 測定について議論する予定である。

【蛋白質発現・精製】

大腸菌用にコドン最適化した β_2 ARのDNA配列に対し、N末端にHATタグ、C末端にウェスタンブロット検出用のFLAGタグを導入した。この直鎖DNAをPCRで増幅し、無細胞合成のテンプレートとして使用した。大腸菌由来の無細胞反応液（太陽日酸）にセレノメチオニン含有アミノ酸液を添加して無細胞合成を行った。合成後、反応液をTALONレジンでアフィニティ精製し、TEVプロテアーゼでN末端のHATタグを切断した後、ゲルろ過精製を行った。脂質膜（DOPC）とコレステロール（コレステリルヘミコハク酸）が10:1（w/w）で組成されたリポソームに対し、精製した β_2 ARを再構成した。

【セレノメチオニン固体NMR測定】

^{77}Se はスピン1/2をもつ核種で、硫黄と同族であり性質もよく似ている一方で、硫黄の安定同位体 ^{33}S と比較して共鳴周波数や天然存在比、四極子相互作用の有無の観点からNMR観測に適しているため、しばしば硫黄の代わりに蛋白質に導入され、NMR測定に用いられる。

予備実験として、セレノ-L-メチオニンの微結晶粉末の固体NMR測定を行った。 ^1H 共鳴周波数700 MHz (^{77}Se 共鳴周波数133.5 MHz)のNMR分光計を使用し、MAS速度70 kHz、338 Kおよび288 Kの条件で行った ^1H - ^{77}Se の2次元double-CP測定の結果を示す (Fig.1)。338 Kでは111 ppmに1本のピークが得られたが、288 Kでは119 ppmと76 ppmにそれぞれ線幅の異なる2つのピークが得られた。この結果はPotrzebowskiらの、結晶構造中にセレノメチオニンのコンフォメーションが2つ存在するという報告^[3]と一致する結果であり、288 Kのスペクトルにおける2つのピークは、この2つの構造を反映していると考えられる。一方、338 Kでは熱揺らぎの影響で、これら2つの平均構造として1本のピークが得られたものと考えられる。 ^{77}Se の化学シフトは特に周辺の化学的環境に鋭敏であるため、セレノメチオニン標識した β_2 ARにおいても、そのコンフォメーション変化が議論できると期待される。

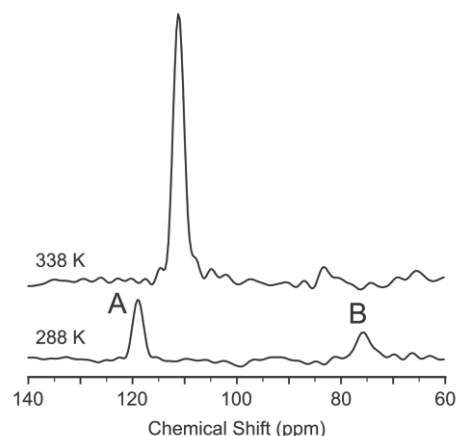


Fig. 1. ^{77}Se -NMR spectra of seleno-L-methionine microcrystalline powder.

Two spectra were provided with ^1H - ^{77}Se 2D double-CP at 338 K and 288 K.

References

- [1] Kofuku *et al.* (2012), *Nature communication*, **3**, 1045.
- [2] Takamuku *et al.* (2022), *Neurochemistry International*, **157**, 105345.
- [3] Gajda *et al.* (2006), *Jornal of Physical Chemistry B*, **110**, 25692.

P78Y

全固体電池の高感度オペランド計測法の開発

○四方歩美¹, 田上修¹, 藤原僚平¹, 高橋勝國¹, 寺西貴志¹, 端健二郎², 藤戸輝昭³, 品川秀行³, 後藤和馬¹

1岡山大学大学院 自然科学研究科

2物質・材料研究機構

3株式会社プローブ工房

Development of a high-sensitive *operando* NMR for all-solid-state batteries

○Ayumi Shikata¹, Osamu Tagami¹, Ryouhei Fujiwara¹, Masakuni Takahashi¹, Takashi Teranishi¹, Kenjiro Hashi², Teruaki Fujito³, Hideyuki Shinagawa³, Kazuma Gotoh¹

¹ Graduate school of natural science and technology, Okayama University

² National Institute for Materials Science

³ PROBE LAB. INC.

All-solid-state lithium-ion battery (ASSLB) is one of the most promising next-generation second batteries which has high safety and high energy density. However, a problem of deactivation which is caused by the deposition of dendritic lithium inside the battery during high-speed charging and discharging hasn't been settled. To solve the problem, it is required to clarify the charge-discharge behavior and to understand the deactivation mechanism. In this study, a handmade ASSLB and a probe were developed to realize *operando* ⁷Li NMR to observe the dendritic lithium. Lithium-ion insertion process into hard carbon electrode in ASSLB was observed using *operando* ⁷Li NMR.

【緒言】リチウムイオン電池はスマートフォンやノート型パソコンの電源として広く利用され、電気自動車への搭載や電力貯蔵目的での使用も広がっている。特に全固体リチウムイオン電池(全固体電池)は安全かつ高容量な電池として今後の実用化が期待されているが、高速充放電時に電池内部に針樹状金属リチウム(デンドライト)が析出し失活してしまうという問題が未解決であり、その充放電機構や失活メカニズムの解明が求められている。本研究では、リチウムデンドライトの直接観測が可能な⁷Li NMRによる電池の高感度オペランド計測を実現するため、全固体電池用セルとプローブを作製し、炭素負極へのLi吸蔵過程を観測した。

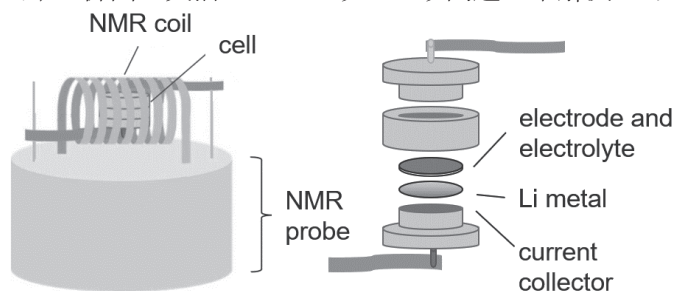


Fig.1 Structure of the cell and the probe

【実験】Ar雰囲気下のグローブボックス内でPEEK材製のプラスチックセルパッケージ、作用電極(ハードカーボン, Carbotron®P(J)), 硫化物系固体電解質(Li₆PS₅Cl, NEI Corp.), 対極(金属リチウム箔)で構成される半電池(Fig.1)を作製した。作用電極と固体電解質はφ8.0 mmの円形2層電極ペレットとした。

⁷Li NMR, オペランド計測, 全固体リチウムイオン電池

○しかたあゆみ, たがみおさむ, ふじわらりょうへい, たかはしまさくに, てらにしたかし, はしけんじろう, ふじとてるあき, しながわひでゆき, ごとうかずま

^7Li 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た。測定条件はシングルパルス系列、スピン・エコー法によるスペクトルの取得、積算回数 128 回、測定時温度 23°C および 60°C とした。電池電極面が外部磁場の向きに対して 90° になるよう電池をセットし、下限電圧を 0 V とした定電流定電圧放電 (Li 挿入) および下限電圧を -1.0 V とした過放電の際の全固体電池の内部変化をリアルタイムで観測した。

【結果・考察】 温度 23°C ・充放電速度 0.05 C で、下限電圧を -1.0 V とした過放電 (overdischarge) を行った電池では、放電開始から 2.5 時間ほどで界面反応による分解生成物のピークの出現・増加が観測された

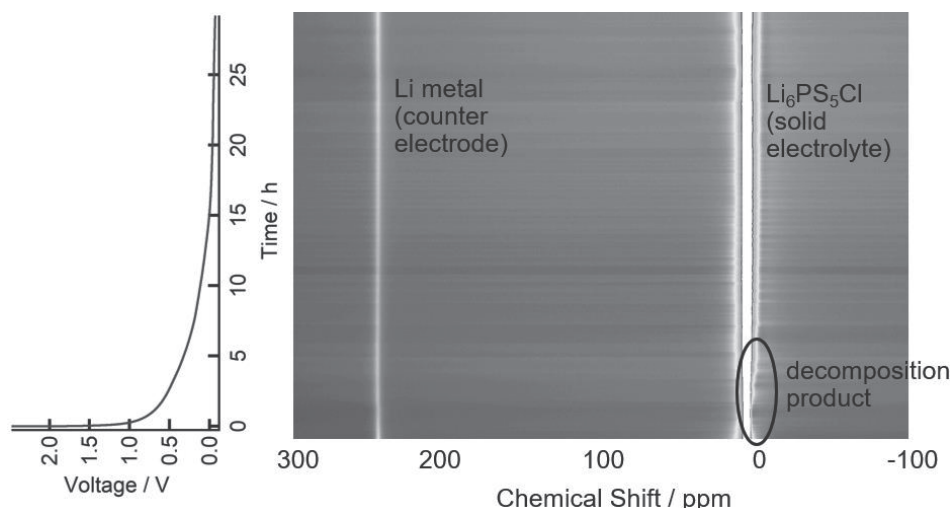


Fig.2 Charge-discharge curve and the corresponding *operando* ^7Li NMR spectra (23°C , 0.05C overdischarge)

(Fig.2, 丸印). 放電の終盤 (0 V 到達から約 6 時間後) で

$60\sim 120\text{ ppm}$ に幅広いピークが観測された。このピークはハードカーボン電極に挿入され形成されたリチウムクラスターに帰属される。デンドライトピークは観測されなかったが、その後更に過放電を行い電池が短絡した状態ではデンドライト状リチウムに帰属される 278.2 ppm のピークが観測された。

温度 60°C ・充放電速度 0.1 C で、 0 V まで定電流放電その後定電圧放電 (CCCV discharge) を行った電池では、 0 V 到達時の容量が 364.5 mAh g^{-1} と大きく伸び、明瞭な分解生成物ピークは観測されなかった。この電池でも放電の終盤 (0 V 到達から約 4 時間後) でハードカーボン電極内に形成されたリチウムクラスターの幅広いピーク ($60\sim 120\text{ ppm}$) が観測された (Fig.3)。

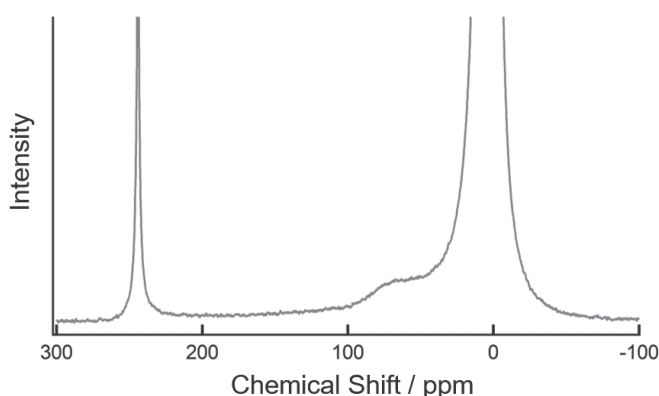


Fig.3 A ^7Li NMR spectrum in *operando* measurement (60°C , after 0.1C CCCV discharge)

本研究ではオペランド計測を実現する特殊型全固体電池の作製に成功し、室温および高温 (60°C) にて全固体電池の放電時の内部変化 (分解生成物、クラスター、デンドライト) を観測することができた。

P79

水素交換速度観測を利用したファーマコフォア解析の試み

○栗田順一¹, 平尾優佳¹, 西村善文^{1,2}

¹横浜市立大学生命医科学研究科

²広島大学大学院統合生命科学研究科

Pharmacophore analysis using hydrogen exchange rates

○Jun-ichi Kurita¹, Yuuka Hirao¹, Yoshifumi Nishimura^{1,2}

¹Graduate school of medical life science, Yokohama City University

²Graduate school of integrated sciences for life, Hiroshima University

Currently, NMR is used as a tool for screening and analyzing drug candidates in various stages of drug discovery. Although widely used chemical shift perturbation experiments are very effective for analyzing interactions of compounds with a target protein, in the case of a flexible target protein, chemical shift changes themselves are also sensitive to the protein conformational changes caused by binding to a compound and it is too difficult to identify the interaction site in the protein. The well-known saturation transfer method has been applied to relatively large molecular weight complexes with efficient spin diffusions, such as protein-protein interactions, but is not easily applied to the interaction of small proteins with small molecular ligands, in addition sample preparations such as deuterium labeling technique is hardly to be applied. Here, we attempted to use hydrogen exchange rates in a flexible target protein, which is possibly labelled even with only relatively inexpensive ¹⁵N stable isotope, and to apply the interaction site analysis of the target with some ligands.

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タンパク質とリガンドの相互作用解析においてなくてはならないツールとして現在使われており、相互作用解析では滴下実験による化学シフト変化の観測が広く行われている。この手法は鍵と鍵穴のような相互作用の解析には非常に有効ではあるものの、化学シフト変化自体がタンパク質の構造変化にも敏感である為に柔軟なタンパク質とリガンドの相互作用の様な場合は相互作用部位を特定することは困難である。タンパク質とタンパク質の相互作用の様にスピン拡散が効率よく進むような比較的分子量が大きい系では飽和移動法のようなスマートな方法を適応することができるが、小さなタンパク質と低分子リガンドのような系では適用が難しく、更に重水素ラベルが必要であることなど試料調製のハードルが高い。そこで我々は、¹⁵N安定同位体標識のみで行える水素交換速度を観測し、その変化を相互作用解析に応用することを試みた。

方法

ターゲットタンパク質mSin3A PAH1ドメイン(100uM, スクリーニングにより選抜された化合物D5を1:1になるようにpH6.8 50mM リン酸バッファー(10%D₂O)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、HETex-TROSY法¹により水素交換速度を観測した。

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

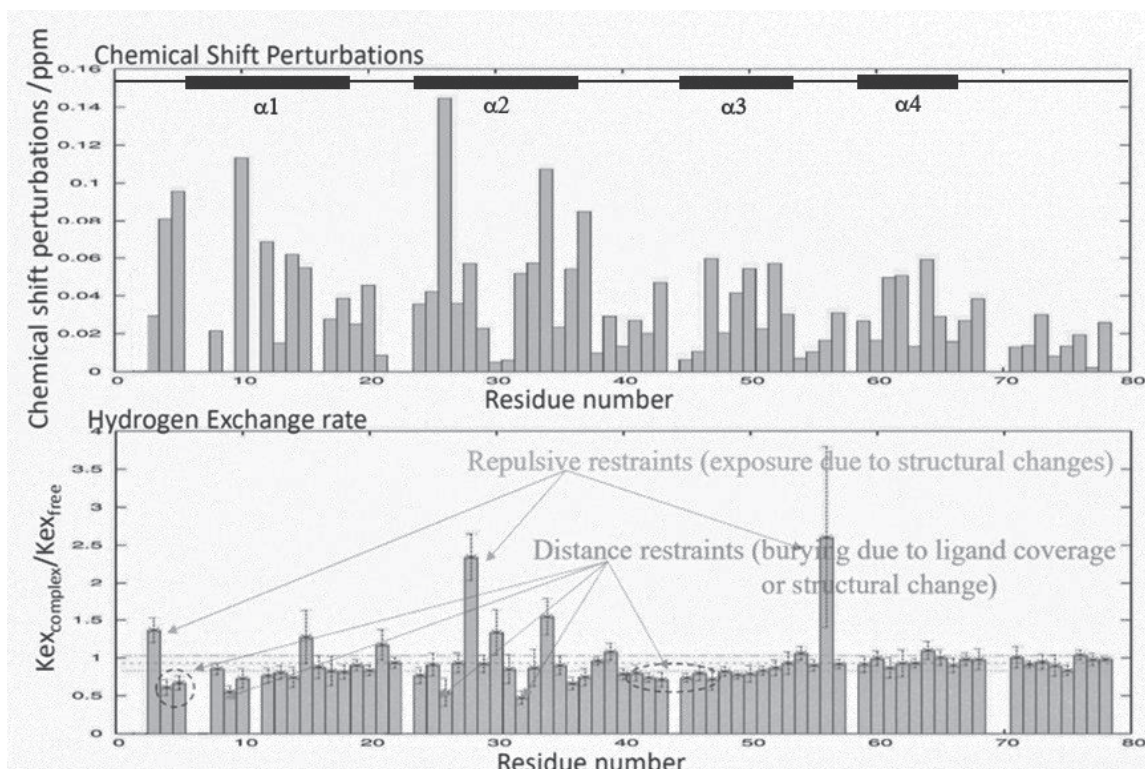


図1. 化合物 D5 の結合による Sin3A PAH1 ドメインの CSP(上)と水素交換速度変化(下)の比較

結果と考察

Sin3A PAH1 ドメインは化合物 D5 との結合によりドメイン全体の化学シフトが変化しており局所的な変化の特定が困難であるが、水素交換速度は局所的な変化が観測されている(図1)。またそれぞれの実験において変化の平均値から σ よりも大きい変化を見せた残基を active residue として HADDOCK によるドッキングを行った結果を図2に示す。CSP は柔軟な部位が大きな変化を見せる傾向がある為、テール付近に結合している

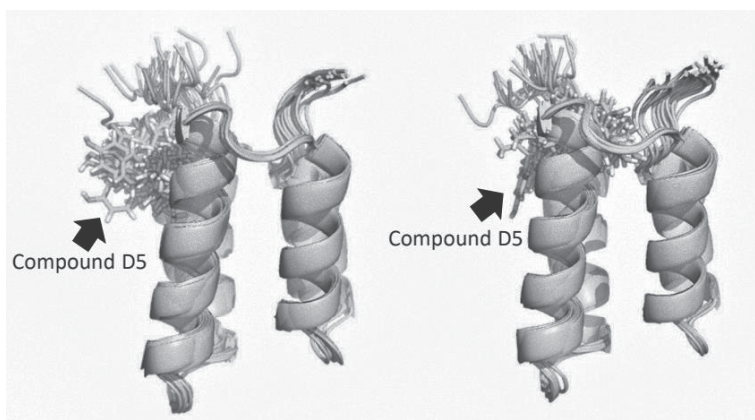


図2. CSP 情報を利用したドッキング構造(左)水素交換速度変化観測を利用したドッキング構造(右)

ように解析されてしまうが、水素交換速度変化を用いた解析ではよりポケットに入った結合様式に解析された。この系では $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ 安定同位体標識サンプルを用いることによってポケット奥に存在するV46やI47からの分子間NOEを観測することができたため、水素交換速度観測を用いた解析による複合体構造が支持された。これは本手法の妥当性を示すものである。

(1) Rennella, E., Solyom, Z., and Brutscher, B. (2014) Measuring hydrogen exchange in proteins by selective water saturation in 1H- ^{15}N SOFAST/BEST-type experiments: advantages and limitations. *J. Biomol. NMR* 60, 99–107.

P80Y

共晶法による生体分子のTriplet DNP

○佐藤晴紀¹, 宮西孝一郎^{2,3}, 根来誠^{3,4}, 香川晃徳^{2,3}, 西山裕介^{5,6}, 中村浩一⁷, 犬飼宗弘⁷

¹ 徳島大学大学院 創成科学研究科

² 大阪大学大学院 基礎工学研究科

³ 大阪大学 量子情報・量子生命研究センター

⁴ 量子科学技術開発機構 量子生命科学研究所

⁵ 理研-JEOL 連携センター

⁶ 株式会社 JEOL RESONANCE

⁷ 徳島大学大学院 社会産業理工学研究部

Hyperpolarization of Biomolecules in eutectic crystals using Triplet DNP

○Haruki Sato¹, Koichiro Miyanishi^{2,3}, Makoto Negoro^{3,4}, Akinori Kagawa^{2,3}, Yusuke Nishiyama^{5,6}, Koichi Nakamura⁷, Munehiro Inukai⁷

¹ Graduate School of Sciences and Technology for Innovation, University of Tokushima

² Graduate School of Engineering Science, University of Osaka

³ Center for Quantum Information and Quantum Biology, University of Osaka

⁴ Institute for Quantum Life Science, National Institutes for Quantum Science and Technology

⁵ RIKEN - JEOL Collaboration Center

⁶ JEOL RESONANCE Inc.

⁷ Graduate School of Technology, Industrial and Social Sciences, University of Tokushima

Dynamic nuclear polarization using photo-excited electron spin (Triplet DNP) can significantly improve the sensitivity of NMR measurements at room temperature. This hyperpolarization technique has been applied to several small molecules such as, metal-organic framework, drug molecules, and biomolecules. Here, we present Triplet-DNP of eutectic crystals methods to hyperpolarize metabolic biomolecules. We have performed powder X-ray diffraction measurement to confirm the crystal structure of the eutectic crystals and UV-vis spectroscopy to investigate in which region pentacene was doped. Furthermore, the spin diffusion coefficient of ¹H were investigated from two dimensional ¹H-¹H exchange NMR experiments and comparison among the relaxation time of the eutectic polycrystals, benzoic acid polycrystals, and polycrystals of the target molecules. These results conclude that the eutectic crystals have small domain where polarization diffuse from benzoic acid to target analyte until the relaxation time.

[序論]

核スピンの偏極率を向上させる手段の一つに光励起三重項状態の電子スピンを用いたDNP(Triplet DNP : Triplet dynamic nuclear polarization)が挙げられる。光照射で生じる高い電子スピン偏極を偏極源として用いることで、寒剤を用いず室温でNMR測定感度を大幅に向上させること

動的核偏極, MAS NMR, 共晶

○さとうはるき, みやにしこういちろう, ねごろまこと, かがわあきのり, にしやまゆうすけ, なかむらこういち, いぬかいむねひろ

ができる^[1]。しかし、偏極源であるペンタセンが難溶のため、生体分子中への分散が困難であった。これまでに、可溶性偏極源の利用^[2]や溶解DNPとNOE(Nuclear Overhauser Effect)を組み合わせた低分子偏極の報告例^[3]などがあるが、偏極率や実験温度などに課題が残されており、室温で高い偏極率を可能とする手法の開発が求められている。

本研究では、共晶法を用いたTriplet DNPに注目し、その構造や偏極拡散過程を明らかにすることに加え、適用範囲の拡張を行った。共晶とは、2つの低分子を合成した際にお互いの結晶相が維持した状態で混ざり合う結晶のことである。これまでに、偏極源であるペンタセンを分散した安息香酸とターゲットとなる分子を混合させ共晶とすることでターゲット分子の超偏極化が可能となっている^[4]。共晶法は様々な分子に適用できる将来性があるが、報告例では、安息香酸(ペンタセンを分散した)と安息香酸類似化合物(ターゲット分子)から組み上がる共晶の到達偏極率の報告のみにとどまった。共晶法を広く応用するためには、カルボン酸や芳香族を含まない分子をターゲット分子として、高偏極化することやその構造や偏極拡散過程の考察を行うことが不可欠である。そこでクエン酸回路の一部であるコハク酸、糖であるエリスリトールや葉であるカフェインなどの生体分子をターゲット分子とし、安息香酸との共晶を合成し、Triplet DNPにより高偏極化に成功した。また、共晶の構造解析や偏極拡散過程を固体高分解能NMRによって明らかにした。

[共晶の合成と構造]

安息香酸に対し、ペンタセン(0.06 mol%)を添加し、加熱融解(200°C)合成によりペンタセンを安息香酸結晶相中に分散させた(以下安息香酸を **BA**、ペンタセンを分散した安息香酸を **BAP** と呼ぶ)。得られた **BAP** とターゲット分子であるコハク酸、エリスリトール、カフェインを化学量論比1:1で加熱融解(200°C)合成により共晶を合成した(以下コハク酸を **SUA**、エリスリトールを **ET**、カフェインを **CAF** と呼ぶ)。

結晶構造解析を行うため、各サンプルの粉末 XRD 測定を行った。どのサンプルも **BA** のスペクトルとターゲット分子単体のスペクトルの重ね合わせのスペクトルが確認された。これはお互いの結晶構造が維持した状態で結晶を形成していることを示唆している。共晶の特徴であるそれぞれの結晶相を維持した状態で混ざった結晶と一致しており、**BA** と **SUA**、**ET**、**CAF** は共晶を形成していることが明らかとなった。

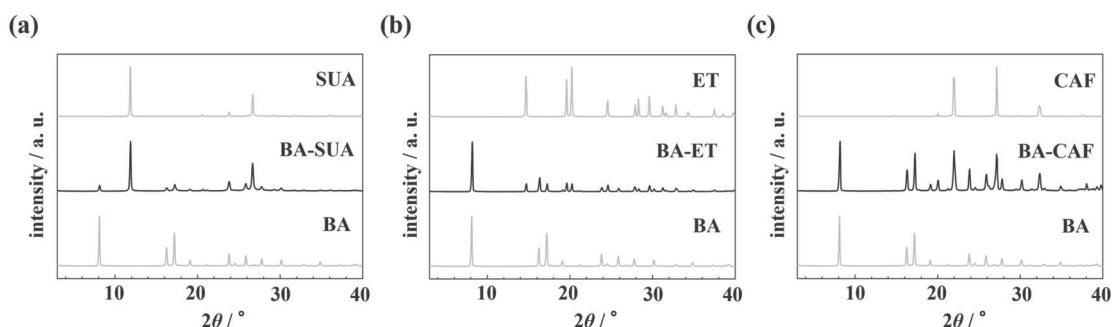


Fig. 1. PXRD of (a) BA-CAF, (b) BA-ET and (c) BA-SUA in eutectics.

[共晶におけるペンタセンの位置]

偏極源であるペンタセンの位置を明らかにするため、3つの共晶と**BAP**のUV-vis測定を行った。3つの共晶と**BAP**は共にペンタセン由来の光吸収ピークを示し、ペンタセンが共晶および**BA**中に分散していることを確認した。加えて、光吸収ピークが全て一致したことから、ペンタセン周辺の環境は同じ、すなわち共晶中でのペンタセンは**BA**の結晶相中に分散していることが予想される。

[共晶の Triplet DNP]

これら 3 つの共晶に対して、Triplet DNP を行った。ターゲット分子の偏極が明確になるように、安息香酸の全ての水素、及びターゲット分子の水酸基とカルボキシル基の水素を重水素と交換した試料 (d_6 -BA : D 化率 92%、 d_4 -ET : D 化率 60%、 d_2 -SUA : D 化率 95%) を用いた。Triplet DNP を行った後の ^1H NMR 測定において、明らかな増強された信号を確認できた (Fig. 2 (b) 黒色)。この結果から、どの共晶も 0.4 T の熱平衡状態に比べ、100 倍以上の偏極率を示し (Fig. 2 (c))、室温下で生体分子の高偏極化に成功した。

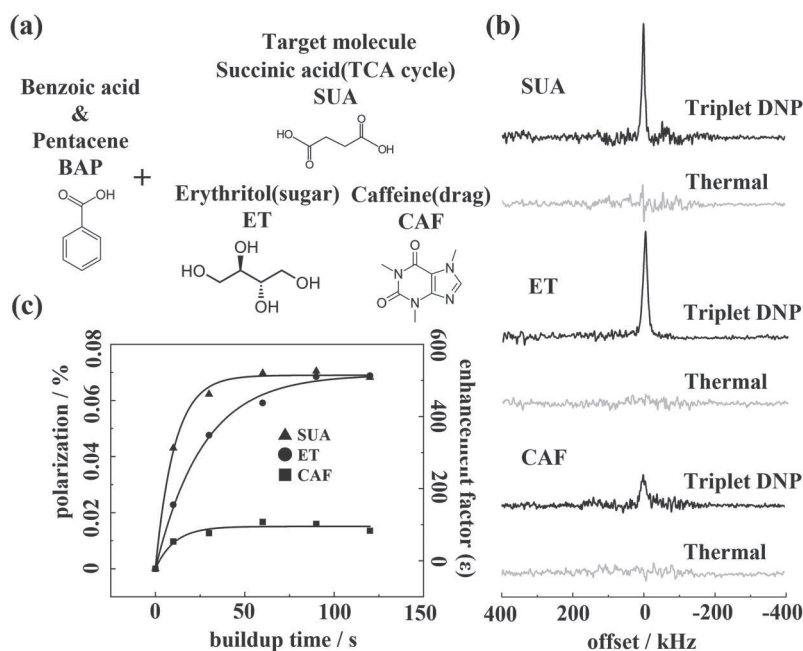


Fig. 2. Triplet DNP of (a) molecular with eutectic and (b) ^1H NMR spectra (black) and thermal ^1H NMR spectra (gray). (c) The buildup curve of target molecular in eutectics.

[偏極拡散過程の解明]

次に、どのようにペンタセンを含む安息香酸の偏極相からターゲット分子の結晶相に偏極が移動しているかを調べた。部分的な重水素化をした d_5 -BA (ベンゼン環を重水素化) とターゲット分子からなる共晶を合成し、 ^1H MAS NMR により T_1 測定を行った。磁場強度は 14 T、試料回転速度は 70 kHz である。

d_5 -BA のカルボン酸の T_1 は、 d_5 -BA-ET では 61.2 s から 55.4 s、 d_5 -BA-CAF では 29.9 s に減少した。ET のエチレンと CAF のメチルの T_1 も d_5 -BA-ET と d_5 -BA-CAF でそれぞれ 573 s から 52.3 s、33.3 s から 28.3 s に減少しており、 d_5 -BA のカルボン酸とターゲット分子のエチレン、メチルの T_1 は共有していることが確認された。超高速 MAS NMR 条件下では、 ^1H - ^1H 双極子カップリングが抑制されるため、スピン拡散が遅くなる。これらの T_1 解析は、スピン拡散が遅い状態でも共晶中の磁化が均一にスピン拡散していることを示唆している。共晶中において、緩和時間の間は偏極相 (BAP) からターゲット分子の結晶相へ磁化が拡散可能ということが明らかとなった。

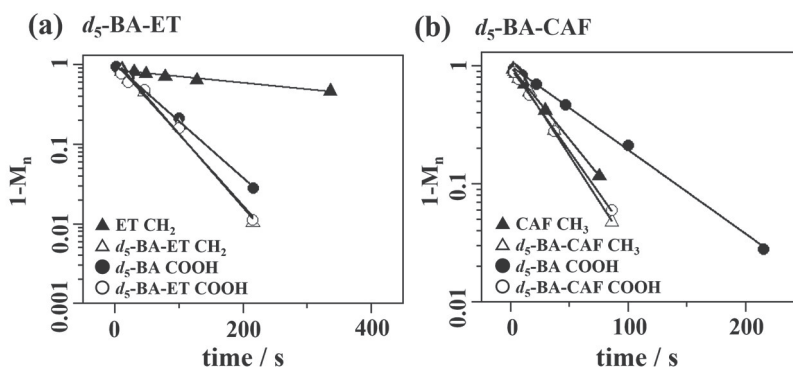


Fig. 3. T_1 saturation recovery of (a) d_5 -BA-ET, (b) d_5 -BA-CAF.

次に、 ^1H 2D exchange MAS NMR 測定を $d_5\text{-BA}$ と CAF による共晶に対して行った。交換時間 (mixing time) が 0.1 s のスペクトルは CAF 結晶相内の磁化交換を示すピークのみ示した (Fig. 4 (a)) が、10 s のスペクトルでは $d_5\text{-BA}$ のカルボン酸と CAF のメチル間で磁化交換を示すクロスピークを確認できた (Fig. 4 (b))。これは $d_5\text{-BA}$ と CAF が緩和時間内でスピン拡散が可能な距離に近接していることを示しており、すわなち、BAP による超偏極が CAF に拡散していることを示唆している。

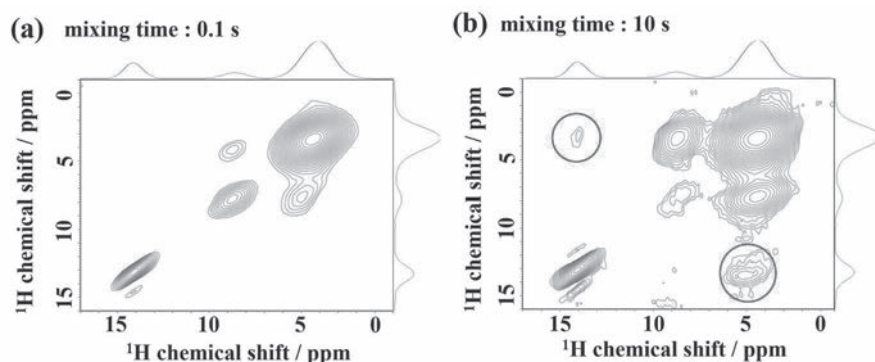


Fig. 4. 2D exchange ^1H MAS NMR spectra of $d_5\text{-BA-CAF}$ mixing time of (a) 0.1 s and (b) 10 s.

[まとめ]

本研究では、ペンタセンを分散させた安息香酸とコハク酸、エリスリトールやカフェインの共晶を合成した。UV-vis 測定により、共晶における偏極源のペンタセンがターゲット分子の結晶相ではなく、安息香酸の結晶相中に分散されていると予想した。これら共晶を Triplet DNP により、室温で高偏極化することに成功した。2D exchange ^1H MAS NMR スペクトルにより、安息香酸とターゲット分子間でスピン拡散が確認できた。このことから、共晶を用いた Triplet DNP では、安息香酸の偏極相から、スピン拡散によりターゲット分子の結晶相へ偏極が移動することを示唆している (Fig. 5)。

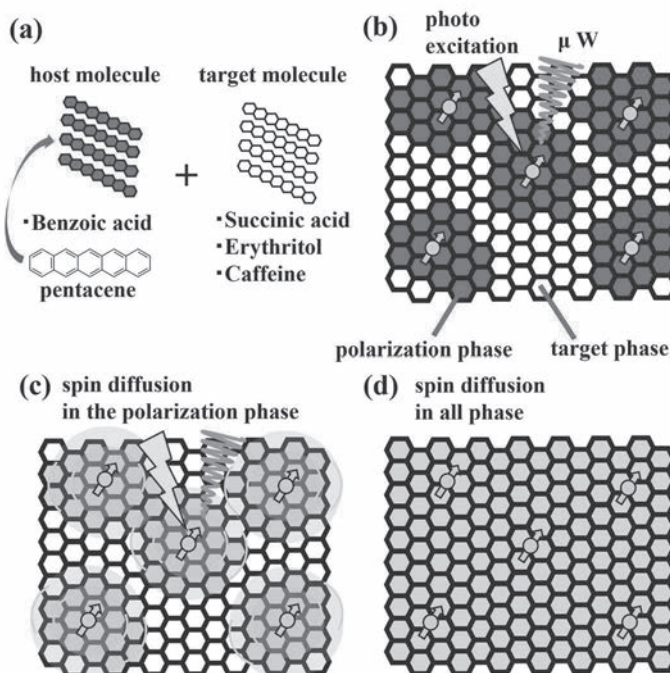


Fig. 5. (a) Synthesis of eutectic and (b) eutectic matrix and Triplet DNP. (c, d) Spin diffusion of polarization from the polarization phase with polarization source to target phase.

[Reference]

- [1] K. Tateishi, M. Negoro, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2014, **111**, 7527.
- [2] N. Yanai, et al., *J.Phys. Chem. Lett.* 2021, **12**, 2645.
- [3] T. R. Eichhorn, A. J. Parker, I. Schwartz, et al., *J. Am. Chem. Soc.* 2022, **144**, 2511.
- [4] A. Kagawa, et al., *J.Phys. Chem. A.* 2018, **122**, 9670.

P81

親水性ナノ細孔に閉じ込められた階層的な水分子クラスターの²H-NMRスペクトル解析

○齊藤 明¹, 尾花駿一¹, 並木智哉¹, 小林文也¹, 栗原拓也², 水野元博², 田所 誠¹

1 東京理科大学・理学部第1部化学科

2 金沢大学・理工研究域

²H-NMR Spectroscopy on Hierarchical Water Molecule Clusters Confined to Hydrophilic Nanoporous Channels

○Akira Saito¹, Shunichi Obana¹, Tomoya Namiki¹, Fumiya Kobayashi¹, Takuya Kurihara², Motohiro Mizuno², Makoto Tadokoro¹

¹ Department of Chemistry, Faculty of Science, Tokyo University of Science

² Graduate School of Natural Science and Technology, Kanazawa University

We have investigated on water molecular clusters (WMCs) confined to hydrophilic quasi-1-D nanoporous channels in the self-organized molecular crystal. The WMC structure has a hierarchical structure of three phases, which is different by the strength of H-bonding interaction. This time, by ²H-NMR spectra, three kinds of WMC layers would be observed in the melting and freezing state. It was confirmed that, by X-ray crystal analysis, the crystal structures of a dynamic WMC in the melting state and a static WMC in the freezing one were clarified to have three hierarchical layer structures.

【諸言】準一次元ナノ細孔を有する親水性分子結晶の内部に閉じ込められた水分子クラスター (Water molecular cluster: WMC) は、外壁に存在する周期的な親水性官能基の影響で低温では外側から氷結し、WMC内部にいく

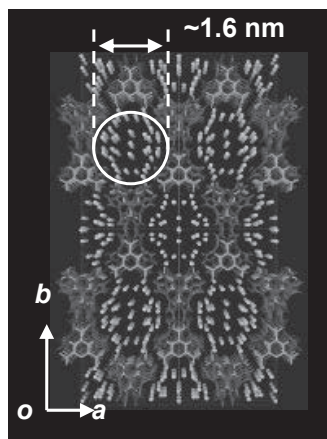


Fig. 2. Crystal structure of 1.

につれて凍結しにくくなる。これは外壁が -Si-O-Si- 基のアモルファスからなるMCM-41などのメソポーラス材料が、内部からバルクの I_c に氷結し、外壁付近の H₂O は構造をもたずに凍結する傾向とは異なっている。そのため、親水性ナノ多孔質結晶内に捕えられたWMCはバルク氷と異なった挙動を示し、例えばWMCの凍結構造はバルク氷と異なった構造を示す。(Fig.1) 本研究では、親水性分子多孔質結晶内に閉じ込められたWMCの性質を固体 ²H-NMR で調査することを目的にあげた。

固体²H-NMR, 分子性ナノ多孔質結晶, 水分子クラスター

○さいとうあきら, おばなしゅんいち, なみきともや, こばやしふみや, くりはらたくや, みずのもとひろ, たどころまこと

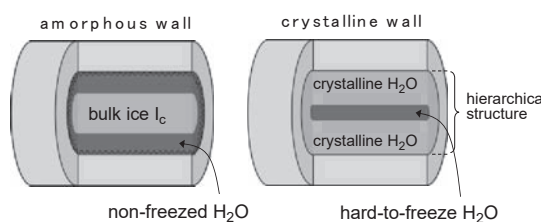
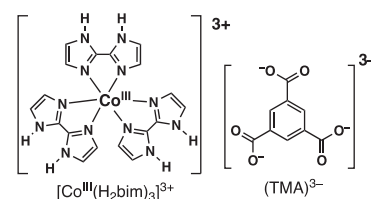


Fig.1. Images of freezing behaviours of WMC
(a) Mesoporous silica and (b) Nano-porous molecular crystal



私たちの研究室では準一次元ナノチャンネル構造にWMCを閉じ込めた構造をもつ $\{[\text{Co}^{\text{III}}(\text{H}_2\text{bim})_3](\text{TMA})\cdot 20\text{H}_2\text{O}\}_n$ (**1**) ($\text{H}_2\text{bim} = 2,2'$ -biimidazole, $\text{TMA}^{3-} = \text{trimesate}$) の結晶合成に成功した. ($M = \text{Co}^{\text{III}}, \text{Rh}^{\text{III}}, \text{Ru}^{\text{III}}, \text{Cr}^{\text{III}}, \text{Os}^{\text{III}}$ が知られている.) 固体の ^2H -NMRの測定に結晶 **1** を選択した理由は Co^{III} 錯体が測定に適したLS (low spin) の反磁性だからである. Fig. 2 に示したように, 規則性の高い準一次元親水性ナノチャンネル ($\phi \sim 1.6$ nm) を有する多孔質結晶に自己組織化する. この内部に取り込まれたWMCは, 細孔壁面にある $-\text{COO}^-$ 基の親水性O原子との水素結合で構造化されていた. そして, その相転移前後でのWMC構造を求めることに成功した.^[1]X線構造解析では周辺の水素結合の状態によって, 融解状態や凍結状態でもWMCの構造は 3 層の構造をもつことが明らかになっている. 固体の ^2H -NMRの測定によって, H_2O 同士の水素結合性相互作用の違いから, WMCの3層からなる階層構造を観測することを試みた.

【実験】 $[\text{Co}^{\text{III}}(\text{H}_2\text{bim})_3](\text{NO}_3)_3$ と K_3TMA を水中でゆっくりと拡散させることで, 赤色の六角柱状結晶として **1** を得た. これを D_2O (99.9%) に1時間程漬け込む操作を2回行い, 内部に取り込まれた H_2O を D_2O に置換した $\{[\text{Co}^{\text{III}}(\text{D}_2\text{bim})_3](\text{TMA})\cdot 20\text{D}_2\text{O}\}_n$ (**2**) を得た. **2** を硬質ガラス製サンプル管 (ϕ 4 mm) に 20 mg 程度入れ, 液体 N_2 に漬けて結晶内部の D_2O を凍結させた. このガラス管内を真空ポンプで脱気し, 焼き切ることでNMR測定の微結晶粉末サンプルとした. また, ガラス管に数 mm に成長した **2** の単結晶と D_2O で湿らせた綿を封入した単結晶サンプルも作成した. これらのサンプルを Bruker社の400 MHz NMRの装置を用いて, 四極子エコー法 (共鳴周波数61.44 MHz) によりの固体 ^2H -NMRスペクトルを測定した. また, 固体 ^2H -2次元交換NMRも試みているところである.

【結果と考察】 Fig. 3 に 163 K から 243 K までの **2** の粉末サンプルによる ^2H -NMRスペクトルの結果を示した. 213 Kからブロードなピーク (-100 kHz \sim $+100$ kHz) が先鋭化 (-5 kHz \sim $+5$ kHz) していることが観測された. この温度付近で融解凝固の相転移が起こっているものと考えている. 先鋭化したピークにも異方性があり, WMCのピークであることが分かる. 163 Kにはいくつかショルダーが観測されるため, 四極子結合定数 C_Q と非対称性パラメーター η を用いてフィッティングを行った. 中心のブロードなピークに加えて, C_Q が大きな異方性をもつ

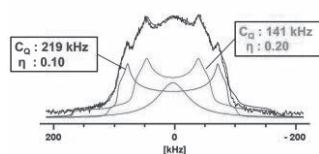


Fig. 4. Deconvolution of ^2H -NMR of **2** at 163 K

ピーク ($C_Q = 219$ kHz, $\eta = 0.10$) と, やや異方性が小さなピーク ($C_Q = 141$ kHz, $\eta = 0.20$) の3つに分解できることが分かった. これらの3種類のピークは, WMCの凍結構造の運動に起因しているものと考えている. pake doublet に近い $C_Q = 219$ kHzのピークを除いて, 163 Kの凍結構造でも2種類の D_2O の運動モードを残しているものと考えている. これらの運動モードがWMCの凍結構造と関係づけられるか検討中である. さらに, 単結晶 **2** を用いて融解した温度領域でダイナミックなWMCの階層的なクラスター構造を確認できるかについても検討中である.

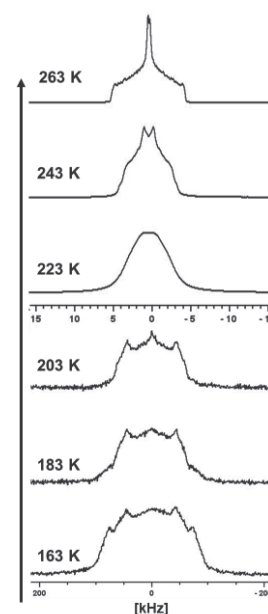


Fig. 3. Temperature-dependent solid-state

References

- [1] M. Tadokoro *et al.*, *Chem. Commun.*, 2006, 1274-1276
- [2] M. Tadokoro *et al.*, *Chem. Lett.*, 2010, **39**, 186-187

P82Y

多孔性配位高分子における二酸化炭素と水の動的挙動と競争吸着

○金子宗平¹、栗原拓也²、水野元博³、中村浩一⁴、犬飼宗弘⁴

¹徳島大学大学院創成科学研究科理工専攻

²金沢大学理工研究域物質化学系

³金沢大学ナノマテリアル研究所

⁴徳島大学大学院社会産業理工学研究部理工学域

Dynamics and competitive adsorption of carbon dioxide and water on PCP

○Sohei Kaneko¹, Takuya Kurihara², Motohiro Mizuno³, Koichi Nakamura⁴, Munehiro Inukai⁴

¹ Graduate School of Sciences and Technology for Innovation, University of Tokushima

² Graduate School of Natural Science and Technology, Kanazawa University

³ Nanomaterials Research Institute, Kanazawa University

⁴ Graduate School of Technology, Industrial and Social Sciences, Tokushima University

Separation and recovery of CO₂ from exhaust gases is an important issue in modern society. Recently, PCP has attracted much attention, and studies on CO₂ separation and storage under wet conditions have been conducted. However, detailed analysis of CO₂ adsorption sites, dynamics, and diffusion behavior inside PCP under wet conditions is limited, and such information have been on demand to consider its separation and storage capacity.

In this study, we focused on UTSA-16, which has high CO₂ adsorption ability under wet conditions, and analyzed the dynamics of CO₂ and H₂O with MAS NMR to elucidate the adsorption under wet conditions. The NMR analyses shows specific dynamics of adsorbed H₂O and competitive adsorption of CO₂.

[序論]

地球温暖化の原因となるCO₂は火力発電所や工場の排気ガスから多量に排出されており、それら排気ガスから二酸化炭素を分離・回収する技術開発は重要な課題の一つである。近年、湿潤環境下で多大なエネルギーを必要とせずにCO₂分離・貯蔵を可能とする材料として多孔性配位高分子(PCP: Porous Coordination Polymer)が注目されている。PCPは金属イオンと有機配位子で構成されており、その組み合わせ次第で細孔の大きさや形状を自由に設計することが出来るポーラス材料である^{[1][2]}。

一般的に、湿潤環境下のPCPはCO₂より極性分子であるH₂Oが優先的に吸着するため、吸着サイトがH₂Oに占有されてしまい、CO₂の吸着量が著しく減る。湿潤環境下でもCO₂吸着量を維持できるPCPの報告例はわずかにあるが^[3]、その詳細な機構は不明であり、解明が望まれる。これまでPCP内部におけるCO₂分離・吸着の研究^[4]は盛んに行われているが乾燥雰囲気下に限られており、湿潤環境下のPCP内部におけるH₂O及びCO₂の分子運動や拡散挙動などに関する詳細な解析例はほぼ皆無である。

MAS NMR

○かねこそうへい、くりはらたくや、みずのもとひろ、なかむらこういち、いぬかいむねひろ

本研究では、湿潤環境下で高いCO₂吸着能を維持するUTSA-16 [K₂Zn₃(C₆H₄O₇)₂] [5] に注目し、MAS NMR解析によってPCP内部のH₂OとCO₂の位置や運動を明らかにすることで、湿潤混合ガスにおけるCO₂吸着機構の解明に取り組んだ。複数種類のガスをPCPとともに封入できるMAS試料管と導入装置を使用し、D₂OとCO₂の混合ガスをPCPに封入しながら、湿度雰囲気下におけるCO₂とD₂O、およびUTSA-16のNMR解析を行った。

[混合ガス封入装置]

従来のMAS用サンプル管ではサンプル管内にCO₂分子を封入することは困難である。本研究ではJEOL製4mmサンプル管の形状をベースに設計されたサンプル管を使用した(Fig1.(a))^[6]。Oリングを2個装着したスクリューキャップにより、試料空間のガス圧を保ったままローターを密閉することができる。スピニングキャップは、JEOL製4mmスピニングキャップを使用することができる。ガス封入チャンバー(Fig1.(b))を使用することで様々な圧力の水及び複数ガスをサンプル管に封入することが可能である。本研究ではD₂Oにより加湿したN₂ガスと¹³C CO₂ガスを用いた。

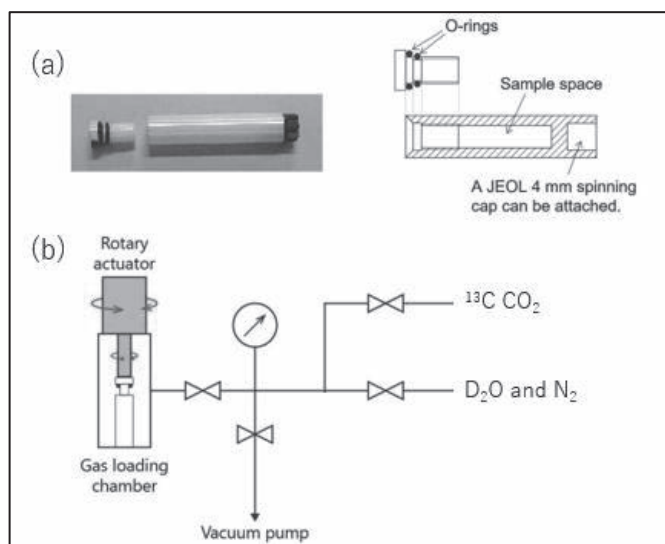


Fig 1. (a) 4mm スクリューサンプル管と (b) ガス封入チャンバー^[6]

[PCPの構造と合成]

UTSA-16 [K₂Zn₃(C₆H₄O₇)₂] は亜鉛、カリウム及びクエン酸によって構成されており、細孔径が3.3×5.4Å²のダイヤモンド型に組み上がっているPCPである(Fig.2(a))。各クエン酸のカルボン酸の酸素は一つを除いて金属を中心とした八面体と四面体及びK⁺を配位している(Fig.2(b))。合成直後の状態では各K⁺に2つ水が配位しており、この配位水にCO₂が吸着することが報告されている^[7]。また、配位水の結合は弱く、90℃の温度で1日真空乾燥することで完全に除去することが出来る。他にもCO₂の吸着サイトとして、配位水を除去した後のK⁺や配位子であるクエン酸が予想されている^[7]。

酢酸亜鉛二水和物、水酸化カリウム及びクエン酸をH₂O中で混合した溶液にエタノールを加えて120℃で2日加熱し、UTSA-16の粉末を得た。得られた粉末をメタノールで3日洗浄した後、室温で24時間真空乾燥したものを1とする。本研究では複数条件でNMR測定を行い、CO₂やH₂Oの運動を調べた(Table 1)。

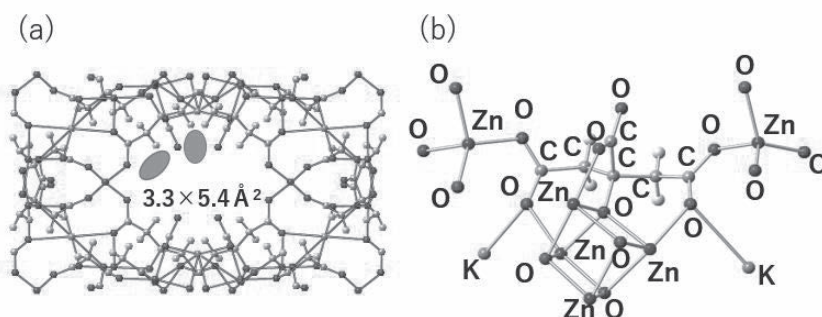


Fig. 2 (a) 細孔の大きさ(灰円は吸着部位)と (b) UTSA-16 のクエン酸周りの構造

Table 1 試料の後処理

サンプル名	1からの調整
1_ assyn 1a	D ₂ Oに12時間曝露しH ₂ OをD ₂ Oに交換 90°Cで10時間真空乾燥してH ₂ O除去後
1a_D₂O(1h)	90°Cで10時間真空乾燥してH ₂ O除去後、 D ₂ Oに1時間曝露
1a_D₂O(12h)	90°Cで10時間真空乾燥してH ₂ O除去後、 D ₂ Oに12時間曝露
1a_D₂O + CO₂	90°Cで10時間真空乾燥してH ₂ O除去後、 D ₂ OとCO ₂ の混合ガスに30分曝露

[NMR測定条件]

すべての固体NMR実験は、日本電子のJNM-ECA300分光器を用いて、7 T超伝導マグネットと4 mm MASプローブにより室温で行った。¹H、¹³C MAS NMR測定は試料回転速度5 kHzで測定した。UTSA-16に吸着させるCO₂は¹³C同位体置換したものを用いた。湿潤雰囲気下の水の運動を知るために、H₂Oの代わりにD₂Oを用いて²H NMR 四極子エコー測定（試料回転速度0 Hz）を行った。

知するために、H₂Oの代わりにD₂Oを用いて²H NMR 四極子エコー測定（試料回転速度0 Hz）を行った。

[UTSA-16内部のD₂Oの運動性、及びCO₂との競争性]

吸着過程におけるD₂Oの運動性を調べるために、D₂Oに曝す時間を1hと12hに変えながら²H NMR測定を行った(Fig.3(a)、左上は規格化した図)。1a_D₂O(1h)は信号強度が弱いペイクダブレットのピークを示した。D₂Oの吸着量は少なく、回転軸を有する特異的な運動をしていることが予想される^[8]。一方、1a_D₂O(12h)において、ペイクダブレットと等方的なピークの重ね合わせが確認できた。特異的な運動モードのD₂Oに加えて、等方的なD₂Oが12hの間に追加されたと予想される。一般的に、極性の高い水の吸着は秒から分のオーダーで平衡に達するが、UTSA-16は、数時間の非常に長いタイムスケールでD₂Oを吸着し、またその吸着したD₂Oの一部は、特異的な運動モードを有していることが確認された。

次にCO₂とD₂Oの混合ガスに曝露した1a_D₂O + CO₂を対象に行ったNMR測定のスペクトルをFig.3(b)(c)に示す。¹³C MAS NMR(Fig3.(b))ではスペクトルにおいて124.6ppmにCO₂由来のピークを確認できたが、²H NMR(Fig3.(c))はD₂O由来のピークを確認することが出来なかった。

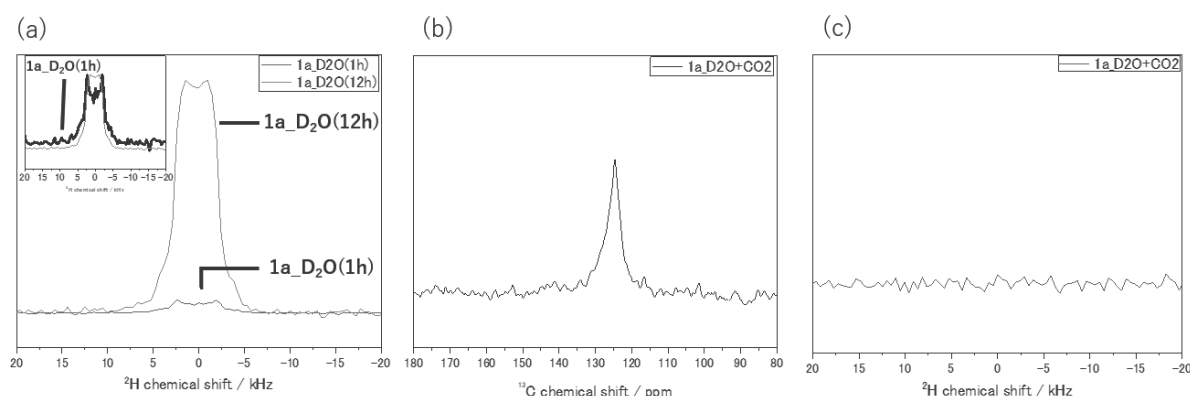


Fig. 3 (a) D₂O 曝露したサンプルを対象とした²H NMR スペクトル、(b) 混合ガスに曝露したサンプルを対象とした¹³C MAS NMR スペクトルと、(c) ²H NMR スペクトル

[配位水の有無による構造変化]

上記の特異的なCO₂の優先吸着の機構を明らかにするために、配位水の除去による局所構造の変化を調べた。**1a**、**1a_D₂O(12h)**、**1a_assyn**の¹³C CP-MAS NMRのスペクトルをFig.4に示す。D₂Oが存在しない**1a**はクエン酸のCH₂を示す50ppm付近のピークが1本なのに対して、D₂Oが吸着している**1a_D₂O(12h)**、**1a_assyn**はクエン酸のCH₂を示す50ppm付近のピークのシフトと分裂化を確認した。配位水の除去によって局所構造が変化し、D₂OよりCO₂を優先的に吸着する特殊な疎水的である細孔が出来たこと予想される。XRDパターンにおいてもわずかなピーク変化が確認されており、NMRの結果を支持している。

先行研究では、H₂OとCO₂の混合系において配位水がCO₂の吸着サイトと考えられていた。しかし本研究により配位水を除去したUTSA-16は、D₂Oを容易に吸着せず、その間は配位サイトは空になる。その場合、そのK⁺の配位サイトにクエン酸のカルボン酸が配位、及び配位によるクエン酸周りの局所構造変化が予想される。そのため、配位水が無いUTSA-16は親水性の高いK⁺の吸着サイト（配位サイト）はクエン酸で占有されており、水が吸着しにくくなったと考えている。また、CO₂の吸着サイトは明らかになっていないが、それら疎水的な細孔にCO₂が優先的に吸着できるサイトがあると考え、解析を進めている。

[まとめ]

本研究ではPCPにD₂OとCO₂の混合ガスを封入してMAS NMRを行い、乾燥状態のUTSA-16内部ではD₂Oに対してCO₂が優先的に吸着されることを明らかにした。²H NMR測定において、D₂Oの異常に長い吸着時間、そして特異的な運動モードを有する配位水と等方的な回転をしている水が混在していることを明らかにした。また、乾燥状態とD₂O曝露したUTSA-16の比較によりD₂Oの存在の有無でクエン酸周りの構造が変化して局所構造に歪みが生じることにより、疎水的かつCO₂を優先的に吸着できる細孔があると予想している。

[Reference]

- [1] S. Kitagawa, R. Kitaura, S. Noro, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2004, **43**, 2334
- [2] B. Chen, M. Eddaoudi, S. T. Hyde, M. O’Keeffe, O. M. Yaghi, *Science* 2001, **291**, 1012
- [3] N. T. T. Nguyen, H. Furukawa, F. Gündara, H. T. Nguyen, K. E. Cordova, O. M. Yaghi, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2014, **53**, 10645
- [4] M. Inukai, M. Tamura, S. Horike, M. Higuchi, S. Kitagawa, K. Nakamura, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2018, **57**, 8687
- [5] S. Xiang, Y. He, Z. Zhang, H. Wu, W. Zhou, R. Krishna, B. Chen, *Nat. Comm.*, 2012, **3**, 954
- [6] T. Kurihara, M. Inukai, M. Mizuno, *J. Phys. Chem. Lett.*, 2022, **13**, 7023
- [7] A. Masala, F. Grifasi, C. Atzori, J. G. Vitillo, L. Mino, F. Bonino, M. R. Chierotti, S. Bordiga, *J. Phys. Chem. C.*, 2016, **120**, 12068
- [8] T. Iijima, M. Mizuno, *Chem. Phys. Lett.*, 2003, **380**, 736

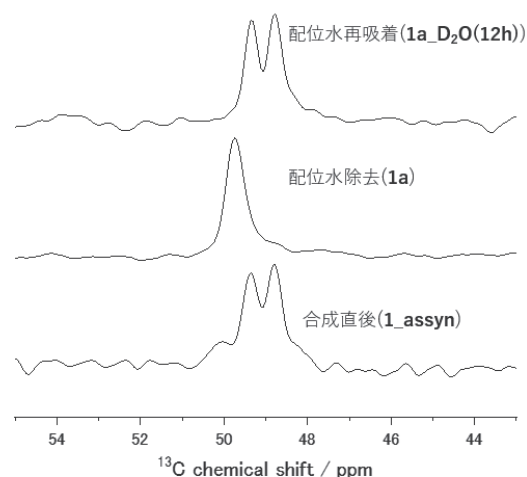


Fig. 4 D₂O 曝露したサンプルと乾燥状態のサンプルを対象とした ¹³C CP-MAS NMR スペクトル

○森本大智¹, Erik Walinda², 白川昌宏¹, 菅瀬謙治³

1京都大学・大学院工学研究科

2京都大学・大学院医学研究科

3京都大学・大学院農学研究科

Structural dynamic heterogeneity of polyubiquitin subunits captured by analysis of amide proton chemical shift temperature dependence○Daichi Morimoto¹, Erik Walinda², Masahiro Shirakawa¹, and Kenji Sugase³¹ Graduate School of Engineering, Kyoto University² Graduate School of Medicine, Kyoto University³ Graduate School of Agriculture, Kyoto University

Polyubiquitin is formed by covalent conjugation of ubiquitin molecules. Due to the high structural rigidity of the ubiquitin fold, respective ubiquitin moieties in a polyubiquitin chain appear to be structurally equivalent to each other. Therefore, it remains unclear how a specific ubiquitin moiety in a chain is preferentially recognized by ubiquitin binding proteins, such as the kinase PINK1. Our NMR analysis of amide proton chemical shift temperature dependence captured subunit-asymmetric structural fluctuations in the two ubiquitin moieties of K48-linked diubiquitin. Notably, the identified heterogeneous structural fluctuations appeared to be linked to subunit-specific difference in susceptibility to phosphorylation by PINK1. Since there are almost no differences in static tertiary structure among ubiquitin moieties in a chain, the observed subunit-specific structural fluctuations may be an important factor that distinguishes individual ubiquitin moieties in a chain, thereby aiding both efficiency and specificity in post-translational modifications.

ポリユビキチン鎖はユビキチンが数珠状に連なったポリマー分子であり、細胞内タンパク質に結合することにより細胞周期や免疫応答を制御している。鎖の連なり方は8種類(M1, K6, K11, K27, K29, K33, K48, K63結合型)発見されており、連なり方の違いで発現する細胞内機能が異なると考えられている(ユビキチンコード)¹。つまり、細胞内のユビキチン結合タンパク質はポリユビキチン鎖の連なり方を識別し、特異的に結合する必要がある。ポリユビキチン鎖を構成するユビキチンユニットの静的な三次構造にほぼ違いが無いため(Fig. 1aならびに1b下)、多くのユビキチン結合タンパク質はユビキチンユニットの相対的な角度や距離を認識していると考えられている(Fig. 1b上)¹。

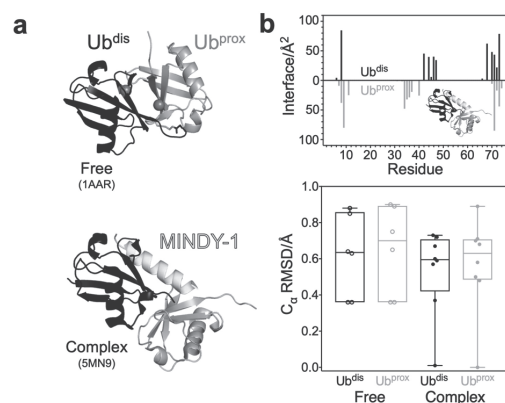


Fig. 1. Structural similarity in the two ubiquitin moieties of K48-linked diubiquitin. **a**, Reported structures of K48-linked Ub₂ in the free and complex forms. **b**, Upper, per-residue buried surface area. Lower, C_α RMSD between Ub₁ and ubiquitin subunits of K48-linked Ub₂.

化学シフト温度依存性, リン酸化, ユビキチン

○もりもとだいち, うありんだえりつく, しらかわまさひろ, すがせけんじ

一方、リン酸化酵素であるPINK1は鎖内のユビキチンユニットの相対的な角度や距離は認識できないが、ユビキチンユニット選択的にリン酸化する²。しかし、どのような機構でPINK1が鎖内のユビキチンユニットを判別しているのかわかっていない。そこで、本研究では、この判別機構を明らかにするため、細胞内で最も存在するK48結合型ポリユビキチン鎖の最小単位であるダイユビキチン(以降Ub₂)内の二つのユビキチンユニットについて構造学的差異を調べた。

まず、PDBに登録されているK48結合型Ub₂の二つのユビキチンユニットの三次構造の違いを調べたが、優位な差はなかった(Fig. 1b下)。そこで、静的構造ではなく動的構造に違いがあるのか調べるため、アミドプロトンの化学シフトの温度依存性を調べた。構造揺らぎなどの化学交換が存在すると、アミドプロトンの化学シフトは温度に対して非直線的に変化する。

K48結合型Ub₂の二つのユビキチンユニットは溶液中で開閉運動するため、ユニット界面のアミドプロトンは非直線的な化学シフト温度依存性を示した³。興味深いことに、界面から離れた部位でも非直線的な化学シフト温度依存性が観測された。だが、ユビキチンユニットにおいて対称的には現れず、近位(proximal)ユニットの多くのアミノ酸が非直線的な化学シフト温度依存性を示した(Fig. 2)。つまり、観測された化学交換はユニット開閉運動ではなく、ユニット特異的な構造揺らぎであることが示唆された。さらに、構造揺らぎを示すアミノ酸はリン酸を受けるSer65近傍に集中していた³。注目すべきは、Ser65の側鎖はリン酸化前には構造内部を向いていることである。加えて、リン酸化によってSer65だけでなく近傍のアミノ酸も溶媒に露出する。したがって、Ser65近傍の特異的な構造揺らぎは、リン酸化を受けやすくする機能があるかもしれない。この仮説を検証するため、それぞれのユビキチンユニットのPINK1によるリン酸化速度をリアルタイムNMR法で計測したところ、構造揺らぎを持つ近位ユニットが優位に速くリン酸化を受けることが分かった(Fig. 3)。このように、特定したユニット特異的な構造揺らぎはリン酸化の受けやすさと関連していることが分かった。

References

- (1) Komander D, and Rape M (2012) The ubiquitin code. *Annu. Rev. Biochem.* 81 (1), 203–229.
- (2) Gersch M, Gladkova C, Schubert, AF, Michel MA, Maslen S, and Komander D (2017) Mechanism and regulation of the Lys6-selective deubiquitinase USP30. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 24 (11), 920–930.
- (3) Morimoto D, Walinda E, Takashima S, Nishizawa M, Iwai K, Shirakawa M, and Sugase K (2021) Structural dynamic heterogeneity of polyubiquitin subunits affects phosphorylation susceptibility. *Biochemistry* 60, 573–583.

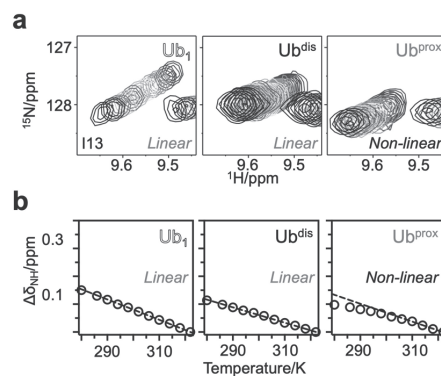


Fig. 2. Subunit-specific chemical shift temperature dependence of K48-linked Ub₂.
a, Representative cross-peak (Ile13) showing heterogeneous chemical shift temperature dependence. **b**, Curvature in temperature-dependent chemical shift profiles.

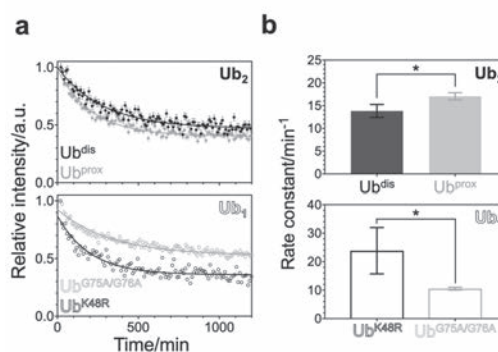


Fig. 3. Subunit-specific phosphorylation susceptibility of K48-linked Ub₂.
a, Real-time NMR profiles for intensity decay of the Ala46 cross-peak derived from unphosphorylated species. **b**, Comparative analysis of the estimated phosphorylation rates.

P84Y

固体 NMR による Zn²⁺結合型 TaHeR の構造解析

○熊谷咲里¹, 鈴木しぶき¹, 長島敏雄², 山崎俊夫², 片山耕大³, 神取秀樹³, 川村出¹

1 横浜国立大学 大学院理工学府

2 理研 RSC

3 名古屋工業大学

Solid-state NMR study of membrane embedded TaHeR in the presence of Zn²⁺

○Sari Kumagai¹, Shibuki Suzuki¹, Toshio Nagashima², Toshio Yamazaki², Kota Katayama³, Hideki Kandori³, Izuru Kawamura¹

¹Graduate School of Engineering Science, Yokohama National University, Japan, ²RIKEN RSC, Japan,

³Nagoya Institute of Technology, Japan.

Heliorhodopsin (HeR) is a transmembrane protein with a retinal chromophore that constitutes a new rhodopsin family [1]. FTIR spectroscopy has revealed that only helical structural perturbations are observed by binding Zn²⁺ to TaHeR [3]. Here, using solid-state NMR spectroscopy, we investigated whether the structure of membrane embedded TaHeR in POPE/POPG is affected by Zn²⁺-binding. We exhibited Zn²⁺ concentration dependance of changes in ¹⁵N NMR signals of His imidazole rings using ¹⁵N₃ His-labeled sample. On the other hand, no peak shift of the retinal protonated Schiff base was observed using ¹⁵N Lys-labeled sample. From our results, we assume that the binding site of Zn²⁺ is located at His residues in the cytoplasmic region, distant from the retinal chromophore. This binding might contribute to the unknown function of HeR, which is thought to be signal transduction due to the long photocycle.

【緒言】ロドプシンとはレチナル発色団を有し、可視域に吸収をもつ7回膜貫通型タンパク質である。近年、微生物型および動物型ロドプシンとは全く異なる性質を持つ新しいロドプシン群としてヘリオロドプシン(HeR)が発見され、結晶構造が報告された[1,2]。また、FTIRにより Zn²⁺と特異的に結合することが提唱され[3]、HeRの機能との関係が注目されている。本研究ではヒスチジン(His)のイミダゾール環の信号がイオン結合に敏感であることに注目し、脂質二重膜に再構成した ¹⁵N₃-His 標識 TaHeR の NMR 信号の Zn²⁺濃度依存性を調査した(Fig. 1)。

ロドプシン, 固体 NMR, ヒスチジン

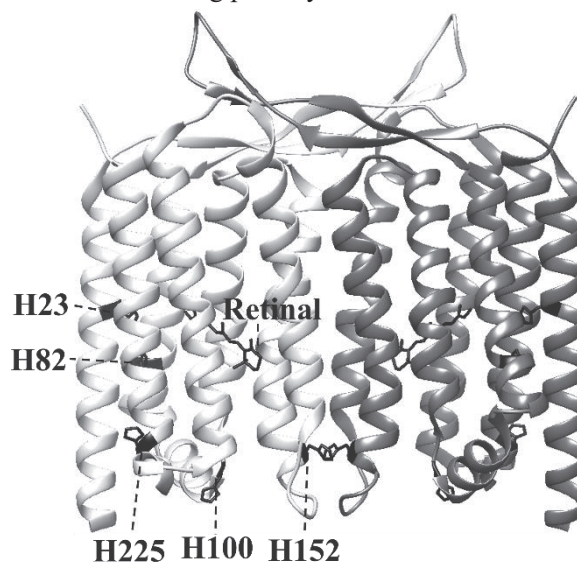


Fig. 1. Crystal structure of TaHeR (dimer)

○くまがいさり, すずきしぶき, ながしまとしお, やまざきとしお, かたやまこうた, かんどりひでき, かわむらいずる

【実験】*Thermoplasmales archaeon* 由来のヘリオロドプシン TaHeR をコードするプラスミド DNA を大腸菌 BL21 株に形質転換し、M9 培地により培養を行った。all-trans 型レチナールと $^{15}\text{N}_3\text{-His}$ を加えた後に IPTG による発現誘導を行い、 $^{15}\text{N}_3\text{-His}$ TaHeR を大量発現させた。 $^{15}\text{N}_\epsilon\text{-Lys}$ TaHeR についても同様に行った。POPE:POPG=3:1 のリポソームにタンパク質と脂質を 1:20 のモル比で膜に再構成し、各試料を Zn^{2+} 濃度を 0, 0.10, 0.15, 0.20, 0.30, 0.40, 0.50, 1.0 mM に調製した pH 7.0 の Buffer で置換して水和膜試料とした。その後、ジルコニア製試料管にパッキングして 4.0 mm E-free $^1\text{H}\text{-}^{13}\text{C}\text{-}^{15}\text{N}$ 三重共鳴プローブを備えた 600 MHz の分光計 (Bruker Avance III) を用いて ^{15}N CP-MAS 測定を行った。測定条件は暗状態で MAS 回転 12 kHz、プローブ温度を 278 K とした。また、3次元 NMR データを用いて His 残基の帰属を行った。 ^{15}N の基準物質は NH_4Cl (38.34 ppm) とした。

【結果および考察】 $^{15}\text{N}_\epsilon\text{-Lys}$ TaHeR の ^{15}N CP-MAS NMR スペクトルより、レチナールのプロトン化シッフ塩基(RPSB)の化学シフト値が 178.9 ppm と帰属された。モデル化合物である all-trans レチニリデンとハロゲン化物イオンにおける RPSB の化学シフト値に対する極大吸収波長の変化は直線関係を示し、多くのロドプシンはこのトレンドを示すが、TaHeR は外れている (Fig. 2)。これは他のロドプシンと異なり、Ser112 や Ser234 が RPSB の窒素に接近しているからであると考えられる。 Zn^{2+} 結合による RPSB の信号変化が観測されなかったことから、レチナール近傍に特異的結合部位が存在しないことが示唆された。一方、 $^{15}\text{N}_3\text{-His}$ TaHeR の ^{15}N CP-MAS スペクトル (Fig. 3) より、主鎖アミド NH・イミダゾール H- $\text{N}\epsilon_2$ ・ $\text{N}\delta_1$ の位置にレチナール近傍の His23, His82 などを含む先鋭な信号を観測したが、 $[\text{Zn}^{2+}]$ 依存性は見られなかった。一方で 210 ppm 付近に $\text{N}\delta_1$ への Zn^{2+} の結合に由来するピーク [4] を検出するとともに、H- $\text{N}\epsilon_2$ の領域の 158 および 170 ppm に $[\text{Zn}^{2+}]$ 依存的な信号変化が観測された。これは Zn^{2+} が His のイミダゾール環内の δ_1 位の窒素に結合し、運動性が低下して CP 検出を可能にしたと示唆される。これらの結果および $[\text{U}\text{-}^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}]$ TaHeR の多次元 NMR データなどから細胞質側に位置する His100 が Zn^{2+} との特異的な結合を担う可能性が示唆された。

【参考文献】 [1] A. Pushkarev et al. (2018) *Nature*, 558, 595. [2] W. Shihoya et al. (2019) *Nature*, 574, 132. [3] M. Hashimoto et al. (2020) *JPC Lett.* 11, 8604. [4] S. S. Kidambi et al. (2003) *Inorg. Chem.* 42, 3142.

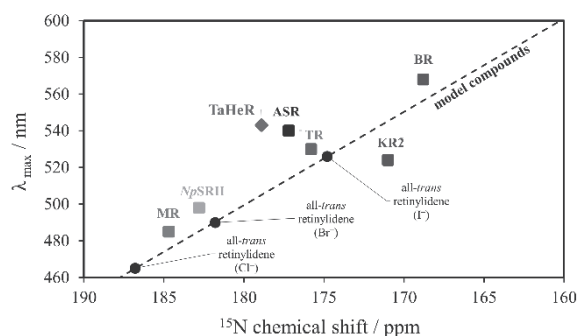


Fig. 2. Relationship between ^{15}N chemical shift of RPSB and λ_{max} (TaHeR: 178.9 ppm/542 nm)

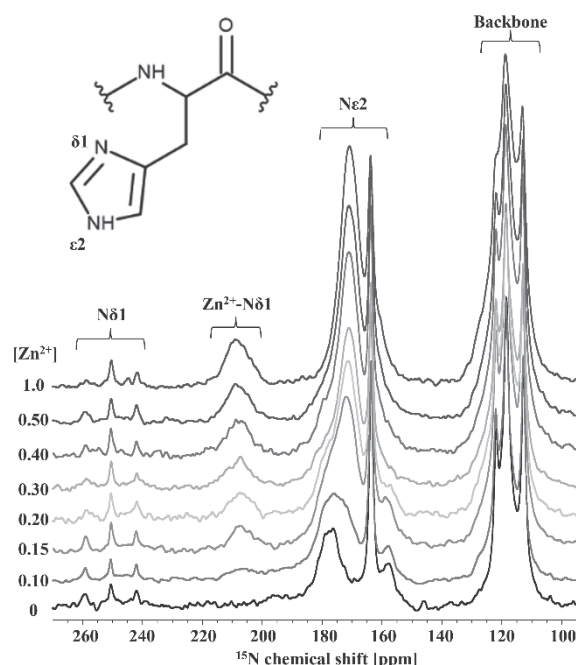


Fig. 3. ^{15}N CP-MAS NMR spectra ($^{15}\text{N}_3\text{-His}$ TaHeR)

P85

固体NMRを用いた平面四配位白金(II)錯体の分子運動の解析とその外部刺激応答性

○重田泰宏、水野元博

金沢大学・ナノマテリアル研究所

Stimuli response of molecular dynamics on square-planar Pt(II) complexes analyzed by solid-state NMR

○Yasuhiro Shigeta, Motohiro Mizuno

Nanomaterials Research Institute, Kanazawa University

Stimuli-responsive materials have been attracted much attention because of their potentially utilization such as for sensors, actuators. Usually, discussions for molecular crystal-based stimuli-responsive materials are based on their static states, such as crystal structure. On the other hand, molecular motion have been increasing attention to affect property of materials. Herein, we report the grinding-induced molecular dynamics changing of Pt(II) complex [PtCl₂(BdmPhambpy)] (= **1**; BdmPhambpy = bipyridine-4,4'-bis-3,5-dimethylcarboxamide), investigated by solid-state ²H NMR spectroscopy.

The as-synthesized, deuterated complex **1** exhibited two sets of signals in the solid-state ²H NMR measurement. These signals could be assigned to the fast rotational motion of methyl deuterons with small angle librational motion and static state of phenyl deuterons. After grinding, additional signals were observed in the ²H NMR spectra, suggested grinding induced promotion of molecular dynamics.

【序論】近年、外部刺激によってその性質を変化させる物質群の研究が盛んに行われている。この性質は、センサーやアクチュエーター等への展開が期待されており、外部刺激と変化させられる性質には多数の組み合わせがあることが知られている。分子結晶を用いた外部刺激応答性物質における応答は、多くの場合外部刺激印加による結晶構造の変化を中心に議論が展開されており、静的な状態の解析が主であった。他方、分子運動性はイオン伝導性など結晶構造だけでは説明がつけられないような物性に影響を与えていることが知られている。外部刺激印加によって分子運動が制御できれば、今までに無い外部刺激応答性物質の創製に繋がる可能性がある。

本研究では、すり潰しによる結晶性の低下が分子運動やその速度にどのような影響を及ぼすかを²H 固体NMR及びX線構造解析から議論することを目的に、すり潰しによる結晶性の低下や非晶質化が数多く報告されている白金(II)錯体の配位子を重水素化し、運動性の変化について調べたので報告する。

【合成】配位子BdmPhambpyは、bipyridine-4,4'-dicarboxylic acidを塩化チオニルによって酸塩化物へと変換し、3,5-

dimethylaniline(dmAn)と反応させることで合成した。dmAnは、

酸化白金(IV)存在下重水を用いて水熱条件で反応させることで重水素化したものを用いた。更に、K₂PtCl₄と配位子と反応させることで目的錯体である[PtCl₂(BdmPhambpy)] (=錯体**1**)を合成した(Fig.1)。溶液¹H NMR測定の結果、錯体はdmAn部位のフェニル重水素が85%、メチル重水素が50%程度重水素化されていることが分かった。

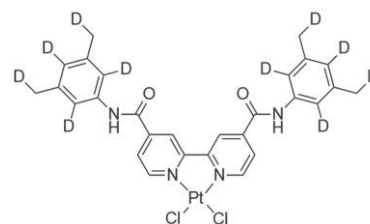


Fig.1 Molecular structure of **1**.

²H 固体NMR, 結晶構造

○しげたやすひろ, みずのもとひろ

【結果と考察】

Fig.2に合成した直後の**錯体1**の100 °Cにおける²H NMRスペクトルを示す。²H NMRスペクトルは四極子エコー法によって測定した。得られたスペクトルは、高速回転しているメチル基がアミド基のC-N結合方向を軸に振動角27°で振動している±18 kHz付近にピークを示すシグナルと、同様に振動しているフェニル環上の重水素及び軸上に存在するために運動していない重水素と帰属されるPake patternの、3種類のシグナルの重ね合わせで再現できた。

次に、**錯体1**をすり潰した際の変化を調べた(Fig. 3)。XRD測定の結果、**錯体1**はすり潰す前は結晶性が良いことを示す多数のシャープなピークを示した一方、すり潰しによってこれらがブロード化して観測されたことから、結晶性の著しい低下が確認された(Fig.3(a))。

結晶性の低下が運動性に与える影響を調べるべく、乳鉢を用いてすり潰したサンプルについて再度固体²H NMRスペクトルを測定した。乳鉢を用いたすり潰しでは、サンプル中ですり潰しの度合いが異なる部分が共存すると予想される。そのため、すり潰し前と同じ温度かつ同じ待ち時間を用いて測定した結果について比較した(Fig.3(b))。待ち時間1秒において得られたすり潰し後のスペクトルの線形は、すり潰し前とは明確に異なることが分かった。すり潰し後のスペクトル線形をシミュレーションによって解析したところ、すり潰し前の成分に加え、アミド部位のC-N結合を軸方向としてすり潰し前よりも大きな角度で振動する運動を示唆する±5.6 kHzのピークと、それよりも更に運動性の高い成分の存在を示す0 kHzのピークが新たに生じていることが示唆された。±15 kHz付近のフィッティングとシミュレーションパターンとの不一致は更なる運動成分の存在を示唆しているが、これはすり潰しが均一でないことに由来して分子周辺の環境が多様であり、少数の多様な成分が存在するためと予想される。以上の結果より、すり潰しに伴って新たな分子運動が誘起されることが明らかとなった。これは、結晶性の低下に伴って分子周辺に空間が生じたことに由来すると考えられる。

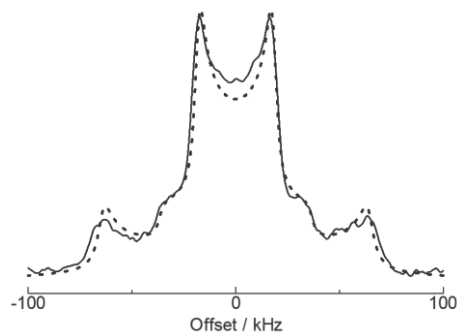


Fig.2 ²H NMR spectra of as-synthesized **1** (solid line) compared with simulated spectra (dashed line).

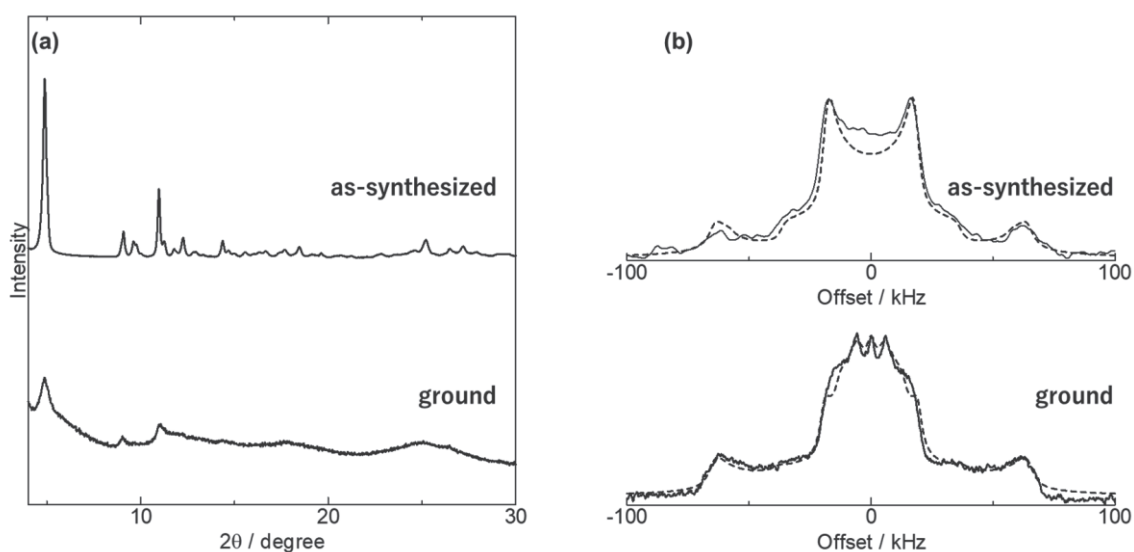


Fig.3 (a) XRD pattern of as-synthesized (top) and ground (bottom) **1**. (b) ²H NMR spectra of as-synthesized **1** (top) and ground (bottom) **1**. Spectra were shown in solid lines compared with simulation (dashed lines).

P86Y

STD NMRによるTiO₂粒子と抗インフルエンザウイルスペプチドの相互作用解析

○鈴木悠斗¹, 岡村英保², 川村出¹, 鈴木悠²

¹横浜国立大学・大学院理工学府

²福井大学・学術研究院工学系部門・生物応用化学講座

Analysis of interaction of TiO₂ particles with anti-viral peptide using STD NMR

○Yuto Suzuki¹, Hideyasu Okamura², Izuru Kawamura¹, Yu Suzuki²

¹ Graduate School of Engineering Science, Yokohama National University

² Department of Applied Chemistry and Biotechnology, Graduate School of Engineering, University of Fukui

Proteins and peptides give the surface of inorganic particle materials functionality. NMR technology is extremely useful in analyzing the interaction of biomolecules with inorganic nanoparticle surfaces and saturation transfer difference (STD) NMR has revealed the interaction of titanium-binding peptides (TBPs) with TiO₂ nanoparticles. In this study, we analyzed the interactions with a fragment of urumin, an anti-influenza virus peptide from the Indian frog, and TiO₂ nanoparticle by STD NMR. The results suggested that the urumin fragment binds to the surface of TiO₂ nanoparticles and interacts primarily at N-terminal Ile1 and Arg11.

[緒言]

タンパク質やペプチドは無機粒子材料に対して吸着・凝縮するなどして粒子の表面機能化を果たす。特にその表面に対して抗体、抗生物質もしくは抗菌ペプチドなどを結合させることでコーティングし、ナノ粒子表面の機能性向上に関わる研究が広くなされている^[1]。一方で、ペプチドと無機粒子材料の間の複雑な相互作用の理解が不十分なため、目的の無機材料に特異的な結合親和性を持つ生理活性タンパク質やペプチド分子を特定することは容易ではない。無機ナノ粒子表面と生体分子の相互作用を解析する上でNMR技術は極めて有効であり、STD NMRを利用したチタン結合性ペプチド(TBP)とTiO₂ナノ粒子との相互作用が報告されてきた^[2,3]。

本研究では、インドアカガエル由来の抗インフルエンザウイルス活性ペプチド ウルミン(Urumin)のフラグメントペプチド(一次構造: IPLRGAFINGRWDSQ)とTiO₂ナノ粒子間における相互作用についてSTD NMR測定を用いて検討し、TiO₂ナノ粒子に対するウルミンフラグメントペプチドの構造解析を行った。

[実験方法]

固相合成法で合成されたウルミンのフラグメントを準備し、ECA600II分光計を用いてNMR実験を行った。NMR信号の帰属はTOCSY, ¹H-¹³C HSQC, ROESY測定で得られたスペクトルを用いて行った。TiO₂表面の結合水からウルミンへの飽和移動を観測するため、溶媒には10% D₂O/90% H₂Oリン酸緩衝液(pH: 6.8)を用い、ペプチド3.0 mMとTiO₂ 1 mg/mLの条件で測定した。飽和パルス照射位置はon resonanceを4.7 ppm、off resonanceを-10 ppmにそれぞれ設定した。また、飽和パルス照射時間を0.8, 1.6, 2.4, 3.2, 4.8, 6.4, 8.0, 9.6, 11.2 sに変えて測定を行い、飽和パルス非照射のSTD NMR, TiO₂ナノ粒子, 抗インフルエンザウイルスペプチド

○すずきゆうと, おかむらひでやす, かわむらいずる, すずきゆう

NMR スペクトルのシグナル強度に対する STD シグナル強度の割合(A_{STD})を求め、飽和パルス照射時間に対するプロットを行い、STD buildup curve を作製した。

[結果・考察]

ウルミンのフラグメントのTOCSY NMRスペクトルをFig. 1に示す。 ^1H - ^{13}C HSQC及びROESY測定によって得られたスペクトルを併用することで、ウルミンの ^1H NMRシグナルをFig. 1のように帰属した。

飽和パルス照射時間11.2 sにおけるウルミンフラグメント- TiO_2 試料のSTD NMRスペクトルをFig. 2に示す。ペプチドのみの試料ではSTDシグナルが観測されなかったのに対し、ペプチド- TiO_2 試料ではSTDシグナルが観測されたことから、 TiO_2 表面の結合水からウルミンフラグメントペプチドへ飽和移動が起きていることが観測された。これにより TiO_2 表面にペプチドが相互作用していることが示唆された。飽和パルス非照射のウルミンフラグメント- TiO_2 試料の ^1H NMRスペクトルの信号強度に対する各STD NMRシグナルの相対強度を比較したところ、0.797, 0.939, 1.872, 2.998 ppmに観測されたシグナルの強度が比較的高くなっていった。したがって、N端のIle1やArg11などが TiO_2 ナノ粒子との相互作用において重要であることが考えられる。また、飽和パルス照射時間の増大に伴って、STDシグナル強度が増大することが確認された。

現在、飽和パルス照射時間を変えて測定した各STD NMRスペクトルから作製したSTD buildup curveを用いて各 ^1H NMRシグナルにおけるSTD効果を求めており、本討論会にてウルミンフラグメント- TiO_2 間における相互作用部位の詳細について議論する予定である。

参考文献

- [1] Bahrami, A., Delshadi, R., Jafari, S. M. (2020) *Trends Food Sci. Technol.* 99, 217–228.
- [2] Suzuki, Y., Shindo, H., Asakura, T. (2016) *J. Phys. Chem. B*, 120, 4600-4607.
- [3] Suzuki, Y., Shindo, H. (2018) *Polymer J.*, 50, 989-996.

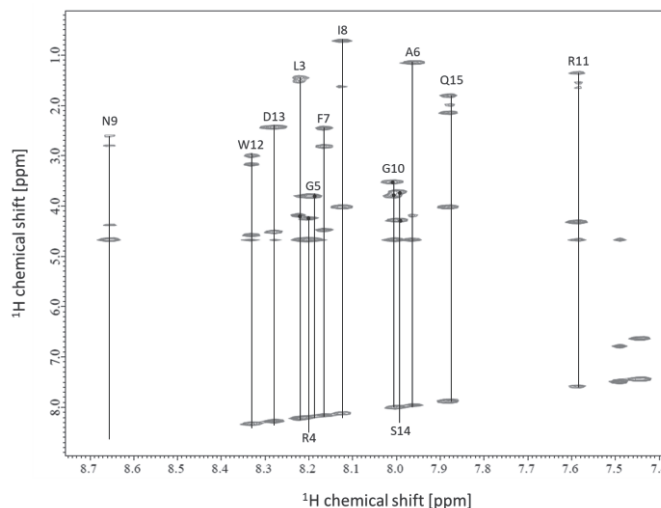


Fig. 1 TOCSY NMR spectrum of urumin fragment (3 mM peptide in 10 % D_2O 20 mM phosphate buffer pH 6.8, mixing time: 60 ms).

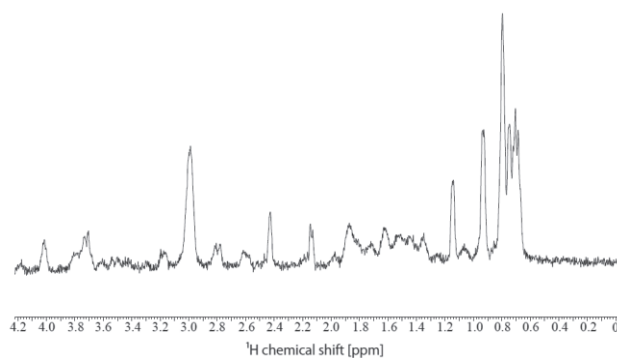


Fig. 2 1D STD NMR spectrum with saturation time of 11.2 s of urumin fragment – TiO_2 sample in solution.

高橋 彩香^{1,2} ○細田 和男³ 林 史夫³

1 群馬大学 理工学部 総合理工学科

2 群馬大学 機器分析マイスター

3 群馬大学 機器分析センター

Exploring approaches to liquid samples in NMR analysis

Sayaka Takahashi^{1,2} ○Kazuo Hosoda³ Fumio Hayashi³

1 School of Science and Technology, Faculty of Science and Engineering, Gunma University

2 Meister of Instrumental Analysis, Gunma University

3 Center for Instrumental Analysis, Gunma University

In instrumental analysis, NMR analysis, especially solution NMR, is characterized by the fact that results can be obtained in a shorter time by selecting an appropriate solvent and preparing concentration if the sample is a powder. Even so, it is not uncommon for the party requesting instrumental analysis to request that the sample is a liquid or solution because it's solution NMR. Since we can imagine that a method of measuring the liquid itself with a precision coaxial tube would be time-effective, we examined the practicality of our approach with a precision coaxial tube.

機器分析において NMR 分析、特に溶液 NMR は対象物が粉末であれば適切な重水素溶媒を選択し適切な濃度への調製によって、短時間で結果・情報を得られる点が特徴です。とはいえ機器分析を依頼する側としては溶液 NMR だからこそその依頼として、対象物が溶液・液体であることは少なくありません。サンプルの調製は重水素溶媒への置換を行うのは定石ですが、まず定性的な情報を得たい時に同軸二重管で液体そのものを測定する手法は時間的に効果的と想像できますので、私達は同軸二重管を用いるアプローチについて実用性を検討しました。

同軸二重管を利用した直接的な液体試料の 1H-NMR 測定

和光特級 2-プロパノールについて同軸二重管を用いて 1H-NMR 測定しました。内管には 40mM DSS 重水溶液を注入しています。測定は AVANCE III HD 500 (Topspin3.6.2) を用い、測定温度 298K、繰り返し回数が 32 回です。この測定において、重水素 LOCK は Topspin の 10%重水の条件を用いました (Fig.1)。比較としてアルコールに重水を加えるサンプル調整にて測定も行いましたが、結果的にブロードなシグナルにしか得られませんでした。

機器分析、同軸二重管、分析化学、溶液 NMR

たかはし さやか、○ほそだ かずお、はやし ふみお

内管の DSS シグナル強度について

使用している（株）シゲミ製 SP-402 同軸管は、内管・外管内での容積がカタログに記載されていますが簡易的な計算を目的に基準物質 DSS のシグナルの大きさを比較して濃度の換算を試みました。内管を挿入しない状態での DSS シグナルと、その DSS 溶液を内管に注入し、外管には重水のみを注入したときの DSS シグナルを比較し、その比として 0.2 倍、つまり内管 DSS シグナルは、5 倍希釈の状態と同等と見積もることができました。

外管・内管でのシグナルの定量性

内管 DSS シグナルと外管の目的物シグナルとの積分値の比について、目的物の濃度との相関を確認しました。外管に注入するサンプルは、カフェインの重水溶液ストックを作成，そこから分注希釈をし，等倍および 2 倍から 5 倍までの希釈溶液を外管に注入，同じ内管にて測定しました。横軸にカフェインの濃度，縦軸に各スペクトル上で DSS シグナルとカフェインシグナルの積分の比をプロットした結果，目的物濃度と積分比に相関があることが確認できました。

今回同軸二重管を用いた液体サンプルの測定において、事前に使用する同軸管の基礎的な挙動を確認しておくことで試料の定性的な情報だけでなく、簡易的な定量性についても情報を得ることができ議論することができる可能性を示す事ができました。

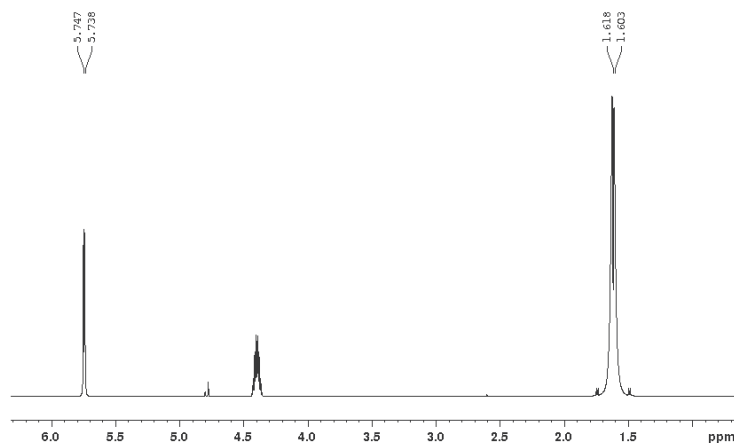


Fig.1 同軸二重管（内管 DSS 重水溶液）を用いて測定した 2-プロパノールの $^1\text{H-NMR}$ スペクトル

群馬大学機器分析マイスターについて

群馬大学では、学部 2 年生から参加できる分析の考え方・知識・技術を学ぶプログラム、「マイスター育成プログラム」を設置しています。「分析」は「問題」を解決するための重要なピースであり本プログラムを通じて機器の仕組み等を学習、そして機器分析センターの所有する XPS・HPLC-MS・溶液 NMR の内 1 つの操作・測定を含めた 1 年間の教習の後、実技を含む認定試験を経て「機器分析マイスター」を認定しています。認定者（学部 3 年生）は、機器分析センターの外部依頼等の測定も担ってもらっています。

Experimental

有機溶媒処理により Ala 連鎖領域が random coil, β -sheet, α -helix 構造を形成した RSP 溶液をそれぞれ調製し、10%(w/w) RSP ヒドロゲルを作製した。得られたゲルをそれぞれ rc-RSP, β -RSP, α -RSP とする。ゲルおよびゲルの凍結乾燥体に対し、固体 NMR 測定と圧縮強度測定を行った。固体 NMR 測定は、JEOL ECA600II にて 3.2 mm 固体プローブを使用し、MAS 速度は凍結乾燥体 10 kHz, ゲル 4 kHz とした。凍結乾燥体は ^{13}C CPMAS 測定により二次構造を評価した。ゲルは運動性の低い成分を ^{13}C CPMAS 測定、運動性の高い成分を ^{13}C r-INEPT 測定にて観測した。

Results & Discussion

各 RSP ゲルの Ala 連鎖領域の二次構造の割合を定量的に決定するためにゲルの凍結乾燥体の固体 ^{13}C CPMAS NMR 測定を行った (Fig. 2)。Ala C β のピークを波形分離し、積分強度比から各二次構造の割合を算出した。 β -RSPゲルは Ala 残基の 80%以上が β -sheet 構造、rc-RSP は45%が random coil 構造、 α -RSP は15%が α -helix 構造を有していた。ゲルの ^{13}C CPMAS および ^{13}C r-INEPT NMR 測定により、各ゲル中で二次構造を維持していることを確認した。

各ゲルの破断強度・ひずみプロット、および代表的な応力-ひずみ曲線を Fig. 3 に示す。rc-RSP ゲルに比べて α -RSP ゲルと β -RSP ゲルの弾性率が高かった。また、応力-ひずみ曲線において α -RSP ゲルには下降伏点が存在しており、 α -RSP ゲルと β -RSP ゲルでは高弾性率のメカニズムが異なる可能性が示唆された。

これらの結果から、rc-RSP ゲルは架橋点が少ないため弾性率が低く、 β -RSP ゲルは β -sheet 構造からなる架橋点が多いため弾性率が高く、 α -RSP ゲルは α -helix 構造により分子鎖が剛直なため弾性率が高いと考察できる。

References

[1] Y. Tasei et al., *Macromolecules* 50, 8117-8128 (2017).

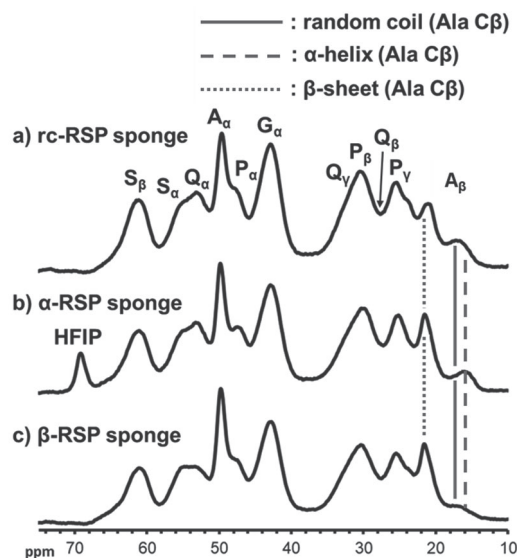


Fig. 2. ^{13}C CPMAS NMR spectra of freeze-dried rc-RSP, α -RSP and β -RSP gel.

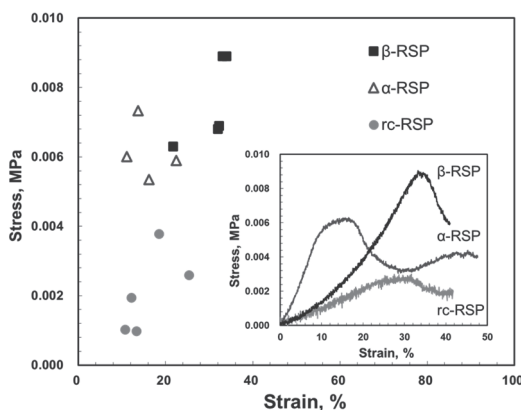


Fig. 3. Plots of breaking strength and strain and stress vs. strain curves of compression strength measurement of rc-RSP gel, α -RSP gel, and β -RSP gel.

P89

π パルス列を用いた高速MAS下での ^{13}C - ^{13}C DARR測定手法の開発

○松永達弥¹, 石井佳誉^{1,2}

¹理化学研究所生命機能科学センター・先端NMR開発応用研究チーム

²東京工業大学・生命理工学院

Development of ^{13}C - ^{13}C DARR measurement on fast MAS driven by π -pulse train

○Tatsuya Matsunaga¹, Yoshitaka Ishii^{1,2}

¹Laboratory for Advanced NMR Application and Development,

RIKEN Center for Biosystems Dynamics Research

²School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology

Dipolar-Assisted Rotational Resonance (DARR) is one of powerful tools to measure ^{13}C - ^{13}C dipolar interaction in various range on Magic-Angle Spinning (MAS). However, it requires long RF irradiation whose intensity equals to MAS frequency. Thus, it's mainly used on as fast as 10–30 kHz MAS and rarely used on fast/ultrafast MAS with faster spinning than it. In this study, I show ^1H - ^{13}C dipolar recoupling with π -pulse train with interval of 1.5-times MAS period. It realized long and low-power recoupling and drove ^{13}C - ^{13}C recoupling like DARR, which I call as π -pulse driven DARR (π -DARR). I show that it works on ultrafast MAS with rotor frequency of 60 kHz.

固体NMRによる分子内・分子間の磁気相互作用の測定はそれらの距離情報をもたらし、生体分子や高分子をはじめとする様々な物質の構造解析に貢献してきた。一方で、これらの磁気相互作用は固体NMRスペクトルが広幅化する原因でもあり、固体試料を磁場中で高速回転させる Magic-Angle Spinning (MAS)や、非観測核へのRF照射によるdipolar decouplingなど、磁気相互作用を打ち消すことでスペクトルを先鋭化する手法が数多く開発されてきた。固体NMR発展の歴史は、磁気相互作用のdecouple/recoupleの手法発展の歴史でもある。

Dipolar-Assisted Rotational Resonance (DARR)[1] は固体MAS NMRで広く用いられる同種核間相互作用recoupling手法の一つである。DARR測定では、MASの試料回転速度 $\omega_r/2\pi$ と等しい ^1H 磁化回転をもたらすRFパルスを照射し、数十から数百msという比較的長時間の ^1H - ^{13}C 間dipolar recouplingを起こす。この ^1H - ^{13}C 間dipolar相互作用を介する事で近距離から遠距離まで広い範囲の ^{13}C - ^{13}C 相関を測定する。しかし、近年の50~60 kHzを超えるような高速/超高速MAS下では、強力かつ長時間の ^1H RF照射が必要なため、DARRの使用が困難である。

本研究では、一定強度のRF照射 (constant wave, CW) の代わりに、 π パルスの繰り返しをベースにした ^1H - ^{13}C 間dipolar recouplingパルスを使う事で電力を抑え、60 kHz以上のMAS下でDARRの様な ^{13}C - ^{13}C 相関スペクトルを

同種核間相互作用、超高速MAS、固体NMR

○まつながたつや, いしいよしたか

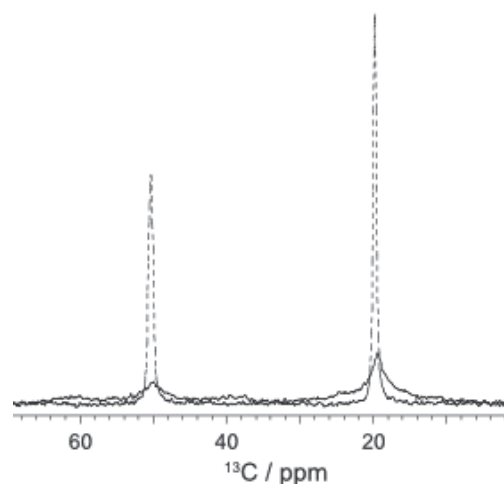


Fig. 3. ^{13}C CPMAS spectra of ^{13}C , ^{15}N -labeled L-alanine measured with repetition of ^1H π -pulse with intensity of 30 kHz. MAS frequency is 60 kHz. Periods of the π -pulse train are 25.2 μs (solid line) and 34.1 μs (dashed line).

測定する手法を開発した。この手法を π -pulse driven DARR (π -DARR)と呼ぶ事とする。

Fig. 1 は、60 kHz の MAS 下で、強度 30 kHz の ^1H π パルスを周期 $\tau = 25 \mu\text{s}$ (solid), $34 \mu\text{s}$ (dashed) で繰り返しながら測定した $^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$ -labeled L-Alanine の ^{13}C CPMAS スペクトルである。MAS の回転周期は $\tau_r = 16.67 \mu\text{s}$ であり、 π パルスの周期が $\tau = 25 \mu\text{s} = 1.5\tau_r$ の時はパルスが ^1H recoupling として、 $\tau = 34 \mu\text{s} \sim 2\tau_r$ の時は ^1H decoupling として働く。Fig. 2 は π パルスの周期による $^{13}\text{C}\alpha$ ピーク強度変化のグラフであり、 τ によって π パルスが decouple 条件と recouple 条件を行き来しているのが分かる。Recouple 効率は $\tau = 25, 42 \mu\text{s}$ 、つまり τ が MAS 周期 τ_r の半整数倍の時に最大となる。その他の窪みは MAS 周期から $1/4$ 周期ずれた点で、ここも弱い recouple 条件を持つ。

強い RF 照射によって発生する電力はサンプルの加熱や電気回路の損傷を引き起こすため、NMR 測定では RF 照射の強度や時間に注意が必要である。 π -DARR の利点は、mixing 時の RF 強度と照射時間を減らせる事に加え、高速 MAS 特有の弱い ^1H decoupling パルスが使える事である [2]。今回、 π -DARR で用いる π パルス強度を MAS 周波数の半分とした。この場合、mixing 中の電力は通常の DARR で使われる CW 照射の約 $1/6$ となる。また、30 kHz MAS 下では FID 観測時や間接次元の展開時間に 100 kHz 近い強度の ^1H decoupling パルスが必要であるのに対し、60 kHz MAS 下では 10 kHz 程度の ^1H decoupling 強度で十分である。FID の長さを 10 ms とした場合、60 kHz MAS での π -DARR 測定であれば 30 kHz MAS での DARR 測定と同等の電力で 2-4 倍の長さの mixing を行う事ができる。 π -DARR の recouple 効率は最大で DARR の recouple 効率の $2/3$ である事を加味しても十分に電力を抑制できる。Fig. 3 は 60 kHz MAS 下で測定した GB1 タンパクの ^{13}C - ^{13}C π -DARR スペクトルである。繰り返し時間が 2.5 s でありながら 285 ms もの長い mixing を安全に行う事ができた。

References

[1] K. Takegoshi *et al.*, (2001) ^{13}C - ^1H dipolar-assisted rotational resonance in magic-angle spinning NMR, *Chem. Phys. Lett.* 344 631-637.

[2] M. Ernst *et al.*, (2001) Low-power decoupling in fast magic-angle spinning NMR, *Chem. Phys. Lett.* 348 293-302.

A. Wickramasinghe *et al.*, (2015) Evolution of CPMAS under fast magic-angle-spinning at 100 kHz and beyond, *SSNMR* 72 9-16.

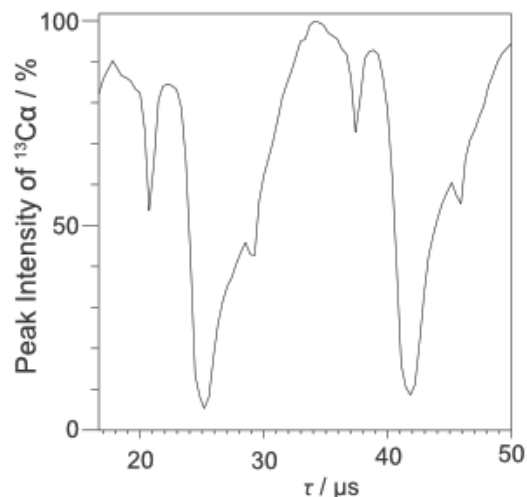


Fig. 2. Dependence of $^{13}\text{C}\alpha$ -peak intensity on π -pulse period τ .

Sample was $^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$ -labeled L-alanine and it was measured with ^{13}C CPMAS on 60 kHz MAS. Intensity was normalized with the highest point on $\tau = 34.1 \mu\text{s}$.

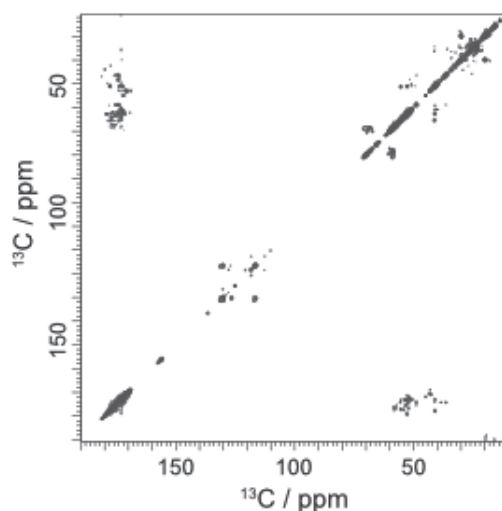


Fig. 3. ^{13}C - ^{13}C π -DARR spectra of $^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$ -labeled GB1 protein.

It was measured on 60 kHz MAS and with repetition time of 2.5 s. Mixing was done with combination of 30 kHz π pulses and 10 kHz decoupling pulses. Mixing time was 285 ms.

P90Y

高温超伝導バルク磁石表面勾配磁場を用いた拡散NMR測定装置の開発 リチウムイオン電池開発に適合する測定装置を目指して

○菊池翔¹, 坂井直道¹, 村上雅人¹, 横山和哉², Tritrakarn Techit³, 岡村哲至³, 高橋雅人^{4,1}, 岡徹雄^{1,4}, 仲村高志^{5,1}

¹ 芝浦工業大学大学院 理工学研究科

² 足利大学 工学部

³ 東京工業大学 工学院 機械系

⁴ 理化学研究所 生命機能科学研究センター

⁵ 理化学研究所 環境資源科学研究センター

Development of Diffusion NMR Measurement System Using High-Temperature Superconducting Bulk Magnet Surface Gradient Field

Toward a measurement device suitable for lithium-ion battery development

○Sho Kikuchi¹, Naomichi Sakai¹, Masato Murakami¹, Kazuya Yokoyama², Tritrakarn Techit³, Tetsuji Okamura³, Masato Takahashi^{4,1}, Tetsuo Oka^{1,4}, Takashi Nakamura^{5,1}

¹ Graduate School of Engineering and Science, Shibaura Institute of Technology

² Faculty of Engineering, Ashikaga University

³ Department of Mechanical Engineering, Tokyo Institute of Technology

⁴ RIKEN Center for Biosystems Dynamics Research

⁵ RIKEN Center for Sustainable Resource Science

We have successfully measured diffusion NMR using a static gradient magnetic field generated on the surface of a single-sided magnet using a high-temperature superconducting (HTS) bulk. HTS bulk magnets with a compact cryocooler can generate a strong and stable magnetic field compared to conventional permanent magnets. Although chemical shifts cannot be observed in the gradient magnetic field generated on the magnet surface due to field inhomogeneity, other properties such as relaxation times and self-diffusion coefficients can be investigated. This strong static field gradient will match the diffusion measurements of the samples with low self-diffusion coefficients and small T_2 . The self-diffusion measurement on ^1H in glycerol was demonstrated using a home-built spectrometer successfully. One of the future applications for this device will be the analysis of electrolytes in lithium-ion batteries by ^7Li measurement.

一般的なNMR装置には強力な均一磁場を発生させるために超伝導コイルが用いられているが、本研究では線材ではなく塊(バルク)状の超伝導材料である高温超伝導(HTS)バルク磁石(Fig. 1)を用いたNMR装置を開発した。HTSバルク磁石は液体ヘリウム温度より高い温度でも超伝導を維持することができるため、交流100Vで稼働する小型の極低温冷凍機で運用することが可能である。したがって、装置の小型化を図りながらも強力で安定した磁場を発生させることができる。HTSバルク磁石のNMRへの応用として、仲村らは積層された環状HTSバルク磁石のボア内で先鋭な溶液NMRのスペクトルを得ることに成功している[1]。通常のNMR測定では、均一で強力な磁場が要

高温超伝導バルク磁石, 拡散 NMR, 片側 NMR

○きくちしょう, さかいなおみち, むらかみまさと, よこやまかずや,
とりとらかーんとしつと, おかむらてつじ, たかはしまさと, おかてつお, なかむらたかし

求されるため、一般的には磁石ボア内部に試料を挿入して測定を行う。したがって、必然的に測定可能な試料はボア径よりも小さいものに限られてしまう。この問題を解決するために、Blümichらは永久磁石の表面に生じている磁場を利用する方法を試み、NMR信号の検出に成功した[2]。磁極表面に試料をあてて測定を行うことで試料サイズ・形状に制限がなくなるため、より高い非破壊・非侵襲性を得ることができる。したがって、生体などのボア内に挿入することができなかった試料も測定対象とすることができる。HTSバルク磁石は同じサイズの永久磁石と比較すると、より強力な磁場を発生させることができるため、より高感度な測定が可能となる。このことから、我々はHTSバルク磁石表面に生じる磁場を利用したNMR装置の開発を試みた(Fig. 2)。しかし、磁極表面に生じている磁場は強力な勾配が生じているため、高い磁場均一度が要求される化学シフトを観測することは不可能である。一方でNMR信号を検出することができれば緩和時間や自己拡散係数などの他の性質を調べることは可能である。本研究では強力な静磁場勾配を生かして自己拡散係数の測定に焦点を当てて装置の開発を進めた。

静磁場勾配による拡散測定で使用される代表的なパルスシーケンスの一つにスピンエコー Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG)がある。Fig. 3にスピンエコーCPMGの概略図を示す。 t_E はスピンエコーの待ち時間、 t_D はCPMGの待ち時間を示す。スピンエコー法による拡散測定では待ち時間 t_E を変化させ、信号が減衰の様子を確認し自己拡散係数を調べる。スピンエコー法により拡散測定を行った際の信号強度比は式(1)のように与えられる。

$$\ln\left(\frac{S(t_E)}{S(0)}\right) = -\frac{1}{12}\gamma^2 G_0^2 t_E^3 D - \frac{t_E}{T_2} \quad (1)$$

$S(t)$ は待ち時間 t におけるNMR信号強度、 γ は磁気回転比、 G_0 は静磁場勾配、 D は自己拡散係数、 T_2 は横緩和時間を示す。式(1)より時間経過に伴い拡散が進み信号強度が減衰していくことが説明できるが、測定領域の静磁場勾配 G_0 の値が大きいほど同じ信号強度比になるまでの待ち時間 t_E を短くすることができる。

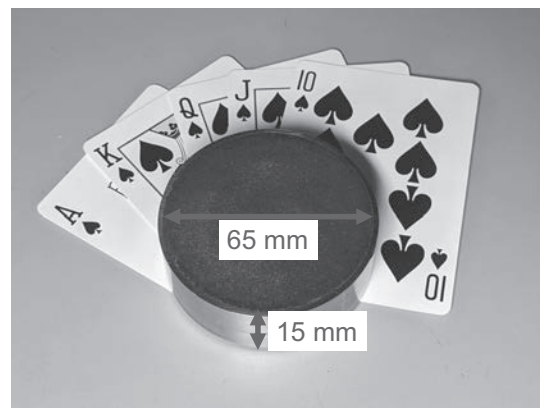


Fig. 1. HTS bulk magnet with SUS ring.
Material : Sm123 HTS bulk,
Diameter : 65 mm, Thickness : 15 mm

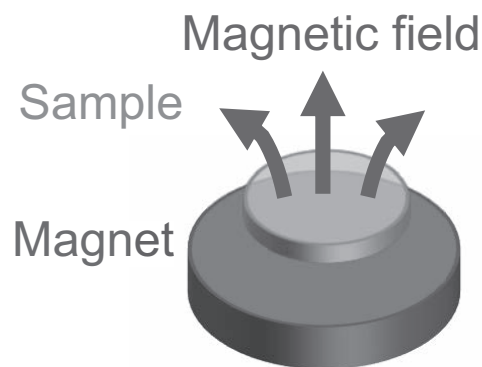


Fig. 2. The schematic view of single-sided NMR.

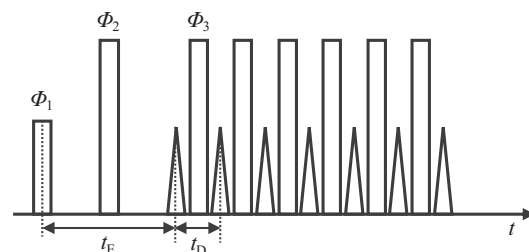


Fig. 3. Pulse sequences of SE-CPMG.

NMRで自己拡散係数の測定を行うために磁場勾配を得る方法として、パルス磁場勾配(PFG)NMR法が一般的に普及している。この方法では任意のタイミングでパルス磁場勾配をPFGコイルで発生させる。PFG-NMR法の利点は任意のタイミングのみに磁場勾配を発生させるため、磁場勾配が生じていない間は磁場均一度が高い状態で測定を行うことができ、磁場勾配が生じている間のみで拡散を進めることができる。そのため、待ち時間の間だけ磁場勾配を発生させ、パルスを印加している間や信号を受信する間は磁場勾配を発生させずに磁場均一度を高め、NMR信号を検出しやすい環境で測定を行うことができる。

しかし、本研究で開発した片側磁石ではHTSバルク磁石表面に定常的に生じている勾配磁場を利用して測定を行う。磁場勾配の有無を切り替えることができないため常に磁場勾配の影響を受けてしまうが、50 T/mを超える強力な勾配磁場を利用することができる。高い磁場勾配を利用することで、短い待ち時間で測定を行うことができる。またそれに伴い緩和の影響、すなわち式(1)における t_E/T_2 の項の影響を小さくすることができる。このことから粘性の高いオイルや生体分子などの T_2 の短い試料や小さな自己拡散係数を持つ試料を測定対象とすることができる。

本研究では拡散測定を進めていくにあたって、まず初めに自己拡散係数の値が既知である水を用いて、式(1)に従って磁場勾配の値のキャリブレーションを行った。拡散測定にはFig. 4に示すプローブを使用した。サンプル中心が磁極表面から3.75 mm離れた位置に来るようにプローブを固定した。その後チューブに試料を流し込み、コイル内部の試料からNMR信号の検出を試みた。水のNMR測定を行うにあたって、純水の T_1 が15 sと非常に長く測定効率が非常に悪くなってしまうため、5 mM CuSO₄を加えることで T_1 を短くし、測定効率の向上を図った。

拡散測定にはFig. 3で示したスピンエコーCPMGパルスシーケンスを用いた。待ち時間 t_E は50, 100, 150, 200, 250, 300 μ sに設定し信号の減衰の様子を観察した。CPMGの設定は全て共通でCPMGの繰り返し回数は100回とし、待ち時間 $t_D = 50 \mu$ sとした。また、測定にあたって積算回数を512回、繰り返し時間を1 sに設定し、周波数43.4 MHzで測定を行った。また、測定は室温(25 °C)で行った。

水の自己拡散測定結果を式(1)に従ってプロットしたものをFig. 5に示す。Fig. 5の点線はプロットした点から最小二乗法にて計算した近似直線である。縦軸は $\ln\{S(t_E)/S(0)\}$ とし、横軸は $\gamma^2 t_E^3 D / 12$ としているため、Fig. 5の近似直線の傾きを式(1)から G_0^2 とみなすことができる。計算結果よりこの直線の傾きは3658であったため、本測定位置(磁石表面から3.75mm離れた位置)における磁場勾配の値は60.5 T/mである。

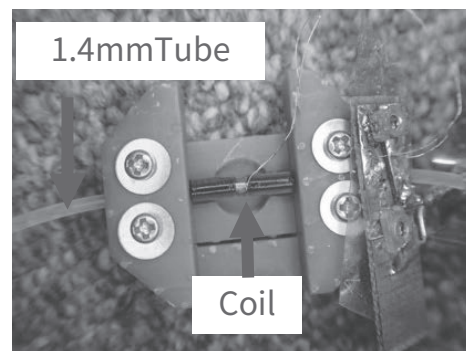


Fig. 4. Our NMR probe. A coil is wound around a PTFE tube and the NMR signal is acquired from the sample inside the coil. The PTFE tube has an inner diameter of 1.0 mm and an outer diameter of 1.4 mm.

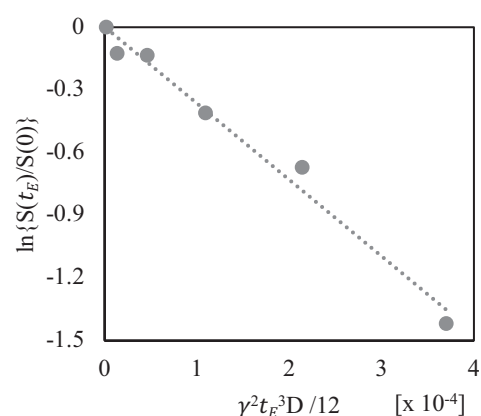


Fig. 5. Diffusion measurements of water. $D_{water} = 2.3 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$. The dotted line by the least-squares method shows the obtained strength of static field gradient $G_0 = 60.5 \text{ T/m}$.

本研究ではこれまでにプロトン(^1H)の信号を検出することで、グリセロールや飽和砂糖水などの自己拡散係数が 10^{-12} m^2/s 程度の試料の拡散測定に成功している(Fig. 6). 待ち時間 t_E は500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000 μs に設定した. Fig. 5とは異なり横軸を $\gamma^2 G_0^2 t_E^3 / 12$ とすることにより, 近似直線の傾きが自己拡散係数 D に対応する. Fig. 6.の近似直線の傾きが -2.0936×10^{-12} となったため, 本測定結果から導き出されるグリセロールの自己拡散係数の測定値は 2.09×10^{-12} m^2/s である. また, 25°C におけるグリセロールの自己拡散係数の文献値が 2.15×10^{-12} m^2/s [3]であることから, 文献値と非常に近い結果が得られていることが分かる.

式(1)より, 本研究と同程度の信号減衰を得るためには, 例えば磁場勾配が100 T/mの場合の待ち時間 t_E は2 msとなるのに対し, 磁場勾配が10 T/mの場合の待ち時間 t_E は10 ms, 磁場勾配が1 T/mの場合の待ち時間 t_E は45 msとなる. このように, 磁場勾配の値が小さいほど待ち時間 t_E が大きくなる. 式(1)より, 待ち時間 t_E が大きく緩和時間 T_2 が小さくなるほど緩和(t_E/T_2 の項)の影響を強く受けてしまう. グリセロールの T_2 は $27.1 \pm .2$ msであるため緩和の影響を受けやすいと言える. しかし, 本測定における磁場勾配は60 T/mであるため, 3 msと非常に短い待ち時間 t_E で拡散測定を行うことに成功している. これにより, 我々のHTSバルク磁石を用いた片側NMRでは緩和の影響を小さくすることができる.

拡散NMRの活用例の一つにリチウムイオン電池の電解液の分析がある. 電解液中の ^7Li の自己拡散係数は $10^{-10} \sim 10^{-12}$ m^2/s であるため, グリセロールと同程度以上の自己拡散係数となる. しかし, 核磁気回転比が ^1H よりも小さくなってしまったためより長い待ち時間 t_E が必要になってしまうこと, NMR信号感度が低下してしまうことが課題となる. したがって, 今後はリチウムイオン電池の電極近傍の ^7Li の測定のためにさらなる改良を行っていく.

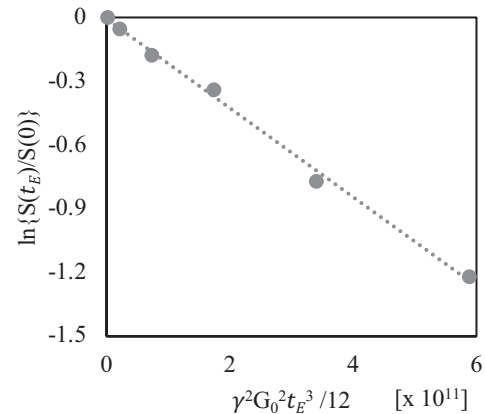


Fig. 6. Diffusion measurements of glycerol.
 $D_{\text{glycerol}} = 2.15 \times 10^{-12}$ m^2/s , $G_0 = 60.5$ T/m.
 The dotted line by the least-squares method shows the measured self-diffusion coefficients $D = 2.09 \times 10^{-12}$ m^2/s

References

1. Nakamura T, Itoh Y, Yoshikawa M, Oka T, Uzawa J. Development of a superconducting magnet for nuclear magnetic resonance using bulk high-temperature superconducting materials. Concepts in Magnetic Resonance Part B: Magnetic Resonance Engineering. 2007. pp. 65–70. doi:10.1002/cmr.b.20083
2. Blümich B, Anders J. When the MOUSE leaves the house. Magn Reson. 2021;2: 149–160.
3. Klein M, Fehete R, Demco DE, Blümich B. Self-diffusion measurements by a constant-relaxation method in strongly inhomogeneous magnetic fields. J Magn Reson. 2003;164: 310–320.

P91

フッ素化スルホン酸アイオノマー分散液の高速磁場サイクリング NMR測定

○山口真, 寺尾剛

技術研究組合FC-Cubic

Fast Field-Cycling NMR Relaxometry of Perfluorosulfonic Acid Ionomer Dispersions

○Makoto Yamaguchi, Takeshi Terao

Fuel Cell Cutting-edge Research Center (FC-Cubic)

Spin-lattice relaxation rate of perfluorosulfonic acid (PFSA) ionomer dispersions in polar solvents were measured by field-cycling relaxometry. Contributions of local motions (defect diffusion along main chain), collective order fluctuations, and rotational diffusion of the dispersed particles are supposed to be responsible to explain frequency dependence, which basically obeys power law with changing indices.

ナフィオンなどのフッ素化スルホン酸(Perfluorosulfonic acid:PFSA)アイオノマーは、固体高分子形燃料電池のプロトン伝導膜や触媒層に用いられている。これらは極性溶媒の分散液として提供されており、分散粒子のサイズや形状や運動性が製品の諸特性を左右する。我々は高速磁場サイクリング(Fast Field-Cycling : FFC) NMRの適用可能性を検討し、スピン格子緩和速度の周波数依存性を分子鎖上の欠陥拡散および粒子の回転拡散で説明を試みてきたが⁽¹⁾、今回は膜試料の測定結果との比較から分子鎖の集団運動の寄与も含めて考察した。

測定装置はSpinmaster2000(Stelar S.r.l., Italy)を用いた。この装置は電磁石による磁場強度を高速で切替が可能である。測定法をFig.1に示す。分極磁場(¹⁹F核ラーモア周波数27.5MHz)で試料の縦磁化を生成し、緩和磁場(0.005-40MHz)を切り替えて磁化を緩和させ、一定時間経過後の磁化を検出磁場(17MHz)でFID検出する。緩和磁場の印加時間を変えて測定を繰り返し、FID信号強度を指数関数でフィットし T_1 を求める。これを緩和磁場強度を変えてスピン格子緩和速度($R_1=1/T_1$)の周波数プロファイルを得る。今回は当量重量(EW)の異なる市販品が入手可能な短側鎖型アイオノマー(Aquivion, Fig.2)の水分散液および膜を用い、長側鎖型の測定結果と比較した。

EW790の水分散液(D79-25BS, 25wt%)と膜(E79-12S, 膜厚120 μ m)のスピン格子緩和速度プロファイルを図3に示す。低周波数側は分散液では5kHzまで測定できたが、膜ではFIDの減衰が速く0.2MHzが下限であった。10MHz以上では温度および試料形状の影響がなく、指数-1のべき乗で近似できる。この領域は長側鎖型アイオノマーの水分散液でも観測されたが、長側鎖型では約15MHz以上で観測された指数-3/2の領域⁽¹⁾が認められなかった。

燃料電池, 高分子, スピン格子緩和

○やまぐちまこと, てらおたけし

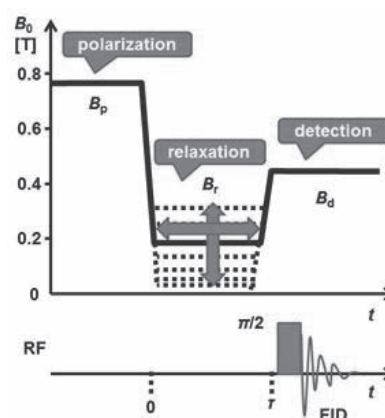


Fig. 1. FFC-NMR measurement

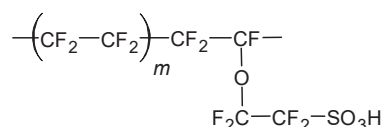


Fig. 2. Structure of Aquivion

一方、0.2MHz以下では分散液の緩和速度はほぼ一定となり、温度が高いほど緩和速度は低下した。PFSAアイオノマーの水分散液では数nmの太さの棒状粒子が分散しており⁽²⁾、粒子全体の回転拡散による寄与があると考えられる。

10~0.2MHzの領域では低周波数側にかけて測定点の傾きが指数-1から次第に緩やかになったが、0.2MHz付近での傾きは303Kでは指数-3/4程度であったものが353Kでは約-1/2にまで変化した。この挙動は分散液と膜の双方で認められたが、353Kの膜では10~0.2MHzの全域で指数-1/2を示した。

スピン格子緩和周波数プロファイルがべき乗則に従う例は高分子や液晶などで多く報告され、同じべき乗則に対しても異なるモデルによる説明がなされており、実験結果の一意的な解釈は難しい⁽³⁾。障壁間の有限範囲の欠陥拡散による緩和機構によれば、べき乗の指数が高周波数側から-3/2→-1/2→0と変化すると予測される⁽⁴⁾。PFSAアイオノマーはPTFEと同様の主鎖構造を有し、PTFEで観察される二重らせん反転と類似の欠陥が主鎖上を拡散し、側鎖の存在が拡散障壁となると考えられることから、以前の発表ではこのモデルが適用可能と考えた⁽¹⁾。Lenkは高周波数側の指数-3/2と低周波数側の指数-1/2を含む一般化されたスペクトル密度関数を提案したが⁽⁵⁾、これによれば両者の中間領域で指数-1となり、緩和速度の温度依存性の消失も同時に説明可能である。一方、353Kの膜で広い領域で約-1/2のべき乗が観測されたが、ネマティック液晶の配向ゆらぎに起因する周波数依存性も指数-1/2を示すことが知られており、液晶性ポリマーでは指数が-0.65となる結果が報告されている⁽⁶⁾。PFSAアイオノマーは主鎖骨格の平行配列に由来するX線回折ピークを 1.2nm^{-1} 付近に示すが、これは膜だけでなく分散液でも観察されることから、指数-1/2は主鎖配列の集合的秩序のゆらぎに起因するスピン格子緩和に起因している可能性も考えられる。この場合は集合的秩序の相関長に対応して周波数の低下に伴い指数が-1/2から0へと移行すると考えられる。

本発表内容は新エネルギー・産業技術総合開発機構の『燃料電池等利用の飛躍的拡大に向けた共通課題解決型産学官研究開発事業』による成果の一部である。

References

- (1) 山口真 (2019) 高速磁場サイクリング NMR による水系分散液中のナフィオン粒子の分子運動性の検討, 第 68 回高分子討論会. (2) Yamaguchi, M., Terao, T., Ohira, A., Hasegawa, N., Shinohara, K. (2019) Size and shape of Nafion particles in water after high-temperature treatment. *J. Polym. Sci. B* 57, 813-818. (3) Kimmich, R. (2012) *Principles of Soft-Matter Dynamics*. (4) Kimmich, R., Voigt, G. (1978) Defect Diffusion Models in NMR and Dielectric Relaxation. *Z. Naturforsch.* 88a, 1294-1306. (5) Lenk, R. (1975) Diffusion and spin relaxation. *Adv. Molec. Relaxation Process.* 6, 287-306. (6) Zeuner, U., Dippel, T. Noack, F., Mueller, K., Mayer, C., Heaton, N., Kothe, G. (1992) Proton spin-lattice relaxation dispersion of liquid crystal polymers: Characterization of local and collective motions. *J. Chem. Phys.* 97, 3794-3802.

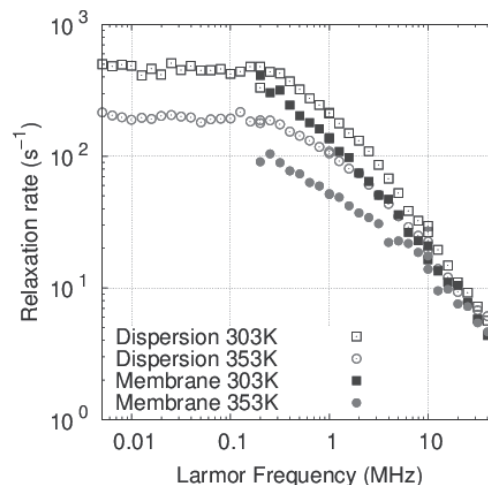


Fig. 3. Relaxation dispersion of Aquivion (EW=790)

P92Y

Perdeuterated α -helical membrane protein preparation methods for proton detection MAS solid-state NMR

Xin Zhang¹, Hajime Tamaki¹, Toshimichi Fujiwara^{1,2}

¹*Institute for Protein Research, Osaka University*

²*Center for Quantum Information and Quantum Biology Division, Institute for Open and Transdisciplinary Research Initiatives, Osaka University*

Perdeuteration improves the sensitivity and resolution of solid-state NMR by suppressing magnetic interactions with protons, which makes it a suitable method for measuring membrane protein complex structural information under physiological condition. However, it is difficult to re-introduce ^1H to α -helical membrane proteins for ssNMR detection. In this study, we prepared perdeuterated *Natronomonas pharaonis* halorhodopsin (NpHR), a membrane protein with 7 α - helices via several methods. The H/D exchanging efficiency and sample quality were evaluated by proton detection ssNMR measurements under 70 kHz magic angle spinning with a 700 MHz spectrometer and will be discussed in this presentation.

Structural studies for membrane proteins are important because those proteins play important roles in physiological activities. Solid-state NMR (ssNMR) is a suitable method for membrane proteins structural analysis because it provides not only structural information but also molecular dynamic information at atomic level under physiological condition. Compared with commonly used ^{13}C and ^{15}N detection ssNMR, ^1H detection ssNMR provides better sensitivity and resolution. However, the strong ^1H - ^1H dipolar interaction results in a homogeneous line-broadening and limits the spectral resolution. The state-of-art ssNMR instrument enabled magic angle spinning (MAS) frequency towards 150 kHz with magnet field up to 1.2 GHz (28 T) which provides narrower proton linewidth. However, even under those conditions dipolar interaction contributes to a major part in line-broadening¹; about 100 Hz homogeneous broadening remained in fully protonated protein samples². Deuteration still benefits to spectral resolution and signal sensitivity and enables ssNMR measurement to larger membrane protein complexes.

Perdeuteration and proton back exchange is a commonly used method to prepare ^2H with $^1\text{H}_\text{N}$ labeled protein for backbone structural and dynamic analysis with ssNMR. Perdeuterated proteins can be expressed in *E. coli* with D_2O based media and re-introducing $^1\text{H}_\text{N}$ via proton back exchange in aqueous solution. However, the application of this method to α -helical membrane proteins faces difficulties. The protein folded structure and the hydrophobic surrounding environment prevent the $^2\text{H}_\text{N}$ exchanging with solvent $^1\text{H}_2\text{O}$ and cause heavily signal losses³. Denaturing the proteins can increase the water accessibility and improve proton back exchange ratio. However, finding the refolding condition for α -helical membrane proteins is difficult. Limited works were focused on preparing ^2H with $^1\text{H}_\text{N}$ labeled α -helical membrane proteins through perdeuterated samples via unfolding and refolding protocol. A cell free expression system can be a better choice for ^2H with $^1\text{H}_\text{N}$ labeled α -helical membrane protein preparation by using ^2H , ^{13}C and ^{15}N labeled amino acids. In cell free expression system, protein is synthesized using cellular extraction in $^1\text{H}_2\text{O}$ based reaction buffer via free amino acids molecules. Theoretically, the proton back exchange already happened in amide acid molecules before protein synthesis thus the signal losses related to incomplete proton back

MAS solid-state NMR, perdeuteration membrane protein

exchange can be totally avoided. However, cell free synthesis method also has problems. The chemical environment differences between living cells and reaction buffer may affect the protein structure; unwanted amino acid metabolic pathways may remain in cellular extraction and introduce additional ^1H to proteins by scrambling. Therefore, it is necessary to evaluate sample preparation method before formal structural study. In this study, ^2H with $^1\text{H}_\text{N}$, ^{13}C and ^{15}N labeled NpHR sample was prepared through *E. coli* expression and cell free synthesis and evaluated by ssNMR.

Perdeuterated with ^{13}C and ^{15}N labeled NpHR was expressed by *E. coli* with D_2O based M9 medium and proton back exchanged in native state or SDS denatured condition. A novel dialysis method is developed for SDS removal and NpHR refolding using DMPC/CHAPS mixture. Cell free synthesized ^2H with $^1\text{H}_\text{N}$, ^{13}C and ^{15}N labeled NpHR was prepared by a commercial kit from Taiyo-Nippon-Sanso. NpHR samples were purified by Ni-affinity chromatography and reconstituted in DMPC liposome for ssNMR measurement. The ssNMR measurements in this study were performed with a JEOL 700 MHz (16.4 T) spectrometer under 70 kHz MAS. Probe temperature was set to $-40\text{ }^\circ\text{C}$ where sample temperature was approximately at $20\text{ }^\circ\text{C}$.

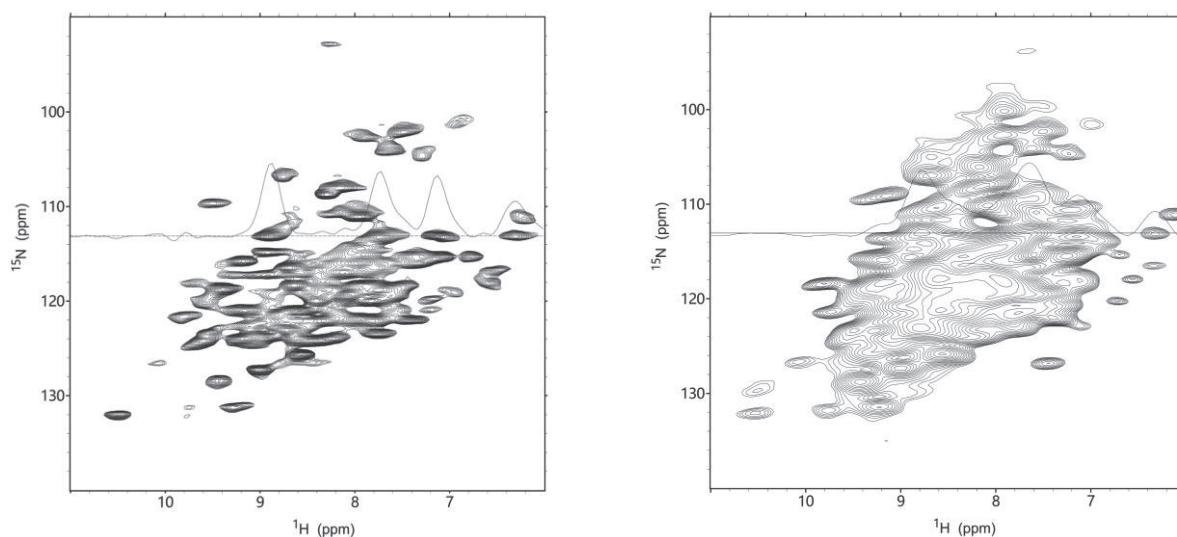


Fig. 1 ^1H - ^{15}N HSQC spectra of ^2H with $^1\text{H}_\text{N}$, ^{13}C and ^{15}N labeled NpHR by *E. coli* expression (left) and cell free synthesis (right)

^2H labeled NpHR provided an average proton linewidth of 200Hz in ^1H - ^{15}N HSQC spectra (Fig. 1), which was 30% narrower than that from fully protonated sample. Signal losses related to incomplete proton back exchanging can be observed in *E. coli* expressed NpHR spectrum even after unfolding and refolding. While no significant signal losses were observed in cell free synthesized NpHR spectrum. The details of sample preparation and ssNMR analysis will be discussed in the presentation.

References:

- (1) Nimerovsky, Evgeny, et al. "Proton detected solid-state NMR of membrane proteins at 28 Tesla (1.2 GHz) and 100 kHz magic-angle spinning." *Biomolecules* 11.5 (2021): 752.
- (2) Schledorn, Maarten, et al. "Protein NMR Spectroscopy at 150 kHz Magic-Angle Spinning Continues To Improve Resolution and Mass Sensitivity." *ChemBioChem* 21.17 (2020): 2540-2548.
- (3) Linser, Rasmus, et al. "Proton-detected solid-state NMR spectroscopy of fibrillar and membrane proteins." *Angewandte Chemie International Edition* 50.19 (2011): 4508-4512.

P93

High-dimensional ^1H -detected SSNMR for Expeditious Characterization of A β 42 Fibrils

Ayesha Wickramasinghe¹, Yiling Xiao², Yoshitaka Ishii^{1,2,3}

¹RIKEN Center for Biosystems Dynamics Research, RIKEN, Yokohama, Kanagawa, Japan

²Department of Chemistry, University of Illinois at Chicago, Chicago, Illinois, USA

³School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology, Yokohama, Kanagawa, Japan

Among various analytical techniques, solid-state NMR (SSNMR) spectroscopy is the most powerful tool for elucidating the atomic level structures of amyloid- β (A β) and other amyloid fibrils. In this study, we evaluate the applicability of high-dimensional ^1H -detected SSNMR under ultra-fast MAS (UFMAS) integrated with non-uniform sampling (NUS) method for a fully protonated 42-residue A β (A β 42) fibril in nano-mole scale. Our results demonstrate the feasibility of efficient characterization of a \sim 42 nmol of fully protonated A β 42 fibril using sparsely sampled 4D SSNMR spectral data within a couple of days of experimental time.

Fibrillar assemblies of A β fibrils have been a subject of intense research due to their close association with Alzheimer's disease (AD).¹ Among different A β species present in AD brain, A β 42 fibril is considered as the most pathogenic species since it exhibits notably higher neurotoxicity and aggregation propensity.² Thus, structural characterization of A β 42 fibril is crucial for a profound understanding of the mechanism of AD. However, due to their insoluble and non-crystalline nature, it has been difficult to characterize A β fibrils by conventional structural tools such as solution NMR and X-ray crystallography. SSNMR spectroscopy has been the most powerful analytical technique to determine the atomic level structures of A β fibrils.³⁻⁵ Nevertheless, essentially only one unique structure having S-shaped β -sheet arrangement is elucidated by previous SSNMR studies on A β 42 fibrils prepared at a physiological pH.⁵⁻⁷ These SSNMR studies on A β 42 fibrils relied on ^{13}C -detected SSNMR, which is effective, but generally requires a large amount of sample (\sim 5-20 mg) to record NMR spectra with sufficient sensitivity. Furthermore, high-dimensional NMR spectra (typically 3D and 4D) are required to achieve sufficient resolution for a reliable resonance assignment, which subsequently demands prolonged experiment time. However, these requirements, which are often nonviable, limit practical biological applications. With recent advances, ^1H -detected high-dimensional SSNMR can circumvent the above limitations of conventional SSNMR.⁸ Additional time saving is attainable by sparsely sampling data points in indirect dimensions using NUS protocols.

In this study, we evaluate the applicability of ^1H -detected 4D SSNMR under UFMAS integrated with NUS for a fully protonated A β 42 fibril in nano-mole scale (\sim 42 nmol or \sim 200 μg). This approach allows one to extract structural profile of A β 42 fibril from 25-100 times less sample amount compared to traditional ^{13}C -detected SSNMR. Here, we recorded ^1H -detected 4D experiments such as (H)CACONH and (H)CA(CO)NCAH with 25% NUS to assign the resonances of the protein-backbone of the A β 42 fibril. Excellent sensitivity of NMR spectra by ^1H -detection and dramatic enhancement of ^1H resolution by UFMAS at 90 kHz permitted us to assign 94% of $^{13}\text{C}_\alpha$, 82% of ^{15}N , 67% of ^{13}CO and $^1\text{H}_\text{N}$, and 76% of $^1\text{H}_\alpha$ resonances

A β 42 fibrils, ^1H -detected SSNMR, Non-uniform sampling

from the structured region of the backbone (Tyr 10-Ala 42) within 2.3 days of experiment time. Other details will be discussed in the presentation.

References

1. V. H. FINDER, *J. Alzheimer's Dis.* (2010) 22, S5–S19.
2. G. Meisl, X. Yang, E. Hellstrand, B. Frohm, J. B. Kirkegaard, S. I. A. Cohen, C. M. Dobson, S. Linse, T. P. J. Knowles, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2014) 111 (26), 9384.
3. A.T. Petkova, Y. Ishii, J. J. Balbach, O. N. Antzutkin, R. D. Leapman, F. Delaglio, R. Tycko, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2002) 99(26), 16742-16747
4. I. Bertini, L. Gonnelli, C. Luchinat, J. Mao, A. Nesi, *J. Am. Chem. Soc.* (2011) 133(40), 16013-16022
5. Y. Xiao, B. Ma, D. McElheny, S. Parthasarathy, F. Long, M. Hoshi, R. Nussinov, Y. Ishii, *Nat. Struct. Mol. Biol.* (2015) 22, 499-505
6. 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
7. 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. USA* (2016) 113, E4976-E4984
8. A. Wickramasinghe, Y. Xiao, N. Kobayashi, S. Wang, K. P. Scherpelz, T. Yamazaki, S. C. Meredith, Y. Ishii, *J. Am. Chem. Soc.* (2021) 143, 11462–11472.

P94Y

NMRによる金属有機構造体のCO₂吸着動力学に対する結晶サイズの影響の研究

○姜 偉明¹, 武田 和行¹

¹京都大学 理学研究科 化学専攻

Crystal-size effect on the kinetics of CO₂ adsorption in metal organic frameworks studied by NMR

○Weiming Jiang¹, Kazuyuki Takeda¹

¹Division of Chemistry, Graduate School of Science, Kyoto University

We investigate the kinetics and exchange of carbon dioxide (CO₂) adsorbed in a metal organic framework (MOF) with various crystal sizes. The crystal-size dependence of the ¹³C NMR lineshape of the guest CO₂ molecules can be explained by asymmetric exchange between the motion-restricting adsorption sites and the hindrance-free isotropic sites. The trend that the smaller the host crystal are, the faster the exchange is, can be explained by the surface-to-volume ratio.

Introduction

Metal-organic frameworks (MOFs) are porous materials composed of metal clusters and organic linkers. The porosity of MOFs offering diverse applications, such as gas storage/separation, catalysis, sensing, and so on, not only rely on the host-guest interactions determined by the chemical structures, but also can be controlled by the crystal size and thereby the accessibility of the active surface sites. Even though solid-state NMR works have successfully revealed the dynamics and diffusion of the guest molecules, the particle size effect has so far been overlooked.

Here, we study the crystal-size dependence of the kinetics of CO₂ adsorbed in [Zn₂(1,4-NDC)₂(dabco)]_n MOF (NDMOF, Fig. 1) with ¹³C NMR.¹

Experimental

We synthesized single crystals of NDMOF, and crushed them into microcrystals with different sizes. The individual sample is put into a capillary and evacuated before being flame-sealed together with ¹³CO₂ with pressure of 90 kPa. The samples include: 1. cc@CO₂ (crushed crystals of 100~200 μm in size), 2. pd@CO₂ (coarse powder of 10~20 μm in size), 3. spd@CO₂ (fine powder of 1~2 μm in size). The ¹³C spectra were measured by a home-built probe in 7 T at room temperature.

Results and Discussion

The ¹³C spectrum of cc@CO₂ showed resonance within a range from 107 to 155 ppm (Fig. 2a), which is

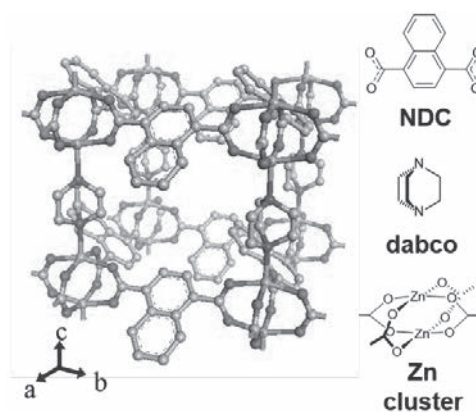


Fig. 1. Structure of [Zn₂(NDC)₂(dabco)]_n MOF (NDMOF). Hydrogen atoms are not shown.

Metal Organic Framework (MOF), CO₂ adsorption, exchange

○ちゃん うえいみん、 たけだ かずゆき

small compared to that for pure solid CO₂ (−85 to 230 ppm), indicating that the adsorbed CO₂ undergo fast reorientation causing partial averaging of the chemical shift anisotropy. The axially symmetric power pattern can be explained by a model in which the CO₂ molecules adsorbed inside the pore of NDMOF behave as if they gyrate around an axis tilted by 61° against the *c*-axis of the host crystal. It should be noted, however, that the actual dynamics is superposition of reorientation and translation, the latter of which does not affect the NMR lineshape.²

Conversely, we observed striking differences in the line shape of the ¹³C spectra for pd@CO₂ and for spd@CO₂ (Fig. 2b, 2c). Since the host structure is common for all samples, the motion of CO₂ inside the MOF lattices is supposed to remain unchanged. Thus, the observed change in the spectrum as downsizing the particle is ascribed to exchange of the CO₂ molecules from one site to another, driven by diffusion across the pores, the gas phase, and different, randomly orientated crystallites. Such multi-site exchange among the motion-restricting adsorption sites (*core* site) and the hindrance-free *isotropic* sites, as schematically depicted in Fig 3a, require complicated calculation in lineshape analysis.

We found that, for 1D NMR lineshape analysis, the multi-site exchange can be reduced to isolated exchange between different core sites and the isotropic sites (Fig. 3b). Based on this idea, we calculated the lineshape using an asymmetric exchange model with various exchange rates.¹

This model successfully reproduced the experimental ¹³C spectra of pd@CO₂ and spd@CO₂ (broken lines in Fig. 2b, 2c) with the rate of exchange from the core to the isotropic sites $k = 200$ Hz and the population of the core sites $p = 0.628$, $p = 0.115$, respectively. Further, the ¹³C spectrum of pd@CO₂ measured in 14 T and 2D exchange spectroscopy (EXSY) experiments also supported our model.¹

Summary

The CO₂ molecules adsorbed in NDMOF undergo exchange among different crystallites and between the isotropic and the core sites. It is the size dependence of the rate of exchange that affects the size-dependent NMR lineshape. The particle-size effect that we observed in this work can also be seen in many other MOF-guest systems, and therefore needs attention in upcoming NMR investigations.

References

1. W. Jiang, K. Takeda, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2022**, in press. DOI: 10.1039/D2CP03226K.
2. L. C. Lin, J. Kim, X. Kong, E. Scott, T. M. McDonald, J. R. Long, J. A. Reimer and B. Smit, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2013**, 52, 4410–4413.

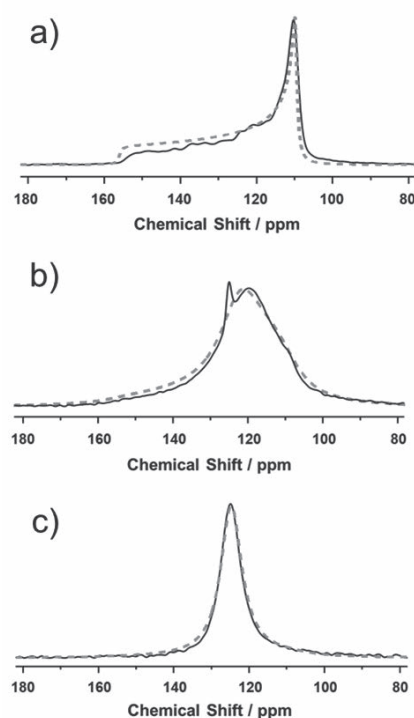


Fig. 2. ¹³C NMR spectra of a) cc@CO₂, b) pd@CO₂, and c) spd@CO₂ obtained in 7 T (Solid lines: experimental, broken lines: calculated).

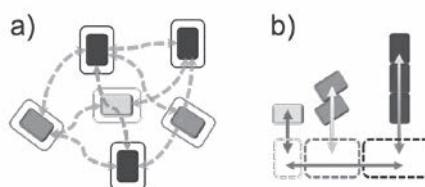


Fig. 3. Schematic diagram of (a) the multi-site exchange among crystallites through gaseous phase, (b) the isolated exchange model. Solid and open boxes represent the *core* and the *isotropic* sites.

著者検索

Author Index

著者検索

五十音順

あ

相沢 智康 L5-1, L5-6, P24Y, P28Y, P33, P34Y, P52Y
 相田 卓三 P32Y
 青野 恵太 P62Y
 青山 洋史 L2-1, P6Y, P72
 赤木 謙一 L4-2
 赤坂 一之 P51
 赤羽根 健生 P23
 浅尾 信央 P66Y
 浅川 直紀 P4Y
 朝倉 克夫 P40Y
 朝倉 由光 P65
 浅野 敦志 P38Y
 雨森 翔悟 P19, P53
 綾部 時芳 P24Y
 有田 恭平 P73
 安藤 考史 P67, P68Y
 安東 映香 P76Y

い

飯塚 友菜 P52Y
 飯塚 佑介 L2-1, P72
 五十嵐 俊介 P15
 池上 貴久 P73
 池口 雅道 P50Y
 池谷 鉄兵 L5-7, P49, P55, P63, P67, P68Y, P74Y
 石井 桜子 P71
 石井 裕一郎 L2-7
 石井 佳誉 L3-6, P29, P47, P57, P89, P93
 石黒 貴也 P47
 石田 康博 P32Y
 石附 京子 P40Y
 石原 颯馬 P52Y
 井田 朋智 P19, P53

板坂 佑真 P32Y
 一條 梨花 P2Y
 伊藤 信靖 P17
 伊藤 隆 L2-1, P49, P55, P63, P67, P68Y, P74Y

伊藤-渡邊 ひかり P31

稲村 勇雅 P33
 犬飼 宗弘 L5-2, P80Y, P82Y
 猪股 晃介 P49, P55, P63, P67, P68Y, P74Y, L4-2
 今井 駿輔 L2-7, L2-8, L4-1, P15, P66Y

う

上田 一義 P31
 上田 卓見 L3-2, AL-1, L2-8, L4-1, P66Y
 内田 紀之 P32Y
 内海 博明 P44Y
 右手 浩一 L2-4

え

榎園 能章 L4-2

お

王 雨 P8Y
 大出 真央 P68Y
 大久保 里佳 P63
 大澤 月穂 L1-3
 大澤 匡範 L2-7, P42Y
 大塚 勇介 P27
 大西 裕季 P24Y, L5-1, L5-6, P28Y, P33, P34Y
 大貫 義則 P37
 岡 徹雄 L1-2, P90Y
 魚返 祐太朗 P26Y
 岡田 康太郎 P37
 岡村 諭 P62Y
 岡村 哲至 L1-2, P7, P22Y, P90Y
 岡村 英保 P86Y, P88Y
 奥下 慶子 P20Y
 小倉 立己 P12
 長田 誠司 P24Y, L5-6, P28Y, P34Y

尾花 駿一	P81	北原 亮	L4-3, P60
親泊 遼	P47	北牧 祐子	P17
	か	北山 翔矢	P58
甲斐荘 正恒	P67, P68Y	木村 友美	P42Y
香川 晃徳	P70Y, P80Y		く
葛西 卓磨	L5-5, L5-7	楠 英樹	P1
梶 弘典	L5-4, P62Y, P76Y	久住 亮介	L1-4
粕谷 尚央	P51	熊谷 咲里	P84Y
片平 正人	L2-2, P48Y	熊木 康裕	L5-1, L5-6, P24Y, P28Y, P33, P34Y, P52Y
片山 耕大	P84Y	熊田 俊吾	P37
加藤 悦子	P23	久米田 博之	P24Y, L5-6, P28Y, P34Y, P52Y
加藤 賢	P35, P77	栗田 順一	P79
門間 啓	L1-4	栗田 政稔	L2-8
金折 賢二	P39, P51	栗原 拓也	L5-2, P19, P53, P81, P82Y
金子 舜	P66Y	桑原 大介	P65
金子 宗平	P82Y	桑山 知也	P42Y
金橋 康二	P20Y		こ
上出 友哉	P21	胡 知彦	P24Y, L5-1, L5-6, P28Y, P34Y
神野 智司	L2-1	小出 怜奈	P60
神原 孝之	P29, P47	神田 大輔	L2-5, P64Y
上村 孝	P2Y	河野 俊之	P1
亀井 駿	P74Y	幸福 裕	L2-8, L3-2, L4-1, P15, P66Y
鴨志田 一	P49	小籠 蒼	P32Y
河合 剛太	P2Y, P3, P56Y	小島 慧一	P18Y
河津 光作	P42Y	小嶋 誠司	L2-3
河端 夏輝	P4Y	児嶋 長次郎	L4-2, P14Y, P32Y, P61
川端 庸平	P68Y	児玉 高志	L4-2
川村 出	P31, P84Y, P86Y	小手石 泰康	P63
甘 莉	P24Y, L5-1, L5-6, P28Y, P33, P34Y	後藤 和馬	P76Y, P78Y
神取 秀樹	P84Y	小沼 剛	P73
神戸 高志	P76Y	小林 直宏	L3-6, P61, P73
	き	小林 文也	P81
木川 隆則	L5-5, L5-7	今 喜裕	L1-6
菊地 淳	P25, P36Y, P43, P58, P59, P69	近藤 敬子	L2-2
菊池 翔	L1-2, P90Y		さ
北川 勝浩	P70Y	齊藤 明	P81
北沢 創一郎	L4-3, P60	齋藤 公児	P20Y

齋藤 潤	P42Y	菅瀬 謙治	L2-6, P30, P54Y, P83
斎藤 直樹	P9, P13	杉木 俊彦	L4-2, P32Y
坂井 直道	L1-2, P90Y	杉下 友晃	P35, P77
寒河江 彪流	L2-7	杉田 知子	P16
坂倉 正義	P75	杉田 有治	P67, P68Y
坂田 研二	P59, P69	杉本 直樹	P40Y
坂本 泰一	P1, P6Y, P46Y	鈴木 榮一郎	P15
阪本 知樹	L2-2, P48Y	鈴木 克明	L5-4, P62Y, P76Y
櫻林 修平	P14Y	鈴木 しぶき	P84Y
笹川 拡明	P44Y	鈴木 隆史	P55
笹原 久武	P62Y	鈴木 拓巳	P6Y
佐藤 健大	P88Y	鈴木 不律	P62Y
佐藤 晴紀	P80Y	鈴木 悠斗	P86Y
佐藤 莉帆	P43	鈴木 悠	P86Y, P88Y
佐藤 涼	P88Y	鈴木 里佳	P18Y
佐谷 秀行	P42Y	須藤 雄気	P18Y
澤井 仁美	P63		せ
沢崎 綾一	L2-7	千田 俊哉	P42Y
澤田 永	P11		そ
	し	曾利 惟恵	P19
四方 歩美	P78Y	染谷 龍彦	P46Y
重田 泰宏	P19, P53, P85	空田 知樹	P54Y
重光 佳基	P29, P57, L3-6	宋 子豪	L5-1, L5-6, P24Y, P28Y, P33, P34Y
品川 秀行	P78Y		た
島 海翔	P55	高橋 彩香	P87
嶋田 一夫	L2-7, L2-8, L3-2, L3-3, L4-1, P15, P66Y	高橋 征三	P3
島本 啓子	L1-3	高橋 貴文	P20Y, P27
清水 由隆	P17	高橋 栄夫	P18Y
蔣 佳稀	P24Y, L5-1, L5-6, P28Y, P34Y	高橋 勝國	P78Y
白石 勇太郎	L2-8, L3-2, L4-1, P15	高橋 雅人	P7, P22Y, P90Y, L1-2
白川 昌宏	L2-6, L4-2, P30, P83	高松 京祐	L2-4
城 宣嗣	P63	田上 修	P78Y
新木 聡太	P71	高屋 展宏	P13
	す	田岸 亮馬	P49
末広 志織	P55	竹内 恒	L2-8, L3-3
末松 孝子	P40Y	竹腰 清乃理	HL-1, P71
菅澤 はるか	P67, P68Y, P74Y	武田 和行	L1-1, L1-4, P8Y, P11, P21, P94Y

館野 圭太	P68Y, P67	中澤 千香子	P38Y
田所 誠	P81	長島 敏雄	P18Y, P84Y
田仲 加代子	P74Y	中島 弘稀	P6Y
田中 真司	P16	永島 裕樹	L1-6
田辺 幹雄	P42Y, P75	中嶋 友理枝	P52Y
田端 真彩子	P67, P68Y	中島 善人	P5
田巻 初	P35, P45, P77, P92Y	永田 崇	L2-2, P1, P48Y,
	ち	中谷 和彦	P14Y
千葉 悠矢	P37	中塚 将一	P42Y
姜 偉明	P94Y	長門石 暁	P23
張 仲良	P10Y	長濱 友海	P46Y
	つ	中村 公則	P24Y
土田 知輝	L2-8	中村 浩一	P80Y, P82Y
坪井 裕理	P36Y, P58	中村 哲枝	P17
津本 浩平	P23	仲村 高志	L1-2, P90Y
	て	中村 光咲	L4-2
鄭 靖康	P52Y	中村 吏佐	P42Y
寺内 勉	P68Y	並木 智哉	P81
寺尾 剛	P91		に
寺西 貴志	P78Y	錦野 達郎	L2-3
寺見 響	P57, L3-6	西崎 雄三	P40Y
寺村 琢央	P39	西澤 茉由	L2-6
寺山 慧	P59	仁科 勇太	P76Y
	と	西村 善文	P79
富樫 直之	P74Y	西山 賢一	L1-3
戸川 航	P61	西山 祐介	L3-4, P26Y, P80Y
徳田 規紘	L2-4		ね
朽尾 豪人	L4-2	根来 誠	P70Y, P80Y
富永 雄介	L1-1		の
留守 めぐみ	P56Y	野田 泰斗	P71
外山 侑樹	L3-1	野村 薫	L1-3
豊田 修平	P31	則永 行庸	P20Y
豊田 芽生	P55		は
トリラカーン テシット	P7, P22Y, L1-2, P90Y	鮑 新努	P17
	な	端 健二郎	P78Y
内藤 晶	P31	長谷川 拓矢	P6Y
永江 峰幸	L2-1, P6Y, P72	畑 友輝	P20Y
中川 直哉	P65	服部 良一	L4-2

花岡 杏美	P52Y	松本 朋子	P43
浜口 功	P1	丸橋 愛美	P59
林 成一郎	P64Y, L2-5		み
林 史夫	P87	三尾 和弘	P75
林 祥弘	P37	三影 昇平	P38Y
	ひ	美川 務	P49, P67, P68Y, P74Y
東 孝憲	P88Y	三島 正規	L2-1, P6Y, P63, P67, P68Y, P72
菱倉 直樹	P63	水越 利巳	P15
日部 雄太	P71	水野 元博	L5-2, P19, P53, P81, P82Y, P85
平尾 優佳	P79	水村 拓也	L2-8
広瀬 侑	L2-1, P72	嶺重 温	L5-3
廣津 直樹	P23	宮田 裕貴	P74Y
廣西 麗加	P18Y	宮西 孝一郎	P80Y
	ふ	宮ノ入 洋平	L2-1, L2-3, L4-3, P68Y
深澤 準	P70Y		む
藤川 紘樹	L1-3	村上 雅人	P90Y, L1-2
藤戸 輝昭	P78Y	村上 美和	L5-3
藤浪 大輔	L2-5, P64Y		も
藤村 遥	P44Y	望月 佑紀	P70Y
藤村 礼	P25	物部 容子	L4-2
藤原 和夫	P50Y	森 祥子	L1-3
藤原 敏道	L1-5, L4-2, P10Y, P14Y, P32Y, P35, P45, P61, P77, P92Y	森永 隆志	P88Y
藤原 僚平	P78Y	森本 大智	AL-2, L2-6, P30, P54Y, P83
古板 恭子	L4-2, P14Y, P32Y, P61	諸岡 等	P27
	ほ	門田 典子	L4-2
星野 真一	L2-7		や
細江 菜々花	P53	八尾 滋	P16
細田 和男	P87	八木 達紀	P69
細田 直	L2-7	八木 宏昌	L5-7
本間 道夫	L2-3	安井 颯	L1-4
	ま	柳沢 耕太	P6Y
鱒渕 友治	P71	柳田 侑樹	P50Y
松木 陽	L1-5, P10Y, P35, P45, P77	屋部 祥大	P49
松熊 伸也	P40Y	山内 一夫	L5-1, L5-6, P24Y, P28Y, P34Y
松田 勇	L3-6, P29, P47, P57	山置 佑大	L2-2, P48Y
松永 一太	P69	山口 秀幸	P15
松永 達弥	L3-6, P29, P89	山口 真	P91
		山崎 太一	P17

山崎 俊夫 P18Y, P73, P84Y
山田 隼嗣 P25, P36Y, P43
山田 剛史 P14Y
山本 京香 P51
山本 航輝 P7, P22Y
山本 純也 L4-3, P60
山本 雅之 P55

よ

横川 真梨子 L2-7, P42Y
横溝 智貴 P15, L4-1
横山 和哉 L1-2, P90Y
横山 大稀 P58, P59
吉川 一步 P52Y
吉田 清美 P50Y
吉水 広明 P41
吉村 弘伸 P40Y

わ

若松 馨 HL-2, P1, P32Y
若本 拓朗 P60
若山 正隆 P12
和田 昌久 L1-4
渡邊 一也 L2-4
渡邊 颯 L2-4
渡邊 英宏 P13
渡邊 吏輝 P63

Alphabetical Order			
	A	Fujimura Haruka	P44Y
		Fujimura Rei	P25
Aida Takuzo	P32Y	Fujinami Daisuke	L2-5, P64Y
Aizawa Tomoyasu	L5-1, L5-6, P24Y, P28Y, P33, P34Y, P52Y	Fujito Teruaki	P78Y
Akabane Tatsuki	P23	Fujiwara Kazuo	P50Y
Akagi Ken-ichi	L4-2	Fujiwara Ryouhei	P78Y
Akasaka Kazuyuki	P51	Fujiwara Toshimichi	L1-5, L4-2, P10Y, P14Y, P32Y, P35, P45, P61, P77, P92Y
Amemori Syogo	P19, P53		
Amoureux, Jean-Paul	L1-6	Fukazawa Jun	P70Y
Ando Hideka	P76Y	Furuita Kyoko	L4-2, P14Y, P32Y, P61
Ando Takami	P67, P68Y		G
Aono Keita	P62Y	Gan, Li	P24Y, L5-1, L5-6, P28Y, P33, P34Y
Aoyama Hiroshi	L2-1, P6Y, P72		
Arita Kyohei	P73	Gotoh Kazuma	P76Y, P78Y
Asakawa Naoki	P4Y		H
Asakura Katsuo	P40Y	Hamaguchi Isao	P1
Asakura Yoshimitsu	P65	Hanaoka Ami	P52Y
Asano Atsushi	P38Y	Hasegawa Takuya	P6Y
Asao Nobuaki	P66Y	Hashi Kenjiro	P78Y
Ayabe Tokiyoshi	P24Y	Hata Yuki	P20Y
	B	Hattori Yoshikazu	L4-2
Bao Xinnu	P17	Hayashi Fumio	P87
Binder, Wolfgang H.	IL-1	Hayashi Seiichiro	P64Y, L2-5
Böhme, Frank	IL-1	Hayashi Yoshihiro	P37
Bryce, David L.	IL-2	Hibe Yuta	P71
	C	Higashi Takanori	P88Y
Chiba Yuya	P37	Hirao Yuuka	P79
Colby, Ralph H.	IL-1	Hironishi Reika	P18Y
Coppel, Yannick	L1-6	Hirose Yuu	L2-1, P72
	D	Hirotsu Naoki	P23
Döhler, Diana	IL-1	Hishikura Naoki	P63
Dokainish, Hisham	P68Y	Homma Michio	L2-3
Dwivedi-Agnihotri, Hemlata	L3-2	Hoshino Shin-ichi	L2-7
	E	Hosoda Kazuo	P87
Enokizono Yoshiaki	L4-2	Hosoda Nao	L2-7
	F	Hosoe Nanaka	P53
Fujikawa Kohki	L1-3	Hu, Zhiyan	P24Y, L5-1, L5-6, P28Y,

	P34Y	Kainosho Masatsune	P67, P68Y
I		Kaji Hironori	L5-4, P62Y, P76Y
Ichijo Rika	P2Y	Kambe Takashi	P76Y
Ida Tomonori	P19, P53	Kamei Shun	P74Y
Igarashi Shunsuke	P15	Kamide Tomoya	P21
Iizuka Tomona	P52Y	Kamihara Takayuki	P29, P47
Iizuka Yusuke	L2-1, P72	Kamimura Takashi	P2Y
Ikegami Takahisa	P73	Kamino Satoshi	L2-1
Ikeguchi Masamichi	P50Y	Kamoshida Hajime	P49
Ikeya Teppei	L5-7, P49, P55, P63, P67, P68Y, P74Y	Kanaori Kenji	P39, P51
Imai Shunsuke	L2-7, L2-8, L4-1, P15, P66Y	Kandori Hideki	P84Y
Inamura Yuga	P33	Kanehashi Koji	P20Y
Inomata Kousuke	P49, P55, P63, P67, P68Y, P74Y, L4-2	Kaneko Shun	P66Y
Inukai Munehiro	L5-2, P80Y, P82Y	kaneko sohei	P82Y
Ishida Yasuhiro	P32Y	Kasai Takuma	L5-5, L5-7
Ishihara Soma	P52Y	Kasuya Naohiro	P51
Ishii Sakurako	P71	Katahira Masato	L2-2, P48Y
Ishii Yoshitaka	L3-6, P29, P47, P57, P89, P93	Katayama Kota	P84Y
Ishii Yuichiro	L2-7	Kato Ken	P35, P77
Ishizuki Kyoko	P40Y	Kato Etsuko	P23
Isiguro Takaya	P47	Kawabata Natsuki	P4Y
Itasaka Yuma	P32Y	Kawabata Youhei	P68Y
Ito Nobuyasu	P17	Kawai Gota	P2Y, P3, P56Y
Ito Yutaka	L2-1, P49, P55, P63, P67, P68Y, P74Y	Kawamura Izuru	P31, P84Y, P86Y
Itoh-Watanabe Hikari	P31	Kawatsu Kosaku	P42Y
Iwai Kazuhiro	P30	Kay, Julie D.	L3-1
		Kay, Lewis E.	L3-1
		Kee, Li Bing	P29
		Kigawa Takanori	L5-5, L5-7
		Kikuchi Jun	P25, P36Y, P43, P58, P59, P69
J		Kikuchi Sho	L1-2, P90Y
Jiang, Jiayi	P24Y, L5-1, L5-6, P28Y, P34Y	Kimura Tomomi	P42Y
		Kitagawa Masahiro	P70Y
K		Kitahara Ryo	L4-3, P60
Kadoma Hiroshi	L1-4	Kitamaki Yuko	P17
Kagawa Akinori	P70Y, P80Y	Kitayama Syoya	P58
Kahn, Myrtil L.	L1-6	Kitazawa Soichiro	L4-3, P60

Kobayashi Fumiya	P81	Matsumoto Tomoko	P43
Kobayashi Naohiro	L3-6, P61, P73	Matsunaga Itta	P69
Kodama S Takashi	L4-2	Matsunaga Tatsuya	L3-6, P29, P89
Kofuku Yutaka	L2-8, L3-2, L4-1, P15, P66Y	Mikage Shohei	P38Y
Kohda Daisuke	L2-5, P64Y	Mikawa Tsutomu	P49, P67, P68Y, P74Y
Kohn, Benjamin	L2-6	Mineshige Atsushi	L5-3
Kohno Toshiyuki	P1	Mio Kazuhiro	P75
Koide Reina	P60	Mishima Masaki	L2-1, P6Y, P63, P67, P68Y, P72
Kojima Chojiro	L4-2, P14Y, P32Y, P61	Miyanishi Koichiro	P80Y
Kojima Keiichi	P18Y	Miyanoiri Yohei	L2-1, L2-3, L4-3, P68Y
Kojima Seiji	L2-3	Miyata Hiroki	P74Y
Kokago Aoi	P32Y	Mizukoshi Toshimi	P15
Kon Yoshihiro	L1-6	Mizumura Takuya	L2-8
Kondo Keiko	L2-2	Mizuno Motohiro	L5-2, P19, P53, P81, P82Y, P85
Konuma Tsuyoshi	P73	Mochizuki Yuki	P70Y
Koteishi Hiroyasu	P63	Mohanty, Biswaranjan	L4-3
Kumada Shungo	P37	Monden Noriko	L4-2
Kumagai Sari	P84Y	Monobe Yoko	L4-2
Kumaki Yasuhiro	L5-1, L5-6, P24Y, P28Y, P33, P34Y, P52Y	Mordvinkin, Anton	IL-1
Kumeta Hiroyuki	P24Y, L5-6, P28Y, P34Y, P52Y	Mori Shoko	L1-3
Kurihara Takuya	L5-2, P19, P53, P81, P82Y	Morimoto Daichi	AL-2, L2-6, P30, P54Y, P83
Kurita Junichi	P79	Morinaga Takashi	P88Y
Kurita Masatoshi	L2-8	Morooka Hitoshi	P27
Kusumi Ryosuke	L1-4	Murakami Masato	P90Y, L1-2
Kusunoki Hideki	P1	Murakami Miwa	L5-3
Kuwahara Daisuke	P65		N
Kuwayama Tomoya	P42Y	Nagae Takayuki	L2-1, P6Y, P72
	L	Nagahama Tomomi	P46Y
Lafon, Olivier	L1-6	Nagashima Hiroki	L1-6
	M	Nagashima Toshio	P18Y, P84Y
Maruhashi Aimi	P59	Nagata Takashi	L2-2, P1, P48Y,
Masubuchi Yuji	P71	Nagatoishi Satoru	P23
Matsuda Isamu	L3-6, P29, P47, P57	Naito Akira	P31
Matsuki Yoh	L1-5, P10Y, P35, P45, P77	Nakagawa Naoya	P65
Matsukuma Shinya	P40Y	Nakajima Hiroki	P6Y

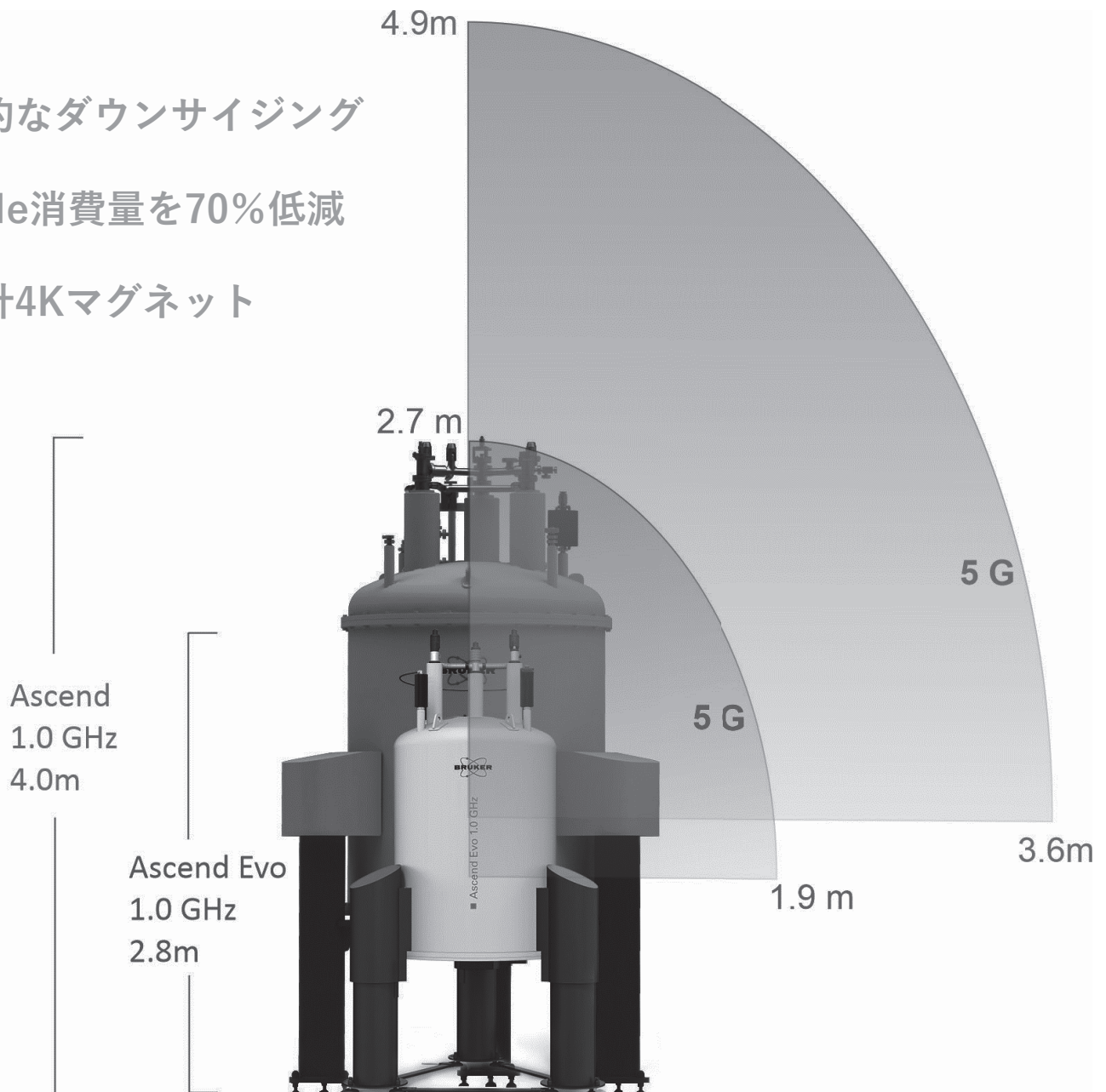
Nakajima Yurie	P52Y	Omar, Eladl	L2-2
Nakamura Kiminori	P24Y	Onuki Yoshinori	P37
Nakamura Koichi	P80Y, P82Y	Osada Seiji	P24Y, L5-6, P28Y, P34Y
Nakamura Misaki	L4-2	Osawa Masanori	L2-7, P42Y
Nakamura Risa	P42Y	Osawa Tsukiho	L1-3
Nakamura Satoe	P17	Otsuka Yusuke	P27
Nakamura Takashi	L1-2, P90Y	Oyadomari Ryo	P47
Nakashima Yoshito	P5		P
Nakatani Kazuhiko	P14Y	Pandey, Shubhi	L3-2
Nakatsuka Shoichi	P42Y	Patchiya, Phanthong	P16
Nakazawa Chikako	P38Y		R
Namiki Tomoya	P81	Rangadurai, Atul Kaushik	L3-1
Namsrai, Javkhlantugs	P31	Ren, Weitong	P68Y
Negoro Makoto	P70Y, P80Y	Rioual, Elisa	L5-7
Nishikino Tatsuro	L2-3		S
Nishimura Yoshifumi	P79	Saalwächter, Kay	IL-1
Nishina Yuta	P76Y	Sagae Takeru	L2-7
Nishiyama Ken-ichi	L1-3	Saito Akira	P81
Nishiyama Yusuke	L3-4, P26Y, P80Y	Saito Jun	P42Y
Nishizaki Yuzo	P40Y	Saito Koji	P20Y
Nishizawa Mayu	L2-6	Saito Naoki	P9, P13
Noda Yasuto	P71	Sakai Naomichi	L1-2, P90Y
Nomrua Kaoru	L1-3	Sakakura Masayoshi	P75
Norinaga Koyo	P20Y	Sakamoto Taiichi	P1, P6Y, P46Y
	O	Sakamoto Tomoki	L2-2, P48Y
Obana Shunichi	P81	Sakata Kenji	P59, P69
Ogaeri Yutaro	P26Y	Sakurabayashi Shuhei	P14Y
Ogura Tatsuki	P12	Sasahara Hisamu	P62Y
Ohnishi Yuki	P24Y, L5-1, L5-6, P28Y, P33, P34Y	Sasakawa Hiroaki	P44Y
Oide Mao	P68Y	Sato Haruki	P80Y
Oka Tetsuo	L1-2, P90Y	Sato Riho	P43
Okada Kotaro	P37	Satoh Ryo	P88Y
Okamura Hideyasu	P86Y, P88Y	Satoh Takehiro	P88Y
Okamura Satoru	P62Y	Sawada Haruka	P11
OKAMURA Tetsuji	L1-2, P7, P22Y, P90Y	Sawai Hitomi	P63
Okubo Rika	P63	Sawazaki Ryoichi	L2-7
Okushita Keiko	P20Y	Saya Hideyuki	P42Y
		Scanlon, Martin	L4-3

Scheler, Ulrich	L2-6	Suzuki Takumi	P6Y
Senda Toshiya	P42Y	Suzuki Yu	P86Y, P88Y
Shigemitsu Yoshiki	P29, P57, L3-6	Suzuki Yuto	P86Y
Shigeta Yasuhiro	P19, P53, P85		T
Shikata Ayumi	P78Y	Tabata Maako	P67, P68Y
Shima Kaito	P55	Tadokoro Makoto	P81
Shimada Ichio	L2-7, L2-8, L3-2, L3-3, L4-1, P15, P66Y	Tagami Osamu	P78Y
Shimamoto Keiko	L1-3	Tagishi Ryouma	P49
Shimizu Yoshitaka	P17	Takahashi Hideo	P18Y
Shinagawa Hideyuki	P78Y	Takahashi Masakuni	P78Y
Shinki Souta	P71	TAKAHASHI Masato	P7, P22Y, P90Y, L1-2
Shiraishi Yutaro	L2-8, L3-2, L4-1, P15	Takahashi Sayaka	P87
Shirakawa Masahiro	L2-6, L4-2, P30, P83	Takahashi Seizo	P3
Shiro Yoshitsugu	P63	Takahashi Takafumi	P20Y, P27
Shukla, Arun K.	L3-2	Takamatsu Kyosuke	L2-4
Someya Tatsuhiko	P46Y	Takaya Nobuhiro	P13
Song Zihao	L5-1, L5-6, P24Y, P28Y, P33, P34Y	Takeda Kazuyuki	L1-1, L1-4, P8Y, P11, P21, P94Y
Sorada Tomoki	P54Y	Takegoshi Kiyonori	HL-1, P71
Souri Yue	P19	Takeuchi Koh	L2-8, L3-3
Suckow, Marcus	IL-1	Tamaki Hajime	P35, P45, P77, P92Y
Sudo Yuki	P18Y	Tanabe Mikio	P42Y, P75
Suehiro Shiori	P55	Tanaka Kayoko	P74Y
Suematsu Takako	P40Y	Tanaka Shinji	P16
Sugasawa Haruka	P67, P68Y, P74Y	Tateno Keita	P67, P68Y
Sugase Kenji	L2-6, P30, P54Y, P83	Tehrani, Mohammad Jafar	L3-6
Sugiki Toshihiko	L4-2, P32Y	Terami Hibiki	P57, L3-6
Sugimoto Naoki	P40Y	Teramura Takuo	P39
Sugishita Tomoaki	P35, P77	Teranishi Takashi	P78Y
Sugita Tomoko	P16	Terao Takeshi	P91
Sugita Yuji	P67, P68Y	Terauchi Tsutomu	P68Y
Suzuki Ei-ichiro	P15	Terayama Kei	P59
Suzuki Furitsu	P62Y	Tjandra, Nico	IL-3
Suzuki Katsuaki	L5-4, P62Y, P76Y	Tochio Hidehito	L4-2
Suzuki Rika	P18Y	Togashi Naoyuki	P74Y
Suzuki Shibuki	P84Y	Togawa Wataru	P61
Suzuki Takafumi	P55	Tokuda Norihiro	L2-4
		Tomemori Megumi	P56Y

Tominaga Yusuke	L1-1	Yamaguchi Hideyuki	P15
Toyama Yuki	L3-1	Yamaguchi Makoto	P91
Toyoda Mei	P55	Yamamoto Junya	L4-3, P60
Toyoda Shuhei	P31	YAMAMOTO Kouki	P7, P22Y
Trebosc, Julien	L1-6	Yamamoto Kyoka	P51
Tritrakarn, Techit	P7, P22Y, L1-2, P90Y	Yamamoto Masayuki	P55
Tsuboi Yuuri	P36Y, P58	Yamaoki Yudai	L2-2, P48Y
Tsuchida Tomoki	L2-8	Yamauchi Kazuo	L5-1, L5-6, P24Y, P28Y, P34Y
Tsumoto Kouhei	P23		
	U	Yamazaki Taichi	P17
Uchida Noriyuki	P32Y	Yamazaki Toshio	P18Y, P73, P84Y
Ueda Kazuyoshi	P31	Yanagida Yuki	P50Y
Ueda Takumi	L3-2, AL-1, L2-8, L4-1, P66Y	Yanagisawa Kota	P6Y
Ute Koichi	L2-4	Yao Shigeru	P16
Utsumi Hiroaki	P44Y	Yasui Hayate	L1-4
	W	Yokogawa Mariko	L2-7, P42Y
Wada Masahisa	L1-4	Yokomizo Tomoki	P15, L4-1
Wakamatsu Kaori	HL-2, P1, P32Y	Yokoyama Daiki	P58, P59
Wakamoto Takuro	P60	Yokoyama Kazuya	L1-2, P90Y
Wakayama Masataka	P12	Yoshida Kiyomi	P50Y
Walinda, Erik	P30, P54Y, P83, L2-6	Yoshikawa Ichiho	P52Y
Wang, Yu	P8Y	Yoshimizu Hiroaki	P41
Watanabe Hidehiro	P13	Yoshimura Hironobu	P40Y
Watanabe Kazuya	L2-4		Z
Watanabe Riki	P63	Zhang, Xin	P92Y
Watanabe Soh	L2-4	Zhang, Zhongliang	P10Y
Weiming, Jiang	P94Y	Zheng, Jingkang	P52Y
Wickramasinghe, Ayesha	P93, L3-6		
	X		
Xiao, Yiling	P93		
Xue, Xianyu	L3-5		
	Y		
Yabu Yoshihiro	P49		
Yagi Hiromasa	L5-7		
Yagi Tatsunori	P69		
Yamada Shunji	P25, P36Y, P43		
Yamada Takeshi	P14Y		

Ascend Evo 1 GHz Magnet

- 驚異的なダウンサイジング
- 液体He消費量を70%低減
- 新設計4Kマグネット



To learn more about our products
visit our website or e-mail us at:
info.bbio.jp@bruker.com

合成確認、構造解析

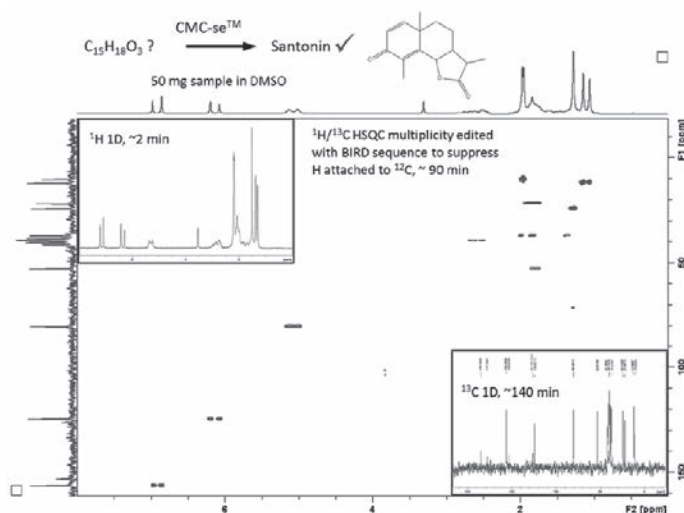


核磁気共鳴分光法 (NMR)

品質管理のための合成確認から、研究目的の反応生成物の構造解析まで、この1台で結果に自信が持てます。

➤ 設置が簡単

- ・ 冷媒不要の永久磁石
- ・ 安定なシムシステム



➤ 測定が簡単

- ・ どなたでもすぐに使えるGoScanソフトウェア
- ・ 長年の実績と信頼のTopSpinソフトウェア
- ・ Mnovaとの連携

化学式とスペクトルを用いた
構造式の計算

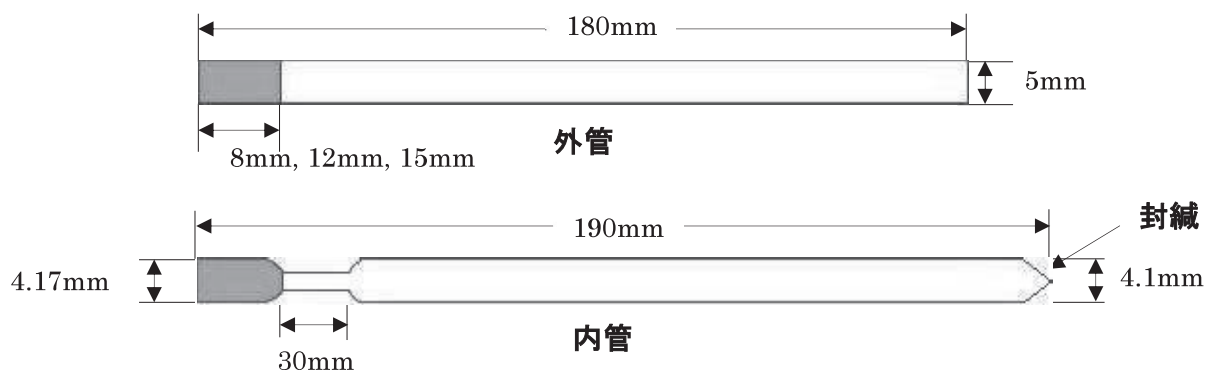
➤ 簡単なのに、さらに・・・

- ・ 二次元スペクトル測定まで可能
- ・ 機械学習の位相補正とベースライン補正
- ・ 25~60°Cの範囲で温度設定可能
- ・ 反応追跡のフロー測定に対応



卓上型Fourier 80 FT-NMRと
PALオートサンプルチェンジャー

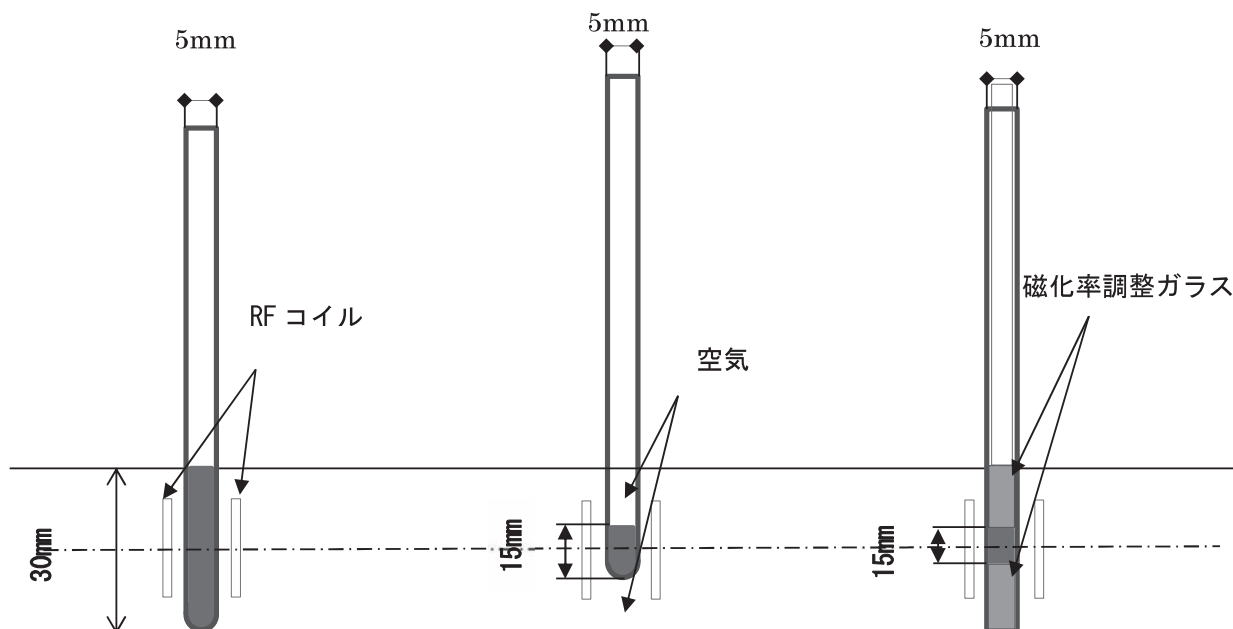
Aceton-d₆ 用対称形マイクロサンプルチューブ



5mm サンプルチューブ

5mm サンプルチューブ

対称形マイ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対称マイ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: info@shigemi.co.jp

先端的なNMR設備と関連技術を提供

『NMRプラットフォーム』は我が国の研究開発基盤の持続的な維持・発展に貢献することを目指し、国内有数の先端的なNMR研究施設・設備を有する8機関でネットワークを構築しています。

4つのNMR関連企業にも協力いただき、先端的なNMR設備と関連技術を幅広い分野の産学官研究者に対して提供しています。



NMRプラットフォームシンポジウム 2022

日時 : 11月28日(月) 13:00~17:00

場所 : AP虎ノ門(東京都港区)

オンライン同時配信

詳細はこちら



<https://nmrpf.jp/>

高性能卓上型NMR

Spinsolve

その性能は、
「卓上型」の概念を変える。



Nakayama
Dedicated Sales Division
Global Business Unit

Spinsolve 60



シリーズ史上最高の
感度と多様性



Spinsolve 90

シリーズ最高スペック90MHzのNMR

Spinsolve Multi-X

再チューニング不要で4核種測定可能

※こちらの製品は巻末の製品ガイドページにも掲載されています。

先進的な卓上型 NMR
「Spinsolve」

- ・永久磁石を用いた卓上型NMR分光計
- ・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
- ・充実のラインナップ: 60, 80, 90MHz, Ultra

- ・測定核種: 1H, 19F, 13C, 31P, その他
- ・リアクションモニタリング可能
- ・2Dが測定可能
- ・自動シム調整可能

S 中山商事株式会社

海外事業部 海外事業課

〒103-0023 東京都中央区日本橋本町2-8-8
宇津共栄ビル3F
TEL: 03-3527-2745

<https://dsd.nakayama-co.jp>

Webサイトは
こちら



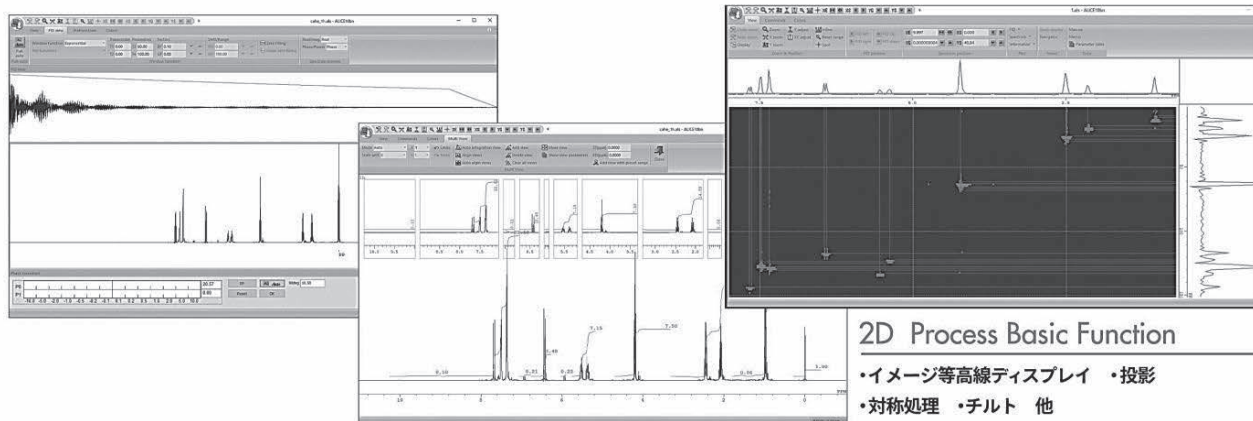
Nakayama

NMR分析のオンリーワン・ソフト

ALICE10bn

Windows10、11 対応版

- 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、11 (32/64bit) 完全対応版



1D Process Basic Function

- ・マルチビュー ・マルチスペクトル
- ・緩和時間計算 ・Jcouple機能 他

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

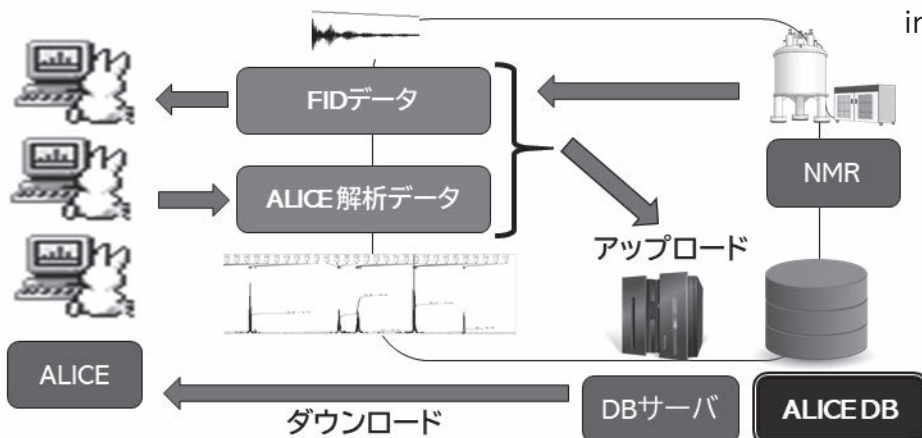
NMR アプリケーション・ソフト ALICE シリーズ専用データ・ベース

AliceDB

NEW!

- FID データと ALICE データをブラウザ上で一括管理
- グループ内共有化を ALICE データベースで実現

お問い合わせをお待ちしております
info@bio-net.co.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。

無細胞タンパク質受託合成

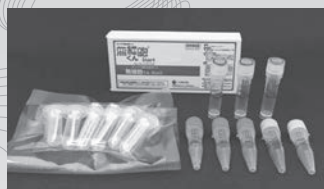
細胞内タンパク質、分泌系タンパク質、膜タンパク質合成を承ります。
弊社HPの専用フォームより簡単にご依頼いただけます。

- 鋳型DNA設計・作製
- 条件検討試験
- 発現・可溶性確認試験
- 大スケール合成



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したしました。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(0.1 mL)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	[δ-2- 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

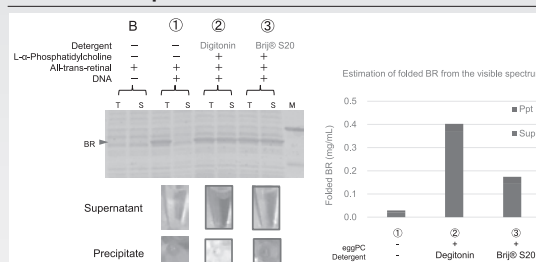
20種類のアミノ酸を含有しております。

■ 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

- 10%, 20% Phosphoramidites (¹³C, ¹⁵N, d)
- NTPs / NMPs (¹³C, ¹⁵N, d) ● RNA-DNAオリゴマ合成

培地

- D-Glucose (¹³C, d) ● Salts (¹⁵N, d)
- Deuterium Oxide 99.9atom%

アミノ酸・ケト酸

- L-Amino Acids (¹³C, ¹⁵N, d) ● Algal Amino Acids (¹³C, ¹⁵N, d)
- α-Keto Acids (¹³C, d)

その他

- Deuterated NDSB ● Lanthanide Tag
- Water-¹⁷O (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 イノベーションユニット SI事業部

〒108-0014 東京都港区芝 5-30-9 藤ビル
TEL.03-5439-5897 Fax.03-5439-5883

● 資料のご請求は、大陽日酸までお気軽にご用命ください。
メールアドレス Isotope.TNS@tn-sanso.co.jp
ホームページアドレス https://stableisotope.tn-sanso.co.jp



大陽日酸
The Gas Professionals

ISOTEC™



謝辞

2022 年度日本核磁気共鳴学会進歩賞をご支援賜るとともに、副賞を授与して下さったブルカージャパン株式会社と日本電子株式会社にご心より御礼申し上げます。

若手による優秀なポスター発表に対し、「大陽日酸・昭光サイエンス賞」、「昭光サイエンス賞」及び「大陽日酸賞」を設けてご支援賜りました大陽日酸株式会社と昭光サイエンス株式会社にご心より御礼申し上げます。

(無断で複製・転載を禁じます)

Copyright© 2022 The Nuclear Magnetic Resonance Society of Japan

2022年10月26日発行

Published on 26th November 2022

第 61 回 NMR 討論会 (2022)

The 61st Annual Meeting of the Nuclear Magnetic Resonance Society of Japan (2022)

会 期：2022年11月8日(火)～10日(木)

November 8 – 10, 2022

会 場：高知県立県民文化ホール

Kochi Prefectural Culture Hall

〒780-0870 高知県高知市本町4丁目3-30

編集・発行：第61回NMR討論会事務局

〒783-8505 高知県南国市岡豊町小蓮医学部総合研究棟III409号室

高知大学教育研究部総合科学系複合領域科学部門 山田研究室内

TEL：088-888-2009