

ポスター発表要旨

Poster Abstracts

昆虫由来成長阻害因子GBPの寄生によるC末端残基伸長部分が活性と生体膜相互作用に与える影響

○梅津喜崇¹, 相沢智康^{1, 2}, 武藤香織³, 山本宏子¹, 神谷昌克^{1, 2}, 熊木康裕^{1, 2}, 水口峰之³, 出村誠^{1, 2}, 早川洋一⁴, 河野敬一^{1, 2}

(¹北大院・理, ²北大院・生命, ³富山大・薬, ⁴佐賀大・農)

The C-terminal Elongation of Growth-Blocking Peptide (GBP) Enhances Its Biological Activity and Micelle Binding Affinity

○Yoshitaka Umetsu¹, Tomoyasu Aizawa^{1, 2}, Kaori Muto³, Hiroko Yamamoto¹, Masakatsu Kamiya^{1, 2}, Yasuhiro Kumaki^{1, 2}, Mineyuki Mizuguchi³, Makoto Demura^{1, 2}, Yoichi Hayakawa⁴, and Keiichi Kawano^{1, 2}

¹Graduate School of Science, Hokkaido University, Sapporo Japan.

²Graduate School of Life Science, Hokkaido University, Sapporo Japan.

³Graduate School of Medicine and Pharmaceutical Sciences, Toyama University, Toyama Japan

⁴Department of Applied Biological Sciences, Saga University, Saga Japan

Growth-blocking peptide (GBP) is a hormone-like peptide that suppresses the growth of the host armyworm. While 23 amino acid GBP (1-23 GBP) is expressed in nonparasitized armyworm plasma, the parasitization by wasp produces 28 amino acid GBP (1-28 GBP) through an elongation of the C-terminal amino acid sequence. In this study, we characterized the GBP variants, which consist of various lengths of the C-terminal region, by comparing their biological activities and three-dimensional structures. The results of an injection study indicate that 1-28 GBP most strongly suppresses larval growth. NMR analysis shows that the C-terminal region of 1-28 GBP undergoes a conformational transition from a random-coiled state to an α -helical state in the presence of dodecylphosphocholine (DPC) micelles. This suggests that binding of the C-terminal region would affect larval growth activity.

【緒言】

Growth-blocking peptide (GBP) は、カリヤコマユバチ *Cotesia kariyai* に寄生されたアワヨトウ *Pseudaletia separata* の幼虫から、幼虫の成長や蛹化変態を阻害する因子として発見された25残基からなるペプチドである。また、多種類の昆虫からGBPと相同性の極めて高いペプチドが発見され、その活性が幼虫に対する麻痺、心臓拍動の制御、異物を排除する血球細胞の活性化など多岐にわたることから、GBPファミリーは多機能のサイトカインであることが明らかになっている。その後の研究で、GBPはアワヨトウの遺伝子由来産物であり、未寄生の幼虫では全長23残基からなる1-23GBPが発現していること、寄生を受けた場合は感染するポリドナウイルスの影響

Growth-blocking peptide, Dodecylphosphocholine, Cytokine

○うめつよしとか、あいざわともやす、むとうかおり、やまもとひろこ、かみやまさかつ、くまきやすひろ、みずぐちみねゆき、でむらまこと、はやかわよういち、かわのけいいち

で、終止コドンがチロシンに翻訳されて28残基からなる1-28GBPとして合成されること、28残基として発現されたこのペプチドが血清中のプロテアーゼなどによって25残基(1-25GBP)まで分解を受けることが示唆されている。興味深いことに、1-28GBPは1-23、1-25GBPと比較して強い成長阻害活性を持つことが明らかになっている。しかし一方では、レセプターが完全には同定されておらず、1-28GBPが強い活性を有するメカニズムについてはわかっていない。そこで本研究では、1-28GBPがなぜ強い活性を有するのかについての分子レベルでの知見を得るために、主にNMR法による立体構造の解析から比較を行った。

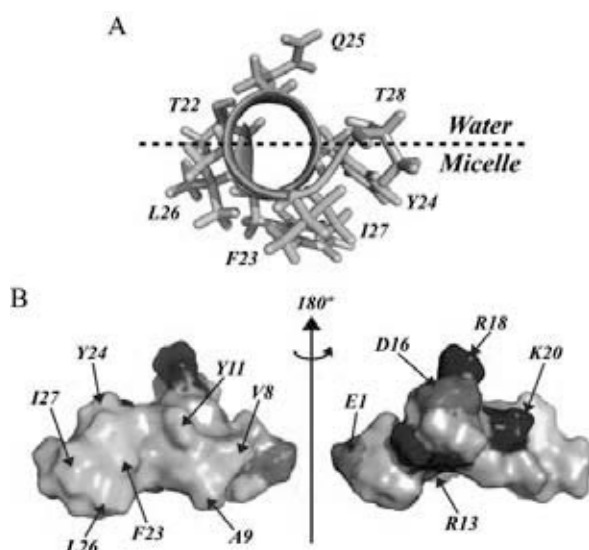
【実験】

大腸菌を用いてノンラベル、 ^{15}N ラベルGBPを発現・精製し、実験に使用した。Bruker DRX 500MHz, JEOL ECA 600MHzのNMR装置を用いて測定を行い、水溶液中、及びDPCミセル中における立体構造解析などを行った。

【結果と考察】

1-23、1-28GBPの立体構造解析を行った結果、N末端部分や活性に重要な β シート領域の構造に明確な違いはなく、活性の違いはフレキシブルなC末端部分が影響していることが示唆された。また、1-28GBPは生体膜と結合することが示唆されたため、生体膜モデルとして使用されるDPCミセル中での立体構造解析を行った。その結果、N末端、 β シート領域の化学シフトにほとんど変化がなくこの領域の生体膜との相互作用への寄与は低いと考えられた。一方、C末端部分はDPCミセルの影響で大きく変化し、立体構造解析から、1-28GBPでは両親媒性ヘリックスを形成することが明らかになった。さらに、緩和測定やスピンラベル実験などから、1-28GBPは主にこのC末端ヘリックスの疎水面において生体膜と相互作用をしていることが示唆された。これらの結果から、1-28GBPは生体膜との相互作用によりプロテアーゼなどによる分解の影響を受けにくくなること。さらに、生体膜表面にある受容体近傍でのGBP濃度が上昇するため、1-23GBPと比較して活性が強くなるメカニズムが推定された。

FIGURE. Interface between 1-28 GBP and DPC micelles. *A*, helical region (Thr22-Thr28) is viewed along the helical axis. *B*, view of the surface model of membrane-bound 1-28 GBP. The side-chains of residues Val8, Ala9, Tyr11, Phe23, Tyr24, Leu26, and Ile27 form a hydrophobic patch.



アメロジェニンの動的性質

○¹熊木康裕、²相沢智康、²神谷昌克、²出村誠、^{1,2}河野敬一
(¹北海道大学大学院理学研究院、²北海道大学大学院先端生命科
研究院、³富山大学大学院医学薬学研究部)

Dynamical property of amelogenin

Yasuhiro Kumaki¹, Tomoyasu Aizawa², Masakatsu Kamiya², Makoto Demura² and Keiichi Kawano^{1,2}

(¹Graduate School of Science, Hokkaido University, ²Graduate School of Life Science, Hokkaido University)

Amelogenin is a major component of enamel matrix proteins. The self-assembly of the amelogenin is believed to play an essential role in regulating the growth and organization of enamel crystals during enamel formation. Recently, it was reported that the self-assembly of the amelogenin is sensitive to the temperature and pH. The elucidation of the amelogenin assembly process is indispensable for the understanding of the mechanisms of enamel formation. The purpose of the present study is to obtain the insight into the self-assembly process of the amelogenin in the atomic level. As a first step, we have completed NMR assignments of the ¹³C/¹⁵N-labeled recombinant porcine amelogenin under the condition where amelogenin is monomeric. In addition, the dynamic property such as the relaxation are being examined in several temperatures and pH's.

アメロジェニンはエナメルマトリクス蛋白質の主要な成分である。このアメロジェニンの自己凝集は、エナメル組織の形成において重要な役割を果たしていることが知られている。近年、このアメロジェニンの自己凝集は温度及び pH に依存することが報告されている^{[1],[2]}。この自己凝集プロセスの解明はエナメル組織の形成メカニズムの理解に不可欠である。

本研究の目的は、NMR によってアメロジェニン分子の自己凝集過程に関する原子レベルでの知見を得ることである。その第一段階として、¹³C 及び ¹⁵N で標識された豚由来のアメロジェニン蛋白質について、各種三重共鳴測定を行い NMR 信号の帰属を完了した。NMR の測定はアメロジェニン分子が単量体で存在すると考えられ、また比較的分離の良い ¹H-¹⁵N HSQC スペクトルが得られる (Fig.1) 低温 (283 K)、及び低 pH (3.0) の条件で行った。以前からアメロジェニン単量体の構造は温度、pH、塩濃度に極めて敏感であると考えられており^[4]、また最近の報告でアメロジェニンは単量体では伸びきった構造をとっていることが示唆されている^[3]。そこで我々は現在緩和測定、重水素交換測定などの NMR 実験によって、

キーワード: アメロジェニン、自己凝集

くまきやすひろ、あいざわともやす、かみやまさかつ、でむらまこと、かわのけいいち

アメロジェニン分子の動的な性質に焦点をあて、またpH や温度といった条件が動的性質にどのように影響を与えるかについて調べている。

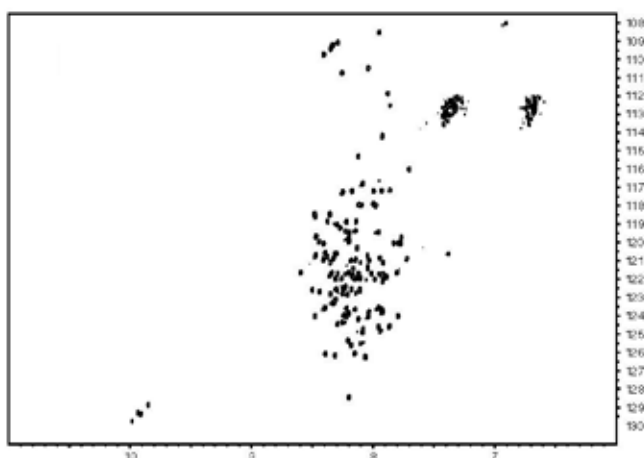


Fig.1 ^1H - ^{15}N HSQC spectra for ^{15}N -labeled recombinant porcine amelogenin at pH 3.0 and 283 K.

<参考文献>

- [1] Moradian-Oldak J, Leung W, Fincham AG. *J. Struct. Biol.* **122**:320-327, 1998.
- [2] Petta V, Moradian-Oldak J, Yannopoulos SN, Bouropoulos N. *Eur. J. Oral Sci.* **114** (Suppl. 1): 308-314, 2006.
- [3] Delak K, Harcup C, Lakshminarayanan R, Sun Z, Fan Y, Moradian-Oldak J, Evans JS. *Biochemistry*, **48**, 2272-2281, 2009.
- [4] Buchko GW, Tarasevich BJ, Bekhazi J, Snead ML, Shaw WJ. *Biochemistry*, **47**, 13215-13222, 2008.

市橋俊¹, 〇神谷昌克², 相沢智康¹, 熊木康裕¹, 菊川峰志¹, 出村誠², 早川洋一³, 河野敬一¹

¹北大院・理

²北大院・生命

³佐賀大・農

Structural and functional analysis of a novel chemokine, HCP from an insect

〇Suguru Ichihashi¹, Masakatsu Kamiya², Tomoyasu Aizawa¹, Yasuhiro Kumaki¹, Takashi Kikukawa¹, Makoto Demura², Yoichi Hayakawa³, and Keiichi Kawano¹

¹Graduate School of Sciences, Hokkaido University, Sapporo, Japan.

²Graduate School of Life Sciences, Hokkaido University, Sapporo, Japan.

³Faculty of Agriculture, Saga University, Saga, Japan.

Insect blood cells (hemocytes) comprise an essential arm of the immune system. Several factors mediating recognition and phagocytosis of foreign intruders by hemocytes have been identified but the mechanisms regulating hemocyte movement remain fragmentary. Embryonic hemocytes from *Drosophila* migrate along stereotypical routes in response to chemotactic signals from PVF ligands: members of the platelet-derived growth factor family. Embryonic and larval hemocytes also accumulate at external wounds, but PVFs are not required for this response suggesting involvement by other, unknown factors. Here we report the identification of hemocyte chemotactic peptide (HCP) from the moth *Pseudaletia separata*, and present evidence that it stimulates aggregation and directed movement of phagocytic hemocytes. Spatio-temporal studies revealed that HCP is expressed in both epidermal cells and hemocytes, while structure-function studies identified post-translational modifications important for activity. HCP also shares similarities with another group of cytokines from moths called ENF-peptides. Taken together, our results identify HCP as a chemotactic cytokine that enhances clotting at wound sites in larvae.

我々は最近、イネの害虫であるアワヨトウの幼虫の外皮から傷口の修復に関与する分子Hemocyte chemotactics peptide (HCP)を単離・同定した (Fig. 1, 2)。HCPは32残基のペプチドであり、その主鎖構造は逆平行βシート構造とターン構造からなることがNMRによる構造解析から明らかになっている (Fig. 3)。HCPは血球細胞の凝集を促す作用を持つがその分子機構は不明である。本研究では種々のHCP変異体を作製し、分子機構の一端を明らかにすることを目的とする。本発表では、変異体の血球細胞を用いたアッセイおよびNMR解析により血球凝集活性に関する構造・活性相関を議論する予定である。

Chemokine, Innate immunity, Peptide

いちはしすぐる, 〇かみやまさかつ, あいざわともやす, くまきやすひろ, きくかわたかし, でむらまこと, はやかわよういち, かわのけいいち

実験

HCPは大腸菌発現系においてHisタグ、enterokinase切断認識サイトを付加したTrx融合コンストラクトを作製した。作製したコンストラクトは大腸菌BL21(DE3)株に形質転換し、IPTGにより組み換え体の発現誘導を行った。菌体破碎後の可溶性画分をNi-NTAカラムによるアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。enterokinaseによる酵素切断によってHisタグ、Trx部分が除去され、逆相HPLCによってHCPを精製した。最終的に凍結乾燥処理によって各種解析用のHCP試料を得た。変異体コンストラクトの作製はStratagene社 QuikChange Site-directed Mutagenesis Kitを用いて行った。

各種NMR測定はクライオプローブ付きBruker DRX500およびJEOL ECA600を用いた。構造計算にはCNS1.2を用いた。

結果と考察

大腸菌発現系によりTrx融合HCPを用いたHCPの大量調製の方法を確立した。¹⁵N、¹³C同位体ラベル化HCP試料に関してもノンラベル試料と同様な発現、精製過程で作製した。

HCPの主鎖構造はN末、C末の両末端付近の比較的フレキシブルな領域と7番目および19番目のシステイン残基の間のリジットなコア構造領域からなっている。コア構造領域は2本のβストランド間の水素結合とジスルフィド結合により安定化されている。同一種由来の非常によく似た構造をもつサイトカインGBPの構造-機能関連の解析からコア構造領域はもちろんのこと両末端も活性維持に重要であることが明らかになっている。また、HCPはコア構造のC末端側の2つのトレオニンにGlcNACが修飾し、活性に非常に重要な役割を担っていることも明らかになっており、本研究ではC末端側をトランケートした変異体を作製した。現在、血球凝集活性の測定とNMRによる構造解析を行っている。

参考文献

Nakatogawa S, Oda Y, Kamiya M, Kamijima T, Aizawa T, Clark KD, Demura M, Kawano K, Strand MR, Hayakawa Y. A novel peptide mediates aggregation and migration of hemocytes from an insect. *Curr Biol.* 2009 **19**:779-85.



Fig. 1. Hemocyte aggregation by HCP

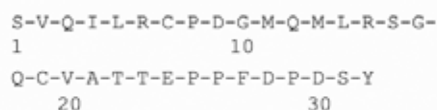


Fig. 2. Primary structure of HCP



Fig. 3. NMR structure of HCP

ビッグディフェンシンのミセル相互作用と抗菌活性発現機構

河野隆英¹, 水口峰之², 相沢智康³, 出村誠³, 川畑俊一郎⁴, ○河野敬一³

¹ミネソタ大, ²富山大・薬, ³北大・理, ⁴九大・理

Big Defensin Changes Its N-Terminal Structure to Associate with the Target Membrane

Takahide Kouno¹, Mineyuki Mizuguchi², Tomoyasu Aizawa³, Makoto Demura³, Shun-ichiro Kawabata⁴, ○Keiichi Kawano³

¹*Dep Biochem Mol Biol & Biophys, Minnesota University, Minneapolis, USA.*

²*Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Toyama, Toyama, Japan.*

³*Division of Biological Sciences, Graduate School of Science, Hokkaido University, Sapporo, Japan.*

⁴*Department of Biology, Kyushu University, Fukuoka, Japan.*

ビッグディフェンシンは 79 残基からなる抗菌ペプチドであり、N 端領域がグラム陽性菌に活性をもち、C 端領域がグラム陰性菌に活性を示す。C 端領域はヒトディフェンシンと同じ立体構造であったが、N 端領域は水溶液中で独自の構造を示した。一方、ミセル中では N 端領域は交換のため NMR 信号が観測できなかった。N 端のペプチドのみをミセル中で NMR 測定したところ、長い α ヘリックスを形成していた。更に常磁性ラベルを用いてミセル中でのヘリックスの配向を検討し、グラム陽性菌に対するビッグディフェンシンの新しい活性発現機構を明らかにした。

We resolved the solution structure of big defensin and demonstrated that the C-terminal domain forms a β -sheet structure with three disulfide bonds just like the β -defensin structure, whereas the N-terminal domain adopts a unique globular conformation consisting of a parallel β -sheet and two α -helices (1). Intriguingly, circular dichroism (CD) and nuclear magnetic resonance (NMR) data indicated that the hydrophobic N-terminal domain undergoes a conformational change in a micellar environment, resulting in a disruption of the parallel β -sheet structure. However, the structure of big defensin bound to micelles remains to be resolved. In this study, we successfully determined the solution structure of the N-terminal fragment of big defensin in sodium dodecyl sulfate (SDS) micelles and observed the association of the fragment peptide with the micelles using paramagnetic probes (2). These results provide a picture of how the N-terminal domain is used by big defensin to recognize the target cell membrane.

antimicrobial peptide, paramagnetic probe, micelle interaction

こうのたかひで, みずぐちみねゆき, あいざわともやす, でむらまこと, かわばたしゅんいちろう, ○かわのけいいち

To identify the interaction of N-terminal fragment of big defensin with SDS micelles, the effect of paramagnetic probes was estimated from two-dimensional TOCSY spectra with and without 16-Dox, Mn^{2+} ion, or Mn^{2+} and EDTA. EDTA chelates Mn^{2+} ion to form a $Mn(EDTA)^{2-}$ complex with a negative charge, thereby preventing electrostatic interactions between Mn^{2+} ions and the sulfate groups of SDS molecules. All residues were significantly affected by the addition of 16-Dox, and the signal intensity was decreased to 30% of the original level even in the cross-peak with the least attenuation. As expected, the pattern of the plot obtained by the addition of Mn^{2+} ion appears to have a complementary relationship to that obtained by the addition of 16-Dox.

In micellar systems, signal attenuation induced by 16-Dox or Mn^{2+} ion indicates that the corresponding amino acid is buried in the interior of the micelle or is exposed to solvent, respectively. In our study, the attenuation profile in the presence of 16-Dox or Mn^{2+} consistently showed that the N-terminal half of the α -helix and residues I3-I5 of big-N peptide contact SDS micelles, while the C-terminal half of the α -helix and residues A7 and T8 are exposed to solvent. Residues V13-V18, in particular, exhibited strong exclusion from Mn^{2+} ions, implying that this region is completely buried in the interior of the micelle and interacts with its hydrophobic core. Residues I3-I5 also exhibited a preference for micellar environments rather than the solvent. However, the signal attenuations of residues I3-I5 upon addition of Mn^{2+} ion were significantly smaller than those of residues V13-V18, and the cross-peaks derived from residues I3-I5 were hardly detected in the presence of Mn^{2+} ions alone. Thus, residues I3-I5 are most likely located in the micellar interface in which the sulfate groups of SDS molecules are most frequently found. Considering that the side chains of residues I3-I5 are arranged as a flat surface, it is likely that they face the hydrophobic core, whereas the backbone is located in the interface region. L20, and V21 are located on one face of the α -helix to form a surface favorable for making contacts with the hydrophobic core of the membrane. Taken together, the N-terminal half of the α -helix dips in the membrane interior through membrane preferring residues, whereas the C-terminal half is exposed to solvent (Figure 1).

- (1) Kouno, T., et al., Biochemistry 47, 10611-10619 (2008)
- (2) Kouno, T., et al., Biochemistry 48, 7629-7635 (2009)

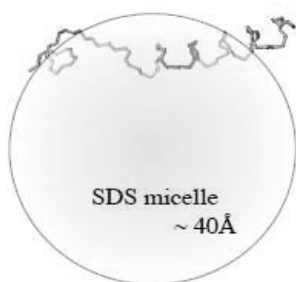


Figure 1 A model of the peptide penetrating into SDS micelle.

分子間SS結合を用いたTom20-プレ配列ペプチド複合体の安定化とその運動性

○泉桂星^{1,2}, 齊藤貴士², 神田大輔²

¹熊大・薬学部

²九大・生医研

Stabilization of Tom20-presequence peptide complexes by intermolecular disulfide bond, and investigation of their molecular motions

○Keisei Izumi^{1,2}, Takashi Saitoh², and Daisuke Kohda²

¹Faculty of pharmacy, Kumamoto University

²Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University

Most mitochondrial proteins are synthesized in the cytosol as precursor proteins with a cleavable N-terminal presequences, and are imported into mitochondria. One of the subunits, Tom20, functions as a general protein import receptor by recognizing the presequences of proteins. It is difficult to obtain the structural information using NMR spectroscopy and X-ray crystallography due to the weak affinity of presequence peptides for Tom20.

In the previous study, we used the technique that tethered the ALDH presequence peptide onto Tom20 via an intermolecular disulfide bond by adding the linker region and a cysteine residue at the C-terminus of the peptide. In this study, we designed a peptide containing a homo-cysteine residue, which was linked to a Tom20 mutant by an intermolecular disulfide bond at the most suitable position. The result of ¹⁵N NMR relaxation analysis indicated that this complex was useful for the dynamic analysis of presequences in the bound state.

ミトコンドリアには独自のゲノムDNAが含まれているが、このミトコンドリアゲノムにコードされているタンパク質はごく少数であり、ミトコンドリアを構成するタンパク質の大部分は核のゲノムにコードされている。これらのミトコンドリアタンパク質は細胞質にあるリボソームでプレ配列が付加された前駆体蛋白質として合成された後、ミトコンドリアの外膜及び内膜に存在する膜透過装置

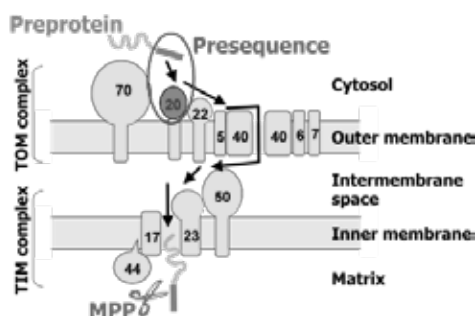


Fig. 1 Diagram of mitochondrial protein transport

キーワード：タンパク質-ペプチド相互作用、ジスルフィド結合、緩和時間解析
○いずみ けいせい、さいとう たかし、こうだ だいすけ

(タンパク質からなる超分子複合体でそれぞれTom及びTim複合体と呼ばれる)によってミトコンドリア・マトリクスへと輸送される (Fig.1)。このうちプレ配列を最初に認識する受容体がTom20である。プレ配列は15から70残基程度の長さであるがその種類は多種類存在し、Tom20はプレ配列中の5残基からなるコンセンサス配列 ($\phi\chi\chi\phi\phi$: ϕ は疎水性残基、 χ は任意のアミノ酸残基)を認識する。コンセンサス配列は配列の相同性が低く多種に及ぶため、Tom20は広い選択性を持たなくてはならない。我々はTom20によるプレ配列の認識メカニズム、特に広い選択性について分子構造を基盤とした理解を目指している。しかしTom20とプレ配列の相互作用は比較的弱い (K_d : μM オーダー) ので、そのままでは複合体の詳細な構造情報を得ることが難しい。そこで過去の研究では、ラットALDH由来プレ配列のC末端に最適な長さのリンカーとCys残基を付加したプレ配列ペプチド (GPRLSRLLSXAGC) を用いた。そして、ラットTom20とSS結合を形成させて複合体の安定化を試みた。この手法により、二つの異なる複合体 (XがAとY) を得た。この複合体のX線結晶解析とNMR緩和解析情報から「Tom20は複数の結合様式の間の速い平衡を利用してプレ配列を認識する」という認識モデルを提唱した¹⁾。本研究ではさらに動的平衡運動の支点となっているアミノ酸 (Leu残基) の位置にホモシステイン (Homo-Cys) を導入したプレ配列 (Fig.2) とTom20との分子間SS結合による複合体の安定化を試みた。

プレ配列中のホモシステインとジスルフィド結合を形成させるため、ラットTom20のVal109をシステインに改変した (Tom20 C100S/V109C)。¹⁵N NMR 緩和

Ac-GPRLSRZLSYA-nh2 Z=Homo-Cys

Fig. 2 Design of the presequence peptide to form an intermolecular disulfide bond with Tom20

解析を行い分子の運動性を観測するために、Tom20 C100S/V109Cを¹⁵N標識し、Fig.2のプレ配列と複合体を形成させ、 T_1 、 T_2 、hetNOE測定を行った。複合体形成時の運動性についてModelFree解析した結果、分子間ジスルフィド結合によって解

離が抑制された状態であるにもかかわらずTom20とプレ配列との接触面の一部にミリ秒時間尺度での運動が存在することと示唆された。よって、本研究で作製したTom20-プレ配列複合体は構造を基盤とした新たな解析に利用できると考えられる。

1)Saitoh T, Igura M, Obita T, Ose T, Kojima R, Maenaka K, Endo T, Kohda D
EMBO J **26**,4777-4787(2007)|

細胞内へのグルコース取り込みの調節に関するタンパク質 CIP4 の TC10 および CDC42 結合ドメインの溶液構造解析

(北海道大学大学院薬学研究院)

○小橋川 敬博、久米田 博之、叶 大輔、稲垣 冬彦

The NMR structure of the TC10- and Cdc42-interacting domain of CIP4

○Yoshihiro Kobashigawa, Hiroyuki Kumeta, Daisuke Kanoh, Fuyuhiko Inagaki

(Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido Univ.)

Insulin stimulates glucose transport into striated (skeletal and cardiac) muscle and adipose tissue via the insulin-responsive glucose transporter GLUT4. The vast majority of GLUT4 resides within the cell in the basal state. Activation of insulin receptors by insulin binding triggers the relocation of GLUT4 vesicles to the cell surface to enhance glucose uptake into the cells. CIP4 (Cdc42-interacting protein 4) regulates GLUT4 relocation via association with the activated Rho-family GTPase protein TC10. Here, we will show the solution structure of CIP4₃₃₂₋₄₂₅ and study the mode of interaction of CIP4₃₃₂₋₄₂₅ with both TC10 and Cdc42.

インスリンはグルコース輸送担体 GLUT4 を介して筋肉や脂肪組織へのグルコースの取り込みを誘導するペプチド性ホルモンである⁽¹⁾。GLUT4 は細胞表層と細胞質内の GLUT4 storage compartment を行き来し、Basal 状態では多くが細胞質内に存在する。インスリン刺激により細胞表層に存在する GLUT4 の割合が増え、細胞内へのグルコースの取り込み量が増加する⁽²⁾。CIP4(Cdc42-interacting protein 4)はこの過程の制御に関するタンパク質である⁽³⁾。

CIP4 は N 末端から FCH ドメイン、1st Coiled-Coil ドメイン、2nd Coiled-Coil ドメイン、SH3 ドメインにより構成される(Fig. 1)。2nd Coiled-Coil ドメインは GTPase である TC10⁽⁴⁾および Cdc42 との結合に関与⁽⁵⁾、SH3 ドメインは Rab ファミリー GTPase の GTP/GDP nucleotide Exchange Factor (GEF) である Gapex-5 との結合に関する。Basal 状態では CIP4 は SH3 ドメインを介して Gapex-5 と結合し、細胞質内の Rab31 を活性化することで GLUT4 の細胞質への移行を促す(Fig. 2-a)。インスリン刺激により細胞膜に存在する TC10 が GTP 結合型に変換され活性化

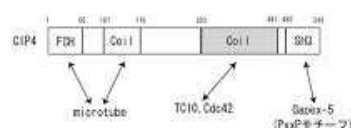


Fig.1. Schematic representation of the domain structure of CIP4.

キーワード : CIP4、GLUT4、insulin

○こばしがわ よしひろ、くめた ひろゆき、かのう だいすけ、いながき ふゆひこ

されると CIP4 は 2nd Coiled-Coil 領域を介して TC10 と結合し、細胞膜へと移行する。その際、CIP4 に SH3 を介して結合した Gapex-5 も細胞膜に移行することで Rab31 が不活性化され、GLUT4 の細胞質への移行が阻害される。これにより細胞表層の GLUT4 が増加し、Glucose が細胞内へ流入する⁽³⁾(Fig. 2-b)。また、この経路では細胞質へ移行した Gapex-5 を介して Rab5 が活性化され、それが Class III PI3K を活性化する⁽⁶⁾。Class III PI3K は macro autophagy の誘導に関ることが知られており、polyQ の除去に関ることが示されている⁽⁷⁾。そのため、CIP4 を介したインスリンシグナル伝達経路のハンチントン病を含む神経変性疾患との関りにも興味を持たれる。

本研究では CIP4 の TC10 および Cdc42 との結合機構に関する知見を得ることを目的として CIP4 の 2nd Coiled-Coil domain (CIP4₃₃₂₋₄₂₅) の溶液構造を決定した(Fig. 3)。その結果、CIP4₃₃₂₋₄₂₅ は逆平行の 2 本の α -helix からなる Coiled-Coil を形成していた。helix 間の相互作用面には I、L、V が多く存在しており、疎水性相互作用を形成していた。また、GTP 結合型の TC10 および Cdc42 との滴定実験を行ったところ、1 本目の helix の C 末端側、helix 間の loop、2 本目の helix の N 末端側に存在する残基の NMR 信号の消失が確認された。消失したピークは TC10 と Cdc42 で同一であり、これらの GTPase が CIP4₃₃₂₋₄₂₅ の同じ領域に結合することが示された。TC10 および Cdc42 と CIP4₃₃₂₋₄₂₅ の相互作用機構についても考察したので本会では報告する予定である。

References

- (1) Chang *et al.*, 2004 *Mol. Med.* **10**, 65-71.
- (2) Bryant *et al.*, 2002 *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **3**, 267-277.
- (3) Lodhi *et al.*, 2007 *Cell Metab.* **5**, 59-72.
- (4) Chang *et al.*, 2002 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 12835-12840.
- (5) Aspenstrom. 1997 *Curr. Biol.* **7**, 479-487.
- (6) Lodhi *et al.*, 2008 *Mol. Biol. Cell.* **19**, 2718-2728.
- (7) Yamamoto *et al.*, 2006 *J. Cell Biol.* **172**, 719-731.

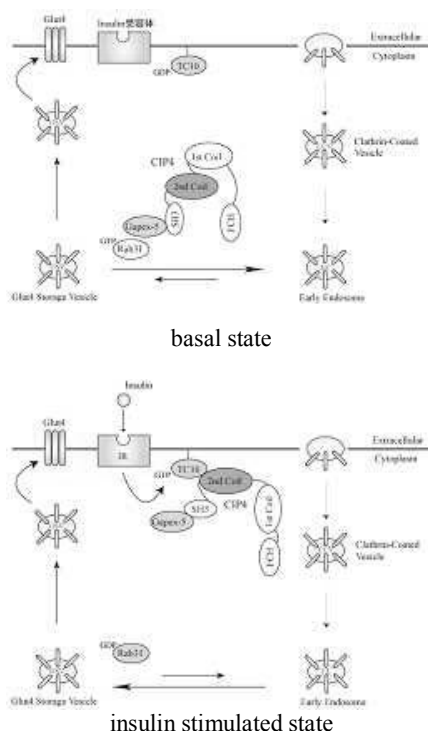


Fig.2. A schematic representation of the regulation mechanism of the translocation of Glut4.

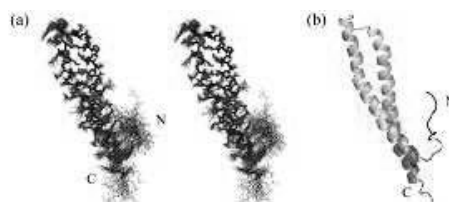


Fig. 3. Solution structure of CIP4₃₃₂₋₄₂₅. (a) Overlay of the ensemble of 20 final energy-minimized CYANA structures in stereo with heavy atoms from 339 to 421 are superimposed. The side chains are shown in blue. (b) Ribbon diagrams of the lowest energy structure. (c) Wheel analysis of the coiled-coil of CIP4₃₃₂₋₄₂₅.

呼吸鎖におけるシトクロム *c* とシトクロム *c* 酸化酵素間電子伝達の機構解明

○野本直子¹、坂本光一¹、内田毅¹、伊藤(新澤)恭子²、吉川信也²、石森浩一郎¹

¹ 北大・院理

² 兵庫県大院・生命理

Electron transfer mechanism between cytochrome *c* and cytochrome *c* oxidase

○ Naoko Nomoto¹, Koichi Sakamoto¹, Takeshi Uchida¹, Kyoko Shinzawa-Itoh², Shinya Yoshikawa² and Koichiro Ishimori¹

¹Faculty of Science, Hokkaido University.

²Department of Life Science, University of Hyogo.

Oxidative phosphorylation, an energy metabolism to produce ATP, is coupled with electron transfer chain carried out by a series of redox proteins. Cytochrome *c* oxidase (CcO), a mitochondrial membrane protein complex, accepts an electron from cytochrome *c* (Cyt *c*), a soluble protein with a *c*-type heme. The electron transfer from Cyt *c* to CcO is needed to be fast not to limit the overall rate of the metabolic pathway, therefore the binding constant for the complex formation is limited by high dissociation rate constant, necessary for a high turnover rate. On the other hands, the redox partners have to form a specific complex with the redox centers of the molecules in close approximation to fast electron transfer. In this study, to reveal the molecular mechanism of the fast electron transfer, we investigated the interaction mode of Cyt *c* and CcO.

【緒言】

細胞呼吸における酸化的リン酸化は、ミトコンドリア内膜上のタンパク質間の電子伝達を駆動することにより、生体に必須のエネルギーであるATPを合成する反応である。可溶性の電子キャリアタンパク質であるシトクロム *c* (Cyt *c*) から、ミトコンドリア内膜貫通タンパク質であるシトクロム

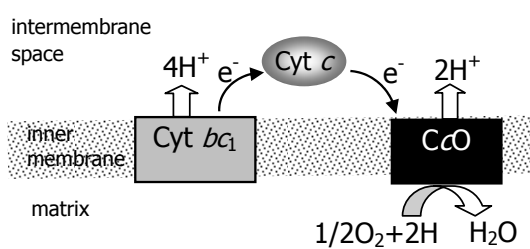


Fig.1 Schematic diagram of the electron transfer pathway around cytochrome *c* (Cyt *c*) in mitochondria.

cytochrome *c*, cytochrome *c* oxidase, electron transfer

○ のもとなおこ, さかもとこういち, うちだたけし, いう(しんざわ)きょうこ, よしかわしんや, いしもりこういちろう

c 酸化酵素 (CcO) への電子伝達 (Fig.1) は、酸化的リン酸化の重要な制御点の 1 つである。CcO は酸化的リン酸化における唯一の不可逆反応を担い、その活性は還元型 Cyt *c* の供給量のみで制御されている。したがって、Cyt *c* から CcO への電子伝達は特異的かつ高効率に進行する必要がある。そこで、本研究においては、高い反応回転効率と特異性を両立する複合体形成機構を解明することを目的として、Cyt *c* と CcO の相互作用解析を行った。

【材料および方法】

安定同位体標識を施したヒト由来 Cyt *c* は、大腸菌 Rosetta2(DE3)pLysS を用いて大量発現させ、超音波破碎後可溶性画分より Hiprep SP 10/16 XL カラムを用いて SDS-PAGE にて単一バンドとなるまで精製した。CcO はウシ心筋から decyl-maltoside(DM) を用いて可溶化させ、酸性沈殿および硫酸沈殿を繰り返すことにより精製を行った。50 mM NaPi, pH 7.0, 0.1% DM, 1 mM DTT に溶解した、均一 [²H,¹⁵N] 標識 Cyt *c* に対し、DM で可溶化した CcO を 1/10 倍量混合し、NMR サンプルとした。NMR 測定は、クライオプローブを装着した Avance 600 を用いて、測定温度 15 °C にて行った。

【結果】

特異性と反応回転効率を両立する Cyt *c*-CcO 間複合体形成の分子機構を解明するためには、結合界面の性質を調べる必要がある。本研究においては、CcO が分子量 400K の巨大な膜タンパク質であることを考慮し、転移交差飽和 (TCS) 実験により Cyt *c* 上の CcO との結合界面を同定することとした。Cyt *c* と CcO ミセルを混合したサンプルを調製し、TCS 実験を行った結果、Cyt *c* に対して DM のみを添加した対照実験の結果と比較して、A51, N54, K55 をはじめとする数残基において、ラジオ波照射に伴う特異的なシグナル強度減少が観測された。これらの残基を Cyt *c* の立体構造上にマッピングした結果、heme edge 近傍の Cyt *c* 分子表面に連続面を形成していた。

【考察】

TCS 実験により検出された結合界面残基は、heme edge 近傍の疎水性残基および塩基性残基から構成されていた。これまでに明らかとされている、Cyt *c* 上のシトクロム *bc*₁ 結合界面およびシトクロム *c* ペルオキシダーゼ結合界面も同様に heme cleft 近傍の疎水性および塩基性残基を含んでいるが、いずれも疎水性残基がよりヘム近傍に位置している。このことから、結合界面上の疎水性残基の役割として、疎水性相互作用による複合体の安定化に加えて、補欠分子族間の電子移動に適した疎水性環境を提供することが考えられる。一方、Cyt *c* の塩基性残基と CcO の酸性残基の相互作用が複合体形成に関与することがクロスリンク実験により示されている。この静電相互作用は、素早い会合もしくは複合体の配向決定に主要に寄与することが推測される。今後は、酸化型 Cyt *c* と CcO の相互作用解析を行い、還元型の結果と比較することにより、高い反応効率を可能とする複合体解離機構の解明を目指す。

P008

膜タンパク質 Ifitm5 の立体構造研究；

溶液 NMR 法による立体構造解析に向けた試料調製

○塚本 卓¹，李 香蘭²，花方 信孝²，出村 誠¹

¹北海道大学 大学院生命科学院

²独立行政法人 物質・材料研究機構 ナノテクノロジー融合センター

Structural study of interferon-inducible transmembrane protein 5; sample preparation for solution-state NMR analysis

Takashi Tsukamoto¹, Li Xiang Lan², Nobutaka Hanagata², Makoto Demura¹

¹*Graduate School of Life Science, Hokkaido University, Sapporo, Japan.*

²*Nanotechnology Innovation Center, National Institute for Materials Science, Tsukuba, Japan.*

Interferon-inducible transmembrane protein 5 (Ifitm5) is a double transmembrane α -helical protein and specifically expresses in osteoblast cells of any species. In previous studies, it was cleared that the expression of Ifitm5 is independent of well-known transcription factors for osteoblast cell differentiation. Therefore, it is suggested that Ifitm5 is a novel factor for the bone morphogenetic. In this study, we challenged to figure out the dynamic structure of human Ifitm5 by solution-state NMR spectroscopy. We prepared the overexpression system using *E. coli* and ¹⁵N, ¹³C/¹⁵N stable-isotope labeled Ifitm5. Far-UV CD spectra showed that detergent-solubilized Ifitm5 forms α -helical conformation. In conclusion, we succeeded in obtaining Ifitm5 in native state. Further NMR analysis under solubilized system are in progress.

インターフェロンにより発現が誘導される膜タンパク質ファミリーとして、Ifitm が知られており、現在までに 7 種類の相同体が確認されている。これらはいずれも二回膜貫通型タンパク質で、一次配列が非常に類似した膜貫通ドメインと、多様性に富んだアミノ末端およびカルボキシ末端をもっている。これまでの Ifitm ファミリーに関する知見は、ノックアウト・RNAi などの in vivo・遺伝子レベルでの研究を中心に報告されており、単独の Ifitm タンパク質に注目した in vitro での詳細な研究は行われてこなかった。

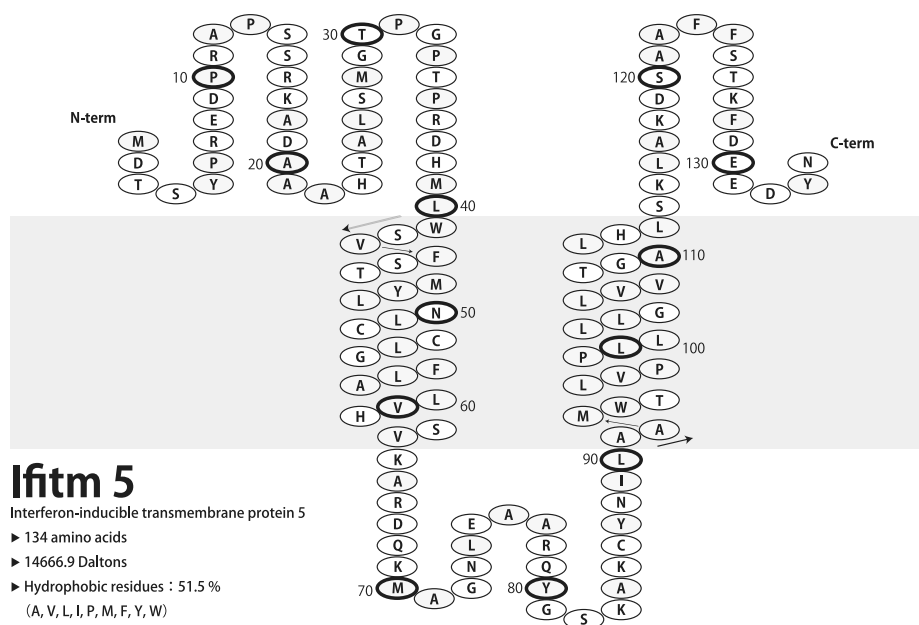
我々は、Ifitm タンパク質ファミリーのひとつである Ifitm5 に注目して研究を行ってきた。in vivo での研究より、Ifitm5 は骨芽細胞にのみ特異的に発現し、その発現にはインターフェロン、骨芽細胞の分化に重要な因子 Runx2/Cbfa1 および Osterix は関与しないことが明らかになった。すなわち、Ifitm5 は、骨芽細胞に特異的に発現

膜タンパク質，溶液 NMR

○つかもと たかし，り こうらん，はながた のぶたか，でむら まこと

して骨形成を促す，新規の膜タンパク質であることが示唆された。また，Ifitm5 は数種類のタンパク質と相互作用することが示唆されており，骨形成や骨に関する様々な疾患との関連が予想される。

そこで我々は，溶液 NMR 法を用いて，膜タンパク質 Ifitm5 のもつダイナミックな構造を解くことを目的とし，その第一段階として NMR 解析のための試料調製を行った。一般に，膜タンパク質の試料調製は困難であると言われている。しかしながら，我々は大腸菌を用いた大量発現系を構築し，1L 培養あたり約 47mg の Ifitm5 を得ることに成功した。また，MALDI-TOF マススペクトロメトリー，C 末端側 His tag をターゲットとしたウェスタンブロッティング，N 末端側のアミノ酸配列分析によって，Ifitm5 は全長でかつ大腸菌膜に発現していることを確認した。さらに，界面活性剤スクリーニングを行ったところ，双性イオン性の LDAO (N-Lauroyl-dimethyl amineoxide) が最も可溶化能に優れていた。LDAO 可溶化状態での遠紫外 CD を測定したところ，スペクトルは 222nm と 207nm に極値をもつ α ヘリックスのパターンを示した。K2D (<http://www.embl-heidelberg.de/~andrade/k2d/>) を用いた解析結果 (Fig.1) を考慮すると，本研究で構築した調製法によって天然状態の Ifitm5 を得ることに成功した。本会では，この発現系を用いて ^{15}N ， $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 安定同位体ラベル化試料を作成し，NMR 測定を行った結果も合わせて報告する予定である。



[Fig.1]

The amino acid sequence of Ifitm5. (SOSUI; <http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/>)

種々の DNA 塩基配列より形成される平行型四重鎖 DNA の立体構造解析

○中野佑亮¹, 太虎林¹, 長友重紀¹, 山本泰彦¹, 逸見光²

¹筑波大院数物, ²農研機構・食総研

Structural characterization of all-parallel G-quadruplex DNAs formed from a series of sequences

○Yusuke Nakano¹, Hulin Tai¹, Shigenori Nagatomo¹, Yasuhiko Yamamoto¹ and Hikaru Hemmi²

¹Dept. of Chem., Univ. of Tsukuba¹ and Natl. Food Res. Inst.²

A G-quadruplex DNA is composed of stacked G-quartets, each of which involves the planar association of four guanine bases. We have characterized the molecular structures of G-quadruplex DNAs formed from DNA sequences possessing various number of consecutive guanines such as d(TTGAGG), d(TTGAGGT), and d(TTGAGGG), in order to elucidate the effects of the sequence on the G-quadruplex DNA structure. Similarly to the G-quartet, adenine bases have been shown to be associated to form A-quartets in the G-quadruplex DNAs of the present DNA sequences. The alteration of the sequence was found to induce structural change of the A-quartet, which in turn influences the G-quadruplex DNA structure.

序論

平行型四重鎖 DNA は、高濃度のカチオン存在下において、グアニンが連続する配列をもつ DNA 4 分子の自己会合により形成される超分子である。四重鎖 DNA では、隣り合う DNA 鎖のグアニン 4 つが Hoogsteen 型塩基対により同一平面内で環状に連結した G-quartet (Fig. 1) が形成され、G-quartet が複数存在する場合には、それらの π 平面のスタッキングが四重鎖 DNA の立体構造の安定化に寄与している。さらに、四重鎖 DNA の 3' 末端に G-カルテットが存在する場合には、3' 末端の G-quartet 同士のスタッキングにより、四重鎖 DNA が二量体を形成すること、そして二量化により四重鎖 DNA の立体構造がより一層安定化することが明らかになっている。本研究では、ヒトテロメアにおける繰り返し配列の基本単位である d(TTAGGG) をモチーフとして設計した d(TTGAGG) と、3' 末端にチミンやグアニンを追加した d(TTGAGGT), d(TTGAGGG) のそれぞれより形成される四重鎖 DNA の立体構造を NMR により解析し、G-quartet のスタッキングが四重鎖 DNA の立体構造に及ぼす影響を明らかにした。

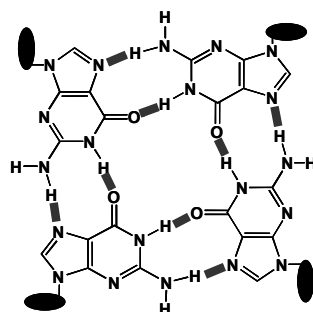


Fig. 1. Molecular structure of G-quartet. Ellipses and thick lines represent deoxyriboses and hydrogen bonds, respectively.

Keywords: G-quartet, π - π stacking, G-Quadruplex DNA

○なかのゆうすけ, たいこりん, ながともしげのり, やまもとやすひこ, へんみひかる

結果・考察

d(TTAGGG)とd(TTGAGG)の ^1H NMRスペクトルで、塩基のCHとグアニンNH (G_{NH})のプロトンシグナルが観測される領域をFig. 2に示す。いずれのスペクトルでも10 - 12 ppmに3つの G_{NH} シグナルが観測され、それぞれのDNAで対称性の高い平行型四重鎖DNA ((d(TTAGGG)) $_4$, (d(TTGAGG)) $_4$)が形成されることが示された。また、(d(TTGAGG)) $_4$ のアデニンH2 (A4H2)に由来するシグナルが9.2 ppmに観測され、このシグナルの通常のシフト値に比べて約1.2 ppmの低磁場シフトを示した。この結果から、(d(TTGAGG)) $_4$ のアデニンは、隣接するG-quartetとのスタッキングによりA-quartet (Fig. 3)を形成することが示唆された。

次に、d(TTGAGGT)、d(TTGAGGG)で、3'末端への1塩基の追加によるA-quartetの構造に与える影響を解析した。(d(TTGAGGT)) $_4$ の ^1H NMRスペクトルでは、 G_{NH} シグナルとA4H2シグナルの分裂が観測された。NOESYによる解析の結果、分裂したそれぞれの G_{NH} シグナルの間で飽和移動によるクロスピークが観測され、対応するA4H2とNOEが観測されたことから、(d(TTGAGGT)) $_4$ にはA-quartetの構造に関して、相互変換する二つのコンフォメーションの存在が示された (Fig. 4)。また、(d(TTGAGGG)) $_4$ でもA-quartetに隣接するG3およびG5の G_{NH} シグナルが二組観測され (Fig. 5)、二つの異なるコンフォメーションの存在が示唆された。このように、A-quartetをもつ四重鎖DNAの構造は塩基配列に依存することが示された。

結論

四重鎖DNAでは、G-quartetとの π - π スタッキングによりA-quartetが安定化することが示された。また、A-quartetの構造は、DNA塩基配列に依存することが明らかになった。

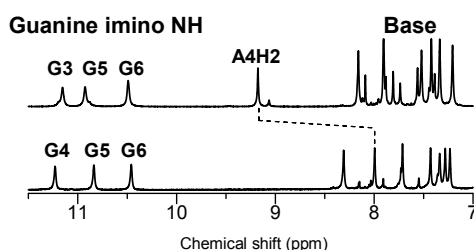


Fig. 2. ^1H NMR spectra of G-quadruplex DNAs formed from d(TTGAGG) (top) and d(TTAGGG) (bottom) at pH 6.80 and 25°C.

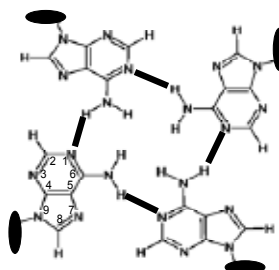


Fig. 3. Putative molecular structure of A-quartet. Ellipses and thick lines represent deoxyriboses and hydrogen bonds, respectively.

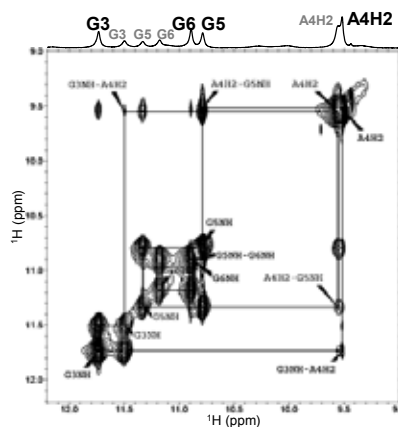


Fig. 4. Portions of ^1H NMR and NOESY spectra of (d(TTGAGGT)) $_4$ at pH 6.80 and 5°C.

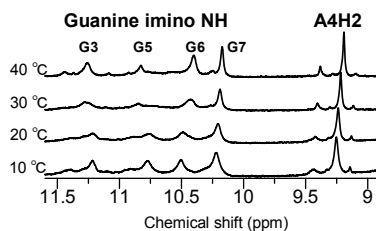


Fig. 5. Temperature dependence of ^1H NMR spectra of (d(TTGAGGG)) $_4$ at pH 6.80.

ヘム-四重鎖DNA複合体の立体構造解析

○斉藤香織¹, 太虎林¹, 長友重紀¹, 山本泰彦¹, 逸見光²

¹筑波大院数物, ²農研機構・食総研

Structural characterization of a complex between heme and G-quadruplex DNA

○Kaori Saito¹, Hulin Tai¹, Shigenori Nagatomo¹, Yasuhiko Yamamoto¹, and Hikaru Hemmi²

¹Dept. of Chem., Univ. of Tsukuba and ²Natl. Food Res. Inst.

A single repeat sequence of the human telomere, d(TTAGGG), has been shown to form all parallel G-quadruplex DNA in the presence of K⁺, which spontaneously dimerizes through the stacking of the 3'-terminal G-quartets. We have previously demonstrated that heme, iron(III)-protoporphyrin IX complex, and G-quadruplex DNA assembled from d(TTAGGG) form a stable complex called “heme-DNA complex”. In this study, we characterized the solution structure of the heme-DNA complex using ¹H NMR. Analysis of signal intensities yielded the stoichiometric ratio of 1:2 between heme and G-quadruplex DNA, and intermolecular NOEs between heme peripheral side chain and G6 protons were observed. These results revealed that heme is sandwiched between 3'-terminal G-quartets of two G-quadruplex DNAs.

序論

四重鎖DNAは、グアニン四量体（G-カルテット、**Fig. 1**）により形成されるDNAの高次構造の一種である。私共はこれまでの研究において、ヘム（鉄-ポルフィリンIX錯体、**Fig. 2**）がDNA塩基配列d(TTAGGG)により形成される四重鎖に対して特異的に結合し、ヘム-DNA複合体を形成することを報告してきた¹⁻³。複合体におけるヘム鉄の配位構造は、特徴的なpH依存性“酸塩基平衡”を示し、中性pHにおいて三価・高スピン型錯体（ $S = 5/2$ ）、塩基性において低スピン型錯体（ $S = 1/2$ ）となる（ $pK_a = 8.7$ ）。本研究では、常磁性の影響がより小さく、二次元NMRの測定が容易になる塩基性pHの条件下において、複合体の構造解析を¹H NMRにより行った。

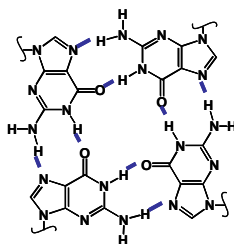


Fig. 1. Molecular structure of G-quartet.

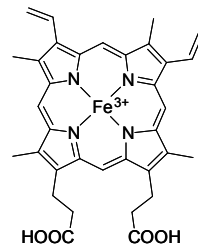


Fig. 2. Molecular structure of heme.

結果・考察

通常の四重鎖DNAにおいて、¹H NMRのシグナルは0 - 12 ppmに観測される（**Fig. 3**）。(d(TTAGGG))₄におけるDNA 4分子はすべて等価であり、~10 ppmより低磁場にシフト

キーワード：ヘム, 四重鎖DNA, 常磁性NMR

○さいとうかおり, たいこりん, ながともしげのり, やまもとやすひこ,
へんみひかる

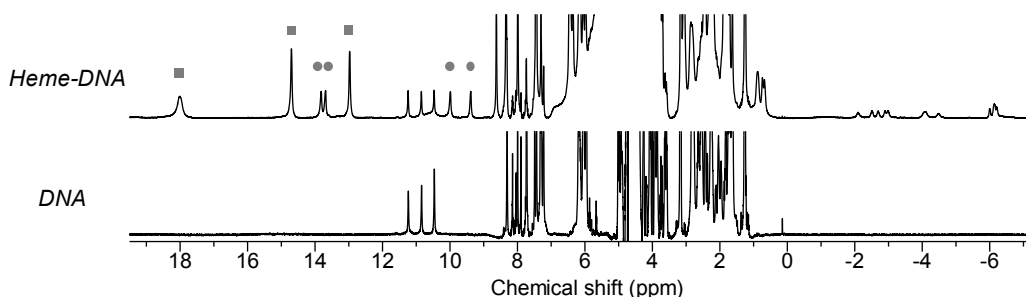


Fig. 3. ^1H NMR spectra of heme-DNA complex (top) and G-quadruplex DNA (bottom) in 90% D_2O /10% H_2O , pH 9.7, at 298K. In the spectrum of heme-DNA complex, heme methyl and guanine imino proton signals are marked by filled circles and squares, respectively.

したシグナルは、各々のG-カルテット中で水素結合を形成したグアニンのイミノプロトンに由来する。一方、ヘム-DNA複合体では、シグナルが-6.4 - 18 ppmの広範囲に観測され (**Fig. 3**)、ヘム側鎖およびヘム近傍のDNAプロトンに由来するシグナルがヘム鉄の対電子の影響を受けて大きく常磁性シフトすることが反映されている。ヘム-DNA複合体のシグナル帰属はNOESY、DQF-COSYにより行い、ヘム側鎖プロトンシグナルの帰属を完了すると共に、ほとんど全てのDNAプロトンシグナルの帰属も得ることができた。

さらに、NOESYにおいては、ヘム-DNA複合体の立体構造決定に重要なヘムとDNAの分子間NOEも観測された。ヘムのメチルプロトンおよびビニルプロトンが四重鎖DNAの6番目の残基であるG6の塩基およびリボースのプロトンとNOEを示したことから (**Fig. 4**)、ヘムはDNAの3'末端側のG-カルテットにスタッキングしていることが示された。G6のイミノプロトンの選択的スピン-格子緩和時間 $^{\text{sel}}T_1$ は約20msと短く、ヘム鉄の対電子による常磁性緩和の影響を強く受けていることが明らかとなった。

また、9 - 18 ppmに分離良く観測された3つのG-カルテット由来のイミノプロトン、および4つのヘムメチルプロトンシグナルの強度比から、ヘム-DNA複合体におけるヘムと四重鎖DNAの化学量論は、約1:2であることが示された。

結論

ヘム-DNA複合体は、塩基性pHにおいて、2つの四重鎖DNAの3'末端にヘムが挟まれたサンドイッチ型構造であることが明らかになった。

References

1. T. Mikuma, N. Terui, Y. Yamamoto, and H. Hori, *Nucleic Acids Res. Suppl. No. 2*, **2002**, 285-286.
2. T. Mikuma, T. Ohyama, N. Terui, Y. Yamamoto, and H. Hori, *Chem. Comm.*, **2003**, 14, 1708-1709.
3. T. Ohyama, Y. Kato, H. Mita, and Y. Yamamoto, *Chem. Lett.*, **2006**, 35, 126-127.

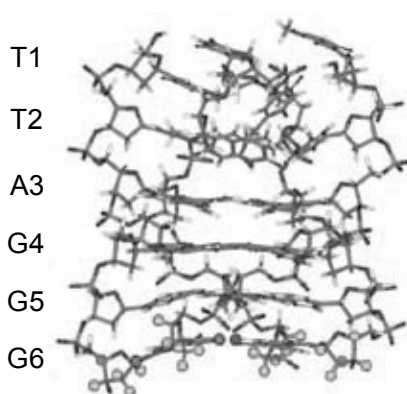


Fig. 4. Schematic drawing of G-quadruplex DNA. Base and ribose protons that exhibited intermolecular NOEs with heme peripheral side chain protons are represented by balls.

ミミズ由来R型レクチンC末端ドメインと糖との結合様式に関するNMR解析

○逸見 光¹, 久野 敦², 海野 幸子², 平林 淳²

¹農研機構・食総研

²産総研・糖鎖医工学研究センター

NMR analyses of the binding of sugar to the C-terminal domain of an R-type lectin from earthworm

○Hikaru Hemmi¹, Atsushi Kuno², Sachiko Unno², and Jun Hirabayashi²

¹National Food Research Institute, National Agriculture and Food Research Organization (NARO), Tsukuba, Japan.

²Research Center for Medical Glycoscience, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Tsukuba, Japan.

The C-terminal domain of an R-type 29-kDa lectin (EW29Ch) from the earthworm *Lumbricus terrestris* has two sugar-binding sites (α and γ). Our recent paper¹ showed that the K_d value of the α sugar-binding site were approximated to 0.01-0.07mM for lactose, whereas that of the γ sugar-binding site was 2.66mM for lactose. Although the crystal structure of the complex between EW29Ch and lactose was reported, it is still unclear why the α sugar-binding site binds to lactose more strongly. In the [¹³C, ¹H]-HSQC spectra of ¹³C-labeled lactose upon the addition of non-label EW29Ch, mainly the NMR signals of the galactose residue of the lactose were broadened and shifted. These results agree well with those from the crystal structure of EW29Ch with lactose and the STD-NMR experiments of lactose with EW29Ch¹. Further, we are currently analyzing the NOEs between EW29Ch and lactose.

分子量が2万9千のミミズ由来レクチン（EW29）は、27%アミノ酸配列が同一の2つのドメインからなり、さらに、そのアミノ酸配列中に“Gly-X-X-X-Gln-X-Trp”と言うモチーフ構造を持つ²。このモチーフ構造は、これまで多くの糖認識タンパク質で発見されており、R-typeレクチンファミリーを形成している。さらに、このレクチンの特徴として、R-typeレクチンファミリーに属する他のタンデムリピートタンパク質がドメイン毎に一つの糖結合部位しか持たないことから単独のドメインでは赤血球凝集活性を持たないと考えられているが、EW29においてC末端ドメイン単独（EW29Ch）でもEW29に比べ10倍程度低い活性ではあるが赤血球凝集活性を持つことが知られている。また、最近EW29 Chと糖との結晶構造が解析され、分子内に2つの糖結合部位（ α 結合部位と γ 結合部位）が存在することがわかった³。さらに、我々は最近、EW29Chと各種糖との相互作用について、NMR滴定実験法を用いて解析を行い、 α 結合部位が γ 結合部位に比べて約100倍高い糖結合能をもつことを報告した¹。

レクチン, 糖, 相互作用

○へんみひかる, くのはつし, うんのさちこ, ひらばやしじゅん

今回、我々は、 ^{13}C 均一ラベルしたラクトースを用いて、非ラベル体EW29Chの添加による $^{13}\text{C}, ^1\text{H}$ -HSQCスペクトルでのNMRシグナルの変化を観察するとともに、分子間NOEの測定、さらに、 $^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$ ラベルしたEW29Chに非ラベル体ラクトースを添加したサンプルを用いて分子間NOEの測定を行ったので、その結果について報告する。

[結果と考察]

今回、我々は、X線結晶構造解析で糖との複合体解析において、2つの糖結合部位（ α と γ ）での糖との相互作用についてほとんど同じ相互作用を示すことが報告されているにも関わらず、NMR滴定実験において α 結合部位が γ 結合部位に比べラクトースに対して約100倍高い結合能を持つことから、 α 結合部位のラクトースとの相互作用を重点的に解析するため、 ^{13}C 均一ラベル体ラクトースに対して非ラベル体EW29Chを糖／タンパク質比が0.5～20なるようにサンプルを調製し、 $^{13}\text{C}, ^1\text{H}$ -HSQC、 ^{13}C -edited NOESY及び ^{13}C -edited TOCSYの測定を行った。その結果、ラクトースのグルコース残基由来のシグナルは、遊離の状態でのシグナルとほとんど変化が見られなかったが、ガラクトース残基由来のシグナルは、ブロードニング及びケミカルシフトの変化が見られた。さらに、ガラクトース残基由来のシグナルにおいては、EW29Chとの分子間NOEが観測された。従って、今回の結果より、ラクトースのガラクトース残基がEW29Chと主に相互作用することが分かり、X線結晶構造解析の結果と一致した。さらに、ラクトースとEW29Chとの分子間NOEの解析を行うために、 ^{15}N ラベルしたEW29Ch及び $^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$ でラベルしたEW29Chを用い、非ラベル体ラクトースを添加したサンプル（糖／タンパク質比が0.5～8）を用いて、 ^{15}N -edited NOESY及び ^{13}C -edited NOESYの測定を行った。 ^{13}C ラベル体ラクトースによる糖側からのNOE解析と、 ^{15}N ラベル体及び $^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$ ラベル体EW29Chによるタンパク質側からのNOE解析により、糖 - タンパク質間NOEの帰属を行った。これらの詳細な結果と、残余双極子カップリング値を用いて精密化した遊離の状態でのEW29Chの立体構造については当日報告する予定である。

References

1. Hemmi, H., Kuno, A., Ito, S., Suzuki, R., Hasegawa, T., and Hirabayashi, J. (2009) FEBS J. 276, 2095-2105.
2. Hirabayashi, J., Dutta, S. K., and Kasai, K. (1998) J. Biol. Chem. 273, 14450-14460.
3. Suzuki, R., Kuno, A., Hasegawa, T., Hirabayashi, J., Kasai, K., Momma, M., and Fujimoto, Z. (2009) Acta Crystallogr D 65, 49-57.

NMR studies on OsLHP1, a chromodomain protein in rice.

○Toshiyuki WAKO, Rintaro SUZUKI, Toshimasa YAMAZAKI

(Protein Research Unit, National Institute of Agrobiological Science)

Epigenetic regulation for gene expression and silencing by histone modifications plays important roles in eukaryotes. Especially, methylation of histone H3 at K9 or K27 is essential for epigenetic silencing. The methylated H3 are recognized mainly by HP1 and Polycomb family proteins that contain chromodomain as binding site. Chromodomain is conserved in from yeast to higher organisms. In plant species, LHP1 which belongs to HP1 family in DNA sequence is likely to play a role as Polycomb, while detailed mechanism is unclear. In this study, we performed structural analysis of the chromodomain in rice LHP1 (OsLHP1-CD) by solution NMR spectroscopy, to reveal the detailed recognition mechanism of methylated histones. Backbone NMR resonance assignment has been achieved by analyzing 3D triple-resonance NMR spectra measured on $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -labelled OsLHP1-CD. Side-chain resonance assignment, structure calculations and NMR titration analysis are in progress.

【序論】

真核生物においては、ヒストンの翻訳後修飾を介したエピジェネティックな遺伝子発現制御が重要な役割を果たしている。とりわけヒストンH3のK9およびK27のメチル化(H3K9me, H3K27me)による発現抑制が非常に注目されている。これらのメチル化ヒストンを認識する主要なタンパク質として、H3K9meに結合するHP1ファミリーおよびH3K27meに結合するPolycombファミリーが知られており、これらは認識ドメインとしてクロモドメインを有する。クロモドメインは約60残基からなり、真核生物に広く保存されている。植物ではPolycombファミリーとの相同配列は存在しないかわりに、HP1ファミリーと配列上の相同性をもつLHP1が、配列からの予想とは異なってPolycombと同様の特異性および機能を担っていることが推定されているが、詳細な結合様式については明らかとなっていない。そこで本研究ではイネのLHP1(OsLHP1)のクロモドメイン単体について、溶液NMRを用いた構造解析を行って立体構造を明らかにし、メチル化ヒストンペプチドとの結合特異性および相互作用メカニズムの解明を目指す。

クロモドメイン、メチル化ヒストン、イネ

○わこうとしゆき, すずきりんたろう, やまざきとしまさ

【方法】

イネLHP1のクロモドメイン(OsLHP1-CD, 59残基)を、大腸菌による大量発現系により ^{15}N および $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ にて標識し、常法により調製して測定試料とした。NMR測定はBruker DMX750を用い、283Kで行った。主鎖の帰属のために、HNCACB, HN(CO)CACB, HNCB, HCACO, HBHACONHの各種三次元測定を行った。側鎖の帰属のために、C(CO)NH, HC(CO)NH, HCCH-TOCSY, ^{15}N -NOESY-HSQC, ^{13}C -NOESY-HSQC, $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -separated NOESY-HSQCの各種三次元測定を行った。測定データの処理には、NMRpipeを、スペクトル解析にはSparkyを用いた。得られた主鎖の化学シフトデータを元に、RCIを用いてOsLHP1-CDの二次構造を解析した。

【結果・考察】

^{15}N -HSQCにおいて良好なスペクトルを得ており (Fig. 1)、これまでに主鎖の帰属を完了させた。化学シフトの値から二次構造を予測したところ、OsLHP1-CDには、N末端側から順に3つの β ストランド($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$)があり、C末端に1つの α ヘリックスを持つことが推定された。この構造は既に説明されている*Drosophila*のHP1やPcなどのクロモドメインと類似しているが、 $\beta 3$ 前後のヘリックスは検出されていない。またC末端の α ヘリックスの長さは、HP1と同様で、Pcより長いと予測されており、二次構造的も一次配列と同様にHP1に近いと考えられる。クロモドメイン(CD)がメチル化ヒストンに結合する際の重要な3つのaromatic residuesはOsLHP1においても保存されていることから、HP1やPcと類似した結合様式が期待される。これまでのところシロイヌナズナのAtLHP1-CDと同様に(Zhang *et al.* 2007)、CD単体ではH3K9meおよびH3K27meの双方への結合がNMRタイトレーションによって観察されており、特異性および認識機構についてさらに解析を進めている。現在、側鎖の帰属、立体構造解析、および結合解析を進行中である。

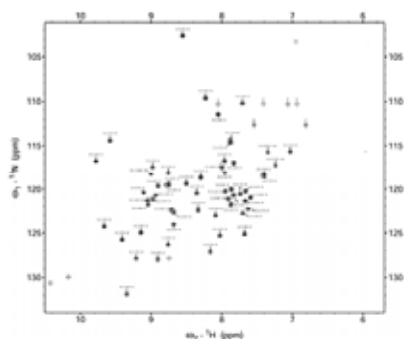


Fig. 1 ^1H - ^{15}N HSQC spectrum of OsLHP1-CD

P013

幼若ホルモン結合タンパク質の構造機能解析

○鈴木倫太郎, 藤本瑞, 塩月孝博, 門間充, 多勢祥, 宮澤光博, 山崎俊正
農業生物資源研究所

Structure-function relationship of juvenile hormone binding protein

○Rintaro Suzuki, Zui Fujimoto, Takahiro Shiotsuki, Mitsuru Momma, Akira Tase, Mitsuhiro Miyazawa, and Toshimasa Yamazaki
National Institute of Agrobiological Sciences, Tsukuba, Japan.

The lipophilic juvenile hormone (JH) is a key hormone in the regulation of the insect life cycle and exists as a complex with JH binding protein (JHBP) in the haemolymph. Here, we present the NMR solution structure of the silkworm JHBP-JH III complex and the X-ray crystal structure of unliganded protein. JHBP has a long α 3-helix which is wrapped in a meandering β -sheet. JH III is completely buried in a deep binding pocket. In solution, the lid of the binding pocket of apo-JHBP is quite flexible and undergoes chemical exchange on the milli- to microsecond time-scale between multiple conformational states, including the “closed-lid” conformation observed for the complex and “open-lid” conformations suitable for JH binding.

非環状セスキテルペノイドである幼若ホルモン(JH)は昆虫の生活環の制御に関わる重要なホルモンである。多くの昆虫で JH は幼虫期の脱皮過程における変態を阻害する。それぞれの種の各幼生期に固有の大きさに達すると JH は幼虫体内から消失し、変態が進行することができるようになる。成虫においては、JH は卵形成などの性成熟、休眠、寿命(成虫期間の長さ)、移動行動などに関わる広範囲の作用を持つ。アラタ体で生合成され血リンパに分泌された JH は、高親和性の JH 結合タンパク質(hJHBP, 25 kDa)と結合し、標的細胞まで運搬される。JH は高脂溶性で不安定な分子であり、その輸送、保護、貯蔵を通じて hJHBP は昆虫の正常な発育に決定的に重要な役割を持つ。鱗翅目の血リンパでは JH の 99%以上が hJHBP と結合した形で存在するため、血リンパにおける JH の動態とは hJHBP-JH 複合体の動態に他ならない。今回我々はカイコ hJHBP および hJHBP-JH III 複合体の立体構造を明らかにしたので報告する。

hJHBP については X 線結晶構造解析により解像度 2.6 Å の構造を得ることができたが、hJHBP-JH III 複合体については結晶化はするものの、解析が困難であった。一方、hJHBP 単体の NMR スペクトルは複合体のスペクトルに比べてピークが 4 割ほど少なく、単体の解析はできなかったが複合体の解析は可能であった。そこで、複合体については NMR 法により構造解析を行った。計算に用いた 11742 個の距離拘束のうち、6 割強を ambiguous assignment とすることで、主鎖の RMSD が 0.32 Å とこのサイズのタンパク質としては精

幼若ホルモン結合タンパク質、ambiguous assignment

○すずきりんたろう, ふじもとずい, しおつきたかひろ, もんまみつる, たせあきら, みやざわみつひろ, やまざきとしまさ

密に構造を決めることができた。各ピークについてambiguous assignmentを採用するか否かは、可能性のあるそれぞれの帰属について $\Sigma(1/r^6)$ を求め、その総和に占める割合 $\Sigma(1/r^6)/\Sigma\Sigma(1/r^6)$ が10%以上であるような帰属が複数あることを目安とした。実際の判定はSparkyのExtensionの一つ、Assignment distancesを改変して上記の割合を表示する機能を追加することで行った。

得られたhJHBPの結晶構造およびhJHBP-JH III複合体の溶液構造はほぼ同じであり、筒状の β シートが長い $\alpha 3$ ヘリックスに巻きつく形になっていた(Fig. 1)。筒状の分子の両端にはそれぞれ短いヘリックス $\alpha 1$ と $\alpha 2$ が存在し、またどちらにもポケット様の表面が見られた。結晶構造では結晶化試薬の2-メチル-2,4-ペンタンジオール(MPD)がこれらのポケットに1分子ずつ結合していた。一方、溶液構造ではJH IIIは片方のポケットに、分子内部に埋もれた形で結合していた。この結合ポケットは疎水性が高かったが、hJHBP-JH III間の水素結合も2箇所で見られた。部位特異的変異体の結合活性測定により、水素結合に関与する残基とJH IIIのエポキシ基周辺の疎水性残基は結合に対する寄与が大きいのが明らかになった。なお、JHとタンパク質の相互作用を示す立体構造としてはこの構造が初めてのものである。

一方、単体のNMRスペクトルで観測できなかった残基はJH III結合ポケット周辺に集中しており、また、結晶構造中でも該当する部分の温度因子は高かった。hJHBP-JH III複合体の溶液構造の20の計算結果間でのRMSDは分子全体にわたって比較的小さく、揺らぎの少ない構造であることが示唆されたが、溶液構造と結晶構造のRMSDを計算すると、両者で違いの大きい部分は結晶構造の温度因子が高い部分と一致していた。また、溶液構造ではJH III分子がMPDよりも大きいことに対応して結合ポケットも大きくなっており、これを取り巻く β シート部分が結晶構造とくらべて外側に広がる形になっていた。この構造の違いはそれほど大きくはないが、 β シート上で温度因子の高低の境目となる部分を蝶番とする開閉として解釈することができた。また、この境目は単体のNMRスペクトルで観測できる部分と観測できない部分の境目と一致していた。さらに、この境目周辺では β シートと $\alpha 3$ ヘリックスを結ぶジスルフィド結合および水素結合が一つずつ見られた。これらの結果から結合部位周辺は溶液中のhJHBP単体では運動性が高く、おそらく結晶構造に似た閉じた構造とJHの結合が可能なより大きく開いた構造のを含む複数の状態間で、ミリ秒からマイクロ秒スケールでの揺らぎがあるものと考えられる。

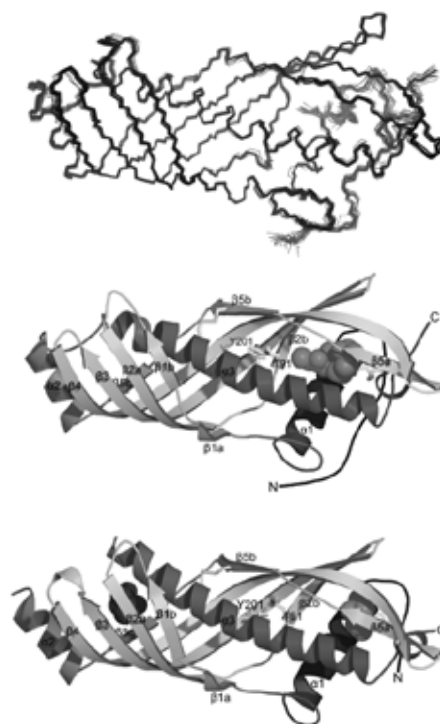


Fig. 1 Structure of silkworm hJHBP

The superimposed backbone atoms of the 20 NMR-derived structures of the JHBP-JH III complex, the representative structure of the JHBP-JH III complex, and the crystal structure of the JHBP-MPD complex.

NMR 緩和測定による低分子量 G タンパク質***Nt*ARL8 の立体構造変化の解析**

((独)農業生物資源研究所 植物・微生物間相互作用ユニット)

○岡村英保、錦織雅樹、相宏宇、石川雅之、加藤悦子

**NMR Relaxation Analysis of Conformational Changes
in Small G-Protein *Nt*ARL8***National Institute of Agrobiological Sciences (NIAS),
Plant-Microbe Interactions Research Unit*○Hideyasu Okamura, Masaki Nishikiori, Hongyu Xiang,
Masayuki Ishikawa and Etsuko Katoh

The replication of eukaryotic positive strand RNA virus genomes occurs in membrane-bound replication complexes which consist of virus-coded replication proteins and host proteins. *Nicotiana tabacum* ADP-ribosylation factor-like protein 8 (*Nt*ARL8) is a host protein that associates with the tobacco mosaic virus replication complex. *Nt*ARL8 belongs to the ARF family of the small G proteins and functions as a molecular switch associated with nucleotide exchange. Knowledge about the dynamic mechanisms of conformational changes in *Nt*ARL8 would help to understand the role of *Nt*ARL8 on the virus replication complex. Here, we investigated conformational changes in *Nt*ARL8 by NMR relaxation analysis, including ZZ-exchange and ^{15}N R_2 relaxation dispersion experiments.

真核生物に感染するプラス鎖 RNA ウイルスのゲノム複製は、ウイルスにコードされた複製タンパク質と宿主タンパク質からなる膜結合性の複製複合体で起こることが知られている。複製複合体の形成機構を明らかにすれば、それを阻害する薬剤の開発に大きく貢献できるであろう。近年、錦織らにより、タバコモザイクウイルスの RNA 複製に関与する宿主因子の一つとしてタバコ ADP-ribosylation factor-like protein 8 (*Nt*ARL8)が同定された。我々はこの *Nt*ARL8 について立体構造決定を含めた解析を進めている(Fig.1)。 *Nt*ARL8 は 20.5kDa の低分子量 G タンパク質群の ARF ファミリーに属するタンパク質であり、GTP 結合型と GDP 結合型の立体構造変化により分子スイッチとして機能すると考えられている。これまでに多くの ARF ファミリー蛋白質で N 末の両親媒性 Helix 領域が、膜への局在に関与すると同時に自身の GTP/GDP への親和性に関与することが指摘されてきた。N 末端領域はヌクレオチド結合部位の反対側にあることから、アロステリック制御機構という観点からも興味深いと思われる。しかしながら、その詳細な機構についての解明は不十分なままである。そこで、我々は N 末端のヘリックス領域を含むΔ7-*Nt*ARL8 (残基番号 8-184)とその領域を欠損したΔ16-*Nt*ARL8 (残基番号 17-184)について NMR により解析を行った。

キーワード 低分子量 G タンパク質, R_2 緩和分散法, ZZ-exchange 法

○おかむらひでやす, にしきおりまさき, しゃんほんいゆう, いしかわまさゆき, かとうえつこ

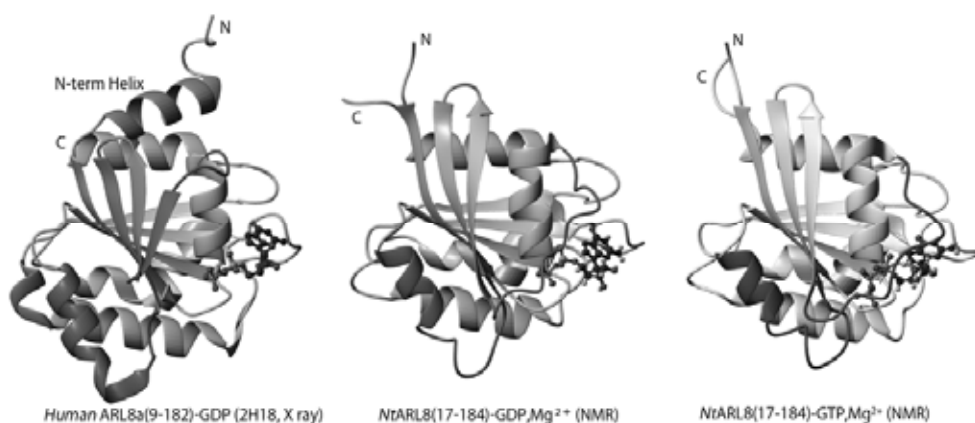


Fig.1 Crystal structure of *Human ARL8a*(9-182)-GDP (Atanassova, A. *et al.*) (GDP form) and solution structures of $\Delta 16$ -*NtARL8*-GDP, Mg²⁺ (GTP-like form) and $\Delta 16$ -*NtARL8*-GTP, Mg²⁺ (GTP form)

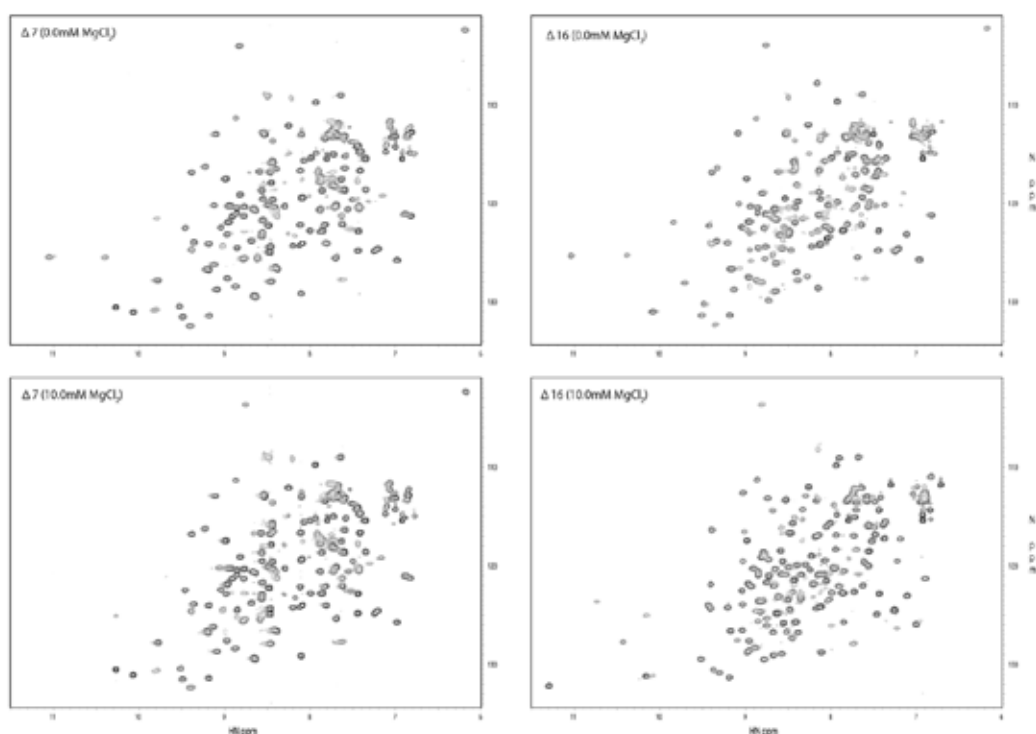


Fig.2 ¹H-¹⁵N HSQC spectra of $\Delta 7$ -*NtARL8* and $\Delta 16$ -*NtARL8* in 20 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0), 100 mM NaCl with or without 10 mM MgCl₂

大腸菌大量発現系から精製した直後では $\Delta 7$ -*NtARL8*はGDP型、 $\Delta 16$ -*NtARL8*はGTP型であった。このことからN末Helix領域の有無によりGDP-GTP親和性が変化していることが示唆された。さらにNMRもしくは等温滴定マイクロカロリーメトリー(ITC)測定を用いて、それぞれのGDP複合体へGTPを滴下すると $\Delta 16$ -*NtARL8*は $\Delta 7$ -*NtARL8*と比較して反応が顕著に見られることから $\Delta 16$ -*NtARL8*はGDP→GTPへの変換が起りやすいことが確認できた。また、*NtARL8*はこれまでに解析

されてきた ARF ファミリータンパク質との比較から、GTP 型では構造中に Mg^{2+} を含むが GDP 型では Mg^{2+} を含まないことが予想された。そこで、 Mg^{2+} 非存在下で NMR スペクトルを測定すると両者はよく似たスペクトルを与え (Fig. 2)、典型的な GDP 型構造をしていると考えられた (Fig. 1 左)。しかし Mg^{2+} を滴定していくと両者に違いが見られ、 $\Delta 7\text{-NtARL8}$ ではヌクレオチド結合領域のわずかな残基がシフトもしくは消失するのみなものに対して、 $\Delta 16\text{-NtARL8}$ では slow-exchange time scale で大きくシグナルが変化することが分かった。そこで、このシグナル変化がほぼ飽和する 30 mM MgCl_2 溶液中で立体構造解析を行った結果、新たに出現したシグナルは $\Delta 16\text{-NtARL8}$ が GDP 複合体にも関わらず GTP-like な構造をとっていることに起因することが分かった (Fig. 1 中)。これらのように、N 末 Helix 領域の有無は NtARL8 の構造変換機能に対して重大な変化をもたらすことが確認できた。

そこで、始めに $\Delta 16\text{-NtARL8}$ では 1 mM Mg^{2+} 存在下で GDP 型、GTP-like 型両方のシグナルが観測できるので、ZZ-exchange 法により解析を行った。その結果、両者の存在比は GDP:GTP-like = 0.62 ± 0.38 、変換速度は $k(\text{GDP} \rightarrow \text{GTP-like}) = 7.1 \pm 0.3 \text{ S}^{-1}$, $k(\text{GTP-like} \rightarrow \text{GDP}) = 11.8 \pm 0.8 \text{ S}^{-1}$ と見積もられた (Fig. 3)。次に、 Mg^{2+} 非存在下では、ほぼ全ての残基で単独のシグナルを与えるが、S184 のみマイナーピークが観測された。さらに、このマイナーピークの位置は Mg^{2+} 存在下での GTP-like 型のピークの位置とほぼ同位置であった。これについて同様に ZZ-exchange 法で解析を行った結果、存在比は GDP:(GTP-like) = 0.91 ± 0.09 で $k(\text{GDP} \rightarrow (\text{GTP-like})) = 8.4 \pm 1.2 \text{ S}^{-1}$, $k((\text{GTP-like}) \rightarrow \text{GDP}) = 83.6 \pm 12.4 \text{ S}^{-1}$ であることがわかった (Fig. 3)。これらの結果は以下の様な可能性を示唆している。まず、 Mg^{2+} 添加により励起される GTP-like 型構造は Mg^{2+} 非存在下でも、既にわずかに存在している。すなわち N 末端 Helix の除去により GTP-like 構造があらかじめわずかに励起されている可能性がある。S184 は C 末端であり特別にシグナルがシャープなためにマイナーピークが観測できた可能性がある。そう仮定すると変換速度 $k(\text{GDP} \rightarrow \text{GTP-like})$ は Mg^{2+} 添加により速くなるのではなく、反対に、 $k(\text{GTP-like} \rightarrow \text{GDP})$ が遅くなっている。これについては Mg^{2+} は GDP 型構造に作用して GTP-like 型構造を誘起しているのではなく、あらかじめ存在する GTP-like 型構造に作用すると考えると説明できる。すなわち Mg^{2+} の効果は induced-fit ではなく、population-shift であると理解できる。これらのことを確かめるために我々は Mg^{2+} 非存在下で ^{15}N R_2 relaxation dispersion 実験を行った。結果は予想した通り、 $\Delta 7\text{-NtARL8}$ ではほぼフラットで R_2 の dispersion が観測できなかったが、 $\Delta 16\text{-NtARL8}$ では複数の残基で顕著な dispersion が観測できた (Fig. 4)。このように、 $\Delta 16\text{-NtARL8}$ では N 末 Helix 領域の欠損により ms- μs スケールの運動が誘起され、マイナーな構造が励起されていることが強く示唆された。反対に $\Delta 7\text{-NtARL8}$ ではこのような運動は抑制されており、N 末のヘリックス領域は $\Delta 16\text{-NtARL8}$ で見られたような Intrinsic な構造のゆらぎを抑えることにより、ヌクレオチド親和性を制御していることが強く示唆された。現在、この ^{15}N R_2 relaxation dispersion により得られるパラメーターを求めるために、さらなる解析を行っている。

$\Delta 16\text{-NtARL8}$ では Mg^{2+} 非存在下でも GTP-like 構造を含む少なくともふたつの立体構造の存在が強く示唆されたため、それらの熱力学パラメーターを見積もるために ZZ-exchange 測定の温度可変実験を行った。その結果を Eyring Plot により解析したところ、GDP 型から GTP 様型への変換の活性化エンタルピー $\Delta H^\ddagger(\text{GDP} \rightarrow \text{GTP-like})$ 、活性化エントロピー $\Delta S^\ddagger(\text{GDP} \rightarrow \text{GTP-like})$ はそれぞれ $11.8 \pm 1.8 \text{ kcal/mol}$, $-0.0146 \pm 0.0061 \text{ kcal/mol} \cdot \text{K}$ と、GTP-like 型から GDP 型への $\Delta H^\ddagger(\text{GTP-like} \rightarrow \text{GDP})$, $\Delta S^\ddagger$

(GTP-like→GDP)はそれぞれ 20.6 ± 1.8 kcal/mol, 0.0193 ± 0.0063 kcal/mol·K と見積もられた(Fig. 3)。従って、この構造変換のエンタルピー変化 ΔH は 8.78 ± 2.52 kcal/mol と見積もられる。これは ITC にて Mg^{2+} 滴定実験により得られた ΔH とほぼ近い値であった。見積もられた熱力学パラメーターから GDP 型構造はエントロピー的に、GTP-like 型構造はエンタルピー的に有利な構造だといえる。GDP 型では NMR シグナルがブロード化している領域が $\Delta 7$ -NtARL8 と $\Delta 16$ -NtARL8 に共通して見られ、その領域の構造の揺らぎを示唆している。それに対して $\Delta 16$ -NtARL8 の GTP-like 型構造では GDP 型に比べ均一なシグナルを与える。これは得られた両構造の熱力学的特徴をよく反映していると考えられる。今後はこれらの解析の精密化とともに、得られた情報を基にウイルス複製複合体における NtARL8 の機能解明へ向けていきたい。

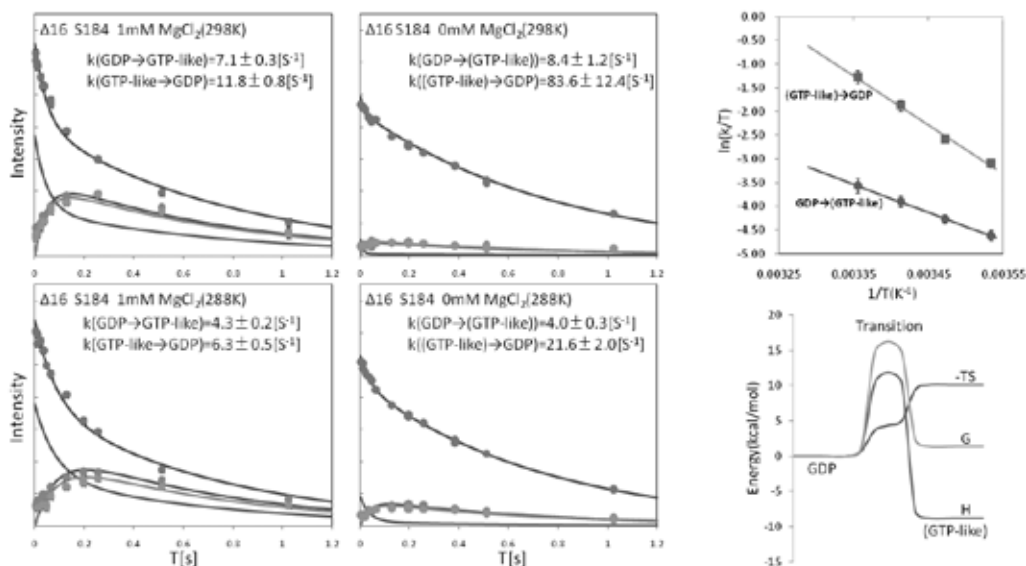


Fig. 3 ZZ-exchange peak intensity profiles for S184 of $\Delta 16$ -NtARL8 in 20mM sodium phosphate buffer (pH 7.0), 100mM NaCl with or without 1mM $MgCl_2$, and Eyring plots and energy diagrams for $\Delta 16$ -NtARL8 conformational changes in the buffer solution without $MgCl_2$ at 298K.

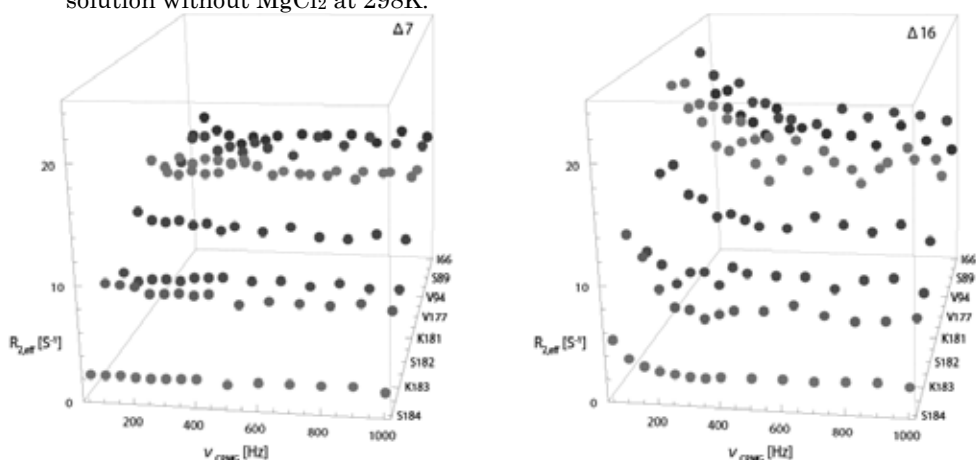


Fig. 4 ^{15}N R_2 relaxation dispersion profiles at 600 MHz 1H Larmor frequency for representative residues of $\Delta 7$ -NtARL8 and $\Delta 16$ -NtARL8

残余双極子相互作用を用いたタンパク質・DNA 複合体 立体構造の精密化

○山崎和彦^{1,2}、木川隆則^{2,3}、渡部暁²、山崎智子¹、井上真²、
関原明⁴、篠崎一雄⁴、横山茂之^{2,5}

¹産総研・年齢軸生命工学研究センター、²理研・生命分子システム基盤研究領域、

³東工大院・総合理工、⁴理研・植物科学研究センター、⁵東大院・理

Refinement of structure of protein-DNA complex using residual dipolar couplings

○Kazuhiko Yamasaki^{1,2}, Takanori Kigawa^{2,3}, Satoru Watanabe², Tomoko Yamasaki¹,
Makoto Inoue², Motoaki Seki⁴, Kazuo Shinozaki⁴, and Shigeyuki Yokoyama^{2,5}

¹Age Dimension Research Center, AIST, Tsukuba, Japan, ²RIKEN Systems and Structural Biology Center, Yokohama, Japan, ³Interdisciplinary Graduate School of Science and Engineering, Tokyo Institute of Technology, Yokoyama, Japan, ⁴RIKEN Plant Science Center, Yokohama, Japan, ⁵Graduate School of Science, Univ. of Tokyo, Tokyo, Japan

NOE-based structure determination of a protein-DNA complex tends to be inaccurate in the intermolecular contacting region, where the proton density is relatively low. To refine the structure, residual dipolar couplings of both the protein and DNA may be useful, which constrain the relative position of the two molecules. We applied this method to the complex of the plant-specific WRKY transcription factor DNA-binding domain and a recognition DNA, and labeled the DNA thymine bases as well as the protein with ¹⁵N isotope. A structure with RMSD of 1.4 Å for the all non-hydrogen atoms was obtained, which enabled us to understand the sequence recognition mechanism.

【目的】 NMR 法によるタンパク質・DNA 複合体の立体構造決定においては、X 線結晶解析法と比較し、特に接触面において構造が不正確になる傾向が否めない。これは、DNA の塩基やリン酸基との接触においては、Lys、Arg 残基の先端の ¹H シグナルを観測しづらい部分や、Asp、Glu、Ser、Thr 残基の酸素原子などが、静電的相互作用や水素結合に関与することが多く、その結果、観測可能な ¹H 間の近接が接触により誘起されにくいことが理由に挙げられる。近年、¹H-¹H NOE 主体の計算手法に、残余

残余双極子相互作用、タンパク質・DNA 複合体、安定同位体標識

○やまさきかずひこ、きがわたかのり、わたなべさとる、やまさきともこ、
いのうえまこと、せきもとあき、しのぎかずお、よこやましげゆき

双極子相互作用(residual dipolar coupling, RDC)を加えることにより、より精密な立体構造を得ることが行われ、一般的になりつつある。RDC による束縛は、NOE と比較して遠距離に効果をもたらす特性があり、複合体中の分子間の相対位置の精密化に資すると予想できる。私たちは、タンパク質に加えて、DNA の塩基を ^{15}N 標識し、N-H 基の RDC を測定することによって、より精密な立体構造決定を試みた。

適用した複合体は、主として病虫害応答に関与する植物特異的 WRKY ファミリー転写因子の亜鉛結合性 DNA 結合ドメイン (WRKY ドメイン) とその認識配列である W-box (TTTGACC) をもつ二重鎖 DNA である。私たちは、植物特異的転写因子群に対する構造プロテオミクス研究の一環として、この WRKY ドメインの β シートからなる立体構造を決定し、DNA 添加による化学シフト変化量の解析により、複合体のモデルを提案した (文献 1)。本研究では、複合体の立体構造を決定し、配列認識機構を明らかにすることを目的とし、RDC を併用した解析を行った。

【方法】 シロイヌナズナ AtWRKY4 タンパク質の C 末端側 WRKY ドメイン (Val399-Ala469) の ^{15}N 標識体を、無細胞合成系によって発現、調製した。 ^{15}N thymidine phosphoramidite (CIL) を用いた化学合成により、16mer 二重鎖 DNA (5'-CGCCTTTTGACCAGCGC-3'/5'-GCGCTGGTCAAAGGCG-3'; 下線は W-box 配列) の 5 つのチミン(T)塩基の ^{15}N 標識を行った。タンパク質と DNA の 1:1 複合体を調製し、0.4-0.5 mM の濃度とした。DMX-750 (Bruker) の装置を用いて、IPAP(in-phase/antiphase)-HSQC (文献 2) を測定し、 ^1H - ^{15}N coupling 値を取得した。12mg/ml の Pfl ファージ(ASLA biotech)の添加によって alignment を誘起し、RDC 値を得た。これに加え、NOE や、タンパク質内の水素結合、DNA の base pair の平面性を維持するための constraints、亜鉛イオンに関する constraints 等を用いて CNS による構造計算を行った。計算は 3 段階に分け、1) タンパク質部分に対する random conformation を初期構造とする simulated annealing、2) B 型 DNA を共存させ、simulated annealing、3) タンパク質に亜鉛を導入し、さらに simulated annealing を行った。RDC の constraints は 1) のプロセスでは導入せず、2)のプロセス以降において導入した。Alignment tensor の axial component (D_a)と rhombic component (D_r)は、構造計算のエネルギー値を指標とした grid search 法 (文献 3) により決定した。NOE と RDC の violation を指標として、最終構造の選別を行った。RDC の計算値と実験値の比較などの解析は、自作の FORTRAN プログラムを用いて行った。

【結果・考察】 ^{15}N 標識した WRKY ドメインと ^{15}N 標識した T 塩基を含む二重鎖 DNA を 1:1 で混合し、IPAP-HSQC の測定を行った (Fig.1)。12mg/ml の Pfl phage の添加により、顕著なブロードニングが生じたが、5 個全ての T 塩基の N3-H3 ベクトルに関す

る RDC の値を得た。N3-H3 ベクトルは塩基対形成のための水素結合に関わり、塩基対平面上にある。タンパク質主鎖 N-H (88 個) やアルギニン側鎖 Nε-Hε (3 個) についても、RDC 値を得た。

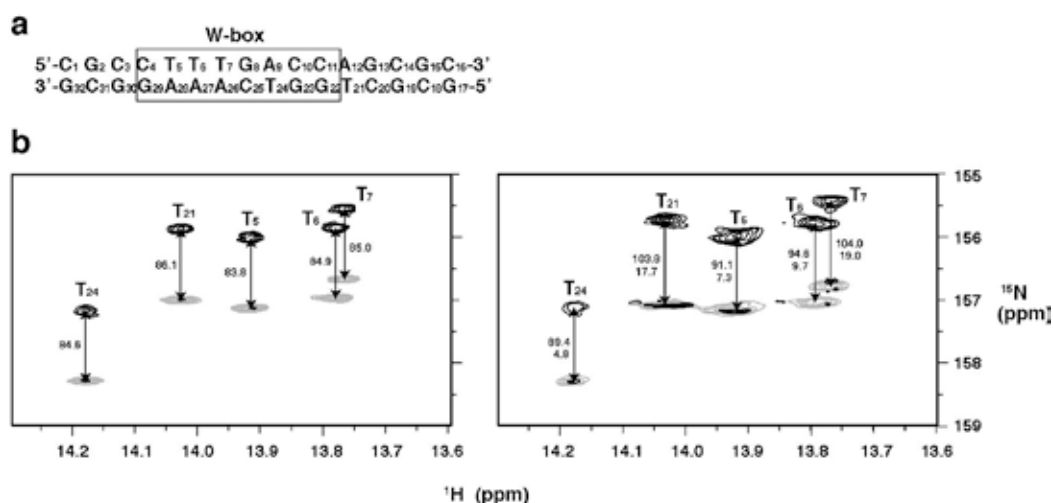


Fig. 1: IPAP-HSQC spectra of the WRKY-DNA complex. a) sequence of the double strand DNA used in the experiment, where the box indicate the putative recognition sequence of WRKY domains, W-box. b) IPAP-HSQC spectra in the DNA imide region, where the N3-H3 cross-peaks of the five labeled T bases are observed. Peaks in black and grey are from the two subspectra of IPAP-HSQC, after addition or subtraction. The sample for the spectra in the right panel contains 12mg/ml Pf1 phage. Splitting values as well as RDCs (lower, in the right) in Hz are shown inside the spectra.

既に解析して得られている NOE や水素結合情報などと併せて、WRKY-DNA 複合体の立体構造を計算した (Fig.2)。収束度 (RMSD) は、タンパク質と、DNA のうちタンパク質と接触している 7 塩基対領域の非プロトン原子について、1.39 Å の値を示した。なお、構造計算を RDC なしで行った場合の収束度は 1.62 Å、またタンパク質の RDC のみで行った場合も 1.60 Å であり、DNA 部分の RDC が複合体構造の収束度に寄与することが示された。また、RDC の計算値と実験値の違いは平均 0.3Hz 程度であった。Alignment に関する z 軸、x 軸も、ensemble の各構造間で非常によく一致した。WRKY ドメインは 4 つのストランドからなる逆平行βシート構造であるが、最も N 末端に位置するβストランド (β1) が、DNA の major groove に沿うように入って塩基と接触することが明らかになった。この様式は、タンパク質の DNA 添加による化学シフト変化値の解析で得たモデル (文献 1) と基本的に一致しているが、DNA の軸とタンパク質のシートのなす角度が若干異なる。なお、このストランドは、WRKY ファ

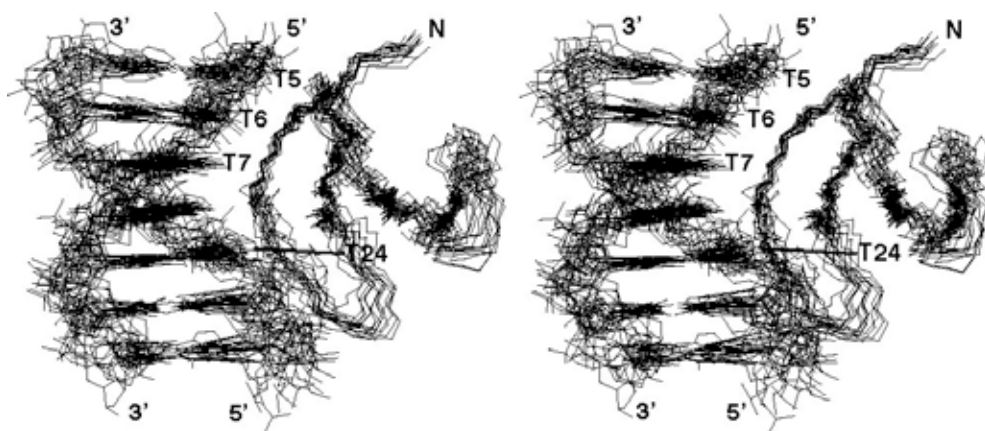


Fig. 2: Solution structure of WRKY-DNA complex. Structure ensemble shown in stereo, where T bases in this region are marked.

ミリーの名前の由来となっている、極めて保存性の高い Trp414-Arg415-Lys416-Tyr417-Gly418-Gln419-Lys420 (WRKYGQK) 配列を中心としている。

DNA の塩基部分とタンパク質の接触面においては、T 塩基のメチル基への接触が非常に多く観察された。W-box 中に含まれる 4 つの T 塩基のメチル基はいずれもタンパク質と接触しており、特に、T6 と T24 のメチル基が β 1 の主鎖と疎水性相互作用を形成している点は特徴的である。すなわち、T6 のメチル基は Tyr416 の C α と、T24 のメチル基は Gly418 の C α と相互作用している。T24 はさらに、Tyr431 の芳香環などと広い範囲で接触をしている。

本研究では、これらの疎水性相互作用の重要性を検証するために、5 つの T 塩基をそれぞれ U に置換した (すなわちメチル基を除いた) DNA を合成し、表面プラズモン共鳴法による結合実験を行った。結合定数は、T6 と T24 を置換した場合、それぞれ、約 1/10、1/25 に低下した。T7 を置換した場合も約 1/2 に低下したが、T5 や T21 を置換した場合は低下がほとんど見られなかった。結合定数の低下の度合いは、本複合体モデル中の接触の度合いと、明らかに傾向が一致しており、複合体モデルの信頼性を裏付けるものと考えられる。

【参考文献】

1. Yamasaki, K., Kigawa, T., Inoue, M., Tateno, M., Yamasaki, T., Yabuki, T., Aoki, M., Seki, E., Matsuda, T., Tomo, Y., Hayami, N., Terada, T., Shirouzu, M., Tanaka, A., Seki, M., Shinozaki, K., and Yokoyama, S. *Plant Cell* 17, 944-956, 2005.
2. Ottiger, M., Delaglio, F., and Bax, A. *J. Magn. Reson.* 131, 373-378, 1998.
3. Clore, G. M., Gronenborn, A. M., and Tjandra, N. *J. Magn. Reson.* 131, 159-162, 1998.

長いRNAの構造解析をめざした部位特異的安定同位体標識

篠阿弥宇¹, 今井美咲¹, 伊谷野悠里¹, 斉藤裕之¹, 福田健治²,
○河合剛太¹

¹千葉工大・工・生命環境科学, ²太陽日酸・SI合成研

Site-specific stable-isotope labeling toward the structural analysis of larger RNA

Amiu Shino¹, Misaki Imai¹, Yuri Iyano¹, Hiroyuki Saito¹, Kenji Fukuda², ○Gota Kawai¹

¹Department of Life and Environmental Sciences, Chiba Institute of Technology, Japan.

²Tsukuba Laboratory SL, Taiyo Nippon Sanso Corporation, Japan.

RNA is now known to have variety of biological functions and, thus, structure of functional RNA domains must be analyzed. In order to challenge to RNA domains consists of more than 100 residues, methods for site-specific stable-isotope labeling of larger RNA is required.

In this presentation, we introduce two techniques for labeling of larger RNA by (1) chemical synthesis of RNA fragment with stable-isotopically labeled phosphoramidite unit, and (2) enzymatic ligation of labeled RNA fragments. 135nt RNAs corresponding to the tRNA-like structure located at the 3'-terminus of *Brome mosaic virus* genomic RNA were prepared by the combination of the two techniques and NMR spectra of those were measured. These techniques will increase the length of RNA to be analyzed by NMR.

序論

近年, ncRNAが生体内に数多く存在し, 遺伝子制御・細胞分化など多くの重要な機能を担っていることがわかってきた. また, 動物や植物に感染するウイルスでRNAゲノムをもつものも多く, これらに含まれる機能ドメインの構造を明らかにすることは重要である. しかし, これら機能ドメインは百残基を超える大きさであることが多く, NMRによるこれまでの手法では解析が難しい.

本研究では, 比較的長いRNA (数百残基) の構造と機能を解析するための技術を開発することをめざし, 標識アミダイトユニットを用いた標識RNAの化学合成およびRNA連結酵素による連結反応を利用して, 長いRNAを部位特異的に標識し, 構造情報を得ることをめざしている.

今回は, 植物ウイルスである*Brome mosaic virus* (BMV) のゲノムおよびサブゲノムRNAの3'末端に存在する約160 残基からなる機能ドメインであるtRNA-like structure (TLS) を題材とした (Fig. 1) .

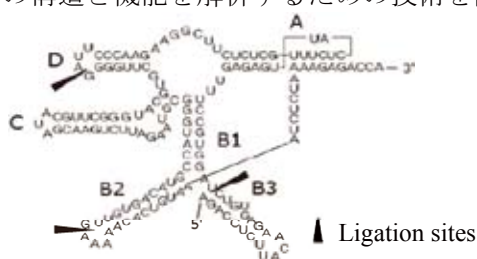


Fig. 1 Secondary structure of BMV TLS.

RNA, 安定同位体標識, 植物ウイルス

しのあみう, いまいみさき, いやのゆり, さいとうひろゆき, ふくだけんじ,
○かわいごうた

方法

RNA自動合成機Expedite 8909 (PerSeptive Biosystems) を用いてRNA断片を合成し、T4 RNA ligaseを用いて連結反応を行った。135残基RNAの転写合成は、BMV RNA4のクローンからPCR法によって鋳型DNAを合成し、AmpliScribe T7 (Epicentre) を用いて行った。BMV RNA4のcDNAクローンは三瀬和之博士 (京都大学) より分譲された。

結果

Fig. 2は、TLSを調製するための連結反応のスキームを示している。今回は、最初の2段階までの合成を行った。Fig. 3は連結反応後の反応液を変性PAGEで分析した結果である。

1段階目の反応ではおよそ50%程度の連結が確認でき、2段階目ではさらに高い連結効率であることがわかる。連結反応を用いて合成したRNAと転写反応によって1段階で合成したRNAのイミノプロトンスペクトルはほぼ一致した。したがって、配列だけでなくコンホメーション的にも転写物と同一のRNAが得られていることが確かめられた。

Fig. 4は、135残基中の2残基のみを選択的に $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 標識したRNAの ^{13}C - ^1H SQCスペクトルを示しており、2つのアデノシン残基に由来するH2およびH8のシグナルが観測されている。このRNAは、自動合成機によって部位特異的に2残基のみを標識したRNAを合成し、それを2段階目の反応に用いて調製したものである。このように、化学合成および連結反応を利用して、部位特異的に標識した長いRNAを調製し、そのNMRスペクトルを測定することができることを実証した。

考察

私たちはこれまでにHIV-1ゲノムRNAの二量体化開始部位由来の39残基RNA (二量体として78残基) の立体構造を決定したが、これはNMR法によって決定されたもっとも大きいRNAの一つである。本手法を活用することによって、さらに長いRNAの立体構造が解析できると期待している。

本研究は、JSTによる産学共同シーズイノベーション化事業および理化学研究所・先端研究施設供用イノベーション創出事業のサポートを受けています。



Fig. 2 Preparation of TLS by 3 step ligation.

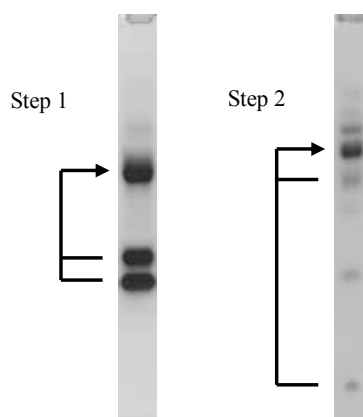


Fig. 3 Results of Ligation reaction.

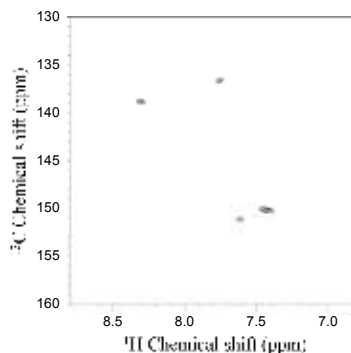


Fig. 4 ^{13}C - ^1H SQC spectrum of a 135 residues TLS prepared by ligation with a fragment having two [$^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$]adenosine residues.

Structural analysis of the catalytic center of an artificial ligase ribozyme○Hirotsu Meya¹, Yoshiya Ikawa^{2,3}, Gota Kawai¹, Taiichi Sakamoto¹¹Department of Life and Environmental Sciences, Chiba Institute of Technology.²Department of Chemistry and Biochemistry, Graduate School of Engineering, Kyushu University, ³PRESTO, Japan Science and Technology Agency (JST).

An artificial ligase ribozyme consisted of a designed RNA scaffold and a selected active site has been obtained and biochemical studies revealed that the ribozyme requires Mg^{2+} ions. To investigate structure-function relationship of the ribozyme, we analyzed the tertiary structure of the catalytic core (L24) of the ribozyme and the interaction between L24 and metal ions. The calculated structures of L24 were converged well in the stem regions. To improve the convergence of the calculated structures of L24, we will introduce information from residual dipolar couplings into the structure calculation. It was suggested, by a titration experiment with $Co(NH_3)_6^{3+}$, that metal ions bind to the internal loop.

序論

近年, 既知の RNA 構造体を組み合わせてモデリングした RNA 構造体に 30 残基のランダム配列を挿入し, *in vitro* selection 法によって ligation 反応を触媒する人工 ribozyme が作製された¹⁾ (Fig. 1). この ligase ribozyme の反応には, Mg^{2+} イオンが必要であることがわかっている²⁾. 本研究では, この ribozyme の触媒メカニズムを明らかにすることを目的とし, 活性中心を構成する 24 残基の RNA 断片 (L24) をデザインし, 立体構造の解析および金属イオン結合部位の解析を行った.

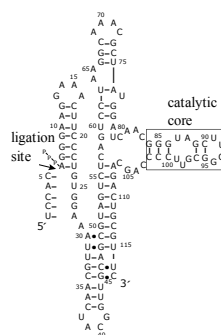


Fig. 1 Secondary structure of the ligase ribozyme.

方法

[NMR スペクトルの測定および立体構造計算]

L24 を 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.5) に溶かし, 500 MHz および 600 MHz の NMR 分光計 (Bruker) を用いて, 283 K および 310 K において NMR スペクトルを測定した. 立体構造計算は, CNS を使い, Simulated Annealing 法で行った.

[$Co(NH_3)_6^{3+}$ を用いた金属イオン結合部位の解析]

L24 と hexamine cobalt (III) ($Co(NH_3)_6^{3+}$) をモル比 1 : 1 になるように混合し, 軽水中において 2D HOHAHA スペクトル, 2D NOESY スペクトルを測定した.

ribozyme, ligase, 金属イオン

○めやひろたつ, いかわよしや, かわいごうた, さかもとたいいち

結果および考察

[NMRスペクトルの測定および立体構造計算]

重水中で、2D NOESYスペクトルを測定し、NOEシグナルの帰属を行った。その結果、H2/H6/H8-H5/H1'領域のほぼすべてのNOEシグナルを帰属できた。しかし、他の領域では、内部ループに由来するシグナルが重なっていることがわかった。NOESYスペクトルから185個の距離情報を抽出した。また、HOHAHAスペクトルから7個のリボースパッキング情報を得た。さらに、すでに構造が明らかとなっているUUCGテトラループの二面角情報およびA型らせん等の情報を加えて立体構造計算を行った。その結果、上部ステム部分および末端ステム部分について、平均構造に対するr.m.s.d.を求めたところ、それぞれ1.24 Å, 1.74 Åであり、ほぼ収束していた。しかし、分子全体では収束しておらず、原因として、内部ループに由来するシグナルの重なりにより、NOE情報が少なくなったことが考えられる。今後は、内部ループに由来するNOEシグナルの重なりを解消するために、部分標識したL24を用いた内部ループのNOEシグナルの解析を行う。さらに、構造の精密化を行うため、残余双極子相互作用の情報を導入する。

[Co(NH₃)₆³⁺を用いた金属イオン結合部位の解析]

Mg(H₂O)₆²⁺とCo(NH₃)₆³⁺はほぼ同じ大きさで、RNAとCo(NH₃)₆³⁺の間で特徴的なNOEシグナルが観測されることから、金属イオン結合部位の解析には、Co(NH₃)₆³⁺を用いた。Co(NH₃)₆³⁺非存在下および存在下のHOHAHAスペクトルを比較した結果、多くのピリジン残基のH5-H6の相関シグナルがシフトしており、特に、U6およびU17に由来するシグナルが大きくシフトしていた (Fig. 2)。Co(NH₃)₆³⁺存在下のNOESYスペクトルを帰属した結果、3.5 ppm のCo(NH₃)₆³⁺に由来するシグナルとG4およびG5のイミノプロトンシグナルの間にNOEシグナルが観測された (Fig. 3)。

H5-H6の相関シグナルのシフトおよびイミノプロトンとCo(NH₃)₆³⁺の間のNOEシグナルから、L24の金属イオン結合部位は、内部ループ周辺であることが示唆された (Fig. 4)。金属イオンが結合したことによる内部ループの構造の変化が、Ligase ribozymeの活性に関与しているかもしれないので、今後、金属イオン存在下で構造解析を試みる。

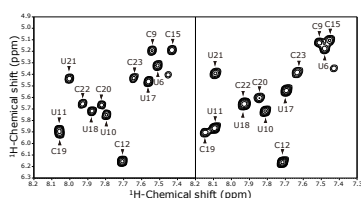


Fig. 2 2D HOHAHA spectra in the absence (left) and presence (right) of Co(NH₃)₆³⁺.

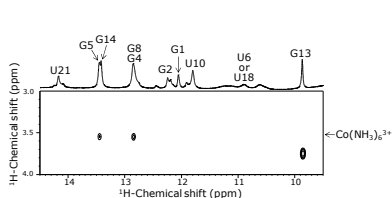


Fig. 3 2D NOESY spectrum in the presence of Co(NH₃)₆³⁺.

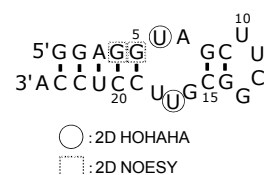


Fig. 4 Secondary structure of L24 and residues affected by Co(NH₃)₆³⁺.

- 1) Ikawa, Y., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 13750-13755 (2004).
- 2) Horie, S. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **339**, 115-121 (2006).

In-cell NMR法を用いた生細胞内におけるプロテインG B1 ドメインの高次構造解析

○花島 知美^{1,2}, 浜津 順平^{1,2}, 白川 昌宏^{2,3}, 三島 正規^{1,2}, 池谷 鉄平^{1,4}, Peter Güntert^{1,4}, 伊藤 隆^{1,2}
(¹首都大院・理工, ²CREST/JST, ³京大院・工, ⁴Frankfurt大・生物
物理化学研究所)

Structure determination of protein G B1 domain in living cells by in-cell NMR spectroscopy

○Tomomi Hanashima^{1,2}, Junpei Hamatsu^{1,2}, Masahiro Shirakawa^{2,3}, Masaki Mishima^{1,2}
Teppei Ikeya^{1,4}, Peter Güntert^{1,4}, and Yutaka Ito^{1,2}
(¹Dept. of Chem., Tokyo Metropolitan Univ., ²CREST/JST, ³Dept. of Eng., Univ. of Kyoto,
⁴Institute of Biophysical Chemistry and Center for Biomolecular Magnetic Resonance, J. W.
Goethe-Univ. Frankfurt)

In-cell NMR spectroscopy yields multi-dimensional NMR spectra of macromolecules in living cells. We reported the first 3D protein structure calculated exclusively on the basis of information obtained in living cells.

In this presentation, as an another demonstration of our methodologies for protein structural analyses *in vivo*, we report in-cell NMR studies of *Streptococcus* protein G B1 domain overexpressed in *E. coli* cells. For backbone and side-chain resonance assignments, we measured and analysed the 3D triple-resonance NMR spectra. Rapid data collection using nonlinear sampling, combined with maximum entropy data processing, was the key for the spectral analyses of G B1. This method provided 3D NMR spectra of much higher quality than conventional spectra recorded in the same short measurement time. All backbone resonances of G B1 have been assigned exclusively from the data obtained in living *E. coli* cells. Side-chain analysis, collection of NOE-data distance restraints and three dimensional structure determination of G B1 in *E. coli* cells is in progress.

【序】 単離・精製した蛋白質の高次構造解析は、NMR や X 線結晶構造解析などにより日常的に行われているが、このような構造生物学的解析を、生細胞内環境で行うことは不可能であった。そのため、細胞内の蛋白質の構造やダイナミクスを高分解能で測定する in-cell NMR という手法が注目されている。わたしたちは既に in-cell NMR を用いて、世界で初めて生細胞内の蛋白質の高次構造解析に成功した[D. Sakakibara *et al. Nature* (2009)]。この研究において、大腸菌内で発現させた高度好熱菌 *Thermus*

In-cell NMR, 異種核多次元NMR, 立体構造

○はなしまともみ, はまつじゅんぺい, しらかわまさひろ, みしままさき, いけやてつぺい, ぺーたー ぎゅんたー, いとうゆたか

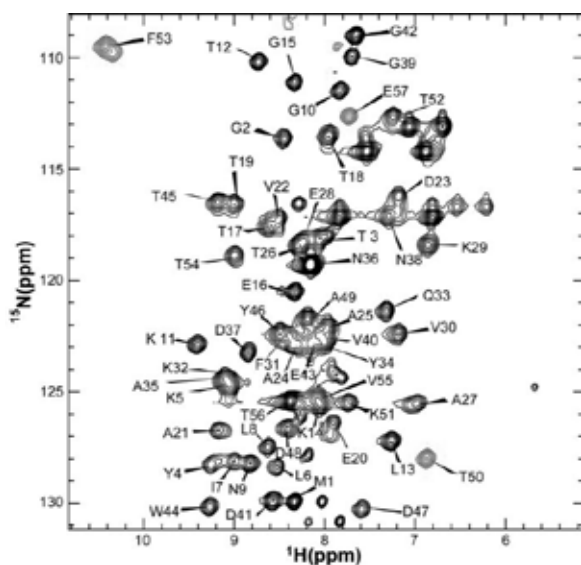
thermophilus HB8 由来蛋白質 TTHA1718(66a.a.)の高分解能な構造を得た。

本研究では、わたしたちの手法の次なる応用例として、*Streptococcus* protein GB1(57a.a.)をターゲット試料とし in-cell NMR による構造解析を試みた。異種核 3 次元 NMR 測定を迅速に行うため、非線形サンプリング法を用いて測定を行い、最大エントロピー法でスペクトルを再構築することで、測定時間の短縮を図った。

【実験、結果および今後の展望】 ターゲット試料 GB1 を大腸菌発現系を用いて調製し in-cell NMR 測定を行った。蛋白質主鎖の帰属のため、 $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 均一標識試料を調製し、3 種の 3 重共鳴 3 次元 NMR 測定 (HNCA, CBCA(CO)NH, HBHA(CBCACO)NH) を行った。非線形サンプリング法を用いて測定を行い、最大エントロピー法でスペクトルを再構築することで、短時間で良好なスペクトルを得ることに成功し、全ての主鎖シグナルの帰属が完了した(Figure)。蛋白質側鎖の帰属のため、さらに 2 種の 3 重共鳴 3 次元 NMR 測定 (CC(CO)NH, HCC(CO)NH)の測定を行った。

また、NOE 由来の高次構造情報の取得も試みた。同様に非線形サンプリング法を適用することによって、短時間で良好な ^{15}N -separated NOESY-HSQC, ^{13}C -separated NOESY-HSQC の測定に成功した。現在、さらなる側鎖の帰属と NOE 解析のための 3 次元 NMR 測定及び解析を行っており、高次構造決定を目指す。

Figure (a)



(b)

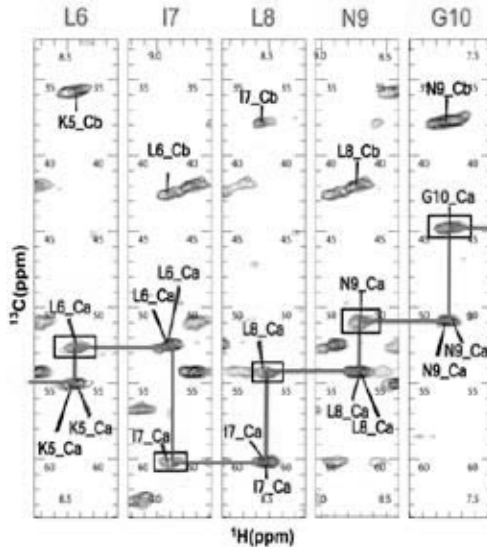


Figure:

(a) The ^1H - ^{15}N HSQC spectrum of the $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -labelled GB1 in *E. coli* cells. Cross peaks are labelled with their corresponding backbone assignments.

(b) Overlaid ^1H - ^{13}C cross-sections of the 3D HNCA and CBCA(CO)NH spectra corresponding to the ^{15}N frequencies of residues from Leu6 to Gly10. Sequential connectivities are represented by lines. Intrasidue correlations are indicated with boxes.

In-cell NMR による TTHA1718 蛋白質の生細胞内における分子動態解析

○浜津順平^{1, 2}, 花島知美^{1, 2}, 三島正規^{1, 2}, 池谷鉄平³, Peter Güntert³,
白川昌宏^{2, 4}, 伊藤隆^{1, 2}

¹首都大・院理化, ²CREST/JST, ³フランクフルト大, ⁴京大・院工

Structural and dynamical studies of TTHA1718 protein in living cells by in-cell NMR spectroscopy

○Junpei Hamatsu^{1,2}, Tomomi Hanashima^{1,2}, Masaki Mishima^{1,2}, Teppei Ikeya³,
Peter Güntert³, Masahiro Shirakawa^{2,4}, and Yutaka Ito^{1,2}

¹Department of Chemistry, Tokyo Metropolitan University; ²CREST/JST; ³Institute of Biophysical Chemistry, J.W. Goethe-University Frankfurt, Germany; ⁴Graduate School of Engineering, Kyoto University

In-cell NMR has been used to detect various intracellular events such as conformational changes, dynamics and binding events in bacterial cells. Very recently, we reported the high resolution 3D structure of a putative heavy metal binding protein TTHA1718 from *Thermus Thermophilus* HB8 in living *E. coli* cells.

In this presentation, we report our recent studies of TTHA1718 focused on identifying the “in-cell” effects. NMR studies on the mutants that lack metal-binding activity suggested that interactions with metal ions in the *E. coli* cytosol may affect the conformation of the metal-binding region. Furthermore, we will discuss the effect of intracellular environment to protein dynamics based on the ¹⁵N relaxation parameter measured both *in vivo* and *in vitro*.

【序】 これまで In-cell NMR を利用した研究例として、大腸菌細胞内における蛋白質の構造変化やリガンドとの相互作用の解析などが報告されている^{1,2}。また、ヒト培養細胞へ膜透過性ペプチドを利用して目的蛋白質を導入し、NMR 測定を行う新たな手法を用いた研究例も報告されている³。当研究室ではごく最近、測定法の改良、および試料調製法の最適化を行うことで、大腸菌大量発現系を利用した in-cell NMR により高度高熱菌 *Thermus Thermophilus* HB8 由来の TTHA1718 蛋白質の生細胞内における立体構造決定に成功した⁴。

本研究では、細胞内環境が及ぼす蛋白質の立体構造、および動的性質への影響を解明するため、TTHA1718蛋白質をターゲットとし、大腸菌細胞内試料、および単離・精製試料中での立体構造の差異の検証、および蛋白質主鎖の¹⁵N核の緩和解析を試みた。

【実験、結果および今後の展望】 TTHA1718蛋白質は CXXC motif を持つことから重金属結合活性を持つと考えられている。TTHA1718蛋白質の大腸菌細胞内試料、および単離・精製試料から得られた、CXXC motif 近辺の残基由来のNMRシグナルから化学シフトの変化が確認され、立体構造においても CXXC motif の近辺にわずかな構造

In-cell NMR, 立体構造, ダイナミクス

○はまつじゅんぺい, はなしまともみ, みしままさき, いけやてつぺい,
ぺーたーぎゅんたー, しらかわまさひろ, いうゆたか

の差異が確認された。この構造の差異の要因を検証するため、CXXC motif の二つの Cys 残基を Ala, または Ser に組み換えた二つの二重変異体を作成し、大腸菌細胞内試料、および単離・精製試料で重金属イオン存在下、および非存在下での NMR 測定を行った。各試料から得られた NMR シグナルの解析を行った結果、二つの二重変異体からは野生型 TTHA1718 蛋白質に見られた化学シフト変化は見られず、生細胞内におけるわずかな構造の差異はこの蛋白質の金属結合活性が関与していることが示唆された。

^{15}N 核の緩和解析では、一般的には 2D ^1H - ^{15}N HSQC 測定を利用した T_1 , T_2 測定を行うが、測定に数時間必要とするため大腸菌細胞内試料では測定中の試料状態の経時変化が懸念される。そのため、Lys選択的 ^{15}N 標識試料を用い、1D ^1H - ^{15}N HSQC 測定を利用した T_1 , T_2 測定を行うことで、TTHA1718蛋白質の一部の動的性質の情報を得るとともに、大腸菌細胞内試料でも 2D ^1H - ^{15}N HSQC 測定を利用した T_1 , T_2 測定が適用可能であるかを検討した。単離・精製試料、および大腸菌細胞内試料から得られたデータを比較した結果、細胞内と細胞外でのTTHA1718蛋白質の回転相関時間には顕著な差があり(Figure1, Table1), 大腸菌細胞内試料の粘性の寄与に加え、いわゆる“Macromolecular crowding”からの動的性質への影響の可能性が伺われた。現在、均一に ^{15}N 標識した試料を用い、2D ^1H - ^{15}N HSQC 測定を利用した T_1 , T_2 測定を行い、細胞内におけるTTHA1718蛋白質の全領域での解析を行っており、その結果もあわせて報告する。

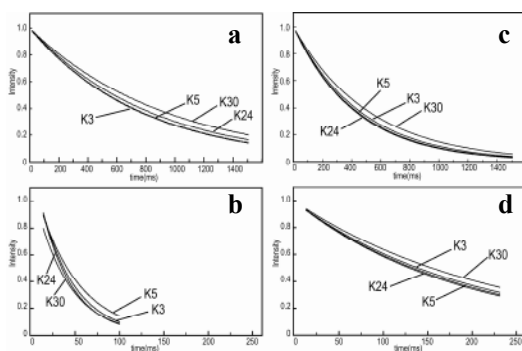


Figure 1: ^{15}N T_1 and T_2 data for the backbone amide ^{15}N nuclei of lysine residues of TTHA1718 in *E. coli* cells (a and b) and *in vitro* (c and d) are displayed with their single-exponential least-squares best-fit curves.

Residue	Relaxation times (mean and s.d.)			
	T_1 (ms), in-cell	T_1 (ms), <i>in vitro</i>	T_2 (ms), in-cell	T_2 (ms), <i>in vitro</i>
Lys3	835 ± 15	466 ± 3	44.3 ± 3.1	201 ± 2
Lys5	767 ± 64	431 ± 26	47.8 ± 2.8	193 ± 1
Lys20		413 ± 3		174 ± 1
Lys20/Lys49	807 ± 18		43.5 ± 1.2	
Lys23		433 ± 1		184 ± 1
Lys24	763 ± 42	429 ± 3	36.8 ± 2.2	187 ± 1
Lys30	939 ± 76	525 ± 2	41.9 ± 5.2	223 ± 1
Lys37		424 ± 5		191 ± 2
Lys37/Lys61	946 ± 32		52.2 ± 2.1	
Lys49		453 ± 1		190 ± 1
Lys61		536 ± 7		230 ± 2

Table 1: ^{15}N T_1 and T_2 relaxation times for backbone ^{15}N nuclei of lysine residues of TTHA1718 in *E. coli* cells and *in vitro*, at a spectrometer frequency of 600 MHz and a temperature of 310 K.

【参考文献】

- 1) Serber, Z. et al. *J. Am. Chem. Soc.* 123, 2446–2447 (2001).
- 2) Dedmon, M. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 12681–12684 (2002).
- 3) Inomata, K. et al. *Nature*, 458, 106–109 (2009).
- 4) Sakakibara, D. et al. *Nature*. 458, 102–105 (2009).

酸化ストレス防御に関わる転写コアクチベーターMBF1と転写制御因子AP-1との複合体構造解析

○川崎久美子¹, 永井義崇¹, 広瀬進², 白川昌宏³, 伊藤隆¹, 三島正規¹

¹首都大・理工・分子物質化学

²国立遺伝学研究所・個体遺伝・形質遺伝

³京大・工・分子工

Structural studies of the complex of transcriptional coactivator MBF1 with transcriptional factor AP-1 related to oxidative stress

○Kumiko Kawasaki¹, Yoshitaka Nagai¹, Susumu Hirose², Masahiro Shirakawa³, Yutaka Ito¹, and Masaki Mishima¹

¹Graduate School of Science and Engineering, Tokyo Metropolitan University, Tokyo, Japan.

²Department of Developmental Genetics, National Institute of Genetics, Shizuoka, Japan.

³Graduate School of Engineering, University of Kyoto, Kyoto, Japan.

MBF1, a transcriptional coactivator, which bridges between the general transcriptional factors and the bZIP type transcriptional factors. It has been reported that MBF1 null *Drosophila* shows a remarkable phenotype under the oxidative stress, such as a shortened life span.

MBF1 prevents Cys229 of the transcriptional factor Jun from oxidation by interacting and covering with the basic region including the cysteine residue. To elucidate the mechanism transcriptional activation under oxidative stress by MBF1, we attempted to determine 3D structure of the MBF1/Jun/Fos/DNA AP1-site quaternary complex. To date, we have succeeded in the 3D structure determination of *Drosophila* MBF1 alone, and in forming the complex *in vitro*. We will present structural analysis of the complex by NMR

<序論>

MBF1 (Multiprotein Bridging Factor-1) は bZIP 型転写制御因子と基本転写因子 TBP (TATA-box Binding protein) の両者に結合し、転写コアクチベーターとして働くことが知られ、古細菌から真核生物まで進化的に保存される重要な因子である (Fig. 1)。また、最近の研究から MBF1 欠損のショウジョウバエは酸化ストレス環境下で短寿命になることが知られ、MBF1 が酸化ストレス防御に大きく関与していると考えられる。

分子レベルでは *Drosophila* MBF1 が、Jun, Fos から成る bZIP 型ヘテロダイマー転写因子 AP-1 の、Jun と相互作用することが明らかになっている。Jun の Cys229 が酸化されると Jun/Fos の DNA への結合活性が著しく減少することが知られているが、MBF1 は酸化還元状態に感受性の高いこの Cys229 が存在する Jun の塩基性領域と直接相互作用し、Jun の Cys229 の酸化を防止することで AP-1 site への結合活性を調節すると考えられている。

MBF1, 転写因子, 酸化ストレス

○かわさきくみこ, ながいよしたか, ひろせすすむ, しらかわまさひろ, いうゆたか, みしままさき

本研究では MBF1 による酸化ストレス耐性の分子レベルでの詳細を明らかにするため、*Drosophila* MBF1/Jun/Fos/DNA AP-1 site の複合体の立体構造解析を目指し、現在までに MBF1 単体の NMR による立体構造解析に成功している。その結果、N 末端側約半分はフレキシブルで、C 末端側約半分にヘリックス構造が 4 本存在しており、DNA 結合タンパク質によくみられるヘリックスターンヘリックスに類似した構造をとっていることがわかっている(Fig. 2)。

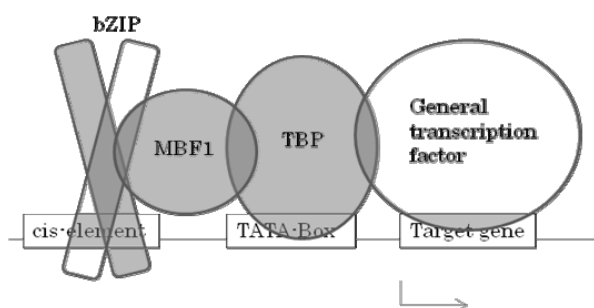


Fig. 1 Schematic representation of MBF1 in transactivation.

MBF1 bridges between the general transcriptional factor TBP and the bZIP type transcriptional factors.

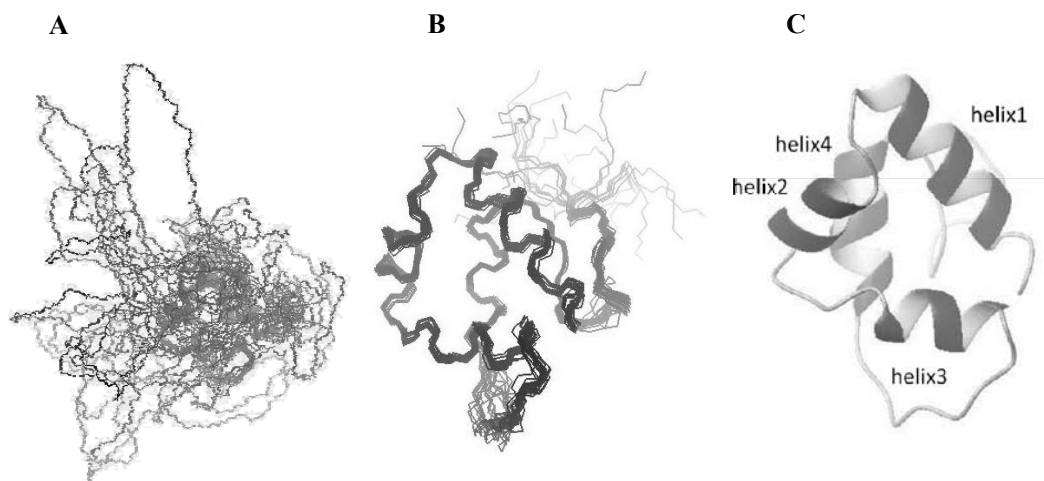


Fig. 2 MBF1 structures.

A. 20 ensemble structures of full length *Drosophila* MBF1. N-terminal part (1-72) does not adopt a well defined structure. **B.** 20 ensemble structures of *Drosophila* MBF1 (73-145). **C.** Ribbon model of the representative structure of *Drosophila* MBF1(73-145).

<実験>

1. GST タグ融合 Jun の発現・精製

当初 His タグ融合の Jun を発現・精製していたが、この方法で得た試料は濃度、純度ともに低かった。そこで、Jun を GST タグ融合に変えての発現・精製を行った。GST

タグ融合 Jun のプラスミドを作製、発現を確認し ^{15}N 標識 Jun の大量発現を行った。DEAE、GSH Sepharose に通し、GST タグを切断、ゲル濾過クロマトグラフィーを行い、GSH Sepharose にもう一度通し、タグとプロテアーゼの除去を行った。濃縮して NMR サンプルとし、HSQC 測定を行った。

2. Jun/Fos の共発現

GST タグ融合 Jun, His タグ融合 Fos がそれぞれ含まれるプラスミド DNA を形質転換した大腸菌を準備した。発現させた。Jun、Fos の両方が共発現していることを確認できたため、この菌体を用いて大量培養を行うこととした。bZIP 型タンパク質に関して、二量体形成時に Mg^{2+} が結合することが知られており、各精製段階でのバッファーにマグネシウムが常に過剰量存在する条件で精製を行うことで、タンパク質の安定化を図った。

3. Jun/Fos と AP-1 site, MBF1 との結合実験

Jun/Fos が結合する DNA AP-1 site を、GSH Sepharose カラム精製後に Jun/Fos 溶液に加え、Jun/Fos の DNA AP-1 site 結合部のフレキシブルな部分を結合させることで安定化することを試みた。

<結果・考察>

1. Jun の発現・精製方法の改善

Jun 単独の精製では、ゲル濾過クロマトグラフィーの結果、カラムの排除体積の分画に Jun が溶出された。これは、Jun どうしの非特異的な結合により、凝集を起こしていたためと考えられる。HSQC 測定の結果得られたスペクトルでも、中央にピークが集まり、解析が困難なものであった。この測定のサンプルに DNA、Fos、MBF1 を添加して再び HSQC を測定したが、スペクトルに顕著な変化はなく、それぞれとの相互作用は確認できなかった。Jun 単独の試料は極めて不安定であることがわかったため、次のような、Jun の発現、精製方法の改善を行った。

Jun/Fos を共発現させ精製し、あらかじめ AP1-site を添加したのち、ゲル濾過クロマトグラフィーを行うと、それまで排除体積の分画にでていた Jun/Fos が、通常の方画に溶出されるようになった(推定分子量約 5 万)。よって、非特異的な結合が改善され、単分散状態の Jun/Fos/AP1-site を得ることに成功したと考えている。Jun/Fos/AP1-site 複合体の分子量は大きなものであるため、Jun/Fos を重水培地で培養・共発現させ、TROSY 法を用い測定を行ったところ、比較的分離のよいスペクトルを得ることができた(Fig.3)。

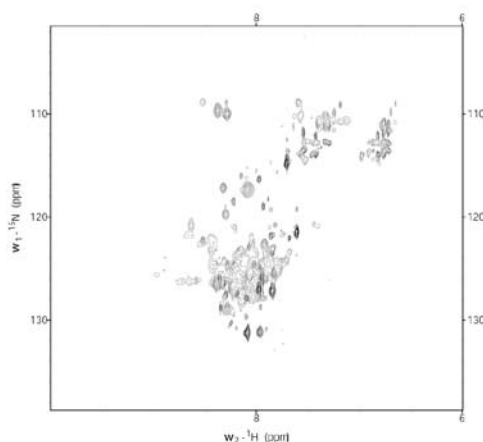


Fig. 3 TROSY spectrum
 ^2H , ^{15}N labeled Jun/Fos in complex with nonlabel AP-1 site, Mg^{2+} (5 mM)

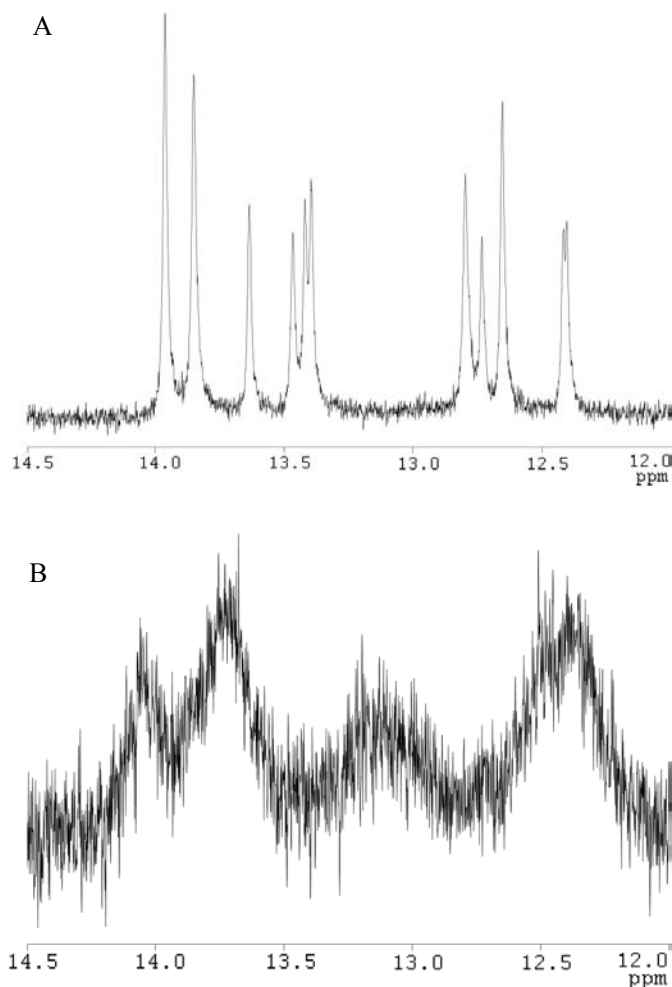


Fig. 4 ^1H spectra of imino region

A. AP-1 site alone B. Jun/Fos/AP1-site

Jun/FosのTROSYスペクトルに著しい改善がみられ、イミノ領域のスペクトルも改善した。この詳細は本討論会において議論する。

<今後の展望>

Jun、Fos、DNAの3者が結合し、NMRで解析可能なスペクトルを確認できたので、目的とするJun/Fos/CREとMBF1との複合体を形成させ、立体構造を明らかにしていく。現在までの予備的な実験から、Jun/Fos/AP1-site(CRE)とMBF1の相互作用は安定な強いものではなく、過渡的なものである可能性が高いので、分子間のParamagnetic Relaxation Enhancementの観測といった手法も用いて解析していきたい。

2. AP1-site と Jun/Fos との相互作用

また、AP1-siteのイミノ領域のスペクトルを測定し、DNA側からの観測によっても、精製したJun/fosとAP1-siteとの相互作用を確認した(Fig. 4)。

スペクトルの変化から相互作用は確かであるが、予想以上の信号の広幅化が見られた(Fig. 4)。

そこでDNAの配列の検討を行った。全体で非対象な配列であるAP1-siteに対し、認識配列が等価であるヘテロダイマーのJun/fosが2種類の方向の向きで結合すると考えられる。そのため、NMRスペクトルが複雑になっていると推測された。次にDNAの配列を対称にすることでより簡潔なスペクトルへ改良を試みた。AP1の中央に一塩基対加わったCREの配列では完全に対称なDNA配列となる。CRE配列を使うことで、より分離したスペクトルが期待でき、実際にCRE配列を用いて同様の実験を行ったところ、Jun/Fos/CREでは

PREを用いたRho-kinase スプリットPHドメインの構造解析

佐藤明子¹, ○金場哲平¹, 寺脇慎一², 伊藤隆¹, 天野睦月³, 貝渕弘三³, 箱嶋敏雄², 三島正規¹

¹首都大院・理工

²奈良先端科学技術大学院・情報科学

³名古屋大・医学

Structural studies of split PH domain of Rho-kinase using paramagnetic relaxation enhancement

Akiko Sato¹, ○Teppei Kanaba¹, Shinichi Terawaki², Yutaka Ito¹, Mutsuki Amano³, Kozo Kaibuchi³, Toshio Hakoshima² and Masaki Mishima¹

¹Graduate School of Science and Engineering, Tokyo Metropolitan University

²Graduate School of Information Science, Nara Institute of Science and Technology

³Graduate School of Medicine, Nagoya University

Rho-kinase, an effector of Rho small GTPase, plays a crucial role in regulation of cytoskeleton. Rho-kinase has the split PH domain consists of the PH subdomain and the C1 subdomain. Interestingly, the C1 subdomain is inserted in the middle of the PH subdomain. Although each tertiary structures of these subdomains were already reported⁽¹⁾, the structure of whole split PH domain is still unknown. Structure determination of the split PH domain including the orientation between the PH subdomain and the C1 subdomain is crucial for understanding its function. In this study, we report three dimensional structure of intact split PH domain using paramagnetic relaxation enhancement (PRE) and multidimensional NMR spectroscopy.

【序論】

Rho-kinase は細胞増殖因子などの信号を受けた低分子 G 蛋白質 Rho により活性型となり、その下流の細胞骨格系蛋白質をリン酸化する。このリン酸化により細胞分裂や神経突起の縮退などの重要な生命現象を制御している。Rho-kinase は N 末端にキナーゼドメイン、中央に Rho 結合領域を含むコイルドコイルドメイン、C 末端に PH ドメインを持つ。この PH ドメインは、その配列の途中にシステインに富む領域(C1 サブドメイン)が挿入されている独特なドメインであり、近年、スプリット PH ドメインと呼ばれるようになった。このスプリット PH ドメインはキナーゼドメインと相互作用し自己阻害することにより Rho-kinase の活性を制御している。またキナーゼドメインから解離した PH ドメインはリン脂質や細胞表層に存在する蛋白質と相互作用することで Rho-kinase の局在を決定していると考えられる。このようにスプリット PH ド

Rho-kinase, スプリットPHドメイン, 常磁性緩和効果

さとうあきこ, ○かなばてつぺい, てらわきしんいち, いとうゆたか, あまのむつき, かいぶちこうぞう, はこしまとしお, みしままさき

インは酵素活性制御、細胞内局在の決定という Rho-kinase の活性制御において非常に大きな役割を果たしている。現在までにスプリット PH ドメインの各サブドメインそれぞれの立体構造が決定されている⁽¹⁾。またスプリット PH ドメインは、2つのサブドメインが動的平衡状態にあり、揺らいだ立体構造を有していることが明らかとなっている。このような動的平衡状態にある分子については、従来法である X 線結晶構造解析や NOE を用いた立体構造決定は困難である。しかし Rho-kinase の活性制御には 2つのサブドメインが協同して機能していることが予想されるため、Rho-kinase の機能解明においてはサブドメイン間の配向を含めたスプリット PH ドメイン全体の立体構造決定が必要と考えられる。本研究ではスプリット PH ドメインによる Rho-kinase の活性制御の詳細な分子機構の解明を目的に、常磁性緩和効果(PRE)を、多次元 NMR により観測するという手法により各サブドメイン間の配向を含めたスプリット PH ドメイン全体の立体構造を決定した。

(1) Wen, W., et al. *J. Biol. Chem.*, 283(38), 26263-26273 (2008)

【実験】

大腸菌の発現系を用い、安定同位体標識をした Rho-kinase スプリット PH ドメイン (1151-1350, RhoK_{SPH}) を発現させた。RhoK_{SPH} は GST タグ融合の蛋白質として発現させた。GSH カラムを使用したアフィニティークロマトグラフィー、PreScission Protease によるタグの分離、ゲルろ過クロマトグラフィーにより精製した。RhoK_{SPH} について ¹H-¹⁵N HSQC、HNCACB、HN(CO)CACB、HNCA、HN(CO)CA、HN(CA)CO、HNCO を測定し、主鎖シグナルの帰属を行った。また、側鎖の帰属のため 3 次元 C(CO)NH、H(CCO)NH、距離情報のため 4 次元 ¹³C/¹⁵N separated NOESY を測定し、帰属を試みた。これらの測定では試料を重水素化することによりシグナル感度の上昇を図った。データプロセスには NMRPipe、スペクトルの解析には Sparky を用いた。

スプリット PH ドメインの全体構造を決定するため、スピンラベルによる PRE を観測した。スピンラベルは部位特異的に導入したシステインにラジカル試薬 PROXYL を付加させる方法を用いた。スピンラベルの位置を一箇所に限定するため、ネイティブのシステインをセリンに置換したミュータントを作成する必要がある。RhoK_{SPH} には C1 サブドメインに存在する亜鉛結合モチーフと考えられるシステインの他に配位に関与しないシステインが 2 個存在する。そのシステイン (C107、C150) をセリンに置換したミュータント C107SC150S を作成した。スペクトルの帰属のために ²H, ¹⁵N, ¹³C 標識をした RhoK_{SPH} C107SC150S について主鎖の帰属に必要な各種 3 次元の測定を行い、主鎖の帰属を行った。次にラジカル試薬を付加させるために特定の残基をシステインに置換したミュータントを複数種類作成した (C150S, V49CC107SC150S, N123CC107SC150S、それぞれ 150C, 49C, 123C にラジカルが付加)。スピンラベルの位置は Wen らの決定した各サブドメインの立体構造を元に、表面露出度 30 パーセント以上であり、二次構造上に存在する残基を選択した。NMR サンプルに PROXYL を添加することでシステイン残基にラジカルを導入し、¹H-¹⁵N HSQC を測定した。更に基準

スペクトルを得るため、測定後の試料にアスコルビン酸を添加することでラジカルを除去し、同様の測定を行った。二つのスペクトルのシグナル強度の変化から、距離情報を取得し、この距離情報を用いて構造計算を行った。構造計算に用いたサブドメイン内の構造情報は、側鎖シグナルの帰属が現在解析中であるので、Wenらの構造情報をPDB (Protein Data Bank) より入手し、使用した (PDB ID : PHサブドメイン2ROV、C1サブドメイン2ROW)。

【結果】

RhoK_{SPH} C107SC150Sについて主鎖シグナルの帰属を完成させた。ミュータントのシグナルの帰属はRhoK_{SPH} C107SC150Sの帰属を元に2D ¹H-¹⁵N HSQCにより行った。スピラベル存在下でのシグナル強度(I_{PRE})とスピラベルを除去した後のシグナル強度(I_{ref})の比をとった(Fig.2)。それぞれのミュータントで異なったパターンのシグナルの消失、または強度の減少が見られた。これはスピラベルからの距離が近く、常磁性緩和効果を受けたものだと考えられる。強度比によって設けた距離制限情報と各サブドメインの構造情報をもとにCYANA ver 3.0により予備的な構造計算を行った。得られたスプリットPHドメインの立体構造をFig.2に示す。これは、2つのサブドメインが動的平衡状態にある中から過渡的にサブドメイン間に相互作用が生じている構造のうち、あるポピュレーションで存在する構造、あるいはそのそれらの平均構造が決定できたと考えられる。またAPBSを用いてこの構造の静電ポテンシャルを計算した(Fig.3)。これによりRho-kinaseのスプリットPHドメインには2つのサブドメインに渡って大きな正に帯電した分子表面が存在することが明らかとなった。

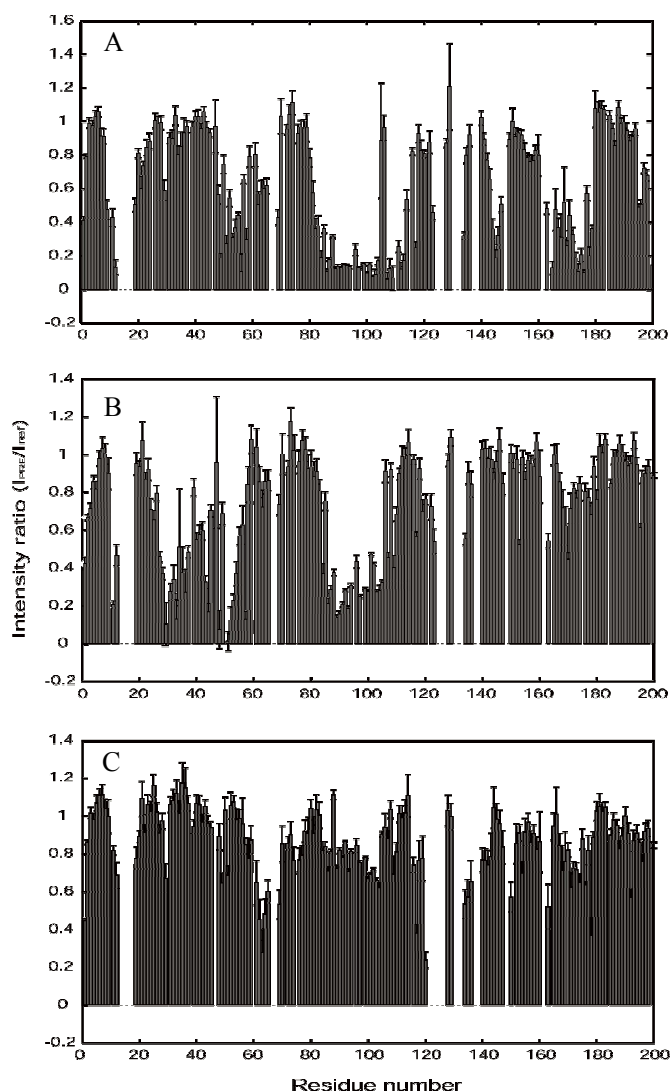


Fig.1 The plots of signal intensity ratio of Rho-kinase mutants.
(A)C150S, (B)V49CC107SC150S, (C)N123CC107SC150S with error bars.

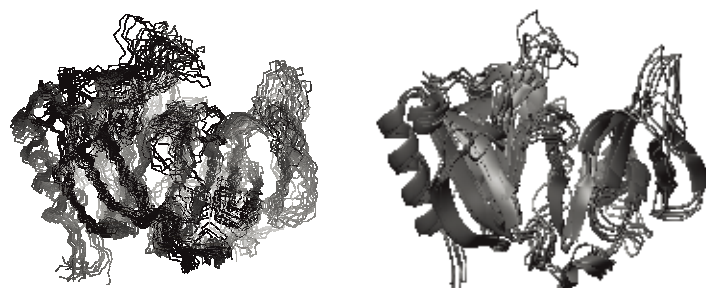


Fig.2 Structure of the split PH domain of Rho-kinase.

Best-fit superimposition of the final 20 simulated annealing structures (A) and final 10 ribbon models (B). Average backbone RMSD to the mean : $3.01 \pm 1.01 \text{ \AA}$.

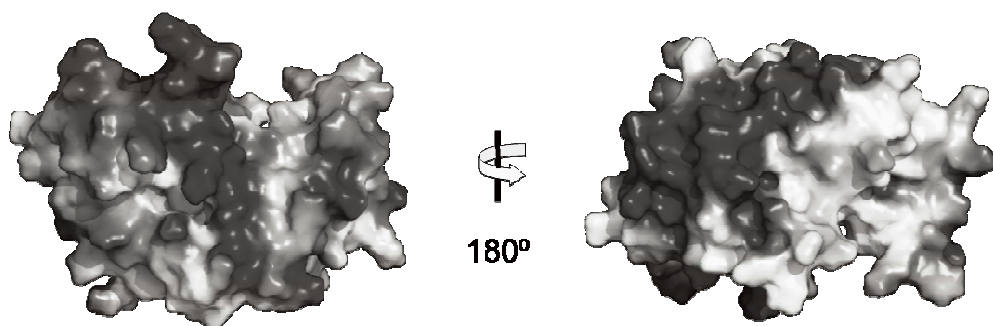


Fig.3 The electrostatic potentials mapped on the molecular surface of the split PH domain.

Molecular orientation of the left image is same as Fig. 2, and right image is 180° rotated. Positively charged regions are dark.

【考察】

構造計算によりスプリットPHドメインは、2つのサブドメインどうしが近づき、特徴的に正電荷を帯びた一つの大きなドメインのような立体構造をとっていることが明らかになった。この正に帯電した分子表面がスプリットPHドメインと他の分子との相互作用に関与している可能性があると考えられる。実際にスプリットPHドメインとの相互作用が報告されている蛋白質との結合実験を行った結果、両サブドメイン上の正に帯電する分子表面の領域で結合することを確認している。2つのサブドメインが平衡状態にある揺らいだ構造をもつ中でも、他の蛋白質との相互作用に都合のよい構造がすでにあるポピュレーションで存在する構造が存在することは、大変興味深い。

【展望】

今回決定したスプリットPHドメインの構造は十分に収束していない低分解能なものであった。今後はより多くのPRE実験を行い、距離制報を増やし、また最適化することにより、立体構造の精密化を目指す。また精密化した構造を元に、他の蛋白質や膜との相互作用と立体構造の関連についても議論していきたい。

溶液NMRによる転写抑制因子SHARP/SMRT複合体の立体構造及び機能解析

○三神すずか, 伊藤隆, 三島正規
首都大・有機構造生物化学研

Structural and functional studies of transcriptional corepressor SHARP/SMRT complex by solution NMR

○Suzuka Mikami, Yutaka Ito, and Masaki Mishima
Department of Chemistry, Tokyo Metropolitan University.

SHARP is a component of transcriptional repression complex in Notch/RBP-J κ signaling pathway. SHARP recruits HDAC complex regulates transcription at the chromatin level. SHARP has three RRM domains at N-terminal part and the SPOC domain at C-terminal. The SPOC domain binds the C-terminal tail of SMRT. However, it was not reported the structure of this complex. In this study, we aimed to determine the structure of SPOC/SMRT complex and establish the structural basis for mechanism of transcriptional repression by SHARP. We will present biochemical and solution NMR study for the complex.

SHARPはspenタンパク質(多様なシグナル経路において重要な転写因子の発現を制御するタンパク質)のひとつであり、現在、Notch/RBP-J κ シグナル経路における転写抑制因子複合体の構成要素として認識されている。Notch/RBP-J κ シグナル経路は多細胞において進化上よく保存された経路であり、発生過程や幹細胞における細胞運命決定に関与している。

SHARPのSPOCドメイン(アミノ酸残基3496~3664)はSMRTのC末端(アミノ酸残基2492~2517)と複合体を形成する。SMRTはヒストン脱アセチル化酵素のHDACと複合体を形成しており、これと、クロマチン構造付近に局在するSHARPが結合することで、クロマチン構造レベルでの転写調節が行われていると考えられている。また、SHARPはRNA結合ドメインRRMsを有しており、ノンコーディングRNAとして唯一その転写活性化機能が知られるSRAと結合することが明らかになっている。このように、アクチベーター、コリプレッサーの両者に結合可能なSHARPの機能は転写調節において重要である。私たちはSHARPのSPOCドメインとSMRTに注目し、その複合体の立体構造及びその転写抑制の分子機構を明らかにすることを目的としている。

[実験]

大腸菌の大量発現系を用い、GSTタグ融合のSPOCドメインを発現・精製した。SPOCと化学合成したSMRTペプチド間の解離定数を求めるため、SPRを用いた結合実験を行った。SMRTペプチドはアミノ酸残基2492~2517までの25残基で、N末端がビオチン化されたものを使用した。得られた結果から、SPOCとSMRTの結合に最適な条件を検討し、この条件下で同発現系を用いて ^{13}C 、 ^{15}N 同位体標識をしたSHARPと化学合成したSMRTペプチドの結合実験を行った。SHARP単体の状態とSMRTと複合体を形成した状態のそれぞれについて各種多次元NMR測定(HNCACB, CBCA(CO)NH, HN(CA)CO, HNCO)を行い、主鎖の帰属を行った。その帰属結果をもとに決定したSMRTとの結合に重要と考えられるアミノ酸残基をすでに報告されているSPOCドメインのX線結晶構造上にマッピング

転写抑制、クロマチン

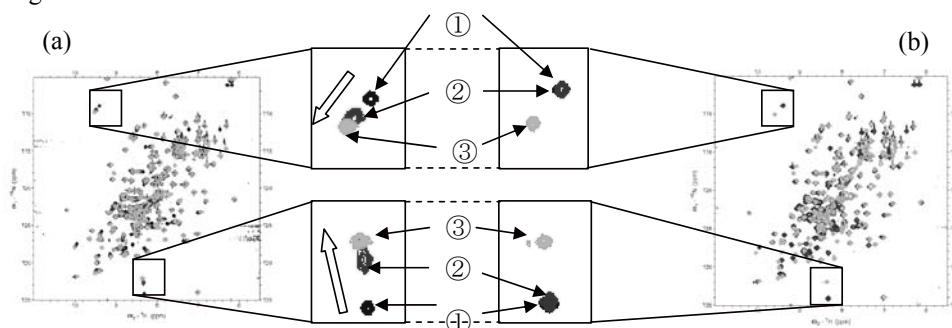
○みかみすずか、いとうゆたか、みしままさき

し、SPOCドメインのSMRT認識部位を特定した。

[結果・考察]

SPRを用いた実験により、SHARPと化学合成したSMRTペプチド間との解離定数を求めた。条件検討の結果、ある条件下では通常の1000倍近くの結合 (10^{-8} M) を示すことがわかった。実際に溶液NMRを用いた結合実験においても、通常の条件下ではSPOC単独の状態のスペクトルから複合体型のスペクトルへの変化がfast exchangeであったのに対し、特定の条件下ではslow exchangeになった。

Fig1



<Fig1> Comparison of ^{15}N - ^1H HSQC spectra. Observed chemical shift changes in fast exchange (a) and slow exchange (b). Three spectra are overlaid in both of panels (a) and (b). ①, ② and ③ correspond to SHARP:SMRT ratios, 1:0, 1:1 and 1:4, respectively.

またSPOC単独及び複合体を形成した状態の二つの主鎖の帰属結果をもとに、その化学シフト変化からSPOCにおけるSMRT結合に関与するアミノ酸残基を特定した。これらのアミノ酸残基をすでに報告されているSPOCドメインのX線結晶構造上にマッピングしたところSPOCドメインの $\beta 3$ がSMRTとの結合に寄与していることがわかった。この $\beta 3$ は結晶構造中でSPOCドメイン同士がパッキングしていた β ストランドに対応しており、 $\beta 3$ が分子間相互作用に使用されることを強く裏付ける結果であるといえる。

[今後の展望]

現在、化学合成したSMRTペプチド(8残基 ; 2510~2517)と複合体を形成したSHARPのSPOCドメイン(^{13}C , ^{15}N 標識したもの)について多次元NMR測定を行っており、複合体型のSHARPの立体構造解析を行っていく予定である。

また、同時に同位体標識したSMRT(2492~2517)を得るため、SMRT大量発現系の構築に取り組んでいる。精製が難しく、現在のところ発現・精製系の確立には至っていないが、今後条件検討を重ねていく予定である。

○吉浦 知絵¹、幸福 裕¹、上田 卓見¹、寺島 裕也^{2,3}、松島 綱治²、
嶋田 一夫^{1,4}

¹東大・院薬系、²東大・院医系、³エフェクター細胞研究所、

⁴産総研 バイオメディシナル情報研究センター

Structural analysis for the interaction between CCR5 and its ligands

○Chie Yoshiura¹, Yutaka Kofuku¹, Takumi Ueda¹, Yuya Terashima^{2,3}, Kouji Matsushima²,
and Ichio Shimada^{1,4}

¹Grad. Sch. Pharm. Sci., the Univ. of Tokyo, Tokyo, Japan. ²Grad. Sch. Med., the Univ. of Tokyo, Tokyo, Japan. ³ECI, Inc., Tokyo, Japan. ⁴BIRC, AIST, Tokyo, Japan.

CC-chemokine receptor 5 (CCR5) belongs to the G protein coupled receptors (GPCRs) family. CCR5 plays important roles in inflammatory responses and its ligands are known as inhibitors of HIV infection. In this study, using a reconstituted HDL (rHDL) system, we have established a new sample preparation method for CCR5 with its functions, which is suitable for NMR analyses. By using this sample preparation method along with the transferred cross-saturation (TCS) method, we demonstrated that valine 63 of MIP-1 α and MIP-1 β , which were not investigated in previous mutational studies, are in close proximity to CCR5.

ケモカイン受容体CCR5 は、G タンパク質共役型受容体(GPCR) に属する膜タンパク質である。CCR5 とそのリガンド(MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES) 間の相互作用は、G_i タンパク質へのシグナル伝達を介し、CCR5 を発現した白血球の遊走反応を誘起する。また、CCR5 はHIV-1 の共受容体であり、CCR5 のリガンドはHIV 感染に競合することが報告されている。このため、CCR5—リガンド間相互作用に関する構造生物学解析は、抗HIV 薬の開発において有用な知見を与えることが期待される。

しかし、CCR5 は発現量が少なく、可溶化状態において不安定である。このため、生物学的活性を保持した状態にてCCR5 を大量調製する手法は確立されておらず、構造生物学的解析は困難であった。

そこで本研究では、脂質二重膜再構成法の一つである再構成HDL (rHDL) を改良し、生物学的活性を保持したCCR5 の大量調製法の確立を目指した。さらに、rHDL に再構成したCCR5 とリガンド間相互作用に関する構造生物学的知見を得ることを目的とし、メチルプロトン検出型 TCS 実験を行った。CCR5 のリガンドである MIP-1 α およびMIP-1 β 分子上におけるCCR5 結合部位を同定することにより、CCR5 のリガンド認識機構の解明を目指した。

GPCR, 転移交差飽和法

○よしうら ちえ, こうふく ゆたか, うえだ たくみ, てらしま ゆうや, まつしま こうじ, しまだ いちお

【方法】 CCR5 は昆虫細胞発現系にて発現した。CCR5 を発現した細胞に対して超音波破碎およびショ糖密度勾配遠心を行い、CCR5 を含む細胞膜画分を得た。膜画分を 1 % n-dodecyl- β -D-maltopyranoside (DDM) を含むバッファーにて可溶化し、その直後に rHDL への再構成を行った。得られた rHDL に対して、Ni アフィニティークロマトグラフィーおよび 1D4 抗体アフィニティークロマトグラフィーによる精製を行い、CCR5-rHDL を得た。

メチルプロトン検出型 TCS 実験には、 $[u\text{-}^2\text{H}, ^{15}\text{N}/(\text{Ile, Leu, Val})\text{-}^{13}\text{C}^1\text{H}_3]$ 標識 MIP-1 α および MIP-1 β を用いた。このリガンド 10 μM に対して CCR5-rHDL を約 1 μM 含む試料を調製した。測定温度を 10 $^{\circ}\text{C}$ とし、TCS 実験を行った。コントロール実験として、CCR5 を含まない rHDL を用いた TCS 実験を行った。

【結果】 (1) CCR5-rHDL の調製

上記の方法により、80 % 以上の純度で CCR5-rHDL を得たことを SDS-PAGE 解析により確認した。また、昆虫細胞 1L 培養から調製した rHDL に含まれる CCR5 の収量は、約 10 μg と見積もられた。

調製した CCR5-rHDL が、構造認識抗体 2D7 との結合活性を保持することを SPR 法により確認した。また、CCR5-rHDL の安定性を評価するため、2D7 結合量の経時変化を調べた。4 $^{\circ}\text{C}$ 、24 時間後にも 85 % の 2D7 結合量が保持されることがわかった。

MIP-1 β を用いたプルダウンアッセイを行い、調製した CCR5-rHDL がリガンド結合活性を保持していることを確認した。さらに、G タンパク質上の GDP-GTP 交換アッセイを行い、CCR5-rHDL がリガンド結合依存的に G α サブユニットへのシグナル伝達を誘起することを確認した。

(2) メチル検出型 TCS 実験

MIP-1 α を用いた TCS 実験では、V59 および V63 の H_γ シグナルにおいて、コントロール実験と比較して有意な強度減少が観測された (Fig.1, 2)。MIP-1 β を用いた TCS 実験では、V25、V26、V63 の H_γ シグナルにおいて強度減少が観測された。

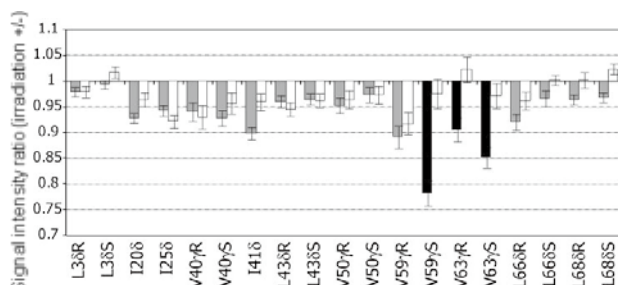


Fig. 1 Result of the TCS experiment of MIP-1 α
 ■: the TCS experiment using CCR5-rHDL
 □: the control TCS experiment using empty-rHDL

【考察】MIP-1 β を用いた TCS 実験において V25、V26 にシグナル強度減少が観測されたことは、V25、V26 に近接する R22 への変異導入により CCR5 との親和性が低下するという報告と対応している。加えて、MIP-1 α 、MIP-1 β とともに、変異導入が行われていない V63 近傍にもシグナル強度減少が観測された。MIP-1 α 、MIP-1 β はともに CCR5 のリガンドであるが、生体内における機能には相違点がある。このため両者の受容体相互作用様式においても、共通点と相違点が存在する可能性が高い。本研究において明らかになった V63 において、MIP-1 α と MIP-1 β は、CCR5 に対する共通の相互作用様式を有すると考えた。

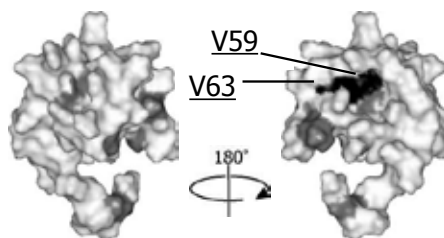


Fig. 2 Mapping of the residues affected by the irradiation on MIP-1 α molecule
 ■: Residues affected by the irradiation
 □: Not affected by the irradiation

プラストシアニンと光合成膜反応蛋白質の高効率電子輸送機構の構造生物学的解明

○古我征道¹, 小笠広起¹, 野本直子¹, 上田卓見¹, 嶋田一夫^{1, 2}

¹東京大学大学院薬学系研究科

²バイオメディシナル情報研究センター (BIRC)、産業技術総合研究所 (AIST)

Structural clarification of the efficient electron transfer mechanism between Plastocyanin and photosynthetic membrane proteins

○Masamichi Koga¹, Hiroki Ogasa¹, Naoko Nomoto¹, Takumi Ueda¹, and Ichio Shimada^{1, 2}

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

²Biomedical Information Research Center(BIRC), National Institute of Advanced Industrial Science and Technology(AIST)

Plastocyanin (Pc) is a copper protein that donates an electron to Photosystem I (PSI) in photosynthesis. The oxidized Pc, which is formed after the electron donation, reportedly has a lower affinity for PSI than the reduced Pc. The rapid dissociation of the oxidized Pc from PSI results in an initiation of another reaction cycle in PSI, which enables the efficient electron transport. Here, we utilized the transferred cross-saturation (TCS) methods to identify the PSI binding interface of the cadmium-substituted Pc (Cd-Pc), which is a diamagnetic analog of the oxidized Pc. G10, S11 and L12 were not included in the PSI binding interface of the Cd-Pc, whereas they were included in that of the reduced Pc. We conclude that the difference is due to the increase of the mobility of L12 induced by the decrease of the distance between H87, which is in close proximity to L12, and the copper ion upon oxidation.

【目的】光合成膜反応は、光のエネルギーをATPやNADPHといった化学エネルギーに変換する、植物の生命に必須な反応である。Plastocyanin (Pc) は可溶性銅結合蛋白質で、光合成膜反応において、膜蛋白質複合体であるPhotosystem I (PSI) に電子を受け渡す。酸化型Pcは、還元型Pcに比べてPSIに対する親和性が10倍程度低いことが明らかになっている。このことは、反応後に生じる酸化型PcがPSIから素早く解離することで次のPc分子が迅速にPSIと結合することを可能とし、その結果全体として電子輸送反応が効率良く起こることを示している。これまでに当研究室では、転移交差飽和法 (TCS法) を用いて、還元型PcのPSIとの結合様式を解明した。しかし酸化型PcのPSI結合様式は不明であった。そこで本研究では、酸化型PcのPSIとの結合様式をNMRにより同定し、還元型PcのPSI結合様式と比較することにより、効率的電子輸送反応の機構を解明することを目的とした。

【方法】酸化型Pcにおける常磁性緩和増大効果を回避するため、反磁性の酸化型Pcアナログである、カドミウム置換体Pc (Cd-Pc) を調製した。Cd-Pcの主鎖NMRシグナルの連鎖帰属を行い、先行文献で報告されたCd-Pcのアミドプロトンの化学シフトと比

光合成, 転移交差飽和,

○こがまさみち, おがさひろき, のもとなおこ, うえだたくみ, しまだいちお

較することにより、立体構造を保持した状態のCd-Pcが単離されたことを確認した。 $[^2\text{H}, ^{15}\text{N}]$ 均一標識Cd-Pc $144\ \mu\text{M}$ に対して非標識PSIミセル $11\ \mu\text{M}$ を混合したサンプルを調製し、転移交差飽和 (TCS) 実験を行った。

【結果と考察】TCS実験で有意な強度減少が観測された残基は、銅イオン近傍の hydrophobic patch およびE59, E60を含む acidic patch 上で連続面を形成していた (Fig. 1, Fig. 2(A))。したがって、この

領域がCd-Pc上のPSI結合界面であると結論した。得られた結合界面を還元型Pc上のPSI結合界面と比較すると、Cd-Pc上の結合界面にはG10, S11, L12が含まれていない点が違っていた (Fig. 2(A), (B))。以上の結果および先行論文で報告されている非結合状態の還元型・酸化型Pcの立体構造の比較から、PSI親和性の減少による効率的電子輸送の機構を、次のように考察した。1. Pcが酸化型になると、銅イオンとH87が近接し、近傍のL12の運動性に変化が生じる。2. その結果、L12ならびに同一ループ上に位置するG10, S11を介したPSIとの相互作用が減弱し、電子移動後のPSIからの素早い解離が実現され、効率的電子輸送反応が起こる。現在、非結合状態の還元型Pc、酸化型PcおよびCd-Pcの構造およびダイナミクスの詳細な比較を行っている。

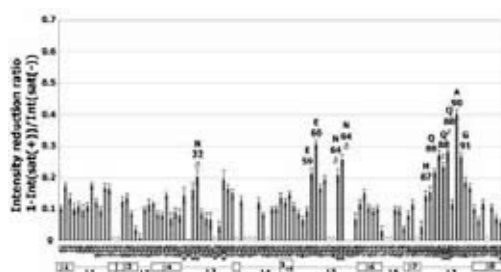


Fig.1 Plot of the peak intensity reduction of Cd-Pc in the TCS experiment with PSI

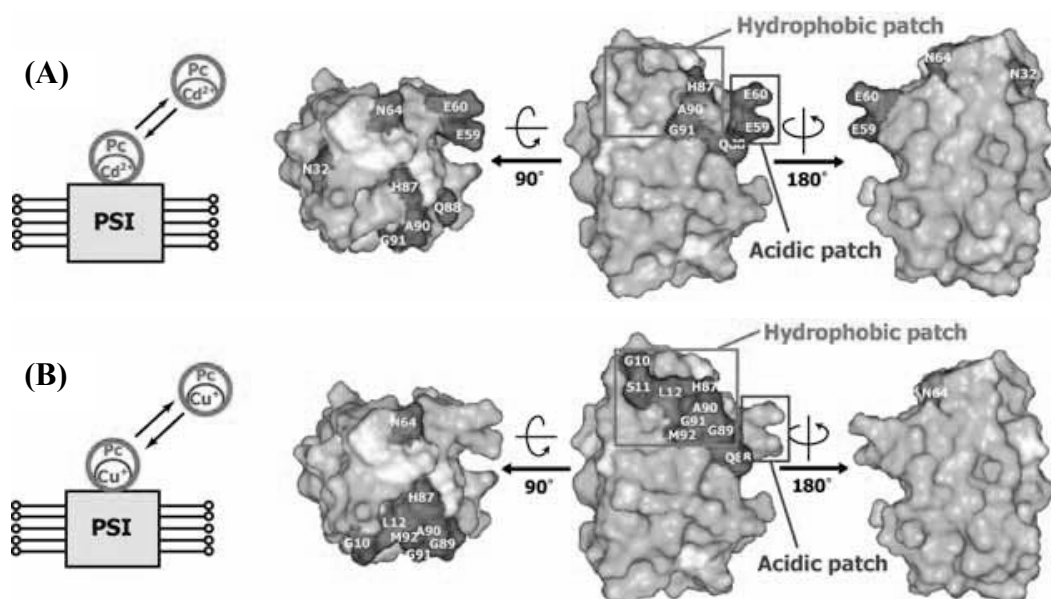


Fig.2 Mapping of the PSI binding interface residues of (A) Cd-Pc and (B) reduced Pc determined by TCS

Assigning carbon and proton signals of mono-3-amino-3-deoxy(2AS, 3AS)- α and β -CyD in D₂O

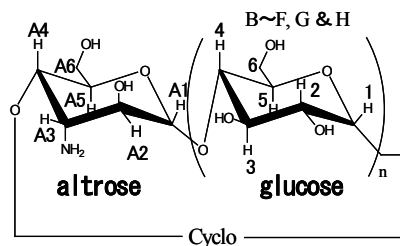
Takahashi Keiko, and ○Keita Andou

Tokyo Polytechnic University, Faculty of Engineering, Department of Life Science and Sustainable chemistry, Kanagawa, Japan.

Many modified cyclodextrins(CyDs) on secondary hydroxyl site have been reported. Since mono-3-amino-3-deoxy(2AS,3AS)-CyDs involve an altrose residue, molecular conformation should be different from that of native CyD. The measurements of proton and carbon resonance for mono-3-amino-3-deoxy(2AS, 3AS)- α , β , and γ -CyDs are performed. All chemical shifts of CyDs has been assigned.

[緒言]

シクロデキストリン(CyD)はグルコースが6, 7および8個 α -1, 4グリコシド結合で環状に結合したオリゴ糖で、空洞の大きさの異なる α , β および γ -CyDがよく知られている。二級位水酸基にアミノ基を導入したmono-3-amino-3-deoxy(2AS, 3AS) α -, β -, および γ -CyD (3A- α , β および γ -CyD) は二級位修飾体の基幹化合物として注目されている¹⁾。これら二級位水酸基にアミノ基を導入したCyDは導入されたグルコースがアルトローズへと変換され、CyD空洞が歪み、アミノ基導入前のCyDよりNMRスペクトルは複雑になっている(Scheme 1)。当研究室ではC₁, C₄炭素の化学シフト値とグリコシド結合二面角の相関性をCyDの α -1, 4グリコシド結合の推測に適用し、CyDの環立体構造について報告している²⁾。本研究では、NMRからCyD環構造を解析するための第一段階として3A-CyD化学シフトの¹H, ¹³Cの全帰属を行い達成したので報告する。

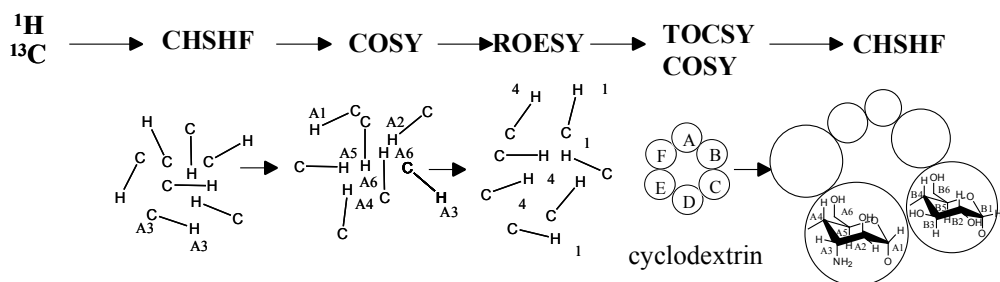
Scheme 1. Structure of 3A- α , β , and γ -CyD

[実験と結果]

測定はJEOL NM-Lambda-500を用い、5φ管中30℃にて行った。試料濃度は27.4mMである。¹H, ¹³Cに続き、2D CHSHFでアルトロース3Aプロトンを確定し、COSYでアルトロース1A, 2A, 4A, 5A, 6Aプロトンを確定した。続いてROESYにてα-1, 4結合の両端のプロトン(B4, F1)を確定し、同様の操作を繰り返しA～F環の全プロトンを確定した。

アミノデオキシ誘導体, シクロデキストリン, アルトロース

たかはしけいこ、○あんどうけいた



Scheme 2. Strategy for assignment of modified CyD derivative.

γ -CyDについても同様に行った(Scheme 2)。構成元素の数が多く ROESY, TOCSYでは相関ピークの重複を避け、帰属を正確に行うためF1, F2-acquisitionパラメーターポイントを同数としての測定が必要であった。

^1H および ^{13}C の全帰属をFig.1に示す。Scheme 2に示した方法は、他のオリゴ糖帰属にも応用でき、有用である。

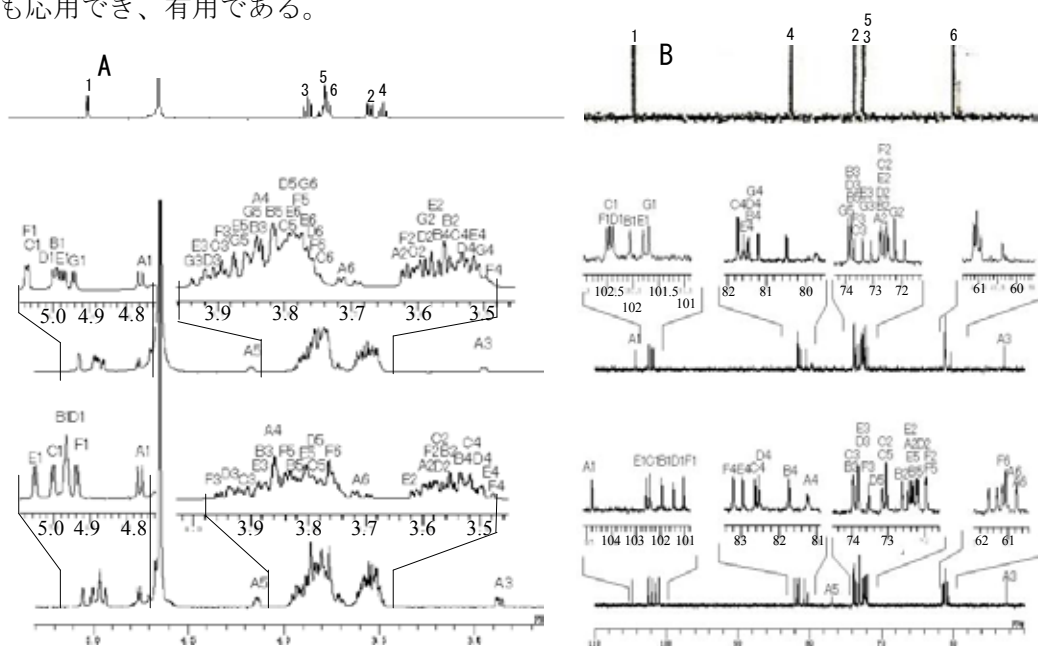


Fig.1. ^1H NMR (A) and ^{13}C NMR (B) spectra of mono-3-amino-3-deoxy(2AS,3AS) α -CyD (bottom), mono-3-amino-3-deoxy(2AS,3AS) β -CyD(middle) and β -CyD(top).

[参考文献]

- 1) Christopher J Easton, Stephen F Lincoln, "Modified Cyclodextrins" Imperial College Press, Singapore (1999).
- 2) Keiko,T.; *Bull.Chem. Soc.,Jpn.*, **66**, 550-554 (1993).

ヒストンアセチルトランスフェラーゼEsa1のクロモドメインのNMRによる立体構造解析

○下條秀朗¹, 佐野徳彦², 森脇義仁¹, 奥田昌彦¹, 堀越正美², 西村善文¹

¹横浜市大・院生命ナノシステム

²東大・分生研・発生分化構造

Structural studies on the presumed chromodomain from a histone acetyltransferase, Esa1

○Hideaki Shimojo¹, Norihiko Sano², Yoshihito Moriwaki¹, Masahiko Okuda¹, Masami Horikoshi², and Yoshifumi Nishimura¹

¹*Department of Supramolecular Biology, Graduate School of Nanobioscience, Yokohama City University, Kanagawa, Japan.*

²*Laboratory of Developmental Biology, Institute of Molecular and Cellular Biosciences, University of Tokyo, Tokyo, Japan.*

Chromodomains are methylated histone binding modules which have been widely studied. Interestingly some chromodomains are reported to bind to RNA and/or DNA, although the molecular basis of their RNA/DNA interactions has not been solved. Essential Sas-related acetyltransferase 1 (Esa1) contains a presumed chromodomain. We initially determined the solution structure of the Esa1 presumed chromodomain and showed it to consist of a well folded structure containing a five stranded β barrel similar to the tudor domain and to have no RNA/DNA binding ability. Since its N-terminus forms a helical turn, we prepared an N-terminally extended version of the protein, which was surprisingly found to bind to poly(U) and to be critical for *in vivo* function. This extended protein contains an additional β -sheet which acts as a knot for the tudor domain. The knot does not globally change the core structure but induces a well defined loop in the tudor domain itself, which is responsible for RNA binding.

真核細胞において染色体 DNA はクロマチン構造をとっている。クロマチンの構成単位はヒストン H2A, H2B, H3, H4 が各二分子からなるヒストンオクタマーに 146 塩基対の DNA が 1.75 回転左巻きに巻きついたヌクレオソームコアである。基本転写因子や RNA ポリメラーゼがプロモーター上に結合して転写反応を開始するにはクロマチンリモデルリングが必要である。クロマチンリモデルリング因子には、ATP 依存的 SWI/SNF 様複合体とヒストンアセチル化酵素 (HAT) の 2 種類がある。これらの因子が協調的に働き RNA ポリメラーゼによる転写が促進される。

Solution structure

○しもじょうひであき, さのりひこ, もりわきよしひと, おくだまさひこ, ほりこしまさみ, にしむらよしふみ

ヒストンの修飾にはアセチル化、メチル化、リン酸化、ユビキチン化、SUMO 化、ADP リボース化が知られている。ヒストンのリジン残基をアセチル化するヒストンアセチル化酵素は、転写、DNA 複製や修復、ヘテロクロマチン形成のような核内プロセスに関係している。配列相同性をもとに分類された p300/CBP、SRC、TAF1、ATF-2、GNAT、MYST ファミリーが知られ、それぞれ特異的にヒストンテールのリジン残基をアセチル化する。MYST ファミリーは様々な生物種で機能が多岐にわたっている。

Esa1 (Essential Sas-related Acetyltransferase 1) は *Saccharomyces cerevisiae* の NuA4 複合体の酵素サブユニットであり、H4/H2A ヒストンをアセチル化する。他のヒストンアセチル化酵素と異なり細胞周期進行に必要で、唯一酵母の生育に必須である。Esa1 にはN末側にクロモドメイン、C末側にMYST-HATドメインがある。(Fig. 1)クロモドメインはメチル化されたヒストン結合モジュールとして広く知られている。しかし、*in vitro*や*in vivo*でRNAやDNAとの結合が報告されているクロモドメインもある。これらRNAやDNAとの結合能が生物学的



Fig. 1 Schematic representation of the Esa1

に重要であることが知られているが、その結合メカニズムはまだ解明されていない。本研究ではNMRを用いて

Esa1 クロモドメインの構造解析し、構造に基づいてEsa1 クロモドメインの新たな知見を得ることを試みた。

酵母由来の Esa1 クロモドメインの大量培養・精製を行った。多次元多種核 NMR 法により、種々の測定により主鎖及び側鎖の帰属、構造計算を行った。また、DNA/RNA との結合実験を行った。

Esa1 クロモドメインとして予測された領域の構造解析を行った。その構造は 5 本の β ストランドからなる β バレル構造であった。このタンパク質の核酸結合実験では、RNA と DNA とともに結合が観測されなかった。先の構造解析の結果、N 末領域に何らかの特定の構造を取るのではないかと考えられたため、新たに N 末を伸ばした領域の構造解析を行った。その構造は β バレル構造に加え、新たに N 末と C 末それぞれの β ストランドによる β シートが形成された。さらに RNA に結合、また DNA に対し弱い結合が観測された。

Esa1 クロモドメインの構造は、SMN タンパク質の tudor ドメインに大変類似していたが、N 末と C 末それぞれの β ストランドによる β シートが新たに形成され tudor ドメインに knot 様構造が付加された新規な構造であった。この knot 様構造が RNA との結合に必要であるが、結合部位ではなく、コアの構造を変化させずにコアに機能が誘起されたと考えられる。

The structural analysis of the nucleosome core by NMR spectroscopy○Yoshihito Moriwaki¹, Masahiko Sato¹, Aritaka Nagadoi¹, Yoshifumi Nishimura¹¹Lab. of Struct. Biol., Grad. Sch. of Supermol. Biol, Yokohama City University, Kanagawa, Japan.

In eukaryotic cells, DNA is stably stored in a highly ordered structure, chromatin. Its fundamental repeating structural unit is a nucleosome core, which is comprised of 147 bp of DNA and a histone octamer, consisting of two copies of histones, H2A, H2B, H3 and H4. Here, we try to clarify the structure of the H2A/H2B complex in solution by NMR; each molecular weight of H2A and H2B is about 14kDa. At first we prepared the recombinant H2A and H2B proteins in *E. coli* by labeling ¹⁵N or ¹⁵N and ¹³C, however the backbone assignments of the complex was very difficult. So now we try to prepare the SAIL-labeled H2A and H2B proteins by using cell-free method.

真核生物のクロマチン構造の単位であるヌクレオソームコアは約 147 塩基対の DNA と 4 種類のヒストン H2A、H2B、H3、H4 の 2 量体からなるヒストン 8 量体で形成されている。ヌクレオソームコア中のヒストンがアセチル化、脱アセチル化、メチル化など様々な修飾を受けることにより、遺伝子の発現は制御される。

X 線結晶構造解析によって、修飾されていないヒストンオクタマーと同じ 73 塩基対が回文配列の 146 または 147 塩基対からなる二重鎖 DNA で構成されたヌクレオソームコアおよび 147 塩基対が 4 回繰り返されたオリゴマーのヌクレオソームコアの立体構造が既に解かれている。しかし、ヌクレオソームコアの溶液中での詳細構造を解析することは、ヒストンタンパク質の修飾の場所・種類や二重鎖 DNA の配列の違いが構造にどのように影響を与えているかを解析し、遺伝子の発現制御を理解する上で必要不可欠である。

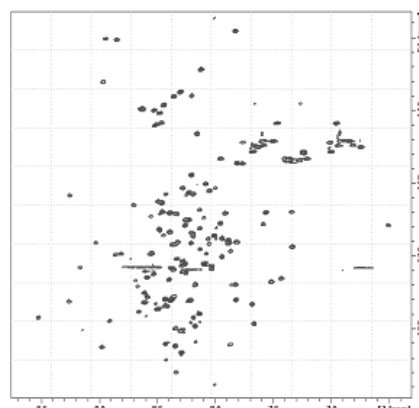


Figure 1. ¹H-¹⁵N HSQC spectrum of the ¹⁵N-labeled H2A/nonlabeled H2B complex.

ヒストン, SAIL, NMR

○ もりわきよしひと, さとうまさひこ, ながどいありたか, にしむらよしふみ

我々は先ず H2A/H2B ヘテロ 2 量体の溶液中での詳細構造を決定し、遺伝子制御機構の理解へとつなげることを目的とした。大腸菌発現系では H2A と H2B は沈殿物に回収されたので、可溶化して H2A/H2B ヘテロ 2 量体を作製した。

Figure 1. に示すように、 ^{15}N -labeled H2A/nonlabeled H2B の ^1H - ^{15}N HSQC 測定に成功した。H2A/H2B 複合体は H2A、H2B どちらも大きさが約 14kDa であり、複合体では 28kDa になる。 ^{15}N , ^{13}C -labeled H2A/nonlabeled H2B を測定したが、現時点で骨格の帰属が困難であった。そこで SAIL 法によりラベル化したタンパクを用いて立体構造解析を行うことを試みた。SAIL アミノ酸を用いることにより、これまでよりも大きなサイズのタンパクの、側鎖を含む詳細な構造決定が可能である。側鎖の構造決定は、現在未解明である多くのヒストン修飾機構の解明に大きく貢献することが期待される。SAIL アミノ酸を用いるには、ラベル化効率を損なわないために cell-free によるタンパク合成が必須となるが、我々は大腸菌抽出液を用いた cell-free タンパク合成反応による H2A 及び H2B の大量合成に成功した(Figure 2.)。H2A/H2B 複合体の構造解析に成功した後は、H3/H4 ヘテロ 4 量体の構造決定、さらにはヒストン 8 量体を構築し翻訳後修飾部位の構造解析にも挑戦する予定である。

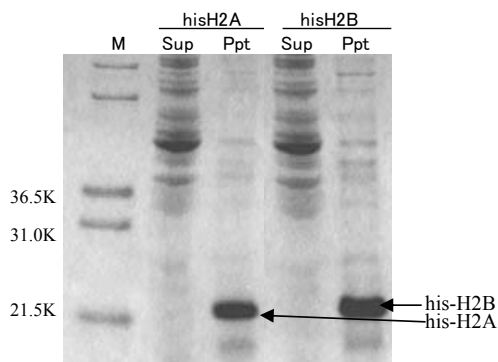


Figure 2. SDS-PAGE of his-tagged H2A and his-tagged H2B synthesized by cell-free reactions.

NMR study of protein structure and dynamics by using SAIL aromatic amino acids○Mitsuhiro Takeda¹, and Masatsune Kainosho^{1, 2}¹ Graduate School of Science, Nagoya University, Nagoya, Japan.² Center for Priority Areas, Tokyo Metropolitan University, Hachioji, Japan.

The extensive collection of NOE constraint data involving the aromatic ring signals is essential for accurate protein structure determination, although it is often hampered in practice by the pervasive signal overlapping and tight spin couplings for aromatic rings. We have prepared various types of stereo-array isotope labeled phenylalanines (δ -, ϵ - and ζ -SAIL Phe) and tyrosine (δ -, ϵ -SAIL Tyr) to overcome these problems. Each of the various types of SAIL Phe and SAIL Tyr yields well-resolved resonances for the δ -, ϵ - or ζ - $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ signals, respectively, which can readily be assigned by simple and robust pulse sequences. We demonstrate for the NMR analysis of an 18.2 kDa protein, *E. coli* peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase b (EPPib) that the concomitant use of various types of SAIL-Phe and SAIL-Tyr would be effective in generating accurate protein structures.

蛋白質内部に含まれるフェニルアラニン (Phe)、チロシン (Tyr) 残基の芳香族プロトンとその周囲のプロトンとの間には、蛋白質の構造決定において重要な拘束条件を与えるNOEが観測される。しかし、従来の均一 ^{13}C 、 ^{15}N 標識 (UL) 試料から得られる芳香族スペクトルは複雑なため解析が非常に難しい。我々が開発を進めている立体整列同位体標識 (Stereo-array isotope labeling; SAIL) 法は、高度に立体・位置選択的安定同位体標識を施した蛋白質試料を利用して、NMRスペクトルを簡略化する技術であり、現在も新しいNMR解析法の可能性を追求し、安定同位体標識パターンの思考錯誤を続けている。Phe、Tyr残基についてはこれまでに δ -, ϵ -, ζ -SAIL Phe および δ -, ϵ -SAIL Pheを開発している (Fig. 1) (2, 3)。SAIL Phe, Tyrの芳香環の構造は、観測対象とする水素と炭素のみ ^1H - ^{13}C とし、他の水素、炭素を ^2H 、 ^{12}C とすることを原則としている。

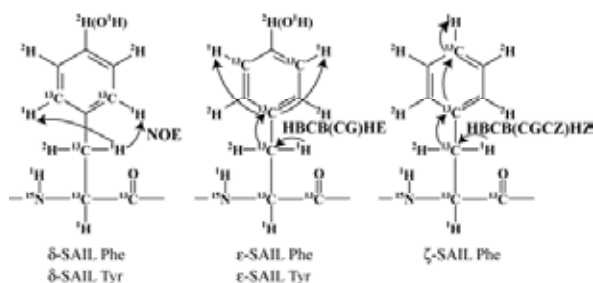


Fig. 1 Structures and assignment strategies of SAIL phenylalanine and tyrosine residues

SAIL法, 蛋白質, 芳香族アミノ酸

○ただみみつひろ, かいのしょうまさつね

これらSAIL Phe, Tyr残基は互いに観測対象が芳香環の δ 、 ϵ あるいは ζ 位かという点において異なるが、この観測位置の差が実際の構造解析にどのように影響してくるかという点は興味深い。我々は、この点を検証するため、まず δ -、 ϵ -あるいは ζ -SAIL Pheにより選択標識した大腸菌シストランスイソメラーゼ (EPPIb)を調製して得られる芳香族スペクトルを比較した。3種類のSAIL Phe標識体はいずれも、芳香環内のスピ結合、磁気双極子相互作用が除去されているため、UL Phe 標識体と比較して格段に簡略化された芳香族スペクトルを与えた (Fig. 2)。特筆すべき点は、 ζ -SAIL Phe標識体においてはEPPIbに含まれる12残基のPheに対応したシグナルが全て観測されたのに対して、 δ -および ϵ -SAIL Phe標識体においては、Phe27、Phe110、Phe123の3残基のシグナルが著しく広幅化していた。この広幅化は同3残基の芳香環 C_β - C_γ 軸まわりの180度回転運動による化学交換の影響と考えられる。さらに、Phe、Tyr残基のみ標識パターンが異なる3種類の

SAIL-EPPIb 蛋白質を実際に調製して構造解析を行った。その結果、得られた20構造の主鎖RMSDを調べると、 δ -SAIL Pheと δ -SAIL Tyrを用いた場合1.01 Å、 ϵ -SAIL Pheと ϵ -SAIL Tyrを用いた場合0.79Å、 ζ -SAIL Pheと ϵ -SAIL Tyrの場合0.60 Åの値を示した。

この差は、上述した、 δ -、 ϵ -SAIL Phe における芳香環回転運動の影響に加え、 H_δ 原子より、 H_ϵ 、 H_ζ 原子が遠位のNOE距離情報

を多く与えることに起因する。また、これらのNOE距離制限は互いに補間性があり、3種類のSAIL-EPPIb 試料から得られたNOE距離情報を全て組み合わせると主鎖RMSD値が 0.57 Åまでさらに上昇した。

以上の結果、NMR構造解析に用いる試料には、 ζ -SAIL Pheと ϵ -SAIL Tyr を用いるのが適当と考えられる (3)。また、 δ -、 ϵ -SAIL Pheおよび δ -SAIL Tyr から得られるNOE距離制限を追加することにより、さらに構造の精度を上昇出来る。

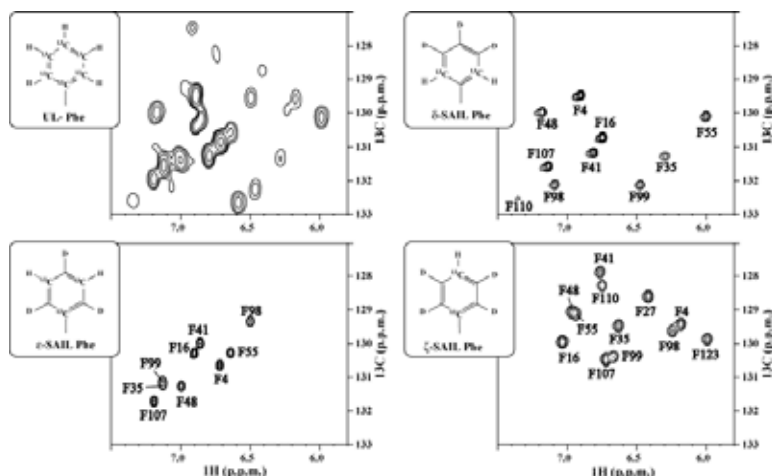


Fig. 2 NMR spectral comparisons of the aromatic regions of EPPIb's selectively labeled with the δ -, ϵ -, and ζ -SAIL phenylalanines, to that of the uniformly ^{13}C -labeled EPPIb. (DRX600, 30°C)

【謝辞】 本研究はターゲットタンパク研究プログラム (MEXT) および若手研究 (B) (21770110)の助成を受けて行われた。

【参考文献】

- 1) M. Kainosho, et al., (2006) *Nature* **440**: 52-57.
- 2) T. Torizawa, et al., (2005) *J Am Chem Soc* **127**: 12620-12626
- 3) M. Takeda, et al., (2009) *J Biomol. NMR* doi: 10.1007/s10858-009-9360-9

Rap80ユビキチン結合モチーフによるLys63結合型ポリユビキチン鎖認識機構

○関山直孝¹、磯貝信¹、有吉真理子¹、枋尾豪人¹、白川昌宏¹

¹京大院工、

Structural analysis of Lys63-linked polyubiquitin recognition

○Naotaka Sekiyama¹, Shin Isogai¹, Mariko Ariyoshi¹, Hidehito Tochio¹,

Masahiro Shirakawa¹

¹Graduate School of Engineering, Kyoto University, Kyoto, Japan

Lys63-linked polyubiquitin chains play an important role for DNA repair at the site of DNA double-strand breaks in human cells. Rap80 is known to recognize Lys63-linked polyubiquitin chains through its tandem ubiquitin interacting motifs (tandem UIMs) and recruit DNA repair machinery. In this study, we investigated the Lys63-linked polyubiquitin recognition mechanism using NMR spectroscopy. Based on solution NMR derived data such as chemical shift perturbations, paramagnetic relaxation enhancement and residual dipolar coupling, we built a structure model of the complex between tandem UIMs of Rap80 and Lys63-linked diubiquitin. The model reveals that the interaction mode between each pair of UIM and ubiquitin is identical to conventional UIM-ubiquitin complexes, and N-terminal UIM interacts with proximal ubiquitin and C-terminal UIM interacts with distal ubiquitin.

<序論> ユビキチンは酵母からヒトまで真核生物に高度に保存された蛋白質修飾タグである。ユビキチンは、自身の Lys48 や Lys63 を介してポリユビキチン鎖を形成し、その形成パターンにより異なる機能を発揮することが知られている。特に Lys63 結合型のポリユビキチンは DNA 二重鎖切断修復にも関与している。最近、Lys63 結合型ポリユビキチンの認識を行う蛋白質として Rap80 (Receptor-associated protein 80) が同定された^{1,2}。Rap80 は DNA 二重鎖切断が生じた部位に形成される Lys-63 結合型ポリユビキチンを認識し、様々な修復酵素をリクルートする蛋白質複合体形成の足場としての役割を担っていると考えられている。本研究では Rap80 による Lys-63 結合型ポリユビキチン認識機構を構造学的に解明することを目的とした。

<結果および考察> Rap80 には UIM (ubiquitin-interacting motif) と呼ばれるユビキチン結合モチーフが 2 個存在する (tandem UIMs)。この tandem UIMs とユビキチンおよびポリユビキチン鎖との結合実験を行ったところ、Rap80 の tandem UIMs はモノユビキチンや Lys48 結合型ポリユビキチン鎖には全く結合しないが、Lys63 結合型ジユビキチン鎖 (Lys63 結合型 Ub₂) には非常に強い親和性で結合することを見出した。Lys63 結合型 Ub₂ の Rap80 に対する相互作用表面を同定するため、NMR による化学シフト摂動法を行ったところ、Ub の Ile44 を中心とした疎水的な表面に集中していた。

Key words : Lys63-linked polyubiquitin, Rap80, DNA double-strand breaks

○せきやまなおたか、いそがいしん、ありよしまりこ、とちおひでひと、しらかわまさひろ

これは以前に報告されたユビキチンと UIM の相互作用表面と一致していた (Fig. 1)。

次に、tandem UIMs の Lys63 結合型 Ub₂ に対する配向を調べるために、スピラベルを用いた常磁性緩和効果の測定を行った。tandem UIMs の C 末端に存在する Cys 残基にスピラベル試薬 MTSL ((1-Oxyl-2, 2, 5,

5-Tetramethyl- Δ^3 -Pyrroline-3-Methyl) Methanethiosulfonate) を導入し、二つの Ub それぞれに安定同位体ラベルを導入した Lys63 結合型 Ub₂ を結合させた。スピラベルを導入したサンプルでは、遠位 (Distal) Ub において ¹H-¹⁵N HSQC スペクトルのピーク強度が減少していた。これは tandem UIMs の C 末端が遠位 Ub の近傍に存在していることを示している。以上の結果から、N 末端側の UIM (UIM1) と近位 (Proximal) Ub、C 末端側の UIM (UIM2) と遠位 Ub で相互作用していることがわかった。

Lys63 結合型 Ub₂ の二つの Ub の配向を残余双極子相互作用により検証した。Ub に安定同位体ラベルを導入したサンプルを、4%ポリアクリルアミドゲルに浸漬させ NMR チューブに圧縮、充填した。このような分子配向条件下において、IPAP-[¹H-¹⁵N]-HSQC により ¹H-¹⁵N 残余双極子相互作用を測定したところ、二つの Ub の UIM との相互作用表面は同一の方向にあることがわかった。以上の実験から得られた構造情報をもとに tandem UIMs と Lys63 結合型 Ub₂ の複合体構造のモデルを構築した (Fig. 2)。

現在はtandem UIMs、遠位Ub、近位UbそれぞれのNOEによる距離制限をもとにtandem UIMsとLys63結合型Ub₂の複合体構造を計算しており、討論会ではその結果を含めて議論する。

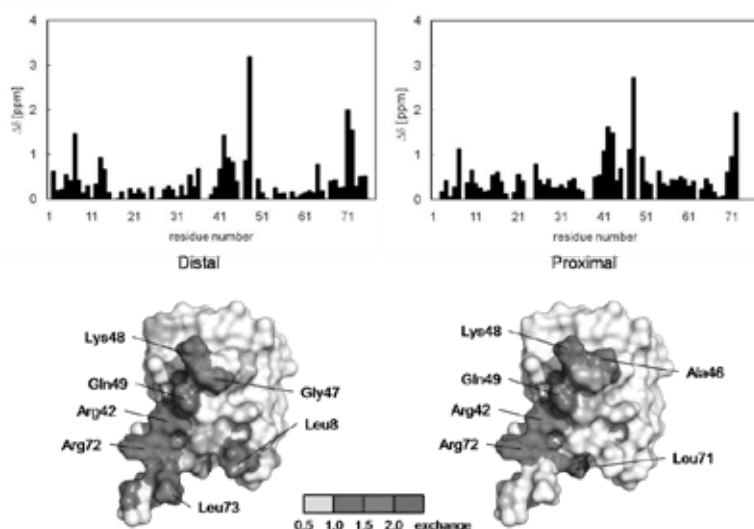


Fig. 1 Chemical Shift perturbation

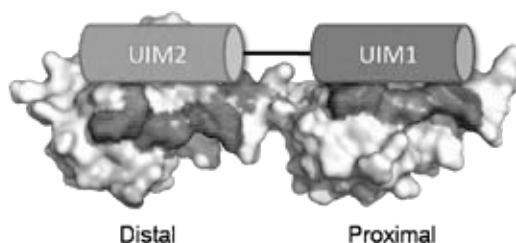


Fig. 2 The tandem UIMs-Lys63-linked Ub₂ complex structure model

- 1 Kim, H., Chen, J. & Yu, X. Ubiquitin-binding protein RAP80 mediates BRCA1-dependent DNA damage response. *Science* **316**, 1202-1205 (2007).
- 2 Sobhian, B. *et al.* RAP80 targets BRCA1 to specific ubiquitin structures at DNA damage sites. *Science* **316**, 1198-1202 (2007).

腫瘍抑制因子 APC-SAMP モチーフと DDEF1-SH3 ド

メインの複合体立体構造解析

○海江田修至¹、松井千幸²、清末優子³、池上貴久¹

¹大阪大学蛋白質研究所、²株式会社カン研究所、³理化学研究所発生・再生科学総合研究センター

Structural analysis of the complex between the APC-SAMP motif and the DDEF1-SH3 domain

○Shuji Kaieda¹, Chiyuki Matsui², Yuko Mimori-Kiyosue³, and Takahisa Ikegami¹

¹ Institute for Protein Research, Osaka University, ² KAN Research Institute, Inc., ³ RIKEN Center for Developmental Biology

The adenomatous polyposis coli (APC) tumour suppressor protein is a multifunctional protein with well-characterised roles in the Wnt signal transduction pathway and in cytoskeletal regulation. The SAMP motifs of APC, Axin-binding sites, are known to be important for both the tumour suppressing and the developmental functions of APC. We identified the SH3 domain of the development- and differentiation-enhancing factor 1 (DDEF1) as another binding partner of the first SAMP motif-containing region of APC. Interestingly, the SAMP motifs and the canonical SH3-binding sequence, PxxP motif, caused similar patterns of chemical shift perturbation in the resonances of the DDEF1-SH3 domain. To gain insight into the interaction between APC-SAMP motif and the DDEF1-SH3 domain, we determined the three-dimensional structure of the complex in solution.

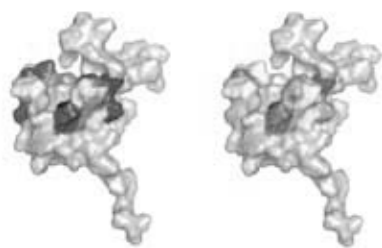
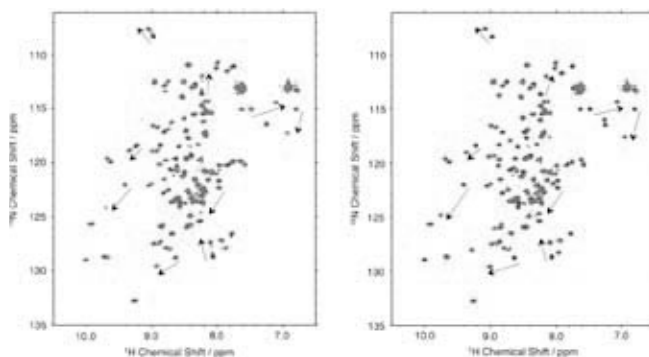
adenomatous polyposis coli (apc) 遺伝子は、遺伝性大腸癌の原因遺伝子の一つであり、遺伝性に限らず多くの大腸癌で変異が見られる。これらの変異の大多数は *apc* 遺伝子の中央付近で起こり、その結果、切断型変異体が発現される。変異によって切断を受ける APC 蛋白質の中央部位には、SAMP モチーフと呼ばれる繰り返し配列が3つ存在する。SAMP モチーフは APC の腫瘍抑制に重要な役割を担っており、APC 蛋白質の腫瘍抑制能には SAMP モチーフが少なくとも1つ必要であることが報告されている。APC の SAMP モチーフは、Axin との相互作用部位であることが既に明らかとなっている。APC と Axin は共に Wnt シグナル伝達経路の負の制御因子として働くため、これまで、APC-SAMP モチーフによる腫瘍抑制は、Axin 及び Wnt シグナル伝達経路とのみ関連付けられていた。しかし

キーワード: 蛋白質間相互作用、蛋白質立体構造解析、蛋白質複合体

著者ふりがな: ○かいえだしゅうじ、まついちゆき、きよすえゆうこ、いけがみたかひさ

ながら、APC は Wnt シグナル伝達以外にも多くの機能を有しており、APC の腫瘍抑制機能のメカニズムは完全に解明されているわけではない。我々のグループは、APC の SAMP モチーフが development- and differentiation-enhancing factor 1 (DDEF1) の SH3 ドメインと特異的に相互作用することを見出し、APC-SAMP モチーフが Axin 以外の分子とも相互作用することを初めて明らかにした。Chemical shift perturbation の結果から、これらの分子が直接相互作用し、生理的に比較的強い相互作用であることも明らかとなった。更に、SAMP モチーフと他の SH3 ドメインとの間の相互作用はほとんど認められず、SAMP モチーフが DDEF1-SH3 ドメインに高い選択性を示すことがわかった。SH3 ドメインは、PxxP モチーフと呼ばれるプロリンに富んだ配列を認識することがよく知られており、DDEF1-SH3 も focal adhesion kinase の PxxP モチーフ (FAK-SII) と相互作用することが報告されている。APC-SAMP モチーフと FAK-SII の DDEF1-SH3 ドメイン上での相互作用部位を調べた結果、興味深い事に、二つの異なる配列が同じ部位に相互作用することが明らかとなった。このように、SAMP モチーフと DDEF1-SH3 ドメインは共に蛋白質構造の観点から、非常に特徴的であると言える。そこで、我々のグループは、溶液中で APC-SAMP モチーフと DDEF1-SH3 ドメインの複合体立体構造解析を行った。APC は、細胞骨格を制御し、細胞運動や細胞接着に関わることも報告されている。また、DDEF1 も、同様に細胞運動に関わっていることから、APC と協調して細胞骨格の制御を行うと予想される。APC-SAMP モチーフと DDEF1-SH3 ドメインの相互作用、複合体構造から、APC の機能に関する更なる知見を得ることが出来ると考えられる。

→ **Fig 1.** Overlaid 2D ^1H - ^{15}N HSQC spectra of $[U\text{-}^{15}\text{N}]$ -DDEF1-SH3 with 0 (purple), 0.25 (blue), 0.5 (cyan), 1.0 (green), 1.5 (yellow), and 2.0 (red) equivalent amounts of the FLAG-SAMP#1 (left) or the FLAG-FAK-SII (right) peptide.



← **Fig 2.** Mapping of the residues for which chemical shift changes were observed when FLAG-SAMP#1 (left) or FLAG-FAK-SII (right) was added to the solution of $[^{15}\text{N}]$ -DDEF1-SH3 on the 3D structure of human Intersectin2-SH3 (PDB coordinate: 1UDL), which shows the highest sequence similarity to DDEF1-SH3 in the Protein Data Bank. Residues are coloured according to the scale of the chemical shift changes.

RNA 2 本鎖における中心部と末端部の GA-AG ミスマッチ塩基対 の溶液構造の研究

○天野まゆみ（大阪大学蛋白質研究所）

Solution structure of the terminal and internal GA-AG mismatches in RNA duplexes

Institute for Protein Research, Osaka University

Mayumi Amano

The solution structure of the terminal and internal tandem GA mismatches with the closing GC base pair in RNA duplexes were studied by H-NMR. The terminal tandem GA mismatches form the sheared conformation, while the internal tandem GA mismatches form both the sheared and Watson-Crick conformations. Stability of the sheared tandem GA base pairs depends on the closing base pair. The sheared conformation with CG base pair 5'adjacent to the tandem GA mismatches is more stable than that with GC base pair. The solution structure of the internal tandem GA mismatches with the closing UA base pair was also studied by H-NMR. The internal tandem GA mismatches form the sheared conformation at low temperature and unpaired conformation at high temperature. It suggests that in RNA duplexes, the unpaired G is stabilized by the close A base, but not by the close G base.

序) GA-AG塩基対は、2つの構造、Watson-Crickとsheared 塩基対を形成することが報告されている。その構造は隣りの塩基対に依存し、5'隣りがCG 塩基対の時、Watson-Crick塩基対を、GC塩基対の時、sheared 塩基対を形成する。しかしながら、今回、GA-AG塩基対を含むオリゴマーを合成し、NMR解析した結果、ステムの中心に存在するGA-AG塩基対は両方の構造を形成することがわかった。又、隣りがUA塩基対も同様に解析したが、CG塩基対とは違った構造を形成する。

実験) 図1) に示す GA-AG 塩基対がステムの中心と端にあるそれぞれ2つずつオリゴマーを合成し、0.1M NaCl, 1mM EDTA, 3mM sodium cacodylate, 10%D₂O, pH 6.5 溶液に溶かし、ブルーカーDRX 600NMR 1D, 2D-NOESY スペクトルを測定した。

キーワード : GA-AG ミスマッチ塩基対, sheared構造, Watson-Crick構造

○あまのまゆみ

結果)

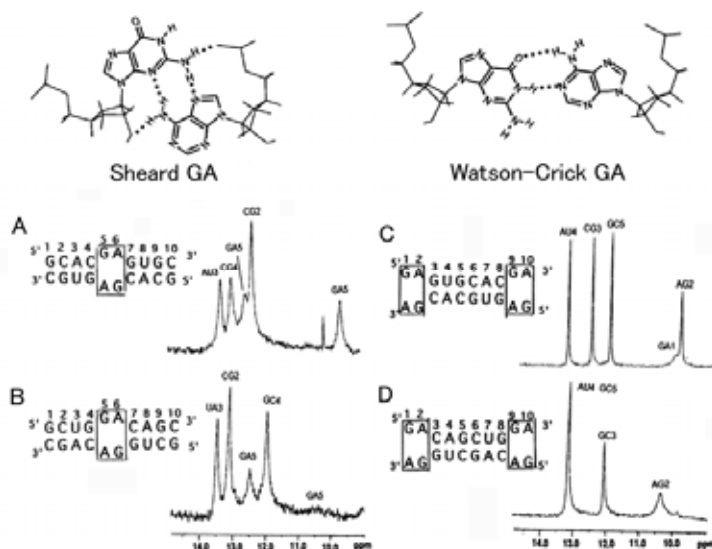


Figure 1. NMR spectra for the imino proton region of RNA oligomers with the internal or terminal tandem GA base pairs and the assignment

sequential NOEにより、それぞれのイミノプロトンを帰属した。10ppm付近のシグナルはsheared GA塩基対由来のイミノプロトンである。末端部のGA-AG塩基対はsheared構造のみを形成するが、中心部のGA-AG塩基対はsheared構造以外に12.5 ppmにWatson-Crick由来のイミノプロトンが観

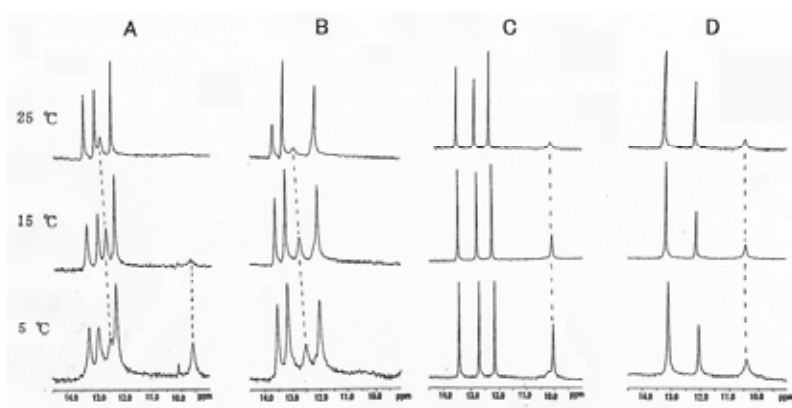


Figure 2. The imino protons as a function of temperature

温度の上昇と共に、10ppmのピークは減少し、12.5ppmのWatson-Crick構造のピークが増加し、25 °Cでは、Watson-Crick構造のピークのみが観測される。図3にaromatic C-H regionの2D-NOESYスペクトルを示す。オリゴマーA, B共、30 °CではWatson-Crick由来の、低温(10 °Cと5 °C)ではsheared構造由来のsequentialのNOEを示す。この様に明らかに、ステム中のGA-AG塩基対は隣の塩基対がCG, GC共に2つの構造を形成する。

測される。しかし、sheared GA塩基対の安定性は隣の塩基対に依存し、5'隣りがGCの時は不安定で非常にブロードである。図2にイミノプロトンの温度変化をしめすが、低温5 °Cでsheared構造は安定に形成し、

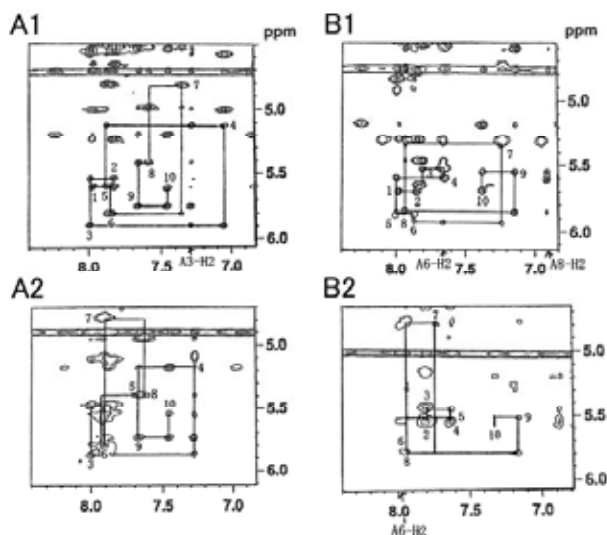


Figure 3. The 800 ms mixing time 2D NOESY spectra of the H8/H2/H6 to H1'/H5 region of (rGCACGAGUGC)₂: A1 (at 30°C) and A2 (at 10°C), and (rGCUGGACAGC)₂: B1 (at 30°C) and B2 (at 5°C).

5'隣りがUA塩基対でステム中心部のGA-AG塩基対も同様にNMRで解析した。図4にそのオリゴマーのイミノプロトンのスペクトルとその帰属をしめす。5°C

では9.7ppmにsheared GA-AG 由来のシグナルが観測される。温度上昇に伴い、15°Cで消失し、さらに温度の上昇すると0.2 ppm低磁場シフトした新たなピークが現れる。それと共に、GA-AG 塩基対の隣りのUA6 塩基対のピークが、0.6 ppm高磁場にシフトして現れた。これは、GA-AG 塩基対の構造の変化がUA6塩基対のchemical shiftに影響したものと思われる。この様に隣がUA塩基対でステムの中心部にあるGA-AG塩基対も2つ構造を形成するが、低温ではsheared 構造であり、高温ではWatson-Crick 構造ではなく、塩基対を形成していない構造であることがわかった。図5にC-H 領域の2D-NOESYスペクトルを示すが、30°Cで8と9の塩基間でNOEをしめなさい。このことから、図6に示す様に、隣がUA塩基対であるGA-AG塩基対は塩基対を形成していないく、そのG塩基は2つのA塩基に挟まれている。Watson-Crick GA塩基対はそのstrand間が通常のAU,GC塩基対よりも広く、その形成は、糖リン酸バックボーンに

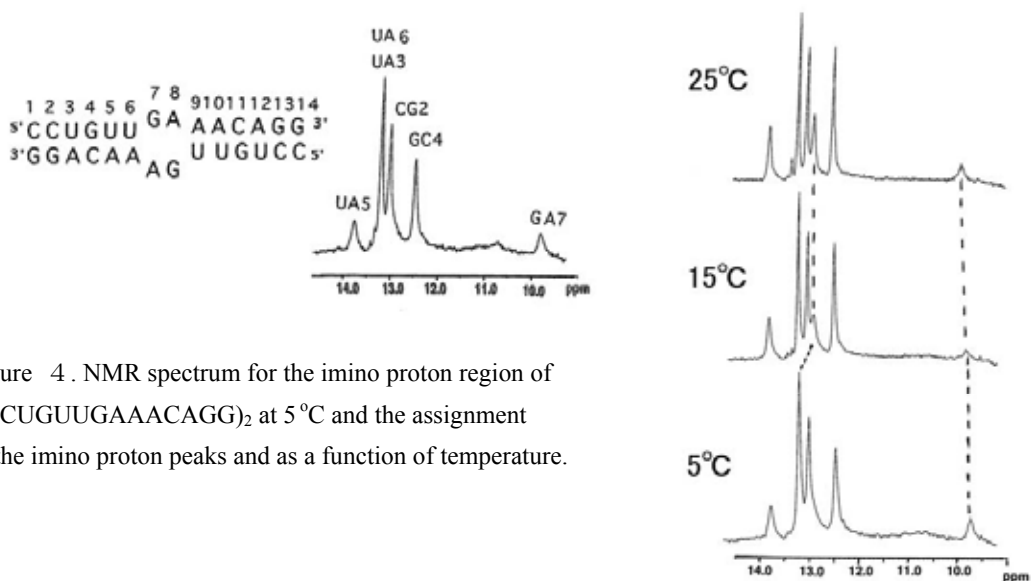


Figure 4. NMR spectrum for the imino proton region of (rCCUGUUGAAACAGG)₂ at 5°C and the assignment of the imino proton peaks and as a function of temperature.

ストレスを与える。しかし、Gイミノプロトンは親水性であり、疎水性である塩基対領域では、水素結合をしないと不安定であるが、隣りがUA塩基対の場合は、水素結合をしなくても、安定に存在できる。この様にGのNHは、親水性で塩基対を形成しなければ、ループアウトしやすいことがわかった。今まではGA-AG 塩基対はステム中では1つの構造しか形成しないと考えられていたが、2つの構造を形成することが初めて明らかになった。そして、その構造は隣接する塩基対に依存することがわかった。

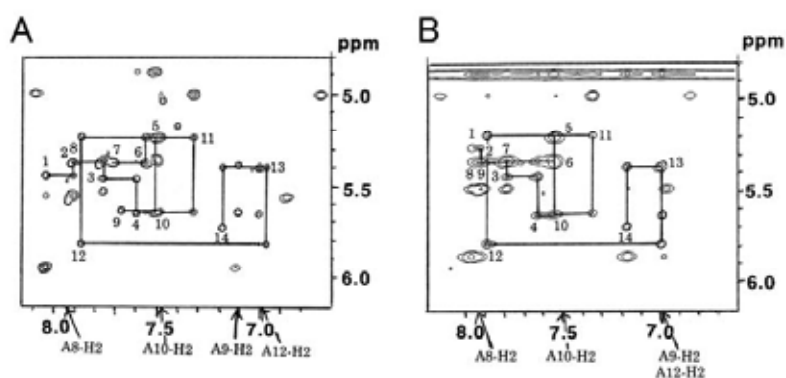


Figure 5 . The 800 ms mixing time 2D-NOESY spectra of the H8/H2/H6 to H1'/H5 region of (rCCUGUUGAAA CAGG)₂: A (at 30°C) and B (at 10°C).

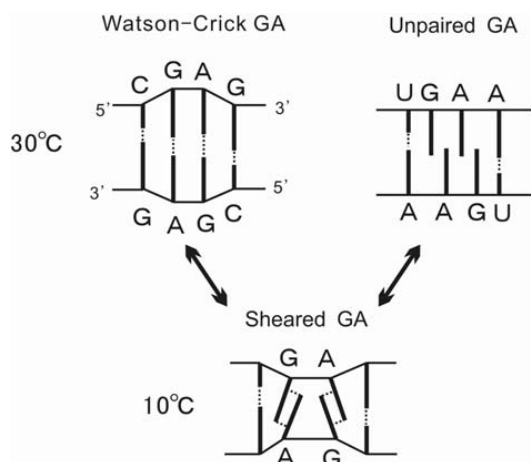


Figure 6 . Schematic model of kinetics of conformational change of the internal tandem GA mismatches with the closing UA or CG base pairs.

緑色蛍光蛋白質GFPの自己会合とその抑制変異体の NMR解析

○小佐見謙一, 古板恭子, 児嶋長次郎
奈良先端大・バイオ

NMR analysis of self-association of green fluorescent protein GFP

○Kenichi Kosami, Kyoko Furuita and Chojiro Kojima

Graduate School of Biological Sciences, Nara Institute of Science and Technology

NMR analysis of the green fluorescent protein (GFP) from the jellyfish *Aequorea Victoria* is not easy because of its self-association character. In crystal, GFP is dimmer and three amino acids A206, L221 and F223 exist on the dimerization interface. The self-association of YFP has been suppressed by mutations of these residues. In this study, we have tried to suppress the self-association of GFP and examined self-association of several GFPs by NMR. Finally We obtained self-association suppressed GFP mutants.

[緒言]

オワンクラゲ由来の緑色蛍光蛋白質 GFP は、蛋白質や細胞の蛍光標識として使われるなど分子生物学の様々な研究で用いられている。現在、開発されている新しい蛍光タンパク質の多くはオワンクラゲ由来の GFP にランダムなアミノ酸置換を導入し、目的の機能を持つ変異体を探し出すことで得られている。我々は溶液 NMR を用い、pH や温度、塩強度など複数の条件下での GFP の各残基周辺の局所的な構造や化学環境の動的な変化を観察し、化学シフト変化の大きいアミノ酸残基にアミノ酸置換をすることで効果的な改変 GFP の開発につながると考えた。しかし、溶液 NMR を用いた GFP の解析では GFP の自己会合が問題となる。GFP は蛋白質濃度が高い場合に自己会合することが知られており、溶液中では単量体と二量体の混ざった状態で存在している。そのため NMR を用いた GFP の研究にはまず、高濃度において二量体を形成しない完全単量体化した GFP の作成が必要である。本研究では、NMR 研究に基づいた新しい蛍光タンパク質の開発を目指し、まず単量体化した GFP の作成を試みた。溶液 NMR により、以下 5 種類の GFP、[(1)蛋白質の蛍光ラベルとして古くから使われているオワンクラゲ *Aequorea Victoria* 由来の AvGFP、(2)その改変型 GFP として AvGFP の 35 倍の蛍光強度を持つ EGFP (AvGFP (F64L/S65T))、(3)AvGFP の 18 倍の蛍光強度を持つ GFPuv (AvGFP (F99S/M153T/V163A))、(4)AvGFP の変異体であり細胞内 pH インジケーターとして使用される pHluorin、(5)オワンクラゲ *Aequorea coerulescens* に由来する AcGFP]の溶液中での自己会合の有無を解析した。また、これらの GFP の自己会合抑制変異体をデザインし、NMR で解析を行った。

キーワード ; GFP, 自己会合

○ こさみけんいち, ふるいたきょうこ, こじまちょうじろう

[方法]

本研究では、目的 DNA 断片を pCold-GST ベクターに組み込んだプラスミドを大腸菌に導入し、GFP を ^{15}N 、 ^{13}C で均一に標識して大量発現させ精製し実験に用いた。NMR 測定には AVANCE 500, 800 (Bruker Biospin) を用いた。GFP の自己会合性は、 ^{15}N 標識した GFP を用いて高濃度(1 mM または 0.8 mM)と低濃度(0.1 mM)の蛋白質量で ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルを測定し、濃度依存的な化学シフト変化により評価した。主鎖の帰属は非線形サンプリング法で測定した HNCA, HN(CO)CA, HN(CA)CB, HN(COCA)CB を用いて行った。

[結果と考察]

高濃度と低濃度で ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルを測定した結果、5 種の GFP 全てにおいて濃度依存的な化学シフト変化が見られた (Fig.1)。このことは全ての GFP が濃度依存的な自己会合性を持つことを示している。YFP の A206 を K に置換した変異体では自己会合が抑制されることから、GFP の自己会合を抑制するため AvGFP, GFPuv, EGFP, 及び pHluorin の A206K 変異体、AcGFP の A207K 変異体を作成した。高濃度と低濃度で ^1H - ^{15}N HSQC 測定をしたところ GFPuv, EGFP, pHluorin の変異体では、変異導入前と比べ濃度依存的な化学シフト変化が抑制された (Fig.2)。従って GFPuv, EGFP, pHluorin では A206K 変異により自己会合が抑えられたと考えられる。

A206K 変異により自己会合が抑えられた GFPuv, EGFP, pHluorin のうち GFPuv, pHluorin で主鎖の帰属を試みた。pHluorin(A206K)では良好なスペクトルは得られなかった。良好なスペクトルが得られた GFPuv(A206K)については 238 残基中 54 残基を帰属した。しかし、GFP はピークの重なりが激しいため帰属が困難であり、さらに帰属を進めるために、GFP を N 末端側 1-154 と C 末端側 155-238 のふたつに分割し、片方を $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 同位体ラベル標識、他方をノンラベルで精製し、北海道大学の小橋川らが開発した SortaseA による Protein Ligation 法を用い、主鎖の帰属を進めている。

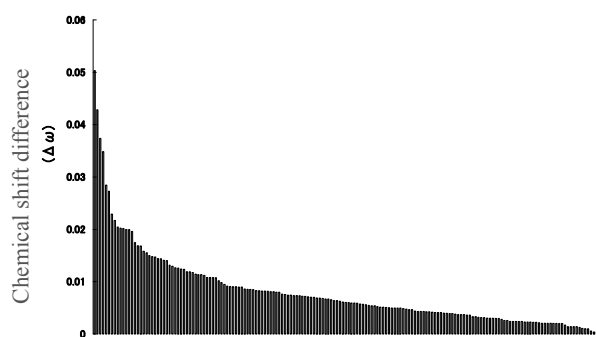


Fig. 1 Chemical shift differences of backbone amide groups between 0.1 mM and 1 mM. GFPuv (wild-type)

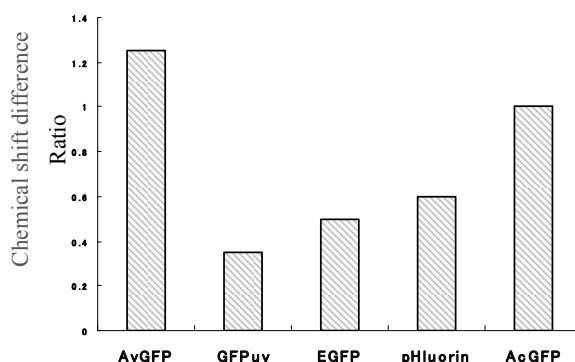


Fig. 2 Chemical shift differences ratios of mutant to wild-type for each GFP. Chemical shift differences of backbone amide groups are calculated between 0.1 and 1 mM GFPs.

NMRによるヌクレオソームシャペロンタンパク質 HMGB2のドメイン相対配向解析

○上脇隼一¹, 森内 寛², 楯 直子², 楯 真一¹

(¹広島大院・理, ²武蔵野大・薬)

Domain orientation analysis of nucleosome chaperon protein HMGB2 by NMR

○Jun-ichi Uewaki¹, Hiroshi Moriuchi², Naoko Utsunomiya-Tate², and Shin-ichi Tate¹

¹ Dept. Mathematical and Life Sciences, School of Science, Hiroshima University,

² Research Institute of Pharmaceutical Sciences, Musashino University

HMGB2 protein has two DNA binding domains that are linked by ten-residue-long linker. The comparison of the ¹H-¹⁵N HSQC spectra between the isolated domains and the linked domains has suggested the linker exclusively contacts the N-terminal domain; some signals in the spectrum of the isolated N-terminal domain have changed their spectral positions in the spectrum for the protein comprising of two linked domains, while the C-terminal domain did not show any spectral changes. This may implicate that the inter-domain linker, which is actually an intrinsically unstructured element, should define the relative domain orientation through the linker – N-terminal domain contact. This prompted us to explore the precise orientation of the two domains in HMGB2 in solution, which orientation may presumably have biological significance in the sequence non-specific but structure specific features of the HMGB2-DNA interaction. For this purpose, we employed DIORITE and lanthanide labeling methods. The details in the experimentally determined overall structure of HMGB2 will be reported.

タンパク質は、ドメインの再配向などを伴う大きな分子形態変化を伴ってその独自の機能を発現する。そのため、タンパク質の機能制御機構を研究するためにはドメインの相対配向を明らかにすることが必要不可欠である。本発表では、L字型の立体構造を持つHMGドメイン2つからなるヌクレオソーム形成因子であるHMGB2タンパク質の溶液中におけるドメイン間相対配向解析を行った結果を報告する。HMGB2タンパク質は全長で18kDaの分子量であるが、構成する各ドメインが示す強い分子回転異方性のために¹⁵N核の横緩和時間が短くなり、分子配向条件下で観測されたIPAP-HSQCスペクトル上の各ダブレットシグナルのうち高磁場成分のS/Nが極端に低下するために十分な数のRDCデータを集積することができなかった。一方、私たちが開発を進めているTROSYを用いた分子配向解析法(DIORITE)を用いて解析を行ったところ、全てのシグナルから分子配向依存的なTROSYシグナル変化量を高精度に観測することができ、溶液中でのHMGB2の2つのドメイン相対配向情報を得ることに成功した。

Keyword : NMR, domain orientation, HMG

うえわき じゅんいち、もりうち ひろし、たて なおこ、たて しんいち

HMGB2タンパク質は、2つのHMGBboxが10残基のリンカーでつながれた構造を持つ。興味深いことに、HMGB2全長の ^1H - ^{15}N HSQCスペクトル上で観測される各ドメイン由来のシグナルをみると、C末端部HMGBboxのシグナルはドメイン単独の時のシグナルと重なるのに対して、N末端部HMGBboxのシグナルは単離されたドメインの場合とは大きく異なっている。これは、HMGB2全長構造中では、N末端部ドメインがリンカーと相互作用していることを示していると考えられる。このため、HMGB2はDNAが存在しない状態でもN末端ドメインとリンカーとの相互作用を介して特定のドメイン配向を優位に持つものとする。そこで、DIORITE解析の結果得られた各ドメインの配向テンソルを基にして2つのドメインの相対配向の解析を行った。さらに、DIORITE解析から得られたドメイン相対配向を確認すると同時に、ドメイン間の距離情報を得るため、ランタニドイオン標識を用いてpseudo contact shift(PCS)の解析を行った。

【実験・結果】

空間的な異方性もつように圧縮したアクリルアミドゲルを用いて、HMGB2を磁場に対して弱く配向させることで、DIORITE解析に必要なTROSYスペクトル上での変化量を観測した。観測値から個々のドメインの磁場に対する配向テンソルを決定し、それに基づいて2つのドメインの相対配向を決定した。得られた各ドメインの配向テンソルからは、4つの相対配向が可能となるが、N末ドメインとリンカーとの選択的な相互作用を考えFig.1に示す相対配向が妥当と考えられた。この相対配向では、HMGB2を構成する2つのドメインがDNA結合ループを同じ側に持つような相対配向になっており、DNAと相互作用するには有利な構造を持つことが考えられる。

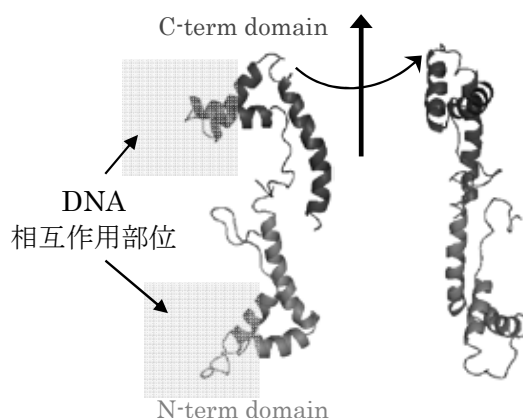


Fig.1: Possible relative orientation of the domains in HMGB2.

DIORITE解析からは、ドメイン間の距離情報を得ることができないため、ランタニドイオンによるPCSおよび緩和誘導効果 (paramagnetic relaxation enhancement, PRE) からドメイン間距離情報を得ることを試みた。HMGB2のN末端部にランタニドイオン結合配列を導入し(Fig.2)、効果の異なるランタニドイオン La^{3+} 、 Tb^{3+} 、 Dy^{3+} 、 Er^{3+} 、 Ce^{3+} により標識した。ランタニドイオンの種類に応じた明瞭なPCS、PREが観測された。観測されたデータに基づいて、DIORITE解析から決定されたドメイン配向情報と併せて、HMGB2中の2つのドメインの相対配向とダイナミックスについて議論する。

GSH - YIDTNNDGWYEGDELLA - HMGB2
LBT

Fig.2: PCS sample of HMGB2.

DIORITE法を用いた高分子量タンパク質の ドメイン再配向解析

○岸本浩一¹、田中利好²、河野俊之²、楯 真一¹

¹広島大院・理・数理分子

²三菱化学生命研

Domain reorientation analysis of high-molecular-weight protein by DIORITE

○Hirokazu Kishimoto¹, Rikou Tanaka², Toshiyuki Kohno², and Shin-ichi Tate¹

¹*Dept. Mathematical and Life Sciences, Hiroshima University*

²*Mitsubishi Kagaku Institute of Life Sciences*

We have been developing a new approach for determining the alignment tensor for a weakly aligned protein solely based on the orientation-induced TROSY shift changes, which is named as DIORITE. This approach can expand the domain orientation analysis of proteins to higher molecular weight. We report the domain orientation analysis of mRNA capping enzyme (38kDa) by using DIORITE. The conventional RDC-based approaches were not useful for the analysis. Two crystal structures are reported for the protein, they are open and close forms and both of them are crystallized as the GTP bound form. The DIORITE analysis has shown that the apo-form of the protein is different from the open-form crystal structure. In addition to the angular information based on DIORITE analysis, distance information from PRE experiments will be incorporated to refine the apo-form structure of CE in solution.

我々は新規NMR構造解析技術であるDIORITE法の開発と応用研究を進めてきている。本研究で対象とするmRNA capping enzyme (以下CE) は、GTP共存下でopen型、close型と分類される2つの異なる構造が結晶構造解析から得られている (Fig. 1)。そこで結晶構造が得られていない基質がない状態でのCEのドメイン相対配向解析を行った。CEは38kDaと分子量も大



Fig.1 Two crystal structures of CE : open state (left) and close state (right) (PDB : 1CKM)

きく、溶解度が低いうえ熱的にも不安定であるため、RDCを用いた従来のNMR法ではドメイン配向解析を行うことができなかった。³H/¹⁵N標識したCEを用いて分子配向依存的なTROSY化学シフト変化からDIORITE法によりCEを構成する2つのドメインそれぞれの配向テンソルを決定し、それに基づいてドメイン間の相対配向を決定することに成功した。このDIORITE法を用いたapo型のCEのドメイン相対配向は、結晶構造から予測されていたopen型構造とは大きく異なるものであった。今発表では、DIORITE法から

Keywords : deuterium label, CSA, domain orientation

○きしもとひろかず、たなかりこう、こうのとしゆき、たてしんいち

得られたドメイン相対配向角情報に加え、緩和誘導法などを用いて2つのドメイン間距離情報を得ることでCEのapo型構造の精密化を行う予定である。

異方性圧縮アクリルアミドゲルにより CE を磁場に対して弱く配向させることで分子配向依存的な TROSY シフト変化量を明瞭に観測できた (Fig. 2)。

このシグナルの変化量から、対応するアミノ酸残基のペプチド面の磁場に対する配向情報を獲得し、そのデータを N 末端側、C 末端側の各ドメイン集積することで各ドメインの磁場配向テンソルを決定した。Apo 型の CE の 2 つのドメインは結晶中の open 型構造よりもさらに開いた構造を持つことを昨年の本討論会で発表した。

今回は、DIORITE 法から決定したドメイン間相対配向に加え、ドメイン間距離情報を加えることで、CE の apo 型構造を決定することを試みた。C 末端部にランタニドタグを導入した CE、および CE 中に 3 か所ある Cys のうち1つのみを残す変異体を作成した。ランタニドイオンによる緩和誘導効果 (PRE)、擬接触シフト (pseudo contact shift, PCS) を用いてドメイン間距離情報を得ることを試みた。また、cys 変異体では nitroxide 標識を行い、NO ラジカルによる PRE 効果からドメイン間距離の取得を試みた。

ランタニドイオンを利用する方法では、ランタニドイオン導入時に激しくタンパク質が沈殿してしまい、十分な感度での解析ができなかった。nitroxide 標識では、0.3 mM 程度の濃度の標識試料を調製することができたので現在、MTSL 標識試料を用いてドメイン間距離情報の取得を試みている。発表では、試料調製の詳細とともに MTSL 実験の結果を合わせて報告する。

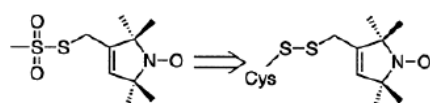


Fig.3 Chemical structure of the spin label reagent MTSL.

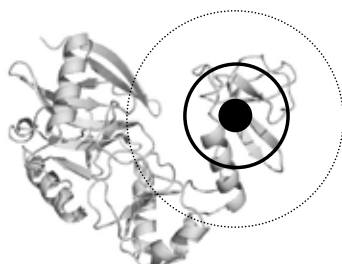


Fig.4 PRE effect expected for CE(open state) .

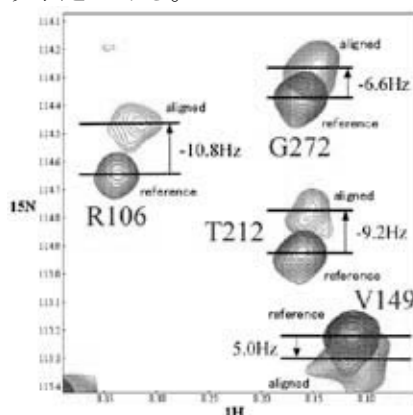


Fig.2 Trosy shift changes for CE in compressed and uncompressed gel.

変異体CE中に1つ残したCys282へMTSLを結合させた試料を用いてドメイン間距離情報を得る (Figs. 3, 4)。参照用データの取得には、定法に従いアスコルビン酸を加えNO ラジカルを消去したサンプルを用いる。二つのスペクトルのピーク強度比からスピンラベルを導入したOB ドメインと NT ドメインの間の距離情報を取得する。解析の結果得られるドメイン間距離情報と DIORITE 解析から得られるドメイン間の配向角情報に基づいて apo 型 CE の全体構造を決定する予定である。

沖縄モズクから抽出した高分子フコイダンの構造

○オジェイルFエゾモ¹、モハメドSムスタク¹、堀江迪喜¹、高橋和也¹、
川本仁志²、三木康成²、木村隆之²、飯塚舜介¹

¹鳥取大学大学院医学系研究科機能再生医科学専攻

²(株)海産物のきむらや

NMR studies of the structure of high molecular weight native fucoidan from the brown seaweed (*Cladosiphon okamuranus*)

Ojeiru F. Ezomo¹, Mohammed S. Mustak¹, Yuki Horie¹, Kazuya Takahashi¹,
Hitoshi Kawamoto², Yasunari Miki², Takayuki Kimura², Shunsuke Meshitsuka¹

¹Tottori University Graduate School of Medical Science, Yonago, 683-8503

²Marine Products Kimuraya Co., Sakaiminato, 684-0072.

フコイダンは、抗菌・抗ウィルス作用があることが知られている。また、抗がん作用があることも報告されている。さらに、健康維持のためのサプリメントとしての効果も期待されている。沖縄モズクから、なるべく手を加えないで抽出したフコイダンは、クロマトグラフで単一バンドを示す分子量約 300,000 Da の高分子物質である。低分子化したフコイダンの構造に関する報告は数多くあるが、天然高分子の構造に関する報告は見当たらない。そこで、乾燥粉末天然フコイダンを溶解した水溶液のNMRを測定した。TOCSY, COSY, NOESY などの2次元NMRから推定される天然フコイダンの構造を報告する。

It has been reported that fucoidan has functions of anti-bacteria and anti-virus effects. Also, recently it has been reported that fucoidan reveals the effects on cancer therapy. In addition, fucoidan is expected as a material to maintain a healthy condition as a food supplement. Fucoidan extracted from Okinawa mozuku (*Cladosiphon okamuranus*) revealed a single band in chromatography of about 300,000 Da molecular weight. The structure of native high molecular weight fucoidan was estimated from 2D-NMR spectra such as TOCSY, COSY and NOESY.

fucoidan, 2D-NMR, brown algae

○オジェイルFエゾモ¹、モハメドSムスタク¹、ほりえゆうき¹、たかはしかずや¹、
かわもとひとし²、みきやすなり²、きむらたかゆき²、めしつかしゅんすけ¹

Fucoidans are one kind of polysaccharides found in brown algae. They usually contain large proportions of L-fucose and sulfates and also small proportions of galactose, mannose, xylose and uronic acids moieties have also been observed in various fucoidans. Recently fucoidans have been extracted, analyzed and studied from several types' brown algae due to their promising biological activities and therapeutic applications. The several reports have shown that fucoidans extracted from different kind of brown algae exhibit several biological activities such as anti-tumor, anti-coagulant, contraceptive, anti-inflammatory, anti-HIV and inducing apoptosis. The present study is focused on the fucoidan isolated from *Cladosiphon okamuranus* (*C. okamuranus*) edible brown algae which is commercially cultured around the Okinawa Island, Japan. Interestingly, in addition to many biological functions of fucoidans, isolated from *C. okamuranus*, it can also block the adhesion of the helicobacter pylori to human gastric cell line and can also induce macrophage activation. However, studies have shown that the biological activities of fucoidans are depending on their structure and sulfation content.

In spite of many studies attempting to determine the fine structure of fucoidans isolated from *C. okamuranus*, there are still no satisfactory regular structure has been described. In the previous studies it is reported that the structure of fucoidan from *C. okamuranus* has linear polysaccharides backbone built up of (1→3) linked α -L-fucopyranose residue with single branches (D-glucuronate) at 2 position of sixth fucose residue. However the structural heterogeneity of fucoidan from *C. okamuranus* with respect to linkage, branching point and position of acetyl and sulfate groups are still not determined in its native form. Therefore, the purpose of the present study is to investigate the regular structure of fucoidan in native form of about 300,000 Da molecular weight isolated from *C. okamuranus* using high field 2D NMR spectroscopy. The present study shows that the assignment of the signals in the spectra such as COSY, TOCSY, NOESY and also ^{13}C -NMR. The regular structure of fucoidan from *C. okamuranus* and the composition of substituents and their terminal residues are reported to be different from earlier studies.

TICAM-1およびTICAM-2 TIRドメインの溶液構造 榎園能章¹ ○久米田博之¹ 堀内正隆¹ 小椋賢治¹ 瀬谷司² 稲垣冬彦¹

¹北海道大学 薬学部 構造生物学研究室

²北海道大学大学院 医学研究科免疫学分野

Solution Structures of TICAM-1 and TICAM-2 TIR Domain.

Yoshiaki Enokizono¹, ○Hiroyuki Kumeta¹, Masataka Horiuchi¹, Kenji Ogura¹,
Tsukasa Seya², and Fuyuhiko Inagaki¹

¹Laboratory of Structural Biology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University, Sapporo, Japan.

²Department of Microbiology and Immunology, Graduate School of Medicine, Hokkaido University, Sapporo, Japan.

Toll / interleukin-1 receptor (TIR) domain is a key mediator in the Toll-like receptor (TLR) signaling. TIR containing adaptor protein-1 (TICAM-1) is established as the adaptor controlling both TLR3- and TLR4-mediated IFN production signal. TICAM-2 functions as a bridging adaptor, which plays TICAM-1-recruiting to TLR4. The homo- and hetero-oligomerization of the TIR domains of these receptors and adaptors brings about the activation of NF- κ B and IRF-3, which regulate the synthesis of pro-inflammatory cytokines and IFN- β , respectively. Here, we solved the solution structures of homo-oligomerization deletion variant of TIR domain of TICAM-1 and TICAM-2, and will discuss the TIR-TIR interaction of the TLRs and TICAMs.

Toll / interleukin-1 receptor (TIR)ドメインは自然免疫応答である Toll-like receptor (TLR)シグナルにおいて重要な役割を担っている。膜外領域で病原体由来刺激を受けた TLR は、ホモまたはヘテロ二量体を形成し細胞内領域にある TIR ドメインが近づくことで活性化する。活性化した TLR の TIR ドメインは細胞内アダプター分子の TIR ドメインとヘテロオリゴマーを形成し、下流へとシグナルを伝達する。

TIR ドメインを含む細胞内アダプター分子には、Myeloid differentiation primary response gene88 (MyD88), MyD88 adaptor-like (Mal または TIRAP), TIR containing adaptor molecule-1 (TICAM-1 または TRIF)および 2(TICAM-2 または TRAM), と sterile α -motif and HEAT/armadillo repeats (SARM)の 5 種がある。TIR ドメインの立体構造はレセプターでは TLR1, TLR2, TLR10, IL-1RAPL について解かれており、アダプターでは MyD88 のみが解かれている。

TICAM-1はTLR3および4の下流に存在し、MyD88系とは独立にインターフェロン産生に寄与する。TICAM-2はTLR4からTICAM-1へのシグナルを仲介する。シグナルを

キーワード : TICAM-1, TICAM-2, TIRドメイン

えのきぞの よしあき, ○くめた ひろゆき, ほりうち まさたか, おぐら けんじ, せや つかさ, いながき ふゆひこ

受けたTICAM-1はTIRドメイン以外の領域を介して下流のNAP1 / TBK1 / IKK ϵ 複合体, TRAF6およびRIP1へと伝達する. 上流のレセプターからTICAM-1までのTLRシグナル伝達において, 各タンパク質に存在するTIRドメイン同士の相互作用が非常に重要であることが明らかになっている.

本発表では, TICAM-1-TIRおよびTICAM-2-TIRの溶液構造, ならびにTIRドメイン間の相互作用に関する考察について報告する.

[結果・考察] TICAM-1のTIRドメインは完全に不溶性であり, TICAM-2のTIRドメインは高濃度域において自己会合体を形成するため, どちらも野生株における立体構造解析が困難であった. そこで, TIRドメインにおいてoligomer形成またはシグナル伝達に重要であると報告されているBB-loop領域にアミノ酸置換を導入することにより, 自己会合体形成を抑制した変異体を得た. 作製された変異体は[^1H - ^{15}N] HSQCスペクトルで良好な信号の分散/強度を示し, NMR測定濃度においても単量体であることが示唆された. この変異体を用いて各種NMR測定による帰属およびCYANAを用いた立体構造決定を行った (下図).

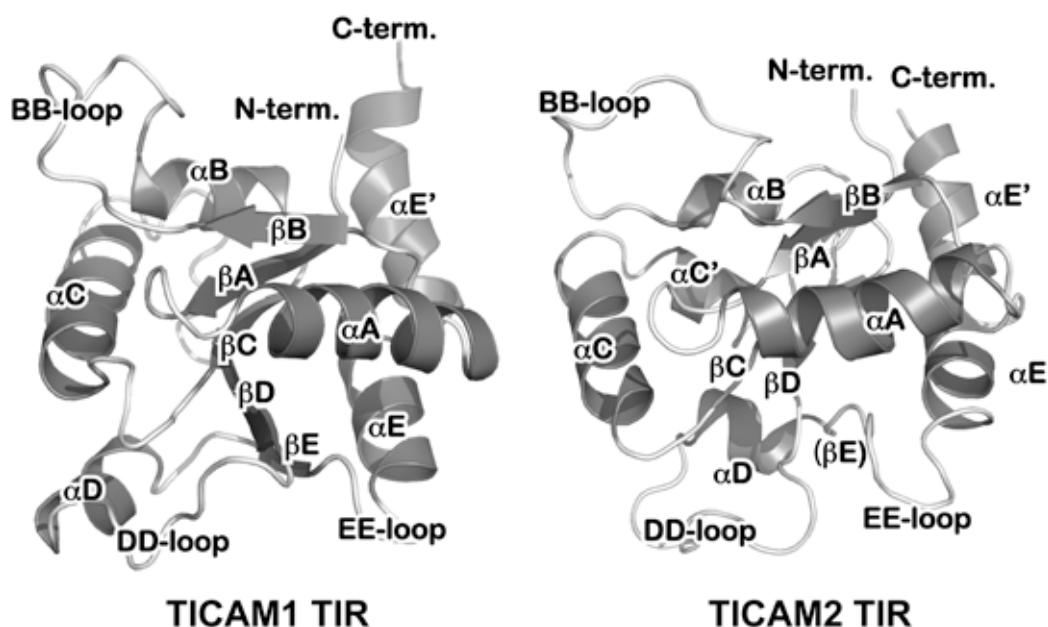


Fig. Solution structures of TICAM1- and TICAM2-TIR domain

TICAM-1およびTICAM-2のTIRドメインの立体構造は, MyD88 TIRやレセプターTIRと同様に $\alpha/\beta/\alpha$ の三層からなるflavodoxin-like foldを有していた. 変異箇所周辺であるBB-loop領域は, フレキシブルな構造を有しており, またMyD88 TIRと同様に[^1H - ^{15}N] HSQC上で信号帰属が困難であった. 静電ポテンシャルを分子表面にマッピングしたところ, TICAM-1には, 他のTIRドメインには見られない αE , $\alpha\text{E}'$ ヘリックスによって形成される広い塩基性面が存在していた. 現在, この領域を中心に他のTIRドメインとの相互作用に重要な部位を探索中である.

NMRに基づくケモカイン受容体 CCR2 と制御因子 フロントとの相互作用解析

○江崎 芳¹, 藺田 晃弘¹, 吉永 壮佐¹, 嶋田 一夫²,
寺島 裕也^{3,4}, 遠田 悦子³, 松島 綱治³, 寺沢 宏明¹,
¹熊大・院・医薬, ²東大・院・薬, ³東大・院・医, ⁴ECI

NMR analyses of interaction between chemokine receptor CCR2 and its regulator FROUNT

○Kaori Esaki¹, Akihiro Sonoda¹, Sosuke Yoshinaga¹, Ichio Shimada², Yuya Terashima^{3,4},
Etsuko Toda³, Kouji Matsushima³ and Hiroaki Terasawa¹

¹Grad. Sch. Med. and Pharm. Sci., Kumamoto Univ., ²Grad. Sch. Pharm. Sci., Univ. Tokyo,

³Grad. Sch. Med., Univ. Tokyo, ⁴ECI, Inc.

Chemokine receptor CCR2 belongs to the family of G protein-coupled receptors (GPCRs) and mediates chemokine signaling. The C-terminus of CCR2 is exposed to the intracellular space. Its membrane-proximal region (CCR2 Pro-C) is necessary for chemokine signaling. We found that FROUNT activates the signaling through binding to the CCR2 pro-C on the cytoplasmic side. FROUNT is expected as a new target for anti-inflammatory therapies. Elucidation of the interaction between CCR2 and FROUNT would contribute to understanding mechanisms of GPCR regulation and the drug discovery.

We revealed that the CCR2 Pro-C forms α -helix with DPC micelles. Cross saturation and transferred cross saturation experiments showed that the hydrophobic residues of CCR2 Pro-C interact with both membrane and FROUNT.

【背景】

炎症免疫反応における白血球の遊走応答は、炎症部で産生されたケモカインが、細胞膜上のGタンパク質共役受容体 (GPCR) に認識されることで引き起こされる。CCR2はこのようなケモカイン受容体の一つとして知られている。CCR2のC末端は、細胞内に露出しており、その細胞膜近傍領域 (Pro-C) は細胞遊走活性に必須である。我々は、ケモカインの存在下でCCR2のPro-Cに結合し、白血球の遊走シグナルを制御する細胞内因子フロントを同定した(1)(Fig 1)。フロントは、既知のGPCR制御タンパク質と相同性を持っておらず、フロントを介した新規GPCR制御機構の存在が明らかとなった。本研究は、CCR2—フロント間相互作用を介した白血球の遊走応答シグナル伝達機構を、構造生物学的に解明することを目的とする。本研究によって、ケモカイン受容体と細胞内制御タンパク質の相互作用が原子レベルで明らかになり、GPCRに共通する新規の制御機構の解明、さらには慢性炎症性疾患に対する新しい作用機序をもつ薬の開発へとつながることが期待される。

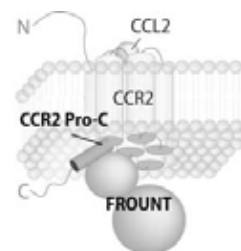


Figure 1. The model of CCR2—FROUNT complex.

フロント, ケモカイン受容体, Gタンパク質共役受容体

○えさきかおり, そのだあきひろ, よしながそうすけ, しまだいちお,
てらしまゆうや, とおだえつこ, まつしまこうじ, てらさわひろあき

【方法】

CCR2 Pro-C及び全長フロントタンパク質は、大腸菌の発現系および各種クロマトグラフィーを用いて調製した。NMRシグナルの帰属は、HNCACB, HN(CO)CACB, H(CCO)NH, HCCH-TOCSY によって行った。立体構造決定は、 ^{13}C edited NOESYおよび ^{15}N edited NOESYを用いて行った。スペクトル解析には、NMRPipe, Oliviaを使用した。主鎖二面角情報は、TALOSによって見積もった。

【結果と考察】

CCR2 Pro-C 領域の 16 アミノ酸残基からなるペプチドが、全長 FROUNT と相互作用することを表面プラズモン共鳴法により明らかにした (未発表)。また、CCR2 Pro-C の各種 NMR スペクトルを測定し、化学シフトに基づく二次構造解析を行ったところ、CCR2 Pro-C は、ランダムコイルと α -ヘリックス構造の平衡状態にあることがわかった。さらにその平衡が、DPC ミセルを加えることによって α -ヘリックス構造へと偏ることを明らかにした。DPC ミセル存在下で立体構造決定を行い、CCR2 Pro-C が α -ヘリックス構造をとることを示した。フロント結合時の CCR2 Pro-C の構造解析は、フロントとの結合状態の立体構造を反映する trNOE スペクトルを用いることとした。フロント存在下で CCR2 Pro-C の ^{15}N edited NOESY を測定したところ、フロント非存在下では見られない多くの NOE が観察された。このことから、CCR2 Pro-C は全長フロントと複合体を形成することで、立体構造を形成することが示唆された。現在、立体構造解析を進行中である。

次に、CCR2 Pro-C がどのアミノ酸残基で膜と相互作用しているかを調べるため、交差飽和法(2)による解析を行った。その結果、 α -ヘリックスの片側に位置する疎水性アミノ酸残基が、膜との相互作用面に存在することがわかった。さらに、CCR2 Pro-C と全長フロントとの相互作用について、転移交差飽和法(2)を用いて解析した。その結果、フロントとの相互作用に重要なアミノ酸残基は、 α -ヘリックスの片側に位置する疎水性アミノ酸であり、膜との相互作用部位と重なっていることがわかった。

CCR2 Pro-Cは、一次構造上、膜貫通ドメインの直下に存在する。DPCミセル存在下で α -ヘリックスを形成したことから、CCR2 Pro-Cは、生体内においても細胞膜と相互作用して α -ヘリックス構造をとることが強く示唆された。また、CCR2 Pro-C上のフロント結合部位と膜結合部位が共通していることが明らかとなった。CCR2のリガンドであるCCL2の刺激に伴って、フロントは細胞表面でCCR2と共局在することを我々は明らかにしている(1)。以上の知見から、CCL2がCCR2に結合することで、受容体の構造変化が起こり、Pro-Cの配向が変化してフロントが結合し、その結果、下流のシグナルの活性化がおこるという仮説が考えられた。

【参考文献】

- (1) Terashima, Y. *et al.*, *Nat Immunol* 6 (8), 827-835 (2005).
- (2) Shimada, I., *Methods Enzymol* 394, 483-506 (2005).

ケモカインのシグナル伝達を制御する細胞内因子 FROUNT の構造生物学的研究

○藺田 晃弘¹, 江崎 芳¹, 吉永 壮佐¹, 嶋田 一夫²,
寺島 裕也^{3,4}, 遠田 悦子³, 松島 綱治³, 寺沢 宏明¹
¹熊大・院・医薬, ²東大・院・薬, ³東大・院・医, ⁴ECI

Structural analyses of FROUNT: a cytoplasmic mediator of chemokine signaling

○Akihiro Sonoda¹, Kaori Esaki¹, Sosuke Yoshinaga¹, Ichio Shimada², Yuya Terashima^{3,4},
Etsuko Toda³, Kouji Matsushima³, Hiroaki Terasawa¹

¹Grad. Sch. Med. and Pharm. Sci., Kumamoto Univ., ²Grad. Sch. Pharm. Sci., Univ. Tokyo,

³Grad. Sch. Med., Univ. Tokyo, ⁴ECI, Inc.

Immune cells such as monocytes and macrophages migrate to the inflamed site during inflammation. The migration is induced by binding of chemokines to chemokine receptors. We identified a novel cytoplasmic protein FROUNT that mediates chemokine signaling by the interaction between its C-terminal domain (FNT-C) and the C-terminal region of CCR2 (Pro-C). The purpose of this study is elucidation of the binding mode of FNT-C with CCR2 Pro-C and development of therapeutic agents for chronic inflammatory diseases. We report here the NMR analyses of the interactions between FNT-C and CCR2 Pro-C. The CCR2 binding site of FNT-C and the amino acid residues involved in binding will be discussed.

【背景・目的】

生体で炎症が起きると、炎症部位からケモカインが放出される。単球やマクロファージといった免疫細胞は、ケモカインを認識し、炎症部位に移動・集積する。この免疫細胞の移動・集積は、細胞膜上の G 蛋白質共役型受容体であるケモカイン受容体に、ケモカインが結合することによって引き起こされる。我々は、ケモカイン受容体である CCR2 の C 末端細胞膜近傍領域 (Pro-C) に細胞質側から結合し、CCR2 を介したシグナル伝達を制御する新規な細胞内因子 FROUNT を見出した¹。また、FROUNT の CCR2 結合領域は、FROUNT の C 末端領域 (FNT-C) であることを明らかにした¹。本研究は、(1) FNT-C と CCR2 との結合様式を解明し、免疫細胞の遊走におけるシグナル伝達機構を原子レベルで明らかにすること、(2) 得られた知見に基づいて、

キーワード：ケモカイン受容体，フロント，シグナル伝達

著者ふりがな：○そのだあきひろ，えさきかおり，よしながそうすけ，しまだいちお，
てらしまゆうや，とおだえつこ，まつしまこうじ，てらさわひろあき

FROUNT を標的とする慢性炎症性疾患治療薬を開発することを目的とする。

【実験】

大腸菌による発現系を用いて、均一 ^{15}N 標識または、 $^2\text{H}^{15}\text{N}$, $^2\text{H}^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ 標識 FNT-C を大量発現した。グルタチオンセファロースクロマトグラフィーによる粗精製の後、トロンビンで GST タグを切断し、イオン交換クロマトグラフィーを用いて精製を行った。得られた安定同位体標識 FNT-C を用いて、 ^1H - ^{15}N HSQC および各種三重共鳴 NMR 測定を行い、主鎖由来 NMR シグナルの帰属を行った。スペクトル解析には、NMRPipe, Olivia を使用した。CCR2 Pro-C の発現には大腸菌の系を用いた。精製にはニッケルアフィニティークロマトグラフィーを用いた。

【結果と考察】

FNT-C の構造ドメインを同定するために、長さが異なる 11 種類の均一 ^{15}N 標識 FNT-C を調製し、NMR 測定および解析を行った。その結果、良好なシグナルの分散を示すスペクトルを与える構造ドメイン (FNT-CB) を同定した。FNT-CB が、CCR2 上の FROUNT 結合領域 (Pro-C) に対する親和性を保持していることを、表面プラズモン法を用いて明らかにした。

^{15}N 標識 FNT-CB の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルを解析した結果、一部のシグナル強度にばらつきが見られた。そこで、溶液条件および測定条件の検討を行い、スペクトルの改善を図った。さらに、FNT-CB の重水素化を行った結果、 ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルは改善され、シグナル強度が均一で良好な NMR スペクトルが得られた。この条件で、各種三重共鳴 NMR 測定および解析を行い、FNT-CB の主鎖 NMR シグナルの帰属を進めた。また、6 種類のアミノ酸選択標識体 (^{15}N Cys, ^{15}N His, ^{15}N Ile, ^{15}N Lys, ^{15}N Met, ^{15}N Thr) を調製し、同様に NMR 測定・解析を行った。以上の NMR 解析に基づいて、帰属を行った。

次に、FNT-CB 上の CCR2 Pro-C との相互作用部位を同定するために、 $^2\text{H}^{15}\text{N}$ 標識 FNT-CB に、非標識の CCR2 Pro-C を滴定して NMR 測定・解析を行った。その結果、滴定後にシグナル強度の減少するピークが観測された。疎水性アミノ酸残基由来のシグナルにおいて減少が顕著であり、CCR2 Pro-C との相互作用には疎水性相互作用が強く関与することが示唆された。FNT-CB の化学シフトに基づく二次構造予測より、CCR2 Pro-C との相互作用に関与するアミノ酸残基は、C 末端近傍に位置する α ヘリックス上に存在し、疎水性パッチを形成していると考えられた。

以上の結果から得られた FROUNT 側の知見と、CCR2 Pro-C 側の NMR 解析に基づく結果 (江崎ら、本年会発表) をあわせて、FNT-CB と CCR2 Pro-C との結合様式について議論する。

【参考文献】

- (1) Terashima Y. et al., *Nature Immunology*, **6**, 827 - 835 (2005)

○吉永 壮佐¹, 佐藤 徹², 平金 真¹, はが 紗智子²,
木本 裕子², 嶋田 一夫³, 東原 和成², 寺沢 宏明¹

¹熊本大学 大学院 医学薬学研究部, ²東京大学 大学院
新領域創成科学研究科, ³東京大学 大学院 薬学系研究科

Structural and functional analyses of a male-mice-specific pheromone ESP1.

○Sosuke Yoshinaga¹, Toru Sato², Makoto Hirakane¹, Sachiko Haga², Hiroko Kimoto²,
Ichio Shimada³, Kazushige Touhara², and Hiroaki Terasawa¹

¹*Faculty of Medical and Pharmaceutical Sciences, Kumamoto University,*

²*Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo,*

³*Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo*

Pheromones are perceived by a vomeronasal organ (VNO) and vomeronasal sensory neurons (VSNs) in many mammals. We previously identified a male-specific peptide ESP1 secreted into tear fluid of mice. ESP1 is received by its own receptor V2Rp5 expressed in female's VNO. ESP1 turned out to be a member of a new multigene family which is supposed to convey information on sex, strain, and species in rodents. The aim of this study is to elucidate mechanisms underlying the pheromone-reception system on the ESP family. We report here the three-dimensional structure and the V2Rp5-binding sites of ESP1, based on solution NMR analyses and mutational effects on the VSNs-stimulating activity. Structural informations of ESP1 give a way to elucidate specific ligand-receptor recognition mechanism on the ESP family.

【背景・目的】

多くの哺乳動物において、フェロモンは、鼻腔下部の鋤鼻器官、鋤鼻神経系を介して感知される。既知のフェロモンのほとんどは、尿や汗に含まれる揮発性の低分子であるが、我々は、オスマウスの涙から、メスマウスの鋤鼻神経系を活性化する不揮発性のペプチド、ESP1 (exocrine-gland-secreting peptide 1) を同定した¹⁾。また、ESP1 の受容体が、鋤鼻器官に発現するGタンパク質共役型受容体V2Rp5 (vomeronasal type 2 receptor p5) であることを明らかにした²⁾。さらに、ESP1 の相同性遺伝子を、マウスに38種類、ラットに10種類見出し、これらが、齧歯類の性・系統・種の情報伝達する分子群 (ESPファミリー) である可能性を示してきた³⁾。

(キーワード) ペプチド, 分子認識, GPCR

(著者ふりがな) ○よしながそうすけ, さとうとおる, ひらかねまこと, はがさちこ,
きもとひろこ, しまだいちお, とうはらかずしげ, てらさわひろあき

本研究は、溶液 NMR 法を用いて ESP1 の立体構造を決定し、受容体認識機構を明らかにすることにより、ESP ファミリーによって媒介される、個体間コミュニケーションの構造学的基盤を確立することを目的とする。

【方法】

大腸菌の大量発現系において、安定同位体標識した栄養源を含む M9 最少培地を用いることで、ESP1 の安定同位体標識体を得た。ニッケルアフィニティークロマトグラフィーによる粗精製に用いたポリヒスチジンタグは、トロンビン処理にて ESP1 から分離した。さらに、ニッケルアフィニティー、陰イオン交換、ゲル濾過、逆相の各クロマトグラフィーを行ない、ESP1 の精製品を得た。NMR スペクトルの解析には Olivia, ESP1 の立体構造計算には CYANA を用いた。また、ESP1 の鋤鼻神経系活性化能は、神経細胞における c-Fos タンパク質の発現誘導を指標に測定した。

【結果・考察】

^{15}N および $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 標識 ESP1 について、各種の多核多次元関連 NMR スペクトルの測定および解析を行ない、各原子核由来の NMR 信号の帰属を完了した。帰属結果と $\{^1\text{H}\}-^{15}\text{N}$ NOE の解析から、ESP1 は、N 末端に 30 残基程度のランダムコイル領域を含むことを明らかにした。ランダムコイル領域を欠失した変異体は、鋤鼻神経系活性化能を保持していた。そのため、C 末端側の立体構造をもつ 55 残基からなる領域が活性部位を含むことが分かった。 ^{15}N および ^{13}C -NOESY スペクトルから得られる ^1H 間の距離情報と、HNHA スペクトルおよび化学シフト値から得られる主鎖二面角の情報をもとに ESP1 の立体構造決定を行ない、3 本のヘリックスを含むことを明らかにした。

得られた ESP1 の立体構造情報を利用し、電荷分布に着目して調製した変異体について鋤鼻神経系活性化能を調べた結果、複数のアルギニン残基からなる正電荷に帯びた領域が活性に必須であることが分かった。これらのアルギニン残基は、ESP ファミリーの中でも ESP1 に特徴があるため、受容体結合の特異性を担う残基と考えられる。

以上の溶液 NMR 解析、ならびに変異体解析の結果に基づき、ESP1 の立体構造と機能について議論する。

本結果は、ESP ファミリーの立体構造、および、受容体結合の特異性を担う残基を初めて明らかにしたものであり、齧歯類の個体数を制御する化合物の設計等への応用・展開が期待される。

【参考文献】

- 1) Kimoto H. *et al.*, *Nature*, **437**, 898-901 (2005)
- 2) Haga S. *et al.*, *Pure and Applied Chemistry*, **79**, 775-783 (2007)
- 3) Kimoto H. *et al.*, *Current Biology*, **17**, 1879-1884 (2007)

CYANAを用いた二量体タンパク質の三次元構造解析

○濱田季之^{1,2,3}, Yi-Jan Lin¹, 黒崎千智^{1,3}, 小柴生造^{1,3}, 小林直宏¹, 井上真^{1,3}, 木川隆則^{1,3,4}, 林文晶^{1,3}, 武藤裕^{1,3}, 大橋若奈¹, 佐藤真奈美^{1,3}, 赤坂領吾^{1,3}, 新野睦子^{1,3}, 寺田貴帆^{1,3}, 白水美香子^{1,3}, 好田真由美^{1,3}, 田中昭子^{1,3}, 林崎良英¹, 横山茂之^{1,3,5}, 廣田洋¹, Peter Güntert^{1,6}

¹理研GSC, ²鹿児島大院理工, ³理研SSBC, ⁴東工大・院総理工, ⁵東大院理, ⁶J. W. Goethe 大学

Solution structures of the UBA domains of Cbl-b and c-Cbl and reliability of CYANA structure calculations for homodimeric proteins

○Toshiyuki Hamada^{1,2,3}, Yi-Jan Lin¹, Chisato Kurosaki^{1,3}, Seizo Koshiba^{1,3}, Naohiro Kobayashi¹, Makoto Inoue^{1,3}, Takanori Kigawa^{1,3,4}, Fumiaki Hayashi^{1,3}, Yutaka Muto^{1,3}, Wakana Ohashi¹, Manami Sato^{1,3}, Ryogo Akasaka^{1,3}, Mutsuko Kukimoto-Niino^{1,3}, Takaho Terada^{1,3}, Mikako Shirouzu^{1,3}, Mayumi Yoshida^{1,3}, Akiko Tanaka^{1,3}, Yoshihide Hayashizaki¹, Shigeyuki Yokoyama^{1,3,5}, Hiroshi Hirota¹, and Peter Güntert^{1,6}

¹RIKEN Genomic Sciences Center, Yokohama, Japan.

²Graduate School of Science and Engineering, Kagoshima University

³RIKEN Systems and Structural Biology Center(SSBC), Yokohama, Japan.

⁴Int. Graduate School of Science and Engineering, Tokyo Institute of Technology, Yokohama, Japan.

⁵Graduate School of Science, The University of Tokyo, Tokyo, Japan.

⁶Institute of Biophysical Chemistry and Biomolecular Magnetic Resonance Center, Goethe University, Frankfurt am Main, Germany.

c-Cbl and Cbl-b are ubiquitously expressed in a variety of mammalian cells and regulate signal transduction pathways in the E3 ubiquitin-ligation process. Dimerization of the C-terminal UBA domain in both Cbl proteins is essential for their ubiquitin-binding and signal transduction functions. In this presentation, we show the first structural analysis of the homo-dimeric structures of the mammalian UBA_c and UBA_b domains by multi-dimensional NMR experiments and CYANA structure calculations. NMR structures of UBA_c dimers (PDB ID: 2D9S) were in excellent agreement with a subsequently published corresponding crystal structure (PDB ID: 2O09), indicating the high reliability of our approach for the structure determination of homodimeric proteins.

CYANA, homo-dimer, UBA domain

○ はまだとしゆき, Yi-Jan Lin, くろさきちさと、こしばせいぞう、こばやしなほひろ、いのうえまこと、きがわたかのり、はやしふみあき、むとうゆたか、おおはしわかな、さとうまなみ、あかさかりょうご、くきもと-いのむつこ、てらだたかほ、しろうずみかこ、よしだまゆみ、たなかあきこ、はやしぎきよしひで、よこやましげゆき、ひろたひろし、Peter Güntert

ユビキチン-プロテアソーム経路 (Ubiquitin-proteasome systems; UPS) は、タンパク質のユビキチン化/脱ユビキチン化のサイクルにおいて、タンパク質分解、DNA修復、シグナル伝達、エンドサイトーシス、タンパク質輸送などの重要な役割を果たしている。このUPSのサイクルを調節しているタンパク質ファミリーの中にE3 ubiquitin ligase (活性化されたtyrosine kinaseをユビキチン化し、分解へと導く酵素群) の一種、Cblタンパク質ファミリーがある。Cblタンパク質の中で、伝播因子として働くタンパク質がCbl-bであり、一方、その逆の制御因子の中心的な役割を果たしているのがc-Cblである。

これらCbl-bとc-Cblは、Cblタンパク質の中で、唯一C末端にUBA domainを持つ。c-Cblは、そのUBA domain (UBA_c) を介して、自身とhomo-dimerを形成することが知られており、ポリユビキチン鎖やユビキチン化タンパク質との相互作用は、極めて弱い。一方、Cbl-bのUBA domain (UBA_b) は、UBA_c と非常に高いsequence homology (85 % similarity) を有しているにもかかわらず、UBA_c と対照的に、monomerとして存在し、ubiquitin化タンパク質やpoly-ubiquitinとやや強い相互作用を示すことが報告されている。全長タンパク質の生物機能 (つまり、E3 ligaseの正と負の調節因子) と合わせて、対照的な性質を持つ2つのUBA domainsの構造機能解析を行うことは、c-CblとCbl-bの作用メカニズムの解明に大きく寄与するのみならず、UPSの調節機構を明らかにする上で非常に重要である。

そこで、今回、高等動物由来c-CblとCbl-bのUBA domain (UBA_cとUBA_b) について、¹³C, ¹⁵N-標識化体を調製後、Filtered NOESY を含めた各種NMR測定を行い、dimerCYANA構造計算を用いて三次元構造を決定した。

得られたUBA_cのNMR構造(PDB ID:2D9S)は、この構造より後にPDB登録されたX線結晶構造(PDB ID:2009)とほぼ一致していた。このことは、本研究で用いたdimer構造決定に関する一連の手法が高い信憑性を持つことを示している。また、UBA_bのNMR構造(PDB ID:2D06)は、X線結晶構造(PDB ID:200A)と一致しなかった。その理由および二量体タンパク質用のCYANA構造計算法の詳細は、本討論会にて示す。

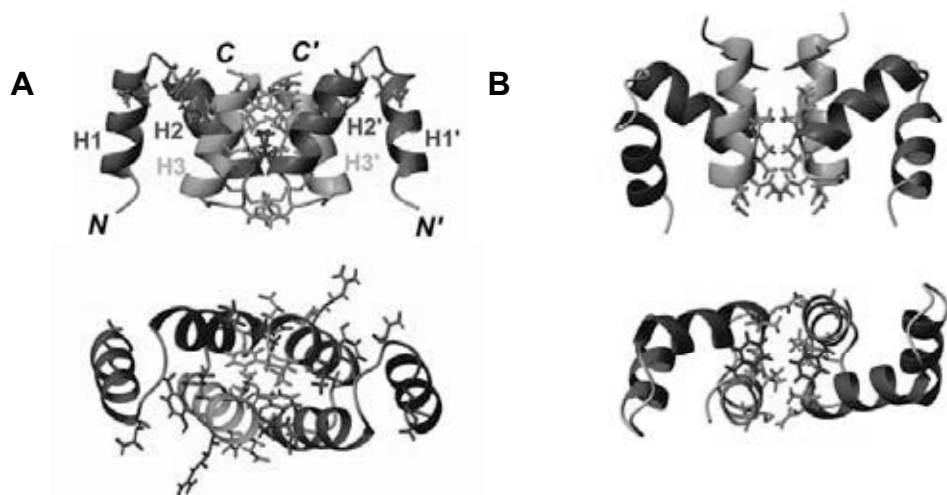


Figure 1. Two orthogonal views of a ribbon representation of one conformer of the NMR structures of the UBA_c (A) and UBA_b dimers (B).

膜タンパク質ハロロドプシンの多次元固体NMR法による構造解析

樋口真理花¹, 江川文子², 田巻初¹, 神谷昌克¹,
相沢智康¹, 河野敬一³, 藤原敏道², ○出村誠¹

¹北大院・先端生命

²阪大・蛋白研

³北大院・理

Structural Analysis of Membrane Protein Halorhodopsin by Solid State NMR

Marika Higuchi¹, Ayako Egawa², Hajime Tamaki¹, Masakatsu Kamiya¹, Tomoyasu Aizawa¹,
Keiichi Kawano³, Toshimichi Fujiwara², and ○Makoto Demura¹

¹*Faculty of Life Science, Hokkaido University, Sapporo, Japan.*

²*Institute for Protein Research, Osaka University, Osaka, Japan.*

³*Faculty of Science, Hokkaido University, Sapporo, Japan.*

Rhodopsin is a membrane protein having a typical seven-transmembrane-helical structure. Archaeal rhodopsin, the structural family of rhodopsin, functions as light-driven ion pump or sensor. Halorhodopsin (HR), one of archaeal rhodopsin, is an inward-directed light-driven chloride pump. In the photo-excited state or chloride-bound state, HR would undergo dynamic structural changes such as helix moving, opening of uptake channel, and re-orientation of the specific side-chain. However, there is no direct evidence for these structural changes of HR. The purpose of this study is structural characterization of HR by using solid-state NMR. In this presentation, we introduce multi-dimensional magic angle spinning solid state NMR of uniformly and selectively ¹³C and ¹⁵N labeled HR, which is reconstituted with lipid, for the assignments and structural analysis.

膜タンパク質・脂質複合体の機能と構造解析は生命分子科学や創薬研究のターゲットタンパク質として重要である。我々は7回膜貫通型ヘリックス構造ファミリーである古細菌*Natronomonas pharaonis*由来のハロロドプシン（以下NpHR）の機能・構造解析のための大腸菌大量発現系の確立に成功した。NpHRは光エネルギーを利用してCl⁻を細胞外側から取り込むアニオンポンプである。このCl⁻ポンプ機能には細胞外ループが重要な役割を果たしていることが予想されているが、その詳細なメカニズムはまだ解明されていない。そこで本研究では、膜タンパク質ハロロドプシンのCl⁻輸送活性への細胞外ループ領域の構造変化の寄与を固体NMRで解明することを目的とした。NpHRの固体NMR分光法による構造解析に向けた安定同位体ラベルサンプルの調製法と脂質膜再構成法を最適化し、最新の多次元固体NMR測定・解析に取り組んだ。Cl⁻取り込みに関わる細胞外ループ領域の化学シフト変化について詳細に考察した。

Membrane Protein, Light-driven anion pump, Lipid reconstitution

ひぐちまりか, えがわあやこ, たまきはじめ, かみやまさかつ, あいざわともやす,
かわのけいいち, ふじわらとしみち, ○でむらまこと

実験

NpHR の ^{13}C , ^{15}N 均一二重またはリバースラベル化は M9 最少培地を用いて大腸菌発現系で行なった。D 化 DMPC と NpHR で脂質再構成を行なった。多次元固体 NMR 測定は、500MHz、600MHz、700MHz 固体 MAS NMR 装置を用いた。二次元固体 NMR 測定は、膜貫通の immobile 領域と膜表面の mobile 領域をそれぞれターゲットとした測定を行なった。特に mobile 領域では注目する細胞外ループの Cl^- 結合に伴う構造変化解析を行なうために、 Cl^- 結合型と Cl^- 非結合型の 2 種類のサンプルについて測定した。帰属結果から主鎖構造の指標である CSI (化学シフトインデックス) の計算を行なうことで二次構造を評価した。

結果と考察

本研究で作製した NpHR 安定同位体サンプルは大腸菌発現系の培養条件を最適化することにより、 ^{13}C , ^{15}N 均一二重ラベルでは培地 1L 当たり約 11mg、リバースラベルでは約 17mg、 ^2H , ^{13}C , ^{15}N 均一三重ラベルでは約 8mg の収率で大腸菌膜から“活性型”として高収量に得られた。また脂質再構成条件を詳細に検討することで NpHR の二次元結晶化に成功した。これにより膜タンパク質 NpHR が固体 NMR 測定用試料として均一となるのでスペクトル分解能の向上が期待でき、複雑な多次元固体 NMR 測定への応用が可能となった。

一般に脂質二重膜を貫通する膜タンパク質の運動性は、膜貫通領域と膜表面領域で異なると考えられる。本研究ではそれらの運動性の違いを利用した NpHR の多次元 NMR 信号の検出を行い、帰属作業の簡略化に適用できるか検討した。

膜貫通の immobile 領域をターゲットとして ^{13}C , ^{15}N の均一二重ラベルサンプルで二次元 ^{13}C - ^{13}C スピン拡散測定を行った。7TM タンパク質は α ヘリックス構造由来の信号の重なりが多いため均一ラベルではピークの分離が難しいが、膜貫通領域に多数存在する疎水性アミノ酸のうち V, L, F, Y のラベル率を下げたリバースラベルサンプルによって帰属を効率化した。一方、膜表面の mobile 領域をターゲットとして Cl^- 結合に伴う構造変化解析を行なうために、 Cl^- 結合型と Cl^- 非結合型の 2 種類のサンプルについて二次元 ^1H - ^{13}C FLOPSY 測定を行った。これらのアミノ酸レベルでの帰属結果から CSI を計算したところ、immobile 領域では α ヘリックス構造、mobile 領域では凡そランダムコイル構造を示し、運動性の違いを利用した NMR 信号の検出が適切に行なわれていることがわかった。更に mobile 領域ではコンフォメーション変化に Cl^- 依存性があることが示唆された。これらの変化をより詳細に検討するために HNCOCA 測定を行い、FLOPSY と組み合わせで解析することで残基レベルの帰属を行った。その結果、膜表面領域の約 63 % にあたる 71 残基の主鎖の帰属に成功し、CSI から Cl^- 依存による化学シフトの変化は特に細胞外ループの 100 番目の His 近傍で大きいことがわかった。これらの結果は、 Cl^- の取り込み機能に His100 近傍の構造変化が関与している可能性が示唆された。

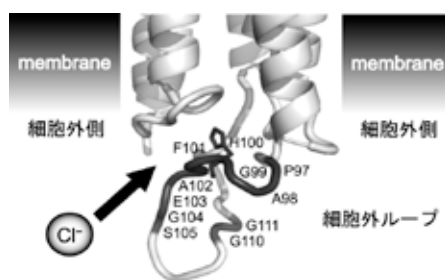


Fig. 1 Chemical shift perturbation in the BC loop of NpHR by adding Cl^-

ポリアミノ酸-金属イオン錯体の固体 NMR

北大院工 ○平沖敏文、藤江正樹

Solid state NMR studies on Poly(amino acid)s-Metal ion complexes

○Toshifumi Hiraoki and Masaki Fujie

Graduate School of Engineering, Hokkaido University, Sapporo, 060-8628

The structures of poly(D-glutamic acid)(PGA) and poly (L-aspartic acid) (PAA) complexes with various metal ions in solid state were characterized by ^{13}C CP/MAS NMR spectroscopy. Most of complexes show the α -helical conformation as judged from the chemical shift values of the main-chain carbons. The chemical shift value of the carboxylate carbons of PGA- and PAA-metal complexes depends on the ionic radius of the metal ion used, suggesting the contribution of the δ_{22} component of the chemical shift anisotropy for the carboxylate carbon resonance.

ポリグルタミン酸 (PGA)とポリアスパラギン酸 (PAA)は様々な金属イオンと錯体を形成する。二価金属イオンと PGA との錯体は、固体状態で主鎖構造は用いる金属イオンに依存して様々な二次構造をとる。¹⁾ 側鎖カルボキシル炭素の化学シフト値は金属イオン半径と原子価数に依存して変化することが分かった。本研究では、PGA 金属イオン錯体と側鎖メチレン基が1つ少ない PAA の金属イオン錯体を固体 ^{13}C -NMR により調べ、PGA 錯体と比較検討した。又、PGA 錯体の側鎖カルボキシル基炭素の化学シフト異方性を測定し、金属イオン半径との関係を調べた。

高分子金属イオン錯体は NaPGA、NaPAA 水溶液に目的の金属塩を加えて調整した。 ^{13}C -CPMAS NMR 測定は室温、75MHz で行った。

Fig. 1 に PGA と 5 種の金属イオン錯体の ^{13}C -CPMAS スペクトルを示す。主鎖 C' 、 C_α 、 C_β の化学シフト値は 176、56、26ppm であり、いずれの錯体も α -ヘリックス構造を示す。これは、コイル状態の NaPGA は二価金属イオンを結合すると α -ヘリックスにコンフォメーション変化することを示している。さらに側鎖 C_γ の化学シフト値は Fig.4 に示すように金属イオン半径に依存して変化した。

C_α シグナルには右肩が観測され、この化学シフト値はコイル状態を示す。線形分離して求めた α -ヘリックス含量は金属イオン半径の増加にともない、90 から 70%に減少した。

PGA-三価金属イオン錯体の ^{13}C CP/MAS NMR スペクトルを Fig. 2 に示す。これらの錯

key word : poly(amino acid), metal ion complex, solid NMR

○ひらおき としふみ、ふじえ まさき

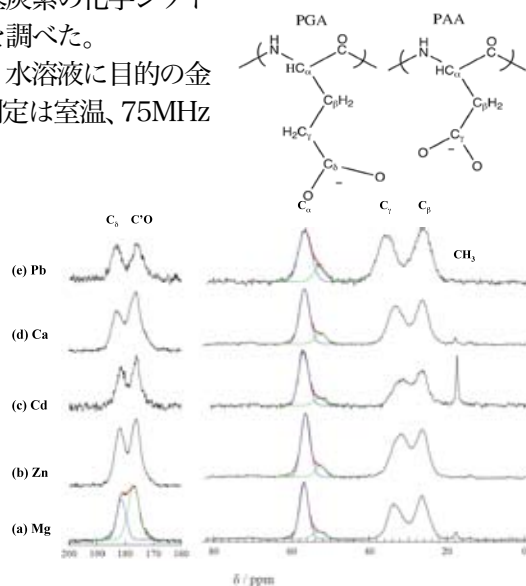


Fig. 1 ^{13}C -CPMAS NMR spectra of PGA-divalent ion complexes.

体の C' 、 C_α 、 C_β の化学シフト値は二価金属錯体と同様であり、 α -ヘリックス構造であることを示す。 C_α シグナルには肩が観測され、コイル構造の存在を示す。波形分離して求めた α -ヘリックス含量は 65~70% で、金属イオン半径に依存してわずかに増加した。この傾向は二価金属錯体とは異なる。 C_δ の化学シフト値は Fig.4 に示すように金属イオン半径依存性を示し、その変化量(3.8ppm/Å)は二価金属錯体(6.3ppm/Å)に比べ小さい。ここで Y-と La-PGA の C_δ は数 ppm の常磁性シフトを示した。

Fig.3 に PAA 金属錯体の ^{13}C CP/MAS NMR スペクトルを示す。NaPAA では 173, 52, 39ppm に C' 、 C_α 、 C_β がそれぞれ観測され、主鎖構造が α -ヘリックスであることを示す。PAA 金属錯体では C' と C_γ のシグナルが重なっているため、波形分離して化学シフト値を求めた。MgPAA、CaPAA、PbPAA の C' 、 C_α 、 C_β の化学シフト値は PAA-Na の値とほぼ等しく、PAA-二価金属錯体も α -ヘリックス構造であることを示している。

PAA の C_γ の化学シフトの金属イオン半径依存性を Fig. 4 に示す。金属イオン半径が大きくなると、PAA の化学シフト値は PGA と同様に増加するが、その変化量(2.2ppm/Å)は PGA より小さい。

カルボキシル炭素の化学シフト値の金属イオン半径依存性を検討するため、Herzfeld-Berger 法より PGA の C_δ の化学シフト異方性を求めた。 δ_{22} 成分は Fig.5 に示すように δ_{iso} と同様なイオン半径依存性(5.5 ppm/Å)を示すが、 $\delta_{11}+\delta_{33}$ はほぼ一定であった。 δ_{22} の方向はカルボキシル基面内で C_δ -金属イオン軸方向に垂直であると予想され、金属イオン半径の増加によりこの方向の C_δ の電子密度が減少することを示唆している。

1) H. D. Keith, et al, *Biopolymers*, 7, 775(1969).

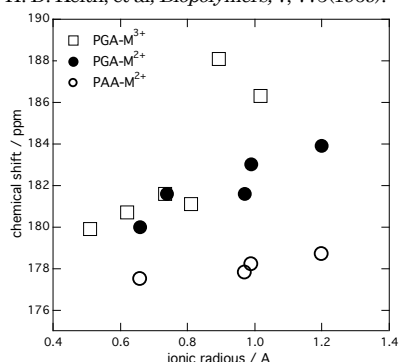


Fig. 4 Chemical shifts of carboxylate carbons against ionic radius.

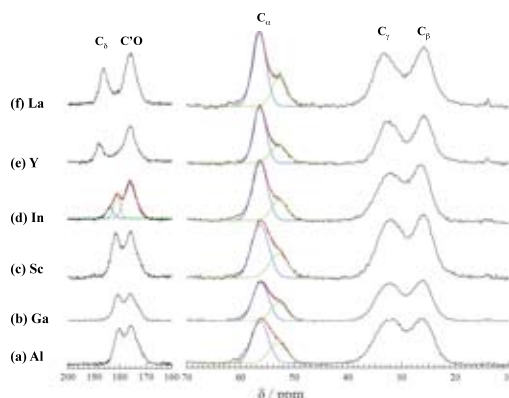


Fig. 2 ^{13}C -CPMAS NMR spectra of PGA-trivalent ion complexes.

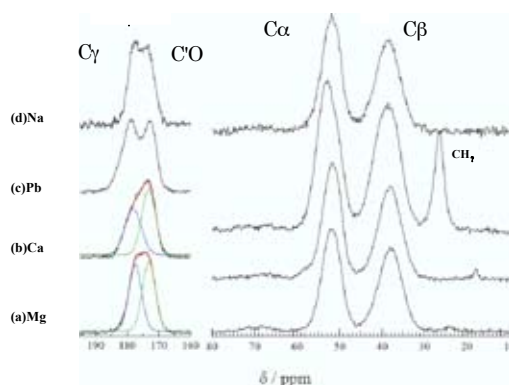


Fig. 3 ^{13}C CP/MAS NMR spectra of PAA-metal complexes.

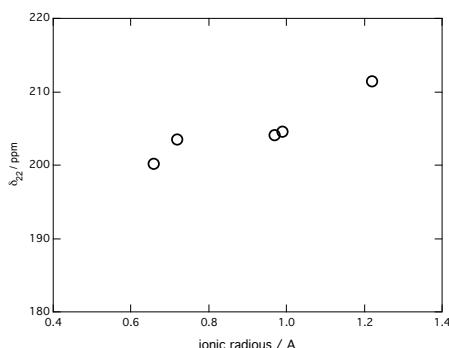


Fig. 5 δ_{22} component of C_δ of PGA complexes against ionic radius.

の研究

○永井圭祐, 平沖敏文
北大院工

Solid state multi nuclear NMR studies on poly(L-lysine) - hydrogenphosphate complex

○Keisuke Nagai and Toshifumi Hiraoki

Graduate School of Engineering, Hokkaido University, Sapporo

The conformation of poly(L-lysine) - hydrogenphosphate complex in solid state was characterized by ^{13}C CP/MAS NMR spectroscopy. The complex formed the α -helical as well as the random coil conformations as judged from the chemical shift values of the main chain carbon resonances. HETCOR spectra showed the fast spin diffusion. Chemical-shift-anisotropy parameters of the phosphate were obtained from ^{31}P CP/MAS NMR spectroscopy. δ_{11} and δ_{22} values of the complex were different from those of $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, while δ_{iso} and δ_{33} values of the complex were close to those of $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$.

【序論】 Keithらは、ポリLリジン(PLL)の側鎖に HPO_4^{2-} が結合したPLL- HPO_4 錯体の固体構造が α -helix構造であると、X線回折・電子線回折で明らかにした。⁽¹⁾ 本研究では、固体 ^{13}C CP/MAS NMRとFT-IRによりPLL- HPO_4 の二次構造を調べ、 ^{13}C - ^1H dipolar HETCOR測定により、スピン拡散について調べることで構造をさらに検討した。側鎖末端の構造を検討する為、固体 ^{31}P CP/MAS NMR測定を行った。Herzfeld- Berger法により求め、 HPO_4^{2-} の化学シフト異方性パラメーターを求めた。

【実験】 PLL-HBrと12倍量の Na_2HPO_4 イオンからなる水溶液を室温で混ぜ沈殿を得た。20%エタノールを加えて洗い数回遠心分離し凍結乾燥させて、PLL- HPO_4 を得た。固体 ^{13}C CP/MAS、 ^{31}P CP/MAS測定は、共鳴周波数がそれぞれ75.5MHz、121.5MHzで行った。HETCOR測定は分子科学研究所の ^{13}C 共鳴周波数が231.5 MHzであるECA-920で行った。

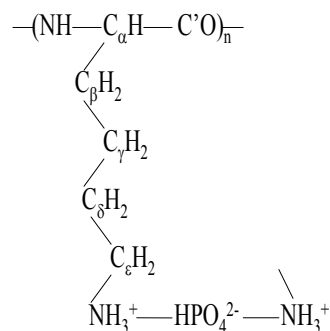


Fig.1 Schematic model of PLL- HPO_4 complex.

Poly(L-lysine) ^{13}C NMR conformation

○ ながい けいすけ, ひらおき としふみ

【結果・考察】(1) 固体 ^{13}C CP/MAS

Fig.1に ^{13}C CP/MAS NMRスペクトルを示した。PLL-HBrの $\text{C}'\text{O}$ 、 C_α 、 C_β シグナルは171.5、52.5、27.5ppmに現れ、文献値との比較から主に β シート構造を取る。(2) $\text{C}'\text{O}$ 、 C_α シグナルは非対称な線形でありランダムコイル構造も存在する。波形分離から β シート含量は60%とわかった。PLL-H PO_4 の $\text{C}'\text{O}$ 、 C_α 、 C_β シグナルは177、58.2/54.8、23.6ppmに現れ、 α ヘリックス構造を取る。 C_α シグナルはダブルレットでありランダムコイル構造も存在する。波形分離から α ヘリックス含量は54%とわかった。これは HPO_4^{2-} が結合することで主鎖の2次構造が β シート/ランダムコイルから α ヘリックス/ランダムコイルへ変化することを示している。

(2) ^{13}C - ^1H HETCOR

PLL-H PO_4 のHETCORスペクトルをFig.3に示した。 ^1H 軸側では H_α だけが、他のシグナルとはっきり区別出来た。Mixing Time(MT)=100 μs では、直接結合している C_α - H_α 、 C_β 、 δ 、 γ -H側鎖シグナルや C_α -NH/NH $_3$ シグナルが見られた。MT=500 μs では、2~3結合離れている $\text{C}'\text{O}$ -H側鎖、 $\text{C}'\text{O}$ - H_α や C_β 、 δ 、 γ -NH/NH $_3$ や C_α -H側鎖シグナルが新たに見られた。MT=1msでは、 C_ϵ -NH/NH $_3$ シグナルの長距離相関が新たに見られた。

(3) 固体 ^{31}P CP/MAS

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ とPLL-H PO_4 の化学シフト異方性パラメーターを求めた。リン系化合物では、 δ_{11} に近い方向の結合距離が最も長く、 δ_{33} に近い方向の結合距離が最も短いという性質がある。(3) これを用いて HPO_4^{2-} の δ_{33} が $\text{P}=\text{O}$ 結合方向に近いと考え、テンソル軸方向を推定した。

References

- (1) H. D. Keith, et al, Biopolymers, 7, 775 (1969).
- (2) H. R. Kricheldorf, et al, Macromolecules, 16, 615 (1983).
- (3) C.A.McDowell, et al, J. Mag. Res. 78, 498 (1988).

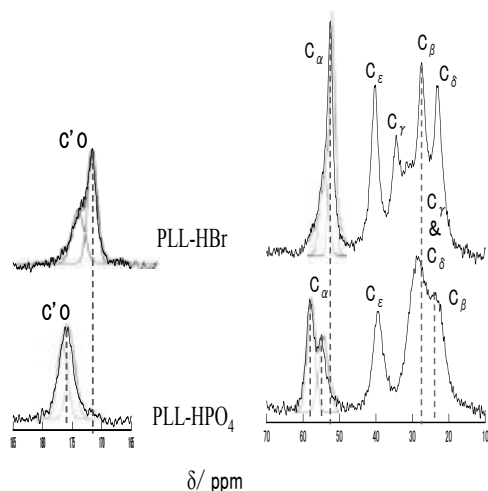


Fig.2 ^{13}C CP/MAS NMR spectra of PLL-HBr and PLL-H PO_4 .

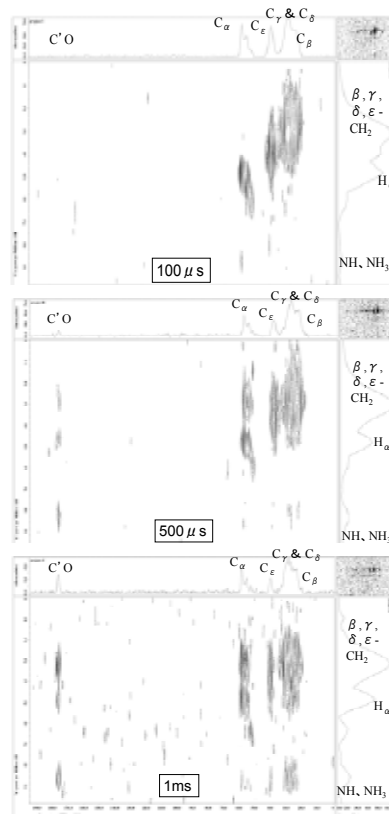


Fig.3 ^{13}C - ^1H HETCOR spectra of PLL-H PO_4 at various mixing time.

スズメバチのシルクの延伸配向挙動に関する 固体 NMR 解析

亀田 恒徳（農業生物資源研究所）

Drawing of silk of the hornet (*Vespa xanthoptera*) using by solid-state NMR

Tsunenori Kameda

National Institute of Agrobiological Sciences, Tsukuba, Ibaraki, Japan

Hornet silk obtained from the cocoons of yellow hornet (*Vespa simillima*, Vespinae, Vespidae) in their native state have an α -helix with coiled-coil structure and a β -sheet. When hornet silk gel films (HSGFs) are formed by pressing and drying the hornet silk hydrogel, the structure of the silk fibers in the native cocoon is restored. Wet HSGFs are flexible and can be uniaxially drawn with a draw ratio of 2. In order to clarify the deformation mechanism during uniaxial drawing, changes occurring in the conformation and molecular orientation of the films during drawing are examined by solid-state ^{13}C and ^{15}N NMR. The results show that during wet drawing, molecular orientation proceeds preferentially over α - β transformation. Furthermore, molecular orientation of the α -helix proceeds preferentially over that of the β -sheet.

【緒言】 スズメバチの幼虫は蛹になる過程で巢中の巢穴にフタ状のマユを作る。このマユはホーネットシルク(HS)と呼ばれる繊維状タンパク質から構成され、そのタンパク質の構造は α -helix を主体としている¹。さらに一部の α -helix 分子鎖同士がロープのように絡み合っており^{2,3}、従来知られてきた β -sheet 構造を主体とするクモやカイコのシルクとは異なっていることが最近の研究から分かってきた⁴⁻⁶。我々は、Coiled-coil 構造の存在が、水を含んでいる状態での延伸(Wet 延伸)において、分子鎖の配向効率を向上させ、少ない延伸倍率で高い力学物性を引出すことを可能にすると考えている。本研究では、HS フィルムの延伸に伴う構造変化を固体 NMR によって解析し、Coiled-coil 構造を有するタンパク質素材の延伸における配向挙動と力学物性への影響について明らかにすることを目的とする。

【実験】 茨城県および栃木県内で駆除されたキイロスズメバチの巣からマユを採取して、9M LiBr 水溶液に溶解し、溶け残った不純物を除去した後、透析し、その過程で形成した HS ゲルを平板状に圧縮乾燥してフィルム(HS ゲルフィルム⁷)を作製した。ゲル中のシルク濃度は 1wt%とした。ゲルフィルムの延伸は、フィルムを幅 1-2mm の短冊状に切出して一軸延伸した。固体 NMR 測定は Varian infinity 300((独)森林総合研究所)を用いた。Slow-MAS 測定、Static 測定、および含水試料の測定は 7.5mmf CP-MAS プローブを用い、その他の ^{13}C および ^{15}N CP-MAS 測定は 4mmf CP-MAS プローブを用いて行った。

【結果および考察】 HS ゲルフィルムは Wet 延伸すると 2 倍まで均一に延伸できた。2 倍に延伸した後に定長下で乾燥したフィルムの力学物性値は、過去に報告されたタンパク質フィルムのそれを上回っていた。こうした優れた物性値が比較的小さい延伸倍率で得られた理由は、延伸過程で Coiled-coil 構造領域が効率的に配向したためであると推察された。これを検証するために、Wet 延伸で得られた延伸倍率の異なる HS ゲルフィルムについて広角 X 線回折(WAXD)測定を行ったところ、 α -helix と β -sheet が混在し、 α -helix の一部が Coiled-coil 構造を形成していることが確認された。さらに、2 倍延伸フィルムには、配向した α -helix と β -sheet

スズメバチシルク、ゲルフィルム、配向
かめだ つねのり

成分の他に、ほとんど無配向の β -sheet 成分が存在していることが分かった。また、 ^{13}C CP-MAS 測定からは、Ala の一部は延伸によって α -helix から β -sheet へ転移するが、Ser のコンホメーションはほとんど変化しないことが分かった。 ^{13}C CP-MAS 測定から得られる Ala および Ser のピークは、それぞれ、HS の Ala リッチおよび Ser リッチ領域の構造を主に反映しているものと考えられる。このことから、Ala リッチ領域では α -helix(一部 Coiled-coil 構造)が形成され、それが延伸によって効率的に配向し、さらにその一部が配向 β -sheet に転移したものと解釈された。一方、Ser リッチ領域は、延伸前から β -sheet が形成され、延伸の影響をほとんど受けず、延伸前の無配向 β -sheet の状態が延伸後も残り、それが低配向 β -sheet として観測されたと考えられた。これらの解釈の妥当性を検証するため、2倍延伸試料の Ala および Ser に由来する ^{13}C CP/MAS 固体 NMR スペクトルについてスピニングサイドバンド(SSB)に着目した解析を行った。HS ゲルフィルムを2倍に延伸し、その延伸軸を固体 NMR の試料管回転軸と平行に揃えた状態と、揃えずに完全ランダムにした状態で ^{13}C CP/MAS スペクトルを観測して比較した。一般に、延伸軸に対して分子鎖が無配向の場合には、いずれの状態も同一のスペクトルを与えるが、分子鎖が配向している場合には、等方平均化学シフトピークに対する SSB ピークの強度が配向の程度に依存して変化する。Fig. 1

には、Ala と Ser のカルボニル炭素の等方平均化学シフトピークに対して高磁場(+)および低磁場(-)側に現れる一次の SSB について、2倍延伸試料の延伸軸を試料回転軸に揃えなかった場合(ランダム)に対する、揃えた場合のピーク強度の減少率(%)を、スピニング周波数に対してプロットした。この図から、Ala(α -helix)および Ala(β -sheet)と比べて、Ser(β -sheet)の減少率が小さいことがわかる。この結果は、2倍延伸フィルム中において、Ala が存在する α -helix および β -sheet は共に高配向状態にあり、一方、Ser が存在する β -sheet は低配向状態にあることを示唆しており、前述の解釈を支持するものである。以上の結果から、HS ゲルフィルムのWet 延伸において、 α -helix (一部 Coiled-coil 構造)を形成している Ala リッチ領域は、 β -sheet を形成している Ser リッチ領域よりも優先的に配向することが明らかになった。さらに、固体 NMR によるダイナミクス解析や HS ゲルフィルムを重水中に浸漬することによる ^{13}C および ^{15}N CP-MAS スペクトルの線形変化などの解析結果を併せて考察することにより、Coiled-coil 構造領域の延伸効率が上がる理由として、Coiled-coil 構造の周辺に水分子が集まり、さらに、Coiled-coil 構造の剛直性も加わることで、延伸方向への方向転換が容易にできるためと結論した。

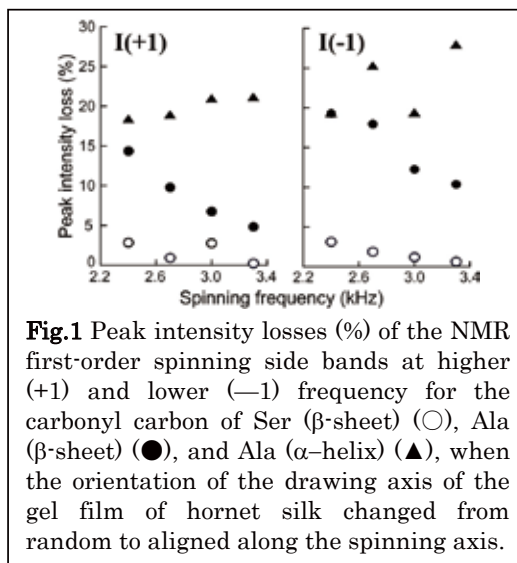


Fig.1 Peak intensity losses (%) of the NMR first-order spinning side bands at higher (+1) and lower (—1) frequency for the carbonyl carbon of Ser (β -sheet) (○), Ala (β -sheet) (●), and Ala (α -helix) (▲), when the orientation of the drawing axis of the gel film of hornet silk changed from random to aligned along the spinning axis.

【参考文献】 1. Kameda et al., *Z.Naturforschung. C.*, **60**, 906 (2005). 2. Kameda et al., *Int. J. Biol. Macromol.*, **44**, 64 (2009). 3. Sezutsu et al., *Biosci.Biotech. & Biochem.*, **71**, 2725 (2007). 4. Kameda et al., *Anal. Bioanal. Chem.*, **387**, 2895 (2007). 5. Kameda et al., *Biosci. Biotech. Biochem.*, **71**, 1353 (2007). 6. Kameda et al., *Comp. Biochem. Phys. B*, **151**, 221 (2008). 7. Teramoto et al., *Biosci. Biotech. Biochem.*, **2**, 3189 (2008).

The processing mechanism of *B.mori* silk and its application○Yu Suzuki¹, J. T. Gerig² and Tetsuo Asakura¹¹Department of Biotechnology, Tokyo University of Agriculture and Technology, Japan²Department of Chemistry, UC Santa Barbara, California, USA.

The fiber formation mechanism of silk fibroin in *B. mori* silkworm has been revealed via the conformational change of the silk fibroin between before spinning (Silk I) and after spinning (Silk II). Especially, Silk I was repeated type II β -turn structure in aqueous solution which is a key structure for producing the silk fiber with extremely high strength. In order to mimic this Silk I structure, fluorinated alcohols have been used as solvent because regenerated silk fibroin in the concentrated aqueous solution takes only random coil structure and loose-helical structure like Silk I has been observed in the fluorinated alcohols. In this presentation, we will study the solution structure of the sequential peptide which is a model for the crystalline part of *B. mori* silk fibroin, in the fluorinated alcohols such as hexafluoroisopropanol and hexafluoroacetone by solution NMR. The solute-solvent interactions are also examined by ¹H-¹⁹F intermolecular NOE.

【緒言】

家蚕絹は、蚕体内では水溶液として存在するが、独自の繊維化機構を経て高強度な繊維となる。このダイナミックな物性の変化は、主として絹フィブロインの立体構造の変化によって、もたらされる。そのため、この繊維化機構を理解するためには、繊維化前後の絹フィブロインの立体構造の解明が不可欠であった。我々は、¹³C/¹⁵N 化学シフト値や REDOR、2D スピン拡散などの各種固体 NMR 手法等を駆使して、繊維化前の構造である Silk I 型はタイプ II 型の β -turn の繰り返し構造であることを明らかにしてきた。¹ また、この繊維化前の特異な構造からスタートし、吐糸管内部の圧糸部を通過する際の“ズリ”と八の字を描く蚕頭部の動きによる延伸力を受け²、繊維化後 (Silk II) には、分子間構造の異なる 2 種類の逆平行 β -sheet 構造とゆがんだ β -turn 構造の混在型となり、高強度な絹繊維となることが明らかとなった。³

これらの研究から、Silk I の構造が高強度の絹繊維の形成に極めて重要であることが示されてきた。実際、カイコ体内の液状絹と同濃度の 30% 再生絹水溶液はランダム構造であり、その再生絹糸は極めて弱い。一方、絹がゆるいヘリックス構造を形成するフッ素系溶媒、HFIP や HFA に溶解すると、得られる再生絹糸は天然の絹糸と同程度の力学強度を有する。⁴ そこで、本研究では、HFIP と HFA 中の絹結晶部モデルペプチドの構造と、ペプチド-溶媒間の相互作用の詳細を溶液 NMR により検討した。

家蚕絹・繊維化・モデルペプチド

○すずきゆう, ジョン・ゲーリック, あさくらてつお

【実験】

家蚕絹結晶部モデルペプチド(AGSGAG)₂-NH₂は Pi Proteomics 社(Huntsville, AL)から購入した。溶媒は HFIP-d₁((CF₃)₂CDOH)と HFA·3H₂O を用いた。NMR 測定は Varian INOVA 500MHz、H/F probe を用い、25℃、ペプチド濃度 30mM で行った。構造決定のため、TOCSY、NOESY、ROESY 測定を行い、解析は SPARKY、構造計算は DYANA を用いた。ペプチドーフッ化アルコール間の相互作用解析は、¹H-¹⁹F intermolecular NOE 測定を行い、交差緩和係数(σ_{HF})を求めた。拡散係数は bipolar double stimulated echo pulsed field gradient 測定により求めた。

【結果・考察】

HFIP、HFA のどちらの溶媒中でも、ほぼ全長にわたり H_{αN}(i, i+1)、H_{NN}(i, i+1)のクロスピークが観測され、(AGSGAG)₂ は、ゆらぎは大きいものの、ターンを含むコンパクトな構造を形成していることが示された(Figure 1)。HFIP 中の方が、少し伸びた構造であった。

また、ペプチドーフッ化アルコール相互作用解析では、¹H-¹⁹F NOE スペクトルにおいて、ペプチド由来のすべてのピークが HFIP 中ではポジティブであるのに対し、HFA 中ではネガティブであった(Figure 2)。⁵ 溶媒の粘性や分子半径等の条件を考慮に入れてペプチドー溶媒分子間に特異的な相互作用がない場合の交差緩和係数σ_{calc}を求め、¹H-¹⁹F NOE スペクトルから求めた実測値σ_{obs}と比較すると、HFIP は σ_{calc} と σ_{obs} が同程度の値であった。一方、HFA では σ_{calc} がほぼすべての ¹H でポジティブなのに対し、σ_{obs} はすべてネガティブであり、ペプチドーHFA 分子間の強い相互作用が示唆された。HFA 絹溶液から作成された再生絹糸の力学強度は、HFIP 絹溶液の 60%程度であり、絹フィブロインの溶液構造の違いに加え、溶媒との相互作用の強さが再生絹糸の物性に影響を与えていると考えられる。

【謝辞】本研究は一部、生物系特定産業技術研究支援センターイノベーション創出基礎的研究推進事業(平成 20-22 年度)ならびに科学研究費基盤研究 S(平成 18-22 年度)によって行われた。

【参考文献】

1. T. Asakura *et al*, *Macromolecules* **38** 739 (2005)
2. M. Moriya *et al*, *Polymer* **49** 952 (2008)
3. T. Asakura *et al*, *J. Am. Chem. Soc.* **124** 8794 (2002)
4. S. W. Ha *et al*, *Biomacromolecules* **7** 18 (2006)
5. C. Chatterjee *et al*, *Biochemistry* **45** 14665 (2006)

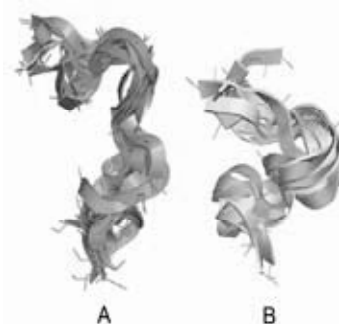


Figure 1: Superimposed ten structures of (AGSGAG)₂ in HFIP (A) and seven structures of (AGSGAG)₂ in HFA (B) consistent with the available intra-molecular ¹H-¹H NOE/ROEs data

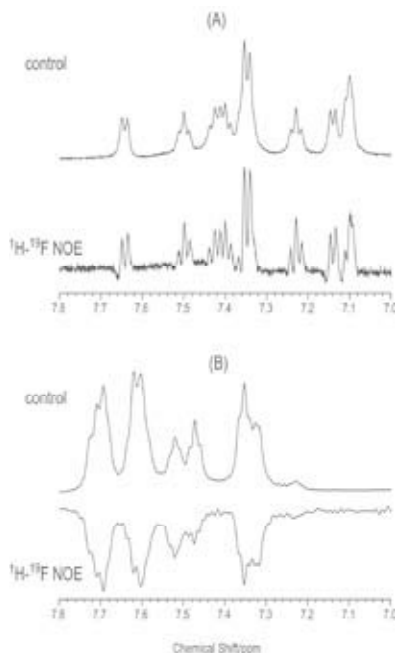


Figure 2: Low field ¹H-¹⁹F intermolecular NOE spectra of (AGSGAG)₂ in HFIP (A) and in HFA (B). Upper spectrum in each set is the observed 1D ¹H spectrum and lower spectrum is the ¹H-¹⁹F NOE spectrum at a mixing time of 500ms for HFIP system and 300ms for HFA system, respectively.

Production and NMR analysis of silk-like proteins containing the cell adhesive sequence○Ai YOSHIDA¹, Masakatsu KAMIYA², Makoto DEMURA², and Tetsuo ASAKURA¹¹Department of Biotechnology, Tokyo University of Agriculture and Technology.²Graduate School of Advanced Life Science, Hokkaido University.

Basic cellular events such as cell adhesion and cell migration depend heavily on the ligand recognition exercised by integrins through a RGD tripeptide sequence of the ligand. Silk-like proteins which consist of alternative sequences of main sequences from *Antheraea perni* silk fibroin and the sequence TGRGDSPA in fibronectin with high cell adhesion ability were produced by *E.coli*. To determine specificity and affinity of RGD motif-containing integrin-ligands, structural environment of the motif is also important. In order to develop a structural platform for design of silk-based biomaterials, solution state and solid state NMR analysis of the model peptides containing both silk fibroin sequences and TGRGDSPA were performed. Also, production of the ¹³C, ¹⁵N-uniform labeled silk-like protein is continuously advanced to make comparative study between conformations and function of these proteins.

【緒言】

細胞の接着や増殖において最も重要であるインテグリン-リガンド結合の多くは Arg-Gly-Asp (RGD) 配列によって認識される。このリガンド認識の特異性と高親和性はリガンドの一次配列だけでなく、構造環境にも起因する。高い相同性を有するタンパク質である、フィブロネクチンとテネイシンはRGD配列の存在するループの長さや運動性によって、結合するインテグリンの種類や結合の強さが異なることが報告されている[1]。また、インテグリンの種類に合わせてRGD配列の構造環境を最適化することで、アンタゴニストとして優れたペプチドを *de novo* 設計する試みも行われている[2]。

我々は、機械的強度や生体適合性に優れ、高い形状加工性を持つ絹タンパク質の一次配列と機能性配列を組み合わせることで、絹の機能性向上を目的とした絹様タンパク質の設計・生産を行ってきた[3]。一方、野蚕の一種である *A. perni* の絹フィブロインはアラニン連鎖とRGD配列を有し、細胞接着性が高いことが知られている[4]。

今回、新たにアラニン連鎖配列およびフィブロネクチン由来のRGD配列、水溶性付加とカルシウム結合のポイントとなるグルタミン酸連鎖配列を導入した絹様タンパク質の設計を行い、硬組織用絹様材料の創製を目的とした。本発表では、モデルペプチドを用いてpH変化による絹配列部分の構造変化がRGD配列の構造環境にどのような影響を与えるのかについて、溶液および固体NMRを用いて検討した。

Silk fibroin, RGD, Peptide and Protein

○ よしだあい, かみやまさかつ, でむらまこと, あさくらてつお

【実験】

1. モデルペプチドの合成と溶液および固体NMR構造解析

各種ペプチドならびに安定同位体ラベルペプチドの合成をF-moc固相法にて行った。

Table 1. Several model peptides synthesized by solid-phase method.

(a)	EE(A) ₁₂ EETGRGDSPAEE(A) ₁₂ EE	<i>A. perni</i> silk fibroin + RGD
(b)	AGS(GAGAGS) ₂ GGTGRGDSPAGG(GAGAGS) ₂ GAG	<i>B. mori</i> silk fibroin + RGD
(c)	(TSTGRGDSPAS) ₃	(RGD) ₃

ペプチド(a)について、H₂OまたはD₂O中でCDおよび溶液NMR測定を行った。構造を比較するために、ペプチド(b), (c)についても同様の測定を行った。pH調整はNaOHのみで行い、所定のpHに調整後、凍結乾燥した試料を固体NMR測定に用いた。CD測定はJASCO J-805、溶液NMR測定はJEOL ECA-400またはBruker DRX500、固体NMR測定はBruker AVANCE-400を用いて行った。

2. 新規絹様タンパク質の設計と生産

ペプチド(a)の構造に基づいて、新規絹様タンパク質のDNA配列を設計し、大腸菌による発現を進めている。E2A12E2FN(5); [EE(A)₁₂EETGRGDSPA]₅。

【結果と考察】

pH変化に伴うGlu残基側鎖の荷電状態の変化が、ドライビングフォースとなり、Ala連鎖部位の構造に大きく影響することが懸念される。ペプチド(a)の各pHにおけるCDスペクトルをFigure 1に示した。222 nmと208 nm近くに極小値を持つことから、pH3.6およびpH5.2では α -helix構造が主であることが分かる。しかしpHが上がるにつれて、しだいにrandom coil構造の割合が増加する。

一方、ペプチド(a)をpH3.0およびpH10.6に調整後、凍結乾燥させた試料の¹³C CP/MASスペクトルをFigure 2に示した。構造依存性の高いAla C β はpH3.0では15.1ppm、pH10.6では15.9ppmにピークを示し、C α およびC γ はほとんど変化しない。従って、固体状態ではいずれもGlu側鎖の解離状態によらず、Ala連鎖部位は α -helix構造を持つことが分かる。

今後、RGD部位の局所構造についての解析を進め、機能との相関について異なるRGD構造環境を持つペプチド(b)や(c)と比較する予定である。また、新規絹様タンパク質のNMR構造解析および高分子量化による材料化を目指す。尚、本研究は一部、生物系特定産業技術研究支援センターイノベーション創出基礎的研究推進事業(平成20-22年度)ならびに科学研究費基盤研究S(平成18-22年度)によって行われた。

【参考文献】

- [1] Carr, P.A., et al., Structure, 1997. **5**(7): p. 949-959.
- [2] DiCara, D., et al., J. Biol. Chem., 2007. **282**(13): p. 9657-9665.
- [3] Mingying, Y., et al., J. Biomed. Mater. Res., 2008. **84**(2): p.353-363.
- [4] Minoura, N., et al., Biochem. Biophys. Res. Co., 1995. **208**(2): p. 511-516.

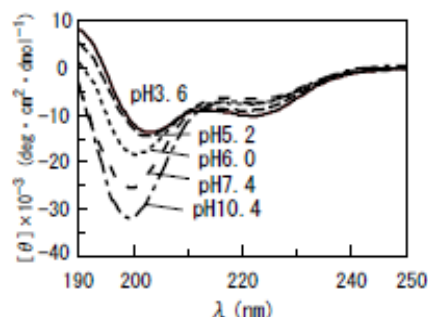


Figure 1. CD spectra of the model peptide (a) (0.02% w/v in H₂O).

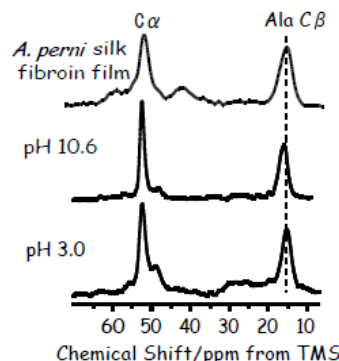


Figure 2. ¹³C CP/MAS NMR spectra of *A. perni* silk fibroin and model peptide (a).

油系ゲル化剤パルミチン酸デキストリンの物性研究

○長島敏雄¹、鈴木孝直²、小池秀明²、月岡大輔²、木川隆則^{1,3}、
横山茂之^{1,4}、林文晶¹

¹理研・生命分子システム、²千葉製粉株式会社、

³東工大院・総理工、⁴東大院・理

A characterization of the molecular interaction of a gelation agent for oil, dextrin palmitate

○Toshio Nagashima¹, Takanao Suzuki², Hideaki Koike², Daisuke Tsukioka²,
Takanori Kigawa^{1,3}, Shigeyuki Yokoyama^{1,4}, Fumiaki Hayashi¹

¹RIKEN SSBC, ²Chiba Flour Milling Co., LTD., ³Interdisciplinary Graduate School of Science and Engineer, Tokyo Institute of Technology, ⁴Graduate School of Science, University of Tokyo

To investigate the molecular property of a gelation agent for oil, dextrin palmitate (DP), which is used as a base material in cosmetic products and medicines, we applied solid-state NMR to the various state of DP. We observed two kinds of peaks from alkyl chain of palmitate in gel and solid NMR spectra and furthermore the temperature-dependent migration between the peaks. Additionally, this dependence was similar to that of DP gel hardness. However, this temperature-dependent manner did not appear on the peaks from dextrin main chain. These results suggest the gel formation is induced by the crystallization and/or the re-orientation of the alkyl chain of palmitate. We will discuss the roll of the alkyl chain and hydroxyl group of DP on gel formation in more detail by NMR.

【序】パルミチン酸デキストリン(DP)は、油系ゲル化剤として、乳液やクリームなどの化粧品の安定化や使用感の向上、油脂の結晶化抑制、顔料の分散安定化に用いられている。DPはデンプンを加水分解して得られたデキストリンにパルミチン酸クロライドを反応させ得られたもので、グルコースひとつに対して最大3個のエステル化が起こる。今回は液状油脂のゲル化に注目し、ゲル形成の構造的メカニズムを明らかにすることを目的している。ゲル形成にはゲル化剤によるマトリックス構造の形成が必要不可欠であるが、DPによるゲル化のメカニズムはわかっていない。本研究では、DP間の分子間相互作用を固体NMRを用いて明らかにした。

【実験】今回用いたDPはエステル置換度が2程度のもので、グルコース上に平均1つの水酸基が残っており、平均分子量は15k程度である。まず、10%DPの流動パラフィン溶液は、硬

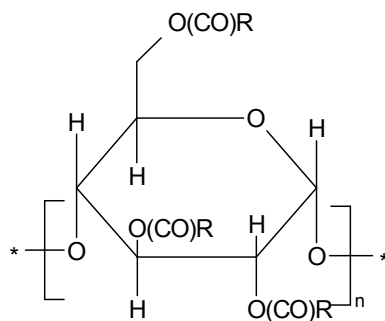


Fig 1. Structure of dextrin palmitate, in which R is alkyl chain (C15).

ゲル、デキストリン脂肪酸エステル、結晶化

○ながしまとしお、すずきたかなお、こいけひであき、つきおかだいすけ、きがわたかのり、
よこやましげゆき、はやしふみあき

いゲルを形成した。2%の重クロロホルム溶液は、粘性変化が見られない溶液状態を保っていた。JEOL ECA-700 NMRとDoty 4mm MASプローブ、およびJEOL CMX-400 NMRとChemagnetics 4mm MASプローブを用いて溶液、ゲル、粉末の ^{13}C NMR測定を行った。溶液およびゲルの測定には、PCTFE製の内部試料管をMASローター内に入れて行った。またVarian Inova 600 NMRを用いて溶液の測定を行い、シグナルを帰属した。

【結果と考察】Fig2に示すように、4~5kHzMASによるCP/MAS NMRスペクトルでは、ゲル中に大量に含まれる流動パラフィンの信号の寄与は小さく、ゲルと粉末でアルキル鎖領域が酷似したパターンをとることがわかった。また、同じ条件で測定した2%DP重クロロホルム溶液のCP/MAS NMRスペクトルとは明らかに異なる結果になった。これらの結果から、ゲル状態にあるDPは粉末に近い状態にあると考えられる。溶液のスペクトルとは異なり、C4-C13のメチレン鎖の部分に低磁場シフトした成分が現れた。C14はC4-C13に重なって解析できないが、同様のシフトはアルキル鎖先端のC15、C16でも見られる。アルキル鎖付け根のC2、C3にはこのような顕著なスペクトル変化が見られなかった。低磁場シフトしている32ppm付近の幅広のシグナルはゲルや粉末にしか見られず、ゲルの形成に密接に関係していると考えられる。

次にゲルに似たスペクトルが得られた粉末で温度依存性を ^{13}C NMRスペクトルを用いて調べた(Fig3)。4~66℃の間ではデキストリン骨格には大きなスペクトル変化が見られなかったが、アルキル鎖領域で温度上昇と共に30ppm付近の信号が増大し、32ppm付近のシグナルが減少した。47℃程度まで変化していくこの過程は、粘弾性測定によるゲル強度測定の結果とも一致する。したがって、ゲル強度の変化にはアルキル鎖の状態変化が関連していると推察される。どちらのシグナルにおいても、十分なCP/MAS NMRスペクトルが観測できているので、どちらも分子運動が制限された状態であると考えられる。NMRでこのようにポピュレーション移動する現象はアルキル鎖間相互作用の変化が原因と考えられ、これまでの報告から32ppmが結晶状態で、30ppmが非晶状態と推定できる[1]。ゲルのマトリクス構造そのものの直接的なデータは得られていないものの、デキストリンの水酸基の水素結合ではなく、C4以降のアルキル鎖の結晶化がマトリクス形成に重要な役割を果たしていると考えられる。

[1] Kitamaru, R et al., *Macromolecules*, **1986**, 19, 636.

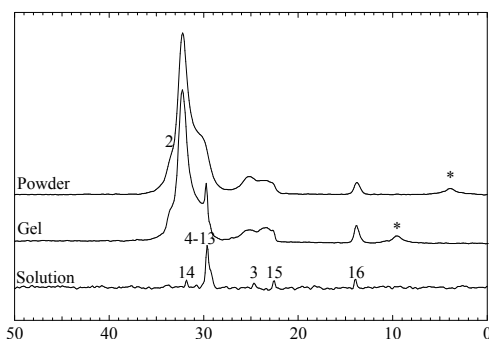


Fig 2. ^{13}C CP/MAS NMR spectra of alkyl chain region of DP in state of solution, gel, and powder at room temperature. Astarisks indicate spinning side band, and the numbers on peaks correspond to carbon on alkyl chain.

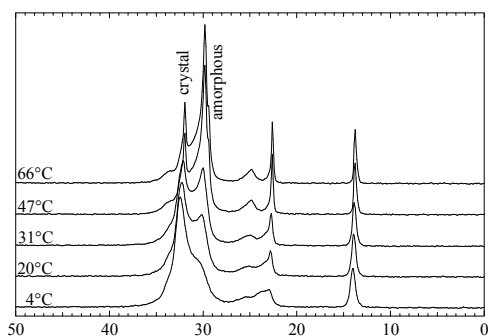


Fig 3. Temperature dependence of ^{13}C NMR spectra of alkyl chain region of DP powder under MAS.

固体¹³C NMRを用いた光照射による ppR - $pHtrII$ の細胞質表面部位の相互作用変化の観測

○近藤 隆博¹、川村 出¹、西尾 拓道¹、加茂 直樹²、内藤 晶¹

¹横浜国立大学大学院工学府

²松山大学薬学部

Change of interaction in cytoplasmic surface region of ppR with $pHtrII$ in the complex formation as studied by solid-state NMR under photo illumination

Takahiro Kondo ¹, Izuru Kawamura ¹, Takudo Nisio ¹, Naoki Kamo ², Akira Naito ¹

¹Graduate School of Engineering, Yokohama National University:College of Pharmaceutical

²Sciences, Matsuyama University

Pharaonis phoborhodopsin (ppR) is a negative phototaxis receptor from *Natronomonas pharaonis* and forms a complex with its cognate transducer $pHtrII$. To understand molecular mechanism of negative phototaxis, it is important to observe the interactional changes of ppR with $pHtrII$ during complex formation and photo activation processes. In this study, interaction of ppR with $pHtrII$ in the cytoplasmic side was examined using solid-state NMR under photo illumination. [¹-¹³C] Ser and [³-¹³C] Ala-labeled ppR and there complexes with $pHtrII$ (1-159) were prepared to investigate the interaction between ppR and $pHtrII$. As a result we observed changes of NMR signal intensity which was related to the interactional changes of cytoplasmic region with $pHtrII$. We will discuss these spectral changes to understand the molecular mechanism of the signal transfer in the process of negative phototaxis.

概要

Pharaonis phoborhodopsin (ppR)は高度好塩好アルカリ性菌中に存在する膜タンパク質で、7本の膜貫通 α -ヘリックスからなるレチナールタンパク質である。また、*pharaonis* Halobacterial transducer II ($pHtrII$)と複合体を形成することで細菌が負の走光性を示すための光受容体となる。そして、この信号伝達のメカニズムを理解するためには、 ppR が光を受けた時の細胞質側でのタンパク質間相互作用の変化を観測することが重要である。

そこで本研究では細胞質側での相互作用変化を調べるための検出プローブとして細胞質表面部位に局在しているSerとタンパク質全体に多く存在するAlaを同位体標識した[1-¹³C]Ser、[3-¹³C]Ala標識 ppR を用い、標識部位の光照射固体¹³C NMR測定を行った。またこの結果、わずかながら ppR と $pHtrII$ の相互作用に関わるNMR信号変化を観測できた。この細胞質側での相互作用変化から信号伝達機構について考察する。

Solid-state NMR, membrane protein, Solid-state NMR under photo illumination

○こんどうたかひろ、かわむらいずる、にしおたくどう、かもなおき、ないとうあきら

実験方法

野生型 ppR -ヒスチジンタグ発現プラスミドを導入した大腸菌をM9培地で培養し、 $[1-^{13}\text{C}]\text{Ser}$ で同位体標識した ppR を発現させた。また野生型 $pHtrII$ -ヒスチジンタグ発現プラスミドを導入した大腸菌をLB培地で培養することで、野生型 $pHtrII(1-159)$ を発現させた。発現された ppR と $pHtrII$ は遠心分離により集菌し、超音波によって破碎、Ni-NTAカラムによる精製を行った。発現タンパク質の確認には吸収スペクトルとSDS-PAGEを用いた。次にEggPCに $ppR : pHtrII : \text{EggPC} = 1 : 1 : 50$ のモル比で再構成した試料を調製し、それぞれNMR測定用buffer(pH7.0)で懸濁し、NMR試料管に詰めて密閉した。 ^{13}C NMRの測定は ^1H 共鳴周波数を398.1MHz、 ^{13}C 共鳴周波数を100.1MHz、測定温度を20°Cに設定し、測定感度を向上させる交差分極 (CP)、異種核間の双極子相互作用を消去する双極子デカップリング (DD) 及び、化学シフト異方性を消去するMAS法(4kHz)を組み合わせることで分解能を向上させた。NMR試料管への光照射はプローブの上方から光ファイバーを挿入し、光ファイバーでフタをした試料管の上から照射した。この方法により高速回転中での光照射が可能になった。これらの装置を用いて暗順応状態と明順応状態で、それぞれNMR測定を行った。明順応状態では帯域通過フィルターで450~600nmの光を ppR に照射することで光活性化状態 (M中間体) を捕捉した。

結果と考察

Fig.1に $[3-^{13}\text{C}]\text{Ala-}ppR/pHtrII$ のDD-MAS ^{13}C NMRスペクトルを載せた。円内が ppR の細胞質表面部位にあるC末端領域に帰属されている信号である。この結果、光を照射することでC末端領域の信号強度が増えているので、この部分の運動性が上がっていることが示唆された。

以前当研究室では光励起信号伝達状態に対応するD75Nで測定したところ、C末端の運動量が増加することを観測した⁽¹⁾。さらに $pHtrII$ 同士の相互作用が増加することが分かった。本実験では、実際に光照射を行い、M中間体が捕捉できたと考えられるので、 ppR は光活性化状態(M中間体)でも $pHtrII$ との相互作用が細胞質表面部位において弱まることが示唆された。このレチナールの光異性化に伴う ppR と $pHtrII$ との相互作用変化が ppR の信号伝達のメカニズムの一端を担っていると考えられる。

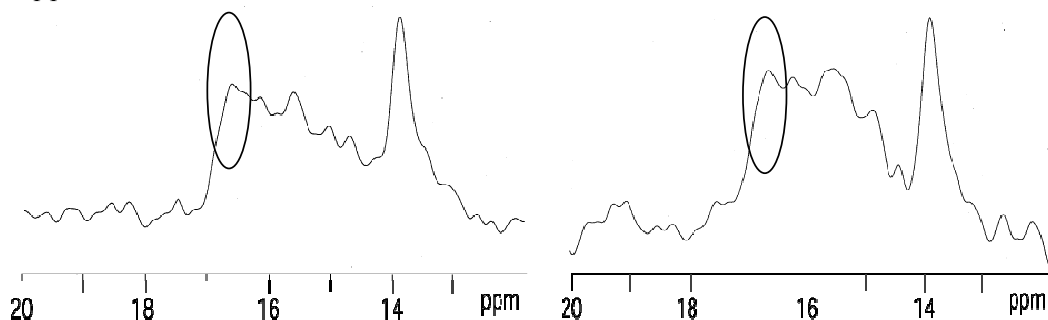


Fig.1 $[3-^{13}\text{C}]\text{Ala-}ppR/pHtrII$ DD-MAS ^{13}C NMR spectra
C-terminal tip region (in circle) , Left : Dark state , Right : Light state

参考文献

- (1) I.Kawamura et al. *Photochem. Photobiol.* (2008) 84,921-930.

固体NMRとTEMによるヒトカルシトニンのアミロイド様線維形成機構とその阻害効果の解析

○渡邊（伊藤）ひかり¹、上平美弥²、近藤正志³、佐藤道夫³、中越雅道³、内藤晶¹

¹横浜国大・工学府、²東北大・多元研、³横浜国大・機器分析評価センター

Analyses of amyloid fibrillation mechanism and its inhibition effect of hCT as studied by ¹³C solid-state NMR and TEM

○Hikari Watanabe(Itoh)¹, Miya Kamihira², Masasi Konndou³, Michio Sato³, Masamichi Nakakoshi³, and Akira Naito¹

¹Graduate School of Engineering, Yokohama National University

²Institute of Multidisciplinary Research Tohoku University

³Instrumental Analysis Center, Yokohama National University

Human calcitonin (hCT) is known as forming amyloid fibril in concentrated aqueous solution. We have shown that the fibrillation mechanism of hCT can be analyzed by the two step autocatalytic reaction mechanism. In this study, we investigated inhibition effect in the fibrillation of hCT. First, we investigated inhibition effect on a variety of solvent in fibrillation. The morphology of hCT in the initial step of fibrillation in HEPES aqueous solution was examined by means of TEM. It was revealed that the fibrillation rate became very slow and consequently spherical intermediate appeared. In addition, ¹³C NMR experiments were performed on the fibrillations of hCT mutants in HEPES aqueous solution. The ¹³C NMR signals showed that structural transition of hCT mutants from random coil to β -sheet and random coil near C-terminal regions appeared during fibrillation. These results suggest that HEPES aqueous solution pronouncedly inhibit the fibrillation in case of hCT mutant.

アミロイド線維形成はアルツハイマー病やパーキンソン病などで知られるアミロイド病の直接的な原因とされており、この線維形成機構や線維形成阻害機構を解明することは、線維形成が起こる全般的な病気（アミロイド病）の治療法や予防法の開発の手がかりになる。アミロイド線維は結晶を形成せず、沈殿物を形成するため、X線回折法や溶液NMRを用いることは適さない。よって、我々はアミロイド線維に対して、固体NMRを使用することで、線維構造に関する詳細な情報の提供を示してきた。

本実験で使用するヒトカルシトニン（hCT）は骨粗鬆症、Paget病及び高カルシウム血症の治療薬として以前使用されていたペプチドであったが、水溶液中で容易にアミロイド様線維を形成することが確認されたため、治療薬として使用されなくなっている。これまでの結果、hCTは核形成過程と線維成長過程の2段階自己触媒反応機構で線維形成することを報告した。

固体NMR、アミロイド線維、アミロイド線維阻害

○わたなべ（いとう）ひかり、かみひらみや、こんどうまさし、さとうみちお、なかこしまさみち、ないとうあきら

本研究では、溶媒による線維形成阻害効果と、線維の促進因子となるアミノ酸の特定するため、hCT変異体による線維形成阻害機構について、固体NMRを用いて解析し、検証した。

【実験】 Wt-hCT・hCT変異体（F19L-hCTとF16L-hCT）は、Fmoc基を導入した ^{13}C 標識したアミノ酸を用いて、固相法により化学合成を行い、脱保護、逆相HPLCにより精製し、目的の試料を得た。次に、hCT変異体（F19L-hCTとF16L-hCT）は、20mM リン酸緩衝液（pH7.4）に、15mM 酢酸水溶液（pH3.3）に溶かし、Wt-hCTとF19L-hCTは、20mM HEPES水溶液（pH5.3）に溶かすことで線維形成を開始し、その経時変化を固体NMR及びTEMにより測定した。固体NMR測定では、モノマー成分の観測に90度励起パルスに引き続いて高出力デカップリングパルス下で信号検出するDD-MAS法を用い、線維成分の観測に交差分離とデカップリングを組み合わせたCP-MAS法を用いて、同じ試料に対し、交互に線維形成過程を測定した。

【結果と考察】

1. 電子顕微鏡による線維形成の観察

hCT の線維形成は①核形成（モノマーがミセルを形成し、そのミセルが構造転移を起こし、 β -sheet からなる核を形成する過程）と②線維成長（線維の核にモノマーが会合し、線維が伸長していく過程）の律速段階をもつ 2 段階自己触媒反応機構（Fig.1）で起こることを我々の研究では提唱している。

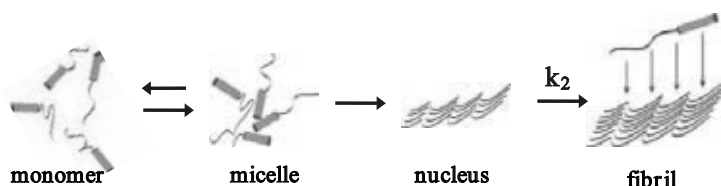


Fig.1 The mechanism of fibrillation

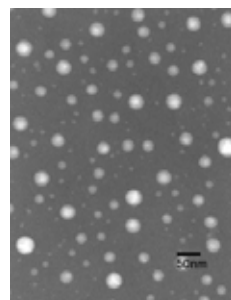


Fig.2 Wt-hCT image
in the initial step of fibrillation
in HEPES aqueous solution

この線維形成機構において、hCT のそれぞれの状態を明確に確認できるような溶媒を確定するため、様々な溶媒で線維化を試した。この結果、線維化が中性の場合に比べて遅い酢酸水溶液（pH3.3）よりも、さらに線維化が遅い HEPES 水溶液（pH5.3）を溶媒に決定した。この HEPES 水溶液での線維化において、透過型電子顕微鏡（TEM）を使用することで、Wt-hCT の中間体（核）および中間体（核）から線維が伸びて成長する様子が観測された。Fig.2 では、一面に様々な大きさの球状の中間体（核）、（直径 10.8[nm]~40.3[nm]）が多数存在していた。これにより、様々な大きさのミセルが中間体（核）に構造転移を起こしたと考えられる。

2. 線維の構造解析

それぞれの溶媒下で Wt-hCT の線維化と hCT 変異体の線維化を行い、DD-MAS 法及びCP-MAS 法により観察したモノマーおよび線維の二次構造情報を Table 1 に示す。

Table 1. ^{13}C chemical shifts of hCT and its mutants (ppm from TMS) and their assignments

Sample		Gly10 C=O	Ala26 CH_3
Condition: pH3.3 (酢酸)			
hCT	Monomer(a)	171.8 (α -helix)	16.9 (random coil)
	Fibril(b)	169.9 (β -sheet)	19.3 (β -sheet), 21.3 (β -sheet)
F19L-hCT	Monomer(a)	171.9 (α -helix)	16.9 (random coil)
	Fibril(b)	170.0 (β -sheet)	19.1 (β -sheet), 17.0 (random coil)
F16L-hCT	Monomer(a)	171.9 (α -helix)	16.9 (random coil)
	Fibril(b)	169.6 (β -sheet), 170.6 (random coil)	19.3 (β -sheet), 18.0 (random coil)
Condition: pH5.3 (HEPES)			
F19L-hCT	Monomer(a)	171.8 (α -helix)	16.9 (random coil)
	Fibril(b)	169.6 (β -sheet)	19.1 (β -sheet), 17.0 (random coil)
Condition: pH7.4 (リン酸)			
hCT	Monomer(a)	171.8 (α -helix)	16.9 (random coil)
F19L-hCT	Monomer(a)	171.8 (α -helix)	16.9 (random coil)
F16L-hCT	Monomer(a)	171.8 (α -helix)	16.9 (random coil)

(a) DD-MAS, (b) CP-MAS

モノマー成分では、溶媒や変異体に関係なくペプチドの分子中央部では α -helix 構造、C 末端では random coil 構造を示していた。これは、線維形成前のペプチドの状態は溶媒や芳香族の数に影響を受けず、同一の構造を取っていることが分かる。次に、pH3.3 下で hCT 変異体 (F19L-hCT, F16L-hCT) の C 末端は random coil 構造から線維化後に β -sheet 構造と random coil 構造の混在状態へと構造変化が起こった。Wt-hCT と比較すると、芳香環を一つ失うことで構造上、比較的柔らかい線維が形成したと考えられる。

また、F19L-hCT において、pH3.3 下と pH5.3 下を比較すると、構造上の変化は見られなかったので、溶媒によって構造が変化するのではないことが明らかになった。

3. 線維形成機構における反応速度解析

hCT の線維形成は二段階自己触媒反応機構 (Fig.1) を基にして解析した。核形成反応と線維成長反応からなる反応機構において、核形成反応の速度定数 k_1 、と線維成長反応の速度定数 k_2 を決定した。

hCT 変異体 (F19L-hCT) においては、線維成長の経時変化に着目した。まず、CP-MAS の NMR スペクトル信号 (Fig.3) は線維が β -sheet であることを示した。この線維成長の強度変化をプロットする (Fig.4) と、一定時間後、線維成分が成長し始めたことから、二段階自己触媒反応機構で線維化が起こることが分かった。この機構で反応速度解

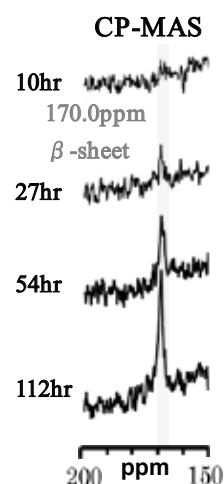


Fig.3 ^{13}C NMR spectra of $[1-^{13}\text{C}]\text{Gly}^{10}$, F19L-hCT at CP-MAS in the time course of fibril formation

析を行い、速度定数を導き出した。各条件下における速度定数を Table 2 に示す。

Table 2 Kinetics parameters for fibril formation of Wt-hCT, F19L-hCT and F16L-hCT

	pH 7.4		pH3.3	
	$k_1[s^{-1}]$	$k_2[s^{-1}M^{-1}]$	$k_1[s^{-1}]$	$k_2[s^{-1}M^{-1}]$
Wt-hCT	2.79×10^{-6}	2.29	3.28×10^{-6}	2.04×10^{-3}
F19L-hCT	7.41×10^{-9}	2.90×10^{-2}	1.27×10^{-6}	1.58×10^{-3}
F16L-hCT	1.52×10^{-6}	1.03×10^{-2}	1.85×10^{-6}	6.14×10^{-4}

Table 2 より Wt-hCT と比較して、hCT 変異体の k_1 では、ほぼ一定値であるのに対し、 k_2 は中性水溶液中で 100 倍、酸性水溶液中で約 4 倍、値が小さくなり、線維成長反応が遅くなった。これにより、線維成長段階に芳香族アミノ酸が阻害効果を及ぼすことが示唆された。その理由として、F19L、F16L-hCT では、ベンゼン環同士の π - π stacking (疎水性相互作用) が 1 つなくなり、 β -sheet 構造を形成する安定化エネルギーが減少するため、大きな線維阻害の効果が現われたと考えられる。

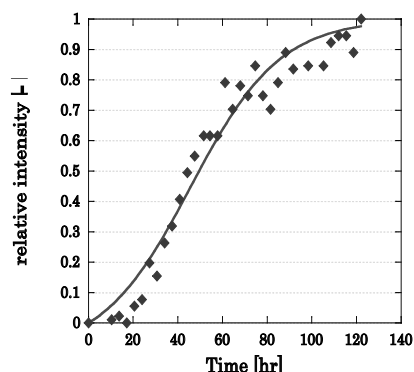


Fig.4 Time course of ^{13}C NMR signal intensity at CP-MAS $[1-^{13}\text{C}]\text{Gly}^{10}$

4. 溶媒による線維形成阻害

Wt-hCT の線維化において、溶媒による阻害効果を検討した。最初に、電子顕微鏡にて同じ濃度の下で、酢酸水溶液下での線維化と HEPES 水溶液下での線維化を観察した。細い線維が確認され始めた時間を比較すると、酢酸水溶液では 2 日目で確認されたことに対し、HEPES 水溶液では 7 週間で確認した。このことから、HEPES 水溶液は線形成を阻害して、反応速度が格段に遅くなったと考えられる。

次に、hCT 変異体 (F19L-hCT) の線維化においても溶媒による阻害効果を検討するため、同様な実験を試みた。固体 NMR を用いて、線維形成過程を定量的に解析した。線維成分を測定する CP-MAS 法の NMR スペクトル信号が伸長し始めた時間を比較すると、酢酸水溶液では Fig.3 で示すように線維形成が線維化開始 27 時間後で確認された。これに対し、HEPES 水溶液では、11 日後に CP-MAS の NMR スペクトル信号を確認することができた。以上から、Wt-hCT だけではなく、hCT 変異体でも HEPES 水溶液は線維形成阻害効果があることが判明した。

【結論】ヒトカルシトニンにおいて F19 および F16 は線維を安定化するため、線維成長速度を促進することが分かった。線維形成を阻害する溶媒を検討した結果、HEPES は強い線維形成阻害効果を示すことが分かった。この HEPES 溶媒を用いて、線維形成過程を観測したところ球状の中間体の存在が明らかになった。

NMR を用いたリン脂質膜中における緑茶カテキン類の

相互作用部位の解析

○植草 義徳¹, 上平 美弥¹, 杉本 収¹, 丹治 健一¹,
中村 浩蔵², 石井 剛志¹, 熊澤 茂則¹, 内藤 晶³, 中山 勉¹
¹静岡県大院・生活健, ²信州大・農, ³横浜国大院・工

Analysis of the interaction between tea catechins and phospholipid membranes as determined by NMR spectroscopy

○Yoshinori Uekusa¹, Miya Kamihira¹, Osamu Sugimoto¹, Ken-ichi Tanji¹, Kozo Nakamura², Takeshi Ishii¹, Shigenori Kumazawa¹, Akira Naito³, and Tsutomu Nakayama¹

¹Department of Food and Nutritional Sciences, University of Shizuoka

²Department of Bioscience and Biotechnology, Shinshu University

³Graduate School of Engineering, Yokohama National University

We have clarified that a beneficial green tea component, epicatechin gallate (ECg), strongly interacts with the surface of phospholipid bilayers by solution and solid-state NMR measurements. In this study, we examined the location of ECg in phospholipid membranes using ¹³C labeled ECg ([¹³C]-ECg) and various NMR techniques. The results of ¹H-¹³C heteronuclear NOE experiments demonstrated that the carbonyl carbon of [¹³C]-ECg locates near the phospholipid's γ protons. Using the ¹³C-³¹P REDOR measurements, we determined the accurate interatomic distance between the carbonyl carbon of [¹³C]-ECg and the phosphorus of phospholipids to be 5.3 ± 0.1 Å. Furthermore, we also measured the distance between the carbonyl carbon and the γ carbons of phospholipids with/without ECg. These results provide insights into the interaction mechanism of tea catechins with lipid membranes.

【序論】 茶カテキン類はポリフェノール類の一種であり、抗酸化作用や抗菌作用等の生理機能を有することが報告されているが、機能発現メカニズムの詳細については解明されていない。我々はこれらの生理機能を発揮するためには、第一段階として生体膜である脂質二重層への相互作用が重要であると考えており、溶液及び固体 NMR を用いてカテキン類とリン脂質膜との相互作用解析を進めてきた。その結果、この相互作用に関与する部位の特定（カテキン類：B 環，galloyl 基，リン脂質分子： γ 位）に成功し、さらにカテキン類の一種である epicatechin gallate (ECg) はリン脂質膜中で膜法線まわりの回転運動を行っていることを明らかにした。本研究では、溶液 NMR による ¹H-¹³C 異種核 NOE 相関測定と固体 NMR の ¹³C-³¹P REDOR 法を用いて、モデルリン脂質膜（バイセル，多重膜リポソーム（MLV））中における ECg の相互作用に

キーワード：カテキン，異種核 NOE，REDOR

○うえくさ よしのり、かみひら みや、すぎもと おさむ、たんじ けんいち、
なかむら こうぞう、いしい たけし、くまざわ しげのり、ないとう あきら、なかやま つとむ

重要な galloyl 基の存在位置をより明確に決定することを目的とした。

【実験方法】 ECg のカルボニル炭素を安定同位体ラベルした $[^{13}\text{C}]$ -ECg を化学合成によって得た。これを DMPC と DHPC で構成されるバイセルに再構成させて、溶液 NMR (JEOL JNM- α 400) にて ^1H - ^{13}C 異種核 NOE 相関測定を行った。また、 $[^{13}\text{C}]$ -ECg を DMPC から成る MLV に再構成させて水和試料を作製し、急速凍結・凍結乾燥により粉末にした後、 ^{13}C - ^{31}P REDOR 測定を行った。REDOR 測定は Chemagnetics CMX infinity-400 NMR 分光器を用いて、xy-4 compensation pulse 法によって測定した。

【結果と考察】 溶液 NMR 測定の結果、リン脂質分子 γ 位の水素からラベル部位である $[^{13}\text{C}]$ -ECg の galloyl 基のカルボニル炭素に対して異種核 NOE が観測された (Fig. 1)。一方、リン脂質分子の α 及び β 位水素と $[^{13}\text{C}]$ -ECg との相関は観測されなかった。この結果は、先行研究の NOESY 測定により得られた相互作用部位の知見を強く支持しており、カテキン類はリン脂質膜表面付近と相互作用することを確認した。固体 NMR の ^{13}C - ^{31}P REDOR 測定においては、 $[^{13}\text{C}]$ -ECg のカルボニル炭素の信号強度が顕著に減衰し、この減衰比を理論曲線にフィッティングさせて $[^{13}\text{C}]$ -ECg のラベル ^{13}C 原子とリン脂質分子のリン原子との分子間 ^{13}C - ^{31}P 原子間距離を算出した (Fig. 2)。その結果、原子間距離は $5.3 \pm 0.1 \text{ \AA}$ であった。第 47 回 NMR 討論会においても REDOR 法による原子間距離の測定結果を報告したが、今回は REDOR パルス系列の π (^{31}P) パルス幅を注意深く検討したことで、より精密な原子間距離の測定に成功した。さらに、リン脂質分子の γ 位とリン原子との分子内原子間距離を ECg 存在下／非存在下で比較したが、相互作用の有無による違いは確認できなかった。この結果から、カテキン類は生体膜表面付近と相互作用するが、膜構造は大きく変化しないことが明らかになった。

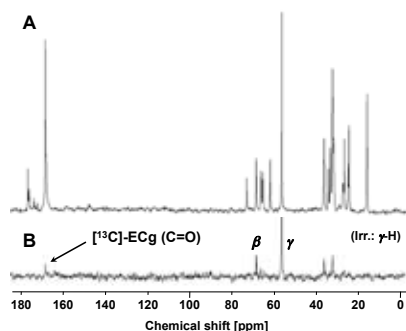


Fig. 1. ^{13}C NMR (A) and ^1H - ^{13}C heteronuclear NOE (B) spectra of $[^{13}\text{C}]$ -ECg interacting with bicelles.

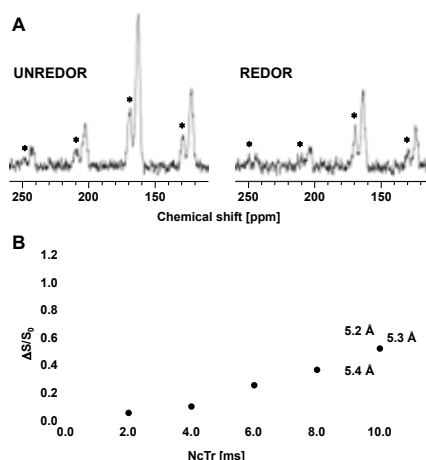


Fig. 2. ^{13}C - ^{31}P REDOR spectra of $[^{13}\text{C}]$ -ECg (C=O) in MLV (MAS: 4000 Hz, NcTr: 10 ms) (A) and theoretical curve fitting to the REDOR data (B). The asterisk mark is the signal from phospholipids.

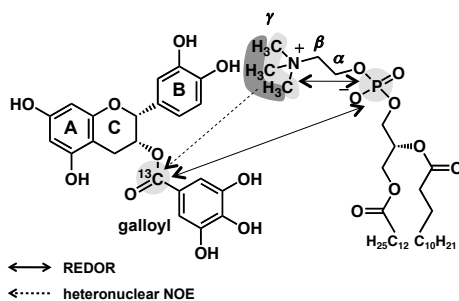


Fig. 3. The schematic representation of correlations between $[^{13}\text{C}]$ -ECg and phospholipid obtained by ^1H - ^{13}C heteronuclear NOE and ^{13}C - ^{31}P REDOR experiments.

固体NMRとCOMPASS法を用いたH⁺-ATP合成酵素 subunit c-ringの構造解析

○戸所泰人¹, 田中健太郎¹, 湯面郁子¹, 岩崎郁¹, 小林将俊¹,
鈴木俊治^{2,3}, 吉田賢右^{2,3}, 藤原敏道¹, 阿久津秀雄¹

¹阪大・蛋白研, ²東工大・資源研, ³JST・ICORP・ATP合成制御

Structural analysis of H⁺-ATP synthase subunit c-ring by Solid-state NMR and COMPASS method

○Yasuto Todokoro¹, Kentaro Tanaka¹, Ikuko Yumen¹, Iku Iwasaki¹, Masatoshi Kobayashi¹,
Toshiharu Suzuki^{2,3}, Masasuke Yoshida^{2,3}, Toshimichi Fujiwara¹, Hideo Akutsu¹

¹IPR, Osaka Univ., Japan, ²CRL, Tokyo Inst. of Tech., Japan, ³ATP-synthesis regulation project, ICORP, JST, Japan

A rotary motor ATP synthase is located in bacterial plasma membranes, thylakoid membranes of chloroplasts, and mitochondrial inner membranes. F-type ATP synthase from a *thermophilic Bacillus* PS3 (TF₀F₁-ATP synthase) is one of them. TF₀ subunit c (TF₀c) consists of 72 amino acids, and forms an oligomeric ring, which acts as a proton motor. The proton-transfer mechanism has not been resolved, because whole structure of c-ring is not determined. Thus, we are trying to analyze the three dimensional structure of the TF₀c-ring reconstituted into liposomes for clarification of the proton-transfer mechanism. C^α (90%), and CO, NH (80%) signals could be sequentially assigned by COMPASS method using a series of selectively labeled amino acids. The chemical shifts suggest that major parts of the TF₀c-ring in liposomes take on α-helices, similarly to the monomer structure in organic solution.

生物のエネルギーキャリアーであるATPは、生物のエネルギー代謝の中心的役割を果たしている。このATPを合成しているのがATP合成酵素であり、真核生物ではミトコンドリア内膜に、バクテリアでは細胞膜に存在する。ATP合成酵素は、生体膜を介した水素の電気化学的ポテンシャルを利用して、ADPとリン酸からATPを合成する。バクテリアでは、主にα₃β₃γδεという5種類9個のサブユニットからなる膜表在性のF₁とab₂c₁₀₋₁₄という3種類13個から17個のサブユニットで構成される膜内在性F₀から構成され、サブユニットcは複数集まってring構造を形成している。本研究では、好熱菌PS3由来ATP合成酵素F₀のサブユニット c-ring (以下TF₀c-ring) に注目した。c-ringは、生物種によってring構造を構成するオリゴマーの数が異なるが、プロトン輸送によるringの回転は共通している。近年、溶液NMRにより有機溶媒中でのモノマーの立体構造が決定され、プロトン輸送における構造変化に関して2つのモデルが提案されているが、ring全体の構造がいまだ明らかになっていない。そのため、回転メカニズムはいまだ解明されていない。そこで、回転メカニズム解明に向けて、生体内の環境

Solid-state NMR, membrane protein, sequential assignment

○とどころやすと, たなかけんたろう, ゆめんいくこ, いわさきいく, こばやしまさとし, すずきとしはる, よしだまさすけ, ふじわらとしみち, あくつひでお

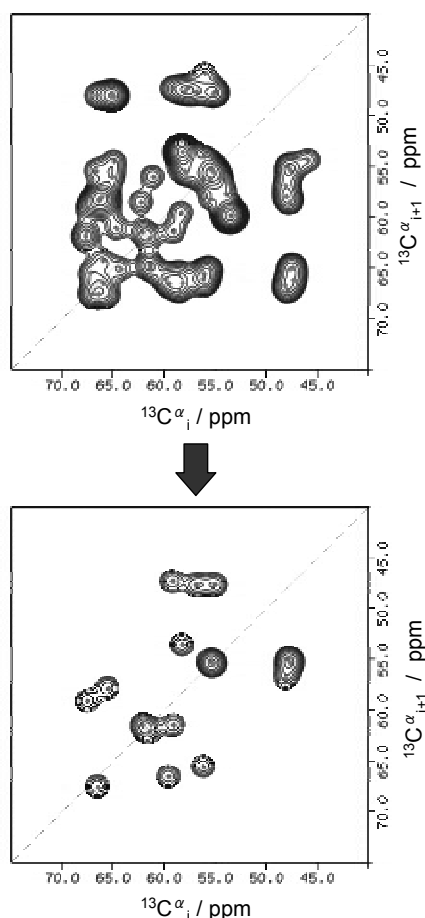


Fig. 1 Model spectra of $^{13}\text{C}^{\alpha_{i+1}}-^{13}\text{C}^{\alpha_i}$ correlation are plotted from chemical shifts of monomer. (a) ^{13}C , ^{15}N uniformly labeled TF_0c and (b) reverse labeled TF_0c (ΔV , L, I, R, H)

成した。

これらの試料について、それぞれ残基内 2D $^{13}\text{C}-^{13}\text{C}$ 、2D $^{15}\text{N}-^{13}\text{C}^{\alpha}$ 、残基間 2D $^{13}\text{C}^{\alpha_{i+1}}-^{13}\text{C}^{\alpha_i}$ 、2D $^{15}\text{N}_{i+1}-^{13}\text{C}^{\alpha_i}$ を測定した。Fig. 1 に溶液 NMR から得られた TF_0c モノマーの化学シフト値を利用して、残基間 2D $^{13}\text{C}^{\alpha_{i+1}}-^{13}\text{C}^{\alpha_i}$ のモデルスペクトルを示した。大幅にシグナルの重なり合いが改善し、解析可能なスペクトルとなっている。COMPASS 法を用いて、その他に 2 種類のサンプルのスペクトルを得ることで、残基配列に沿った帰属をすることができる。今回の場合、 C^{α} は約 90%、 CO 、 NH は約 80% を配列特異的に帰属ができた。これらの化学シフト値とスペクトルを用いた脂質二重膜中での TF_0c -ring の構造解析について報告する。

に近い状態での ring 構造を解析するために、 ^{13}C 、 ^{15}N 安定同位体標識した TF_0c -ring を精製し、人工脂質膜に再構成した活性のある構造を固体 NMR により解析している。

固体 NMR は溶液 NMR に比べ分解能が悪いことが、蛋白質の構造解析に広く使われない要因の一つである。そこで、分解能を向上させるために、COMPASS (COMpensated Patch Assignments by Selevtively labeled Samples) 法を開発し、 TF_0c -ring の主鎖のほとんどを配列特異的に帰属した。COMPASS 法は経験的にシグナルが分散し、アミノ酸配列で帰属がつながるように、数種類の選択ラベルサンプルをデザインし、それらを相補的に用いて、配列特異的に帰属できる方法である。

選択標識したサンプルの作成にはリバースラベル法を用い、 ^{13}C 、 ^{15}N 標識培地に標識していないアミノ酸を多量に加えることで、特定のアミノ酸を標識しないサンプルを作成した。この方法で ^{13}C 、 ^{15}N 安定同位体標識を薄めた試料を 3 種類作成した。リバースラベル法により ^{13}C 、 ^{15}N 標識を行う利点は、培地に標識していないアミノ酸を加えるだけなので、大量発現系に大きな変更がいらず、比較的容易に ^{13}C 、 ^{15}N 選択標識サンプルを作成することができる。界面活性剤を用いてインタクトな TF_0c -ring を精製し、DMPC (dimyristoylphosphatidylcholine) でできた脂質二重膜に再構成する方法はすでに確立されていたので、それを用い ^{13}C 、 ^{15}N 標識アミノ酸の異なる 3 種類のサンプルを作

脂質膜界面における PH ドメインの構造および機能の解析

○徳田尚美¹、八木澤 仁¹、 福井泰久²、 辻 暁¹

(¹兵庫県立大学大学院 生命科学研究科、 ²星薬科大学 創薬研究センター)

A study of structure and function of the PH domain induced at the membrane interface.

○Naomi Tokuda¹, Hitoshi Yagisawa¹, Yasuhisa Fukui², Satoru Tuzi¹

(¹Grad. Schl. Life Sci., Univ. Hyogo, ²Hoshi Univ.)

The PH domain is frequently found in the proteins included in the important cellular functions such as the cellular signal transduction and cytoskeletal organization. One of the well known functions of the PH domain is to regulate membrane localization of the protein with stereospecific recognition of the phosphoinositide headgroups. In this study, we investigated structural alterations of the switch associated protein-70 (SWAP-70) PH domain induced at the membrane surface by using the solid-state NMR spectroscopy. The solid-state ¹³C NMR spectra of the membrane associated SWAP-70 PH domain revealed that a conformational transition of the C-terminal α -helix to a random coil is induced at the membrane surface. Since C-terminal α -helix involves nuclear localization signal (NLS), the conformational transition would expose NLS and subsequently facilitate translocation of the SWAP-70 to the nucleus.

【序論】PH ドメインは細胞内情報伝達に関与する蛋白質中に数多く見出されており、7本の β ストランドからなる β サンドイッチ構造、およびC末端の α ヘリックスを構造モチーフとするドメインである。主要な機能として、イノシトールリン脂質頭部への結合を介する、膜表在性蛋白質の膜への局在の制御が知られている。本研究では、固体 NMR 分光法を用いて脂質膜上に結合した際の PH ドメインの立体構造を直接観測し、その脂質膜結合機能を詳細に解析することを目的としている。ここでは、PIP₃ 頭部を認識し、選択的に結合する SWAP-70 PH ドメインについて、固体 ¹³C NMR による解析を行った。脂質膜上における SWAP-70 PH ドメインの構造変化と蛋白質機能への関与について報告する。

【実験】大腸菌発現系を用い、[3-¹³C]Ala および[1-¹³C]Val 安定同位体標識を導入した GST 融合ヒト由来 SWAP-70 PH ドメインの発現を行った。

キーワード：固体 NMR、PH ドメイン、脂質二重膜

著者：○とくだ なおみ、やぎさわ ひとし、ふくい やすひさ、つじ さとる

GST 融合蛋白質は、アフィニティーレジンをを用いて単離した後、thrombin 切断により GST を除去し、イオン交換カラムを用いて精製した。得られた PH ドメインは、D-*myo*-phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate (PIP₃) を含む脂質二重膜懸濁液、又は PIP₃ の頭部にあたる水溶性の低分子 D-*myo*-inositol 1,3,4,5-tetraphosphate (IP₄) にそれぞれ結合させた後、濃縮し、測定試料とした。得られた水和状態のサンプルは、固体 NMR 測定用試料管に密封し、測定に用いた。固体 ¹³C NMR 測定は DD-MAS 法および CP-MAS 法を用いて Chemagnetics CMX Infinity-400 (¹³C: 100.6 MHz) により 25 °C で行った。

【結果と考察】SWAP-70 PH ドメインの立体構造モデル中に、¹³C 標識部位を示した (Fig. 1)。Fig. 2 A, B に DD-MAS 法により測定された、IP₄ および POPC/PIP₃ ベシクル共存下における[3-¹³C]Ala 標識 SWAP-70 PH ドメインの固体 ¹³C NMR スペクトルを示す。Fig. 1 に示すように、Ala300 は C 末端のαヘリックス中に、Ala288 はαヘリックスの N 末端に隣接するβ7ストランドの C 末端に存在する。Fig. 2A の 18.5 ppm および 15.9 ppm の信号は、二次構造と化学シフトの対応により、それぞれ Ala288 および Ala300 に帰属できる。POPC/PIP₃ ベシクル中の PIP₃ に結合した状態 (Fig. 2B) では、ランダムコイルの化学シフト値

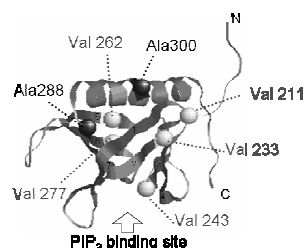


Fig. 1 Three-dimensional model structure of SWAP-70 PH domain in solution. The positions of alanine and valine residues are indicated. (Li, H et al. PDB ID: 2DN6)

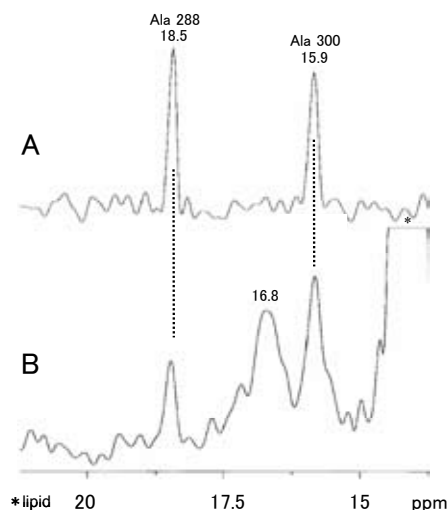


Fig. 2 DD-MAS NMR spectra of the [3-¹³C]Ala labeled SWAP-70 PH domain forming complex with IP₄ in solution (A), and with PIP₃ embedded in the vesicle (POPC : PIP₃ = 95:5) (B).

に近い 16.8 ppm に新たな信号が観測された。この信号は、αヘリックス構造と比べて CP 効率が低いことから、運動性が高く、二次構造を持たないランダムコイル状構造に由来すると考えられる。これらの点から、SWAP-70 PH ドメイン C 末端のαヘリックス構造は、脂質膜結合によりランダムコイルへと転移すると考えられる。一方、βストランドおよびループ中に含まれる Val 残基のカルボニル炭素の信号は SWAP-70 PH ドメインのβサンドイッチ骨格が、脂質膜界面においても保たれていることを示した。脂質膜との相互作用による、C 末端のαヘリックス構造からランダムコイルへの転移は、αヘリックス中に含まれる核移行シグナル (NLS) を溶液中へと露出させ、SWAP-70 の細胞膜から核への移行を促進すると考えられる。

1mmφ高速 MAS プローブによる新たな固体 NMR 法の可能性

○ 山内一夫¹, 西山裕介², 石井佳誉³, 朝倉哲郎¹, 樋岡克哉²

¹東京農工大学, ²日本電子, ³イリノイ大学

Solid State NMR of High Speed 1mm Probehead and Its Application

Kazuo Yamauchi¹, Yusuke Nishiyama², Yoshitaka Ishii³, Tetsuo Asakura¹, Katsuya Hioka²

¹Department of Biotechnology, Tokyo University of Agriculture and Technology, Tokyo, Japan.

²JEOL Ltd., Tokyo, Japan.

³Department of Chemistry, University of Illinois, IL, U.S.A.

The probehead is developed for high-resolution solid state NMR observation with high speed spinning of the samples. The probehead is composed with stator for 1mmΦ. rotor and it span over 70kHz and it has the capability of observation with sub-micro gram sample. As the result, spectra obtained by this probehead are high resolution and high sensitivity. Here, we introduce some applications using this probehead with 800MHz instrument including basic specification of it and also the potentiality for new applications specially using high speed spinning and high field NMR for solid state NMR.

緒言

近年の固体 NMR 測定において、高感度化と高分解能化は非常に重要な課題である。NMR の高感度化は外部磁場の高磁場化を始めさまざまな方法が行われているが、装置やサンプルの観点から汎用的に微量物質を感度よく測定する方法として我々はマイクロコイル NMR プローブを用いてきた。特に微量でも高感度・高分解能で観測可能な固体 NMR 用の microMAS プローブは検出限界の飛躍的な向上を実現してきている¹⁾⁻²⁾。これにより今まで観測が事実上不可能であったミリグラム以下の試料であっても観測が可能となった。

一方、マイクロコイルを用いる方法は高感度化のみならずサンプルチューブの小型化が実現でき、これはサンプルチューブを高速回転すること可能となる。これにより固体 NMR に障害になるプロトン-プロトンの双極子相互作用の除去、常磁性物質による広幅化の軽減など直接的な高分解能化が期待できる。また、マイクロコイルを用いているために回路の効率化ができています。そのためにプロトン照射(デカップル)をする際に従来よりも弱いパワーで十分なデカップリングが可能となり高分解能化が実現できる。



Fig.1 1mmΦ rotor for high speed MAS and rice grain.



Fig.2 1mm MAS probehead for 800 MHz instrument

solids state NMR, MAS, high speed spinning

やまうちかずお、にしやまゆうすけ、いしいよしたか、あさくらてつお、ひおかかつや

Fig.1 に 1mm ローターを示す。サンプルチューブの材質は以前製作しているものと同じくジルコニアの本体及び vespel のキャップで製作した。サンプルチューブの長さを 9.5mm から 7.4mm と短くしたことにより高速回転を目指し、さらに高速回転に対応できるスピナーモジュールを製作した。

測定・プローブ評価

今回、プローブは Fig.2 に示す ^1H 周波数 800MHz、 ^{13}C 周波数 201MHz のナローボアデュアルチューンのプローブを製作し用いた。測定は市販 800MHz 溶液 NMR 装置のマグネットと分光器を用いた。回転制御は分光器と別に本グループで開発したコントローラおよびプログラムを用いて測定を行った。

・高速回転

回転は従来の MAS 操作と同様にプログラムにより bearing と driving の空気を制御することにより、70kHz 以上の安定した回転が実現できた。Fig.3 に 10～70kHz で回転させた L-alanine の ^1H -MAS スペクトルを示す。 ^1H - ^1H の非常に強い双極子相互作用により線形が広幅化していたものが高速回転することにより先鋭化し、スペクトルピークの感度上昇が実現できることがわかった。

・デカップルと CP 法

4mm ϕ の従来のサンプルチューブを用い 20kHz 程度の MAS 回転下で測定を行う場合、溶液の NMR 用のアンプを用いたデカップルでは帯域が不十分であり固体スペクトルは十分に高分解能化できなかった。しかしながら、今回開発したプローブを用いることにより高速回転下ラジオ波照射デカップリングは非常に弱いもので十分である。Fig.4 に実際の ^{13}C CP/MAS スペクトルを示す。50kHz で MAS 回転を行っているために、双極子相互作用は弱くなり、そのためにデカップルは 10kHz でも十分高分解能スペクトルが得られていることがわかる。

発表においては、高速回転下におけるハートマン・ハーン条件など、応用測定を視野に入れた解決しなければならない問題点の提起、さらに高速回転の NMR により得られる新たな情報の可能性について議論する予定である。

謝辞

この開発は独立行政法人科学技術振興機構の先端計測分析技術・機器開発事業による成果である。

参考文献

- 1) K. Yamauchi, J.W.G. Janssen A.P.M. Kentgens, *J. Magn. Reson.* **167**, 87. (2004).
- 2) K. Yamauchi, T. Asakura, *Chem. Lett.* **35**, 426. (2006).

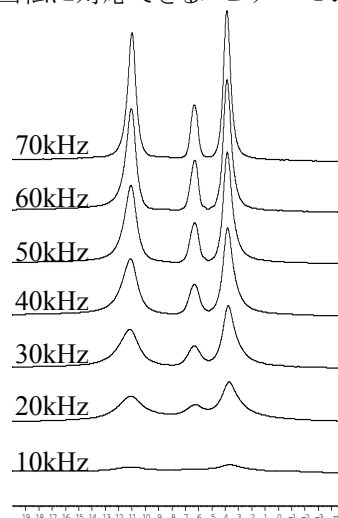


Fig.3 ^1H MAS spectra of L-alanine by changing spinning speed

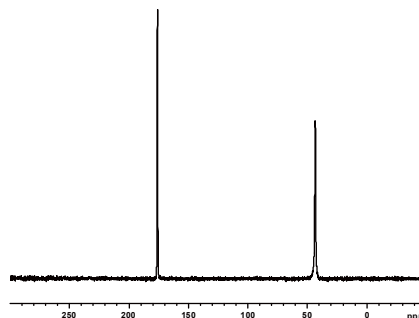


Fig.4 ^{13}C CP/MAS spectrum of glycine by 50kHz MAS spinning speed with 10kHz decoupling field

1 mm超高速MASプローブの開発

○遠藤由宇生¹, 根本貴宏¹, 蜂谷健一¹, 西山裕介¹, 下池田勇一¹,
山内一夫², 樋岡克哉¹

¹日本電子

²東京農工大学

Development of 1 mm Ultra High Speed MAS Probe

○Yuki Endo¹, Takahiro Nemoto¹, Kenichi Hachitani¹, Yusuke Nishiyama¹,
Yuichi Shimoikeda¹, Kazuo Yamauchi², and Katsuya Hioka¹

¹JEOL Ltd., Tokyo, Japan.

²Department of Biotechnology, Tokyo University of Agriculture and Technology, Tokyo, Japan.

In solid state NMR, it is strongly required to develop high speed MAS probes in order to improve the resolution and the sensitivity with mass-limited samples. However, the development has not been advanced so well due to various mechanical problems.

Therefore, the authors have established a high speed spinning system enough to solve them. Then, we have developed a 1 mm ultra high speed MAS probe. As a result, the MAS speed over 70,000 Hz has been achieved in practical NMR measurements.

In this presentation, we mainly discuss the precise mechanical processing of the sample tube and the gas bearing in the spinner module.

固体NMR測定の高分解能高感度化において、サンプルチューブの小型化、MASの高速化は、重要な課題である。一般に、固体NMR測定には数十～数百 μL (mg)のサンプル量が要求される。そのため、サンプルチューブの小型化による量感度の向上が、強く望まれている[1]。同時に、サンプルチューブの小型化に伴うMASの高速化は、固体NMR測定の更なる進展に不可欠である。例えば、常磁性物質の線幅はMAS速度に敏感であり、MASの高速化が高分解能化に威力を発揮する。また、一般的な¹Hデカップリングの¹³C測定では、MASの高速化により、ローパワーデカップリングが有効になる[1]。それにより、いままで測定困難であった、温度に敏感な生態系試料などの測定に対して、新たな展望が期待される。

現在のところ、外径1 mm程度のサンプルチューブを用いた超高速MASに関して、いくつか報告されているが[2]、まだ実用には困難が多い。特に、キャップのタービン部には μm オーダーの超精密加工が要求され、これは一般的な機械加工の範疇を大きく超えている。我々は、超高速MASプローブの実用化を目的とし、これらの問題に対して機械工学的観点からのアプローチを行っている。そこで今回、70,000 Hzを超える1 mm超高速MASプローブの開発を行った。

(キーワード3つ) MASローター, 高速MAS, MASプローブ

○えんどうゆうき, ねもとたかひろ, はちたにけんいち, にしやまゆうすけ, しもいけだゆういち, やまうちかずお, ひおかかつや

Fig. 1に、開発したサンプルチューブと比較のための1円玉を示す。寸法は、外径1 mm、キャップを含めた全長7.4 mm、サンプルボリューム0.8 μL である。キャップの材質はVespel、スリーブの材質はジルコニアである。特にキャップの材質は、強度と軽量化を考慮しての選択である。安定した超高速回転を実現する上で、他の樹脂を使用することは難しい。また、キャップのタービン部に関しては、超精密加工技術により、直径1 mmの円柱に5枚の羽根を作成した。

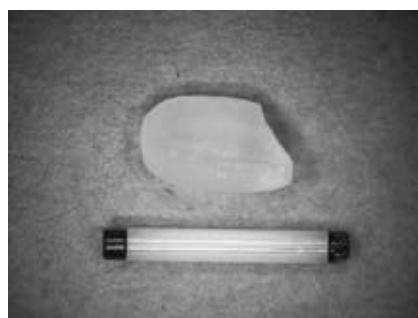


Fig. 1 Sample tube compared with a rice

Fig. 2に、開発したプローブに搭載されたスピナーモジュールを示す。 ^1H 観測時のバックグラウンドを考慮し、スピナーモジュールの材質には、PCTFEを採用した。Fig. 3は軸受とタービンノズルの配置を模式的に示したものであり、気体軸受は静圧型である。ラジアル方向に2カ所、スラスト方向に1カ所の軸受を配置し、サンプルチューブを支持している。気体の経路は、一般的に見られるBearingとDriveがそれぞれ独立している形式を採用した。また、駆動するにあたって複雑な操作が発生しないよう、設計に留意した。駆動方式は、円周方向からエアジェットを当てる衝動型を採用している。



Fig. 2 Spinner module

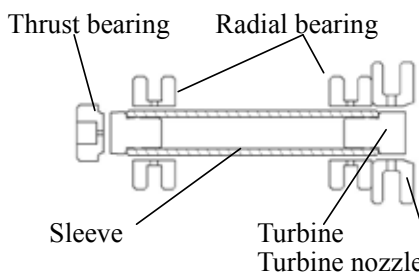


Fig. 3 Arrangement of the bearing and the turbine nozzle

Fig. 4に、実際の駆動から得られた回転速度とDrive圧力の関係を示す。70,000 Hzを超える回転速度を確認した。開発したプローブは、NMR評価を実施中である。

謝辞

この開発は、独立行政法人 科学技術振興機構の先端計測分析技術・機器開発事業による成果である。

参考文献

- [1] K. Yamauchi and T. Asakura, Chem. Lett. **35**, 426 (2006).
- [2] A. Samoson, T. Tuherm and Z. Gan, Solid State Nucl. Magn. Reson. **20**, 130 (2001).

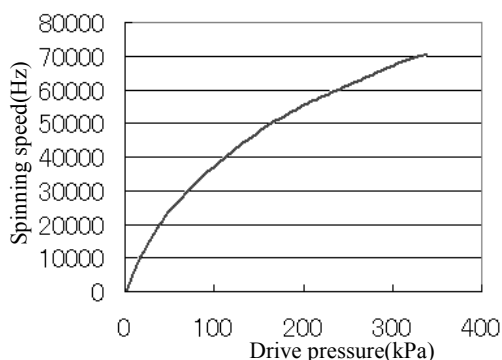


Fig. 4 Relation of the spinning speed and the drive pressure

高速 MAS 下における試料管内部の温度分布についての考察

浅野敦志、○北村成史、田中千香子、黒津卓三
防衛大学校 応用科学群 応用化学科

Temperature distribution map of inside of rotor under fast MAS using ^{207}Pb signal

Atsushi Asano, Masashi Kitamura, Chikako Tanaka, Takuzo Kurotsu
Department of Applied Chemistry, National Defense Academy, Japan

It is important to calibrate the regulated temperature for the solid state NMR experiment under fast magic-angle spinning (MAS). Previously, we calibrate the regulated temperature under MAS by methanol method¹ to elucidate the molecular motion of rubbers,² because the temperature can be directly known from the chemical shift difference between ^1H signals of CH_3 and OH . However, methanol is liquid so that the temperature distribution in a rotor is averaged by its very fast molecular motion and migration. For investigation of molecular motion of solid polymers, it is necessary to know the correct temperature distribution inside of rotor utilized. ^{207}Pb signal of lead nitrate ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$) has widely used to calibrate the temperature for variable-temperature (VT) MAS experiments.^{3,4} On the other hand, there is some ambiguity to calibrate temperature directly even though temperature dependence of chemical shift change is very large. In this study, we investigate the temperature distribution using both $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ and methanol methods at both various temperatures and MAS rates.

温度可変実験は分子運動の解析など重要な知見を得るためには必要不可欠であるが、MAS 中の試料が感じる温度は、VT ガス（または Bearing ガス）とローター外壁との摩擦熱により上昇するため、制御しているガス温度とは異なる。したがって MAS 法を併用する固体 NMR 測定において、温度校正は重要である。また試料が感じている温度は場所により一様ではないことも知られている³。本研究では、実際にどの程度の温度差が生じているかを検討し、ローター内部と温度分布を視覚化することを目指した。また、実際に市販の温度制御装置の応答性についても考察した。

温度校正ならびにローター内部の位置による温度分布を検討するため、硝酸鉛 ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 、和光純薬、特級) の ^{207}Pb の信号を観測した。 ^{207}Pb 信号は温度に鋭敏であり、化学シフト値が温度に依存して幅広く変化することが知られている^{3,4}。しかし、化学シフト値から直接温度を計算するためには、0 ppm 基準が何℃なのか知る必要がある。我々は Takahasi ら⁴の研究を参考に 29℃の信号を 0 ppm 基準とすることとした。

Keywords : 高速 MAS, 温度分布, ^{207}Pb スペクトル

著者ふりがな : あさのあつし、きたむらまさし、たなかちかこ、くろつたくぞう

3.2mm ϕ ローターの場合では、MAS 速度が 6 kHz で 30 $^{\circ}$ C に温度を制御した場合にメタノール信号から計算される温度が 29 $^{\circ}$ C であったので、この条件下の ^{207}Pb 信号の位置を 0 ppm とした。ローター内部の試料位置でどのように温度が異なるか $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ を約 2mm 厚で中央 (center)、Drive チップ側 (bottom)、ローター上部側 (top) にそれぞれ封入し、MAS 速度を変化させて 5 $^{\circ}$ C 刻みで温度を制御して ^{207}Pb の信号を観測した。図 1 にはローター内部全体に $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ を封入した場合 (a)、top (b)、center (c)、bottom (d) の ^{207}Pb MAS スペクトルを示した。MAS 速度は 6 kHz、温度は 30 $^{\circ}$ C で制御している。(b) ~ (d) のローター内の空間にはテフロンスペーサーを入れた。図 1 からローター内部の上中下では温度が異なり、化学シフト値ならびに線幅が異なることがわかる。さらに全体の信号は、これら 3 つの信号の足し合わせとして観測されている。線幅が広く観測される top と bottom の場合、シムの影響も考慮する必要があるが、温度分布の影響が大きいと考えられる。温度を上げるか MAS 速度を速くしていくと、全体のスペクトルは、上中下の 3 つの信号との化学シフト値のずれが大きくなり、そのままの合成では再現できなくなる。これはテフロンと試料との熱伝導の違いによるものと考えられた。

図 2 には、横軸にローターの試料封入部の長さを (中央を 0 とした)、縦軸を MAS 速度にとった温度分布図を示した。VT ガス温度は 30 $^{\circ}$ C に制御してある。温度分布は 3ヶ所から得られる信号の化学シフト値と、線幅から求めた。図 2 からわかるように、MAS 速度が速くなると温度が高くなるのは当たり前であるが、さらにローター内の温度分布が MAS 速度に依存して大きくなる。MAS 速度が 25 kHz の場合、中央と上下との温度差は最大 6 $^{\circ}$ C であった。

参考文献

- 1: van Geet, A.L., *Anal. Chem.*, **42**, 679-680 (1970).
- 2: A. Asano *et al.*, *IRC'08 proceedings*, 1118-1135 (2008).
- 3: A. Bielecki, D.P. Burum, *J. Magn. Reson. A*, **116**, 215-220 (1995).
- 4: T. Takahashi, *et al.*, *Solid State Nuc. Magn. Reson.*, **15**, 119-123 (1999)

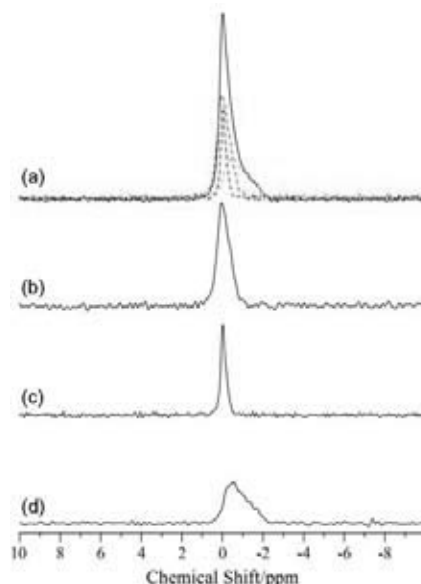


Figure 1. Position dependence of ^{207}Pb MAS NMR spectra of $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ at 30 $^{\circ}$ C and MAS = 6 kHz: (a) whole, (b) top, (c) center, and (d) bottom in 3.2mm ϕ rotor. The sample height of (b) to (d) is ca. 2 mm.

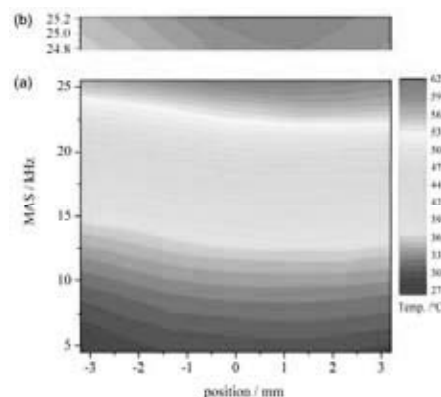


Figure 2. Temperature distribution map for 3.2mm ϕ rotor regulated at 30 $^{\circ}$ C: (a) full and (b) expanded map at MAS = 25 $\pm$ 0.2 kHz.

配向試料のためのオフセット依存性を改善した

固体NMR分極移動法の開発

○ 西村 勝之
分子科学研究所

**“Carrier frequency offset insensitive polarization transfer
for oriented solid.”**

○Katsuyuki Nishimura
Institute for Molecular Science,

An efficient heteronuclear polarization transfer for static oriented sample is presented. The developed technique is based on the dipolar-INEPT like technique of DAPT. However the one refocuses carrier frequency offset for ^1H nuclei sufficiently within windowless refocused multiple-pulses in addition to the refocusing of those for observed nuclei during dipolar polarization transfer. Insensitivity of ^1H carrier frequency offset and improvements of polarization transfer efficiency of developed technique were verified from the comparison to DAPT, practically.

Introduction: Jayanthi et al. proposed dipolar INEPT like technique for heteronuclear polarization transfer DAPT (*dipolar assisted polarization transfer*)¹⁾ for oriented solid. The DAPT used windowless multiple-pulse (MP) only for ^1H nuclei for ^1H homonuclear dipolar decoupling and a few of $\pi/2$ and π pulses are applied to observed nuclei. This approach attenuates sample heating due to RF irradiation effectively compared to the techniques based on double channel RF irradiations such as cross polarization (CP).

However, unfortunately, DAPT shows poor performance practically due to lack of refocusing mechanism of ^1H carrier frequency offset. Thus signal intensities of observed nuclei vary depending on the carrier frequency offset for dipolar coupled ^1H nuclei. In this study, the author implement such mechanism into DAPT based on newly developed refocused windowless multiple-pulse and trim pulse, improvement of polarization transfer efficiency was achieved. We shall refer to developed method to as REDAPT as an acronym of *refocused dipolar assisted polarization transfer*.

固体 NMR、分極移動、開発

○ にしむら かつゆき

Results and Discussion: All experiments were carried out on Varian INOVA 400 spectrometer equipped with JEOL narrow bore 6 mm MAS probe at static mode. 5CB liquid crystalline solvent was used to assess the performances of those techniques. Figure 1 shows the pulse sequences for DAPT and REDAPT. BLEW48– is the newly developed ^1H homonuclear dipolar decoupling sequence which induces same form of average Hamiltonian for chemical shift anisotropy and heteronuclear dipolar interaction with opposite signs respect to those for BLEW48. Combination of BLEW48+/- refocuses ^1H carrier frequency offset. Furthermore, by using BLEW48 instead of BLEW12 for MP, theoretically, 20 % of signal gain can be obtained over DAPT due to the relative orientation of ^1H magnetization respect to the effective field of MP. Figure 2 (a) and (b) show ^{13}C -NMR spectra obtained from DAPT and REDAPT, respectively. Figure 2 (c) and (d) show carrier frequency offset dependence for DAPT and REDAPT, respectively. REDAPT improves ^1H carrier frequency offset dependence sufficiently.

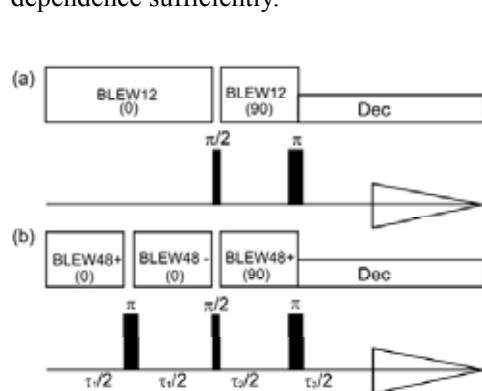


Figure 1 Pulse sequences for ^1H -X heteronuclear polarization transfer techniques of (a) DAPT and (b) newly developed REDAPT, respectively. Brackets under MPs indicate phase of MP. BLEW48+/- indicate MP sequence induce same form of AH for chemical shift anisotropy and heteronuclear dipolar interaction at opposite signs.

<References>

- 1) S. Jayanthi et al. *Chem. Phys. Lett.* 2007, 439,407-411

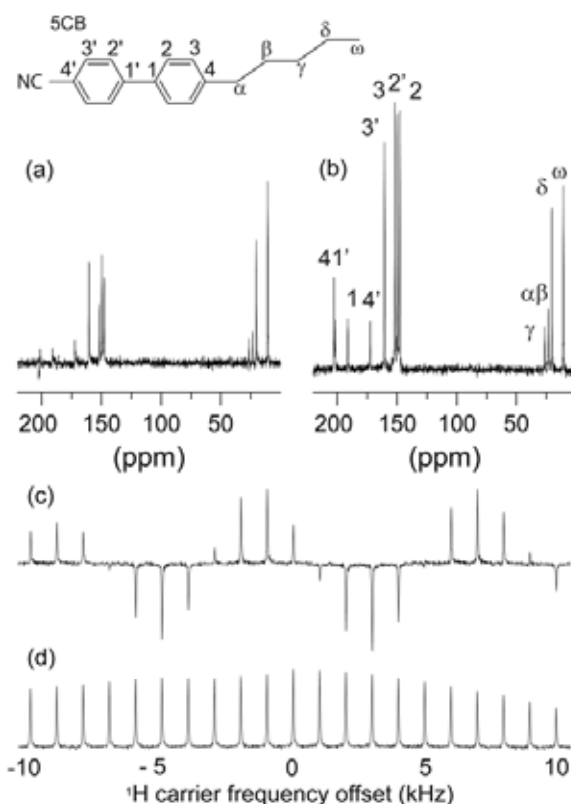


Figure 2 ^{13}C -NMR spectra of 5CB obtained by (a) DAPT and (b) REDAPT, respectively. Plot of site 3 signal of 5CB respect to ^1H carrier frequency offsets at mixing time of 264 μs acquired by (c) DAPT and (d) REDAPT, respectively.

固体 ^{13}C CPMAS NMR 擬似的クロマトグラフ法

○ 西山裕介¹, Michael H. Frey², Sseziwa Mukasa², 内海博明¹

¹ 日本電子株式会社 NM事業ユニット, ² JEOL USA Inc.

^{13}C Solid-State NMR Chromatography by Magic Angle Spinning ^1H T_1 Relaxation Ordered Spectroscopy

○Yusuke Nishiyama¹, Michael H. Frey², Sseziwa Mukasa², Hiroaki Utsumi¹

¹ NM Business Unit, JEOL Ltd., ² JEOL USA Inc.

A practical method to separate ^{13}C NMR spectra of solid mixtures is introduced. The ^1H longitudinal (T_1) relaxation time is used to separate the overlapping ^{13}C spectra of solid mixtures via an inverse Laplace transform of the relaxation dimension. The resulting 2D spectrum contains separate ^{13}C spectra for each component of the mixture that are identical to ^{13}C spectra of the isolated materials. The separation is based on the equalization of ^1H T_1 values in a single domain by rapid ^1H spin diffusion and on the ^1H T_1 value differences between different domains. The method is demonstrated on a commercial drug containing several compounds.

はじめに

ここでは、固体混合物のNMRスペクトルを構成物ごとに分離する手法を提案する。 ^1H の T_1 緩和時間により混合物の ^{13}C スペクトルを分離できることが知られている[1]。この手法は、1) ^1H - ^1H 間のスピン拡散により ^1H の T_1 がドメイン内で均一になること、2)異なるドメイン間では ^1H の T_1 が異なる値になることを利用している。しかしながら、非常に長い測定時間が要求され実用的に使うには問題があった。ここでは、緩和時間解析に逆ラプラス変換(ILT)を利用することにより測定時間を一桁短縮するRelaxation Ordered Spectroscopy (ROSY)法を提案する。

NMR 測定

測定は一般的な ^{13}C 観測の ^1H T_1 時間測定である(図 1)。saturation recovery を用いることにより T_1 の値に関わらず短時間での繰り返し測定が可能となる。また有効に ^1H 拡散を行うために中程度の試料回転(<15kHz)を用い、スピニングサイドバンドはcogwheel phase cycled

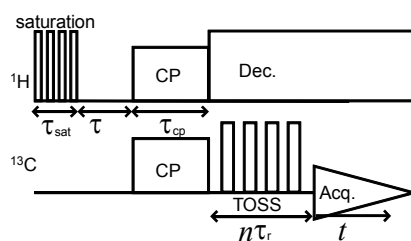


Fig1. Pulse scheme used for the ROSY experiments.

^{13}C CPMAS, 混合物, 固体NMR

○にしやまゆうすけ, Michael H. Frey, Sseziwa Mukasa, うつみひろあき

TOSSにより消去した[2]。NICPにより効率のよい磁化移動を実現した[3]。

解析

従来法では τ の間隔に均等なサンプリング間隔しか許されない DECRA という線形解析を利用していた。緩和時間測定には均等なサンプリング間隔は非効率であり、log スケールのサンプリング間隔が望ましい。解析に ILT を用いることにより任意のサンプリング間隔が利用可能となり、2～4 倍の測定時間の短縮が可能となる。

NMR 信号 $S(t, \tau)$ は以下のように表記できる。

$$S(t, \tau) = \int \int d\nu dT_1 I(\nu, T_1) \exp(i\nu t) [1 - \exp(-\tau/T_1)], \quad (1)$$

ILT は指数関数 $\exp(-\tau/T_1)$ に適用することにより T_1 の位置にピークを与えるので、 $S(t, \infty) - S(t, \tau)$ の t 次元への Fourier 変換に引き続き τ 次元に ILT を行うことで ROSY スペクトル $I(\nu, T_1)$ が得られる。

結果

市販の鎮痛薬の ROSY 測定結果を図 2 に示す。 ^1H の T_1 緩和時間次元に 3 つのピークが現れた。 $T_1 = 94\text{s}$ 付近の信号は acetaminophen、 $T_1 = 7.4\text{s}$ は ethenzamide の信号であり、単離したサンプルの ^{13}C CPMAS スペクトルとよい一致を示した。 $T_1 = 2.2\text{s}$ 付近には、賦形剤のデンプンや糖の信号が現れた。従来法では 570 時間の測定時間が必要であったが、ROSY 法により 50 時間に短縮することができた。本試料は T_1 が長いいため長い測定時間が必要であるが、 $T_1 = 5\text{s}$ 程度の試料では数時間での測定が可能である。当日は試料回転が ^1H の T_1 に与える影響、ドメインサイズについても議論を行う。

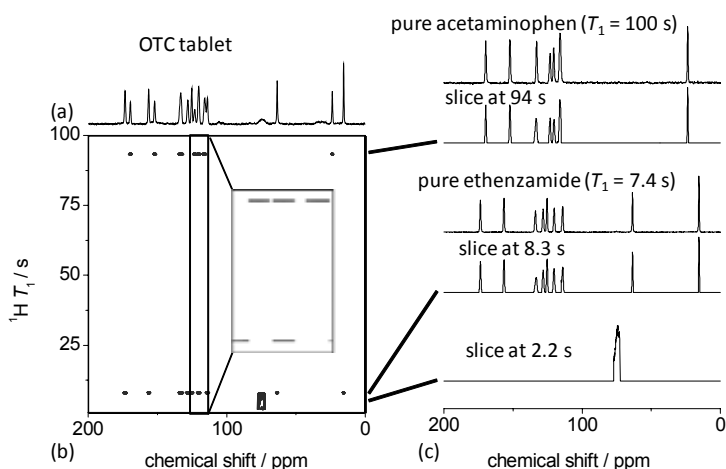


Figure 2. ^{13}C spectra of an OTC drug and two pure materials, ethenzamide and acetaminophen, at 15 kHz MAS. (a) ^{13}C CPMAS and (b) ROSY spectra of the OTC drug. 18 spectra were recorded with $\tau = 0.1$ to 400 s for the ROSY spectrum. An expansion from 115 to 126 ppm is superimposed on the ROSY spectrum. (c) ^{13}C CPMAS and ROSY slices.

参考文献

- [1] N. Zumbulyadis, et al., J. Am. Chem. Soc. 121 (1999) 11554.
- [2] N. Ivchenko, et al., J. Magn. Reson. 164 (2003) 286.
- [3] W.K. Peng, et al., Chem. Phys. Lett. 417 (2006) 58.

固体NMRプローブにおける マジック角の微小角度精密調整法

○水野 敬、樋岡克哉 (日本電子 (株))、
竹腰清乃理 (京都大学大学院理学研究科)

Infinitesimal adjustment of magic-angle in solid-state NMR
Takashi Mizuno,¹ Katsuya Hioka¹ and K. Takegoshi²
(¹JEOL Ltd., ²Graduate School of Science, Kyoto University)

An infinitesimal adjustment system of magic-angle in solid-state NMR has been developed by a simm coil wounded at the most outer layer of a probe, not mechanically. This coil was designed as a Helmholtz shape with the flat wire for taking account of optimizing the spectral resolution, packing, thermal conduction and durability in a continuously current flowing mode. It was confirmed by NMR observation of KBr that the angle could be adjusted using a prototype of the simm coil which was fitted with a commercial 300 MHz WB probe.

■はじめに 固体NMRにおいてマジック角回転法(MAS)は、内部相互作用の空間部分のうち、外部磁場と試料回転軸との為す角度 θ に関する $P_2(\cos\theta)$ に依存した項を消去することにより、高分解能NMRを可能ならしめる手法として定着している。従来、固体NMRプローブにおけるマジック角の調整は、単純な接合機構などを用いた手動の機械操作によって行われてきた。

四極子核(^{17}O , ^{27}Al etc.)の固体高分解能NMRでは、比較的大きな四極子相互作用(数100kHz~数MHz)のために、マジック角のわずかな誤差によってもスペクトル分解能が悪くなる。たとえば我々が実施した天然存在比の ^2H MAS-NMRでは、 $\pm 0.03^\circ$ の偏差まで合わせこむ必要があった^[1]。また、四極子核の高分解能NMR法として注目されるSTMAS法では、 ^{27}Al で、 $\pm 0.008^\circ$ 以内の誤差範囲が要求された例もある^[2]。これを既存の角度調整機構によって手作業でルーチ的に達成することは、非常な困難を伴う。

そこで、我々は、機械的な動作によらず、高精度かつ高再現的なマジック角の精密調整を容易に可能にすることができる「シムコイル」を考案した。この「シムコイル」は、Figure 1に示すように、試料空間における外部静磁場方向(以下、Z方向という)に対して、垂直な方向(以下、Y方向という)にごく小さい均一な静磁場を発生するためのものである。トータルの静磁場はZ方向とY方向の合成によって与えられるから、「シムコイル」に電流を流すことで、外部磁場全体をZ方向からわずかに傾け、マジック角を調整することができる。

我々はこの「シムコイル」を、ヘルムホルツコイル(鞍型コイルのペア)形状で仕様を検討した。外部磁場強度が7[T]の場合、角度を 0.05° 傾けるのに必要なY方向の磁場は約60[gauss]で

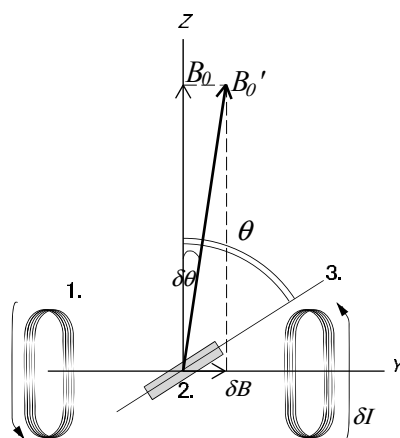


Figure 1: Z方向の静磁場 B_0 下で均一な磁場コイル(1.)に電流 δI を流してy軸方向に磁場 δB を作ったとき。このとき、回転試料(2.)の感じる磁場は合成ベクトル B_0' に相当し、試料回転軸(3.)と全外部磁場との為す角度は $\theta - \delta\theta$ となる。

1

Key Words: MAS, infinitesimal adustment, solid-state NMR
○みずの たかし、ひおか かつや、たけごし きよのり

ある。この磁場強度は、ヘルムホルツコイルをワイドボア・プローブの最外周に設置したとき、丸線直径 1mm で約 100 ターンのコイルに 4.4[A] の電流を流すことに相当する。ここで我々は、このコイルを断面形状が矩形状の「平角線」によって作ることを提案した（特許出願中）。平角線は、通常よく用いられる「丸線」と比較して、線と線の間空隙が無く、稠密性に優れることから——(1) 設置空間あたりの磁場強度を大きくでき、(2) 熱伝導性・堅牢性に優れ、(3) 単一層で巻けることからコイル形状が理想形に近似し、スペクトル分解能への影響を少なくできる——といった長所を有し、多数ターンの鞍型コイルに適用するに相応であると考えた。

■実験・結果 実証試験機として、Doty 社のワイドボア 300 MHz 二重共鳴 H-X MAS プローブに対して適合した、マジック角調整シムコイルおよびボビンを設計した (Figure 2)。このシムコイルを装着したプローブにおいて、KBr を試料としてシムコイルに流す DC 電流を変化させながら ^{79}Br NMR を測定した (Figure 3)。シムコイルに流れる電流を変化させることにより、センターバンドおよびサイドバンド強度が連続的に変化し、試料回転軸の角度変化に対応することが確認された。

■むすびに 平角線ヘルムホルツコイルによって、固体 NMR におけるマジック角を DC 電流により微小制御できることを実験的に示すことができた。本シムコイルは、アタッチメントとして、全ての固体高分解能 NMR プローブに対して取り付けて、マジック角の精密調整を容易化・オートメーション化することができる。また、試料系の周囲に特殊な実験環境（真空、極低温、高温、高圧、特殊雰囲気 … etc.

）を設定された特殊プローブ（たとえば、クライオコイル MAS^[3]）においては、試料管と検出コイルの間に断熱真空層の壁を挿入するため、試料管の角度はプローブ筐体に対して固定されることが望ましい）において、非-機械的にマジック角の精密制御を担保するシステムとしても機能する。

謝辞 本研究は、CREST/JST(平成 17 年度採択) により財政的に支援された。平角線の提供および巻線作業について、三菱電線工業(株) 機器部品事業部 MEXCEL 部および浦谷エンジニアリング(株) に感謝する。

参考文献: [1] T. Mizuno et al., J. Am. Chem. Soc., 128 (2006) 9683-9686.; [2] C. Huguenard et al., J. Magn. Reson. 156 (2002) 131-137.; [3] T. Mizuno et al., Rev. Sci. Instrum. 79 (2008) 044706.

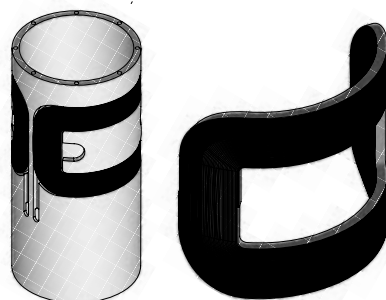


Figure 2: (左) 実証試験機のシムコイルおよびボビンの模式図。(右) シムコイルの片側（平角線鞍型コイル）の拡大図。平角線寸法：厚さ 0.3 mm, 幅 2.8 mm, 絶縁被覆厚み 0.03 mm。コイル寸法：半径 $33+2.8$ mm, 高さ 45.2 ± 16 mm, 巻数 48。

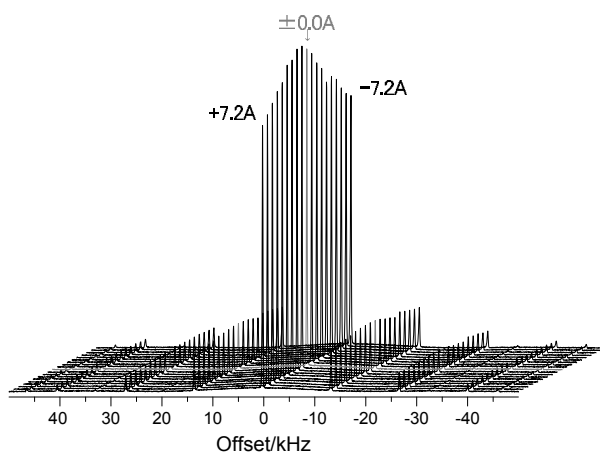


Figure 3: 実証試験機による 1-pulse ^{79}Br NMR スペクトル。外部磁場 7.05[T]。シムコイルに流す電流を + 7.2A ~ - 7.2A まで 0.8A 刻みで変化し、それぞれについて 16 回積算した。電流変化 0.8A あたり角度変化 0.085° と推定される。

PBLA の ^{13}C 化学シフト異方性の測定と二次構造の評価○神原孝之¹、水野敬²、竹腰清乃理¹、莊司顯³¹京都大学大学院理学研究科、²日本電子(株)、³群馬大学大学院工学研究科**Conformational analysis of poly(β -benzyl L-aspartate) by ^{13}C chemical shift anisotropies**○Takayuki Kamihara¹, Takashi Mizuno², Kiyonori Takegoshi¹, and Akira Shoji³¹Graduate School of Science, Kyoto University, Kyoto, Japan, ²JEOL Ltd.,³Graduate School of Engineering, Gunma University, Gunma, Japan

Poly(β -benzyl L-aspartate) (PBLA) is a unique polypeptide undergoing irreversible transformation of its conformation in the solid-state by heat treatment. In order to study origin of its unique property, we measured ^{13}C chemical shift anisotropy (CSA) of the peptide carbon in PBLA by the high-speed Switching-Angle Sample-Spinning (SASS) technique and made comparison with CSAs of similar polypeptides. We observe a low-frequency shift of the δ_{22} value in the peptide carbon of α_R -helix PBLA, which indicates weaker intramolecular hydrogen bond in its α_R form. We conclude this suggests its structural instability and thereby its unique property regarding to the conformational transformation.

ポリペプチドである poly(β -benzyl L-aspartate) (PBLA) は、固体状態で加熱によってその二次構造が不可逆的に転移することが知られている^[1]。このような転移は他のポリペプチドには見られない。我々は PBLA 固有の転移を引き起こす原因を明らかにするため、化学シフト異方性 (CSA; chemical shift anisotropy) を測定し、類似ペプチドのものと比較した。化学シフト異方性は、原子核の周りの電子雲による外部磁場の遮蔽に関する情報を含んでおり、3つの主値(δ_{11} 、 δ_{22} 、 δ_{33})で特徴づけられる回転楕円体様の広がりを持っていると近似できる。特にペプチド炭素の δ_{22} の方向はほぼ C=O 結合の方向を向いていることが知られ、その構造に重要な水素結合に関する情報を含んでいる。化学シフト異方性の情報を得るためには、Switching-Angle Sample-Spinning (SASS) 法^[2]を適用した。

今回用いた 2 次元高速 SASS 法では、試料回転角を 1 次元目に off-magic angle に、2 次元目に magic angle に置いて実験を行った。こうして得られた 2 次元スペクトルでは、1 次元目に off-magic angle でスケーリングされた CSA パウダーパターンが、

キーワード: poly(β -benzyl L-aspartate)、化学シフト異方性、二次構造

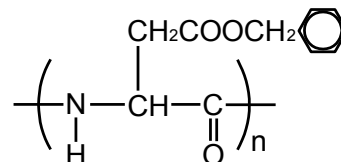


Fig.1 Structure of PBLA

○かみはらたかゆき、みずのたかし、たけごしきよのり、しょうじあきら

2次元目に magic angle での先鋭なスペクトルがそれぞれ得られる。各サンプルに対して得られたスペクトルから C=O 炭素のパウダーパターンを取り出し、最小二乗フィッティングを行うことで化学シフト異方性の値を決定した。

測定したサンプルは、PBLA の α_R -helix、 α_L -helix、類似のポリペプチド poly(γ -benzyl L-glutamate) (PBLG) の α_R -helix である。得られた 2次元 SASS スペクトルのペプチド炭素の部分を拡大したもの、それを t_1 軸方向にスライスして得られたパウダーパターンをフィッティングしたものを Fig. 2 に示す。

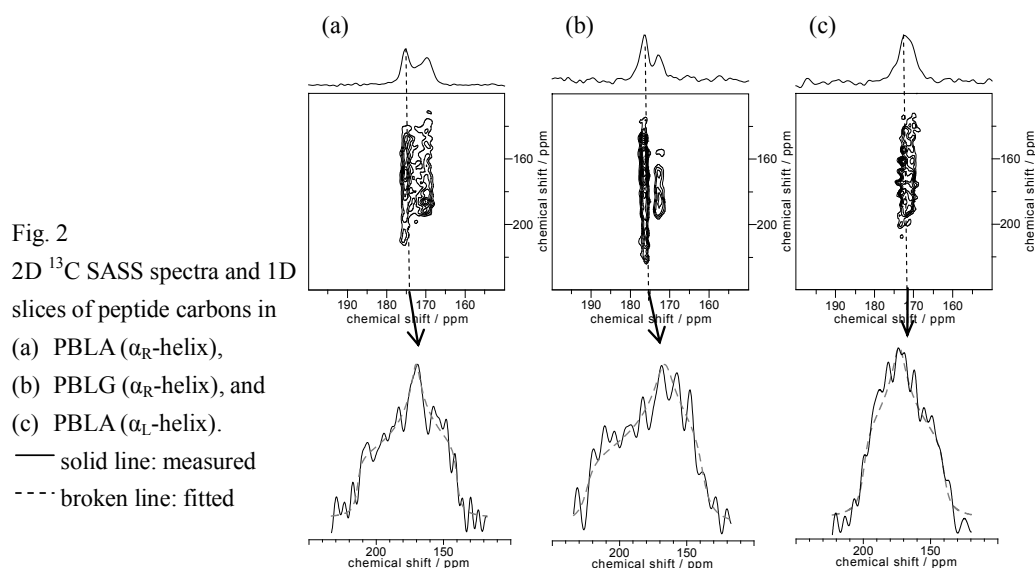


Fig. 2
2D ^{13}C SASS spectra and 1D
slices of peptide carbons in
(a) PBLA (α_R -helix),
(b) PBLG (α_R -helix), and
(c) PBLA (α_L -helix).
— solid line: measured
---- broken line: fitted

		δ_{11}	δ_{22}	δ_{33}	δ_{iso}
α_R -helix	(PBLA)	245.5	183.7	95.0	175.3
	(PBLG)	255.8	196.9	76.4	176.4
α_L -helix	(PBLA)	233.0	166.0	113.7	172.3

Table 1. Principal values of ^{13}C CSA

ここから得られた CSA の値 (Table 1) を比較すると、PBLA の α_R -helix における δ_{22} の値は、PBLG のものより低周波数側に大きくシフトしている。ポリペプチドにおいては、水素結合距離が大きくなるほど δ_{22} の値は小さくなることが知られている^[3]。また、 α_L -helix という構造は α_R -helix よりも水素結合が弱いため不安定とされている。実際にその δ_{22} の値は α_R のものより小さい。これらのことから、PBLA の α_R -helix は他のポリペプチドの α_R -helix よりも弱い水素結合をしていると考えた。したがって、PBLA の α_R -helix 構造の不安定性や特異な構造転移はその弱い水素結合に起因するのではないかと考えられる。

References: [1] T. Akieda, et al., *Macromolecules* **32**, 5794 (1992)

[2] T. Terao, et al., *Chem. Phys. Lett.* **107**, 145 (1984)

[3] T. Kameda, et al., *J. Mol. Struct.* **384**, 17 (1996)

硬い架橋のバイラジカルを使った動的核分極 (DNP)

○松木陽^{1,2,6}, Thorsten Maly¹, Olivier Ouari³, Hakim Karoui⁵, Francois Le Moigne⁵, Egon Rizzato⁵, Sevdalina Lyubenova⁴, Judith Herzfeld², Thomas Prisner⁴, Paul Tordo³, Robert G. Griffin¹

¹マサチューセッツ工科大学・フランシスビターマグネット研

²ブランダイス大学・化学科

³エクスマルセイユ大学・化学科

⁴フランクフルト大学・化学-薬学科

⁵プロバンス大学

⁶(現)阪大・蛋白研

Dynamic Nuclear Polarization using a Rigid Biradical

○Yoh Matsuki^{1,2,6}, Thorsten Maly¹, Olivier Ouari³, Hakim Karoui⁵, Francois Le Moigne⁵, Egon Rizzato⁵, Sevdalina Lyubenova⁴, Judith Herzfeld², Thomas Prisner⁴, Paul Tordo³, Robert G. Griffin¹

¹Massachusetts Institute of Technology, Massachusetts, USA

²Brandeis University, Massachusetts, USA

³University of Aix-Marseille I and III, Marseille, France

⁴University of Frankfurt, Frankfurt, Germany

⁵University of Provence, Marseille, France

⁶(present address) Institute for Protein Research, Osaka University, Osaka Japan

In an effort optimizing the efficiency of dynamic nuclear polarization (DNP) in high magnetic field conditions, we rationally designed, synthesized and tested a novel TEMPO-based biradical polarizing agent, called bis-TEMPO-bisketal (bTbk). A rigid spiro tether connects two 2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl (TEMPO) moieties in the new biradical (see structure) with superior performance in dynamic nuclear polarization. The ¹H DNP enhancement observed in a ¹³C spectrum of an organic compound after cross-polarization (CP) was $\epsilon \sim 250$, and by a factor about 1.4 times larger

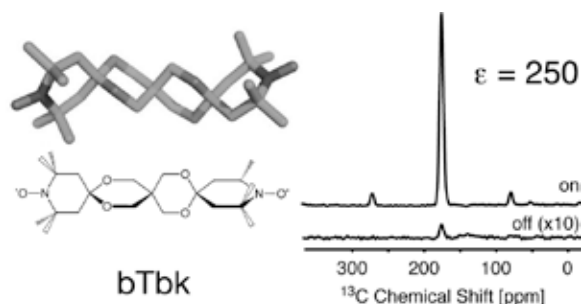


Fig. 1 Crystal structure of a new biradical bTbk, and NMR signal of ¹³C-labeled urea observed after CP with and without microwave irradiation.

Biradical, Dynamic Nuclear Polarization, Solid-State NMR

○まつきよう、とーすてんまりー、おりびえうあり、はきむかるい、ふらんそわるもわーにゆ、いごんりざと、せふだりーなりゆべの一ば、じゅでいすへるつふえんど、とますぶりしゅなー、ろばーとぐりふいん

than that using TOTAPOL, a previously described TEMPO-based biradical with a flexible tether.

DNPを使ったNMR信号増幅の効率を上げる一つのアプローチとして、試料中に分散した電子源であるラジカル分子の化学構造を理知的に設計することがあげられる。生体試料の高分解能測定のために必要な高磁場条件ではラジカル分子としてTEMPOが便利である。高磁場条件で重要になる電子・核間の分極移動機構“cross effect”がよく働くからである。このCross effectには二つの重要な条件が存在する。すなわち、i) 分極移動に関与する二電子間の双極子結合が大きい事、ii) その二電子の共鳴周波数差が核のラーモア周波数と一致することである。2004年、TEMPO二分子を化学的につないだバイラジカル(TOTAPOL)が、DNPによるNMR信号増幅因子を従来の単量体TEMPOで得られる40から170程度にまで向上する事が見いだされた。これは上記の条件i)を、空間的に二電子を近づけて固定する事で実現したものである。我々は条件ii)も同時に満たすように、二電子のg-テンソルの相対向きが上記周波数マッチングの条件を満たすような配向で固定される様に、二つのTEMPO分子を堅いスピロ架橋で繋いだ、新しいバイラジカルbis-TEMPO-bisketal (bTbk)を設計、合成した。このラジカルを使った140GHz/212MHzにおける動的核分極(DNP)法で、NMRの感度向上は250倍を観測、これまで最も効率の良かったバイラジカルTOTAPOLによるものより約1.4倍高かった。[1]

Reference:

[1] Y. Matsuki, T. Maly, O. Ouari, H. Karoui, F. Le Moigne, E. Rizzato, S. Lyubenova, J. Herzfeld, T. Prisner, P. Tordo, and R. G. Griffin, *Angew. Chem. Int. Ed.* **48**, 4996-5000 (2009)

14Tでの高磁場DNPによる固体NMRの高感度化

○植田啓介¹, 松木陽¹, 高橋大樹¹, 出原敏孝², 小川勇², 戸田充²,
藤原敏道¹

¹阪大・蛋白研、²福井大・遠赤外領域開発研究センター

Sensitivity Enhancement of Solid-State NMR by High-Field Dynamic Nuclear Polarization at 14T

○Keisuke Ueda ¹, Yoh Matsuki ¹, Hiroki Takahashi ¹, Toshitaka Idehara ², Isamu Ogawa ², Mitsuru Toda ², Toshimichi Fujiwara ¹

¹ Institute for Protein Research, Osaka University, Osaka, Japan., ²Research Center for Development of Far-Infrared Region, University of Fukui, Fukui, Japan.

Dynamic nuclear polarization (DNP) is the method for improving the sensitivity of NMR through the transfer of the magnetization from electrons to nuclei. We have developed instrumentation for high-field DNP-NMR. For the high field DNP experiments, we used a gyrotron as a source of high-power (50 W) and high frequency (394 GHz) microwaves, and a solid state NMR probe modified for microwave irradiation of the sample at low temperatures. At 600 MHz proton frequency, over ten-fold signal enhancement by DNP was observed at 90 K for the ¹³C resonance of glucose in deuterated glass matrix after cross-polarization from ¹H. At lower temperature, sensitivity should be improved further.

NMRの測定対象の分子が大きくなるにつれて、対象分子数は減少し感度が低下する。したがって、感度の向上により、構造解析可能な分子の大きさの上限や解析精度が上がることになる。巨大な電子スピン分極を核スピンの移動し、NMRの感度を向上させる方法として、動的核分極 (DNP: Dynamic Nuclear Polarization) 法がある。固体でのDNPとは、まずESRを引き起こす周波数をもつ大きなパワーの電磁波を、極低温の対象物に照射し、電子スピンを飽和近くまで励起する。すると、室温核スピンより5000倍以上の大きさを持つ電子スピンの分極が核スピンの移動し、核スピンの磁化が格段に大きくなる。その結果、NMR信号が大きくなる現象である。この分極が移動する際、電子スピンと核スピン間の相互作用であるフェルミ接触相互作用や双極子相互作用が利用される。この感度向上の原理は、オーバーハウザー効果や固体効果などが古くから知られている。DNPは50年以上もの歴史があるが、近年、ジャイロトロンなどDNPに必要な高出力なサブミリ波光源が発展し、高磁場でのDNP実験が可能になってきた。

現在の進んだ高分解能多次元固体NMR法とDNPを組み合わせるためには、極低温高磁場でDNPを実験することが不可欠である。しかし、高磁場ではDNPが低下することが理論的に予想されている。これまで、高磁場DNPの実験的研究は、MITのGriffinらによる先進的な研究があるだけである。私たちは、DNPを行う静磁場としては、世界的にも最高の磁場強度のもとで行う装置を独自に開発した。この装置によりDNP-NMR実験を行い、高磁場で感度最適化を行う方法を検討したので報告する。

DNP、オーバーハウザー、ジャイロトロン、ビラジカル

○うえだけいすけ、まつきよう、たかはしひろき、いではらとしたか、おがわいさむ、とだみつる、ふじわらとしみち

【装置】高磁場DNP実験におけるサブミリ波光源としてジャイロトロンを使用するのは、ガンダイオード等の半導体や後進行波管では出力が不足するためである。高分解能固体DNP-NMRのために、発振出力と周波数について安定性の高いDNP用ジャイロトロンFU-CWⅡを製作した。このジャイロトロンは、 ^1H 共鳴周波数600MHzの固体NMRについて感度を向上させることができる394GHzの周波数のサブミリ波を、二次高調波としてTE₀₆モード、50Wの出力で発振する。約2mの真空管であるジャイロトロンを稼働するために、Heフリー8T超伝導磁石、冷却水循環装置(5kW)、ターボ真空ポンプ、電子銃陽極・陰極・ヒーターにそれぞれに高圧電源装置(最大30kV)を設置した。静磁場掃引は、14T高分解能ワイドボア磁石の主コイル電流を変化させて行った。また、サブミリ波周波数及び出力計測システムを自作した。ジャイロトロンから発振したサブミリ波は、準光学系を用いずに導波管伝送系を経て、DNP-NMRプローブのマジック角試料回転ローターにある試料に、約3W照射できるようにした。試料検出部分は、ラジオ波による核磁化の励起と検出のために最適化した。このプローブは、断熱性を改善し、導波管を挿入するなど既製MASプローブを改造して製作した。試料はサブミリ波透過性の高いサファイアのローターに封入した。また、低温実験のため、液体窒素消費量の少ない中空糸膜を用いた極低温窒素ガス製造システムを作った。

【実験】最初に静磁場強度に依存したDNP効率を測定した。正と負のDNPピークの間隔がほぼ ^1H のゼーマン分裂に相当することから、DNPは電子スピン間結合によるクロス効果により生じていると考えられた。

最高のDNP効率を得る実験では、 ^{13}C グルコースを測定対象とし、DNPを引き起こすラジカルとしてピラジカルTOTAPOL¹⁾を使用した。溶媒として、低温下でガラスマトリクスを形成させるために、グリセリン、重水、水をそれぞれ60:30:10の重量比で調製した。90Kの低温下で測定しながら、

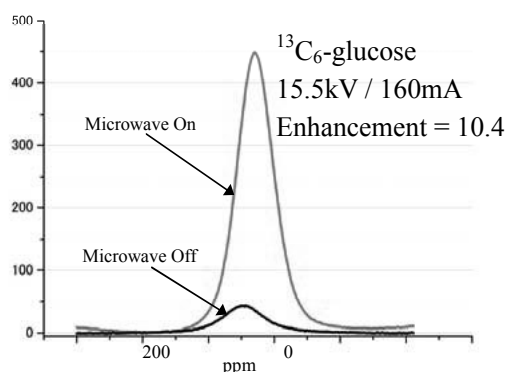


Fig.1 DNP/Solid-State NMR at 394GHz/600MHz

ビーム電流160mA、陰極電圧15.5kVのサブミリ波を照射したところ、10倍以上の感度向上が見られた (Fig. 1)。より大きなDNPを引き起こすために、サブミリ波の出力をビーム電流350mA、陰極電圧15.8kVに上げたところ、意外な事に、感度は4倍程度しか向上しなかった。これは、試料やローターなどがサブミリ波のエネルギーを吸収し、10K程度が上昇したためDNP効率が下がったと考えられる。つまり、高磁場ではニトロキシラジカルの大きなgテンソル異方性のために、熱運動による電子スピン緩和が極端に速くなるのである。したがって、これまで最高磁場であった9T程度でのDNPに比べて、より高い磁場14Tでは、DNP効率を良くするために試料の温度をさらに低く保つなどの処置が必要であると考えられた。この高磁場DNP効率を改善するために、極低温Heガスを用いること、gテンソルの小さいラジカルを用いること、ピラジカルの2つのgテンソルの相対配向をクロス効果DNPに最適化することなどを検討している。

1) C. Song, K. Hu, C. Joo, T. Swager, R. Griffin, *J. Am. Chem. Soc.* 2006, **128**, 11385.

光励起三重項 DNP による室温での p-terphenyl 結晶におけるプロトンの高偏極化

(阪大院基) ○根来 誠, 立石 健一郎, 香川 晃徳, 北川 勝浩

High proton polarization at room temperature with p-terphenyl crystal by DNP using photoexcited triplets

○ Makoto Negoro, Kenichiro Tateishi, Akinori Kagawa, and Masahiro Kitagawa
Graduate School of Engineering Science, Osaka University

Abstract: In this work, we have obtained high ^1H polarization of 0.11 in a single crystal of 0.1mol% pentacene-doped p-terphenyl using Dynamic Nuclear Polarization with photoexcited triplets (triplet-DNP). The polarization is achieved in 10 minutes at room temperature and in 0.4 T. In triplet-DNP, the polarization of 0.11 is the highest at room temperature and the time required for obtaining the polarization of order 0.1 is the shortest in the undeuterated sample.

NMR 分光という観測手法は感度が非常に低いのが欠点で、現在、それを補うための手段として動的核偏極 (DNP; Dynamic Nuclear Polarization) の研究が盛んに行われている [1]. DNP とは電子スピンの偏極率を ESR 周波数近くのマイクロ波照射によって、超微細結合を通して核スピンの伝えることで感度を向上する手法である。He 温度以下, ESR 周波数がサブテラヘルツ領域にかかる磁場下で DNP を行うことで, 0.1 のオーダーの核スピン偏極を得ることが出来る。普通, DNP を行うときは観測したい試料にフリーラジカルをドーピングするのであるが, フリーラジカルの代わりに光励起電子を持つ分子をドーピングし, その光励起電子で DNP を行うという方法もあり, これを triplet-DNP と呼ぶ。ペンタセンのような分子は光励起三重項電子スピン状態を持ち, その占有数分布が温度, 磁場に関係なく非常に大きく偏るということが知られている。それゆえ, ペンタセンを用いた triplet-DNP では従来の DNP より比較的扱いやすい低磁場, 高温度の環境で核スピン系を 0.1 のオーダーの偏極率まで高めることが出来る。

我々の研究室では NMR を用いた量子計算の研究を行っている。量子計算が古典計算を凌駕するためにはエンタングルメントが必要不可欠であり, エンタングルメントを利用した真の NMR 量子計算には, 0.1 のオーダーの偏極率を持った核スピンを量子ビット (qubit) として用いる必要がある [2]. 我々は triplet-DNP によって高偏極化させた核スピン系で NMR 量子計算実験を行うことを目指している。このアプローチは NMR 量子計算を目指している他のグループによるフリーラジカルを用いた DNP により高偏極化させるアプローチに比べて [3], デコヒーレンス (スピン緩和) が少ないという点で優れている

Key Word: DNP, triplet-DNP, 量子計算

ねごろまこと, たていしけんいちろう, かがわあきのり, きたがわまさひろ

と考えられる。三重項電子の寿命は有限であるので、偏極後に光励起を止めれば常磁性電子からの核スピン系へのデコヒーレンスに苦しめられないのである。

武田らによって triplet-DNP のためのパルスシーケンスの中で最も効率的と言われている ICP シーケンスを 50 Hz で繰り返し行い、0.018 mol%ペンタセンを少量ドーピングしたナフタレンの ^1H 偏極が 100 K, 0.3 T 下で 0.7 まで向上できることが報告されている [4]。この時の偏極のビルドアップカーブの時定数は約 2 時間であり、高偏極化には非常に時間がかかっていた。

本研究では、ホスト分子を p-terphenyl に代えることで短時間で高偏極化が可能であることを示す。p-terphenyl はナフタレンに比べてペンタセンをより多くドーピングすることができ、偏極の高速化が期待できる。マイクロ波強度、スイープ磁場パラメータ、レーザーパラメータを最適化し、0.1 mol%ペンタセンをドーピングした p-terphenyl 単結晶中の ^1H 偏極が室温、0.4 T 下で 10 分で 0.11 まで向上できることを示した。 ^1H 偏極率の時間変化を図 1 に示す。ICP シーケンスは 50 Hz で繰り返した。ビルドアップカーブの時定数は約 2 分で、高偏極化にかかる時間がナフタレンに比べて大幅に短縮されている。0.11 という偏極率は室温で行われた triplet-DNP 実験で得られた最も高い偏極率で、このビルドアップの早さは部分的重水素化されていないサンプルで行われたものの中なかでは最も早いものである。

発表では、様々なパラメータで行った実験の結果を紹介し、偏極の高速化について詳しく議論する。

本研究に関して、多大なるご支援、ご助言を頂いた京都大学の武田和行先生に感謝いたします。また、本研究は日本科学技術振興機構の戦略的創造研究推進事業の援助を受けて行われた。

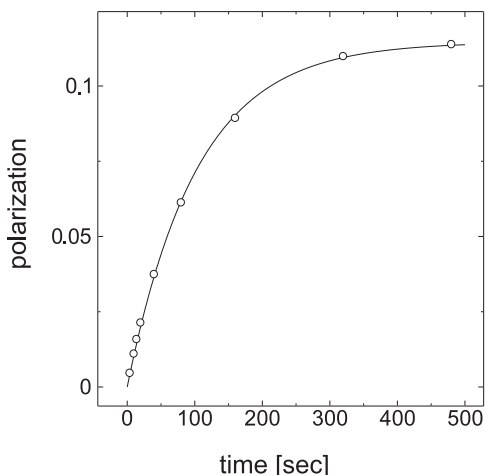


図 1: Buildup curve of the ^1H polarization in a single crystal of 0.1 mol% pentacene doped p-terphenyl. The ICP sequence was repeated at a rate of 50 Hz in 0.4 T and at room temperature.

References

- [1] T. Maly *et al.*, J. Chem. Phys. **128**, 05221 (2008).
- [2] S. L. Braunstein *et al.*, Phys. Rev. Lett. **83**, 1054 (1999).
- [3] H. J. Cho *et al.*, J. Magn. Res. **187**, 242 (2007).
- [4] K. Takeda, “Triplet State Dynamic Nuclear Polarization” VDM Verlag, (2009).

マイクロコイルMASによる極微量の薄膜リチウムイオン電池材料の解析

○野田泰斗¹, 武田和行², 河村純一³, 前川英己¹

¹東北大・工学研究科

²京大・理学研究科

³東北大・多元物質研究所

Micro Amount NMR of Thin-film Lithium-ion Battery Materials Using of Microcoil MAS

○Yasuto Noda¹, Kazuyuki Takeda², Junichi Kawamura³, and Hideki Maekawa¹

¹Graduate School of Engineering, Tohoku University, Sendai, Japan.

²Graduate School of Science, Kyoto University, Kyoto, Japan.

³Institute of Multidisciplinary Research for Advanced Materials, Tohoku University, Sendai, Japan.

Thin-film lithium-ion batteries are lightweight and have properties including high energy density, feasibility to built-on semiconductor devices. For the improving the properties, the precise analysis of cathode materials are desired. Although MAS NMR is powerful tool to investigate local structure and electron state in cathode materials, the less S/N prevented analysis due to micro amount of the samples. Microcoil MAS is a key method to investigate precisely such micro amount samples.

半導体を用いた電子機器は幅広く普及し、携帯電話やノートPCといったモバイル機器の小型・軽量化や長時間駆動などの機能や特性の向上が望まれている。リチウムイオン電池は高エネルギー密度を有し、モバイル機器の電源として最も採用されている。電子機器性能の向上の要求に伴い、その電源であるリチウムイオン電池の更なる軽量化や高安全性、高機能化が求められている。現在普及しているリチウムイオン電池は発火につながる有機電解液が用いられているが、この電解液を固体電解質に置き換えた全固体電池は従来の電池と比較して漏液や自己放電がなく、高信頼性と有する魅力的な電源である。全固体電池の中でも薄膜リチウムイオン電池は比較的任意の基板上に電池を薄膜技術のみで作製できるため他の機能素子との複合化が可能になる。薄膜リチウムイオン電池用電極材料に必要とされる性能は、良好な電子伝導性と電極中のLiイオンの拡散能が大きいことである。リチウムイオン電池のサイクル特性やパワー特性、容量の向上のためには正極材料のリチウムイオンの拡散経路や格納サイトと密接な関係があるLiの局所構造を評価することが必要であると考えられる。

⁷Li NMRは電子スピンまたは非局在化電子の存在に極めて敏感である。そのため、電極材料に用いられている層間化合物の局所構造を緻密に評価することが可能である。しかし、薄膜リチウムイオン電池では正極材料が1 mg以下と極微量しか得られず、従来のMAS NMR法では評価することが困難である。近年、ソレノイドマイクロコイルを

マイクロコイルMAS, リチウムイオン電池, 極微量固体NMR

○のだ やすと, たけだ かずゆき, かわむら じゅんいち, まえかわ ひでき

用いて微量試料を高感度に測定可能なMAS NMR法が開発された[2]。マイクロコイルを用いたNMRは微量試料に対し大きなフィリングファクタと巨大な有効磁場強度が実現でき微量試料を高感度で測定可能となる。今回はマイクロコイルを組み込んだプローブを自作し、リチウムイオン電池の正極材料である LiCoO_2 と LiMn_2O_4 を ^7Li MAS NMRにより評価することを目的とした。

薄膜試料はパルスレーザーアブレーション法 (Pulsed Laser Deposition; PLD) により作製された。薄膜形状は1 cm x 1 cm x 400 nmである。質量はバルク LiCoO_2 の密度 5.05 g/cm^3 からおよそ0.2 mgと求められる。マイクロコイルプローブは0.05 mmの銅線を20回巻いた内径0.8 mmのソレノイドコイルとコンデンサから自作した。この予稿では、作製したマイクロコイルプローブにより実際の薄膜正極材料と同じ質量の粉末正極材料を予備実験として測定した結果を掲載する。試料は内径0.4 mm、外径0.5 mmの石英キャピラリーに充填した。静磁場強度は7 Tである。

作製したマイクロコイルMASプローブのラジオ波強度の入力パワーに対する依存性をFig. 1に示す。小さな入力パワーで大きな有効磁場が得られている。この作製したマイクロコイルで測定した LiCoO_2 の ^7Li MAS NMR をFig. 2に示す。MASの回転速度は8 kHzであり、スピニングサイドバンドをアスタリスクで示した。

討論会当日は現在取り組んでいる実際に薄膜リチウム電池の正極材料の測定結果とローターの中にマイクロコイルを組み込み、コイルごとMASをして測定した結果も合わせて報告したい。

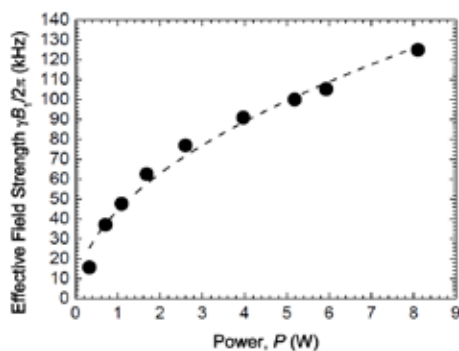


Fig. 1 Effective field dependence on rf-power obtained by nutation experiments of ^7Li in solid LiCl.

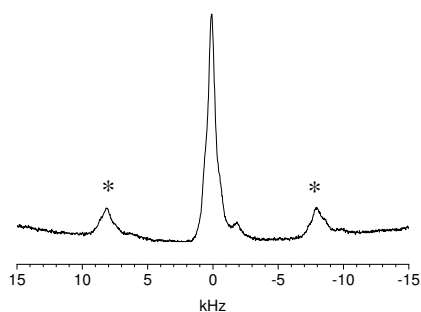


Fig. 2. ^7Li NMR spectrum of LiCoO_2 particles of $10 \mu\text{s}$ in diameter measured by single pulse sequence. The MAS frequency is 8 kHz and the acquisition time is 10,000.

【参考文献】

- [1] C. P. Grey and N. Dupr, Chem. Rev. 104, 4493 (2004).
- [2] H. Janssen et al., J. Am. Chem. Soc. 128, 8722 (2006), D. Sakellariou et al., Nature 447, 694 (2007).

固体高分解能NMRによるナノ粒子表面の修飾有機分子の結合状態とハイブリッド試料の構造解析

○相馬洋之, 千葉亮, 林繁信

独立行政法人 産業技術総合研究所 計測フロンティア研究部門

Bonding states of organic molecules modifying the surface of nano-particles and structures of hybrid materials studied by high-resolution solid-state NMR

○Hiroyuki Souma, Ryo Chiba, Shigenobu Hayashi

Research Institute of Instrumentation Frontier, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Tsukuba, Japan

It is important that the surface of nano-particles is modified by chemical species having high affinity with the matrix in order to disperse nano-particles uniformly in the matrix. And solid-state nuclear magnetic resonance (SSNMR) is a powerful technique to characterize the modified surface of nano-particles. In the present study, we have synthesized titania (TiO_2) nano-particles modified by propylphosphonic acid (PPA) and decylphosphonic acid (DPA), and have demonstrated that SSNMR can detect the bonding between the surface of the nano-particles and the surface-modified reagent. And we proved that SSNMR is very useful to characterize the modified surface of nano-particles.

【序論】

ナノ粒子をマトリックス中に均一に分散させるためには、マトリックスと相溶性の高い化学種でナノ粒子表面を修飾することが重要である。そのためには、表面修飾剤は粒子表面に共有結合で強固に結合している必要がある。そこで、金属ナノ粒子と有機分子のハイブリッド試料を調製し、粒子表面の有機分子の結合状態を固体NMR法により調べた。

【実験】

表面修飾剤としてプロピルホスホン酸(PPA)、デシルホスホン酸(DPA)を用い、二酸化チタンナノ粒子（アナターゼ型） TiO_2 とのハイブリッド試料を、調製時間や温度、さらに調製方法を変えて調製した。それぞれの試料中のナノ粒子表面のリン酸基の結合状態とそれらの構造を ^{31}P 、 ^{13}C CPMAS NMR法、 ^1H SP MAS法により調べた。測定には、Bruker MSL400分光計、Bruker ASX400分光計（共鳴周波数 ^{31}P : 161.98MHz、 ^{13}C : 100.62MHz、 ^1H : 400.13MHz）を用いた。さらに、調製したハイブリッド試料の構造を解析するために、Rigaku MiniFlexを用い、X線粉末回折測定を行った。

【結果・考察】

Figure 1aに表面修飾剤としてデシルホスホン酸(DPA)を用いたハイブリッド試料(DPA/TiO_2)の ^{31}P CPMAS NMRスペクトルを示す。Sample A~Cは、それぞれ調製条件の異なる試料である。

このスペクトルより、Sample Aにおいて9.4ppm、7.4ppmのシグナルが他と比べて大

固体NMR、ナノ粒子、表面修飾

○そうまひろゆき、ちばりょう、はやししげのぶ

きいことがわかった。このシグナルは、表面修飾剤の酸素原子が全て二酸化チタンナノ粒子と共有結合した3座配位に由来するシグナルである[1]。Sample Aは、3日間オイルバスを用いて均一に100℃で加熱して調製した試料であり、表面修飾剤にプロピルホスホン酸(PPA)を用いた場合も、同様の調製を行った試料の ^{31}P CPMAS NMRスペクトルにおいて、同様の傾向があった。これより、均一に長時間加熱することが3座配位の増加につながるということが明らかとなった。

Figure 1bに各ハイブリッド試料DPA/ TiO_2 の ^{13}C CPMAS NMRスペクトルを示す。ここで注目すべき点として、Sample Aでのみ観測された35ppm付近のシグナルと、13、

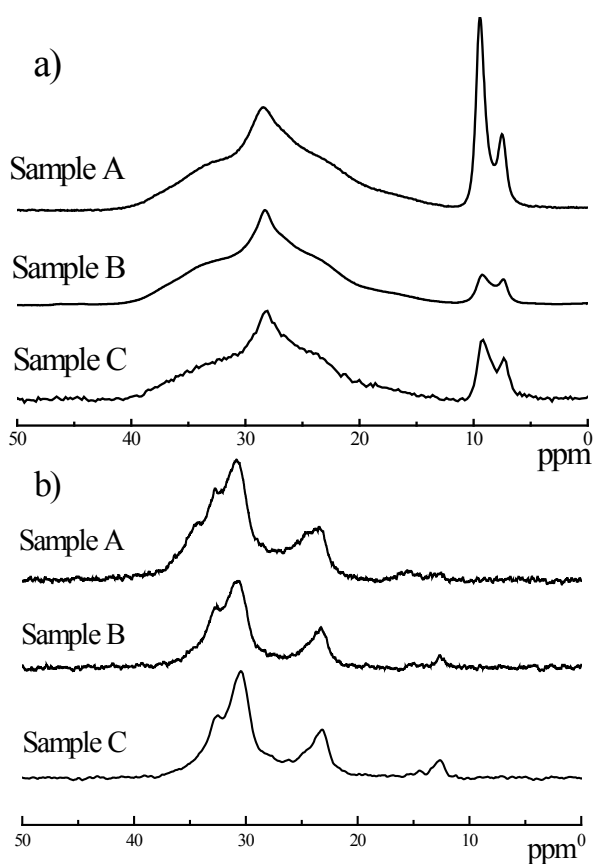


Figure 1.

a) ^{31}P CPMAS NMR spectra of DPA/ TiO_2 .

b) ^{13}C CPMAS NMR spectra of DPA/ TiO_2 .

Sample A : 3 days at 100°C (an oil bath)

Sample B : 1 days at 100°C (an oil bath)

Sample C : 3 days at 100°C (a mantle heater)

【引用文献】

[1] G. Guerrero, P. H. Mutin and A. Vioux, *Chem. Mater.*, **12**, 1268-1272 (2000).

[2] I. Ando, T. Yamanobe, S. Akiyama and T. Komoto, *Solid State Commun.*, **62**, 785-788 (1987).

[3] S. Hayashi, *J. Phys. Chem.*, **99**, 7120-7129 (1995).

15ppm付近のシグナルが挙げられる。DPAの CH_2 鎖は、各スペクトルの30.4ppmのシグナルに帰属されるが、Sample Aにおける35ppmのシグナルは、この CH_2 鎖のシグナルがシフトしたものであると考えられる。鎖がトランス型になった場合、このようなシフトを示すことが以前の研究で明らかになっており[2]、ここでもSample Aの CH_2 鎖がトランス型となることが予測される。さらに13、15ppmのシグナルは末端 CH_3 に帰属されるが、Sample Aのみ明確に分かれている。 CH_3 基は構造上込み入った空間に入ると高周波数シフトを生じることが明らかになっている[3]。これらの結果から、この試料には層状構造となった部分が含まれることが予測される。X線粉末回折測定の結果でも、この予測を支持する結果が得られた。

このように、固体NMRを用いて、ハイブリッド試料の表面修飾剤の結合状態や、その構造を明らかにした。

本研究は、NEDO超ハイブリッド材料技術開発プロジェクトの支援を受けて行われたものである。

液晶CBOOAと混合系液晶CBOOA/HBABにおける分子間相互作用の比較

○萩原祥子¹, 谷本登¹, 藤森裕基¹

¹日大院・総合基

Study of inter-molecular interactions in CBOOA/HBAB mixture by high-resolution ¹³C NMR.

○Shoko HAGIWARA¹, Noboru TANIMOTO¹, and Hiroki FUJIMORI¹

¹ Graduate School of Integrated Basic Sciences, Nihon University.

4-octyloxy-*N*-(4-cyanobenzylidene)aniline (CBOOA) has the thermotropic phase sequence, isotropic (I) – nematic (N) – smectic Ad (S_{Ad}) – crystal (C), on lowering the temperature at atmospheric pressure. When CBOOA is mixed with *N*-*p*-hexyloxybenzylidene-*p*-aminobenzonitrile (HBAB), which has the similar molecular structure to CBOOA but the different phase sequence, reentrant nematic (RN) phase is appeared at atmospheric pressure. To understand the molecular dynamics and the inter-molecular interactions in the liquid crystalline phases, the ¹³C high-resolution NMR experiments were carried out for CBOOA, HBAB, and CBOOA/HBAB mixture.

【緒言】液晶相は分子構造及び分子間相互作用が密接に関与し合って形成される、液体と結晶の中間状態である。4-octyloxy-*N*-(4-cyanobenzylidene)aniline (CBOOA, Fig. 1(a))は、大気圧下で分子配列、配向が共に無秩序で分子が自由な運動を行う等方性液体(Isotropic, I)相、分子配向に一軸性の秩序をもつネマチック(Nematic, N)相、分子配向秩序と共に一次元の周期性をもつスメクチック(Smectic Ad, S_{Ad})相、そして分子配向及び分子の重心位置に三次元の周期性をもつ結晶(Crystal, C)相へと相転移する。これに比べ、CBOOAと似た分子構造を有する*N*-*p*-hexyloxybenzylidene-*p*-aminobenzonitrile (HBAB, Fig. 1(b))は高温側からI-N-Cと相転移する。これらの物質の比較からは、構造上の僅かな差異が液晶相形成に与える影響に関する知見が得られることが期待される。また、これら二種類の液晶物質の混合物は大気圧下において、I-N- S_{Ad} -N-Cの相転移系列をもつことが知られている[1]。低温で再び現われるN相はリエントラントネマチック(Reentrant Nematic, RN)相と呼ばれる。この様な系では、分子の自己集合のわずかな違いが相の出現を支配していると考えられる。そこで、本研究では液晶相形成過程の解明に対し、分子構造による効果、及び混合系における分子間相互作用の変化による効果の両面からアプローチすることを目的としている。この様に、流動性の高い液晶におけるメゾスコピック構造を研究する際には、NMRによる測定が非常に有益となる。今回は、CBOOA、HBAB、および混合系液晶CBOOA/HBABに対し、各炭素核におけるスピン-格子緩和時間(T_1)の測定を行い、比較した。

Liquid-crystal, High-resolution NMR, Relaxation time

○はぎわらしょうこ, たにもとのぼる, ふじもりひろき

【実験】CB00A及びHBABは宮島らにより合成された試料[2]を使用した。混合系液晶はCB00Aにモル分率0.09のHBABを混合させた試料、CB00A_{0.91}HBAB_{0.09}を用いた。¹³C NMR測定にはJEOL製EX-270を使用し、大気圧下において磁場中で配向させた静止試料に対して温度範囲326~388 K、共鳴周波数67.94 MHzで行った。各炭素核における T_1 は $\pi - \tau - \pi/2$ パルス系列を用いた反転回復法により測定した。

【結果・考察】Fig. 2は、CB00A, HBAB, およびCB00A_{0.91}HBAB_{0.09}の液晶相における¹³C NMRスペクトルを示す。Fig. 3, 4は、C(8), C(10), C(11)およびC(1)における T_1 温度依存性を示す。各試料のほとんどの炭素核における T_1 は、液晶相ではほぼ連続的な温度依存性を示し、また、多くの場合対応する炭素核同士の T_1 は、ほぼ一致することが明らかとなった。しかし、分子末端シアノ基C(1)における T_1 温度依存性は試料間で異なる傾向を示した。比較の結果、本液晶系では混合による分子間相互作用への影響は分子構造の差異によるものと様々に[3]分子末端シアノ基に顕著に現われるということが明らかとなった。

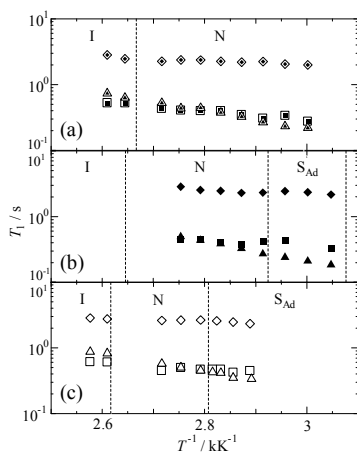


Fig. 3. Temperature dependencies of T_1 of typical carbons, C(8), C(10), and C(11), for HBAB (a), CB00A_{0.91}HBAB_{0.09} (b), and CB00A (c). The triangle, diamond and square marks represent the results of C(8), C(10), and C(11), respectively. The dotted lines represent the transition temperatures.

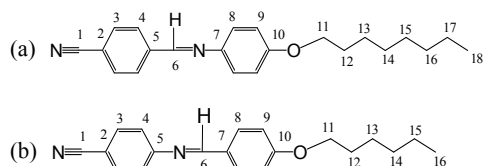


Fig. 1. Molecular structures of CBOOA (a) and HBAB (b) and numbering of carbon atoms.

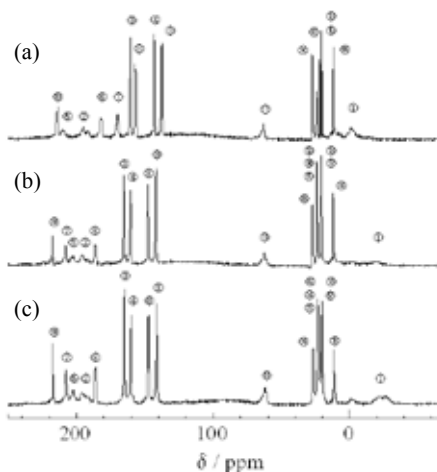


Fig. 2. ¹H-decoupled ¹³C NMR spectra of HBAB (a), CBOOA_{0.91}HBAB_{0.09} (b), and CBOOA (c) in liquid-crystalline phases. Numbers indicate the results of line assignment.

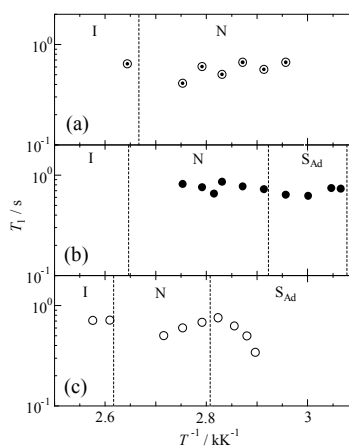


Fig. 4. Temperature dependencies of T_1 of C(1) for HBAB (a), CBOOA_{0.91}HBAB_{0.09} (b), and CBOOA (c). The dotted lines represent the transition temperatures.

[1] P. E. Cladis, *Phys. Rev. Lett.* **35**, 48 (1975).

[2] S. Miyajima, T. Enomoto, T. Kusanagi, and T. Chiba, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **64**, 1679 (1991).

[3] S. Hagiwara, Y. Iwama, and H. Fujimori, *Complex Systems*, 725 (2008).

固体NMRを用いた不飽和脂質を含有する バイセルに関する研究

○上釜 奈緒子¹、辻 暁²、西村 勝之¹

¹分子科学研究所, ²兵庫県立大学

Properties of Bicelle Composed of Un-, and Saturated Phosphatidylcholine Revealed by Solid State NMR Spectroscopy

○Naoko Uekama¹, Satoru Tuzi², and Katsuyuki Nishimura¹

¹Institute for Molecular Science, ²University of Hyogo

In this study, we report development of new bicelle composed of un-, and saturated lipids together with phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate (PIP₂). That possesses planer lipid bilayer as same as conventional bicelle, but can be magnetically aligned at room temperature stably. The orientational property of developed bicelle was assessed by using ³¹P-NMR. Rearrangements of lipids in bicelle were observed by differential interference microscope at various temperatures.

Introduction: Conventional bicelle prepared from the hydrated mixture of saturated lipids possessing short and long acyl-chains at proper composition forms planer lipid bilayer and can be magnetically aligned under static magnetic field from 30 to 40 °C. Triba et al., proposed a bicelle prepared by mixture of saturated lipid 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DMPC) and unsaturated lipid 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (POPC) for long acyl chain lipids, and 1,2-dihexanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DHPC) for short acyl chain lipid, respectively, in order to achieve magnetic alignment at temperature lower than that of conventional bicelle¹⁾. In the following we refer above bicelle to as POPC/DMPC/DHPC-bicelle.

Experimental: POPC/DMPC/DHPC-bicelle was prepared with q value of 3.0 as described in ref (1). Our developed bicelle consists of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) in addition to above lipids at proper molar ratio. We refer new bicelle to as PIP₂/POPC/DMPC/DHPC-bicelle. Similarly, PIP₂/POPC/DMPC/DHPC- bicelle was prepared with q value of 3.0. Orientational property of developed bicelle was compared to that for POPC/DMPC/DHPC-bicelle based on ³¹P-NMR. All of NMR experiments were carried out using Varian INOVA 400 spectrometer equipped with JEOL 6 mm o.d. narrow bore MAS

固体 NMR バイセル

○ うえかま なおこ、つじ さとる、にしむら かつゆき

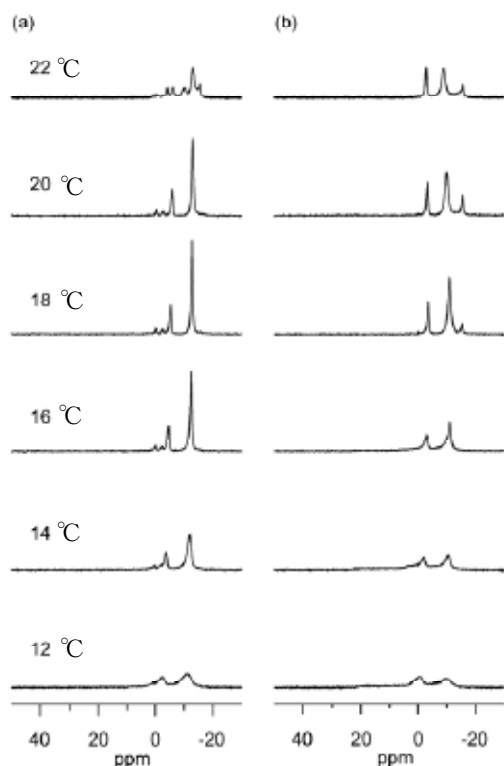


Fig. 1 ^{31}P -NMR spectra of (a) $\text{PIP}_2/\text{POPC}/\text{DMPC}/\text{DHPC}$ -bicelle and (b) $\text{POPC}/\text{DMPC}/\text{DHPC}$ -bicelle from 12 to 22 °C.

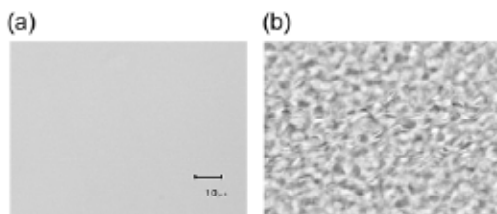


Fig. 2 Differential interference microscope pictures of (a) $\text{PIP}_2/\text{POPC}/\text{DMPC}/\text{DHPC}$ -bicelle and (b) $\text{POPC}/\text{DMPC}/\text{DHPC}$ -bicelle at 16 °C.

two bicelles were significantly different, even though those were prepared by same q value.

We have successfully developed bicelle which can be magnetically aligned stably at room temperature. The developed bicelle may be useful for structural characterization of membrane proteins.

References

- (1) Triba MN, Devaux PF, Warschawski DE, *Biophys. J.* **2006**, *91*, 1357.

probe at static mode. Temperature was increased from 0 to 30 °C.

Results and Discussions: Figure 1 shows the comparison of ^{31}P -NMR spectra for (a) $\text{PIP}_2/\text{POPC}/\text{DMPC}/\text{DHPC}$ -bicelle and (b) $\text{POPC}/\text{DMPC}/\text{DHPC}$ -bicelle. The peaks around -3 and -11 ppm are originated from DHPC and POPC/DMPC mixture, respectively. The peak around -15.5 ppm is $\delta_{\perp}$ edge of axially symmetric powder pattern of ^{31}P chemical shift anisotropy from multi lamella vesicles (MLVs). As shown in Figure 1 (a), $\text{PIP}_2/\text{POPC}/\text{DMPC}/\text{DHPC}$ -bicelle was magnetically aligned stably from 14 to 20 °C. In contrast, $\text{POPC}/\text{DMPC}/\text{DHPC}$ -bicelle was magnetically aligned only at 16 °C. At 18 °C, $\delta_{\perp}$ edge of axially symmetric powder pattern of ^{31}P chemical shift anisotropy from MLVs was appeared.

Differential interference microscope pictures of (a) $\text{PIP}_2/\text{POPC}/\text{DMPC}/\text{DHPC}$ -bicelle and (b) POPC/DMPC -bicelle at 16 °C are shown in Figure 2. No visible size objects were observed for $\text{PIP}_2/\text{POPC}/\text{DMPC}/\text{DHPC}$ -bicelle at 16 °C, in contrast to observation of visible size of bicelle for $\text{POPC}/\text{DMPC}/\text{DHPC}$ -bicelle. This result indicates that the size of those

固体NMRによるシルセスキオキサンを骨格とする エポキシ樹脂の構造解析

○前田史郎¹, 黄前真吾¹, 清水裕太¹, 村上吉昭²

¹福井大院工, ²日東シンコー

Characterization of epoxy resin reinforced with silsesquioxanes by solid NMR

○Shiro Maeda¹, Shingo Oumae¹, Yuta Shimizu¹, Yoshiaki Murakami²

¹Division of Applied Chemistry and Biotechnology, Graduate School of Engineering, University of Fukui, Fukui, 910-8507, Japan. ²Nitto Shinko Corp., Sakai, Fukui, 910-0381, Japan

Characterization of epoxy resin reinforced with silsesquioxanes [1] was done by using ¹³C and ²⁹Si solid-state high resolution NMR measurements. ¹³C and ²⁹Si spin-lattice relaxation times and ¹³C depolarization time constants of [1] were measured with Torchia's T1CP pulse sequence and Wu's depolarization pulse sequence, respectively. ²⁹Si DD/MAS spectrum of [1] was curve fitted to four peaks.

【はじめに】シルセスキオキサンは、一般式(RSiO_{3/2})_nで示される化合物であり、三官能性シランを加水分解・重縮合反応することにより得られる、このシルセスキオキサンには、ランダム構造、梯子状構造、かご状構造等がある。これらの化合物をビルディングブロックとして得られるポリマーは、高い機械的強度、高い耐熱性を有する等の利点が報告されており、高機能材料として期待が寄せられている。シルセスキオキサンを骨格とするエポキシ樹脂硬化物の固体¹³Cおよび²⁹Si NMR測定を行って分子構造解析を行った。

【実験】シルセスキオキサン骨格エポキシ樹脂硬化物の試料作製は次の通りである：アルコキシシラン化合物とビスフェノールA型エポキシ樹脂とを加熱縮合させる。反応生成物としてアルコールおよび水が発生する。重合樹脂としてはシルセスキオキサン骨格を含有するエポキシ樹脂が得られる。固体¹³Cおよび²⁹Si NMR測定は、Chemagnetics CMX Infinity 300を用いて75.56MHzと59.69MHzで測定した。化学シフトは外部基準値を用い、¹³Cはヘキサメチルベンゼンのメチル炭素をTMSから17.35ppm、²⁹SiはポリジメチルシランをTMSから-34.1ppmとした。

Table 1. ¹³C Chemical shifts, depolarization time constants, T_d , and relaxation times, T_1^C of epoxy resin reinforced with silsesquioxanes.

Peak Number	1,1'	2	3	3'	4	5	5'	6	7	8	8'	9	10	11
Chemical shift/ppm	157	144	130	130	115	72	72	51	41	31	31	23	17	8
$T_d/\mu s$	600, 590	540	490	71	81	38	38	270	400	240	60	76	180	60
T_1/s	11, 22	11	30	5.0	4.4	0.7	6.6	4.3	4.1	9.9	0.3	0.7	5.7	0.8

シルセスキオキサン, エポキシ樹脂, 固体NMR

○まえだしろう, おうまえしんご, しみずゆうた, むらかみよしあき

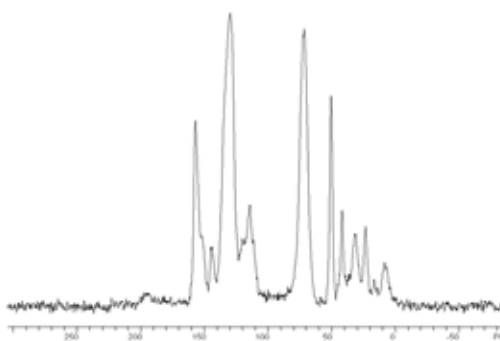


Figure 1. ^{13}C CP/MAS-TOSS spectrum of epoxy resin reinforced with silsesquioxanes.

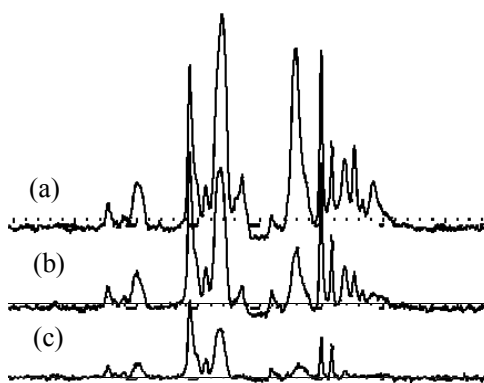


Figure 2. ^{13}C CP/MAS depolarization spectra of epoxy resin reinforced with silsesquioxanes: depolarization times are a) $40\mu\text{s}$, b) $100\mu\text{s}$, and c) $400\mu\text{s}$, respectively.

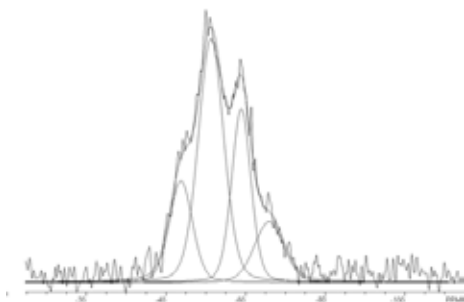


Figure 3. ^{29}Si DD/MAS spectrum of epoxy resin reinforced with silsesquioxanes.

90° パルス幅は $5\mu\text{s}$, ^{13}C CP/MAS測定のコネクタタイムは 1.5ms , 待ち時間は 1s , 試料回転数は 5kHz であった. 試料管外径は 5mm で, セラミックス製CP/MASプローブを用いた. ^{29}Si DD/MASスペクトルは待ち時間 360s で 1600 回積算した. Wuらの脱分極パルスシーケンスならびにTorchiaのT1CPシーケンスを用いて, 脱分極時定数 T_d ならびに, ^{13}C および ^{29}Si スピン格子緩和時間 T_1 の測定を行った.

【結果と議論】図1に ^{13}C CP/MAS-TOSSスペクトルを示す. 表1に ^{13}C 化学シフト, 脱分極時定数, 緩和時間を示す. 重なっているピークは脱分極時定数および緩和時間の違いを利用して分離して帰属した. 図2(a), (b), および(c)は, それぞれ脱分極時間が $40\mu\text{s}$, $100\mu\text{s}$, および $400\mu\text{s}$ の脱分極スペクトルである. 図1にない低磁場側および中央付近のピークはスピニングサイドバンドである.

^{29}Si DD/MASスペクトルを図3に示す. スペクトルは -43ppm , -50ppm , -59ppm , および -66ppm の4つのピークに波形分離できた. これらのピークは, それぞれ, T^0 サイト $\text{RSi}(\text{OR})_3$, T^1 サイト $\text{RSi}(\text{OSi-})(\text{OR})_2$, T^2 サイト $\text{RSi}(\text{OSi-})_2(\text{OR})$, および T^3 サイト $\text{RSi}(\text{OSi-})_3$ に帰属した. ^{29}Si スピン格子緩和時間は, それぞれ 23s , 42s , 66s , および 26s , 面積比率は 17% , 45% , 24% , および 13% である. エポキシ樹脂硬化物の固体NMR測定結果と硬化前の液体状態のエポキシ樹脂の ^{13}C および ^{29}Si NMR測定結果と合わせて, 硬化機構およびシルセスキオキサン骨格の分子構造の詳細も発表する予定である.

固体 NMR を用いた新規水素貯蔵材料 $M(\text{Al}(\text{NH}_2)_4)_x$ の 局所構造解析

○ 小野泰輔¹、下田景士²、坪田雅己²、小島健一³、
市川貴之²、小島由継²

1. 広大先端研、2. 広大先進セ、3. 広大総科研

Systematic study on local structure of novel hydrogen storage material $M(\text{Al}(\text{NH}_2)_4)_x$ by solid state NMR

Taisuke Ono¹, Keiji Shimoda², Masami Tsubota²,
Ken-ichi Kojima³, Takayuki Ichikawa², Yoshitsugu Kojima²

1. *The Graduate School of Advanced Sciences of Matter, Hiroshima University*

2. *Institute for Advanced Materials Research, Hiroshima University*

3. *The Graduate School of Integrated Arts and Sciences, Hiroshima University*

Novel metal aluminum amides $M(\text{Al}(\text{NH}_2)_4)_x$ ($M = \text{Li}, \text{Na}, \text{K}, \text{Mg}, \text{and Ca}; x = 1, 2$) were synthesized by ball milling method under liquid ammonia. Thermogravimetry and mass spectroscopy (TG/MS), synchrotron radiation X-ray powder diffraction (SR-XRD), and ^{27}Al MAS and 3QMAS NMR experiments have been performed in order to investigate the thermal decomposition and structural properties. ^{27}Al MAS spectra showed that $\text{Al}(\text{NH}_2)_4^-$ units actually existed in $M(\text{Al}(\text{NH}_2)_4)_x$. We found the correlation between decomposition temperature and the ^{27}Al isotropic chemical shift in 3QMAS spectra.

《序論》

今日、地球温暖化を促進しかつ枯渇が迫っている化石燃料に代わる新エネルギーの開発が急がれている。中でも水素と電力をベースとしたクリーンなエネルギー社会の構築が注目を集めている。水素エネルギー活用の実現化を考える上で、軽量・高容量かつ容易に水素を取り出せる水素貯蔵材料の開発が極めて重要な課題となり、近年、軽元素を用いた水素

Key words: Hydrogen Storage Material; ^{27}Al 3QMAS NMR

おの たいすけ、しもだ けいじ、つぼた まさみ、こじま けんいち、
いちかわ たかゆき、こじま よしつぐ

貯蔵材料の開発が盛んに行われている。そのような中、我々は有望な材料として $M(\text{Al}(\text{NH}_2)_4)_x$ ($M = \text{Li, Na, K, Mg, Ca}$; $x = 1, 2$)系水素貯蔵材料に着目した。 $M = \text{Li}$ の場合、5.1 質量%もの多量のアンモニアを吸蔵/放出し、LiH とのミリング複合化処理により、6.1 質量%という多量の水素を 130°C という低温で放出することが報告されている[1]。それ故、高容量水素貯蔵材料として実用化が期待される材料である。そこで我々の研究グループは、さらなる水素放出温度の低温化を目指して、 $M(\text{Al}(\text{NH}_2)_4)_x$ の系統的な研究に取り組んだ。

《実験》

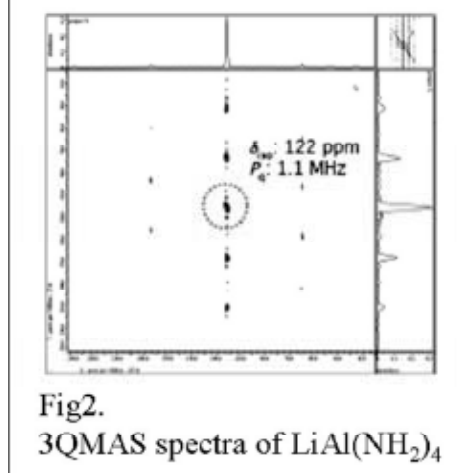
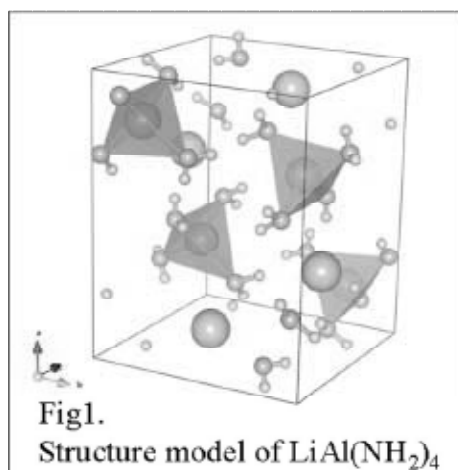
$M(\text{Al}(\text{NH}_2)_4)_x$ は、出発物質 (Al 粉末、水素化物、アラネート、金属粉末) を液体アンモニア中で 4~10 時間ボールミリング処理して作製した。 ^{27}Al MAS 測定及び 3QMAS 測定は JEOL ECA600 (14.1 T) を使用して行われた。測定は 15kHz の MAS 回転で行った。参照試料には、 AlCl_3 1M 水溶液を用いた。

《結果と考察》

Fig.1は、過去に報告された $\text{LiAl}(\text{NH}_2)_4$ の構造モデル[2]であり、Alを中心に NH_2^- イオンが四面体配位している。本研究にて作製した $\text{LiAl}(\text{NH}_2)_4$ の回折パターンは、この構造モデルと一致する。熱分析結果では、同族元素内では原子番号が大きくなるにつれアンモニア放出温度(分解温度)が低温化している。そこで、我々は ^{27}Al MAS 及び 3QMAS NMR を用いて $\text{Al}(\text{NH}_2)_4^-$ 錯イオンの中核となるAl原子の化学状態を観察した。Fig.2 は $\text{LiAl}(\text{NH}_2)_4$ の ^{27}Al 3QMASスペクトルである。3QMASから得られた化学シフト値と分解温度に相関が見られた。詳細は他の結果と併せて、ポスター上にて議論する。

[1] R. Janot *et al.*, J. Phys. Chem. C **111** (2007) 2335-2340.

[2] H. Jacobs *et al.*, Z. Anorg. Allg. Chem. **581** (1985) 125-139.



高圧水素ガスシール用ゴム材料中に溶解した水素の固体NMRによる解析

○藤原 広匡⁽¹⁾, 山辺 純一郎^(1,2), 西村 伸^(1,3)

1) 産業技術総合研究所(AIST)

水素材料先端科学研究センター (HYDROGENIUS)

2) 九州大学大学院工学研究院水素エネルギー国際研究センター

3) 九州大学大学院工学研究院機械工学部門

Evaluation of Hydrogen Dissolved in Rubber for High Pressure Hydrogen Sealing using Solid state NMR

○Hirofumi Fujiwara¹, Junichiro Yamabe^{1,2} and Shin Nishimura^{1,3}

1 National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)

Research Center for Hydrogen Industrial Use and Storage (HYDROGENIUS)

2 International Research Center for Hydrogen Energy, Kyushu University

3 Department of Mechanical Engineering in Faculty of Engineering, Kyushu University

Rubber materials for high-pressure hydrogen gas sealing are repeatedly exposed to hydrogen gas. Hydrogen gas dissolves in rubber in high-pressure hydrogen gas. The dissolved hydrogen in rubber causes blister fracture, which starts from inner bubbles emerged during hydrogen desorption. In this study, we evaluate content and state of the dissolved hydrogen in NBR after 100MPa hydrogen gas exposure, using solid state NMR, aiming to clarify the mechanism of the fracture. As a result, two types of hydrogen with different chemical shifts were determined by NMR spectra. Examination of the relaxation time clarified the significant difference of the mobility of the two types of hydrogen.

【緒言】燃料電池システムなどに用いられる高圧水素ガス貯蔵容器シール用ゴム材料の設計指針を確立する目的で、高圧水素ガスのゴム材料への影響評価を進めている。高圧水素ガス曝露によりゴム材料にはブリストと呼ばれる破壊現象が生じるが、これは、ゴム中に溶解した水素の脱離過程において発生した気泡が進展することで起こる現象²⁾であることを既に報告した。破壊現象にはゴム材料の化学構造変化を伴わないことを NMR, IR, ラマン測定により確認した¹⁾。高圧水素曝露による破壊のメカニズムの解明に際しては、曝露時にゴム中に溶解した水素の状態把握と定量が不可欠である。本研究では NBR(アクリロニトリルブタジエンゴム)を用い 100MPa 圧力条件にて水素ガス曝露に供した試験片の固体 NMR 測定を行う事でゴム中に溶解した水素の状態と濃度評価を行った。

【実験】実験には原料ゴムである NBR(日本ゼオン Nipol 1042)に硫黄 1.5phr および加硫促進剤を配合した試験片を用いた。ジルコニア製固体 NMR 測定用 φ7mm ローターに円柱試験片を充填したサンプルを 100MPa・30°C・65 時間の条件にて水素曝露に供し、超伝導固体 NMR 装置 CMX-300(日本電子(株))を用い、シリコンゴム(0ppm)を基準物質として ¹H ケミカルシフトを観測した。残存水素量は同条件にて曝露した試験片を TDA: 昇温脱離分析装置 JSH-201 (J サイエンス社製)にて別途測定した。また、水素ガスを NMR 管に封管し、重水素ガス, Solid state NMR, Fuel cell

○ふじわらひろただ, やまべじゅんいちろう, にしむらしん

ロロホルムを外部ロック試薬として超伝導 NMR ECP-400(日本電子(株))にて測定した。

【結果・考察】Fig. 1 に曝露後ゴム中に水素ガスが溶解した状態の試験片について MAS 速度 3,000Hz で固体 ^1H NMR 測定を行った結果を水素ガスのスペクトルと合わせて示す。曝露後 1 時間経過した試験片には 2.2ppm と 5.5ppm をピークトップとする NBR 由来のスペクトルの他、未曝露の NBR では観測されない 4.49 ppm[A] (半値幅:

148Hz)と 4.8 ppm[B] (47Hz)に 2 種類のピークが発現した。一方、水素ガスのスペクトルは約 7.3 ppm 付近に観測されたことから、[A] [B]は測定中に試験片から脱離した水素ガス由来のスペクトルでないことが示唆される。NMR スペクトルの経時変化を測定した結果、[A] [B]は時間の経過とともに減少し 30 時間後消滅した。30 時間後のスペクトルは未曝露 NBR 試験片のスペクトルと一致することが確認され、試験片中の残存水素量は TDA により 0wt・ppm であることが確認された。NBR の分子構造は水素曝露の影響を受けないこ

とから[A] [B]を水素分子と仮定した場合の濃度をスペクトルの波形分離によって NBR の面積比率を基に算出した。別途 TDA により NMR 測定温度と同条件下で測定した試験片中の残存水素濃度との関係を Fig. 2 に示す。[A]と[B]の合計水素量は TDA 測定による水素脱離挙動と一致した。TDA 測定により観測されるガスは水素分子であることが確認されているため、[A] [B]はゴム試験片中に溶解している水素分子であることが確認された。よって、ゴム中に溶解した水素ガスは、ケミカルシフトと半値幅が異なることから分子運動性の異なる 2 種類の水素分子で存在していることが示唆された。

1) 第 58 回高分子討論会 2R-15 藤原広匡 山辺純一郎 西村伸。

2) J. Yamabe, S. Nishimura, Int. J. Hydrogen Energy, 34, 1997 (2009).

【謝辞】ゴム試験片を作製いただきました高石工業(株)に感謝します。本研究成果の一部は、NEDO 技術開発機構の水素材料先端科学基礎研究事業(平成 18 年度～平成 24 年度)の一環として行ったものである。

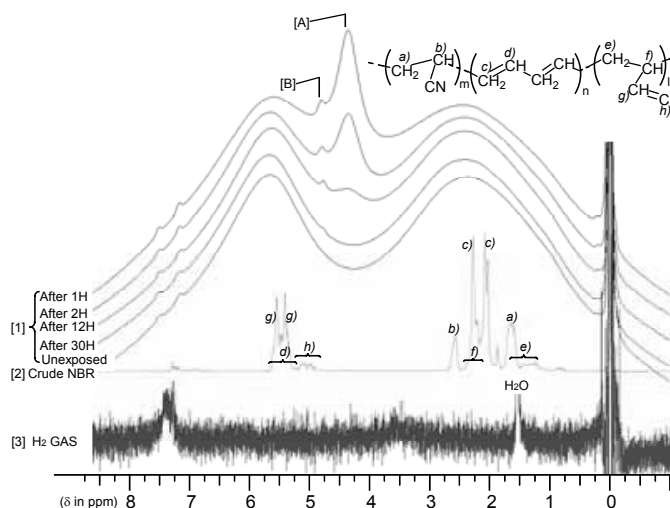


Fig. 1 ^1H NMR spectra of NBR during hydrogen elimination

[1] Time-series of Solid state NMR spectra of NBR, [2] Liquid phase NMR spectra of crude NBR in CDCl_3 , [3] Solution State NMR spectra of H_2 Gas

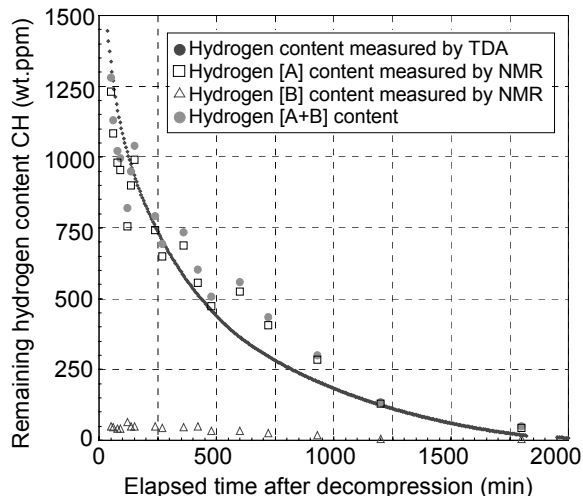


Fig.2 Variation of hydrogen measured by TDA and NMR

Hydrogen bonds and proton dynamics in hybrid materials of CsHSO₄-silica nanoparticle prepared by mechanical milling

○Keiko Jimura and Shigenobu Hayashi

Research Institute of Instrumentation Frontier, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)

In inorganic solid acid salts such as cesium hydrogen sulfate CsHSO₄, tetrahedral AO₄ (A = S, P) anions form hydrogen-bond networks. It is well known that a high proton conductivity is observed at temperatures higher than 100°C. Proton dynamics is closely related with rotation of AO₄ tetrahedral ions, and proton transport takes place through the hydrogen bond networks. The proton transport phenomenon is expected to be changed or improved, if the hydrogen-bond states are changed or controlled. In the present work, we have synthesized hybrid materials of CsHSO₄ and silica nanoparticle by use of mechanical milling, and have studied the hydrogen-bond states and the proton dynamics by ¹H solid-state NMR.

【序】 CsHSO₄に代表される無機固体酸塩では、AO₄型の四面体イオン (A = S, P) が水素結合のネットワークを形成しており、100°C以上の温度において高いプロトン伝導性を示すことが知られている。プロトンの拡散は四面体イオンの回転と密接に関係しており、プロトンは水素結合ネットワークを移動する。水素結合の状態を変化させることにより、プロトンの拡散挙動が大きく変化することが期待できる。本研究では、CsHSO₄ とシリカナノ粒子とをメカニカルミリングで複合化した試料について、その水素結合状態と水素拡散挙動を ¹H NMR を用いて調べたので報告する。

【実験】 CsHSO₄ とシリカナノ粒子をメカニカルミリングで複合化して調製した。ジルコニア製粉砕ジャーに CsHSO₄ とシリカナノ粒子を所定量秤取り、遊星型ボールミルで2時間ミリングした。調製中に材料が吸湿した可能性があるので、複合化した試料を室温減圧下で乾燥した。複合材料 xSiO₂-(1-x)CsHSO₄ の組成は mol 比率 : x = 0 ~ 0.95 とした。¹H MAS NMR 測定には、Bruker MSL400 (共鳴周波数 400.13MHz) を用いた。

【結果・考察】 組成比の異なる複合材料の ¹H MAS NMR スペクトルを Fig.1 に示す。x = 0 の材料では 12.4 ppm にシグナルが観測された。これは bulk CsHSO₄ (phase III)

固体 NMR、水素結合、無機固体酸塩

○じむら けいこ、はやし しげのぶ

に帰属される。シリカナノ粒子を加えずに調製した複合材料にはメカニカルミリングの影響がないことを示している。一方、 $x > 0$ の材料では 11 ppm ~ 3 ppm 付近までシグナルが広がっており、11 ppm、8~6 ppm、3~5 ppm に三種類のピークが確認された。後者二つのシグナルは、11 ppm のピークよりも線幅がブロードであった。Bulk CsHSO₄ (phase II) の化学シフトが 11.2 ppm であることから、11 ppm のピークは、CsHSO₄ (phase II) like 部分に帰属される。5~3 ppm のピークは、シリカナノ粒子の OH 基に帰属される。8~6 ppm のピークは、CsHSO₄ 領域とシリカ領域の境界部分に帰属される。これらの結果から、複合材料の水素結合状態は明らかに bulk CsHSO₄ と異なる。水素結合の状態が変化したこと、プロトンの拡散挙動も大きく変化していると期待される。

複合材料 $x = 0.8$ の ¹H MAS NMR スペクトルの温度依存性を Fig. 2 に示す。温度上昇に伴う各ピークの水素量変化は観測されなかった。すなわち、3 種類のプロトンが別々に存在していることを示した。一方、温度上昇に伴い、11 ppm のピークでは線幅がブロードになり、8~6 ppm のピークでは線幅がシャープになった。この結果は、CsHSO₄ (phase II) like 部分と複合材料境界部分のプロトンが運動していることを示しているが、その運動モードが異なることを示唆している。

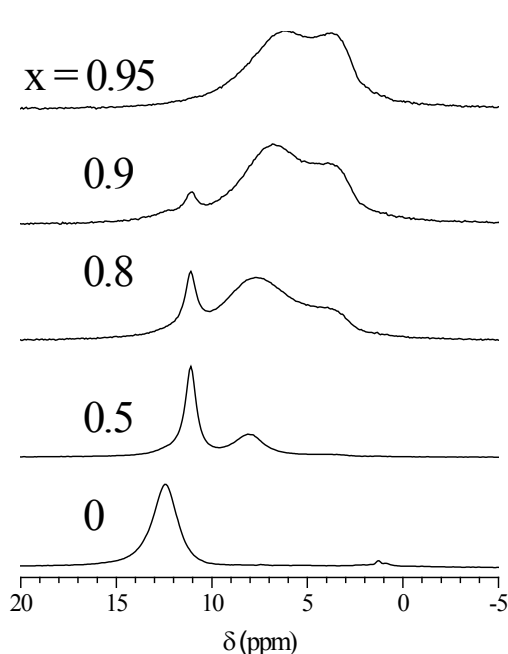


Fig. 1 ¹H MAS NMR spectra of hybrid materials, $x\text{SiO}_2-(1-x)\text{CsHSO}_4$, $x = 0-0.95$. The spin rates were 10.0 kHz.

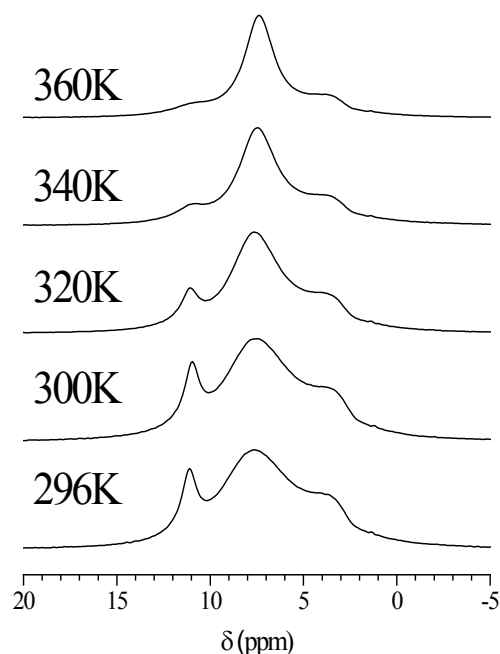


Fig. 2 ¹H MAS NMR spectra of hybrid materials, $x\text{SiO}_2-(1-x)\text{CsHSO}_4$, $x = 0.8$. The spin rates were 8.0 kHz. The temperature was 296 ~ 360K.

ゼオライトに吸着したジクロロメタンの観測

○小島 奈津子, 林 繁信

産業技術総合研究所 計測フロンティア研究部門

NMR observation of dichloromethane adsorbed on zeolites

○Natsuko Kojima and Shigenobu Hayashi

Research Institute of Instrumentation Frontier, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)

Dichloromethane is one of organic solvents, which can well dissolve organic substances. The solvent has been used when a solid substance was adsorbed on an adsorbent. Everyone believes that dichloromethane is easily removed by evacuation at room temperature. However, we find out that some zeolites do not release dichloromethane under vacuum. In the present work, we study the adsorption state of dichloromethane molecules by means of solid-state NMR.

〈緒言〉

ジクロロメタンは有機溶媒の1つであり、有機固体物質をよく溶解するため、ゼオライトなどの吸着物質へ有機固体物質を吸着させるときの溶媒としてよく用いられてきた。吸着させた後に室温で真空排気することにより、ジクロロメタンは容易に除去できると従来考えられてきた。ところが、ゼオライトの一種であるモルデナイトでは、吸着したジクロロメタンが真空排気によって完全には脱離しないことを ^{13}C , ^1H MAS NMR の観測によって見出した。本研究では、固体NMRを用いてジクロロメタン分子の吸着状態について検討したので報告する。

〈実験〉

モルデナイトは、触媒学会参照触媒委員会から提供されたJRC-Z-HM10, -15, -20を用いた。酸点の影響を検討するためにH型モルデナイトとした。合成時における $\text{SiO}_2/\text{Al}_2\text{O}_3$ のモル比が各々、10, 15, 20となっている。残留している NH_4^+ イオンを除くためにあらかじめ 535°C で焼成をした。比較のために、H型YゼオライトであるJRC-Z-HY5.6も用いた。空气中、 400°C で乾燥後、バイアル瓶に入れ密閉した。その後、既知量の CH_2Cl_2 をマイクロシリンジで加えた。その状態で、3日間放置した後、ロータリーポンプで真空引きして吸着していない CH_2Cl_2 を除去した。これらの操作は窒素ガス雰囲気下で行い、MASローターへの試料の充填も窒素ガス雰囲気下で行った。

^{13}C , ^1H magic-angle-spinning (MAS) NMR はBruker MSL-400 (共鳴周波数: ^{13}C 100.61 MHz, ^1H 400.13 MHz) を用いて室温で測定した。Bruker MAS プローブヘッドで、外径4.0mmのジルコニアローターを使用し、パルス系列は通常のシングルパルスを使用した。 ^{13}C 測定では ^1H デカップリングを行った。 ^{13}C , ^1H のスペクトルは、100%テトラメチルシラン(TMS)を基準として表示した。

固体NMR, ゼオライト, 吸着

○こじまなつこ, はやししげのぶ

〈結果と考察〉

ゼオライトに CH_2Cl_2 を吸着させ真空排気した後に測定した ^1H MAS NMRスペクトルを図1に示した。HM10, HM15, HM20では、5.4 ppmにシャープなシグナルが観測された。モルデナイトでは他に、1.8 ppmと8.9 ppmに比較的シャープなシグナルがあり、さらに、5 ppm付近を中心とした非常にブロードなシグナルが観測された。1.8 ppmは孤立した Si-OH 、8.9 ppmは水素結合した $\text{Si-OH}\cdots\text{O-Si}$ 、5 ppmのブロードなシグナルはブレンステッド酸点 Si-OH-Al に帰属され、いずれも CH_2Cl_2 を吸着させる前から存在していたシグナルである。一方、5.4 ppmのシグナルは、 CH_2Cl_2 (100%) の化学シフト値5.443 ppmと一致しており、真空排気した後も残留した吸着 CH_2Cl_2 分子に帰属される。ブレンステッド酸点の量が $\text{HM10} > \text{HM15} > \text{HM20}$ であることを考えると、5.4 ppmのシグナル強度から吸着 CH_2Cl_2 分子量は $\text{HM10} > \text{HM15} > \text{HM20}$ の順となる。

一方、HYでは、4.7 ppmを中心とした比較的ブロードなシグナルのみ観測された。このシグナルはブレンステッド酸点 Si-OH-Al に帰属される。吸着 CH_2Cl_2 分子に由来するシグナルは観測されなかった。

水が吸着していても5 ppm付近にシグナルを示すので、 ^{13}C MAS NMRスペクトルを測定して、吸着 CH_2Cl_2 分子の有無を確認した。図2に、 ^{13}C MAS NMRスペクトルを示した。HM10, HM15, HM20いずれも54 ppmにシグナルが観測された。 CH_2Cl_2 (100%) の化学シフト値54.548 ppmと一致しており、吸着 CH_2Cl_2 分子の存在が確認できた。一方、HYではシグナルが全く観測されず、真空排気により CH_2Cl_2 がすべて無くなったことが確認された。

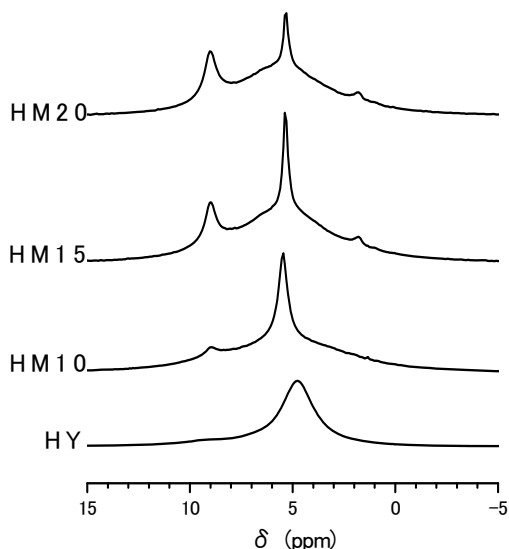


Figure 1. ^1H MAS NMR spectra of H-type mordenites and HY after CH_2Cl_2 adsorption followed by evacuation.

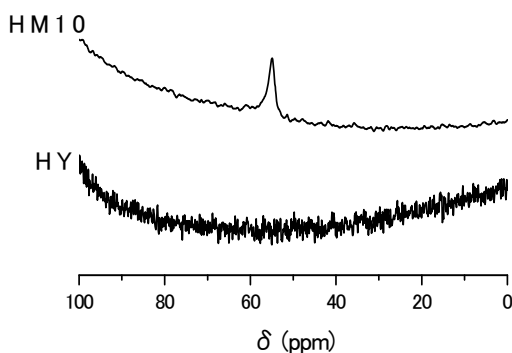


Figure 2. ^{13}C MAS NMR spectra of HM10 and HY after CH_2Cl_2 adsorption followed by evacuation.

^{11}B - ^{11}B 2次元MAS NMRによる ボロシリケートガラスの構造解析

○村上美和¹, 清水禎¹, 丹所正孝¹, 赤井智子², 矢澤哲夫³
物質・材料研究機構¹, 産業技術総合研究所²,
兵庫県立大学³

^{11}B - ^{11}B 2D MAS NMR studies on borosilicate glass

○M. Murakami¹, T. Shimizu¹, M. Tansho¹, Tomoko Akai², Tetsuo Yazawa³

¹National Institute for Materials Science,

²National Institute of Advanced Industrial Science and Technology,

³University of Hyogo

To study micro-structure of Na_2O - B_2O_3 - SiO_2 - Al_2O_3 glass, which is a starting material for preparing porous glass, ^{29}Si , ^{23}Na , ^{27}Al , and ^{11}B one-dimensional (1D) magic-angle spinning (MAS) spectra and result of two-dimensional (2D) ^{11}B - ^{11}B homonuclear correlation experiment under MAS are examined at 21.8 T. We conclude that two of the four peaks observed for ^{11}B are assigned to borate rings, which we assign to as the main components in the boron-rich phase to be removed by acid leaching.

Phase separation of alkali borosilicate glass is the most important process in preparing porous glass.^{1,2} So far numerous studies on the phase separation using various spectroscopic means such as X-ray, Raman, and NMR have been done. In this work, we report our recent results using high-resolution one- and two-dimensional NMR experiment on Al-added borosilicate glass.

In Figure 1, we compare ^{29}Si , ^{23}Na , ^{27}Al , and ^{11}B one-dimensional (1D) MAS spectra. Except for the ^{11}B spectrum, the spectra consist of a broad characterless peak. For ^{29}Si , its chemical shift value indicates most of Si exists as tetrahedrally coordinated Si. Similarly most of Al is assigned to tetrahedral one. The observed simple spectrum for ^{23}Na is an expected one because Na exists as a positive ion near the four coordinated Al/B in the glass matrix. On the other hand, ^{11}B exhibits at least two groups of signals. From their chemical shift values, the signal at around 0 ppm is ascribed to the tetrahedrally coordinated boron and those at 10-20 ppm are the trigonally coordinated one.

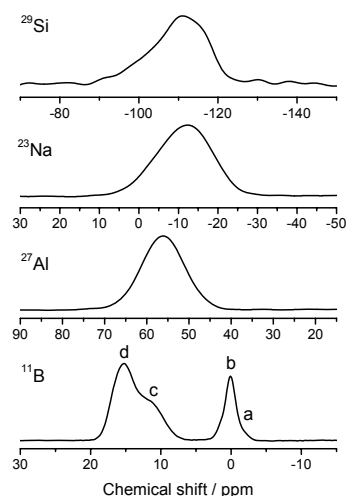


Figure 1. ^{29}Si , ^{23}Na , ^{27}Al , and ^{11}B MAS spectra of Al_2O_3 -added sodium borosilicate glass. ^{29}Si spectrum was taken at 11.7 T and the other spectra were taken at 21.8 T.

固体NMR、無機ガラス構造、二次元相関NMR

○むらかみみわ, しみずただし, たんしょまさたか, あかいともこ, やざわてつお

So far, it has been proposed that there are mainly four ^{11}B signals in a MAS spectrum of alkali-borosilicate glass; (a) tetrahedral boron surrounded by $-\text{O}-\text{Si}-$ (hereafter, $\text{B}(4,0\text{B})$), (b) tetrahedral boron with one of the four coordination is to $-\text{O}-\text{B}-$ ($\text{B}(4,1\text{B})$), (c) trigonal boron in a ring structure ($\text{B}(3,\text{r})$), and (d) trigonal boron in a non-ring structure ($\text{B}(3,\text{nr})$).³ Indeed the observed 1D MAS spectrum follow the assignment; the letter-a to -d in Figure 1 are drawn following the abovementioned assignment. The question is then what is the ring/non-ring boron? How they are related/connected with each other and/or with the tetrahedral borons? To answer these questions, we undertook two-dimensional (2D) $^{11}\text{B}-^{11}\text{B}$ homonuclear correlation experiment using the conventional three 90° pulses sequence (Figure 2).⁴

Figure 3 is the observed 2D $^{11}\text{B}-^{11}\text{B}$ homonuclear correlation spectrum with a mixing time of 2 s. Strong cross peaks are observed between peak-b and peak-d, indicating the existence of a local structure of $-\text{B}(4,1\text{B})-\text{O}-\text{B}(3,\text{r})-$. The large intensity of the cross peak also indicates that most of $\text{B}(4,1\text{B})$ and $\text{B}(3,\text{r})$ forms such local structure. This leads us to conclude that these borons exist as borate structures (Figure 4a) in the borosilicate glass. $\text{B}(3,\text{r})$ is also included in the boroxol ring (Figure 4b).

In the poster, we shall also present lineshape analysis of the ^{11}B lineshape taking the second-order quadrupolar interaction into account.

References

- (1) Yazawa, T. *Key Eng. Mater.* **1996**, *15*, 125.
- (2) Yazawa, T. *Porous Ceram. Mater.* **1996**, *115*, 125-146.
- (3) Du, L. S.; Stebbins, J. F. *Chem. Mater.* **2003**, *15*, 3913-3921.
- (4) Jeener, J.; Meier, B.H.; Bachmann, P.; Ernst, R. R. *J. Chem. Phys.* **1979**, *71*, 4546.

Acknowledgement

This work was also supported in part by Grant-in-Aid for Science Research (C) (Grant No. 21550028) from the Japan Society for the Promotion of Science.

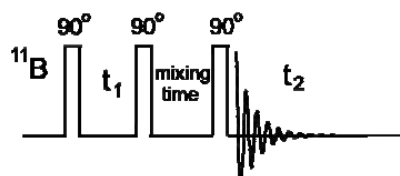


Figure 2. Pulse sequence for 2D homonuclear correlation experiment.

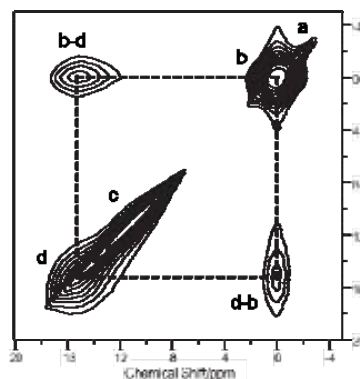


Figure 3. Observed 2D $^{11}\text{B}-^{11}\text{B}$ homonuclear correlation spectrum with a mixing time of 2 s.

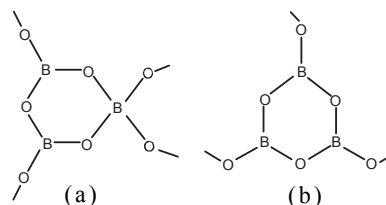


Figure 4. Two examples for ring structures. (a) triborate and (b) boroxol.

バナジウム重水素化物の相構造および重水素の存在状態

○鈴木 陽、林 繁信

産業技術総合研究所 計測フロンティア研究部門

Phase structures and states of deuterium in vanadium deuterides

○You Suzuki, Shigenobu Hayashi

Research institute of instrumentation frontier, National institute of advanced industrial science and technology (AIST)

Vanadium (V) metal can absorb a large amount of hydrogen to the extent of a hydrogen-to-metal atomic ratio of 2. The structures and phase diagrams of vanadium hydrides have extensively been studied so far, including vanadium deuterides. The crystal structure and deuterium site are dependent on the D concentration, and there are three phases denoted α_D , β_D and α'_D in the VD_x system ($0 < x < 1$) at room temperature. The phase diagram around $x = 0.5$ is complex because of the presence of α_D , β_D and α'_D phases. Nuclear magnetic resonance (NMR) is useful to study deuterium and vanadium in metal deuterides. In the present work, we have studied the phase structure and deuterium site in the VD_x system ($0.4 \leq x \leq 0.6$) at room temperature using 2H MAS NMR and ^{51}V NMR.

[序] バナジウム金属は重水素ガスと反応し、安定な重水素化物を形成する。室温付近においてバナジウム重水素化物(VD_x)は重水素濃度の増加につれて α_D 相, β_D 相, α'_D 相の 3 つの相を持つことが知られている。これらの相においてバナジウムが形成する格子の構造はそれぞれ体心立方、体心正方、体心立方であり、重水素が吸蔵されるサイトは 4 配位、6 配位、4 配位である。室温付近において α_D 相, β_D 相, α'_D 相の 3 つの相が存在するため、 VD_x は $0.4 \leq x \leq 0.6$ において複雑な相図を示す。固体 NMR は水素や重水素などを直接観測することができ、局所構造や水素の運動性に関する情報を得ることのできる有用な方法である。本研究では、バナジウム重水素化物における相構造や重水素のサイト、運動性について 2H および ^{51}V NMR スペクトルを測定して調べたので報告する。

[実験] 試料はバナジウム金属の粉末と重水素ガスを反応させて合成し、重水素含有量は吸蔵された重水素ガスの体積から決定した。 2H および ^{51}V NMR の測定には Bruker ASX400 (共鳴周波数 2H 61.42 MHz, ^{51}V 105MHz)を用いた。 ^{51}V NMR スペクトルは静止試料について四極エコー法を用い測定した。 ^{51}V は非常に Knight シフトが大きく非常に広い線幅を持つことから、観測周波数を変え複数回測定し、その包絡線を計算することで ^{51}V NMR スペクトルの正しい線形を得た。 2H NMR スペクトルの測定は、試料を外径 2.5 mm のジルコニアローターに充填し、マジック角回転(MAS)を 15 kHzで行った。通常のシングルパルス法で測定を行った。また、選択的反転回復法 ($\pi/2 - \tau - \pi/2 - T_d - \pi/2$)を用いて、 2H シグナル間の相互作用の有無を調べた。

金属水素化物 (Metal hydrides), ^{51}V NMR, 2H NMR

○すずき よう, はやし しげのぶ

[結果と考察] Fig. 1に ^{51}V NMRスペクトルを示す。それぞれのスペクトルを数本のピークに波形分離し、それぞれのピークを α_{D} 相、 β_{D} 相、 α'_{D} 相に帰属した。VD_{0.40}では5250 ppmおよび6260 ppmの2つのピークが存在し、重水素含有量からそれぞれ α_{D} 相、 β_{D} 相のピークであると考えられる。VD_{0.50}では α_{D} 相に相当する5390 ppmのピークが減少し、6470 ppmの β_{D} 相のピークが増加した。また、6670 ppmに α'_{D} 相ピークが存在した。VD_{0.57}では6760 ppmの α'_{D} 相のピークが大部分を占めており、6470 ppmに少量の β_{D} 相のピークが観測された。それぞれのスペクトルについて α_{D} 相、 β_{D} 相、 α'_{D} 相の割合をTable 1に示す。

Table 1. The fraction of each phase in VD_x ($0.4 \leq x \leq 0.6$) at room temperature.

	α_{D}	β_{D}	α'_{D}
VD _{0.40}	0.20	0.80	—
VD _{0.50}	0.09	0.82	0.09
VD _{0.57}	—	0.17	0.83

VD_{0.50}の ^2H MAS NMRスペクトルをFig. 2に示す。VD_{0.50}では-44 ppmと-36 ppmに β_{D} 相と α'_{D} 相のピークが存在した。 β_{D} 相のピークは線幅が広く複数のスピニングサイドバンドを持つのにに対し、 α'_{D} 相のピークは線幅が狭くスピニングサイドバンドを持たない。これは、2つの相における重水素の運動性の違いを表わしている。-44 ppmと-36 ppmのシグナルが同じ相内の異なるサイトに存在する重水素である可能性もあるため、2つのシグナル間で重水素の交換もしくはスピン拡散が起こっているかを選択的反転回復法の測定によって調べた。中央のピークでは-44 ppmと-36 ppmのピーク間が8 ppmと近接しているため選択的反転を行うことが難しい。そこで、-44 ppmのピークにのみ観測されているスピニングサイドバンドを反転するように τ を調整した。また、反転後の遅延時間 T_{d} はMASの回転周期に同調するように調整した。その結果、-44 ppmのピークではスピン-格子緩和時間に比べ早い磁化の回復が観測された。これは、拡散運動によって選択的反転で生じた磁化が移動したことを示している。-36 ppmのピークでは磁化の回復に大きな変化は認められなかった。このことから、-44 ppmと-36 ppmのシグナル間で重水素の交換もしくはスピン拡散は観測されず、異なる相と帰属することが妥当である。

[謝辞] 本研究はNEDO 水素貯蔵材料先端基盤研究事業(HYDRO☆STAR)の下で行われた。

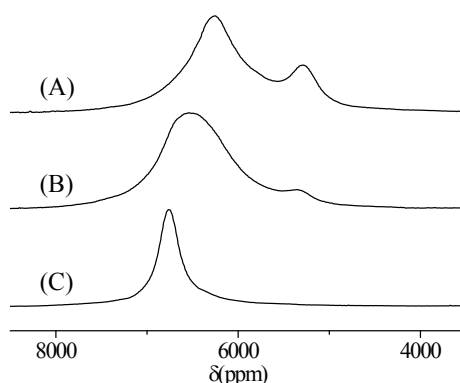


Fig. 1. ^{51}V NMR spectra of VD_x, referenced to the signal of VOCl₃. (A) $x = 0.40$, (B) $x = 0.50$, and (C) $x = 0.57$.

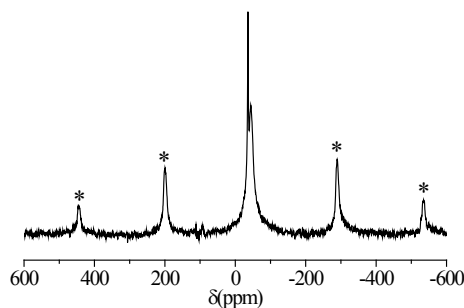


Fig. 2. A ^2H MAS NMR spectrum of VD_{0.50}, referenced to the signal of D₂O. The marks * indicate spinning side bands.

固体 NMR 法による含フッ素化合物/ シクロデキストリン包接錯体の構造解析

○小糸祐介¹, 龍野宏人¹, 山田和彦¹, 安藤慎治¹

¹東工大院理工

Structural Analysis of Fluoro-containing Compounds/ β -cyclodextrin Inclusion Complexes by Solid-state NMR

Yusuke Koito¹, Hiroto Tatsuno¹, Kazuhiko Yamada¹, Shinji Ando¹

¹Department of Chemistry & Materials Science, Tokyo Institute of Technology

The conformational changes of fluoro-containing compound (HFE)/ β -CD inclusion complex (IC) were investigated at elevated temperatures by solid-state ^{19}F MAS NMR. The broad ^{19}F peaks of HFE/ β -CD were shifted to higher frequencies by 2~4 ppm compared to those of the neat condition. Thermal gravimetric analysis of the ICs showed little weight loss below the decomposition temp. of β -CD (300°C) which is much higher than the b.p. of HFE (131°C). The NMR spectral shapes and peak intensities of the ICs were dramatically changed at high-temperature region. In particular, a new peak assignable to the terminal $-\text{CF}_3$ appeared on the high frequency side above 140°C, though it was gradually returned to the lower frequency side after 50 h. The structural transition between the meta-stable state at 150°C and the original state at 20°C is reversible to some extent.

(緒言)シクロデキストリン(CD)は疎水性の空孔に多様な化合物を包接し、包接錯体(Inclusion Complex: IC)を形成することが可能であり、ゲスト分子の耐熱性向上や揮発性抑制などに効果的である [2]。例えば、CD に包接された多くのゲスト化合物は、単体の沸点では蒸発せず、CD の熱分解温度である 300°C 付近まで形態が維持される[3]。このような現象にはホスト-ゲスト間に働く強い相互作用が関与していると考えられることから、室温／高温領域におけるゲスト分子の構造・運動性変化を固体 ^{19}F MAS NMR により解析した。

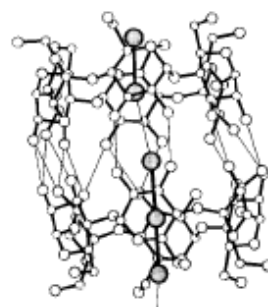


Fig.1 Schematic structure of CD complex [1].

β -cyclodextrin, Solid-state NMR, Inclusion complex

○こいとゆうすけ, たつのひろと, やまだかずひこ, あんどうしんじ

(実験) 本研究ではゲスト分子としてハイドロフルオロエーテル(HFE; 住友 3M (NOVEC7600))を用いた。 β -CD の飽和水溶液にゲスト分子を滴下後、72h 強制的に攪拌し生じた白色沈殿を洗浄して β -CD・IC 試料とした。元素分析(C/F 分率)の結果から HFE/ β -CD・IC はホスト:ゲスト=2:1 の IC を形成していることが示された。

(結果・考察) 温度可変固体 ^{19}F MAS NMR を用いて室温～高温状態におけるゲスト分子の構造・運動性を選択的に観察した結果、 120°C 以下ではスペクトルに大きな変化は生じなかったが、 140°C において高周波数側に新たな信号が観察された (Fig.3)。この信号は末端 $-\text{CF}_3(2)$ に起因すると考えられ、加熱過程による HFE 両末端 $-\text{CF}_3$ 基の挙動が異なることが確認された。われわれは $\text{C}_9\text{F}_{20}/\beta\text{-CD}\cdot\text{IC}$ における C_9F_{20} ゲストの一部が 80°C で β -CD 空孔外に露出することを見出している[4]。ホスト-ゲスト間に働く拘束力がゲスト分子の形態に応じて異なるため昇温過程の構造変化に差が生じたと推測される。

さらに熱処理後の HFE/ β -CD・IC の経時変化を固体 ^{19}F MAS NMR により観察したところ、昇温時に顕著な変化を示した $-\text{CF}_3(2)$ の信号が、再び低周波数の信号 $-\text{CF}_3(2')$ に移行する過程が確認された。高温での構造は準安定状態であり、徐々に最安定な初期状態に近付いたと考えられ、この過程には十時間～数日かかることから、ゲストはホストから比較的強い拘束力を受けていると推定される。熱処理前後で見られる $-\text{CF}_3(2)$ の化学シフト変化の理由については検討中だが、ゲスト分子のコンホメーション変化に由来すると考えられる。

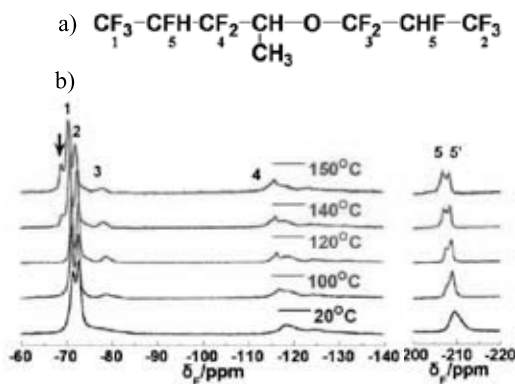


Fig2. a) Molecular structure of HFE, and b) variable temperature ^{19}F MAS NMR spectra of HFE/ β -CD IC.

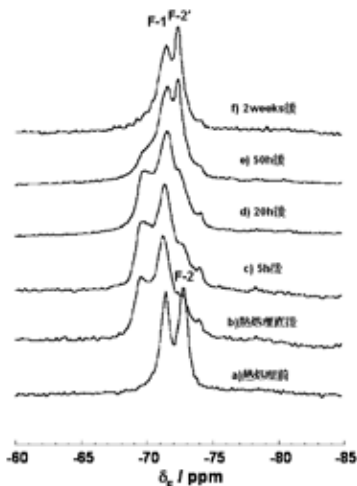


Fig. 3 ^{19}F MAS NMR spectra of HFE/ β -CD IC at various conditions; a) initial state, b) 5h c) 20h d) 50h, and e) 2weeks after annealing at 140°C .

[1] K.Harata, *Chem.Rev.*, **98**, 1803 (1998).

[2] D.Mentzafos, I.M.Mavridis, G.Le Bas, G.Tsoucais, *Acta. Crystallor. Sect. B*, **47**, 746(1991)

[3] E.J. Wang, Z.X. Lian, J. Cai, *Carbohydr. Res.*, **342**, 767 (2007).

[4] H. Tatsuno, S. Ando, *J. Phys. Chem. B*, **110**, 25751 (2006).

CAST/CNMRシステムと合成による天然有機化合物の構造訂正

○越野広雪¹, 叶 躍奇¹, 高橋俊哉¹, 佐藤寛子²

¹独立行政法人理化学研究所

²国立情報学研究所

Structural Revision of Natural Products by Synthesis and Application of the CAST/CNMR System

○Hiroyuki Koshino¹, Yue Qi Ye¹, Shunya Takahashi¹, and Hiroko Satoh²

¹RIKEN, Wako, Japan.

²National Institute of Informatics, Tokyo, Japan.

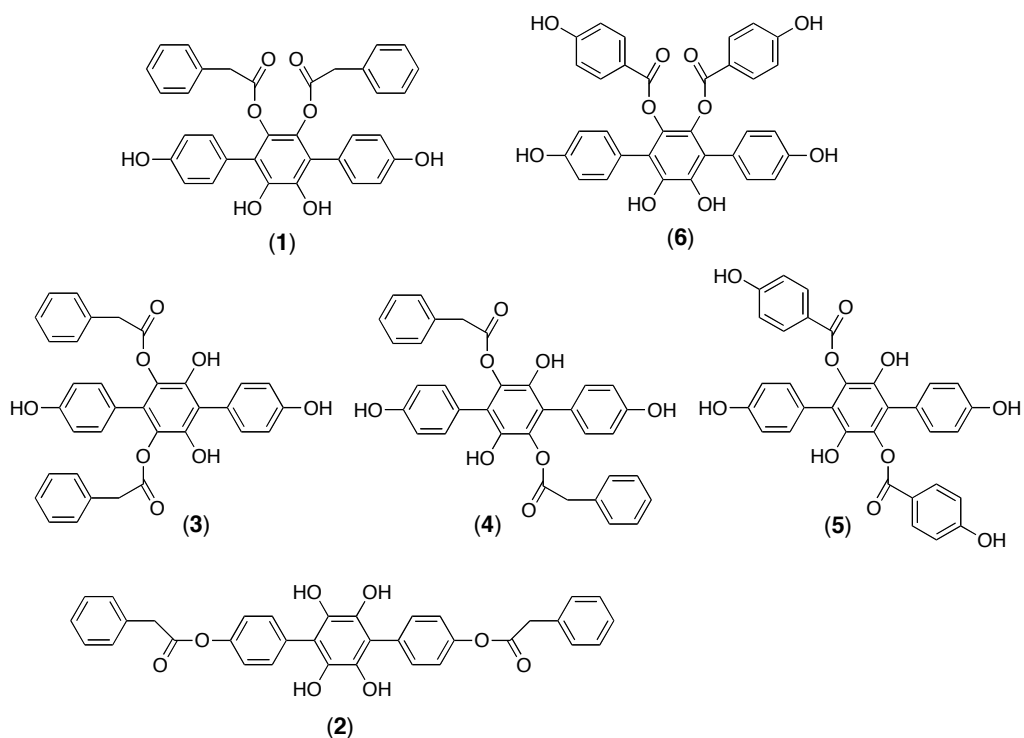
We report structural revision of a series of p-terphenyl natural products by synthesis and NMR study with the help of a CAST/CNMR system, a program code for ¹³C-NMR chemical shift prediction using a chemical shift-structure database. We synthesized the originally proposed structure of thelephantin G and its NMR data did not match with that of reported. Based on the NMR data, we could propose the revised structure for thelephantin G, and its structure was confirmed by total synthesis. Besides, the structures of thelephantins A-F, J, and N, thelephorin A, and curtisian M-Q with p-hydroquinone diesters like ganbajunin E are suspected to be wrong, and p-hydroquinone diester substitutions in the most of these p-terphenyls are supposed to correct to a catechol type ortho diesters like thelephantin G.

CAST/CNMRシステムは独自に開発したCASTコードを利用した立体化学を的確に考慮できることを特徴とするデータベースに基づいた¹³C-NMR化学シフト精密予測システムである¹⁻⁶。データベースに登録されるデータの質は予測データに影響を与えるので、十分に評価して登録しているが、その過程で帰属あるいは構造の間違いがしばしば見つかっており⁷, これまでにモデル化合物の合成研究およびNMRデータの解析による一連の構造訂正も報告してきた⁸。高度に酸化されたp-テルフェニル骨格を有する天然有機化合物はキノコなどの代謝産物として数多く報告されているが^{9,10}, 最近我々が構造決定したvialinin A(**1**)に関しても、その合成研究によって構造を確認すると同時に、アシル基の置換位置に関する異性体であるganbajunin C(**2**)の提案構造が間違いであることを明らかにした¹¹。Vialinin Aの異性体であるganbajunin D(**3**)およびE(**4**)はアシル基が容易に転移するために分離困難な混合物として存在するが、それらのNMRデータを比較した結果、置換基の位置の決定は¹³C-NMRの化学シフト値の比較により充分可能であることを見いだした。さらに、ganbajunin Eのアシル基がp-ヒドロキシ安息香酸になっている構造が提案されていたthelephantin Gの提案構造(**5**)はvialinin Aと同じようにアシル基がパラ位ではなくオルト位に置換している構造(**6**)に訂正されることを化学合成によって証明した¹²。さらに、合成化学的に構造確認した化合物のNMRデータに基づき、報告されている同族体, thelephantin A-F, J, N¹³⁻¹⁵,

CAST/CNMR, p-テルフェニル, 構造訂正

○こしのひろゆき, ようやくき, たかはししゅんや, さとうひろこ

thelephorin A¹⁶, curtisian M-Q¹⁷などのNMRデータに関しても, CAST/CNMRシステムを利用して構造決定に関する再評価を行った結果, 多くのp-ヒドロキノン型の化合物はvialinin Aと同様なカテコール型である事が示唆された¹².



参考文献

- 1) H. Satoh et al, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2000**, 40, 622-630.
- 2) H. Satoh et al, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2001**, 41, 1106-1112.
- 3) H. Satoh et al, *J. Comput. Aided Chem.* **2002**, 3, 48-55.
- 4) H. Satoh et al, *Tetrahedron* **2003**, 59, 4539-4547.
- 5) H. Satoh et al, *Tetrahedron* **2005**, 61, 7431-7437.
- 6) S. Koichi et al, *J. Chem. Inf. Model.* **2007**, 47, 1734-1746.
- 7) H. Koshino et al, *Tetrahedron Lett.* **2006**, 47, 4623-4626.
- 8) S. Takahashi et al, *J. Org. Chem.* **2007**, 72, 4578-4581.
- 9) C. Xie et al, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2005**, 69, 2326-2332.
- 10) C. Xie et al, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, 16, 5424-5426.
- 11) Y. Q. Ye et al, *Org. Lett.*, **2007**, 9, 4131-4134.
- 12) Y. Q. Ye et al, *J. Org. Chem.* **2009**, 74, 4642-4645.
- 13) D. N. Quang et al, *Phytochemistry* **2003**, 62, 109-113.
- 14) D. N. Quang et al, *Phytochemistry* **2003**, 63, 919-924.
- 15) D. N. Quang et al, *Phytochemistry* **2004**, 65, 1179-1184.
- 16) S. Takamoto et al, *Tetrahedron* **2002**, 58, 1103-1105.
- 17) D. N. Quang et al, *Chem. Pharm. Bull.* **2003**, 51, 1064-1067.

Diffusion behavior of water in sulfonated block copolymers

○Takahiro Ohkubo, Tavernier Bruno, Koh Kidena and Akihiro Ohira

Polymer Electrolyte Fuel Cell Cutting-Edge Research Center, Advanced Industrial Science and Technology, Tokyo, Japan.

The longitudinal and transverse relaxation time and diffusion order 2D ^1H NMR spectra of water in sulfonated block copolymer for fuel cells were estimated by use of inverse laplace treatment (CONTIN method). The water with different state around sulfonated acid group or not, which correspond to slow and fast diffusion coefficients, can be identified from 2D NMR spectra.

緒言

燃料電池を構成する要素の中で、電解質膜は、プロトンや水を透過させる機能を持ち、高いプロトン電導性が求められている。プロトン伝導は、水チャンネルと呼ばれる高分子中の親水部を介して起こることから、その中で水の動的特性や水チャンネルのモルフォロジーに関する研究が、これまで多数報告されている。近年、新しい材料開発の試みとして疎水鎖と親水鎖によるブロック化により水チャンネルの高次構造を制御したブロックコポリマー開発が行われている。これらブロックコポリマーの構造は、散乱実験によってキャラクタリゼーションされるが、プロトン伝導の担い手となる水そのものの解析についてはほとんど行われていない。そこで本研究では、高いプロトン伝導性を示す代表的なブロックコポリマー

poly(styrenesulfonate-methylbutylene) (PSS-PMB)を対象とし、水のキャラクタリゼーションのために緩和と拡散を利用した ^1H NMR により解析を行ったので報告する。

実験

Polymer Source から購入した PSS-PMB を THF により融かし、溶媒キャスト法により厚さ $50\mu\text{m}$ の膜を作成した。得られた膜を真空下 40°C にて脱水処理を行い、 $4\text{mm} \times 5\text{mm}$ の短冊状にカットし NMR 管に充填した。含水は、膜の入った NMR 管のまま調湿チャンバーにて $50\%\text{RH}(40^\circ\text{C})$ の条件で行い、NMR 測定中の含水率変化を抑制するために、NMR 管の膜以外のデッドボリュームをテフロンロッドで塞いだ。

NMR 測定は、ECA500(11.7T)で行った。測定は、Inversion-recovery (IR)、Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG)による T_1 , T_2 測定および Bipolar-gradient-pulse pair

拡散、ブロック共重合体、モルフォロジー

○おおくぼ たかひろ, たべるにえ ぶる一の, きでな こう, おおひら あきひろ

longitudinal eddy current delay(BPPLED)による拡散測定を行った。本研究では、CONTIN法を組み込んだ自作プログラムにより逆ラプラス処理を行い、周波数ドメイン(横軸)と T_1 , T_2 および拡散ドメイン(縦軸)による 2 次元スペクトルを得た。

結果

T_1 , T_2 そして拡散係数を縦軸にした 2 次元スペクトルを図 2 に示す。ケミカルシフトの注意は、払っていない。まず T_1 order のスペクトルにおいて、低磁場側(3.6kH)に 2 つの縦緩和時間 420ms および 39ms を中心に持つピーク(A1, A2)が観測された。また幅広の高磁場側のピーク(C)中心は、430s の縦緩和時間であった。低磁場側ピークの 2 つの縦緩和時間は、横緩和時間のスペクトルでも観測され、ピーク中心は、それぞれ 6.7ms および 0.19ms であった。また、高磁場側ピーク(C)の中心は、3.1ms である。低磁場側へのシフトは、主に SO_3H との交換によるシフトと考えられ、2 種の緩和時間については、NMR のタイムスケールで交換できない空隙に存在する水と考えられる。また、各ピーク中心の T_2/T_1 比を計算すると、A1:0.016, A2:0.0049, C:0.0072 であった。緩和時間のタイムスケールと比較して、 $\text{SO}_3\text{H}-\text{H}_2\text{O}$ の早い交換を仮定すると、 T_2/T_1 の比が小さい A2 および C ピークに相当するプロトンは、高分子表面での吸着により長い滞留時間を有している水由来と考えられる。拡散オーダーのスペクトルは、低磁場側から 1.4×10^{-11} 、 1.3×10^{-12} および $1.0 \times 10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$ をピーク中心に持つピークが観測された。緩和時間で観測された A2 ピークは、短い T_2 のため、拡散オーダーの測定では、観測できていないと考えられる。A ピークは、 10^{-11} オーダの拡散係数を有しており、スルホン酸基周りの親水部に存在し水チャンネル内を拡散している水と考えられる。一方、高磁場側のピークは、 10^{-12} オーダの拡散係数であり、高分子内の疎水部に存在する水が自由に拡散できないため、 10^{-12} オーダの遅い拡散係数を有していると考えられる。

以上、緩和時間と拡散係数を利用した 2 次元スペクトルにより、複数の水を識別し、プロトン伝導に関係する運動性を評価することが可能であった。発表では、 T_1 - T_2 および T_1 -D の結果についても報告する予定である。

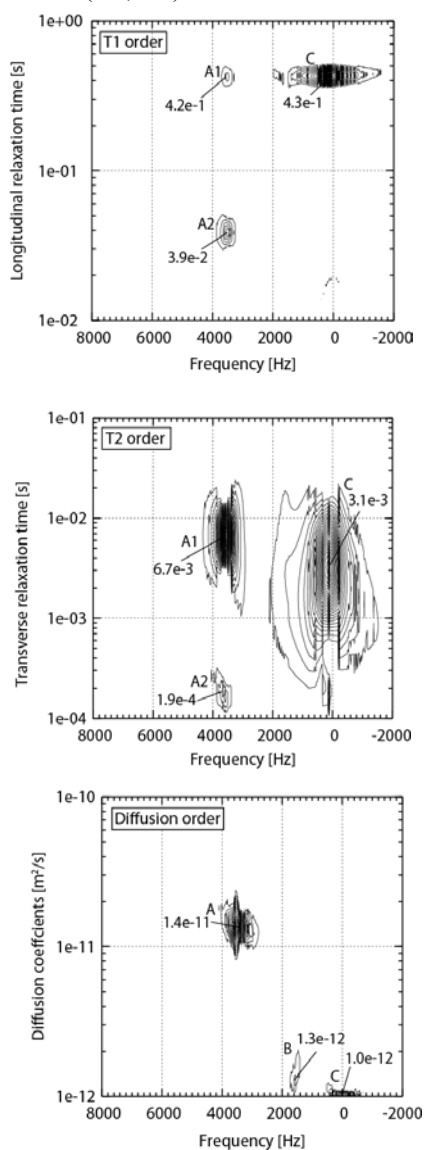


Fig. 2 Longitudinal, transverse relaxation time and diffusion order 2D NMR spectra of water in PSS-PMB

カルシウムアルミノシリケートの ^{27}Al NMR —融体構造の温度依存性—

○金橋康二¹, Jonathan F. Stebbins²

¹新日鐵先端研

²スタンフォード大学

Temperature Effects on Melt Structure of Calcium Aluminosilicates by using ^{27}Al NMR

○Koji Kanehashi¹, Jonathan F. Stebbins²

¹Advanced Technology Research Laboratories, Nippon Steel Corporation

²Dept. of Geological and Environmental Sciences, Stanford University

Structural changes with increasing temperature are important to understand the correlation with macroscopic properties such as viscous flow of most aluminosilicate melts, but remain much less well characterized in general. In this study, we determine temperature effects on melt structure of calcium aluminosilicates experimentally by investigating glass samples prepared with varying cooling rates and in situ methods. The content of five-coordinated aluminum increases with cooling rates and thus with fictive temperature, which is agreement with in situ high temperature NMR data. Five-coordinated aluminum is considered the intermediate of configurational changes of MO_4 (M=Si, Al) tetrahedra.

スラグやパウダーの高温熔融状態での構造の温度依存性を明らかにすることは、粘性等の高温物性を理解するために重要である。その方法として、(1) 冷却速度を変化させて作成したガラスの構造を調べる、(2) in situ な手法で融体の構造を調べる、の2通りが考えられる。今回、我々はNMRを用い、 $\text{CaO-Al}_2\text{O}_3\text{-SiO}_2$ 系の試料におけるAlの融体構造の温度依存性について検討した[1]。

実験で用いたサンプルをTable 1に示す。所定の組成比となるように酸化物を混合し、熔融、急冷させた(Water quench)。仮想温度(T_f)を変化させるために、徐冷(Slow cooled)および超急冷(Fast quench)させた試料を作成した。

ガラスの1D ^{27}Al MAS NMRの測定には、Varian Unity/Inova分光計(18.8 T)を用いた。試料回転周波数は20 kHzとし、フリップ角は固体に対して 30° に設定した。 ^{27}Al 3QMAS NMRの測定には、Varian Unity/Inova分光計

^{27}Al NMR, カルシウムアルミノシリケート, ガラス・融体

○かねはしこうじ, じょなさん・えふ・すてびんず

(14.1 T) を用い、shifted-echoパルスシーケンスを採用した。高温in situ ^{27}Al NMRの測定条件は、既報[2]に従った。 ^{27}Al NMRの化学シフト基準は、 $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 水溶液を 0 ppmとした。

Table 1 Nominal & analyzed compositions, estimated quench rates, and calculated fictive temperatures of CAS glasses

Sample		Nominal composition (mol %)			Analyzed composition (mol %)			Cooling rate (K/s)	Tf (K)
		Al_2O_3	SiO_2	CaO	Al_2O_3	SiO_2	CaO		
CAS25.50	Slow cooled	25	50	25	25.4	49.6	25.0	$1 \pm 0.03 \times 10^{-1}$	1110 ± 5
	Fast quench	25	50	25	25.3	50.1	24.6	$2 \pm 1 \times 10^4$	1260 ± 20
CAS10.60	Slow cooled	10	60	30	10.1	60.3	29.6	$1 \pm 0.03 \times 10^{-1}$	1060 ± 5
	Fast quench	10	60	30	10.1	60.3	29.6	$8 \pm 4 \times 10^3$	1290 ± 20
CAS13.44	Slow cooled	12.5	44.4	43.1	12.6	44.5	42.9	$1 \pm 0.03 \times 10^{-1}$	1065 ± 5
	Water quench	12.5	44.4	43.1	-	-	-	$1 \pm 0.5 \times 10^2$	1105 ± 10
	Fast quench	12.5	44.4	43.1	12.7	44.4	42.9	$10 \pm 5 \times 10^4$	1140 ± 20

CAS13.44ガラスの ^{27}Al MASスペクトルをFig. 1に示す。メインの4配位型 Al (^4Al) の他に、低周波数側に5配位型 (^5Al) に相当するピークを観測され、冷却速度が増加、すなわち T_f が増加するに従い、 ^5Al の存在比率が増加した。また、 ^4Al のピークがやや広幅となっていることから、温度上昇に伴い、AlおよびSiの配列の無秩序化が進んでいると推測される。

Fig. 2に ^5Al の存在比率の温度依存性を示す。 $^4\text{Al} \rightleftharpoons ^5\text{Al}$ の単純な反応を考えた場合、 ΔH と活量係数が一定だとすれば $\log_{10}(^5\text{Al}/^4\text{Al})$ と $1/T$ の間には直線関係が得られるはずである。CAS13.44においては、1400℃における溶融状態において、化学シフト値および熱膨張の効果を考慮すると、24 %程度の ^5Al の存在が見積もられ、その値はガラス試料から得られたFig. 2中の直線を外挿した値と比較的近い値を示した。一方、Siの配位数は T_f が上昇しても変化しないことから、分子の再配列に必要なイオン間の結合・切断がAl周辺で容易に起こりやすくなっていると考えられる。以上の結果から、 ^5Al の存在は分子の流動が起こる際の間mediateとして存在しており、温度が上昇するに従い、その存在量が増加するため、粘性が低下していくと考えられる。

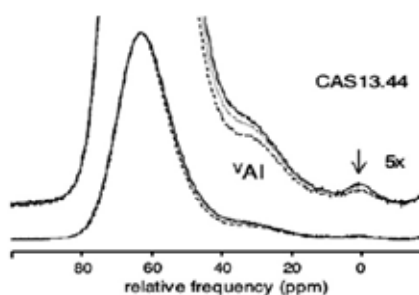


Fig.1 ^{27}Al MAS NMR spectra for CAS13.44. Solid line: fast quench, dotted line: water quench, dashed line: slow cooled.

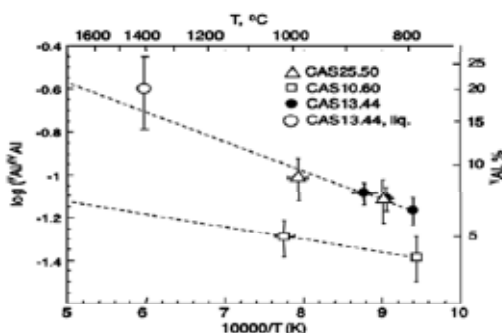


Fig.2 Relationship between the $\log_{10}$ of the $^5\text{Al}/^4\text{Al}$ ratio and inverse temperature for the glass and/or melt samples.

文献

- [1] J. F. Stebbins, E. V. Dubinsky, K. Kanehashi, K. E. Kelsey: *Geochim. Cosmochim. Acta*, **72** (2008), 910.
 [2] K. Kanehashi, J. F. Stebbins: *J. Non-Cryst. Solids*, **353** (2007), 4001.

Chemical structure analysis of trace amount of boron in coals

○Takafumi Takahashi, Koji Kanehashi

¹Advanced Technology Research Laboratories, Nippon Steel Corporation, Shintomi20-1, Futtsu, Japan

Chemical structure analysis of trace amounts of boron (60ppm~120ppm in mass) in coals has been performed by ^{11}B MAS and STMAS. As a result, three structures with isotropic chemical shift (δ_{iso}) of approximately 1ppm, 7ppm, and 14ppm are clearly distinguished. All sites are characterized by quite small quadrupolar products ($P_Q < 0.5\text{MHz}$). These results indicate that boron in coals mainly occurs as four coordinate organo-complexes although the previous studies using solid state NMR suggest that boron occurs as three coordinate species in gangue minerals such as tourmaline and illite. Furthermore, we have proposed structures for the organo-boron complexes which are supported by ^{11}B - ^1H CPMAS experiments.

【緒言】高感度化はNMRにおける大きな課題の一つである。昨年、我々は、四極子核に対する高感度測定法（STMAS）の開発に、日本で初めて成功したことを報告した。今回、この技術をより実用性のあるものに発展させるため、実用材料の一つである石炭へ展開した。

石炭火力発電においては、石炭燃焼後、幾つかの種類の灰が生成する。このうち、電気集塵器によって回収される飛灰（フライアッシュ）には、環境負荷元素の1つホウ素が濃集する。ホウ素に対しては、近年、土壤汚染に関する法律、水質汚濁防止法等で、厳しい排出規制が設けられており、適切な溶出防止策が必要とされている。そのため、ホウ素の挙動を包括的に理解することが必要であり、その一環として、燃焼前のホウ素の化学的存在形態を解明することが必要とされている。元素選択性を有する固体NMRは、ホウ素含有相の構造解析を行ううえで有効である。例えば、Kuwabara [1]らは、石炭の ^{11}B MAS NMR スペクトルを取得し、ホウ素の多くは、無機物質（トルマリン、イライト）中に含まれるとした。しかしながら、この場合、観測核の ^{11}B （スピン $I=3/2$ ）は四極子核であり、一次元スペクトルのみでは、帰属を誤る可能性が高い。ところが、従来のMQMAS法では、微量なホウ素を分析することは困難であった。そこで、より高感度なSTMASによりホウ素の化学的存在形態をより詳細に検討した。

【実験】石炭は、ホウ素濃度 60~120ppm、炭素濃度 70~80%の普遍的に見出される炭種を準備した。試料は、粒子表面に吸着したホウ素の影響を排除するため、マンニトール水溶液(2wt%)で洗浄し、60°Cで乾燥した。NMR スペクトル測定は、JEOL ECA-700(16.4T)、3.2mm用 STMAS プローブを用いて行った。測定中の回転周波数は、MAS コントローラによって $20\text{kHz} \pm 0.003\text{kHz}$ に制御した。STMAS スペクトル測定

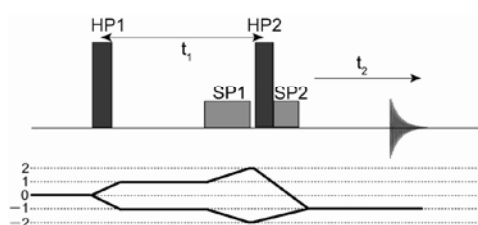


Fig.1. DQF-SPAM pulse sequence for STMAS experiments. The time of t_1 and t_2 was set to 1.6ms and 10.2ms, respectively.

Key words: 微量、ホウ素、STMAS

○たかはし たかふみ、かねはし こうじ

では、試料管の底部約 1/3 に硫酸ナトリウム(Na_2SO_4)、中心部に測定用試料をつめた。 ^{23}Na -STMAS スペクトルを用いて、マジック角を $54.736^\circ \pm 0.002^\circ$ に調整した後、プローブの交換作業を行うことなく、実試料の測定に移行した。実測定において、繰り返し時間は 1 秒とし、 ^{11}B -MAS スペクトルは 18° パルス、 ^{11}B -STMAS スペクトルは、DQF-SPAM パルスシーケンス(Fig.1)を用いて測定した。

【結果および考察】石炭の ^{11}B MAS スペクトルを Fig.2 に示す。この図に示すように、今回測定した石炭は共通して 3 つのサイトを示しており、化学シフトは、0ppm~15ppm の広範囲に分布している。これらの特徴は、先行研究[2]で報告された MAS スペクトルの特徴と一致する。そこで、真の化学シフトおよび核四極子結合定数を評価するため、STMAS スペクトルを測定した。その結果、Fig.3 に示すように、3 つのサイトが区別でき、いずれも小さい四極子結合定数を示した(Table 1)。このうち、サイト c は、明らかに 4 配位であり、この帰属は従来のもものと一致する。また、残りの 2 つのサイト (a,b) についても、我々は 4 配位に帰属したが、これは従来の解釈とは異なる。4 配位に帰属した理由として、これらのサイト (a,b) の小さい核四極子相互作用は、4 配位構造でのみ説明可能だからである。さらに、化学シフトを考慮することで、4 配位構造の中でも無機酸化物型ではなく、有機分子を配位子に持った有機物型であると結論付け、Fig.4 に示す構造を提案した。石炭のマセラル研究では、ホウ素濃度が植物の木質部由来の部分で高いことが報告されており、有機分子型を支持している。また、今回の観測結果は、ホウ素が脈石中ではなく、石炭の炭素骨格中に存在することを示しており、燃烧初期段階でホウ素が放出されることを示唆している。

Table 1. Isotropic chemical shifts δ_{iso} (ppm) and quadrupolar products P_Q (MHz) estimated for three boron sites.

a		b		c	
δ_{iso}	C_Q	δ_{iso}	C_Q	δ_{iso}	C_Q
0.9	0.8	8.0	0.8	15	0.7

【結言】STMAS を含め固体NMRを駆使することで、石炭中の微量ホウ素が主に有機型 4 配位構造として存在することを明らかとなった。今後、従来観測不可能であった低濃度元素への STMAS の展開が期待される。

【参考文献】(1) Takahashi *et al.*(2008) *J.Magn.Reson.* **198**:228-235. (2) Kuwabara *et al.* (2007) *J. Jpn. Inst. Energy* **86**:455-461

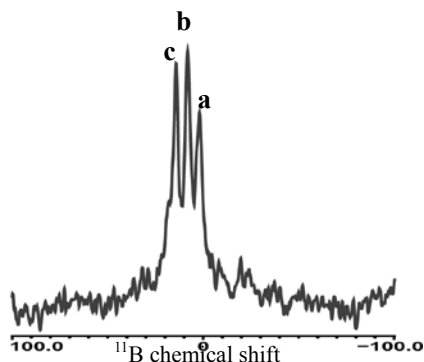


Fig.2. A typical ^{11}B MAS spectrum of coal.

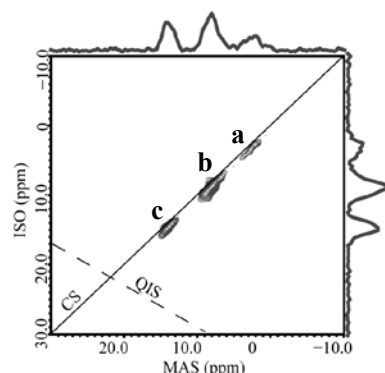


Fig.3. ^{11}B STMAS spectra of coal cited in figure 1.

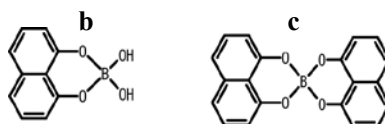


Fig.4. Structures proposed for boron sites (b, c).

高磁場 ^{43}Ca 固体NMRによるカルシウムハイドロシリケートの構造解析

○橋本康博¹, 名雪三依¹, 松野信也¹, 松井久仁雄², 丹所正孝³, 清水禎³
¹旭化成(株)

²旭化成建材(株)

³(独)物質・材料研究機構

Natural-abundance ^{43}Ca solid state NMR study of calcium hydrosilicate

○Yasuhiro Hashimoto¹, Mie Nayuki¹, Shinya Matsuno¹, Kunio Matsui², Masataka Tansho³,
 Tadashi Shimizu³

¹Asahi kasei Corporation, Shizuoka, Japan.

²Asahi Kasei Construction Materials, Ibaraki, Japan.

³National Institute for Material Science, Ibaraki, Japan.

Tobermorite, a naturally present hydrated calcium silicate, is also hydrothermally produced. Taking advantages of the strength and stability, it is widely used as a binder in cement and concrete materials. However, when used in the construction materials, the crystal structure is gradually altered over a few decades leading to deterioration of the material strength. This may be due to a reaction of the calcium with CO_2 in the air to produce CaCO_3 . To investigate the details of the degradation mechanism that still remains unknown, structure analysis means are required. In particular, information of the calcium, aluminum, and boron structure arrangement should be desired. Here we present the application of an ultra-high field 21.8T NMR to obtain natural-abundance solid-state ^{43}Ca , ^{27}Al , and ^{11}B NMR spectrum. Detailed structure information obtained will also be discussed.

【概要】トバモライト($\text{Ca}_5\text{Si}_6\text{O}_{17} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)は、Fig.1に示すような、CaOと SiO_2 層からなる板状結晶カルシウムハイドロシリケートである。4面体 SiO_2 の一部のSiがAlで置換されたり、 SiO_2 層に $\text{Ca}^{2+}(\text{H}_2\text{O})_n$ が存在したり、またあるいは、微量にBを含む場合がある。水熱合成により得られ、軽量気泡コンクリート(ALC)などの建築材料の主成分として使用され、高強度、耐久性、耐火性、耐水性など優れた性質を有する。さらなる耐久性を目指すときの問題は、トバモライト中のカルシウムが大気中の二酸化炭素と反応して炭酸カルシウムを生成する劣化(炭酸化劣化)である。一方、トバモライトは天然にも産することが知られており、その産状から合成品に比べて炭酸化が起こりにくいと予想される。天然品

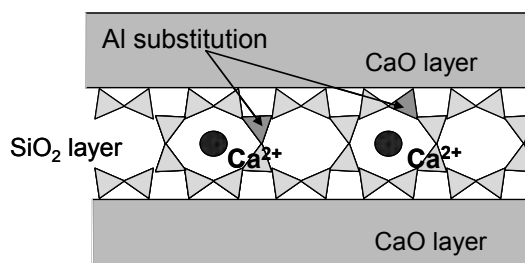


Fig.1 Tobermorite structure.

カルシウムハイドロシリケート、トバモライト、 ^{43}Ca NMR

○はしもとやすひろ、なゆきみえ、まつのしんや、まついくにお、たんしょまさたか、しみずただし

と合成品の違い、そして炭酸劣化機構を解明することが重要であり、そのために、炭酸化に直接関係するとくにカルシウムの状態評価法が重要である。今回我々は超高磁場21.8T NMR装置で、天然存在比での ^{43}Ca 固体NMR法を試み、さらには ^{27}Al 、および ^{11}B 固体NMR法もあわせて構造情報取得を試みた。

【実験】 ^{43}Ca 、 ^{27}Al 、 ^{11}B 固体NMR測定は、JEOL ECA930 (21.8T) 装置で行った。 ^{43}Ca は1次元single pulse法(積算時間: 約50hr、繰返し待ち時間: 0.5sec)を、 ^{11}B と ^{27}Al は、さらに3QMAS測定を行った。試料は同位体標識を行わず天然存在比のまま測定を行った。

【結果】Fig.2に、水熱合成品とその炭酸劣化促進試験品の ^{43}Ca 固体NMRスペクトルを示した。 ^{43}Ca は、四極子核で、低周波数核であり、さらには天然存在比が非常に低い(0.135%)が、今回天然存在比のまま良好なスペクトルを得ることができた。今後、天然品、あるいは種々促進劣化品の比較により、炭酸化メカニズム機構解明への貢献が期待できる。

Fig.3に天然トバモライト(千葉県南房総市平久里産)と水熱合成品の ^{27}Al 固体NMRスペクトルを示した。参考のため、9.4T NMR装置(Bruker Biospin DSX400)で測定したデータと比較した。9.4T 装置で得られたスペクトルでは4配位Alにショルダーが観測され、両試料の違いはそのショルダーピーク強度比の違いが認められるのみであるが、21.8Tでの測定により、このショルダーピークが明瞭に分離し、さらには天然品と合成品でその化学状態が異なることが明らかになった。発表では、その詳細構造について言及する。

【謝辞】NMR測定に関し多大なご尽力を頂いた日本電子 出口様に感謝いたします。

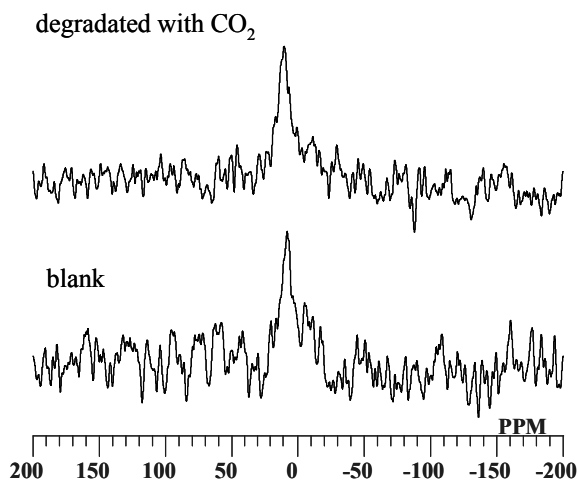


Fig.2 ^{43}Ca solid-state NMR spectrum of synthesized tobermorite.

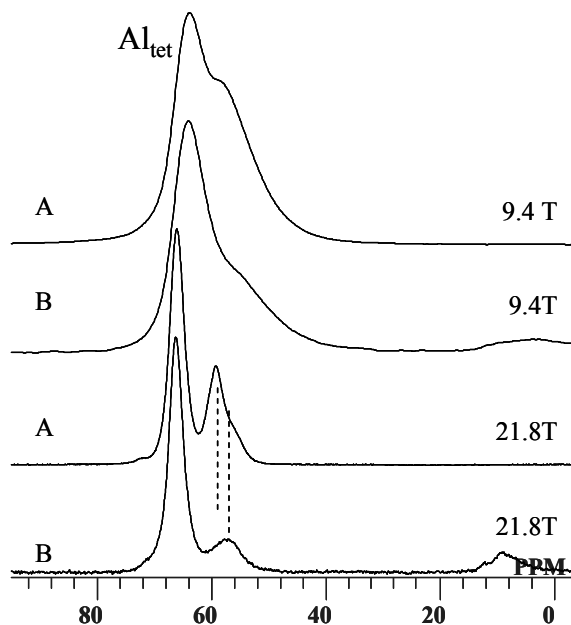


Fig.3 ^{27}Al solid-state NMR spectrum of (A): natural Heguri, and (B): synthesized tobermorite.

P081 混合原子価モリブデン (V, VI) ポリ酸の固体 ^{95}Mo NMR

○飯島隆広¹, 西村勝之¹, 山瀬利博², 丹所正孝³, 清水 禎³

(分子研¹, 東工大², 物材機構³)

Solid state ^{95}Mo NMR of mixed valence polyoxomolybdates(V, VI)

T. Iijima¹, K. Nishimura¹, T. Yamase², M. Tansho³, T. Shimizu³

Institute for Molecular Science¹, Tokyo Institute of Technology², National Institute for Materials Science³

We report solid state NMR of ^{95}Mo NMR of Mo^{V} , $\text{Mo}^{\text{V,VI}}$ and Mo^{VI} species in mixed valence polyoxomolybdates(V, VI) with localized or delocalized d^1 electrons. ^{95}Mo MAS NMR spectra for diamagnetic crystals of $[\text{Me}_3\text{NH}]_6[\text{H}_2\text{Mo}_{12}^{\text{V}}\text{O}_{28}(\text{OH})_{12}(\text{Mo}^{\text{VI}}\text{O}_3)_4] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**1**) and $[\text{NMe}_4]_2[\text{NH}_4]_8[(\text{Mo}_6^{\text{VI}}\text{Mo}^{\text{V}}\text{O}_{23})_2] \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ (**2**) were measured under moderate (9.4 T) and ultrahigh (21.8 T) magnetic fields. Parameters about chemical shift and quadrupole interactions were obtained by simulation of the observed spectra and relativistic density functional theory (DFT) calculations. The isotropic and anisotropic chemical shifts of sites of Mo^{V} in **1** and $\text{Mo}^{\text{V,VI}}$ in **2**, respectively, exhibited absolute values quite larger than those of other Mo^{VI} sites.

【緒言】近年、NMR 用超電導磁石の到達磁場が上昇し、強磁場固体高分解能 NMR の測定が可能になってきている。特に半整数スピンの四極子核では、強磁場化により核四極相互作用の二次のシフトが小さくなるためスペクトルの高分解能化が起り、平衡磁化の増大による感度向上とあいまって、これまで困難とされていた核種を用いた NMR 構造解析が行えるようになってきている。実際、近年強磁場 NMR による ^{95}Mo 等のいわゆる low- γ の核の基礎研究が活発になっている。

^{95}Mo NMR はモリブデンの酸化数 (Mo^0 - Mo^{VI}) により分類できる。溶液 NMR では全ての整数酸化数について ^{95}Mo NMR が報告されており、特に Mo^0 , Mo^{II} , Mo^{VI} の ^{95}Mo NMR は配位化学や反応性の研究で多用されている。一方、固体 NMR の研究は多くなく、これまで酸化物や錯体分子の Mo^0 , Mo^{IV} , Mo^{VI} や金属状態の Mo について ^{95}Mo NMR 測定が報告されている。

本研究では、混合原子価モリブデン (V, VI) ポリ酸の Mo^{V} , $\text{Mo}^{\text{V,VI}}$, Mo^{VI} の固体 ^{95}Mo NMR を報告する。 Mo^{V} は、 ϵ -Keggin アニオンやリング、チューブ、ボール状のナノサイズのポリ酸などに多く含まれているが、これまで二核または三核錯体について溶液 ^{95}Mo NMR が測定されているのみである。本研究で対象としたのは局在化及び非局在化した d^1 電子を有する反磁性のポリ酸 $[\text{Me}_3\text{NH}]_6[\text{H}_2\text{Mo}_{12}^{\text{V}}\text{O}_{28}(\text{OH})_{12}(\text{Mo}^{\text{VI}}\text{O}_3)_4] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**1**) 及び

^{95}Mo , 混合原子価, DFT

○いいじま たかひろ、にしむら かつゆき、やませ としひろ、たんしょ まさたか、しみず ただし

$[\text{NMe}_4]_2[\text{NH}_4]_8[(\text{Mo}_6^{\text{VI}}\text{Mo}^{\text{V}}\text{O}_{23})_2] \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ (**2**) である。9.4 T 及び 21.8 T の強磁場で固体 ^{95}Mo MAS NMR スペクトルを測定し、得られたスペクトルのシミュレーションや相対論的 DFT 計算から局所構造や電子構造を考察した。

【実験】 9.4 T での ^{95}Mo 固体 NMR は Varian Inova 400 分光器を用い、共鳴周波数 26.060 MHz で測定した。21.8 T では JEOL ECA 930 分光器を利用し共鳴周波数 60.572 MHz で ^{95}Mo 固体 NMR 測定を行った。測定は 16 kHz の MAS 及びエコー法で行った。スペクトル・シミュレーションは自作のプログラムを用いて行った。NMR パラメータの DFT 計算は、VWN + BP の汎関数及び triple- ζ レベルの Slater 型基底関数を用い、ADF 2008.01 で行った。

【結果と考察】 Figs. 1(i-a) および 1(ii-a) にそれぞれ、9.4, 21.8 T の磁場で測定した**2** の実測 ^{95}Mo MAS NMR スペクトルを示す。9.4 T のスペクトルは、二次の核四極相互作用や複数のスペクトル成分の重なりのため非常にブロードであったが、21.8 T で測定を行うことによりかなり分解されたスペクトルが得られた。4 つの Mo サイトを考慮することにより、これらのスペクトルをシミュレーションできた。その結果を Fig. 1(b) に、また構成成分を Figs. 1(c)-1(f) に示す。

DFT 計算からも 4 つの異なる Mo サイト ($\text{Mo}^{\text{VI}}(1)$, $\text{Mo}^{\text{VI}}(2)$, $\text{Mo}^{\text{VI}}(3)$, $\text{Mo}^{\text{V,VI}}(4)$) の NMR パラメータが得られた。 $[(\text{Mo}_6^{\text{VI}}\text{Mo}^{\text{V}}\text{O}_{23})_2]^{10-}$ ($\{\text{Mo}_{14}\}$) は、 $[\text{Mo}_7^{\text{VI}}\text{O}_{24}]^{6-}$ ($\{\text{Mo}_7\}$) の脱水二量化による光還元種であり、注入された 2 つの電子は μ -oxo 酸素原子を介してつながっている分子中央の 4 つの MoO_6 八面体に非局在化していると考えられている。4 つのサイトのうち $\text{Mo}^{\text{V,VI}}(4)$ がこの中央の 4 つの MoO_6 八面体の Mo であった。 $\text{Mo}^{\text{V,VI}}(4)$ は、光還元前の $\{\text{Mo}_7\}$ では $\text{Mo}^{\text{VI}}(1)$ に相当するが、NMR パラメータは $\text{Mo}^{\text{VI}}(1)$ とは大きく異なっていた。特に等方化学シフトは $\text{Mo}^{\text{VI}}(1)$ では 56 ppm であるのに対し、 $\text{Mo}^{\text{V,VI}}(4)$ は 730 ppm であった。

一方、**1** では d^1 電子は $\text{Mo}^{\text{V}}\text{-Mo}^{\text{V}}$ 結合により局在化している。NMR スペクトルや DFT の結果より、 Mo^{V} と Mo^{VI} の 2 種類の Mo サイトが確認され、 Mo^{V} のサイトの化学シフト異方性の絶対値は極めて大きいことが分かった (-990 ppm)。

1, **2** とも、HOMO を含む高エネルギーの占有軌道は、 Mo^{V} または $\text{Mo}^{\text{V,VI}}$ の 4d 軌道であり、低エネルギーの仮想軌道にもこれらの 4d 軌道が多く含まれていた。大きな化学シフトはこれらの分子軌道間の磁気双極子許容遷移に伴う常磁性項の寄与により生じており、 d^1 電子の局在性にかかわらず、 ^{95}Mo 核は Mo^{V} を含む固体ポリ酸の分子や電子の構造を調べる良いプローブとなることが分かった。

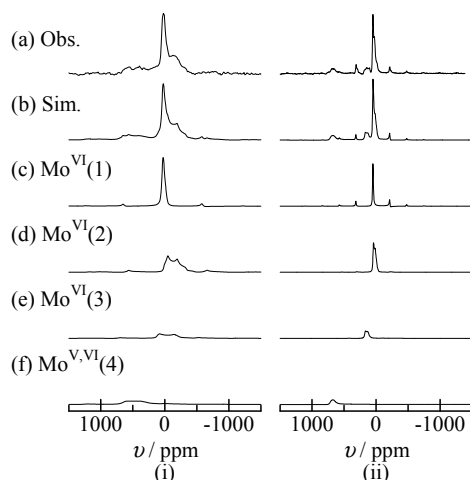


Fig. 1: ^{95}Mo MAS NMR spectra of **2** under (i) 9.4 and (ii) 21.8 T. (a) and (b) show the observed and simulated spectra, respectively. (c-f) denote spectral components constituting the spectrum in (b).

○吉水広明¹・岡澤誠裕¹・奥村祐生¹・傘俊人¹¹名古屋工業大学・大学院・工学研究科

NMR Characterizations of Gas Diffusion Properties of Polymers

○Hiroaki Yoahimizu¹, Masahiro Okazawa¹, Yuki Okumura¹, Toshihito Karakasa¹¹ Graduate School of Materials Engineering, Nagoya Institute of Technology, Nagoya, Japan.

To clarify the gas diffusion behaviors in polymers is important in order to get fine high-performance gas-separation membranes. In this study, the diffusion behaviors of some polymers were investigated by means of various NMR techniques including PFG method. Only single diffusion coefficient of the gas in polyphenylene oxide (PPO) was observed by PFG NMR experiments within several tens ms order, indicating that the averaged value was measured for relatively long observation time. However, the half-width of NMR peak of the gas in PPO decreased with increasing the relaxation-decay time of the order of ms. From these findings, it was pointed out the distribution of gas diffusion in very short time scale. On the other hand, the gas transport properties of crystalline phase of poly(4-methyl-1-pentene) (PMP), and the magnetically oriented structure of liquid crystalline aromatic polyester with n-alkyl side chain (B-C14) membranes were also investigated by some NMR measurements. From the results, the gas transport properties in crystalline phase of PMP, should be explained by free volume fraction and local molecular motions. And the anisotropic diffusion properties of B-C14 have been successfully measured by NMR method.

【緒言】 ガスバリア膜や気体分離膜等へ応用できる優れた高分子膜材料を創製する上で、膜材中の気体拡散挙動を詳細に知ることは重要であり、拡散係数の測定方法を検討することもまた大事である。拡散係数測定の従来法には、気体透過や収着実験で得られる平衡値へ到達するまでの経時変化データをFickの拡散方程式で解析して得る方法などが挙げられるが、ガラス状高分子ではこれらの方法は適用できず、その算出は容易ではない。一方、磁場勾配パルス(PFG) NMR法は、拡散分子そのものの並進拡散移動をNMR信号強度の変化に変換し、このデータ解析から自己拡散係数を直接決定する方法であり、拡散特性の複雑な系において有効な一手段である。また、拡散現象に異方性がある場合、従来法では膜試料を作り分ける必要があり、時としてこれがかかなりの困難を伴う。NMR法では同一試料でも気体拡散の異方性の検討が可能であるので、本研究では種々の高分子材料中の気体拡散挙動について、PFG NMR法を適用するとともに、¹²⁹Xe NMR化学シフト値やスペクトル線幅からの検討も試みた。

【実験】 ポリ(2,6-ジメチル-1,4-フェニレンオキサイド) (PPO : T_g≒220℃)、及びポリ(4-メチル-1-ペンテン) (PMP)、ピロメリット酸のジアルキルエステル(炭素数14)とビフェノールよりなる全芳香族ポリエステル(B-C14)を試料に用いた。各種気体の自己拡散係数を従来法並びにPFG NMR法で決定した。また、Solid-echo法によるスピン-スピン緩和時間(T₂)測定を行い、緩和減衰時間τに伴う線幅の変化を観察した。

気体のNMR、気体輸送特性、気体拡散係数

○よしみずひろあき, おかざわまさひろ, おくむらゆうき, からかさとしひと

[結果・考察] ^{129}Xe NMR化学シフト値はXeと高分子との相互作用に起因し、これは両者の時間平均距離に相関付けられるので、系の極微小空隙サイズを検討できる。Fickの拡散方程式で完全記述できる液体及びゴム状高分子の系では、系中に溶け込んだ気体の拡散性は系の自由体積の大小で一義的に説明される。従って、Xeの拡散係数は、それが系の自由体積分率と強い相関関係にある ^{129}Xe NMR化学シフト値から見積もれる(Figure 1)。一方、Fickの拡散方程式が適用できないガラス状高分子系では、両者の間に定量的相関は得られなかった。次に、PFG NMR測定を行いPPO中のXe原子の拡散挙動を観察した。Figure 2に70℃, 7atmにおける ^{129}Xe のNMR相対信号強度が拡散挙動に基づき減衰する様子を示した。横軸は磁場勾配パルスの印加時間 $\delta=1.2\text{ms}$, 拡散時間 $\Delta=400\text{ms}$ の測定条件下で、磁場勾配パルス強度 g を0~1000G/cmまで変化させたときの拡散パラメータであり、このプロットの勾配から自己拡散係数が求まる。Figure 2は単一指数減衰なので、この測定条件下における拡散成分は1成分でしか観察されない。これは、部分不動化モデルで考えられるHenry及びLangmuir各サイトでの拡散が $\Delta=400(\text{ms})$ の間に既に平均化されていることを意味している。自己拡散係数が圧力(=濃度)依存性を示すことから支持される。ガラス状高分子-気体系における気体輸送特性が二元収着並びに部分不動化モデルで説明されるのなら、Henryサイトにおける拡散係数はLangmuirサイトにおけるそれよりも大きく、その分率は圧力とともに増える。したがって、PPO中を拡散するXeは少なくとも400msの間にHenryとLangmuir両サイトを頻繁に行き来した結果、平均値としての自己拡散係数が1成分としてしか観測されず、これが分率に従い増加したと解釈される。一方、スペクトル線幅(FWHM)も濃度依存性を示し、その検討結果はこれらの解釈を概ね補足するものであった。即ち、NMRスペクトルはFIDと呼ばれる時間減衰信号をフーリエ変換して得られるが、本研究で得たFIDは最短でも10数ms間は信号が明瞭に観測されていたので、この時間内で平均化されるほどに両サイト間を速く交換していると仮定すれば、FWHMの濃度依存性が良く説明できた。一方、 T_2 測定の際に使用した τ 値は数百 μs のオーダーで、 τ 値とともにFWHMは減少した(Figure 3)。これは T_2 成分に分布があることを意味しており、数百 μs 以下の拡散時間では完全な平均化は起こらないことが明らかとなった。

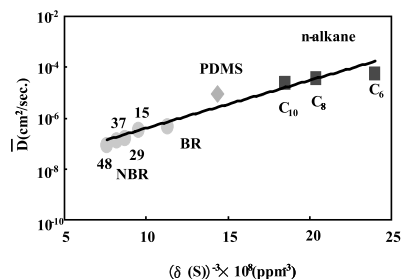


Figure 1 Diffusion coefficient of Xe vs. reciprocal of cubic root of ^{129}Xe NMR chemical shift δ (s).

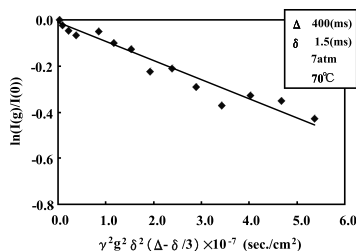


Figure 2 The plots of $\ln [I(g)/I(0)]$ against $\gamma^2 g^2 \delta^2 (\Delta - \delta/3)$ for the ^{129}Xe in PPO at 70 °C

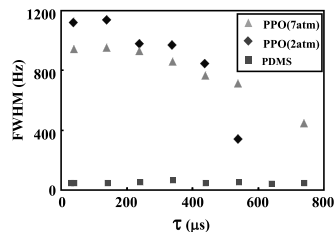


Figure 3 ^{129}Xe NMR peak width of ^{129}Xe in samples against relaxation time at various pressure.

次に、結晶性高分子であるポリ4-メチル-1-ペンテン(PMP)の検討結果について述べる。PMPの結晶形態のひとつである結晶形態I型は7/2ヘリックス構造をとり、正方晶を形成する。このとき嵩高い側鎖を持つことによるパッキングの悪さから結晶相にヘリックス軸に沿った直径約4Åのシリンダー状の空孔ができ、結晶相でも気体分子の収着・拡散・透過が起こりえるという特異的な性質を持つ。本研究では、収着実験並びにNMR法によってPMP膜中の拡散挙動や結晶部の微細構造をより詳しく観察し、結晶相における気体輸送特性の解明の第一歩とした。PMPは、熔融プレス後、急冷又は徐冷して、結晶化度の異なる試料を調製した。得られたサンプルをPMP34, PMP80とする(数字は結晶化度(%)を表す)。各サンプルにおいて室温及び-50℃までの低温における気体収着測定をQCM法によって行った。ペネトラントにはXeを用いた。更に各温度にて ^{129}Xe NMR法によって空孔サイズを評価した。X線回折測定より、いずれのPMPも結晶形態I型であると

確認された。Xe収着測定の結果より、室温における各サンプルへの収着量等温線はHenry型、低温では二元収着型を示した。またXe NMR法にて得られたスペクトルをFigure 4に示す。-50℃においてはピークの分裂が見られた。これは、収着したXeの結晶相と非晶相の2つの収着サイト間での移動が観測スケールよりも遅くなったためと考えられる。さらに空孔サイズは温度が低下するにつれて大きくなることが分かった。また、 ^1H NMR法によって、25および100℃における各試料中に溶け込んだメタンガスの T_2 を算出した。結果をTable 1に示す。結晶化度が低いほど、また温度が高温のものほど T_2 は長くなった。この結果からも結晶相よりも非晶相の方がペネトラント分子は拡散しやすいということが確認できた。この一因としてペネトラント分子は非晶相中においては3方向に拡散できるのに対し、結晶相では螺旋軸に沿った1方向にしか拡散できないためと考えられる。また膜中の CH_4 のピーク線幅を緩和減衰時間 τ に

対してプロットしたところ、いずれの温度、結晶化度においても線幅は τ によらず一定であった。これはペネトラント分子の結晶、非晶間の交換速度が今回の観測スケールである5msよりも十分速いためであると考えられる。

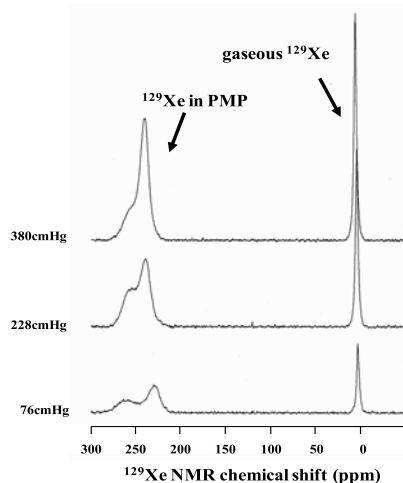


Figure 4 ^{129}Xe NMR spectra of PMP80 at -50℃.

Table 1 T_2 value of CH_4 for PMP at various crystallinity and temperature

Temperature (℃)	T_2 (ms)	
	PMP34	PMP83
21	2.14	2.07
100	2.56	2.38

最後に、アルキル側鎖を有する液晶性全芳香族ポリエスルB-C14(14は側鎖アルキル側鎖の炭素数)の結果について述べる．B-C14は、1,4-ジアルキルエステルと4,4'-ビフェノールからなり、サーモトロピック液晶性を示す．B-Cnは剛直な芳香族主鎖が並列して板状に凝集し、柔軟なアルキル側鎖部と1分子レベルで交互に配列した層状構造をとる．この構造的特徴を用いることで、物質の選択的な透過、分離を可能とするスマートメンブレンの一提案になると考えている．これまでの研究から、B-Cnの層状構造において比較的小さな各種気体では、側鎖層のみに収着、拡散すること、および、B-Cnは外部磁場を印加すると層状構造が磁場方向に平行配向することが確認されている．本研究では磁場による層状構造の配向条件、並びに配向構造の詳細を調べ、この配向膜の気体輸送特性を拡散係数測定から評価した．はじめにDSC測定を行い、磁場印加の際の温度条件を決定した．熔融プレス法で製膜したB-C14を125℃に保ち、9.4Tの強さで13時間磁場を印加した．また比較用サンプルに、磁場を印加していない磁場無印加サンプルを用意した．配向の確認はWAXD測定と固体¹³C NMR測定を行って確認した．配向が気体輸送特性に及ぼす影響を検討するため、25℃でメタン収着測定を重量法により行った．また、拡散の異方性を検討するために、¹H PFG NMR測定を行った．磁場配向するにはある程度の流動性が必要であるため、磁場印加の際の温度条件を、DSC測定の結果より液晶状態であると確認された125℃とした．WAXD測定の結果、層状構造が膜面に対し垂直な方向に配向していることを確認した．また固体¹³C NMR測定の結果からも同様な結果が得られた．メタン収着測定の結果をTable 2に示す．配向による溶解度係数の変化は見られないが、拡散係数では配向膜で大きな値が得られた．このことから磁場配向による拡散性の向上が確認された．また、¹H PFG NMR測定の結果、磁場勾配パルス照射方向によって異なる拡散係数が得られたことから拡散の異方性を確認することができた．

Table 2 Diffusion and solubility coefficients of CH₄ in B-C14 samples at 25°C and 15.2 cmHg

sample	$\bar{D} \times 10^8$ (cm ² /sec.)	$S \times 10^2$ (cm ³ STP/cm ³ _{polym} cmHg)
under magnetic field	21	2.4
without magnetic field	7.5	2.4

○小林将俊¹, 小森佳彦¹, 藤原敏道²¹住友ゴム工業・研究開発本部²阪大・蛋白研**A study of rubber structure by high-field and high-speed MAS ^1H NMR**○Masatoshi Kobayashi¹, Yoshihiko Komori¹ and Toshimichi Fujiwara²¹R&D HQ, Sumitomo Rubber Industries, Kobe, Japan.²Institute for Protein Research, Osaka University, Suita, Japan.

Solid-state NMR studies for structural analysis of cross-linking point of rubber have been performed with ^{13}C observation because ^1H spectra of rubber are broad and featureless. We performed ^1H NMR experiments under ultra high-field with fast magic-angle spinning to obtain high-resolution ^1H spectra and successfully observed the ^1H signals assigned to cross-linking point in a short experimental time.

Ultra high-field NMR is valuable tool for the structural analysis of soft materials like rubber.

【背景と目的】

タイヤを始めとするゴム材料の物性発現には、ナノレベル、分子レベルの構造制御が必要である。ゴムは高分子を硫黄などで架橋して作られ、その架橋構造はゴムの力学物性や耐久性に重要である。

これまでゴムの架橋構造解析は固体 ^{13}C MAS NMRが主であった。本来 ^1H 信号は ^{13}C 信号に比べ400倍感度が良く、高分解能 ^1H スペクトルが得られれば、短時間で架橋構造情報が得られる。しかし溶媒に不溶な一般のゴムに対して ^1H NMR測定は架橋構造解析に有効な役割を果たしてきたとは言えなかった。それは、溶媒に不溶な架橋ゴムは分子運動が束縛されており、主に ^1H - ^1H の双極子-双極子相互作用により、スペクトルがブロードニングし、架橋に由来する微小な信号が観測しづらくなるからである。これらを克服する手法として、超高磁場NMRの利用による化学シフトの分離と、高速MASによる双極子相互作用の低減が挙げられる。

これらの背景をもとに、700MHzあるいは920MHzの高磁場NMRと高速MASの組み合わせによる ^1H MAS NMR測定を行い、架橋に由来する信号を高い分解能で得ることを目的とした。

【実験】

試料はポリイソプレンに架橋剤である硫黄、加硫促進剤、促進助剤を加え、練りプロセスにより均一に分散させた後、150℃でプレス加硫したゴムシートである。固体 ^1H MAS NMR測定は超高磁場(21.6T)の920MHz NMR分光器(JEOL ECA920)、および700MHz NMR分光器(Varian Infinity-plus 700)を用いた。MAS周波数は、試料管(ローター)外径4.0mm ϕ および2.5mm ϕ について、それぞれ14-17kHz、25kHzで測定を行った。積算回数は256回で、20分程度で一つのスペクトルを得た。

ゴム, 高磁場固体NMR, 高速MAS

○こばやしまさとし, こもりよしひこ, ふじわらとしみち

【結果】

図1に920MHz NMRによるMAS 17kHz条件下での ^1H MAS NMRスペクトルを示した。ポリイソプレン由来のメチル、メチレン、メチンの水素が強い強度で観測された。920 MHz NMRの ^1H スペクトルは400–500MHz NMRのスペクトルに比べ、高い分解能であった。またMAS速度依存性を調べたところ、12kHzよりも17kHzで若干分解能は向上していた。以上より、 ^1H スペクトルの線幅の原因として、化学シフトの分散と双極子相互作用の両方が考えられた。ゴムはNMRから見ると液体と固体の中間の性質を持ち、高磁場で高速MASを実施することで、分解能の高い ^1H NMRスペクトルが得られる。

モデル化合物の溶液NMR解析より架橋に由来する信号の化学シフトがわかっており¹⁾、これに対応する信号が加硫ゴムにおいても観測された(図1スペクトル上の矢印で示した)。これらの信号強度は加硫反応時間により変化した。このうち3.5、4.05ppmの信号強度は異なる化学構造に由来する架橋点であるが、加硫時間に対してピークの出現の仕方が異なった。ピーク分離により強度を見積もったところ、架橋構造によりその生成速度が異なることがわかった。

これは ^1H 核観測による高い感度と、高い分解能を有する超高磁場固体NMRにより可能になったものである。

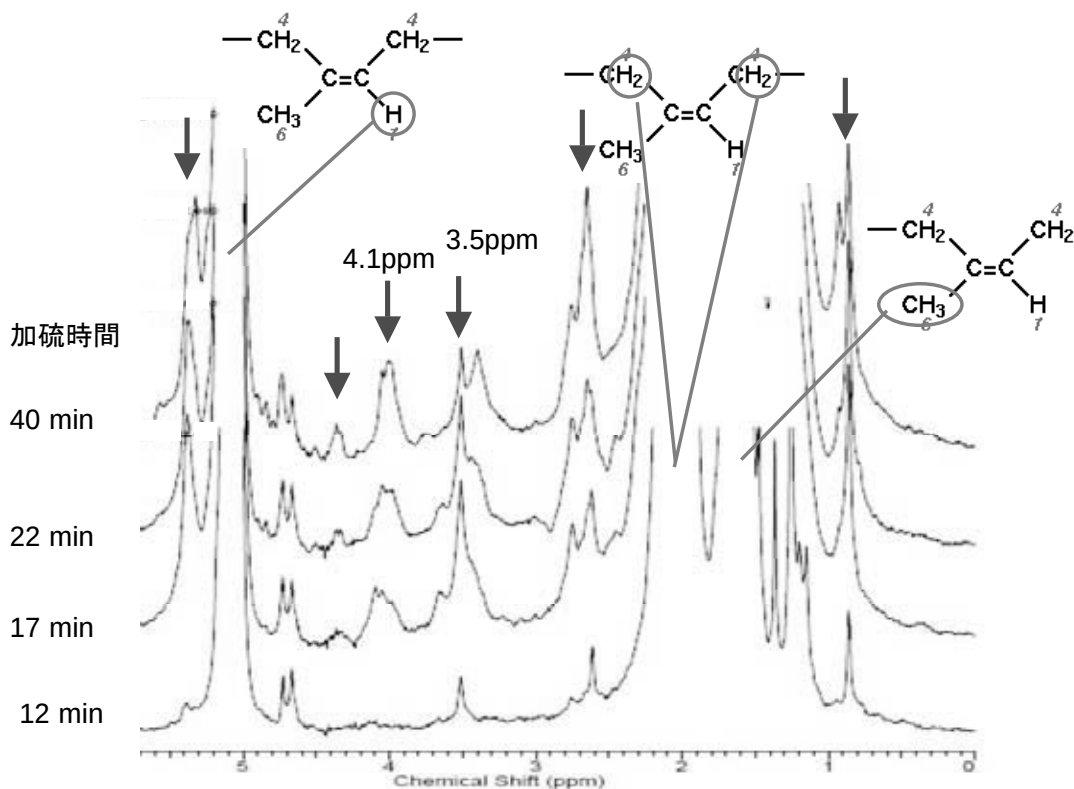


Fig. 1. ^1H NMR spectra of poly(isoprene) rubber depending on cure time observed at ultra high-field (21.6T) with 17kHz MAS. Arrows indicate signals due to cross-linking, the assignment of which is based on solution NMR study of model compound¹⁾.

【文献】

- 1) Y. Komori, R. Tokimune and M. Sugiura, Paper 104A presented at the 172nd Technical meeting of the Rubber Division of American Chemical Society, Cleveland, OH, October 16-18, 2007.

P084

**^{129}Xe NMR によるゼオライトの吸着特性評価.
銀ゼオライトについて**

佐治修吾、河田陽子、今井宏彦、木村敦臣、○藤原英明
大阪大学大学院医学系研究科保健学専攻

Adsorption profiles of Silber Zeolite studied by ^{129}Xe NMR

Shugo Saji, Yoko Kawata, Hirohiko Imai, Atuomi Kimura, ○Hideaki Fujiwara
Division of Health Sciences, Graduate School of Medicine, Osaka University

The ^{129}Xe NMR adsorption isotherms were measured with a silver zeolite and analyzed based on the Dubinin-Radushkevich equation. The signal intensity isotherms were measured and analyzed simultaneously with the chemical shift isotherms. The pressure range changed was between 0.01 and 1.5 atm, and hence adsorption profiles at lower pressure, weak adsorption, may be reflected in the results. The silver zeolite showed strong adsorption energy and smaller adsorption area compared to a potassium zeolite, which may be interpreted to reflect larger Si/Al ratio and smaller ionic radius of Ag.

背景

銀ゼオライトは原子力産業で放射性ヨウ素の吸着回収や大気中微粒子の除去に使用される特徴あるゼオライトである。このゼオライトに含まれる銀の役割を明らかにすべく、 ^{129}Xe NMR による吸着実験を行った。基本手法はこれまで報告してきた我々の開発した方法を利用した（第 47 回 NMR 討論会、要旨集 p.296）。¹⁾

実験

銀ゼオライトとして HALOSORB-II を選び（(株) 東ソー製）、銀を含まない通常のゼオライト HALOSORB-I と比較した。Si/Al 比は前者が 21、後者は 5.1 である。前処理として NMR サンプルチューブ(10 φ)に詰め、 10^{-5} torr 以下の高真空中で、室温で 10 分間脱気した後、393 K まで 2 °C/min 程度の速度でゆっくりと温度を上昇させ、393 K に達したところでそのまま 5 時間保持した。その後室温まで戻し、空気にさらすことなくマグネット内にセットした。Xe 供給システムを用いてサンプルチューブに Xe ガスを所定圧まで供給し、圧力が一定になるまで 1 ～ 2 分待った後に NMR を測定した。

測定に用いた NMR 装置は Varian Unity-INOVA (9.4 T) である。 ^{129}Xe の周波数は 110.6 MHz である。Xe ガス圧を 0.01 から 1.5 気圧の範囲で変え ^{129}Xe 化学シフトと信号強度（ピーク面積）の圧力依存性を測定した（測定温度は 298K）。

結果・考察

^{129}Xe 化学シフトと信号強度の測定結果と解析結果をまとめて図 1 に示した。吸着等温線の形から、HALOSORB-II の方が吸着が強いことが認められる（図 1）。

キーワード： ^{129}Xe NMR、ゼオライト、吸着

著者ふりがな：さじ しゅうご、かわた ようこ、いまい ひろひこ
きむら あつおみ、ふじわら ひであき

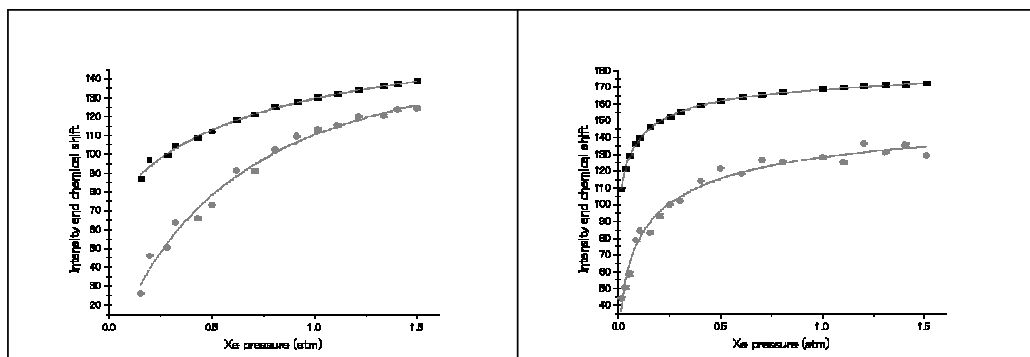


Fig.1 Observed and simulated ^{129}Xe NMR chemical shift(■, upper curve) and signal intensity(●, lower curve) for the samples of HALOSORB-I(left) and HALOSORB-II(right).

表 1 HALOSORB- I 及び HALOSORB- II の DR 解析 (298K)

	sample	HALOSORB- I (K 型)	HALOSORB- II (Ag 型)
Data Source: Signal Intensity and Chemical Shift	q_{st} kJ/mol	18.98 ± 0.56	25.74 ± 1.12
	P_{eq} atm	3.64 ± 1.10	6.11 ± 3.35
	δs ppm	74.44 ± 6.84	83.41 ± 6.53
	$W_{a0}(\text{S.I.})$ g/g	0.193	0.075
	$SA(\text{S.I.})$ m ² /g	205	80
	$W_{a0}(\text{C.S.})$ g/g	0.196	0.076
	$SA(\text{C.S.})$ m ² /g	209	81

W_{a0} : 細孔が満たされた時の全細孔容積(S.I.は信号強度から導かれる値、C.S.は化学シフトデータから導かれる値)

SA : 吸着表面積、 P_{eq} : 見かけの飽和蒸気圧、 q_{st} : 等比体積吸着熱 ($\Delta H_v + \beta E_0$)
 ΔH_v : Xe の沸点における蒸発エンタルピー (12.6kJ/mol)、 βE_0 : 有効吸着ポテンシャルエネルギー、 δs : 圧力ゼロへの外挿化学シフト

図 1 の測定データを DubininRadushkevich(DR)式に基づいて解析した結果を図 1 の中の曲線で示し、得られた数値を表 1 にまとめた。ここでは、前回同様、化学シフトと信号強度を別々に解析すると結果の乖離が問題となり、両者の同時解析でのみ妥当な値が得られることを確かめた。表 1 の値では、 q_{st} が Ag 型では約 6 kJ/mol だけ大きく、Ag 型の方が吸着が強いことを確認した。これは、Si/Al 比が大きくなり表面の疎水性が上がると Xe の吸着エネルギーが下がるという前回の傾向と同じであった。吸着表面積は吸着エネルギーと逆の傾向を示す点も前回と同様であったが、銀ゼオライトの吸着表面積の減少は顕著であった。これは細孔入口付近で Ag の吸着が強く、それ以上の吸着を阻害する効果を示唆した。より高压での同様な吸着特性の比較がこれらの点を明らかにする上で非常に興味を持たれる。²⁾

文献

- 1) Y.Kawata, Y.Adachi, S.Haga, J.Fukutomi, H.imai, A.Kimura and H.Fujiwara , *Anal.Sci.*, (2007) 23. 1397-1402.
- 2) 佐治修吾、修士論文 (大阪大学、2009 年 3 月)。

P085 水素貯蔵材料 $\text{LiAl}(\text{NH}_2)_4$ の熱分解における構造変化： 固体 NMR による評価

小野泰輔, ○下田景士, 坪田雅己, 小島健一, 市川貴之, 小島由継
広島大先進機能物質研究センター

Structural changes on hydrogen storage material $\text{LiAl}(\text{NH}_2)_4$ by thermal decomposition: NMR study

Taisuke Ono, ○Keiji Shimoda, Masami Tsubota, Ken-ichi Kojima, Takayuki Ichikawa,
Yoshitugu Kojima.
IAMR, Hiroshima University, Japan.

A composite of $\text{LiAl}(\text{NH}_2)_4$ and LiH releases H_2 gas of 6.1 wt% below 130 °C. Here, we have investigated the thermal decomposition of the hydrogen storage material $\text{LiAl}(\text{NH}_2)_4$ by using thermogravimetry-mass spectroscopy (TG-MS), synchrotron X-ray diffraction (XRD), ^6Li , ^{15}N , ^{27}Al MAS, and ^{27}Al 3QMAS NMR techniques.

The XRD and ^{27}Al MAS NMR spectra indicated that $\text{LiAl}(\text{NH}_2)_4$ decomposed into amorphous phase with NH_3 desorption above 135 °C. The present study contradicts the decomposition path proposed previously, based on the multinuclear solid state NMR that clarified the detailed local structure of the amorphous phase.

導入

地球温暖化を促進し、かつ枯渇が迫っている化石燃料の代替として、水素と電力をベースとしたクリーンなエネルギー社会の構築が今日注目されている。水素エネルギー活用の実現化を考える上で、軽量・高容量かつ容易に水素を取り出せる水素貯蔵材料の開発が重要な課題となる。そのため近年では、軽元素を用いた水素貯蔵材料の開発が盛んに行われているが、大半の材料は水素放出温度が 200°C 以上であるか、水素貯蔵容量が 5 wt% 以下であり実用化の条件を満たしていない。

リチウムアルミニウムアミド($\text{LiAl}(\text{NH}_2)_4$)は、リチウム水素化物(LiH)との複合化によって 130°C という低温で 6.1 wt% という多量の水素を放出し、高容量水素貯蔵材料として実用化が期待される材料である。一方、 $\text{LiAl}(\text{NH}_2)_4$ 単体での熱分解機構は分解過程で非晶質化するため未だ不明であり、幾つかの反応モデルが提案されている[1-3]。そこで我々は $\text{LiAl}(\text{NH}_2)_4$ の反応機構解明への第一歩として、固体 NMR を用いて分解過程での構造変化を調査し、提案されている反応モデルの検証を行った。

実験

市販の粉末 LiH (99.5 %, シグマ・アルドリッチ)と粉末 Al (99.9 %, レアメタリック)を秤量し、1:1 のモル比で混合した。これらを、ジルコニアボール(φ 8 mm)と共にクロム鋼製ミリング容器に入れて密閉後、ドライアイスエタノールを用いて冷却しながらアンモニアガス圧をかけて、液体アンモニアを導入した。その後、振動型ミリング装置で 8 時間のミリング処理を施した後、1 週間保持することで試料を作製した。

Keywords: ^6Li , ^{15}N , ^{27}Al , 3QMAS, hydrogen storage material

おのたいすけ, ○しもだけいじ, つばたまさみ, こじまけんいち, いちかわたかゆき, こじまよしつぐ

熱重量及び昇温脱離質量数分析(TG-MS)は空気非接触環境下で行った。X 線回折はキャピラリーに封入した熱処理試料(75–300°C)を用いて SPring-8 (BL02B2 ライン)にて行われた。

^6Li , ^{27}Al MAS NMR 測定は JNM-ECA600 (14.1 T)で行われた。 ^{15}N , ^{27}Al MAS 及び ^{27}Al 3QMAS 測定は物質材料研究機構所有の JNM-ECA930 (21.8 T)で行われた。全ての測定は 15 kHz で MAS 回転させて行った。

結果と考察

$\text{LiAl}(\text{NH}_2)_4$ は 135°C 以上で熱分解し、 NH_3 ガスを放出する。300°C まで昇温した際の重量減少は 39.1 wt% となった。RT から 105°C までの X 線回折パターンに変化が見られなかったが、120°C 以上で回折ピークの消失が観察された。このことは、 NH_3 の放出に伴ってアモルファス化することを示しており、既報の反応モデルに現れる AlN , LiNH_2 , Li_3AlN_2 等の結晶回折ピークは検出されなかった。従って、NMR を用いてアモルファス相の解析を試みた。

熱処理した $\text{LiAl}(\text{NH}_2)_4$ 試料の ^{27}Al MAS スペクトルを Fig.1 に示す。120°C までは 121 ppm 付近のシグナルに大きな変化は見られない。しかし、135°C においては、114 ppm 付近に新たなシグナルの出現が見られた。150°C においては、RT から存在していた 121 ppm 付近のシグナルが消失し、115 ppm のシグナルのみになっている。150°C 以上では、徐々にブロードニングしながら高磁場側にシフトし、300°C においては約 113 ppm という値をとった。上述の分解反応モデルで提案されている AlN , Li_3AlN_2 の化学シフトは 112 ppm 及び 114 ppm であり、 ^{27}Al MAS スペクトルでは AlN あるいは Li_3AlN_2 状アモルファス物質の有無ははっきりしない。一方、 ^6Li MAS スペクトルから、分解過程における Li 局所構造は Li_3AlN_2 の Li とは異なると結論付けられた。 ^6Li , ^{15}N MAS 及び ^{27}Al 3QMAS スペクトルの結果及び考察はポスター紙上にて発表する。

本研究は NEDO の助成下で行われている。930 MHz マグネット使用許可に関して、物質材料研究機構の清水・丹所両先生に感謝します。

参照

- [1] Rouxel & Brec (1966), *C.R. Acad. Sci. Paris C* **262**, 1071.
- [2] Jacobs & Jänichen (1985), *Anorg. Allg. Chem.* **531**, 125.
- [3] Janot (2007), *J. Phys. Chem. C* **111**, 2335.

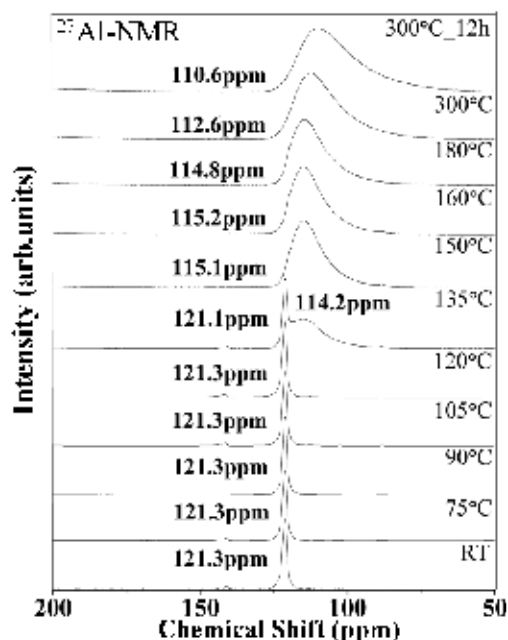


Fig.1 ^{27}Al MAS spectra of $\text{LiAl}(\text{NH}_2)_4$ recovered from different temperatures at 14.1 T.

P086 高圧リフォールディングによるタンパク質立体構造解析試料の調製法

○小椋賢治, 斎尾智英, 小橋川敬博, 稲垣冬彦
(北大院薬)

Hydrostatic pressure refolding from inclusion bodies for protein structural study

Kenji Ogura, Tomohide Saio, Yoshihiro Kobashigawa, and Fuyuhiko Inagaki

Grad. Sch. Pharm. Sci., Hokkaido University

Recently, it has been reported that overexpressed protein forming inclusion bodies in *E. coli* expression systems are solubilized and refolded by hydrostatic pressure. The aim of this study is to prove the pressure-refolding very effective for structural biology by NMR analysis. Inclusion bodies containing the following overexpressed protein: MOE2 Zn-finger, ZIP PB1, and mTOR FRB were solubilized by max. 250 MPa hydrostatic pressure for 16 h. The solubilized protein samples were purified by affinity and size-exclusion chromatography. NMR-based structural analysis showed that the solubilized proteins formed the same folding with the samples from soluble fractions.

【序論】大腸菌発現系において封入体を形成したタンパク質を可溶化するためには、尿素などの変性剤による巻き戻しおよびアルギニン添加が広く用いられている。最近、静水圧によりタンパク質が可溶化できることが示されているが(1)、立体構造解析に応用されたのは一例のみである(2)。本研究の目的は、静水圧により封入体から可溶化したタンパク質の立体構造を NMR により解析することにより、立体構造研究のための試料調製法としての本手法の有用性およびその至適条件を提示することである。

【実験】Histag-GB1 融合タンパク質 (MOE2 tandem Zn-finger ドメインおよび mTOR FRB ドメイン) および GST 融合タンパク質 (ZIP PB1 ドメイン) を含む封入体を各種緩衝液に懸濁し、Barofold 社 M150 型圧力装置を用いて最大 250 MPa, 16 時間、室温にて静水圧を加え、可溶化した。加圧後試料を遠心した上清を各種クロマトグラフィーにより目的タンパク質を精製し、NMR スペクトルを測定、立体構造を評価・解析した。

圧力, リフォールディング, タンパク質立体構造解析

○おぐらけんじ, さいおともひで, こばしがわよしひろ, いながきふゆひこ

【結果】Histag 融合 MOE2 tandem Zn-finger ドメインは、全量が不溶性画分として発現した。封入体を各種緩衝液に懸濁し、200 MPa で 16 h 加圧したところ、50 μ M ZnSO₄ および 20 μ M β -メルカプトエタノールを含む pH8 の緩衝液条件にてもっとも可溶化された。Ni-NTA 樹脂アフィニティー精製ののち、融合タグ切除およびゲル濾過クロマトグラフィーにより最終精製試料を得た。三重共鳴多次元 NMR 法により本試料の立体構造を決定し、他の C2H2 型 Zn-finger と類似の立体構造を形成していることを確認した。

GST 融合 ZIP PB1 ドメインは、可溶性と不溶性の発現割合がほぼ等量であった。不溶性画分は、10 mM DTT を含む pH8 の緩衝液条件にてもっとも可溶化された。Glutathione-Sepharose 4B 樹脂アフィニティー精製ののち、融合タグ切除およびゲル濾過クロマトグラフィーにより最終精製試料を得た。NMR 測定をおこない、可溶性画分由来の精製試料の NMR スペクトルと比較したところ、両スペクトルは一致したため、圧力により可溶化した ZIP PB1 ドメインは正しい立体構造を有していることを確認した。

Histag-GB1 融合 mTOR FRB ドメインは、全量が不溶性画分として発現した。不溶性画分は、20 μ M β -メルカプトエタノールを含む pH8 の緩衝液条件にてもっとも可溶化された。Ni-NTA 樹脂アフィニティー精製ののち、融合タグ切除およびゲル濾過クロマトグラフィーにより最終精製試料を得た。NMR 測定をおこない、高次構造の存在を確認した。本ドメインの認識標的物質である rapamycin を滴定した際の ¹H-¹⁵N HSQC スペクトルの摂動により、標的結合部位を同定した。その部位は文献データと一致したので、本タンパク質が天然状態と同じ標的認識機能を有していることが確認された。

【結論】静水圧により可溶化したタンパク質は、NMR スペクトル測定および立体構造解析により、天然状態と同じ立体構造を保持していることが確認された。本手法は、構造生物学のための試料調製法として有効であり、特に GST 融合タンパク質についてはこれまで有効な可溶化法が提案されておらず、本手法の意義は大きいと考えられる。

【文献】

- (1) Qoronfle MW, Hesterberg LK, Seefeldt MB, Confronting high-throughput protein refolding using high pressure and solution screens. *Protein Expr Purif.* 2007 Oct;55(2):209-24.
- (2) Shieh HS, Mathis KJ, Williams JM, Hills RL, Wiese JF, Benson TE, Kiefer JR, Marino MH, Carroll JN, Leone JW, Malfait AM, Arner EC, Tortorella MD, Tomasselli A, High resolution crystal structure of the catalytic domain of ADAMTS-5 (aggrecanase-2). *J Biol Chem.* 2008 Jan 18;283(3):1501-7.

NMRを利用して有機化合物を定量する場合の解析条件が 定量値に与える影響に関する考察

○三浦亨¹、齋藤剛¹、井原俊英¹、小池昌義¹、前田恒昭¹、杉本直樹²、
多田敦子²、西村哲治²、有福和紀³、末松孝子³、山田裕子⁴、
吉田雄一⁴

¹ (独) 産業技術総合研究所 計測標準研究部門、² 国立医薬品食品衛生研究所、³ 日本電子株式会社、⁴ 和光純薬工業株式会社

Determination of NMR process parameter sets which give accurate results in quantitation of organic compounds

○Toru MIURA¹, Takeshi SAITO¹, Toshihide IHARA¹, Masayoshi Koike¹, Tsuneaki MAEDA¹, Naoki SUGIMOTO², Atsuko TADA², Tetsuji NISHIMURA², Kazunori ARIFUKU³, Takako SUEMATSU³, Yuuko YAMADA⁴, Yuuichi YOSHIDA⁴

¹National Metrology Institute of Japan, AIST, ²National Institute of Health Sciences, ³JEOL Ltd., ⁴Wako Pure Chemical Industries, Ltd.

Abstract

Quantification using NMR is one of the attractive methods for purity determination of organic compounds. We have determined parameter sets for spectral acquisition and their associated uncertainties for the quantification. Here, determination of process parameters, phase correction, baseline correction, and peak integration range, is discussed. We found that manually phase corrected data did not give much influence on the purity. Baseline correction was important for our data because of the back ground broad peak. Baseline correction influenced the peak area and its range of integration. Peak areas with baseline corrected properly became constant as integrating range reached as wide as ¹³C satellite peaks; while the area kept increasing when baseline was not constructed by the correction. For accurate purity determination, area integrations needed to be wider than the ¹³C satellite positions.

【緒言】

有機化合物の定量にはクロマトグラフ法が利用されることが多い。この手法で正確かつ精密（以下、精確）な定量値を得るためには、測定対象と同一の化合物を標準として検量線を作成することが必要となるが、すべての標準が整備されているわけではないという問題を抱えている。一方、¹H NMRによる定量法は、原理的にピーク面積が、共鳴している核の数に比例することから、異なる化学シフトにピークをもつ別の化学物質（内標準物質）を標準として用いることで目的の化学物質の量を測ることが可能な方法であり¹⁾、一つの標準で、多くの化合物に対して定量値を得ることが期待され

キーワード：定量NMR, 化学純度, 計量標準

著者ふりがな：○みうらとおる，さいとうたけし，いはらしひで，こいけまさよし，
まえだつねあき，すぎもとなおき，ただあつこ，にしむらてつじ，ありふくかずのり，す
えまつたかこ，やまだゆうこ，よしだゆういち

る。そこで、演者らはクロマトグラフ法に匹敵する2～3 %程度の不確かさ（ばらつき）での定量を目標に設定し、測定条件および解析条件の最適化を行っている。これまでの検討で、測定条件における最適化を行い、定量値に影響を与える要因を確認したことから²⁾、今回は解析条件における最適化を試みた。

【方法】

Table 1に最適化を行った測定条件と現在の解析条件を示した。解析に利用したスペクトルのシグナル-ノイズ比は、ノイズ範囲を1 ppmとした場合、各ピークの信号強度に依存するが、概ね1000から70 000の範囲であった。解析条件で今回は、ベースライン補正（baseline correction）、位相補正（phase correction）、積分区間（integration）がピーク面積およびそのばらつきに与える影響について、数値的に評価を行った。NMR測定はVARIAN社製^{Unity} INOVA 600Aで行い、得られたデータを主にACD社 ACD/SpecManagerで解析した。試料には和光純薬農薬標準品を用いた。また、内標準物質には14BTMSBd4（1,4-bis(trimethylsilyl)benzene-*d*₄）などを用いた。試料及び内標準物質をdichloromethane-*d*₂などで溶液としたものを試料溶液とした。

Table 1. Typical NMR measurement and process parameter sets used in this work.

Measurement conditions

nucleus	¹ H (599.90 MHz)
spectral width	59970.02 Hz
acquisition time	4 s
number of transients	32
pulse width	11 μ s ($\pi/2$)
decouple	¹³ C (acquisition period)
relaxation delay	60 s
temperature	25 °C

Process conditions

window function	off
phase correction	manual
baseline correction	on
integration	manual

【結果・考察】

・ 位相補正の影響

マニュアルで位相補正を行い最適と判断した位相を基準に、0次項と1次項を一定間隔で変化させたときの位相の変化が、ピーク面積（絶対値）に与える影響を、得られたスペクトルにおける複数のピークについて調べた。

0次項および1次項ともに基準から±3° の範囲では、得られたピーク面積の相対標準偏差は0.5 %以下となった。Figure 1(b)に示したように、位相の1次項が約2° ずれた場合には位相補正が正しく行われていないが、このような場合でもピーク面積には大きな影響を与えないことが分かった。さらに、基準からの位相のずれが10° になると、2 %を超えるピーク面積への影響が見られた。

一方、位相条件がランダムに設定されたスペクトルに対して、マニュアルで繰り返し10回の位相補正を行った場合の再現性は0次項および1次項ともに1° 以下であった。したがって、マニュアルで位相補正を行った場合、ピーク面積への影響は0.5 %以下であることが確かめられた。さらに、自動位相補正ではフーリエ変換後の位相条件が異なる場合でも同じスペクトルに対しては全く同じ位相を与えたが、スペクトルによっては目視で明らかな位相のずれがある場合が見られた。したがって、自動位相補正

を行う場合は、得られるピーク面積への影響について十分に確認する必要があると思われる。

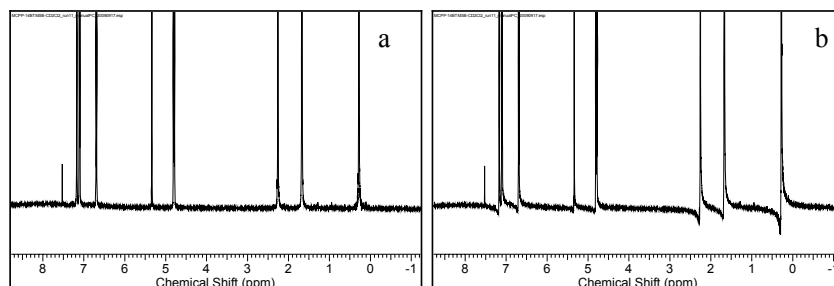


Figure 1. ^1H NMR spectra of MCPP. The phase setting of the spectrum a) was manually optimized, while first order term in spectrum b) was off by 2° .

・ ベースライン補正の影響

ベースライン補正前後のスペクトルをFigure 2に示した。測定においては定量性確保の観点からオーディオフィルターがフラットな帯域を確保するため、測定スペクトル幅を約100 ppmと非常に広くとっている。ベースライン補正をしなかった場合 (Figure 2(a)) は、バックグラウンドの影響 (ベースラインのゆがみ) が非常に大きかった。これが測定対象ピークの面積に影響を及ぼしている可能性が高いと考えられるので、Figure 2に示した補正条件で以下の評価を行った。まず、同じ試料について繰り返し測定を行った場合の同一ピークについてピーク面積の繰り返し性を評価した。その結果、面積のばらつきの大きさは、ベースライン補正の有無によらず変化しなかった。

一方、同じスペクトル内の複数ピークについて相対面積比を比較したところ、ベースライン補正をした場合の方が、しない場合に比べてピーク面積比が ^1H 数に比例することが確認された。これはベースライン補正によるバックグラウンド除去の効果と考えられ、相対面積比に関してはベースライン補正の有効性が確認された。

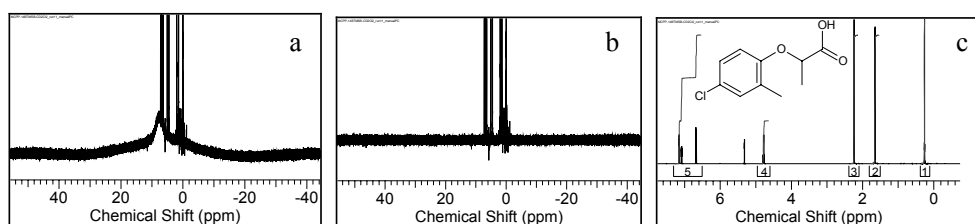


Figure 2. ^1H NMR spectra of MCPP; (a) baseline correction was not applied, (b) baseline correction was applied by Spectrum Averaging (box half width = 200, noise factor = 2) of ACD/SpecManager, and (c) expansion of the spectrum (b) between -1 ppm and 7.5 ppm, structure of MCPP, and area numbers which are shown above the chemical shift scale.

・ 積分区間の影響

積分区間に関しては、マニュアルで位相補正しベースライン補正をしたスペクトルについて検討を行った。積分区間の設定方法として、ここでは ^{13}C サテライトピークまでの区間を積分することを基準とし、これによって得たピーク面積を1に規格化し

て相対的に評価した。Figure 3に示した例のように、基準とした積分区間を中心に10 Hzずつずらして積分を行い、得られたピーク面積をプロットした結果をFigure 4に示した。ここでのPeak番号はFigure 2 (c) に示した積分区間に対応し、Peak 1は基準物質である $^{14}\text{BTMSBd4}$ の信号である。なお本評価に用いたスペクトルは ^{13}C デカップルを行っているので、 ^{13}C サテライトピークは現れない。

ピーク面積は積分区間を拡大するとともに徐々に増加し、ピーク4、5に関しては基準よりも広い区間でほぼ平衡化した。しかし、ピーク1、2、3については平衡化することなく積分区間が広がるほど増加する傾向が続いた。両者の差はベースライン補正が原因であった。すなわち、前者はベースライン補正により近傍のベースラインがよりフラットになったため、ピーク面積がほぼ一定になったのに対して、後者はピークが比較的込み入った部分であるために、今回利用した補正条件では、これらのピークの近傍については補正が適切に行われていなかった。一方、基準とした積分区間よりも狭い場合は、いずれのピークにおいても明らかに面積を過小評価しているため、 ^{13}C サテライトの内側の領域では精確なピーク面積を得られないことが判った。

現時点で積分区間の最適条件を示すのは困難だが、基準の外側30 Hzで積分することで、得られる面積のばらつきは比較的小さくなり、その不確かさは0.2 %と見積もられた。

【まとめ】

これまで解析条件に関する不確かさは数値化されていなかったが、解析条件の中で大きな不確かさ要因と考えられるものについて、その評価方法と不確かさをある程度確認することができた。引き続き検討を行い、より精確な定量値が得られるように解析条件の最適化を進め、発表時には、本要旨記載事項についてさらに詳細に報告する。

【参考文献】

- 1) T. Ihara, T. Saito, and N. Sugimoto, *Synthesiology* 2 (2009) 12-22.
- 2) T. Saito, S. Nakaie, M. Kinoshita, T. Ihara, S. Kinugasa, A. Nomura, and T. Maeda, *Metrologia* 41 (2004) 213-218.

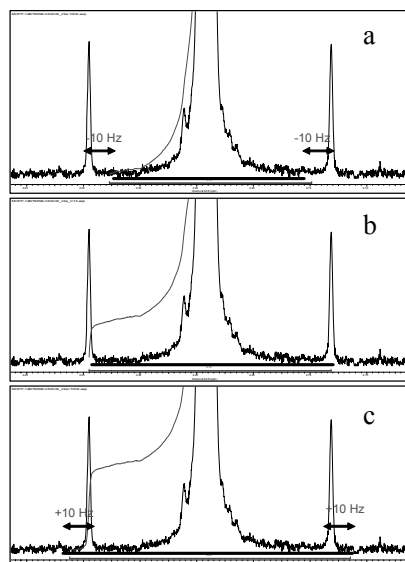


Figure 3. Schematic illustration of integration intervals used in this work; (a) -10 Hz, (b) standard interval, and (c) +10 Hz.

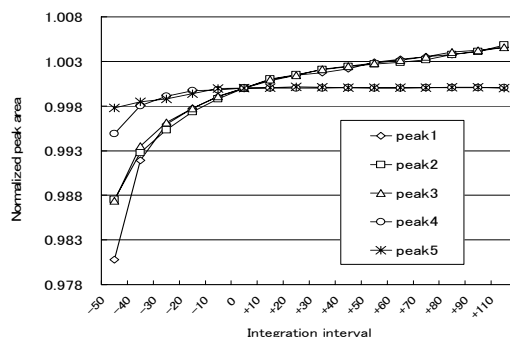


Figure 4. Relationship between peak area and its interval of integration. Peaks 1 through 5 corresponded to the intervals of areas indicated in Figure 2.

マウス由来乳がん細胞における超偏極 ^{13}C ピルビン酸の代謝解析と薬剤添加による影響の観測

○阿部 孝政¹, 久保 均², 原田 雅史², 前沢 博³, 西谷 弘⁴

¹オックスフォード・インストゥルメンツ株式会社 MRI/Bioutil事業本部

²徳島大学大学院 ヘルスバイオサイエンス研究部 画像情報医学分野

³徳島大学大学院 ヘルスバイオサイエンス研究部 放射線理工学分野

⁴徳島大学大学院 ヘルスバイオサイエンス研究部 放射線科学分野

Metabolic Analysis of Hyperpolarized ^{13}C -Labeled Pyruvate on Mouse Mammary Cancer Cell and Observation of Drug Induced Changes

○Takamasa Abe¹, Hitoshi Kubo², Masafumi Harada², Hiroshi Maezawa³ and Hiromu Nishitani⁴

¹MRI/Biotoools Division, Oxford Instruments KK, Tokyo, Japan.

²Department of Medical Imaging, Institute of Health Biosciences, University of Tokushima Graduate School, Tokushima, Japan.

³Department of Radiation Physics, Engineering and Biology, Institute of Health Biosciences, University of Tokushima Graduate School, Tokushima, Japan.

⁴Department of Radiology, Institute of Health Biosciences, University of Tokushima Graduate School, Tokushima, Japan.

The application of nuclear magnetic resonance (NMR) for metabolic analysis has been limited by the intrinsically low sensitivity of ^{13}C nuclei. Recently, dynamic nuclear polarization (DNP), which is a technique for increasing NMR signal intensity, has been shown to enable to detect *in vivo* metabolism and pathological process^{1), 2)}. In this study, hyperpolarized 1- ^{13}C pyruvate was utilized as a metabolic tracer to monitor metabolism on mouse mammary cancer cell cultivated in the RPMI1640 medium with/without glucose, and 5-fluorouracil (5FU) was added to the culture medium to investigate the drug effect for metabolism. The conversion of pyruvate to lactate, alanine and bicarbonate was observed with high signal-to-noise ratio in acquired spectra. From the results of calculated kP/cell, kL/cell and AUC(Lac/Pyr), it was confirmed that 5FU affect the cell metabolism.

1. はじめに

近年、生体機能や代謝解析に核磁気共鳴法が用いられるようになってきたが、短時間での代謝変化を検出する場合には感度の問題から ^1H や ^{31}P といった核に限られている。 ^{13}C および ^{15}N 核は広範囲な化学シフトを持つためシグナル分離がよく、代謝物の同定が容易であることからその応用が期待されているものの、感度が低く短時間で情報を得ることは難しい。そこで、動的核偏極 (DNP) の手法を用いて ^{13}C 核の感

hyperpolarization, dynamic nuclear polarization, DNP

○あべたかまさ, くぼひとし, はらだまさふみ, まえざわひろし, にしたにひろむ

度を劇的に改善することにより、生体内の機能を直接的に観測しようとする試みがいくつか報告され^{1), 2)}、注目を集めている。我々は ^{13}C ピルビン酸をトレーサーとしてグルコースの有無が異なる2種類の培養液で培養したマウス由来乳がん細胞における代謝変化を検出することを試みた。さらに、抗がん剤の1種である 5-fluorouracil (5FU) の添加による代謝への影響を観察したので報告する。

2. 実験方法

$1\text{-}^{13}\text{C}$ ピルビン酸 2.6mg を 50 μl D_2O /Glycerol=3:2 ガラス化溶媒に溶解し、そこに 15 mM の濃度となるように trityl radical(OX63)を添加した。核偏極装置には HyperSense[®](Oxford Instruments 製)を用い、試料を 3.35 T の静磁場で 1.4 K に冷却して 70 分間の偏極を行った。対象細胞はマウス由来 FM3A 乳がん細胞で、RPMI1640 培地およびそこからグルコースのみ抜いたもので 48 時間培養した。5FU は 2 μM を測定 22 時間前に加え、さらに 200 μM を測定 1 時間前に添加した。測定直前に培養細胞を遠心分離して濃縮しておき、PBS に 0.01 % EDTA 添加した溶液 3 ml で偏極試料を溶解した後、直ちにそれらを混合して NMR 測定を行った。NMR 装置は Bruker DRX600、5 mm ϕ のブロードバンドプローブを用い、プロトンデカップリングを併用した 15 度パルスにより 1 秒間隔、4 回積算の測定を 120 秒間経過するまで行った。得られたスペクトルのピルビン酸およびその代謝物である乳酸のシグナル強度を 2 状態モデルでフィットし³⁾、細胞あたりのピルビン酸及び乳酸の反応速度定数(kP/cell, kL/cell)、曲線下面積の乳酸/ピルビン酸比(AUC(Lac/Pyr))を求めた。また、NMR 測定後に測定サンプルの一部を取り出してトリパンブルー染色後、顕微鏡下での観察により細胞数および細胞生存率を調べた。

3. 実験結果と考察

培地のグルコースの有無、そして 5FU 添加の有無によって、得られるスペクトルに差異が確認された。そして算出した kP/cell、kL/cell および AUC(Lac/Pyr)から以下の点が明らかとなった。1. グルコース含有培地に比してグルコース無添加培地では kP, kL が有意に高い。2. 5FU を添加した場合では kP, kL が有意に低い。3. グルコース無添加培地では 5FU 投与時の kP 低下の度合いがグルコース含有培地に比して大きく、また kL 上昇の度合いが小さい。これらの結果から、DNA 合成阻害剤である 5FU はがん細胞において糖代謝にも影響を及ぼすことが確認され、特に低栄養下において与える効果が大きいことが示唆された。

参考文献

- 1) Golman K. *et al.*, *PNAS*, 103, 30, 11270-11275 (2006)
- 2) F. A. Gallagher, *et al.*, *Nature*, 453(7197), 940-943 (2008)
- 3) Day SE, *et al.*, *Nature Medicine*, 13(11), 1382-87 (2007)

Self-Diffusion of Ions in a Confined Nanostructure: NMR Assessment of Ionic Conduction in a Thermotropic Ionic Liquid Crystal

○Anton E. Frise^{1,2}, Takahiro Ichikawa¹, Masafumi Yoshio¹, Hiroyuki Ohno³, Sergey V. Dvinskikh², Istvan Furo², and Takashi Kato¹

¹*Department of Chemistry and Biotechnology, School of Engineering, The University of Tokyo, Tokyo, Japan*

²*Division of Physical Chemistry, Department of Chemistry, Royal Institute of Technology, Stockholm, Sweden*

³*Department of Biotechnology, Tokyo University of Agriculture and Technology, Koganei, Tokyo, Japan.*

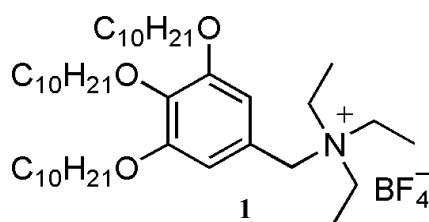
Abstract

Detailed investigation of molecular mobility in nanostructured ion-conductive materials is essential for understanding their dynamic functions. For this purpose we have determined the distinct self-diffusion coefficients of anions and cations in an ion-conductive material that exhibits a thermotropic bicontinuous cubic liquid-crystalline phase by Pulsed-Field-Gradient Nuclear Magnetic Resonance (PFG-NMR) spectroscopy. The results show that dissociating cations and anions in the nanostructured liquid-crystalline phase form ion pairs and clusters in the isotropic phase.

Introduction

Ionic interactions can be utilized for the self-assembly and phase segregation of amphiphilic molecules to achieve new functional liquid-crystalline soft materials [1]. We have previously reported that an ionic liquid based on a fan-shaped ammonium salt (Fig. 1) exhibits a bicontinuous cubic (Cub_{bi}) liquid-crystalline phase [2]. The self-organized material forms a continuous network of ion nano-channels that promote efficient ion conduction. The material shows a steep decrease in ion conductivity at the Cub_{bi} to isotropic phase transition, presumably due to a collapse of the ion channel network [2].

In this study, the diffusion coefficients of ions in ionic liquid crystal **1** were measured by NMR spectroscopy to investigate the dynamic properties of the material. Compound **1** melts to the Cub_{bi} phase at 42°C and shows a phase transition from Cub_{bi} to isotropic (disordered) liquid at 82°C. Pulsed-Field-Gradient (PFG) NMR was employed to determine the diffusion coefficients of both cation and anion over a temperature interval encompassing both Cub_{bi} and isotropic phases. The self-diffusion coefficients were determined by ¹H- and ¹⁹F-NMR for the cations and anions, respectively.



Crystal 42 Cub_{bi} 82 Isotropic

Fig.1 Fan-shaped ammonium salt exhibiting a bicontinuous cubic liquid-crystalline phase.

Experimental

The measurements were performed on a Bruker DMX200 spectrometer equipped with a 10 mm pulsed field gradient probe with 9.6 T/m maximum gradient. The temperature at the sample position was carefully measured with an external thermocouple for both proton and

fluorine radiofrequency inserts. The stimulated-echo pulse sequence was employed and the self-diffusion coefficients were obtained by fitting the echo attenuations to the Stejskal-Tanner equation [3]. A typical echo attenuation is shown in Fig. 2. The nominal values for all diffusion coefficients were calibrated towards the diffusion of water at 298 K [4].

Results

In Table 1, typical values for the diffusion coefficients of cation and anion in both phases are shown. In the Cub_{bi} phase we have found that the anion diffusion is approximately twice as fast as the cation diffusion, while in the isotropic phase the difference in diffusion coefficients between cation and anion is insignificant. Thus, the NMR results suggest that dissociating cations and anions in the liquid-crystalline phase form ion clusters in the isotropic phase, leading to the reduction in the ionic conductivity.

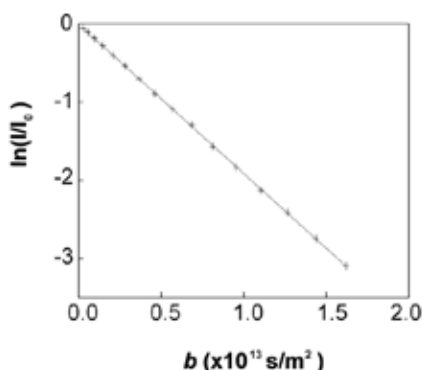


Fig. 2 Normalized signal amplitudes of a stimulated echo decay vs. the Stejskal-Tanner factor, $b = (\gamma g \delta)^2 (\Delta - \delta/3)$, for the anion in the bicontinuous cubic liquid-crystalline phase (66 °C). The solid line is a linear fit with an adjusted R^2 -value higher than 0.9999.

Table 1. Examples of diffusion coefficients in the ion-conductive material.

	Diffusion coefficient ($\text{m}^2 \text{s}^{-1}$)	
	Cation	Anion
60°C (Cub _{bi})	4.63×10^{-14}	1.15×10^{-13}
90°C (Iso)	2.39×10^{-12}	2.29×10^{-12}

Acknowledgements

A.E.F acknowledges financial support from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology (MEXT) and the Swedish Foundation for International Cooperation in Research and Higher Education (STINT). This work was partially supported by Grant-in-Aid for Scientific Research (A) (No. 19205017; T.K.) from the Japan Society for the Promotion of Science (JSPS).

References

1. T. Kato, *Science*, 2002, 295, 2414-2418; T. Kato, N. Mizoshita, K. Kishimoto, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2006, 45, 38-68; M. Yoshio, T. Kagata, K. Hoshino, T. Mukai, H. Ohno and T. Kato, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, 128, 5570-5577.
2. T. Ichikawa, M. Yoshio, A. Hamasaki, T. Mukai, H. Ohno, and T. Kato, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, 129, 10662-10663.
3. E. O. Stejskal and J. E. Tanner, *J. Chem. Phys.*, 1965, 42, 288-292.
4. R. Mills, *J. Phys. Chem.*, 1973, 77, 685-688.

東大院農・応生化¹, 東薬大・薬², 明星大・理工³○降旗一夫¹, 田代(下高原) 櫻子², 湊澤庸一², 田代 充³Application of WET sequence for the detection of the ligand signals
resonating close to water

a Division of Agriculture and Agricultural Life Sciences, The University of Tokyo,

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

c Department of Chemistry, College of Science and Technology, Meisei University,

Kazuo Furihata^a, Sakurako Shimotakahara^b, Yoichi Shibusawa^b and Mitsuru Tashiro^c

An efficient pulse sequence for observing the ligand signals resonating close to the water signal has been developed by incorporating the WET technique into the saturation transfer difference pulse sequence. Although several pulse sequences have been developed for observing a ligand binding with a protein receptor, the ligand signals resonating close to the water were undetectable owing to the interference of the huge water signal in the samples containing 95% $^1\text{H}_2\text{O}$. On the point of sample preparation, it is preferable to avoid the solvent exchange in the protein samples. In the proposed pulse sequence, a WET sequence is incorporated for the selective suppression of the water resonance. The efficient water suppression and the clear observation of the bound ligand signals close to the water have been demonstrated using the lysozyme-glucose complex.

はじめに

レセプターと結合するリガンドを観測する方法として、STD 法が使われている¹⁾。そして、その変法として Water-LOGSY 法が報告された^{2), 3), 4)}。これらの方法とともにレセプターを飽和させ、レセプターと結合しているリガンドを検出する。通常は軽水溶液では、観測段階で如何に水シグナルを消去するかが問題であった。この方法の一つとして、hard pulse による Water Gate 法が使われるようになった⁵⁾。この hard pulse の Water Gate

法は設定も測定も容易であることが特徴であるが、励起範囲が広く、水近傍のシグナルを消去してしまうという欠点を有している。水近傍の STD シグナルを観測する目的で Water Gate 法に対して presaturation 法を検討し、presaturation の一種 WET 法⁶⁾と z-filter の応用した WET-STD 法が良好な結果を得ることが判明したので報告する。

パルス系列

Fig.1 に WET-STD のパルス系列を示す。

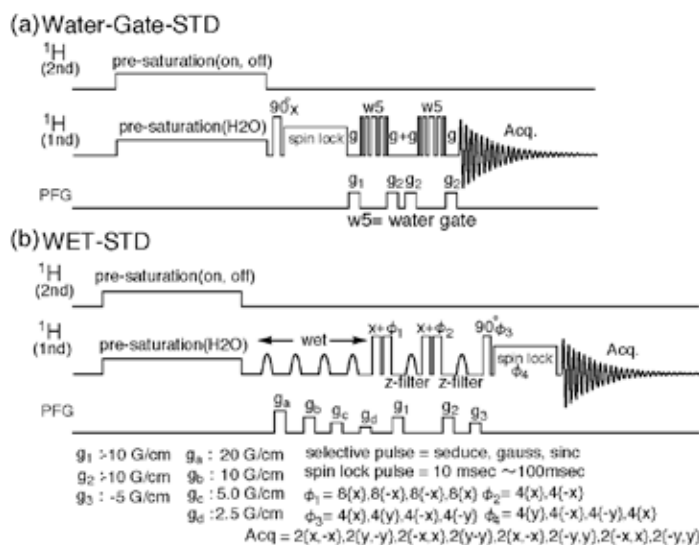


Fig.1 Pulse sequence of STD

STD, Water LOGSY

○ふりはたかずお、しもたかはら(たしろ) さくらこ、しぶさわよういち、たしろみつる

この方法は WET-NOESY pulse⁶⁾をもとにして、presaturation の WET-STD 法にしたものである。1D-NMR の水消去法としては、presaturation-NOESY 法が有効であることは知られている。この方法は巨大な水シグナルを presaturation 法で飽和し、残る水シグナルは差スペクトル (NOESY) で消去することにある。しかし、実際は水シグナルの消去は不十分である。そこで、更に水の消去を高めるために、WET-NOESY 法を検討し、z-filter を更に追加した。また、z-filter

には FG pulse と selective 90 pulse を導入し、z-filter の効率を高めた。この FG pulse と selective pulse は更に水シグナルを saturation するものである。また、水消しが不十分な場合は、必要に応じては WET pulse の手前に presaturation をも入れる。Selective pulse としては選択性が高く pulse 中の短い seduce90 を使用した。この水消し 1D-NMR を STD 法に応用した。結合の弱い STD シグナルを観測する場合は T_2 フィルター (spin lock) は欠かせない。STD 法はリガンドのアルファティック領域の照射と被照射のスペクトルを交互に差スペクトルとして積算する。

Fig. 2 には 1D-NMR による水 saturation の profile、(a) Water Gate、(b) WET-STD (square90)、(c) WET-STD (seduce90) を示す。

Water gate 法 (a) では観測中心の 500Hz から 800Hz が off resonance となり、広い範囲にわたり、シグナルは観測されないことを示す。これに対して、square pulse (10msec) (b) を使用した WET-1D-NMR では、観測中心 120Hz ぐらいを saturation した profile を示すが、square pulse 特有の sidelobe が生じ、シグナルの選択性を落としている。一方、seduce90

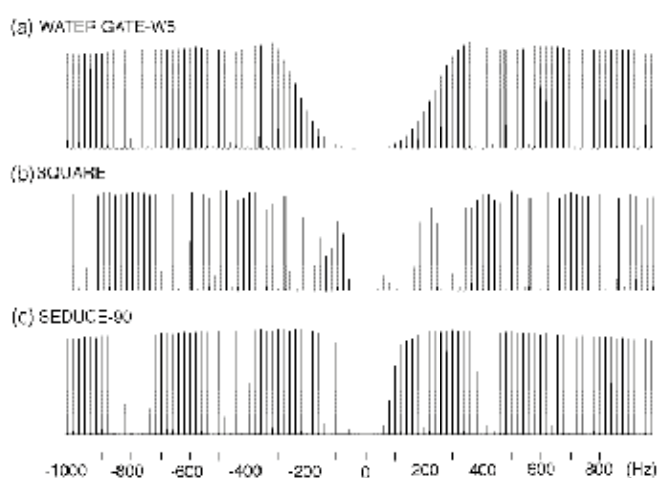


Fig.2 Experimental excitation profiles for solvent suppression pulses

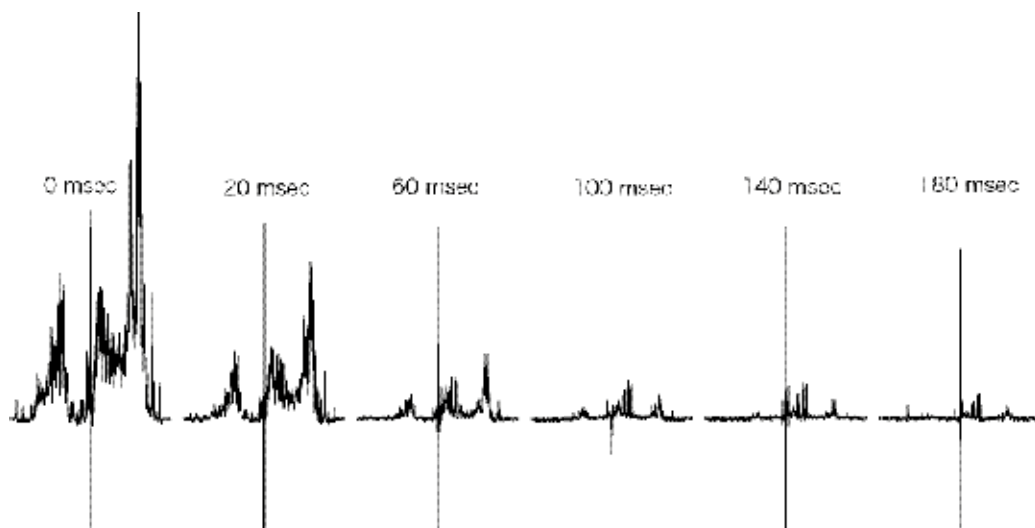


Fig.3 Effects of spin lock in WET-STD experiments
The entire spectrum is displayed (-2ppm~11ppm)

pulse(18msec)(c)の場合は、saturation 領域は square pulse と同じであるが、シグナルの切り込みが鋭い profile となり、選択性が高いことを示す。磁場強度は(b) $\gamma H_1/2\pi = 25.0\text{Hz}$ と(c) $\gamma H_1/2\pi = 31.5\text{Hz}$ である。このように、seduce を使用した WET-STD の 1D-NMR の方が水シグナルを saturation し、水近傍のシグナルを観測するには有利であることがわかる。Seduce pulse の他には、gauss pulse や sinc pulse でも良い結果が得られた。

Fig. 3 は Lysozyme (0.4 mM) と glucose(10 mM) の混合物サンプルで、WET-STD 法における T_2 -filter の効果を検討したスペクトルである。Lysozyme のメチル基領域を照射した。 T_2 -filter は 0 msec, 20 msec, 60 msec, 100 msec と可変して測定した。0 msec (T_2 -filter なし) の時は saturation された Lysozyme シグナルが観測され、目的の Glucose のシグナルを観測することができない。 T_2 -filter を 60 msec, 100 msec と長く入れることにより Lysozyme のシグナルは減衰し、 T_2 -filter=100 msec の時、Lysozyme のシグナルは、ほぼ 1/10 まで減衰し Glucose のシグナルを観測した。このように、結合の弱い STD シグナルを観測するには長い T_2 -filter が必要になってくる。

Fig. 4 は Lysozyme と glucose の混合物において、水近傍の STD シグナルの観測について検討した。(a)Water Gate STD, (b)presaturation-STD, (c)presaturation WET-STD のスペクトルを示す。ともに T -filter=100 msec を用いて、lysozyme のシグナルを消去している。

(a)は STD-Water Gate のスペクトルである。軽水が消去されていると共に、その近傍の glucose の 1 位の $H\alpha$, $H\beta$ のプロトンシグナルも消去している。

(b)は presaturation-STD 法、

(c)は presaturation-WET-STD スペクトルである。(b)では Glucose の $H1\alpha$ のプロトンはつぶれ明確ではないが、水近傍の $H1\beta$ のプロトンの観測ができた。

一方、(c)においては、Glucose の $H1\alpha$ $H1\beta$ のプロトンシグナルを共に観測した。水近傍のシグナルを観測するには水シグナルを如何に低く抑えることができるかがポイントとなるが、このように、presaturation-WET-STD 法は、近傍のシグナルの観測には有効であることが示された。

Water LOGSY 法について

Fig. 5 は、STD と Water LOGSY の感度を比較したスペクトルである。STD と同じような結果を得る方法として、Water LOGSY 法がある。Water LOGSY 法と STD 法において、感度に違いがあるか検討した。サンプルは、Human

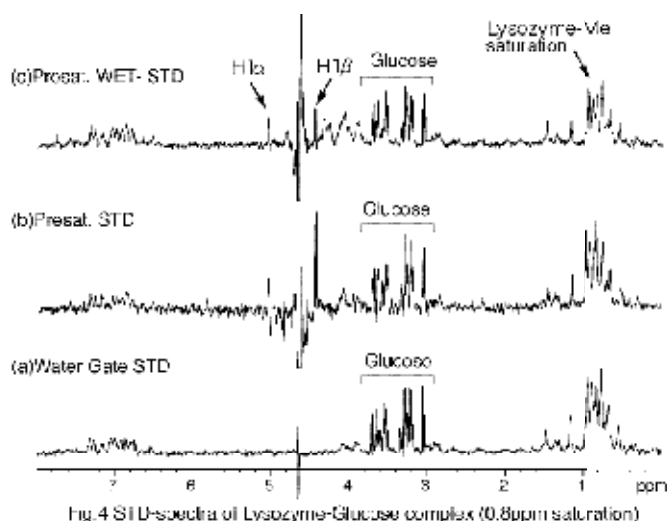


Fig. 4 STD-spectra of Lysozyme-Glucose complex (0.8ppm saturation)

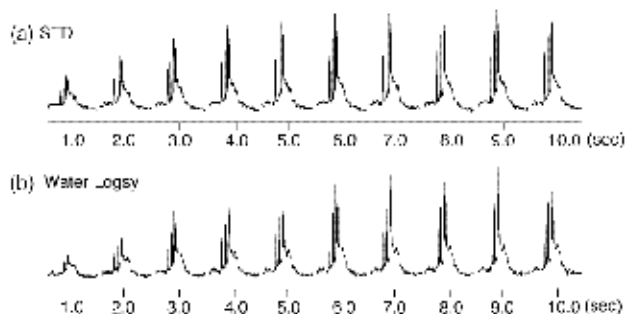


Fig.5 STD and Water LOGSY spectra for Tryptophan as functions of HSA saturation time

Serum Albumin (HSA) 0.1 mM
と Tryptophan 2 mM の complex、
(10%D₂O pH7.2) を使用した。

Pulse 系列は Water Gate-STD
(T₂-filter なし) を使用し、
STD の場合はメチル基領域を、
Water LOGSY の場合は軽水シ
グナルをそれぞれ照射し、照
射時間の依存性を検討した。

(Dalvit らの transient タイ
プの WaterLOGSY pulse^{2), 3)} は
使用しない。) 観測したシグナ
ルは HSA に結合した
Tryptophan のシグナルである。

このスペクトルからは STD 法においても Water LOGSY 法においても、感度の違いは見いだ
せなかった。また、照射時間は長いほど感度は向上することがわかった。

Fig. 6 において、Lysozyme と Glucose の混合物の (a) STD スペクトルと (b) Water LOGSY
スペクトルを示す。Water Logsy の pulse 系列として WET-STD の pulse を使用した。この
pulse を Water Logsy 法として使用する場合は presaturation は使用できない。この場合、
短時間で軽水を saturation する WET pulse は非常に有効であった。軽水の照射と被照射
のスペクトルを交互に差スペクトルとして積算した。このスペクトルでは STD のスペクト
ルとは異なり、Glucose の signal は位相が反転したスペクトルを与える。しかも、signal
強度も強い。Water LOGSY 法の一つの特徴として、タンパクに結合したシグナルと結合し
ないシグナルにおいて、位相が逆転するために、結合しているかいないかの判別が容易にで
きることが特徴であった。しかし、この Lysozyme と Glucose のサンプルのように、(a) STD
測定 (spin lock=100ms) では Lysozyme と Glucose の弱い結合があることを示すことがで
きたのに対して、(b) Water LOGSY 法では Glucose シグナルが位相反転を示した。これは水
と Glucose と結合関係が強く観測され、Lysozyme と Glucose との弱い結合関係を示すこ
とができない。

まとめ

軽水中でのレセプターと結合するリガンドを観測する方法として、Water LOGSY 法より
は Water Gate-STD 法の方が測定は容易である。しかし、軽水近傍のシグナルをターゲッ
トにした場合は Water Gate-STD 法では測定は困難になる。軽水近傍のシグナルをターゲ
ットにした場合は軽水の消去が重要になる。その一つの解決法として、WET-STD 法が良い
データを与えることが判明した。

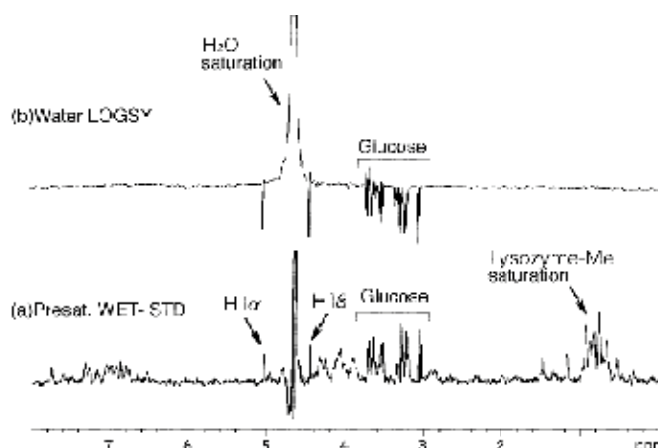


Fig 6 STD and Water LOGSY spectra of Lysozyme-Glucose complex

- 1). M. Mayer, B. Meyer, J. Am. Chem. Soc. 2001, 123, 6108.
- 2). C. Dalvit, P. Pevarello, M. Tato, M. Veronesi, A. Vulpetti, M. Sundstrom, J. Biomol. NMR 2000, 18, 65.
- 3). C. Dalvit, G. P. Fogliatto, A. Stewart, M. Veronesi, B. J. Stockman, J. Biomol. NMR 2001, 21, 349.
- 4). K. Furihata, S. Simotakahara and M. Tashiro, Magn. Reson. Chem. 2008, 46, 799-802
- 5). M. Liu, X. Mao, C. Ye, H. Huang, J. K. Nicholson, J. C. Lindon, J. Magn. Reson. 1998, 132, 125.
- 6). S. H. Smallcombe, S. L. Patt and P. A. Keifer, J. Mag. Reson 1995, A 117, 295-303

***Brevibacillus choshinensis* 分泌発現系を用いた
アミノ酸選択的安定同位体標識試料作成**

○谷生道一、楠英樹、田中利好、田中剛史、河野俊之
三菱化学生命科学研究所 (MITILS)

**Amino acid selective isotope labeling of proteins secreted by
Brevibacillus choshinensis for NMR study**

○Michikazu Tanio, Hideki Kusunoki, Rikou Tanaka, Takeshi Tanaka, and Toshiyuki Kohno
Mitsubishi Kagaku Institute of Life Sciences (MITILS)

The gram-positive bacterium *Brevibacillus choshinensis* has been used to produce recombinant proteins with disulfide bonds. Here we established the amino acid-type selective isotope labeling method using by the *B. choshinensis* expression system. The analyses of ^1H - ^{15}N HSQC NMR spectra of the recombinant proteins with a ^{15}N -labeled amino acid demonstrated that Ala, Arg, Asn, Cys, Gln, His, Lys, Met and Val are suitable for selective labeling, although acidic and aromatic amino acids are not suitable. The ^{15}N labeling for Gly, Ile, Leu, Ser and Thr resulted in scrambling to specific amino acids. These results indicated that the *B. choshinensis* expression system is an alternative tool for amino acid-type selective labeling of proteins, especially secretory proteins, for NMR analyses.

【序】NMR によるタンパク質の構造機能研究に於いて、安定同位体標識試料の作成は必要不可欠な技術である。特にアミノ酸選択的標識は、均一標識の場合では複雑に信号が重なり合うスペクトルをより単純化し、帰属の簡略化のみならず、局所構造とダイナミクスに関する情報も得られやすくなるなど、様々な利点がある。我々はこれまで、グラム陽性菌の *Brevibacillus choshinensis* 分泌発現系を用いた、細胞質および分泌性タンパク質の ^{15}N 均一標識法を確立し、本発現系が特にジスルフィド (SS) 結合を有する分泌性タンパク質の NMR 研究に有用であることを示してきた¹⁾。本研究では、この発現系を用いたアミノ酸選択的標識法の確立、および実際の分泌性タンパク質への応用を目的とした²⁾。

【方法】アミノ酸選択的標識法確立のためのモデルタンパク質として、細胞質タンパク質であり、既に NMR 信号の帰属が成されている 12-kDa ヒト FK506 結合タンパク質 (FKBP) を採用した。SS 結合を有する分泌タンパク質の例としてヒト M-フィコリン異物認識ドメイン (FD1, 26.8 kDa; Fig.1A) を採用した。発現ベクターおよび宿主は、それぞれ pNCMO2 および *B. choshinensis* HPD31-SP3 株 (タカラバイオ) を用いた。エレクトロポレーション法によって得られた形質転換体は、 ^{15}N 標識アミノ酸 (100 mg/L) を添加した非標識 C.H.L 培地 (クロレラ工業、Pro を除く 19 種類を調製) にて 1-5 日間培養し、培地中に分泌された目的試料を、アフィニティーおよびゲル濾過クロマトグラフィーにより精製し、 ^1H - ^{15}N HSQC NMR 測定を行った²⁾。

Brevibacillus choshinensis, secretion, isotope labeling, recombinant protein

○たにお みちかず、くすのき ひでき、たなか りこう、たなか たけし、こうの としゆき

【結果と考察】 ^{15}N アミノ酸標識FKBPの ^1H - ^{15}N HSQC NMRスペクトルにおける、各アミノ酸残基の平均信号強度比を解析した結果、*B. choshinensis*では9種類のアミノ酸 (Ala, Arg, Asn, Cys, Gln, His, Lys, Met, Val) で選択的標識が可能であることが分かった (Table 1)²⁾。一方、酸性および芳香族アミノ酸は、ほぼ全てのアミノ酸へ代謝され、Gly, Ile, Leu, SerおよびThrは、それぞれ特定のアミノ酸へ代謝されることが明らかとなった²⁾。

同様の方法で、FD1のアミノ酸選択的標識を試みたが、標識アミノ酸のみを添加したC.H.L.培地ではFD1の発現が極めて低かった。そこで、低代謝である9種類のアミノ酸のうち、Cysを除く8種類をそれぞれ100 mg/Lとなるように添加したC.H.L.培地 (C.H.L.aa) を用いたところ、FD1の発現量が上昇した (2-5.5 mg/1 L培養)。この結果を基に、目的アミノ酸のみを ^{15}N 標識した、あるいは ^{15}N 標識Cysを添加したC.H.L.aa培地を用いることにより、9種類のアミノ酸選択的標識FD1の調製、およびそれらの ^1H - ^{15}N HSQC NMRスペクトルの取得に成功した (Fig.1)²⁾。

*B. choshinensis*分泌発現系は、大腸菌発現系と同程度の操作技術および実験設備があれば、比較的容易に導入できるため、今後、特にSS結合を有する分泌性タンパク質のNMR研究に大きく貢献するものと期待される。

Table 1 Amino acid scrambling in *B. choshinensis*²⁾

$[\alpha\text{-}^{15}\text{N}]$ Amino acid	Mainly scrambling to	Scrambling rate (%)
Ala	—	< 20
Arg	—	< 35
Asn	—	< 30
Asp	almost all	—
Cys	—	< 18
Gln	—	< 61
Glu	almost all	—
Gly	Cys, Ser, Trp	—
His	—	< 25
Ile	Leu, Val	—
Leu	Ile, Val	—
Lys	—	< 26
Met	—	< 16
Phe	almost all	—
Ser	Cys, Gly, Trp	—
Thr	Cys, Gly, Ser, Trp	—
Trp ^a	almost all	—
Tyr	almost all	—
Val	—	< 23

^a $[\alpha, \epsilon\text{-}^{15}\text{N}]$ Trp

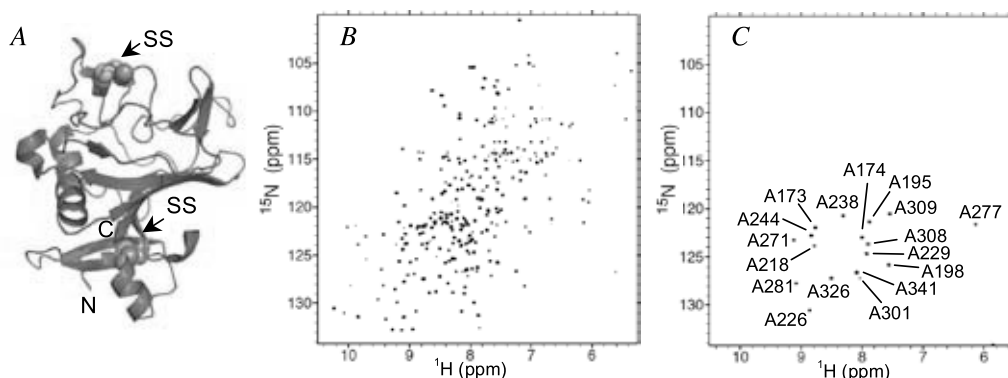


Fig. 1. Crystal structure of FD1 (A, PDB ID 2D39)³⁾ and the ^1H - ^{15}N HSQC spectra of uniformly ^{15}N (B) and ^{15}N -Ala (C) labeled FD1 (F127S/L128S monomer mutant)²⁾.

- 【参考文献】 1) Tanio *et al.*, (2008) *Anal. Biochem.* **373**, 164-166.
 2) Tanio *et al.*, (2009) *Anal. Biochem.* **386**, 156-160.
 3) Tanio *et al.*, (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 3889-3895.

4 塩基コドンを利用したメチオニン番号特異的 安定同位体標識方法

○岡田潔^{1, 2}, 米山桃子^{1, 3}, 田中利好¹, 田中剛史¹, 河野俊之¹
¹ (株) 三菱生命研, ² 現・東農大・応生,
³ 現・奈良先端大・バイオ

Stable isotope labeling of specific methionine residue in protein by four-base codon method for NMR study.

○Kiyoshi Okada^{1, 2}, Momoko Yoneyama^{1, 3}, Rikou Tanaka¹,
 Takeshi Tanaka¹, Toshiyuki Kohno¹
¹ MITILS, ² TUA・Department of Bioscience,
³ NAIST・Graduate School of Biological Sciences

The determination of protein structure is important for understanding functional expression of protein and drug development. NMR spectroscopy and X-ray crystallography methods are used to determine protein structures. Particularly, NMR spectroscopy is promptly analyzed in protein-protein and protein-compound interaction analyses. However, a problem of NMR spectroscopy is that high concentrations and purity of protein are needed. Moreover, higher molecular weight proteins cannot be analyzed by NMR spectroscopy. The purpose of this study is to solve these problems with residue-specific stable isotope labeling using four-base codon method.

【背景】タンパク質の立体構造を知ることは、そのタンパク質がどのように機能発現しているかを原子レベルで深く理解する上でも、さらには、その理解をもとに疾患関連タンパク質の機能を制御する薬剤の効率的な設計を行う上でも極めて重要である。タンパク質の立体構造を明らかにする手法には、NMR 法と X 線結晶構造解析があり、特に NMR 法はタンパク質-タンパク質やタンパク質 - 低分子化合物の相互作用解析を迅速に行うことができる。しかし、このような解析を行うには高純度・高濃度の試料が必要である。また、解析可能なタンパク質の分子量にも上限がある。本研究の目的は、これらの問題を解決するために、リボサイム(1)と 4 塩基コドン法(2)を用いてタンパク質のアミノ酸番号特異的な安定同位体標識方法の開発を行うことである。

4 塩基コドン法, 安定同位体標識法, 無細胞合成系

○おかだきよし、よねやまももこ、たなかりこう、たなかたけし、こうのとしゆき

【方法】本研究では、標準試料として大腸菌無細胞合成系で合成でき、安定なヒト由来の FK506 結合タンパク質 (FKBP) を用いた。FKBP 中のメチオニンをアミノ酸番号特異的に標識するため、一ヶ所ずつメチオニンコドン (AUG) を 4 塩基コドン (CGGG) に置換した 3 種類のプラスミドを作成した (Fig. 1)。また、リボザイムを用いたアミノアシル化を行い Methyl- ^{13}C -Met-tRNA^{accg} を作成した。そして、作成したプラスミドと Methyl- ^{13}C -Met-tRNA^{accg} を用いて、大腸菌無細胞合成系の RTS システムで標識 FKBP (Wt、M29、M49、M66) を合成した。標識 FKBP を TALON Metal Affinity Resin により精製し、NMR 測定を行った。

【結果および考察】標識 FKBP を合成し精製した結果、Wt は 240 μg 、M29 は 15 μg 、M49 は 2 μg 、M66 は 21 μg 得られた。標識 FKBP の ^1H - ^{13}C HSQC スペクトルを測定した結果、Wt では 3 つのシグナルが観測され、M29、M49 および M66 では、それぞれ一つだけシグナルが観測された (Fig. 2)。Wt のシグナルに M29、M49 および M66 のシグナルを重ねたところ全て重なり FKBP のメチオニンのメチル基の帰属が行うことが出来た。以上の結果から FKBP のメチオニンをアミノ酸番号特異的に標識することに成功した。

Wildtype FKBP (Wt)

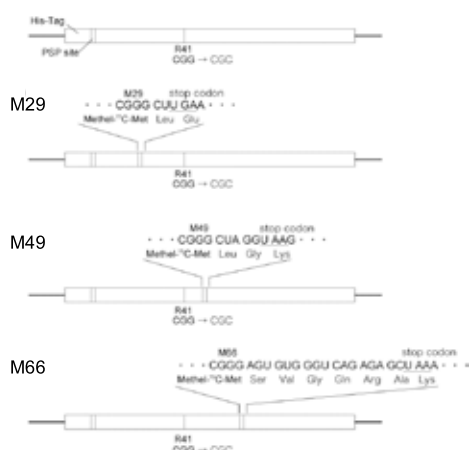


Fig. 1. Nucleotide and amino acid sequences of FKBP containing four-base codon CGGG.

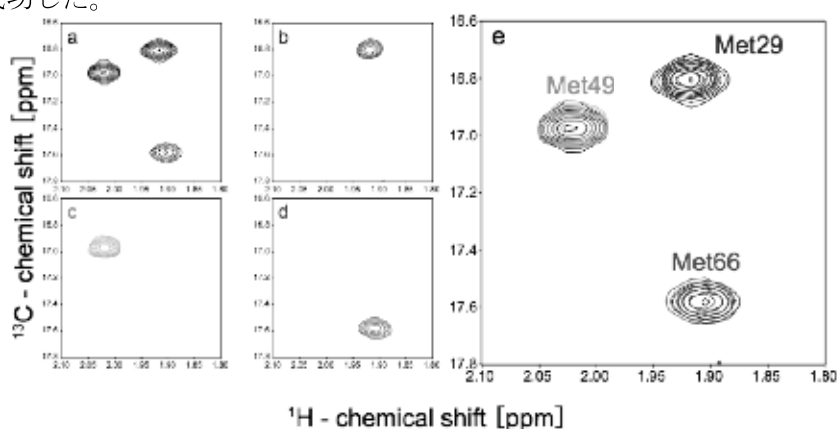


Fig. 2. ^1H - ^{13}C HSQC spectrum of labeled FKBP: (a) Wt, (b) M29, (c) M49 and (d) M66.

(e) Assignment of methyl groups of methionine at FKBP.

【参考文献】 (1) Hohsaka, T. et al. *J. am. chem. soc.* **1996**, 118, 9778-9779.
(2) Murakami, H. et al. *Nature Methods* **2006**, 3, 357-359.

網羅的代謝物アノテーションサーバーSpinAssign を用いた NMR メタボロミクス入門

○近山英輔¹、坪井裕理²、長濱淳子¹、関山恭代¹、菊地淳^{1,3,4}

¹理研PSC、²理研ASI、³横浜市院生命、⁴名大院生命農

Introduction to NMR Metabolomics with SpinAssign: A Comprehensive Metabolite Annotation Server

Eisuke Chikayama¹, Yuuri Tsuboi², Junko Nagahama¹, Yasuyo Sekiyama¹, Jun Kikuchi^{1,3,4}

¹RIKEN PSC, ²RIEKN ASI, ³Graduate School of Bionano., Yokohama City University,

⁴Graduate School of Bioagri. Sci., Nagoya University

NMR-based Metabolomics has become a practical and analytical methodology for discovering novel genes, biomarkers, metabolic phenotypes, and dynamical cell behaviors in organisms. Recently we devised and implemented a statistical index, SpinAssign *p*-value, in NMR-based metabolomics for large-scale metabolite annotation and provided information to the public. We will tutor introductory cases of NMR-based metabolomics by SpinAssign.

＜はじめに＞ 近年NMRメタボロミクスの医学・生物学分野での応用事例が増えてきた。しかしそのほとんどは¹H NMRスペクトルを基本としたプロファイリング解析であり、候補代謝物の網羅的なアノテーションをせずにスペクトルのパターンで結果を議論することが多い。一方、我々の開発した代謝物アノテーションサーバーSpinAssignはNMRによる候補代謝物の網羅的アノテーションを極めて簡易に行なうことのできるウェブシステムである。現在 270 代謝物以上の¹³C-HSQC由来の化学シフトがデータベース化され、試料の¹³C-HSQCスペクトルを計測したユーザーはここにアクセスし自身のスペクトルからピックアップしたHSQCピークをクエリーとして与えるだけで容易に候補代謝物の網羅的アノテーションを得ることができる。最近我々はこのSpinAssignに*p*-value計算という機能を付加した。この方法によって今まで 100 以上の代謝物の同時アノテーションが不可能であったものが 200 代謝物以上の同時アノテーションを可能にするまで改良することができた。この方法は公共利用可能であり、NMR試料さえ用意すれば容易に誰でもNMRメタボロミクス研究を行なうことができる。今回我々は身の周りにある飲料をNMR試料に用いSpinAssignを使うNMRメタボロミクスの研究例について易しく解説する。

＜簡単 NMR メタボロミクス入門＞

1. リン酸カリウムバッファー溶液 350 μ L と計測する飲料 150 μ L を混合し NMR 管に移す。
2. 1D ¹H (water gate) と 2D ¹³C-HSQC スペクトルを計測する。
3. ¹³C-HSQC スペクトルから DSS 以外のピークをピックアップし、1 ピークを 1 行で ¹H<tab>¹³C の順でテキストファイルとして保存する。
4. SpinAssign (http://prime.psc.riken.jp/?action=nmr_search) にアクセスしテキストファイルからピークを貼り付け[do SpinAssign]ボタンを押す。

キーワード: メタボロミクス、メタボローム、ウェブ

○ちかやまえいすけ、つばいゆうり、ながはまじゅんこ、せきやまやすよ、きくちじゅん

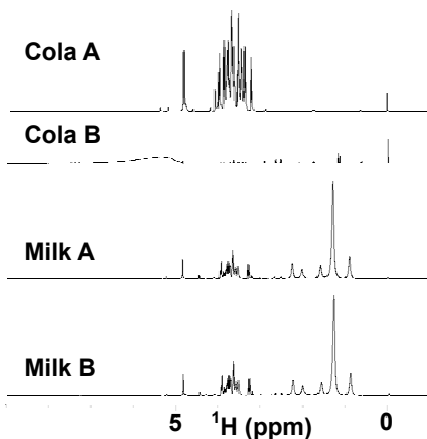
<結果と考察>

この要旨ではコーラA、コーラB、牛乳A、牛乳Bの結果の概要について記す。年会ではより味覚の多様性を網羅した飲料の計測と、ここでは記述しない主成分分析などの統計解析の結果を発表する予定である。1D ^1H では牛乳では脂質と糖分が出ており牛乳間の差はほとんどないことがわかり、コーラAはほとんど糖分であり、コーラBでは 1.12-1.18 / 2.51-2.67 ppmに特徴的なピークが出ているが特に糖分はコーラAに比べ低濃度であることがわかった (Fig. 1)。 ^{13}C -HSQCでも牛乳A、B間で差は全く見られなかった。コーラAとコーラBではパターンが異なった。SpinAssignのアノテーション結果ではコーラAでは果糖/ぶどう糖など、コーラBではPropane-1,2-diol/ethanol/citrateが候補代謝物としてアノテーションされた (Fig. 1)。コーラAは通常タイプであるがコーラBはカロリーゼロタイプであり、低濃度にかかわらず味覚上十分な甘さであった。これは人工甘味料により低い閾値濃度で味覚受容体システムが反応することの結果であると考えられる。牛乳ではクレアチンなどがアノテートされたが現状のデータベースには候補は多くヒットするものの信頼性の高そうな代謝物は存在しなかった。牛乳A、B間でスペクトル上では全く差がなかったが牛乳-コーラ間ではスペクトルは著しく異なった。これは牛乳とコーラという味覚のおよそ違うものはNMRスペクトルでも異なり、がしかし発表者の食味で牛乳A、B間の差異は認識できたことから、($^1\text{H}/^{13}\text{C}$ スペクトルで直接検出できない塩味と酸味は無視するとすれば)NMRで検出できる程の高濃度物質は味覚上で「牛乳」というくくりを決定していることを示唆している。味覚受容体システムが濃度の低い基質よりも高い基質に反応するように設計される場合は物理化学的に無理のない自然な結果であると考えられる。しかし味覚の閾値濃度は個人差もある程多様性があり、牛乳A、B間の味覚差や人工甘味料では果糖ぶどう糖などに比べ少ない閾値濃度で反応することなどは低濃度閾値を持つ味覚受容体システムの帰結であろう。味覚は舌の受容体システムから脳への非線形的合成電気信号であると考えられるが、どのような基質閾値濃度の非線形的組み合わせにどのような味覚で反応するかという生物の進化/適応/学習による味覚の遺伝子-受容体システム/神経ネットワークシステム変遷の一側面がこのようにNMRスペクトルからも見て取れることは大変興味深い。

<方法>

[リン酸カリウムバッファの調整] KH_2PO_4 水溶液(1 M, 1.15 mL), K_2HPO_4 水溶液(1 M, 1.85 mL), 重水(D_2O , 27.0 mL), 2,2-dimethyl-2-silapentane-5-sulfonate (DSS) (6.5 mg)を混合し 30 mLのバッファ溶液を作成した(100 mM, pH 7.0, 1.0 mM DSS)。

[NMRスペクトルの計測] クライオシステム付きBruker Avance II 700 MHzを用いた。water gate (p3919gp) と ^{13}C -HSQC (hsqcetgp) を 298 Kで計測。 ^{13}C -HSQCはスペクトル幅 20/140 ppm、中心 4.7 付近/60 ppm、ポイント数 1024/344、4 スキャン/ポイントで計測。



ANNOTATION						
No.	METABOLITE	ATOM	DETECT	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	p value
1	[2S]-3-Hydroxy-1-phosphonopentanoate	2/7(20.6%)	0.001	-0.016	-0.016	0.000
2	Aspartic acid	1/3(4.3%)	0.009	-0.223	-0.004	1.0e-24
3	Citrate	2/2(100%)	0.003	-0.152	-0.004	0.0e+00
4	Ethanol	2/2(100%)	0.006	-0.276	-0.004	1.6e-25
5	Glucose	1/3(33.3%)	0.009	-0.226	-0.004	5.7e-25
6	Fructose	1/3(33.3%)	0.009	-0.226	-0.004	6.4e-119
7	Propane-1,2-diol	4/4(100%)	0.012	-0.177	-0.004	3.9e-123
8	Sucrose	1/2(50%)	0.014	-0.084	-0.004	4.9e-27
9	Galactose	1/2(50%)	0.005	-0.154	-0.004	7e-40

Figure 1. 1D ^1H NMR spectra (left) and annotations with SpinAssign for Cola B (right).

¹³C 標識生体サンプルを用いた比較メタボローム解析と植物抽出過程における代謝物プロファイリング

○関山恭代¹、近山英輔¹、菊地淳^{1,2,3}

1) 理研・PSC, 2) 横浜市院・生命, 3) 名古屋大院・生命農

Comparative metabolome analysis using ¹³C-labeled organisms and profiling plant metabolites throughout extraction processes

Yasuyo Sekiyama¹, Eisuke Chikayama¹, Jun Kikuchi^{1,2,3}

¹RIKEN Plant Science Center, 1-7-22 Suehiro-cho, Tsurumi-ku, Yokohama 235-0045, Japan.

² Graduate School of Nanobiosciences, Yokohama City University, 1-7-29 Suehirocho, Tsurumi-ku, Yokohama 230-0045, Japan.

³ Graduate School of Bioagricultural Sciences and School of Agricultural Sciences, Nagoya University, 1 Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya-shi, 464-8601, Japan.

NMR techniques can provide structure-based information on a global pool of metabolites, not only in isotropic solvent extracts, but also in heterogeneous samples, such as intact tissues or extraction residues containing insoluble materials. At first, we describe the evaluation of extraction solvents that can be applicable for NMR-based metabolomics of a wide range of organisms and their application to comparative metabolome analysis using ¹³C-labeled plants, animals and microorganisms. In metabolomic analyses, care should be exercised as to which metabolites are extracted from the sample and which remain in the residue. The second, we tried to visualize changes in plant metabolite profiles throughout a series of repeated extraction process using a combined solution-state and HR-MAS NMR approach. In addition to the metabolite profile, we will discuss a relationship between metabolite structure and behavior throughout the repeated extraction process.

[背景]

我々は、安定同位体標識技術および、異種核多次元 NMR 法をメタボローム研究に展開し、分子構造レベルでの代謝動態の解析を目指している [1-3]。これらの方法論を、単一の生物種の評価のみならず、生態系の中での物質動態・循環過程の解析に展開すべく、検討を行なっている (Figure 1)。本会では、代謝物の一斉解析において鍵となる「抽出」に焦点を当て、(1)多様な生物種に適用可能な抽出溶媒の検討と比較メタボローム解析への応用、(2)植物資源の有効活用を視野に入れた、抽出プロセスを体系的に評価する方法としての NMR メタボロミクスの適用について議論する。

キーワード : NMR、¹³C 標識、メタボローム

○せきやま やすよ、ちかやま えいすけ、きくちじゅん

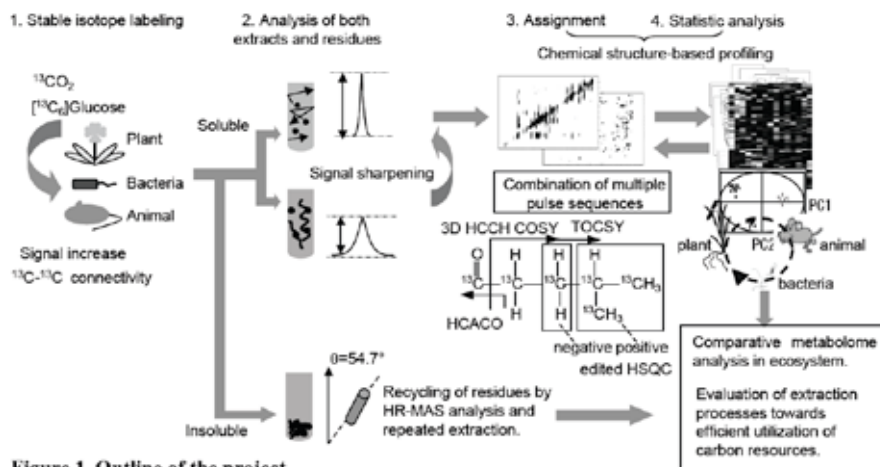


Figure 1. Outline of the project

[^{13}C 標識生体サンプルを用いた比較メタボローム解析]

生態系の中での物質の動態と循環は、一次生産者、消費者、分解者などのさまざまな機能群によって担われている。これらを比較し、物質動態を体系的に解析するためには、多様な生物種に適用可能な抽出溶媒の検討が必要である。我々は、NMR 法を用いた比較メタボローム解析を行なうために一連の抽出溶媒を検討し、重メタノール (MeOD) 系溶媒がシグナルの先鋭化および相関シグナルの増加に有効である事を報告した[4]。そこで今回は、比較メタボローム解析への展開の一例として、 ^{13}C 標識植物 (シロイヌナズナ、ポプラ)、動物 (マウス肝)、昆虫 (カイコ)、微生物 (光合成細菌、大腸菌) サンプルを MeOD 系溶媒で抽出し、代謝物プロファイリングを行なった。本会では、その詳細を報告する。

[植物抽出過程における代謝物プロファイリング]

メタボローム解析における抽出の問題は複雑であり、代謝物の広範に渡る物理化学的性質や全体の濃度バランスを考慮する必要がある。抽出される成分、抽出操作に伴う成分組成の変化、抽出残渣に残る成分を体系的に評価する事は、生理学的観点から代謝の考察を行なう場合だけでなく、生体を資源として捉え、有効利用するという観点からも重要である。我々がフォーカスする NMR 法では、誘導体化や分離精製を伴わない抽出物の直接計測が可能であり、また高速マジック角回転 (HR-MAS) 法による残渣の非侵襲計測により、成分全体を損なわずに解析する事が可能である。今回は、最も多様な代謝物を有すると言われる植物を対象とし、モデル植物である ^{13}C 標識シロイヌナズナを用いて、抽出操作に伴う成分の組成変化と残渣成分の評価を行なったので報告する[5]。

- References - [1] Chikayama, E. *et al.*, *PLoS ONE* 3, e3805 (2008)., [2] Kikuchi, J. and Hirayama, T. *Method. Mol. Biol.* 358, 273-286 (2007), [3] Sekiyama, Y. and Kikuchi, J. *Phytochemistry* 68, 2320-2329 (2007), [4] Sekiyama, Y. *et al.* The 45th Annual Meeting of the NMR Society Japan (2006), [5] Sekiyama, Y. *et al.* submitted.

SAIL法による蛋白質のTrp環シグナルの効率的帰属

○宮ノ入洋平¹, 武田光広¹, 寺内勉^{2,3}, 小野明^{2,3}, 甲斐荘正恒^{1,2}¹名大院・理・構造生物学研究センター²首都大東京・戦略研究センター³SAILテクノロジーズ(株)**Facile assignment of the Trp ring signals in a protein by the SAIL method**○Yohei Miyanoiri¹, Mitsuhiro Takeda¹, Tsutomu Terauchi^{2,3}, Akira Mei Ono^{2,3} and Masatsune Kainosho^{1,2}¹Structural Biology Research Center, Graduate School of Science, Nagoya University.²Center for Priority Areas, Tokyo Metropolitan University.³SAIL Technologies

We are currently exploring further optimizations of the isotope-labeling patterns for various stereo-array isotope-labeled (SAIL) amino acids, in order to establish a method for the robust NMR signal assignment and automated structural determination for large proteins and their complexes, which are somewhat difficult to handle even with the original SAIL method. For example, we recently showed that the combined use of various types of SAIL-Phe/Tyr allowed us to determine a protein structure more accurately (Takeda *et al.*, JBNMR, 2009, DPI 10.1007/s10858-009-9360-9). In this presentation, we introduce a new SAIL-Trp, which has an optimal labeling pattern for the most efficient observation and assignment of the ring signals, as revealed for the six Trp residues of a DNA binding domain of c-Myb (Myb-R2R3).

[序]

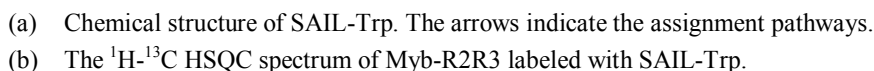
芳香族アミノ酸(Phe, Tyr, Trp)は疎水性コア領域に存在し、蛋白質の立体構造の形成・維持に大きな役割を果たすだけでなく、分子表面や内部において様々な相互作用を通じて蛋白質の機能発現に深く関わっている重要な残基である。我々は従来の均一標識試料を用いたNMR解析法では盲点となってきたPhe/Tyr残基の芳香環シグナルの観測と帰属、及びそれらに由来するNMR構造情報の取得がSAIL法により迅速、且つ高感度に可能となり、更にそれらの構造決定への有用性を明らかにしている。Trp残基に関してもSAIL法を適用し、それらの環シグナルのNMR情報を得ていたものの、最適な標識パターンに関しては様々な試行錯誤が必要であった。本研究では、より高分子量の蛋白質にも適用可能な高感度な芳香環シグナルの帰属を目的に改良したSAIL-Trpを用いて、簡便且つ有効な帰属手法の開発を行った。検証に用いたモデル蛋白質としては、6残のTrpを持つc-Myb蛋白質DNA結合ドメイン(Myb-R2R3)を用い、遊離状態、及びDNA結合状態におけるインドール環シグナルの帰属を試みた。

SAIL法, 芳香環シグナル, NMR帰属法

○ みやのいり ようへい, たけだ みつひろ, てらうち つとむ, おの あきら, かいのしょう まさつね

Fig.(a)に示したSAIL-Trpを最少培地 1Lあたり5mg加えることにより、選択的SAIL-Trp標識したMyb-R2R3を調製した。0.6 mM の精製試料を用いて、 ^{15}N NOESY-HSQC, ^{15}N TOCSY-HSQC, ^{13}C NOESY-HSQC 及び ^1H - ^{13}C HSQCスペクトルを測定した。NMR測定はBruker 500, 600,及び800MHz装置を使用した。インドール環シグナルについて、 $\text{H}_{\text{e}3}$ は H_{a} , $\text{H}_{\text{b}2}$ とのNOEにより帰属した。 $\text{H}_{\text{d}1}$ は H_{N} 若しくは $\text{H}_{\text{b}2}$ とのNOEにより帰属した。 $\text{H}_{\text{e}1}$ は $\text{H}_{\text{d}1}$ とのNOE、 $\text{H}_{\text{b}2}$ に関しては $\text{C}_{\text{e}3}$ とのスピン結合により帰属した。

Myb-R2R3の6残基のTrpが含まれており、均一標識法によってはそれらの環シグナルの完全帰属は不可能である。一方、新たに合成したSAIL-Trpでは、NOESY,HSQC実験によって、Trpの標識部位シグナルの完全帰属が容易に達成できた{Fig.(b)}。



[謝辞] 本研究内容の一部は文科省ターゲットタンパク研究プログラムにおけるSAIL法技術開発の一環として、横浜市大西村教授の協力を得て行われた。

利用したタンパク質試料の調製

○竹内 誠¹, 玉井 淳史², 森 正之^{2,3}, 大木 進野^{1,3}
(北陸先端大学院大¹, 石川県立大², JST先端計測³)

A protein sample preparation with suspension-cultured plant cells and an inducible virus vectors

○Makoto Takeuchi¹, Atsushi Tamai², Masashi Mori^{2,3}, Shin-ya Ohki^{1,3}
(JAIST¹, Ishikawa Pref. Univ.², and JST-SENTAN³)

We have reported that our new protein expression system, the suspension cultured plant cells infected with an inducible virus vector system, can prepare ¹⁵N-labeled proteins. As the next step, we show that the system can also be employed for some other types of labeling. First, we achieved ¹³C-labeling by using ¹³C-labeled sucrose as a sole source of carbon in the medium. The expressed sample, BPTI, showed excellent triple-resonance NMR data. Second, ²H-labeling and a. a. selective-labeling were examined. In addition, we examined the ability of glycosilation on the target sample. These results clearly indicate that this system has a great potential for protein NMR.

<はじめに>

広く普及している大腸菌や酵母を利用した発現系では目的タンパク質が発現されない、あるいは、封入体でタンパク質を得ることはできるが巻き戻しが困難である、といった場合も多い。例えば、細胞に対して毒性を持つようなタンパク質試料は無細胞系を使用して作製できることもある。このように試料調製の代替策を準備しておくことは、研究の可能性を広げることにつながる。

我々は植物細胞を用いた新規なNMR試料調製方法を開発中である。前回のNMR討論会では、植物細胞と誘導可能なウイルスベクターを使用した独自のタンパク質発現系の提案と、4種類の¹⁵N標識タンパク質試料の調製例を紹介した(参考文献 1)。既に報告したように、この発現系はSS結合を有するタンパク質を可溶化状態で正しい折れたたみ構造で発現できる等、幾つかの利点を持っている。

今回、我々は本手法のさらなる発展として¹³C標識、重水素標識、幾つかのアミノ酸タイプの選択標識を試みた。また、糖鎖修飾の可能性についても検討した。以上の結果について報告する。

キーワード：植物細胞，ウイルスベクター，安定同位体標識

発表者指名：○たけうち まこと，たまい あつし，もり まさし，おおき しんや

<実験>

目的タンパク質をコードしている遺伝子を組み込んだトマトモザイクウイルス由来のウイルスベクターをタバコ培養細胞(BY-2)に取り込ませた(参考文献 2)。各種標識方法をテストするためにBPTIを発現させた。また、糖鎖付加の確認にはAFP1を発現させた。

培地の窒素・炭素源は1.9g/L KNO_3 、および1.65g/L NH_4NO_3 、シュクロース(3%(w/v))である。 ^{15}N 標識のためには標識 KNO_3 を NH_4NO_3 利用し、 ^{13}C 標識のためには標識シュクロースを用いた。

それぞれの標識タンパク質の精製は既に報告されている方法に従った。調製した試料のNMRスペクトルをVarian INOVA750 (750MHz)で測定し、得られたデータをNMRPipe/NMRDrawで処理/表示した。

<結果と考察>

^{13}C シュクロースを炭素源として ^{13}C , ^{15}N 二重標識BPTIを作製した。質量分析と各種NMR測定の結果、炭素部位の ^{13}C 標識率は94~95%程度であることがわかった。

重水やアミノ酸は、どちらも培地中の濃度がある程度以上高くなると植物細胞の成長やタンパク質発現を阻害することが確認された。これらの濃度を最適化して標識BPTIを得ることができた。標識されているか否かは質量分析で確認した。

また、糖鎖付加アミノ酸配列を持つ野生型AFP1とその部分に変異を入れたAFP1をそれぞれ発現させた。NMR測定と質量分析により修飾の確認ができた。本手法は糖鎖付加されたタンパク質試料を作製する能力を持つことが示された。

<参考文献>

- (1) Ohki S, Dohi K, Tamai A, Takeuchi M, Mori M. (2008) *Journal of Biomolecular NMR* **42**, 271-277.
- (2) Dohi, K., Nishikori, M. Tamai, A. Ishiwaka, M., Meshi, T., and Mori, M. (2006) *Archives of Virology* **151**, 1075-1084.

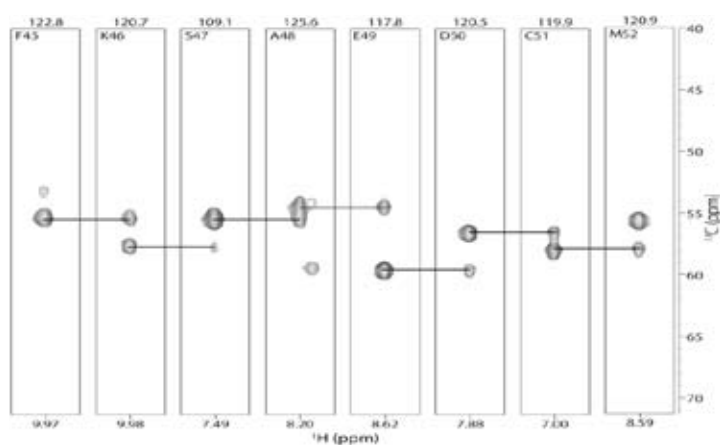


Fig. 1. Strip plot of HNCA of (^{13}C , ^{15}N)-labeled BPTI prepared by the BY-2 system.

多重共鳴NMRを用いた生体における集積コリンおよびグルコース代謝物の選択的計測

○五十嵐 龍治, 朽尾 豪人, 水澤 圭吾, 上平 晃聖, 山東 信介, 青山 安宏, 白川 昌宏
京都大学大学院工学研究科

Selective measurement of choline accumulation and glucose metabolites in cells and organs using multi-resonance NMR

○Ryuji Igarashi, Hidehito Tochio, Keigo Mizusawa, Kosei Uehira, Shinsuke Sando, Yasuhiro Aoyama and Masahiro Shirakawa
Graduate School of Engineering, Kyoto University, Kyoto, Japan.

NMR is one of the most suitable methods to visualize in vivo localization of biomolecules without damaging the organisms. However, molecular specific imaging in biological organisms with NMR/MRI is difficult because NMR signals of target molecules suffer from higher background signals from coexisting molecules. In this study, we employ heteronuclear multiple-resonance NMR techniques to take advantages of their molecular identification ability. A stable-isotope-labeled choline or D-glucose was injected into tumor-bearing mouse, the organs were surgically collected and the homogenized extracts were subjected to NMR measurements. We found that triple-resonance NMR enabled observation of accumulated cholines and lactates, known markers of tumor metabolism, in organ homogenates in a highly molecular specific manner.

1. 序論

細胞内や生物個体内に存在する生体分子の化学反応や構造変化を原子レベルでその場観察するためには低侵襲性と高分解能を兼ね備えた手法を用いなければならない。磁気共鳴法はこれらの特徴を持つ数少ない分光法のひとつであり、磁気モーメントを有する核スピンや対電子が存在する化合物について多くの情報を与える。しかし、生体内のような混合物系の場合、例えば、一般に有機化合物の同定で用いられる¹H NMR スペクトルは複雑なものとなる。従って、磁気共鳴法の生体系への適用においては、必要な情報を選択的にスペクトルに反映させるための方法論が重要となる。

本研究において、我々は特定の分子構造を持つ生体分子のみを選択的に計測する手法として、一定の核間移動を経験したコヒーレンスのみを選択的に検出する多重共鳴NMR法を採用し、生体内に存在する低分子に応用して生体の機能情報を抽出する手法の開発を行なった。計測対象としては、臨床における癌診断への応用を想定して、腫瘍において代謝が亢進するとされるコリンおよびグルコースを選択し、これらを¹³Cおよび¹⁵Nで安定同位体標識したもの(Fig. 1)について細胞や臓器への蓄積および代謝を観察した。

分子イメージング, 腫瘍, 多重共鳴

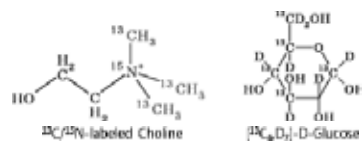


Figure 1 Structural formula of the ¹³C/¹⁵N-choline and ¹³C/²H-D-glucose.

○いがらし りゅうじ, とちお ひでひと, みずさわ けいご, うえひら こうせい, さんどう しんすけ, あおやま やすひろ, しらかわ まさひろ

2. 実験

腫瘍マウスを用いた計測実験においては、メスのBALB/cCrSlcマウス（体重15 g）を使用した。マウスに対する腫瘍の移植は測定の前9日前、 4.0×10^6 個のcolon 26細胞を左後肢に皮下接種することにより行った。24時間絶食させた後、尾静脈注射により0.4 mgの $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -コリンまたは45 mgの $^{13}\text{C}/^2\text{H}$ -D-グルコースを投与し、投与1時間後にジエチルエーテル麻酔下で安楽死させ、癌組織、200 μL の血液、肝臓、腎臓、心臓を回収、重さを計量してTissueLyser (Qiagen) を用いて500 μL の10 % トリクロロ酢酸で破碎した。30分氷上でインキュベーションした後、破碎物を12,000 rpmで5分間、4° Cで遠心沈降して抽出液を回収した。抽出液は凍結乾燥した後に700 μL の D_2O を加え、更に13,200 rpmで30分遠心沈降した後、上清をNMRで測定した。NMR測定はすべて5 mm TCIクライオプローブを装着したAvance 700 (Bruker) にて298 K下で行った。測定データのプロセッシングと解析はTopspin 1.3 (Bruker) で行った。

3. 結果と考察

まず、培養細胞およびマウス生体内におけるコリンの蓄積を計測する実験を行った。この結果、酵母細胞やHeLa細胞において、蓄積した $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ コリンを ^1H - ^{13}C - ^{15}N 三重共鳴NMRを用いることで選択的に検出することができた。また、ラベル化コリンを尾静脈投与した胆がんマウスから摘出した癌組織抽出物についても同手法によりコリンの選択的検出が可能であることを確認できた (Fig. 2)。

また $^{13}\text{C}/^2\text{H}$ -D-グルコースを胆がんマウスに尾静脈注入し、摘出した臓器についての測定も行った (Fig. 3)。 $^{13}\text{C}/^2\text{H}$ -D-グルコースは非交換性のプロトンを持たないため ^1H NMR によって検出されないが、その代謝産物は生体内の水或いは他の物質由来の非交換性プロトンを持つ可能性がある。更にその中には ^1H - ^{13}C - ^{13}C の構造を持つ化合物も存在する。例えばグルコースから解糖系を経て生成するピルビン酸、嫌気呼吸によりピルビン酸が乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH) で還元されて生成する乳酸、あるいはピルビン酸がアラントランスアミナーゼ (ALT) により生成するアラニンなどがこれに相当する。この様に $^{13}\text{C}/^2\text{H}$ -D-グルコースから生成する乳酸は代謝経路での重水素→プロトン化によって初めて検出されるので OFF-ON プローブとして機能することが期待できる。癌組織抽出物では、通常の 1D ^1H NMR ではグルコース代謝物のピークを分離できないほど込み入ったスペクトルを与えた。これに対して ^1H - ^{13}C 二重共鳴による測定では、代謝物のピークを分離可能なスペクトルが得られた。更に ^1H - ^{13}C - ^{13}C 三重共鳴により測定を行ったところ、いずれの臓器でも乳酸 (4.28 ppm) およびアラニン (3.04 ppm) 由来のピークのみが極めて高い選択性で検出された。

以上の結果から、三重共鳴法により、腫瘍に蓄積するコリンおよび乳酸といったバイオマーカーが NMR により選択的に検出がされる可能性が示された。

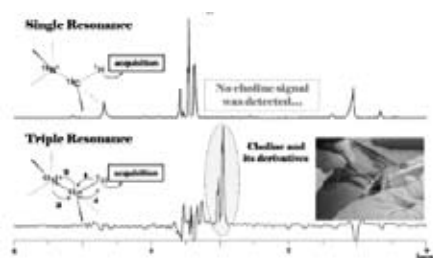


Figure 2 Single- and triple-resonance NMR spectra of tumor homogenate collected from a tumor-bearing mouse injected with $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -choline.

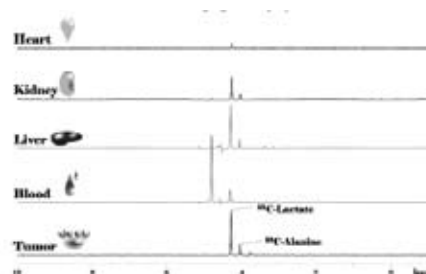


Figure 3 Triple-resonance spectra of organ homogenates collected from a tumor-bearing mouse injected with $^{13}\text{C}/^2\text{H}$ -D-glucose.

コールドショックベクターと可溶性タグの組み合わせによる 発現系構築とNMR への応用

○林 こころ、児嶋 長次郎

奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科

Protein expression using cold-shock vector with soluble protein tag and its application for NMR

○ Kokoro Hayashi and Chojiro Kojima

Graduate School of Biological Science, Nara Institute of Science and Technology

The production of recombinant protein in *Escherichia coli* affords many advantages for preparing NMR sample. But it is often hampered by low expression levels and low solubility. There are many techniques to improve the protein expression, for example, the use of expression tags, and pCold expression system (Qing *et al.*, *Nature Biotech.*, 2004). We reported the development of the pCold I-GST vector which combined pCold I vector with glutathione S-sepharose (GST) (Hayashi and Kojima, *Protein Exp. Purif.* 2008). Here, we developed the expression vector which combined pCold I vector with another three protein tag, maltose binding protein (MBP), protein G B1 domain (GB1) and thioredoxin (Trx). Additionally, we show the C-terminal tag which inhibits the protein degradation.

序論

NMRを用いたタンパク質の解析には安定同位体標識された大量のサンプルが必要である。大腸菌による大量発現系は最も広く用いられているサンプル調製法の一つであり、これまでに組換えタンパク質の溶解度や安定性を上げるための戦略として GST や MBP などの可溶性タグを用いる方法や、発現誘導を低温で行うコールドショックベクター(pColdI~IV)を用いる方法(Qing *et al.*, *Nature Biotech.*, 2004)などが開発されてきた。しかし、これらの方法を用いても発現精製の困難なタンパク質が数多く存在する。これまでに我々は pCold I ベクターと GST タグを組み合わせた発現ベクター、pCold-GST (Fig. 1)の構築を行い、当研究室において発現困難であった 10 種類のタンパク質に適用した結果から、その有効性を示した (Hayashi and Kojima, *Protein Expr. Purif.*, 2008)。今回、我々は GST 以外の可溶性タグと pCold I ベクターを組み合わせたベクターを構築し、発現検討

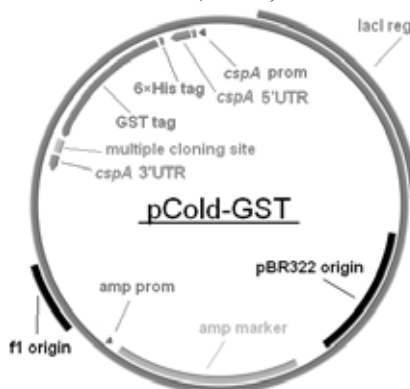


Fig. 1 Structure of pCold-GST vector.

キーワード：大腸菌大量発現系、コールドショックベクター、可溶性タグ

○はやし こころ、こじま ちょうじろう

を行った。また、発現段階で分解を受けやすいペプチドの調製において有用な C 末端タグについて報告する。

pCold-GST ベクター

pCold I ベクターは目的タンパク質の N 末端に His タグを融合発現するよう設計されたコールドショックベクターである。本研究では pCold I の His タグ配列とマルチクローニングサイトの間に *MBP*、*Trx*、*GB1* 遺伝子を導入したベクター、pCold-MBP, pCold-Trx, pCold-GB1 を作成した。これらのベクターは pCold-GST 同様、N 末端に His タグと可溶性タグが付加した融合タンパク質として目的物を得ることができる。また、目的物と可溶性タグの間には極めて特異性の高い HRV3C protease の切断サイトを導入したため、タグの切断が容易である。

タンパク質の発現精製と NMR 実験

pCold-GST は、当研究室において高等動植物をはじめとする様々な生物種由来のタンパク質発現に適用しており、これまでに適用した 85 種類中、79 種類のタンパク質を可溶性画分に発現させることに成功している。Fig.1 は pCold-GST ベクターによって可溶性画分への発現量が顕著に増大した植物由来タンパク質の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルであり、pCold-GST を用いて調製可能になったタンパク質が立体構造を保持していることを示している。

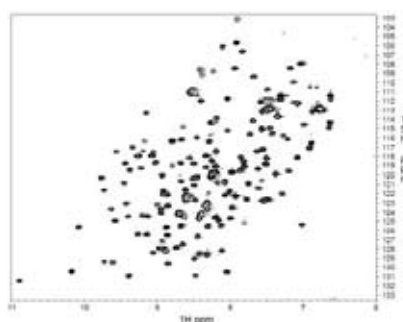


Fig.1 ^1H - ^{15}N HSQC spectra of plant protein (170 a.a.)

昨年の NMR 討論会において、我々は C 末端に His タグを付加した発現系を用いて分解を受けやすいペプチドの発現精製例を示した。しかし、これは分解産物との分離に有用であるが分解抑制はできない。今回、C 末端にプロリン残基を付加することで、発現段階分解を抑制することができ、収率を上げることに成功した(Fig.2)。

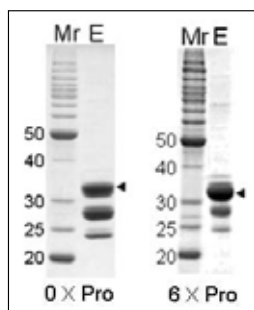


Fig. 2 Protein expression and purification of GST-tagged Tsr with or without C-terminal poly-proline residue. Black arrow indicates the molecular weight of target protein.

まとめ

pCold-GST ベクターは高い確率で可溶性画分への発現を可能にしており、これを利用することで調製可能となったタンパク質（植物由来）は、良好な NMR シグナルを与えたことから、立体構造解析のためのサンプル調製に利用できると考えられる。また、C 末端へのプロリン残基の付加は発現段階での C 末端からの分解抑制に効果が見られた。発表では、種々の可溶性タグを用いた発現系の比較なども合わせて議論する。

データベースを利用したNMR主鎖シグナル自動帰属と立体構造解析

○小林直宏¹、阿久津秀雄¹、藤原敏道¹

¹阪大蛋白研

Automated assignment of NMR signals and structure analysis using structure and chemical shift databases

○Naohiro Kobayashi¹, Hideo Akutsu¹ and Toshimichi Fujiwara¹

¹*Institute for Protein Research, Osaka University, Suita 565-0871, Japan.*

The number of protein structures deposited in the PDB are now reaching 60,000, many of which for the last half decade has been accelerated by the comprehensive analysis for protein structures by structural genomics. This enables us to obtain a homologue structure of the target with high sequence identity much easier than it used to be. On the other hand, the recent developments of solution NMR techniques have successfully improved the cost and time of the experiment and analysis for study on a small protein, however, the assignment works are still intricate even if using the information of coordinate and chemical shift data of the homologue protein. In this study, we have developed a highly automated assignment system for NMR main-chain and C β signals which can incorporate information of known structure or assignments derived from database such as PDB and BMRB.

【序論】データベースにおけるタンパク質の立体構造情報は近年の構造プロテオミクスなどの貢献により加速度的に増え続け、2009年9月の時点で遂に6万件を超えようとしている。これにより配列相同性の高いホモログの立体構造が得られる機会は以前に比べ格段に増したと言える。一方でNMR主鎖シグナル帰属データは相互作用解析、動的性質の解析といった研究への応用が可能であるため極めて有用性が高い情報であるが、シグナル帰属は類縁タンパク質の情報を利用したとしても未だに煩雑な操作を多く含む手間のかかる作業である。また類縁タンパク質のシグナル帰属情報や立体構造情報の利用はデータ解析に役立つばかりか結果の妥当性を評価することにも有効であるがその反面、方針を誤ると恣意的な結果を与える危険な側面もある。本研究では既存の立体構造あるいはNMR化学シフトデータを用いたNMRシグナル帰属の自動化を行うプログラムシステムの開発を行い、帰属されたシグナルの化学シフトデータを用いたモデリングにより、安全で精度の高い立体構造の解析手法の実現を目的とした。

【方法】完全自動NMRシグナル帰属システム "assign_robot" は主としてC言語により記述され、LAMなどのMPIにより高速な並列計算が実行可能である。このプログラムは3次元主鎖帰属用3重共鳴スペクトル、HNCO, HNCACB, CBCA(CO)NHスペクトルより自動的に最適なthresholdを決定し、シグナルを自動検出する。検出されたシグナルをHN-¹⁵N 相関によるクラスタリングを行い、スペクトルの磁化移

Automated assignment, database, PDB, BMRB

○こばやしなおひろ、あくつひでお、ふじわらとしみち

動グラフに従ってスピンスystemを帰属する。既に本討論会2007年度大会(札幌1L5)において発表したペナルティ関数を用いた帰属確率行列アニーリング法を用いて、配列特異的な連鎖帰属を実行した。帰属に際して約30%程度の配列相同性を持つホモログをModeller9 ver.6 を用いてモデリングした後、SPARTA ver. 2008.07.22を用いて化学シフトを予測し、残基タイプの保存性や溶媒露出度を考慮してペナルティ関数に取り込ませた。自動帰属の結果を検証するための化学シフト情報はBMRBよりダウンロードした。帰属された主鎖シグナルの化学シフトを元に更にTALOSによる主鎖二面角を推定し、それを制限情報として与えたModeller計算を行った。これらの計算にはQuadCore CPUを搭載した標準的なLinux-PCを利用した。

【結果と考察】計算対象として選んだ118残基長の α/β タンパク質(AB118)、および219残基長の α ヘリックスタンパク質(A219)の結果を表1に示す。

表1 AB118, A219に対するNMR主鎖自動帰属結果と立体構造モデルの決定精度

Target	PDB	Template ^a	Assign ^b	CPU time ^c	RMSD ^d
AB118	1IV5	1FAO(31%)	94% (100%)	30min	1.4Å (1.5Å)
A219	2EE4	1TX4 (31%)	94% (98%)	300min	2.0 Å (2.2Å)

a: TemplateのPDBID と配列相同性(括弧内)。templateとのalignmentについては、溶媒露出度と配列保存性を考慮し、疎水コア内部の保存残基とその前後1残基を2次構造に関してのみ実行し、modellerによる立体構造モデリングを行った。得られたベストスコアの立体構造からSPARTAによる化学シフト予測を行い、60%程度の限定的な予測化学シフトテーブルを得た。 **b:** アニーリング計算には予測化学シフトテーブルを考慮させたペナルティ関数を用いた。また連鎖帰属に際してはCO(*i*-1), C α (*i*), C α (*i*-1), C β (*i*-1)のシグナル情報を利用した。各サイクルにおけるアニーリング計算により出現確率が80%を超える残基の帰属を確定する方法を用い、6サイクルの計算を行った。表に帰属の達成率と正解率(括弧内)を示す。 **c:** 自動帰属は LAM ver.7.1.4によりCore i7の4コアを用いて並列実行した。 **d:** RMSDは目標立体構造の2次構造部位、主鎖原子C', N α , C α に対する値、括弧内はmodellerのみによる結果である。



図1 Modellerにより予測された構造(dark gray)と正解構造(light gray)との比較。A: AB118, B: A219

表1に示すようにC β (*i*)のような連鎖帰属に重要なシグナル情報が欠損しても高い精度で実行できることが示された。またモデリングされた立体構造(図1)もホモロジーモデリングのみで予測されるより僅かではあるが改善が見られ、タンパク質の分子生物学的機能推定などに充分利用できるレベルであることが示された。また30%ホモログの立体構造と化学シフトデータを用いることで、NOEベースで決定された立体構造の正当性についても評価可能であることを示すことが出来た。

リジン¹³Cメチル化法を用いたユビキチン側鎖のNMR解析

○服部良一, 大木出, 古板恭子, 児嶋長次郎

奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科

NMR Analysis of Ubiquitin Side Chain Using ¹³C-Methylation of Lysine

○Yoshikazu Hattori, Izuru Ohki, Kyoko Furuita and Chojiro Kojima

Graduate School of Biological Sciences, Nara Institute of Science and Technology

NMR has a great advantage for studying protein structure, dynamics and interaction with other biomolecules. However, NMR analysis of big molecules is not easy. Methyl probes based on methyl-TROSY are recently known to be effective to investigate macromolecular complexes. Thus efficient method to introduce methyl groups is required to be developed. In this study, we analyzed ¹³C-methylated lysine side chain of ubiquitin and assigned the correlation spectrum. Moreover, titration of yeast ubiquitin hydrolase suggests that the detection of ¹³C-methylated lysine is available for elucidating protein-protein interactions.

[序論] NMRはタンパク質の相互作用解析の手段として広く用いられているが、培養系での同位体の均一ラベルによる解析は、分子量制限により応用範囲が限られている。これまで高分子量タンパク質の解析法として、トロント大のLewis E. Kayらによる、ロイシンなどの疎水性残基のメチル基を¹³Cラベルして用いるメチルTROSY法が知られているが、本研究では塩基性アミノ酸であるリジン側鎖をメチル化する手法(**Figure 1**)を用いた。

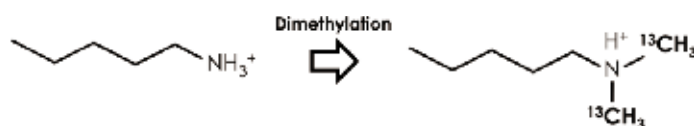


Figure 1. Methylation of lysine side chain

近年、比較のおだやかなリジンのメチル化法が考案され、結晶構造解析分野で多用されているが、NMRにおいては、古くはリジン残基のpKaの決定などの解析手法として用いられていたものの、最近ではリジンのメチル化を用いた報告はほとんどない。そのため、新しいリジンのメチル化法を用いたNMRによるタンパク質解析手法の開発を目的とした。本研究では、ユビキチン (8.6 kDa, 以下Ub) をリジンのメチル化により¹³Cラベルし、その化学的性質を解析した。また、酵母ユビキチン加水分解酵素 (26 kDa, 以下YUH) とのタイトレーション実験を行い、相互作用解析における妥当性を検証した。

[方法] Ubの¹⁵Nおよび¹⁵N/¹³Cラベル体、Ub (K6R, K11R, K27R, K29R, K33R, K48R, K63R) の¹⁵Nラベル体、およびYUHのノンラベル体を大腸菌の大量発現系で調製した。

リジン, タンパク質化学修飾, 分子内相互作用

○はつとりよしかず, おおきいずる, ふるいたきょうこ, こじまちょうじろう

メチル化反応にはborane-dimethylamine complexと ^{13}C -formaldehydeを用い、残留試薬はゲル濾過クロマトグラフィーで除去した。

NMR測定はAVANCE 500, 800 (Bruker Biospin) を用いて、 ^1H - ^{15}N HSQC, ^1H - ^{13}C HSQCによる主鎖アミド基と側鎖メチル基の検出、非線形HNCO, HNCA, HN(CO)CA, HNCACB, HN(CO)CACBによる主鎖の帰属を行った。データ解析にはNMRPipeとSparkyを用いた。主鎖アミド基の化学シフト変化は $\Delta\delta = [\Delta\delta_H^2 + (\Delta\delta_N/5)^2]^{1/2}$ より求めた。

[結果と考察] メチル化Ub変異体の ^1H - ^{13}C HSQC測定により帰属を行った (Figure 2)。結晶構造との対応から、それぞれの化学シフトは静電的環境を鋭敏に反映していることがわかった。その中で、側鎖アミノ基が酸性アミノ酸側鎖と水素結合をつくるK11とK27は、シグナルが二分裂していた。pHを高くすると分裂が抑えられることから、脱プロトン化により結合が弱まり、メチル基の回転が自由になると考えられる。また、メチル化前後の ^1H - ^{15}N HSQCに差が見られたため、三次元NMR測定による主鎖の帰属を行い、化学シフト変化を解析した (Figure 3)。大きな変化を示したのは、Ubの内部に埋もれているK27の周辺残基であった。

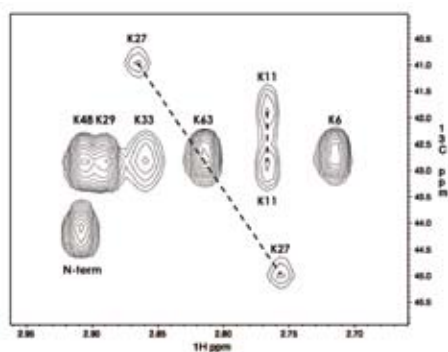


Figure 2. ^1H - ^{13}C HSQC spectrum of ^{13}C -methylated Ub (0.1 mM, pH 6.8, 303 K)

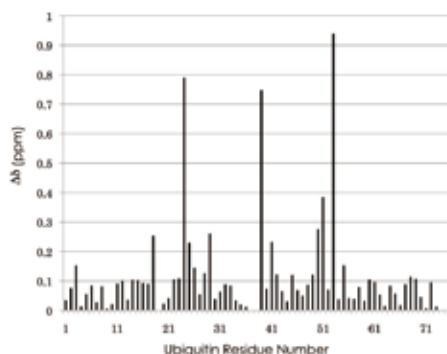


Figure 3. Chemical shift perturbations of backbone amide groups caused by lysine methylation

メチル化Ubに対するYUHのタイトレーション実験 (Figure 4, 5) では、特異的な化学シフト変化を示す残基があった。これらは、Ub-YUH複合体の結晶構造中で相互作用面付近に存在しており、すでに報告されているNMRを用いた相互作用解析の結果とも矛盾しなかった。このように、タンパク質複合体の解析において、NMRを用いたメチル化リジンの検出は有効であることがわかった。

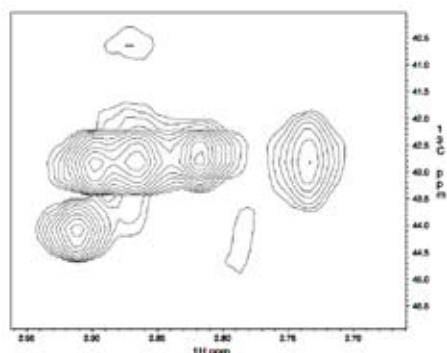


Figure 4. ^1H - ^{13}C HSQC spectrum of ^{13}C -methylated Ub with equal molar YUH

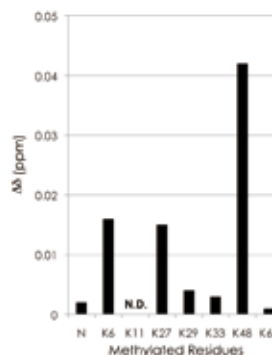


Figure 5. Chemical shift perturbations of methyl protons caused by YUH addition

NMRと質量分析を用いた高精度メタボリック・プロファイリング法

○藤村 由紀¹, 三浦 大典¹, 梶井 聡子², 須永 絵理⁵, 根本 直^{1,3,5},
高橋 勝利^{1,3,5}, 割石 博之^{1,3,4}

¹九大・レドックスナビ, ²九大・生資環, ⁴九大・バイオアーク,
⁴九大・農学研究院, ⁵産総研

High-Precision Metabolic Profiling with NMR and Mass Spectrometry

○Yoshinori Fujimura¹, Daisuke Miura¹, Satoko Kakoi², Eri Sunaga³, Tadashi Nemoto^{1,3,4},
Katsutoshi Takahashi^{1,3,4}, and Hiroyuki Wariishi^{1,4,5}

¹Innovation Center for Medical Redox Navigation, ²Graduate School of Bioresource and Bioenvironmental Sciences, ³Bio-Architecture Center, ⁴Faculty of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka, Japan; ⁵National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Tsukuba & Odaiba, Japan.

Metabolic profiling (MP) is a powerful methodology to discover novel biomarkers as an indicator metabolite of a biological state. The identification of chemical structure of metabolites is a key strategy for functional and applied studies in pharmaceutical research or clinical diagnosis. Nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) and mass spectrometry (MS) are often used as analytical platform for MP. However, determination of chemical structure of candidate biomarkers from an independent data of NMR or MS is very difficult because each data shows only a partial structure or molecular weight information of metabolites, respectively. In the present study, we examined a possibility of the integration of NMR- and MS-based MP to develop a novel strategy for detecting many metabolites and reducing the number of candidate biomarker metabolites as well as identifying the chemical structure of unknown metabolites.

近年、サンプル調製が容易であり、比較的高感度かつ定量性に優れている NMR を用いたメタボリック・プロファイリング (MP) が注目を集めている。この手法は、混合物試料を多変量統計解析により各サンプル群を識別するには極めて有効な解析法であり、病理診断や毒性評価とともにバイオマーカー探索などに汎用されているが、バイオマーカー候補として見出されるピークは化合物の部分構造のみを示す場合が多い。一方、質量分析を用いた MP も行われているが、見出されるピークは化合物の分子量を示し、そこから化合物の構造が決定出来ることは極めてまれである。

バイオマーカーの高精度スクリーニングのためには、できるだけ多くの代謝物を検出する一方で、マーカー候補を精度よく絞り込む戦略的な方法論の開発が必要不可欠である。そこで本研究では、NMR 情報と MS の精密質量および MS/MS 情報を相補的に利用した、新たなバイオマーカー同定戦略の可能性について検討した。

Metabolic profiling, NMR, MS

○ふじむらよしのり, みうらだいすけ, かこいさとこ, すながえり, ねもとただし,
たかはしかつとし, わりいしひろゆき

【方法】

高血圧自然発症ラット SHR (健常ラット WKY; 13 週齢雌) の夜間蓄積尿を測定対象として、複数の分析プラットフォームを用いた解析、すなわち、 $^1\text{H-NMR}$ 分析ならびにエレクトロスプレーイオン化法を用いた高速液体クロマトグラフィー質量分析計 (ESI-LC-MS) および マトリックス支援レーザー脱離イオン化法を用いたフーリエ変換イオンサイクロトン共鳴質量分析計 (MALDI-FT-ICR-MS) を用いた質量分析 (ネガティブイオンモード) を行った。なお、 $^1\text{H-NMR}$ 分析 (ECA-800: JEOL) は Presaturation 法により行った。また ESI-LC-MS 分析 (LCMS-IT-TOF: 島津製作所) は、分離モードの異なる逆相 (RP) および親水性相互作用 (HILIC) カラムを用いて行った。MALDI-FT-ICR-MS 分析 (APEX Q94e: ブルカー・ダルトニクス) には、9-aminoacridine をマトリックスとして用いた。各種測定によって得られたデータは、NMR ケミカルシフト情報: ppm/area あるいは MS 分子量情報: $m/z/\text{intensity}$ からなるマトリックスデータへと変換し、SIMCA-P+ (Umetrics) を用いた多変量統計解析 (主成分分析 PCA および判別分析 OPLS-DA) に供した。

【結果および考察】

個々の分析プラットフォームで特徴的な代謝物とともに、異なるプラットフォーム間でオーバーラップする代謝物がいくつも存在することが明らかとなった。このことは、幅広い代謝物の検出や信頼性の高いバイオマーカー候補の絞り込みを行うために多元的分析法が役立つ可能性を示している。そこで、各種プラットフォームで得られた WKY と SHR の代謝物ピークプロファイルが多変量統計解析により比較検討した。その結果、PCA 解析では、いずれの分析プラットフォームにおいても WKY と SHR で異なるクラスターの形成が認められ、高血圧症の発症によって尿中の代謝物プロファイルが変化することが示唆された。そこで、このような 2 群間の相違に寄与する代謝物、すなわち、疾病バイオマーカー候補を明らかにするため、OPLS-DA 解析を行った。得られたローディングデータの S-plot 分析により、2 群間の相違に寄与する代謝物ピークがいくつも観察された。そこで、これらの代謝物ピークのうち、異種プラットフォーム間 [MALDI vs ESI (RP+HILIC)] でオーバーラップするピークを選択することで、絞り込みを行い、さらに、該当するピークの MS/MS 情報および FT-ICR-MS による超高精度の精密質量情報と NMR ケミカルシフトによる部分構造情報を合わせたデータベース照合により、該当ピークの化学構造を容易に同定することができた。

以上の結果から、NMR と MS を組合せた多元的 MP 法は、バイオマーカー候補となりうる代謝物情報をより高精度に把握するだけでなく、生体試料のメタボローム解析に必要な標品非依存的な代謝物同定に資する極めて有用な基盤技術となりうることを示された。

血管径の変化によるガドリニウム造影剤濃度推定誤差の検討

○中村和浩¹, 近藤靖¹, 水沢重則¹, 曾雌泰央², 陳国躍², 木下俊文¹

¹秋田県立脳血管研究センター

²秋田県立大学・システム科学技術学部

Estimation error of gadolinium tracer concentration relating to blood vessel diameter

○Kazuhiro Nakamura¹, Yasushi Kondoh¹, Shigenori Mizusawa¹, Yasufumi Soshi², Guoyue Chen², Toshibumi Kinoshita¹

¹Akita Research Institute for Brain and Blood Vessels, Akita, Japan.

²Faculty of Systems Science and Technology, Akita Prefectural University, Akita, Japan.

Cerebral blood flow (CBF) in rat ischemic tissue is not properly estimated using dynamic susceptibility contrast (DSC) technique. An assumption of proportional constant between signal intensity and tracer concentration should be different between normal and ischemic tissue. We simulated the NMR signal reduction of DSC technique using the vessel model including different vessel diameter with reasonable physiological condition. The results suppose the proportional constant in the ischemic tissue is increased according to the vessel diameter distribution.

1. はじめに

我々はガドリニウム (Gd) 造影剤を用いた動的磁化率コントラスト (DSC) 法および、持続的スピンラベリング (CASL) 法によりラット脳虚血領域での脳血流量 (CBF) 推定値を比較検討してきた。この結果、正常血流量から50%以上のCBF低下領域においてDSC法とCASL法で相対的血流低下量が異なることを報告してきた[1, 2]。DSC法では、MRI信号強度の変化(ΔR_2^*)が組織の造影剤濃度に比例するという関係を利用する。この比例定数は一般に定数と考えられるが、プロトンの拡散距離を考慮すると、血管径や血管密度によってその比例係数は異なることが知られている[3]。我々は、この比例係数の変化について、シミュレーションモデルを用いて検討することにした。シミュレーションモデルではFig. 1に示すように、血管を模擬した磁化率の異なる円柱を一定範囲内にランダムに配置する。実際の生体モデルに近づけるため、血管径分布を正規分布させてランダムに配置した血管モデルについても合わせて検討した。

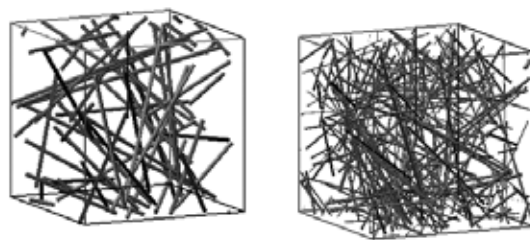


Fig. 1 Blood vessel distribution model. The model with same vessel radius (left) and different distributed radius (right) are shown.

脳血流量計測、Gd造影剤、磁化率効果

○ なかむらかずひろ, こんどうやすし, みずさわしげのり, そしやすふみ, ちんこくやく, きのしたとしふみ

2. 方法

プロトンの拡散距離を考慮したうえで、造影剤の磁気遮蔽効果を計算し、造影剤濃度と信号強度の関係をモデル論的に計算する手法が知られている[3]。我々はこの手法を参考にした。シミュレーションモデルは、Matlab (Mathwork社, USA) で作成し、アルゴリズムの確認をおこなった後、計算処理速度を考慮し、C言語でプログラムを作成した。水素原子核は、時間 Δt 毎にx, y, z各方向に、平均0, 標準偏差 $\sqrt{D\Delta t}$ でランダムに移動する。Dは拡散係数である。個々の磁気じょう乱体が水素原子核に及ぼす磁界変化の総和から、水素原子核移動先の磁界を求め、磁界変化量から位相変化量を計算し、個々の水素原子核の位相変化量は100msまで計算した。また、水素原子核40000個の位相変化を求め、平均値を計算した。測定される信号強度は、位相変化量に基づき計算され、この信号強度変化から勾配磁場法とSpin Echo法を用いた信号強度変化である ΔR_2^* と ΔR_2 をそれぞれ求めた。また、磁気じょう乱体の半径を変化させてシミュレーションモデル実験をおこなうことで、血管径増大に伴う信号変化を模擬した。

3. 結果・考察

血管径分布を正規分布させてランダムに配置した血管モデルについて検討した結果、その平均血管径で考えれば、単一血管径からなるモデルとほぼ同等のシミュレーション結果であった。血管径を増大させ、信号減推量を模擬した結果をFig. 2に示す。この図は、血管の数を増加させ、脳血流量を増加させた場合に比べて、血管の数は同数で血管径が増大した場合に信号減推量がどの程度大きくなるかを示している。血

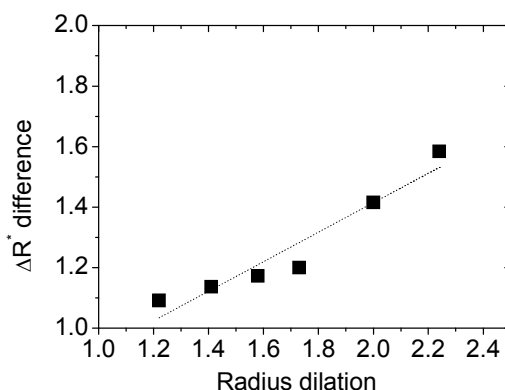


Fig. 2 Simulation result of NMR signal reduction ratio with different radius dilation.

管径がおおよそ2倍になると信号変化は単純な体積増加に比べて1.5倍程度信号減衰量が大きくなった。磁気じょう乱体である血管が増加すれば、信号強度は減衰するが、同じ脳血流量の増加であっても、配置される脳血管径が異なることで、信号減推量が異なることを示している。このことは、造影剤濃度に変換する比例定数が血管径の分布で見かけ上異なることを意味する。虚血領域で観察される脳血流量の増大は、血管の配置は変わらず、それぞれの血管径が増大するためだと考えるのが生理学的には妥当であり、この条件下では脳虚血領域で血管径が増大していることにより比例定数が増加し、DSC法では虚血領域で脳血流量の過大評価されることが説明できたと考えられる。

参考文献

- [1] Kagaya et al., Proc ISMRM 14 (2006) 1467、[2] 加賀谷ら, 生体医工学 44 (2006) 286-292、[3] Boxerman et al., MRM, 34 (1995), 555-566

マジックエコー DANTE 法による自己再結像スライス選択

○増本秀史¹、橋本雄幸²、松井茂¹

¹筑波大学大学院数理物質科学研究科

²横浜創英短期大学情報学科

Self-refocused slice selection by the magic echo DANTE method

○H. Masumoto¹, T. Hashimoto² and S. Matsui¹

¹ Graduate School of Pure and Applied Sciences, University of Tsukuba, Tsukuba, Ibaraki

² Department of Information Technology, Yokohama Soei Junior College,
Yokohama, Kanagawa

The method of slice selection proposed for solid-state MRI by combining DANTE selective excitation with magic-echo (ME) line narrowing requires a rephasing period 0.58 times the DANTE excitation period. The added rephasing period results in a significant loss of sensitivity due to transverse relaxation. To solve the sensitivity problem, we make use of the self-refocusing effect of the 270° Gaussian-shaped soft pulse by introducing a 270° flipping Gaussian modulation to the ME DANTE method. This eliminates the rephasing period. The utility of the improved method is demonstrated by experiments performed on test samples of adamantane and polycarbonate.

【導入】我々は液体用スライス選択法 DANTE と line narrowing のための Magic Echo を組み合わせた、固体 MRI 用スライス選択法 Magic Echo DANTE 法（以下、ME-DANTE）を開発した[1]。この方法では、液体で通常用いられる sinc 関数状に変調した RF によるスライス選択法と同様に、スライス選択に必要な磁場勾配の影響で RF 磁場による DANTE 励起時間内に横磁化の位相に Dephasing が生じる。これを補正するために Rephasing が不可欠であり、励起時間の約半分程度の時間が必要となる。しかし、核磁化の横緩和時間が短い固体においては Rephasing 時間での信号減衰が致命的になりかねない。そこで我々は、Emsley らによって 270° Gaussian パルスの自己再結像効果を用いた選択励起法の報告に注目した[2]。ME-DANTE に 270° Gaussian の自己再結像効果を組み込むことで、Rephasing 時間をゼロにすることを試みた。

【シーケンスとシミュレーション】270° Gaussian を ME-DANTE に組み込んだシーケンスを Fig.1 に示す。一般に、ガウス関数は半値幅を決定すると一意的にその形状が決まる。我々はまず Bloch 方程式に基づいたシミュレーションを行い、最後の DANTE RF

slice selection; MRI; self-refocused

○ますもとひでふみ、はしもとたけゆき、まついしげる

パルス印加終了時刻においてRephasingが最適となるようなガウス関数変調を探索した。シミュレーションはサンプルチューブ内の水を想定して行い、用いたシーケンスはFig. 1からME (TREV-8)を取り除いたものである。 $\tau_D=120\mu\text{s}$ として、横緩和時間はスライス形状の正確な確認のため無限大としている。

【結果と考察】シミュレーションにより得られたスライス形状をFig. 2に示す。比較のため DANTE RF パルスを 90° Gaussian 変調し、Rephasing 時間を有限に取った従来法での結果も示してある。従来法に比べて若干 side lobe があるが、 270° Gaussian 変調の場合でも十分なスライス選択ができることがわかる。

現在、固体サンプルとして Adamantane, PolyCarbonate を用いた実験を行なっている。実験結果はポスターにて発表する予定である。

- 【参考文献】1. S. Matsui, H. Masumoto and T. Hashimoto, *J. Magn. Reson.* 186, 238-242 (2007)
2. L. Emsley and G. Bodenhausen, *J. Magn. Reson.* 82, 211-221 (1989)

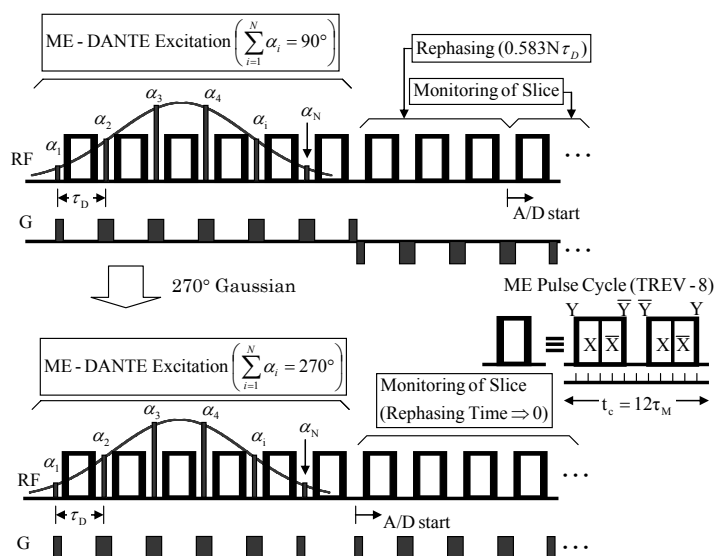


Fig. 1. Pulse sequences for the conventional (upper) and self-refocused (lower) ME DANTE method of slice selection

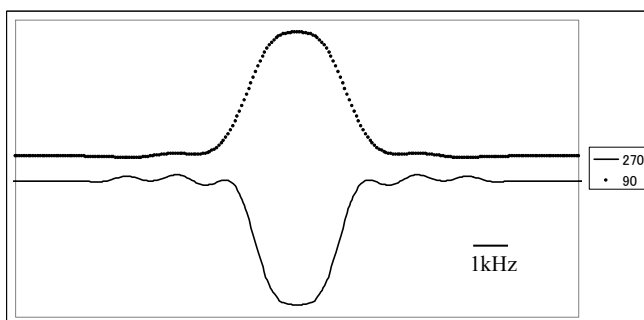


Fig. 2. Simulation results of the DANTE using the 270° and 90° flipping Gaussian modulations

P105 フェリチン水溶液およびゲル試料における水の横緩和速度

○高屋 展宏、渡邊 英宏、三森 文行
国立環境研究所

Transverse relaxation rate of the water in ferritin solution and agarose gel

○Nobuhiro Takaya, Hidehiro Watanabe, Fumiyuki Mitsumori
National Institute for Environmental Studies, Tsukuba, Ibaraki, Japan

We recently reported that the apparent transverse relaxation rate ($R_2^\dagger = 1/T_2^\dagger$) of the tissue water in human brain is well explained with a linear combination of relaxations due to ferritin iron ([Fe]) and the macromolecular mass fraction ($f_M = 1 - \text{water fraction}$). In this study, we attempted to make a simple model system where the same relaxation analysis is applicable. The model system was constructed by adding various amounts of agarose to a ferritin solution and gelling it. Relaxation rate of the gel appears to be analyzed in the same way as human brain. It allows us to analyze the relaxation mechanism in a wider range of B_0 .

【はじめに】

我々はヒト脳in vivo測定により、脳組織水の横緩和速度が組織内に含まれるフェリチン鉄([Fe])と高分子量分画(f_M)によって概ね決定されていることを示した[1,2]。この報告では、モデル系としてフェリチン水溶液とアガロースゲル中の T_2 緩和時間の測定を行いin vivo測定で用いた横緩和速度が鉄濃度と高分子量分画の線形和で説明できるとする提案 $R_2^\dagger = \alpha [\text{Fe}] + \beta f_M + \gamma$ (定数項) をin vitroで再現できるか否か検討する。

【方法】

水溶液の試料は精製したウマのフェリチンを[Fe]値で0~60mg/100mgになるように濃度を変えて調製した。また、水の運動速度を制限するためにアガロースを0.5, 1.0, 1.5%になるように加えてゲル化させた試料も調製した。 T_2 測定はCPMG法を用い室温で1.9, 4.7, 9.4, 11.7, 14.1, 18.8Tの6種類の異なる磁場強度で測定を行った。

1.9, 4.7TはVARIAN社製の横型イメージング装置、9.4, 14.1TはVARIAN社製の縦型NMR装置、11.7, 18.8Tは日本電子社製の縦型NMR装置を用いた。シークエンスの条件は 90° , 180° パルスに270ms, 540msのsquare pulseを用いてエコースペーシングは2msで統一した。

【結果と考察】

フェリチン水溶液の横緩和速度(R_2)は[Fe]に比例して直線的に増大し(図1)、その比例係数(k_2)は観測磁場強度に依存して直線的に増大した。この結果はin vivo脳の状況を再現している。一方、アガロースゲルにおいて[Fe]を変化させた場合も R_2 はこれに比例して増大した。 k_2 値は水溶液の場合と同様、観測磁場強度に依存して直

フェリチン、横緩和機構、鉄

○ たかや のぶひろ、わたなべ ひでひろ、みつもり ふみゆき

線的に増大した。測定で得られた R_2 を $R_2 = \alpha [\text{Fe}] + \beta f_{\text{agarose}} + \gamma$ (f_{agarose} : アガロース濃度(%)) の式で重回帰分析した結果、鉄の寄与する項の係数 α とアガロースの寄与する項の係数 β が得られた(表1)。 γ の値は鉄、アガロースの項が共に0の場合、すなわち、鉄、アガロースゲルが共に含まれていないサンプルの R_2 の実測値を用いた。すべての磁場強度において、重決定 r は非常に高く、この結果より $[\text{Fe}]$ とアガロース濃度は独立して直線的に R_2 に寄与していることが示された。すなわち、このモデル系ではin vivo測定における R_2^* が $[\text{Fe}]$ と f_M 双方に直線的に依存するモデル $R_2^* = \alpha [\text{Fe}] + \beta f_M + \gamma$ と同様の解析が可能であることを示す。さらに重回帰分析により得られた係数 α を磁場強度に対してプロットすると直線的に増大していることが分かる。これは超常磁性を示すフェリチン鉄の緩和特性を示している(図2)。これらの結果より、今回作成したモデル系による測定は、ヒト脳組織水の横緩和速度の機構解明の一助になると考える。

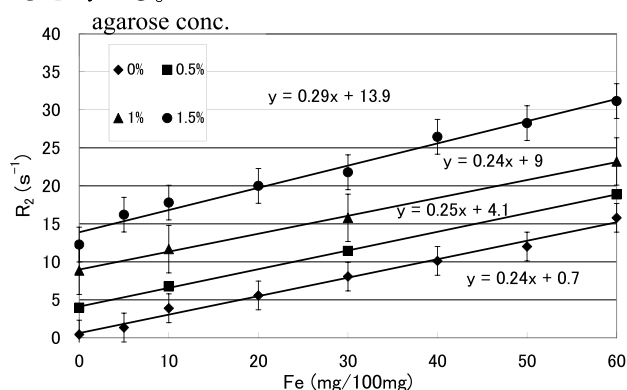
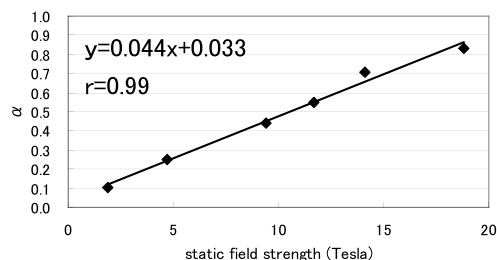


Fig.1. R_2 values of water as a function of the ferritin iron concentration ($[\text{Fe}]$) in ferritin solution and agarose gels (0.5 ~ 1.5%).

B_0	1.9 T	4.7 T	9.4 T	11.7 T	14.1 T	18.8 T
α	0.101 ± 0.002	0.248 ± 0.002	0.442 ± 0.01	0.548 ± 0.008	0.706 ± 0.014	0.832 ± 0.018
β	8.92 ± 0.15	9.37 ± 0.07	10.6 ± 0.36	10.1 ± 0.29	10.9 ± 0.47	11.6 ± 0.62
γ	0.350	0.430	0.380	0.420	0.305	0.42
correlation coefficient	0.996	0.992	0.983	0.992	0.988	0.967

Table 1. Parameters of α and β obtained with a multiple regression analysis on the observed R_2 values at various B_0 strengths in ferritin solution and gels. γ is obtained with a buffer solution containing no ferritin nor agarose.



【参考文献】

- [1] Mitsumori F, Watanabe H, Takaya N, Garwood M: Magn. Reson. Med.,58, 1054 (2007)
- [2] Mitsumori F, Watanabe H, Takaya N: Magn. Reson. Med., in press (2009)

Fig.2. Linear relationship observed α and B_0 .

高磁場環境対応の高性能非磁性薬液注入装置の開発

○平川慶子¹, 森川秀行², 村木秀樹², 佐藤格夫⁴, 小池薫³, 増野智彦⁴, 大野曜吉¹

¹ 日本医科大学 NMR 研究施設

² (株) ユニフローズ

³ 京都大学 初期診療・救急医学

⁴ 日本医科大学 救急医学

Injection system especially designed for clinical and analytical use in a high magnetic field strength above 7 tesla

Keiko Hirkawa¹, Hideyuki Mori², Hideki Muraki², Norio Sato⁴, Kaoru Koike³, Tomohiko Masusno⁴ and Youkichi Ohno¹

¹NMR laboratory, Nippon Medical School

²Uniflows Co. Ltd.

³Department of Primary Care & Emergency Medicine, Kyoto University³⁾

⁴Department of Emergency and Critical Care Medicine, Nippon Medical School⁴⁾

We have succeeded in development with MR injection system designed for use in all MR Scanner field strengths up to and beyond 7T. Our device uses The new device enables to control the pump hydropneumatically with an improved space-saving design. The device has proven reliability and high performance enough to clinical practice.

【背景】MRI 診断は、医療技術として、今日広く臨床応用されている。特に、脳症、髄膜炎、脳梗塞等の脳 MRI の有用性は極めて高く、急性症状が強く、迅速な確定診断が必要とされる小児の高熱性の疾患においても、有用性が高いとされている。3T 以上の高磁場装置の導入も急速に広がり、測定技術・画像解析法の進歩、優れた造影剤の開発に伴って、迅速・高情報量かつ高画質の画像測定が日常的に行われるようになってきた。

しかしながら、MRI 装置の設置環境は強磁界空間であるために、医療現場での画像測定実施においては、磁場の乱れによる性能低下および安全確保の観点から磁性体の持ち込みは厳禁である。また、MRI の検出信号に悪影響を及ぼす電気ノイズの発生の可能性のある電気製品も高画質の画像測定には不適である。

シリンジポンプ、非磁性

○ひらかわけいこ, もりかわひでゆき, むらきひでき, さとうのりお, こいけかおる, ますのともひこ, おおのようきち

このため、医療現場で広く使われている輸液ポンプ・シリンジポンプといった薬液注入装置は、磁性体を含み、磁気モーターが使用されているために、MRI 室への持ち込みが禁止されている。MRI 室対応の装置もすでに開発はされているが、高精度・安価、操作性・メンテナンスのすべてを満たす製品はない。実際には、治療の都合上持続的な薬剤投与が必要な症例も多く、撮像中の体動による画像の乱れが懸念される小児においては、撮像中の鎮静剤持続投与が必要になる場合もある。一般の医療施設では、不本意ながら MRI 適用外となってしまう患者が多いのが現状である。以上の背景から、3T 以上の高磁場の MRI 装置内でも安心して使用できる、汎用性の高い高性能の非磁性薬液注入装置が必要であると考え、新たに医療現場で実用可能な高磁場 MRI 装置対応のシリンジポンプを開発した。

【開発の経緯】高磁場 MRI 室用シリンジポンプとして開発すべき要素は①非磁性であること②電気ノイズを発生しないこと③高精度の速度・液量制御が可能であること④安全性・操作性・メンテナンスにすぐれた仕様を実現できること⑤小型・安価であることであると考え、NMR 技術者・臨床医・輸液ポンプ開発に実績のある企業との共同研究を行った。

【装置の概要】強磁場空間である MRI 装置あるいは周辺には磁性体や電気製品を一切使用しないことが必須と考え、MRI 室内には非磁性体の薬液注入用シリンジおよびシリンジ駆動用複動型液圧シリンダからなる①シリンジ部を設置し、MRI 室外（非磁場環境）に動力側液圧シリンダ・動力発生用モーターおよびコントローラーからなる②動力部を設置することとした。①および②の両シリンダ間は、非磁性液を充填後、外部から密閉した非磁性配管でつなぎ、ハイドロニューマチックなコントロールが可能な装置を試作した。小動物用 7T MRI 装置内で、高磁場環境内で問題なく高精度の動作が確認できた。この結果、少ない構成要素を用いて、小型・安価かつ操作性に優れ、シンプルで高精度の仕様が可能なポンプの製品化が可能となった。

【考察】我々が開発した装置は MRI 室に設置するシリンジ部が完全に非磁性であり、電気部品を全く用いておらず、7 テスラ以上の高磁場 MRI 装置内への設置も可能なことが確認できた。①小型・操作性・安全性の観点から、患者・医療従事者および装置の安全と利便性が確保される。②磁場・電場の乱れがないために、高画質の画像測定が期待できる。③シリンジ部を患者近くに設置できるために、薬液の浪費を防ぐことができる等の利点があり、医療従事者の負担の軽減、MRI 装置稼働率の向上、高磁場 MRI 画像診断患者の適用拡大等による医療の質向上が期待できる。

本技術は、高磁場 MRI 装置を用いた動物実験研究や高分解能 NMR 装置におけるシリンジポンプによる液体持続注入（合成反応・酵素反応等のリアルタイム NMR 観測等）への応用等も可能であり、これまで、強磁場空間ゆえに不可能であった実験研究への応用が実現できると考えている。

ー 透析治療の患者血漿と廃液の解析

○藤原正子¹、安藤一郎^{1,2}、根本直²、竹内和久^{1,3}、今井潤¹¹東北大・薬 ²産総研・バイオメディシナルセンター³(医)宏人会中央クリニック**Clinical Application of ¹H-NMR Metabolomics to Hemodialysis**○Masako Fujiwara¹, Itiro Ando^{1,2}, Tadashi Nemoto², Kazuhisa Takeuchi^{1,3}, Yutaka Imai¹¹ Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University, Sendai, Japan.² Biomedical Information Research Center, AIST, Tsukuba, Japan.³CKD Center, Koujinkai Central Hemodialysis Clinic, Sendai, Japan

Plasma from patients of pre- and post- hemodialysis together with their waste-fluid during dialysis treatment were collected and measured by 600 MHz NMR spectroscopy. Spectral patterns of plasma between pre- and post- dialysis were clearly discriminated together with significant fluctuations in the level of low-molecular-weight metabolites. Several metabolites such as lactate and alanine have decreased with the different ratio from that of creatinine, which suggested endogenous generation during treatment. Spectral quantitation of these metabolites in plasma with high density of proteins was attempted to monitoring dialysis treatment.

<はじめに> NMRメタボロミクスの方法として我々は、含まれる代謝物の量比を水素核NMRスペクトルのパターンとして把握し解析する。昨年本会で慢性腎臓病とその進行した病態である血液透析を行う患者への応用を報告した。透析患者血漿のスペクトルのPCA解析の結果、治療前後に変動する低分子代謝物のプロファイル（クレアチニン、グルコース、アミノ酸、TMAO、ラクテート、および透析液成分など）を得た。今回は、これら代謝物の変動量を求め、透析による内在的代謝の変化を解析する。これによって病態把握や治療のモニターや管理の新たな指標を探索する。

<対象>透析患者の透析直前と直後の血液と治療中の廃液を病院から収集した。

<方法>血漿は200 μLに生理食塩水400 μLで薄め、廃液はそのまま600 μL、各々D₂O、TSP-d₄を加えたものを1サンプルとし、これを600 MHz NMR (JEOL ECA) により¹H NMR測定した。水消しは事前照射法を用いた。スペクトル処理および解析にはALICE 2 for metabolome (JEOL Ltd.)を用いた。各代謝物はスペクトルのピーク積分値を求めることで定量したが、TSPが多量のアルブミンに吸着するため、TSPは定量の内部標準にはならない。蟻酸カルシウムを定量の標準として添加することで正確な定量を行った。

<結果>透析中のラクテートの増加は予期せぬものであり、元の透析液にも含まれないため、体内からの供給が考えられる。その他にアラニン、バリンなどさらに蟻酸も、クレアチニンとは違う見掛けの透析率を持つことがわかった。似たような分子量の低分子の透析効率が違うことは従来報告がない。透析廃液も時間を追って測定したところ、廃液にも人によってはラクテートなどが増加しており、病態との関連が示唆される。

キーワード：メタボロミクス、パターン認識、血液透析

○ふじわらまさこ、あんどういちろう、ねもとただし、たけうちかずひさ、いまいゆたか

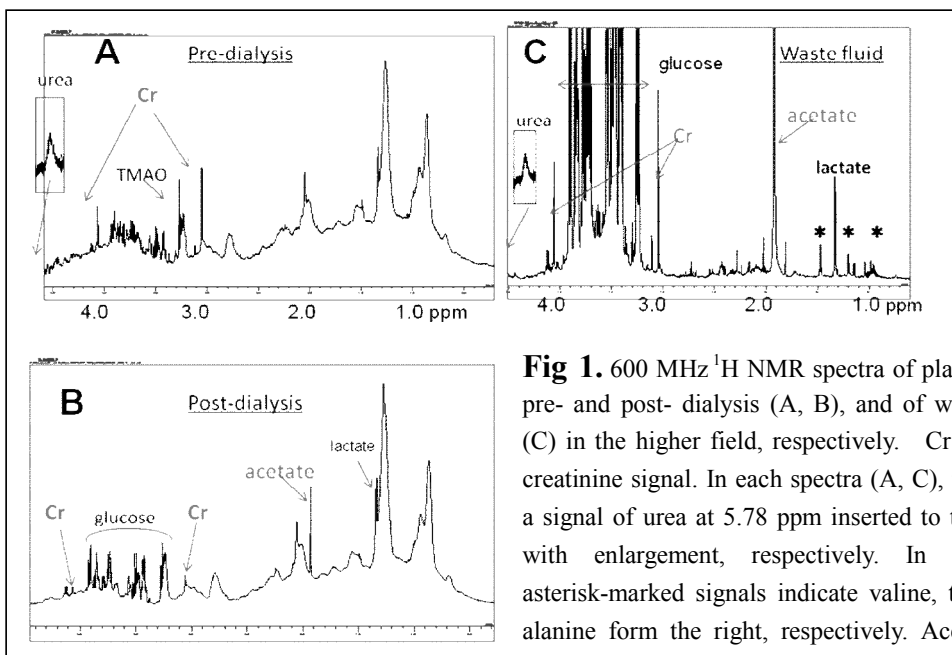


Fig 1. 600 MHz ^1H NMR spectra of plasma from pre- and post- dialysis (A, B), and of waste fluid (C) in the higher field, respectively. Cr indicates creatinine signal. In each spectra (A, C), there was a signal of urea at 5.78 ppm inserted to the figure with enlargement, respectively. In (C), the asterisk-marked signals indicate valine, threonine, alanine form the right, respectively. Acetate was included in the dialysate buffer.

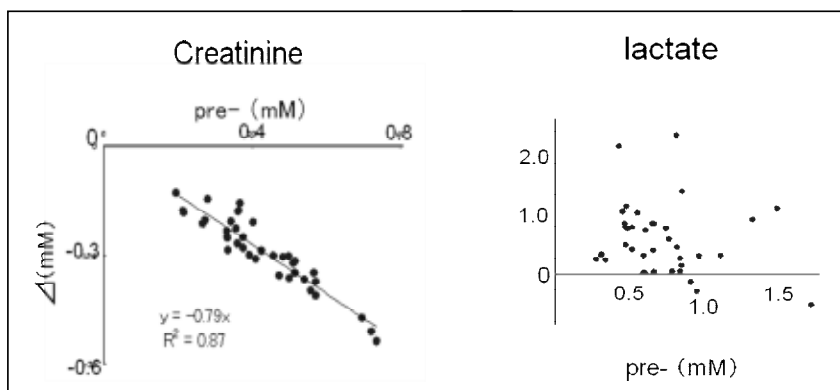


Fig.2 Correlation of the concentration between pre- and difference Δ of 37 subjects in mM, respectively. $\Delta = \text{post} - \text{pre}$, While creatinine was cleared by dialysis, lactate level elevated in post-dialysis plasma.

参考文献

- Masako Fujiwara *et al.* Pattern Recognition Analysis for ^1H NMR Spectra of Plasma from Hemodialysis Patients. 2009, Ana. Bioana. Chem. 394, 1655-1660
- Itiro Ando *et al.* A study of the use of formate as concentration standard for ^1H NMR metabolomics of plasma. 2009, J. Toxicol. Sci. in press.
- 藤原正子他 「NMR メタボロミクスの医療への応用ー 生活習慣病・慢性腎臓病を標的にして」 遺伝子医学 MOOK16 号 “メタボロミクスと最新分子バイオマーカー研究ーその探索技術と臨床・創薬応用研究の最前線” 2009.11 メディカル・ドゥ刊

Protein NMR measurements by newly Configured NMR with Superconducting Split-Magnet and Solenoidal RF Coil○Hideki Tanaka¹, Manabu Hasegawa¹, Michiya Okada¹, Takamitsu Kohzuma² and Hitoshi Kitaguchi³¹Hitachi Research Laboratory, Hitachi Ltd., Hitachi, Japan.²Ibaraki University, Mito, Japan.³National Institute for Materials Science, Tsukuba, Japan.

Theoretically, solenoidal RF coils have higher NMR sensitivity than saddle RF coils. And we have experimentally shown this effectiveness with 0.1% E.B. by developing a newly configured NMR. In protein NMR measurements, salt and buffer cause dielectric losses and decrease sensitivity. So, we compared sensitivities of protein NMR between conventional 700 MHz NMR system and our 600 MHz NMR system. In the results, sensitivities of our system have 1.6 times higher than that of conventional system.

NMRの測定感度において、ソレノイド型RFコイルはサドル型RFコイルよりも優れていることが知られている⁽¹⁾。近年ではその高感度を活かし、固体NMRの測定にソレノイド型RFコイルが用いられている。一方溶液NMRにおいては、静磁場用電磁石の超電導化以降、ソレノイド型RFコイルの用途は限られてきた。これに対し、我々はスプリット型超電導磁石を有する新方式NMRを開発し、溶液NMRにおける高感度化の実証を行ってきた⁽²⁾。

Fig.1 に新方式NMRの断面図を示す。試験管は、超電導磁石の隙間から鉛直方向に装填される。静磁場は水平方向、RF磁場は鉛直方向である。従来形式では困難であったソレノイド型RFコイルへの試験管装填を、超電導磁石を左右に分割することで容易とした。これまでに300MHz機と600MHz機を作製し、標準試料(0.1% E.B.)を用いて新方式NMRの優位性を示した⁽³⁾。

タンパク質NMR測定では、誘電損失により測定感度が低下することが知られている。誘電損失は、試料中の塩・バッファと、RFコイルが作る電界分布に依存する。

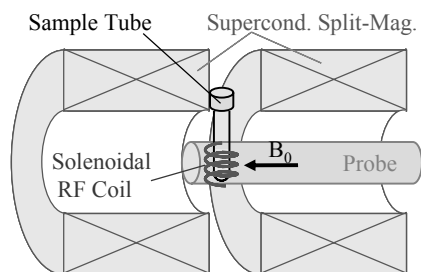


Fig. 1 Schematic diagram of newly configured NMR with solenoidal RF coil

新方式NMR, スプリット型超電導磁石, ソレノイド型RFコイル

○たなかひでき, はせがわまなぶ, おかだみちや, こうづまたかみつ, きたぐちひとし

そこで、タンパク質NMR測定における新方式NMRの感度優位性を実証するために、塩・バッファーを含む試料で、従来方式との感度比較を行った。

Table1 にサンプル条件を示す。バッファー濃度、塩濃度はタンパク質測定で用いられている一般的な濃度を採用した。Fig. 2(a)に試験管の外観を示す。誘電損失は試料体積にも依存するため、試料領域の高さを変更しつつ、感度比較を行った。Fig. 2(b)に、信号強度の定義を示す。信号強度はアノメリックプロトン信号を対象とし、そのスペクトル高さ S_{peak} とスペクトル面積 S_{area} を評価した。一般的に試料高さを 10mm 以下に設定すると、静磁場均一度調整(シム)が困難となり、感度評価が不正確になる。しかし、スペクトル面積を感度指標とすることで、シムの影響を排除し、システムの持つ感度ポテンシャルを比較することが可能となる。ノイズ強度は帯域 100Hz での標準偏差を用いた。なお、ノイズ強度比較を正確に行うため、スペクトル表示時の周波数分解能は 0.12Hz で共通とした。以上の条件において、新方式 600MHz と従来方式 700MHz 機の感度比較をそれぞれの低温プローブを用いて行った。

Fig. 3 に測定結果を示す。縦軸はスペクトル面積を信号強度とした場合の S/N 比、横軸はサンプル領域高さである。新方式 600MHz 機は、従来方式 700MHz 機と比べ、1.6 倍程度高い測定感度を有することが明らかとなった。

本研究の推進に際して、正田英介 先生、木村錫一 先生、神田大輔 先生、森田勇人 先生のご指導、ご支援を賜りました。また、本研究の一部は、文部科学省科学技術振興費委託研究、(19文科振199号)の一環として行われました。

- (1) D. I. Hoult and R. E. Richards, J. Magn. Resonance 24, 71 (1976)
- (2) 新方式NMR用スプリット方式超電導磁石の開発 岡田, 北口 第46回NMR討論会 講演要旨集 P82 (2007)
- (3) 新方式NMR用低温プローブの開発(2) 一木, 川崎, 福田, 山本, 岡田, 北口 第47回NMR討論会 講演要旨集 P390 (2008)

新方式NMR, スプリット型超電導磁石, ソレノイド型RFコイル

○たなかひでき, はせがわまなぶ, おかだみちや, こうづまたかみつ, きたぐちひとし

Table 1 Sample condition

Sucrose / D ₂ O	10mM
Phosphate buffer	20mM
NaCl	50mM

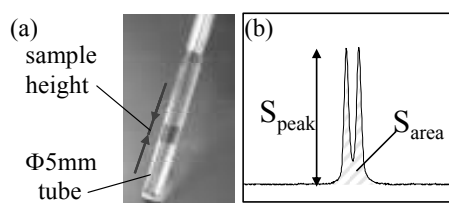


Fig. 2 (a) Appearance of sample tube with various sample height. (b) Anomeric proton signal and definitions of S_{peak} and S_{area} .

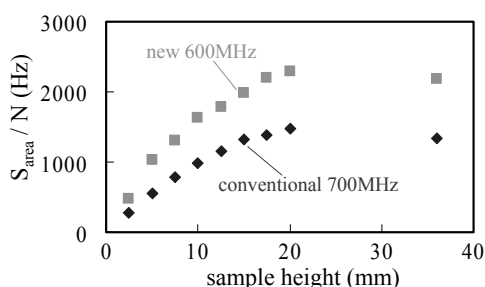


Fig. 3 Sensitivity competition at various sample height

Line-Shape Prediction by Integrating Simulations of the Radio-Frequency Electromagnetic Field and the Static Magnetic Field○Minseok Park¹, Michiya Okada¹, and Hitoshi Kitaguchi²¹Hitachi Research Laboratory, Hitachi Ltd., Hitachi, Japan.²National Institute for Materials Science, Tsukuba, Japan.

Line-shape is of great importance in most NMR experiments. Acquiring good line-shape needs extremely carefully fabricated RF coil, because the magnetization of the coil dominates the B_0 inhomogeneity in most of the practical magnets. Many efforts have been devoted to the engineering of the coil magnetism, and achieved linewidth approaching 1 ppb in casual probes. However, a cryogenic probe still yields rather broad spectrum. Computer simulation may accelerate the design of the magnetism of the cryogenic probe.

In this presentation, we introduce a novel technique to calculate not only the B_0 distribution in a sample but also the line-shape of the spectrum. The technique combines the B_0 distribution with the B_1 distribution obtained by RF field simulation. The technique was applied to designing a solenoidal RF coil for a cryogenic probe of a novel 600 MHz system.

磁場分布はline-shapeに決定的な影響を与えるため、試料周辺に配置するRFコイル等の磁性設計はプローブ開発において極めて重要である。従来、プローブの磁性設計には、各部品の形状と磁化率から試料中の磁場分布を計算する静磁場解析法が用いられてきた[1]。しかし、磁場分布がline-shapeに影響を与える度合いは、その場所の感度分布に比例する。例えば、感度が0の位置における磁場分布は、line-shapeに何ら影響も与えない。従って、プローブの磁性設計は、磁場分布と感度分布を同時に考慮しなければならない。感度分布を考慮することは、試料周囲の構造が複雑な場合、特に重要である。例えば、低温プローブは、室温の試料からわずか数mm離れたRFコイルを20K以下に冷却するために、試料の周りに非常に複雑な構造を持つ。

我々は感度分布と静磁場分布を用いてスペクトルのline-shapeを予測する方法を開発して、600MHzの新方式NMR装置に挿入する低温プローブの設計に適用した。新方式NMR装置は、図1の如く超電導磁石を左右に分割して、高感度のソレノイド型RFコイルを用いることを最大の特長とする。ソレノイド型RFコイルを用いる上でのひとつの難点は、図1のように B_0 磁場と試料

○ぱくみんそく, おかだみちや, きたぐちひとし

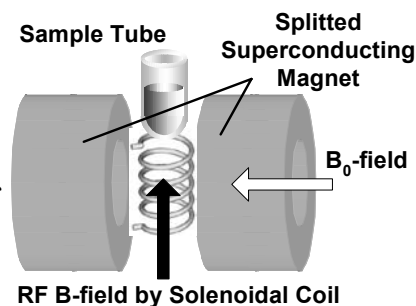


Fig. 1 Key concept of the novel NMR system

料管が直交するため、RF コイルの磁化が試料中に不整磁場を作り易いことであった。

本研究では、この難点を解決するため、RF コイルが作る不整磁場の分布と感度分布を解析で求めた。不整磁場の分布は独自開発した静磁場解析プログラムを用いて、感度分布はComputer Simulation Technology社のMicrowave Studio™を用いて、各々求めた。RF コイルの形状モデルは、解析効率と結果の整合性を得るために、および両方の解析で共通のモデルを用いた。

図2に求めた試料中の感度および不整磁場の分布を示す。試料の高さ方向の座標はRF コイルの高さで規格化し、試料の径方向の座標は試料の半径で規格化した。設計の一例として、形状の異なる2つのRF コイルにおけるline-shapeの計算結果を図3に示す。

本研究の解析方法は、図3の如くline-shapeまで考慮したRF コイルの設計を可能にする。解析による設計は、低温プローブのように実験準備に長時間を要するプローブを開発する際に特に有効であり、本研究では解析により開発期間を約1/40に短縮した。

本研究の推進に際して、正田英介 先生、木村錫一 先生、神田大輔 先生、森田勇人 先生、高妻孝光 先生のご指導、ご支援を賜りました。また、本研究の一部は、文部科学省科学技術振興費委託研究、(19文科振199号)の一環として行われました。

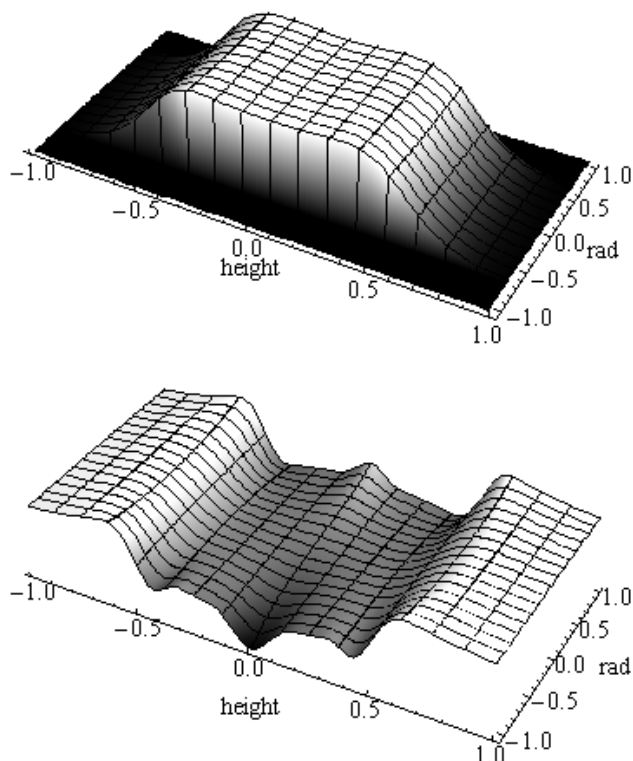


Fig. 2 Distributions of (a) sensitivity and (b) B_0 inhomogeneity in the sample. Height unit is the RF coil height, and radius unit is the sample radius.

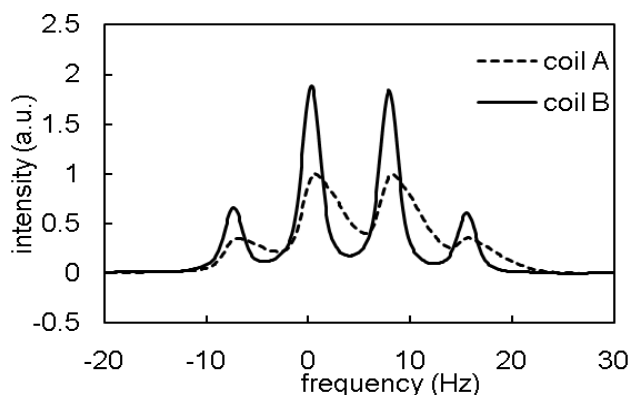


Fig. 3 Predicted line-shapes of CH_2 quartet of ethylbenzene.

(1) F. Doty et al. Magnetism in High-Resolution NMR Probe Design. I: General Methods, Concept Magnetic Res. **10**, 133-156 (1998)

Field distortion caused by shimming in superconducting magnet for solid-state NMR○Hideyuki Shinagawa¹, Shinobu Ohki¹, Teruaki Fujito² and Tadashi Shimizu¹¹National Institute for Materials Science, Tsukuba, Japan.²Probe Laboratory Inc., Tsukuba, Japan.

Field distortion induced by shimming through a coupling of the shim-coil and the magnet was investigated for the high magnetic field (1H - 930 MHz) superconducting magnet for high-resolution solid-state nuclear magnetic resonance (NMR). We found the field distortion or field drift following from the shimming, in which the shim setting was largely changed, may not be negligible for some experiments to obtain high resolution spectra using the superconducting magnet. The distortions have a relatively large time constant up to one week. Such a large change in the shim setting would occasionally happen after changing the probe. The method to computationally compensate such distortion in the magnetic field with an active shimming will be presented.

一般に核磁気共鳴(NMR)用超伝導磁石の磁場の安定度や均一度はシムコイルを用いて調整される。このとき、シムコイルによって形成される磁場は超伝導コイルと相互作用しており、測定空間の磁場は、シムコイルの発生する磁場の値の履歴に対応して、時間に依存した複雑な変動を示す。例えば、Fig. 1は、1H-930MHz超強磁場固体NMR用超伝導磁石において、シムの設定値を大きく変化させたときの測定空間における磁場の値を時間の関数として測定した結果を示すものである。時刻 t_1 において-100ppmの階段関数状の、また、時刻 t_2 において50ppm×15分間のパルス状の摂動磁場が与えられている。図に示されるように、摂動磁場が与えられるとそれに引き続

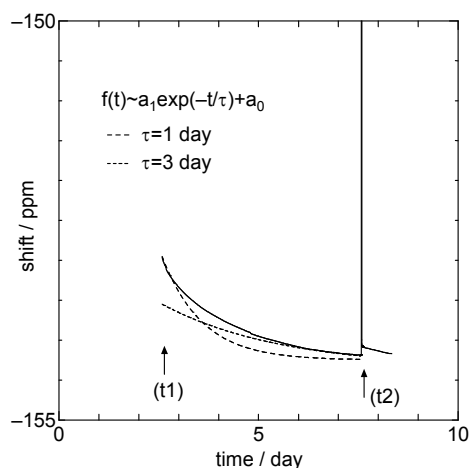


Figure 1. The magnetic field as a function of time on the field perturbations for high field NMR superconducting magnet.

Superconducting magnet、Field distortion、Shimming

○しながわひでゆき、おおきしのぶ、ふじとてるあき、しみずただし

き、緩慢な磁場の変動が観測される。磁場が安定するまでには、一週間以上の長時間を要することもある。図中の点線は、緩和時間 $\tau = 1$ および 3 日に設定した場合の指数関数による緩和曲線を示すが、磁場の変動はこのような単純な緩和曲線では近似できない。

溶液試料の NMR 測定の際は、重水素核等の溶媒の NMR 信号を用いた NMR 磁場ロックを行うのが一般的であるので、このような変動の影響は自動的に補償されており、明示的には現れない。ところが、固体 NMR 測定においては、NMR 磁場ロックの使用は一般的ではないので、何らかの対策が求められる。ここで問題としている磁場の揺動は超伝導磁石の磁場が大きいほどより顕著に現れる。本講演では、このようなシムの設定に起因する磁場の揺動とその補償方法について論ずる。

固体 NMR 測定においては、測定する核種や測定方法に依存して、プローブの変更がしばしば行われるが、多くの場合、プローブの変更はシム設定の大幅な変更を伴うので、前述のような磁場の揺動がしばしば重畳して引き起こされることになる。このような系に対して、我々は、ある時刻においてそれ以前に為された総てのシムの設定を反映した補償関数により、シムコイルを動的に駆動することによって、磁場の揺動を補償する方法を提案する。システムの概略は Figure 2 のブロック図に示されている。シムの状態は常に制御装置の監視下に置かれ、シムの設定の履歴は逐次記録される。補償関数 $g(t)$ は、記録されたシム設定の履歴に依存する関数であり、その値は時々刻々と算出され、シムコイルの駆動に用いられる。これにより、前述の磁場揺動は概ね 0.01 ppm 以下に抑えることができることがわかった。

本方法は磁場の Z_0 以外の成分にも同様に適用できるので、グラジエントパルスを用いた実験等で、パルス磁場の影響で一定時間信号の線形が劣化するような場合において、磁場の均一度を補償する用途にも応用できるものと期待される。

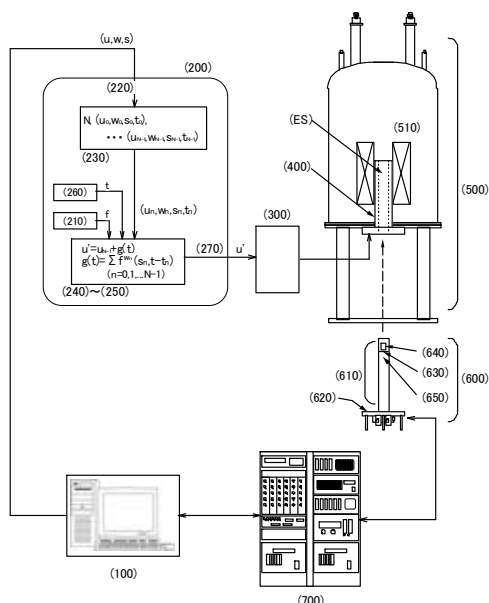


Figure 2. A block diagram of the system.

(100) Overall controller, (200) The shim controller, (210) Elemental function provider, (220) Shim setting receiver, (230) Shim setting recorder, (240) Compensation value calculator, (250) Accumulator, (260) Time base, (270) Transmitter, (300) Shim-coil drive, (400) Shim-coil, (500) Superconducting magnet for high resolution NMR, (510) Superconducting magnet, (600) NMR probe, (610) Tube body, (620) Flange, (630) Base of the resonator, (640) RF-Coil, (650) Tuning circuit, (700) NMR spectrometer, (ES) Field center, t : Time, u : Shim set value (e.g. Z_0), u' : Shim compensated value, w : Type of the setting (e.g. Step-function), s : Size of the setting (e.g. $Z_{0n}-Z_{0n-1}$), N : Number of shim-setting, $f^n(s, t)$: Elemental Compensating function, $g(t)$: Compensating function

小型超電導バルク磁石を用いたマイクロコイルNMR

○仲村高志¹, 室洋一¹, 越野広雪¹, 藤戸輝昭², 寺尾武彦³

¹理研・物質構造解析チーム

²プローブ工房

³京大

Micro coil NMR using compact superconducting bulk magnet

○ Takashi Nakamura¹, Yoichi Muro¹, Hiroyuki Koshino¹, Teruaki Fujito²
and Takehiko Terao³

¹Molecular Characterization Team, RIKEN, Saitama, Japan.

²PROBE Laboratory Inc., Tokyo, Japan., ³Kyoto University, Kyoto, Japan.

We developed new type of superconducting magnet using bulk superconductor. This magnet was designed for NMR application. It maintains magnetic field strength 4.7T and consists of a piece of three SmBaCuO and four EuBaCuO and has 20mm inner diameter room temperature bore. Temperature of bulk superconductor has kept in 40K below T_c using a pulse tube refrigerator. The area of NMR signal detection is too small, because size of magnet was very limited. Therefore, we must present more effective signal detection methods for this magnet. Magic Angle Coil and sample Spinning (MACS) is a powerful application for limited quantity sample. We build a MACS probe and detected signal of 400nl ethanol sample.

【序論】 高温超電導体を用いた小型無冷媒磁石での NMR 応用技術を開発することを目的に開発を行ってきた。この磁石は磁場を形成する材料に高温超電導材 (RE-Ba-Cu-O : RE 希土類元素、 $T_c=90K$) の超電導バルクを用い、小型の冷凍機の伝導冷却により 90K 以下の温度で超電導状態を保つことが出来る。したがって現時点では、高温超電導体による唯一の永久電流モードで安定な磁場を形成する磁石である。今回は、この超電導バルク体を用いた小型無冷媒磁石を 4.7T (1H 共鳴周波数 200MHz) に着磁し、その磁石でマイクロコイルによるワイヤレス検出にて NMR 信号検出を試みている。これは、市販されている NMR 用超電導磁石は直径 200mm 以上のコイルで磁場を形成するのに対し、バルク磁石は直径 60mm なので NMR の観測の為に必要な均一磁場の大きさが比例して小さくなる短所を補う為である。最近ではマイクロコイルを用いた高感度検出の応用が数多く紹介されており、小さな均一磁場領域でも可能な、この磁石に最適な応用技術として評価を行った。

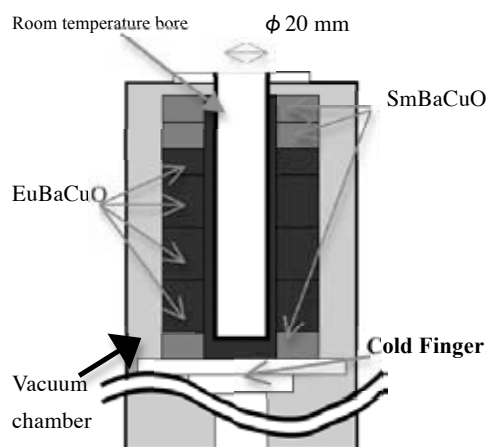


Fig. 1 Design of superconducting magnet

高温超電導, 超電導バルク磁石, 高感度・高分解能検出

○ なかむらたかし, むろよういち, こしのひろゆき, ふじとてるあき, てらおたけひこ

【実験】 熔融法 (melt-growth) で作成した直径 60mm のディスク上のバルク体の中心に 28mm の穴をあけ、樹脂含浸法により強度を向上させた超電導材を作製する。このバルク体を 7 組 (上段 2 つ下段 1 つ 10mm 厚の SmBaCuO、中段の上一段が 10mm 厚その他は 20mm の EuBaCuO) 2 種類の超伝導バルク材料を同軸上に積み重ねて 100mm 厚の超電導体を形成した。これにより現在の超伝導磁石とほぼ同様の構造を持つ室温ボア空間 (内径 20mm) の磁石を設計した (Fig. 1)。

バルク体は均一な静磁場を形成する為に NMR 用の超伝導磁石を用いて 4.7T に静磁場着磁した。結果、 ^1H 共鳴周波数 200.4MHz に信号を観測、安定した静磁場 4.7T を得た。次に検出系として、ワイヤレス検出を行う為のプローブを作製した。Fig. 2 に示すようにマジック角に設定した軸上で回転する直径 0.5mm のキャピラリ上に直径 0.04mm のホルマル線によるマイクロコイルと 0.5X0.5X1.0mm のチップコンデンサによる同調回路を形成し、そのマイクロコイルと誘導カップリングする直径 6mm のソレノイドコイルを通常の NMR 装置と同様のチューニング回路とした。ワイヤレスマイクロコイルの同調回路はコイル 8 ターン、チップコンデンサ容量 27pF で同調を確認した。マイクロコイルと通常と同調回路がカップリングした状態での 90° パルス幅は $8\mu\text{sec}$ で、ニートのエチルアルコール約 400nl を 4 回積算で S/N 比 6.75 が得られた。

【考察】 小型無冷媒磁石でワイヤレスのマイクロコイルによる高感度検出を試みた。マイクロコイルによる微量サンプルの信号の検出は出来たが、試料のポジションや磁場補正による磁場均一度が十分でない (今回の実験では分解能は半値幅が 1ppm (200Hz) 程度あるため、マイクロコイル自身が試料に近いことによって生じる磁場の不均一の問題をマジック角回転で消去するという、当初我々が考えていた試みが十分に検証出来ていない。発表までに検証を進めたいと考えている。分解能の向上により、感度は非常に高くなることが予測されるので、試料のサンプリングの問題があるにせよ、微量サンプルの高感度検出の良い応用として、小型無冷媒磁石の有用性も示せた。

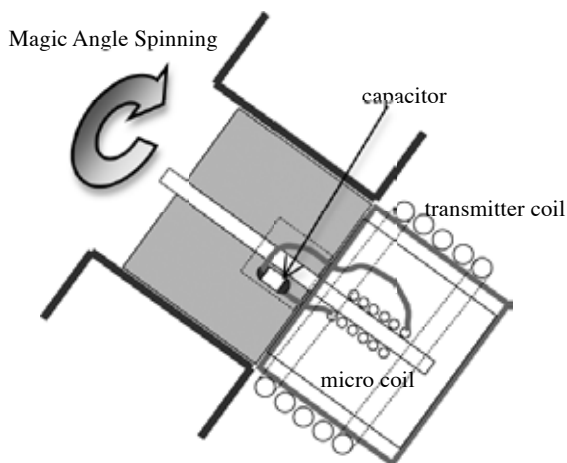


Fig. 2 Design of probe using magic angle coil and sample spinning system

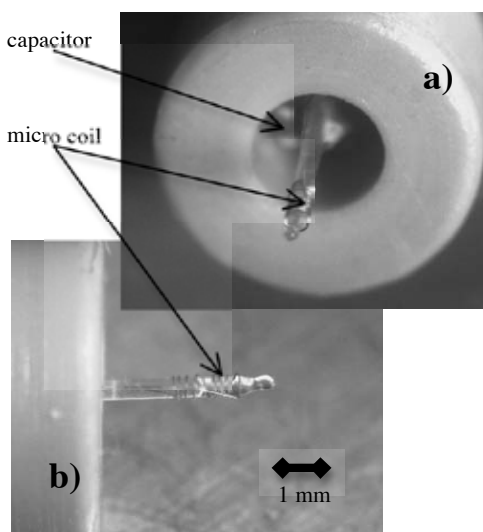


Fig. 3 Photograph of micro coil
a) bottom view b) side view

○室洋一, 仲村高志, 越野広雪
理化学研究所 物質構造解析チーム

Field Map Analysis of Superconducting Bulk Magnet using NMR signal

○Yoichi Muro, Takashi Nakamura and Hiroyuki Koshino

Molecular Characterization Team, RIKEN, Wako, Saitama, Japan.

We have proposed a new type of NMR system with a superconducting bulk magnet. This system is expected to have several advantages over a conventional NMR apparatus, such that no liquid helium is required and a very compact total design is realizable. In order to achieve a more high-resolution spectral, a number of attempts have been performed.

In this presentation, we show field map analysis of our magnet by observing NMR signals.

1. はじめに

NMR 現象の発見以来これまでの間、NMR 分光装置が画期的な発展を遂げてきたことは周知のとおりである。様々な分野の技術革新がその発展に寄与してきたわけであるが、この関係は今後も続いていくと期待される。我々は、高温超電導バルク材料の進歩に注目し NMR 用磁石に応用することによって、既存の装置と比べて圧倒的に小型で経済的な装置構成の実現可能性を示した [1]。

現在、より実用的な NMR スペクトルを得るための種々の手法の開発に取り組んでいる。本発表は、その一連の試みの一つである。

2. 内容

我々が開発を進めている超電導バルク体を用いた磁石の模式図を Fig. 1 に示す。組成は Eu - Ba - Cu - O 系であり、サイズは直径 60 mm×高さ 120 mm、磁場は 4.7 T である。

NMR 分析に利用するための磁石では高安定な磁場強度と均一な磁場分布が必要である。我々の超電導バルク磁石は非常に安定した磁場強度を示すが、バルクの直径が 60 mm と現在使用されている市販の NMR 用超電導磁石のコイル系 (200 mm 以上) に比較して非常に小さいため、均一な磁場空間が市販のものより限定された空間となる。これを NMR 観測に有効な範囲に広げるためには、この磁石専用の磁場補正が必要となる。このため、その基礎として超電導バルク磁石の磁場分布解析を試みた。

超電導バルク磁石, 磁場分布解析

○むろよういち, なかむらたかし, こしのひろゆき

3. 実験と結果

超電導バルク磁石のボア径は 20 mm（以前の発表では 10 mm）であり、この内部の磁場分布を見積もるために、Fig. 2 のような簡易プローブを製作（コイル径：0.5 mm、コイル長：2 mm）し エタノールの ^1H 測定を行うことによって、その共鳴周波数をプロットした。結果の一例を Fig. 3 に示す。z 軸方向の測定間隔が 2 mm と粗く詳細な議論はまだできないが、室温ボア底面からの高さが 75 mm 付近が最も均一度が高いことがわかる。今後、この付近のより詳細なデータを収集し、磁場補正の方法を検討する予定である。詳細は当日報告する。

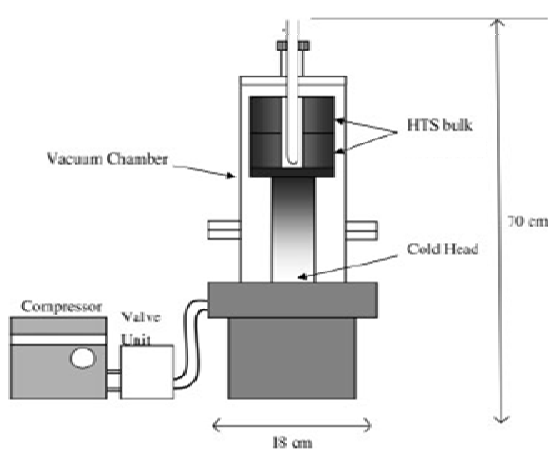


Fig. 1 Schematic diagram of the bulk magnet



Fig. 2 Photograph of the probe used for the measurement

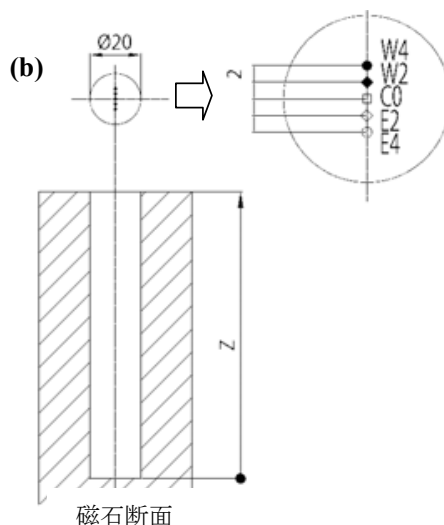
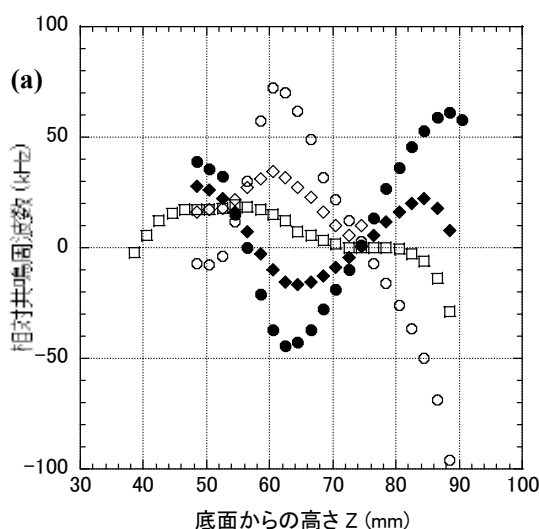


Fig. 3 An example of the magnetic field distribution (a) at the points shown in (b), represented as resonance frequency of ^1H of ethanol

[1] T. Nakamura et al., Concepts in Magnetic Resonance 31B(2) 65–70 (2007)

溶液 ^{33}S NMR 低温プローブの開発

¹ 理化学研究所 SSBC, ² 横浜市立大学, ³ 上智大学

保母 史郎^{1,2}, 高橋 雅人^{1,2}, 斎藤 雄太^{1,3},

佐藤 直樹^{1,2}, 高尾 智明³, ○前田 秀明^{1,2}

Development of ^{33}S Cryogenic probe

¹RIKEN, ²Yokohama City Univ., ³Sophia Univ.

Fumio Hobo^{1,2}, Masato Takahashi^{1,2}, Yuta Saito³,

Naoki Sato^{1,2}, Tomoaki Takao³, ○Hideaki Maeda^{1,2}

A cryogenic probe for ^{33}S solution NMR has been developed for higher sensitivity gain than a commercial probe. We applied the ^{33}S cryogenic probe to biological samples such as a scallop flesh and chondroitin-sulfate A derived from whale cartilages. Both SO_4^{2-} ion or $-\text{SO}_4^{2-}$ group and $-\text{SO}_3^-$ group showed a notable NMR peak, as the surrounding electric field gradient is symmetric and the quadrupole effect is weak; e.g. the mantle of the scallop showed SO_4^{2-} peak of the extrapallial fluid and $-\text{SO}_3^-$ group peak of taurine; chondroitin-sulfate A showed a chondroitin-sulfate unsaturated disaccharide $-\text{SO}_3^-$ group peak. It is suggested that if we make a chemical shift table for biological molecules with SO_3^- group and SO_4^{2-} group, we will be able to assign them by ^{33}S NMR spectroscopy.

1. 序

硫黄は主要な生体構成元素であり、含硫アミノ酸や硫酸化多糖などの生体高分子に様々な機能を付加する特徴も持つ。その重要性にもかかわらず、硫黄 NMR は、その極めて低い感度から生物学研究への利用が困難な状況にある。硫黄の NMR 計測可能な唯一の同位体が硫黄 33 (^{33}S) である。 ^{33}S は四極子核($I=3/2$)であり、低い天然存在比(0.76%)、小さい磁気回転比($2.0517 \times 10^7 \text{ rad T}^{-1} \text{ s}^{-1}$)、大きい四極子モーメント($Q = -6.4 \times 10^{-30} \text{ m}^2$)を持ち、この性質が ^{33}S の検出感度を下げ、 ^{33}S NMR 計測を難しくしている。そのため ^{33}S NMR 計測の高感度化は重要な技術的課題である。

タウリンの生理機能に関する研究は現象レベルのものが少なくないが、これは生体中のタウリン計測の難しさが大きな原因である。例えば ^1H NMR による in-vivo タウリン計測は有効な解析手段の 1 つだが、無数の代謝物のシグナルオーバーラップにより解析が難しくなる問題がある。この問題の解決手段として、in-vivo ^{33}S NMR による方法が Musio と Sciacovelli により考案されている。しかし、通常のブロードバンドプローブを用いた ^{33}S NMR では感度が不十分であり、タウリンの場合では 5 mM 程度が検出限界となる。例えば人に含まれるタウリンの場合その濃度は低く(血液: $159 \pm 19 \mu\text{M}$, 尿: $778.9 \pm 71 \mu\text{M}$)、従来の装置では計測は不可能である。

本研究の目的は、従来に比べて 1 桁高い感度を実現できる ^{33}S NMR 低温プローブの開発を行い、 ^{33}S NMR による計測の適用範囲を大幅に拡張して、 ^{33}S NMR に基づく新しい生体 NMR 計測の世界を切り開くことである。

開発した低温プローブの特徴は、①冷凍機による冷却プローブとしてはこれまでになく低い共鳴周波数をもつこと、②RF(radio frequency)コイル温度がこれまでより低いことである。この様な実験室低温プローブによる NMR 計測を可能にするために、

キーワード: ^{33}S NMR spectroscopy, Cryogenic probe technology,

Signal-to-noise ratio

ほぼふみお、たかはしまさと、さいとうゆうた、さとうなおき、たかおともあき、まえだひであき

独自に RF コイルの設計技術と冷却技術を開発した。また、 ^{33}S のような低周波核では低温プローブでもサンプルの損失が小さいので、大口径のサンプル管としてサンプル量を増やし、感度を向上させた。開発したプローブを用いて、これまで計測が難しかった生体試料（ホタテ貝の組織やコンドロイチン硫酸 A）の計測を実施し、低温プローブによる ^{33}S NMR への適用性を評価した。最後に、 ^{33}S NMR の生物学に対する適用法や考え方を提示した。

2. 実験方法

11.75 テスラ超伝導マグネット用(^1H で 500 MHz)の ^{33}S 溶液 NMR 低温プローブを開発した(Fig.1(a))。冷却システムは当研究室で独自に開発したもので、2 段小型冷凍機(GM/JT 冷凍機)、ヘリウム輸送ライン、低温プローブから構成される。JT バルブを僅かに開けるとバルブを通ったヘリウムが膨張するのでヘリウム温度が 4.7K に下がる。一方、バルブを十分開くと膨張しなくなり 17K になる。ヘリウムは NMR プローブ内部の冷却ステージを冷却する。このステージに RF コイルが固定され、熱伝導で冷却される。

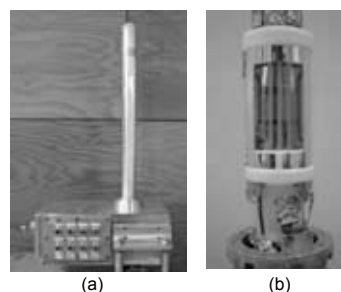


Fig.1. ^{33}S cryogenic probe: (a) outer appearance and (b) RF circuit unit.

Fig.1(b)に示す ^{33}S NMR シグナルを検出する RF ユニット(=RF コイル+共振回路)を制作し、低温プローブ内部の冷却ステージに固定した。プローブは 10 mm タイプであり、約 3 ml のサンプルを挿入できる。RF ユニットは ^{33}S (38.36 MHz)コイルと ^2H (76.5 MHz)コイル（磁場-周波数ロック用）の 2 つの RF コイルが直交する向きで同軸になる構造とした。共振回路は干渉を避けるために独立しており、 B_1 均一度を向上させるためにバランス型回路を採用した。

内側の ^{33}S 用コイルはサファイア管にテフロン熱収縮チューブで固定した。本研究で新たに考案した超音波半田を用いる独自の方法でサファイアと RF コイルの銅板を接続し、接触熱抵抗を減らして冷却性能を高めた。銅板の端部はアルミ基板とアルミ管にインジウムを挟み込む形でネジ止めした。この方法により RF コイル設計の自由度を向上させると共に、RF コイル温度を 9 K まで冷却することが可能になった。

共振回路のチューニング、マッチングの静電容量は、RF コイルの内部抵抗とインダクタンスに依存する。低温プローブでは、室温から低温に冷却する過程で内部抵抗が急激に変化する。このとき RF コイルは、自己共振周波数が計測周波数より大きくなる範囲で、インダクタンスを十分大きく設計することで、より小さいコンデンサーでマッチング、チューニングの調整が可能になる。この理由から、3 回巻き(内径 14.9mm)の RF コイルを採用した。 ^{33}S の縦緩和時間は十分短いので、スピンスピンカップリングの効果は無視できる。このため、 ^1H デカップリングパルスは照射しない(^1H コイルは設置していない)。低温プローブは室温のプリアンプに接続されている。アンプの熱ノイズが比較的大きい(NF:1.6dB)ので、プローブの感度はこれに制約されている。現在、熱ノイズの少ない低温アンプに変更するための開発を進めている。 ^{33}S NMR 計測は 500 MHz NMR 分光器(DMX 500, Bruker Spectrospin)で実施した。各 NMR 計測の 90° パルス幅は 45~60 μs に設定した。

3. 研究結果

3-1) 低温プローブの性能評価

20 mM タウリン水溶液により感度計測試験を行った。結果を室温 5 mm ブロード

バンドプローブ(Bruker, VSP500)と比較した。 ^{33}S 低温プローブと市販 5 mm ブロードバンドプローブ(Bruker, VSP500)の感度を比較して Fig.2 に示す。低温プローブで従来プローブの 5.6 倍の感度上昇を得たことが明らかである。この結果、生体試料計測に必要な濃度である 1 mM 以下のタウリンで ^{33}S NMR 計測が可能になった。

次に、1 M 硫酸ナトリウム水溶液を用いて RF 磁場 (B_1 磁場) 均一度試験を行った(Fig.3)。これは 810° パルスと 90° パルス照射から得られたシグナル強度の比から、 B_1 磁場の均一度や生成効率を見積もる方法である。その結果 $810^\circ/90^\circ$ で 82%の B_1 磁場均一度を得た。市販 5 mm ブロードバンドプローブの均一度は 66%であり、従来品より優れた B_1 磁場均一度を実現できた。

両試験の結果から、RF コイルの形状とインダクタンスが適正であり、また正常なマッチングとバランスにより共振回路がよく機能していることが明らかになった。また、本プローブを用いることで、通常プローブの 5.6 倍の ^{33}S NMR 感度を実現できることが明らかになった。

3-2) 生体試料の ^{33}S NMR 計測

開発した ^{33}S 低温プローブを生体試料に適応した。1 番目の生体試料としてホタテ貝の外套膜、中腸線、貝柱、比較用の海水を計測した(Fig.4)。ホタテ貝の試料は、それぞれの組織を切り出し水洗いした後、重水に入れ計測した。また比較のため海水試料は、海水:重水=9:1 に調整し計測した。ホタテ貝の組織は共に -6.6 ppm 付近にシグナルを示した。これらは、Fig.2 よりタウリンのシグナルと帰属できる。また、海水は 2.65 g/kg の SO_4^{2-} を含むが、Fig.4(d)の 0 ppm シグナルはこの硫酸イオンである。

Fig.4 で特徴的なのは、外套膜で硫酸イオン (0 ppm) シグナルを観測できることである。外套膜は貝殻を形成する器官であり、硫酸イオンを含む様々なイオンや有機基質を含む外套膜外液を分泌することで CaCO_3 結晶を作り出す。その結晶構造は多様であり形成メカニズムは明らかではない。ここでは、外套膜上皮細胞内の硫酸イオンを検知できたのではないかと考えている。今後の実験解析により貝形成のメカニズム解明に繋がる知見が得られるものと期待している。

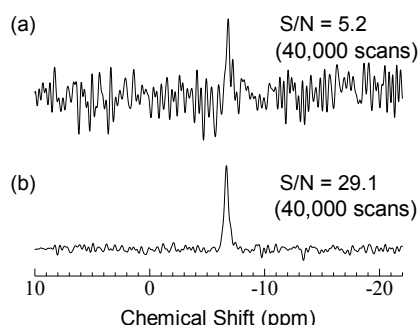


Fig.2. ^{33}S NMR spectra for 20 mM taurine solutions: (a) conventional broadband probe and (b) cryogenic probe.

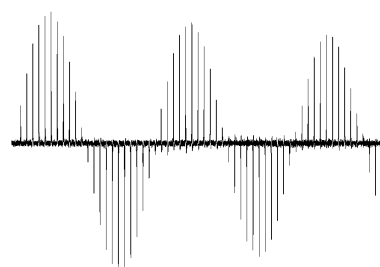


Fig.3. Results of the B_1 homogeneity experiments. $810^\circ/90^\circ$ ratio = 82%.

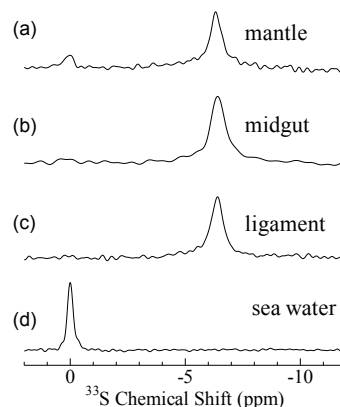


Fig.4. ^{33}S NMR spectra for (a) mantle, (b) midgut, (c) ligament of scallop and (d) sea water.

2 番目の生体試料として、コンドロイチン硫酸 A の酵素 (コンドロイチナーゼ ACII) 分解試料について ^{33}S NMR を計測した (Fig.5)。酵素分解試料は次の手順で用意した。1 試料当たり、二糖硫酸換算で $400\ \mu\text{mol}$ のコンドロイチン硫酸 A を含む試料溶液を $4\ \text{ml}$ ($400\ \mu\text{l}$ の $0.4\ \text{M}$ 緩衝酢酸溶液-pH6.0、 $400\ \mu\text{l}$ の $0.4\ \text{M}$ 酢酸ナトリウム水溶液、 $400\ \mu\text{l}$ の $0.1\ \%$ ウシ血清アルブミン水溶液、純水を含む) を作成した。3 つの試料溶液には $1\ \text{U}$ の酵素を加え、 37°C でそれぞれ $40, 100, 400$ 分間反応させ、 5 分間煮沸した。酵素を加えてない試料についても煮沸処理し、作成した試料溶液 $2.7\ \text{ml}$ に重水 $300\ \mu\text{l}$ を加えた。Fig.5 にそれぞれの試料の ^{33}S NMR 計測結果を示す。酵素を加えない試料では、 ^{33}S シグナルが現れなかった (Fig.5(a))。一方、酵素を加えた試料では、硫酸基の化学シフト ($0\ \text{ppm}$) に相当するピークが現れ (Fig.5(b)) た。ピークは酵素反応時間に応じて強度を増した。この結果は、コンドロイチン硫酸が、酵素分解で二糖硫酸基に分解される過程を検知できたと考えている。ピークが遊離硫酸イオン由来である可能性もあるので、今後、この点につき更に研究を進める。本計測では、信号強度が微弱であり低温プローブにより初めて計測が可能になった。

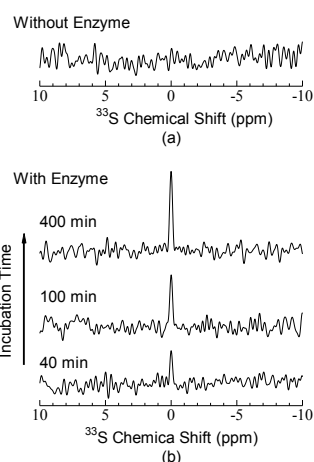


Fig.5. ^{33}S NMR spectra for the chondroitin sulfate A samples (a) without, (b) with the chondroitinase-ACII Arthro degradation.

4. 検討

生体試料の ^{33}S NMR はほとんど例がなく、 ^{33}S NMR 計測が切り開く世界 (どのように適用できるのか) の全貌は明らかになっていない。本低温プローブ開発により、有力なツールを構築できた。

^{33}S は四極子核であり緩和が速いため NMR 信号が小さくなる欠点があるが、本研究の低温プローブの利用により、 SO_3^- や SO_4^{2-} など核の周囲の電場の空間的な対称性の高い遊離基や置換基をもつ分子では、十分明確な信号を取得できることが明らかになった。本研究では、 SO_3^- としてタウリン、 SO_4^{2-} としてコンドロイチン硫酸を示したが、それ以外の類似の構造を持つ重要な生体分子についても化学シフトや線幅の弁別が十分可能であり、この面で今後大きな発展性がある。多種類の分子の化学シフトの有意な分離のためには、高磁場 NMR の適用も非常に有効である。一方、メチオニンやシステインなどのアミノ酸や、それらを含むタンパク質の中に含まれる ^{33}S などの計測では、核の周りの電場の対象性が悪く四極子緩和が大きいので、低温プローブでも有意な信号を得ていない。更なるプローブ感度の向上や装置の高磁場化によりこの種の分子の NMR を計測できれば、 ^{33}S 計測の有効性が更に広がると考えている。

参考文献

- 1) F. Hobo, M. Takahashi, and H. Maeda; ^{33}S NMR cryogenic probe for taurine detection. *Rev. Sci. Instrum.* **80**, 036106(3) **2009**.
This paper was selected in "Virtual Journal of Biological Physics Research, 17(7), **2009**".
- 2) F. Yoshimoto, M. Takahashi, T. Horiuchi, F. Hobo, K. Inoue, T. Miki, M. Hamada, T. Okamura, S. Yokoyama and H. Maeda, *Advances in Cryogenic Engineering: Transactions of the Cryogenic Engineering Conference* **51** (2006) 704–711.

異種核相関実験における 二次元NMRスペクトルの共分散処理

○福地 将志、武田 和行、竹腰 清乃理
京都大学大学院理学研究科、CREST/JST

An extension of the covariance method to heteronuclear correlation experiments

○Masashi Fukuchi, Kazuyuki Takeda, and K. Takegoshi
Graduate school of Science, Kyoto University, Kyoto, Japan.
Japan Science and Technology Agency, CREST, Tokyo, Japan.

In this work, we apply the direct covariance method [1,2], originally used to analyze two-dimensional (2D) homonuclear correlation experiment, to 2D heteronuclear correlation (HETCOR) experiment. In contrast to 2D Fourier transform (2D-FT) NMR, the covariance technique requires less sampling points in the indirect dimension, thus enabling us to save spectrometer time. In fact, we show a factor of 32 reduction.

Recently, covariance NMR spectroscopy, an alternative way to process 2D free induction decay (FID) data in homonuclear correlation experiments, has been introduced in liquids [1] and in solids [2]. In this method, spin correlations are directly showed in terms of a covariance matrix of a series of one-dimensional (1D) spectra. In the conventional 2D-FT NMR, insufficient evolution time makes ripples on cross-sections along the indirect dimension. Therefore, lengthy sampling in the indirect dimension is required, leading to a long experimental time. In the covariance approach, however, insufficient evolution time doesn't induce the ripples along the indirect dimension. The covariance method, thus, requires less sampling points along the indirect dimension, thereby reducing spectrometer time in homonuclear correlation spectra. It is worthy to point out here that the covariance technique does not require any previous information of the positions and linewidths of the resonances. So far, the covariance approach has only been applied in homonuclear correlation experiment. In this work, we applied the covariance method to HETCOR experiments.

Schematic pulse schemes of 2D HETCOR experiments are described in Figure 1, where (a) represents a conventional one and (b) is

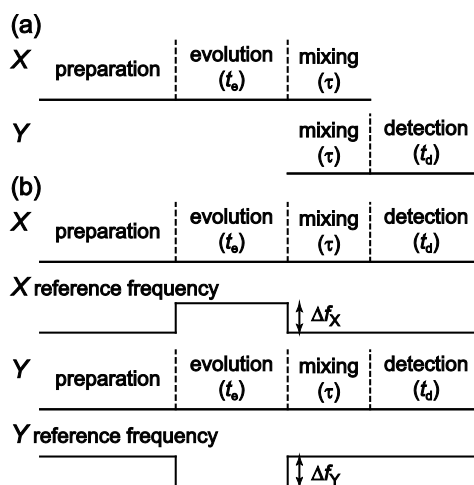


Fig. 1. Pulse schemes of 2D HETCOR experiments. (a) and (b) is the conventional one and the present one for the covariance method.

共分散、HETCOR、二次元NMR

○ふくち まさし、たけだ かずゆき、たけごし きよのり

that used in the present work. In contrast to the conventional scheme (Fig. 1a), the scheme for the covariance technique (Fig. 1b) obtains two FIDs from X and Y channels for each evolution time (t_e). These two FIDs maybe acquired at the same time by a dual-receiver system. In this work, as we have not yet built a dual-receiver system, we used the single-receiver system. Hence, we had to do the same experiment twice for a given t_e to obtain two FIDs from X and Y channels. One notable difference among Fig. 1a and b is that we applied a shift of the X and Y reference frequencies in the evolution period (Δf_X and Δf_Y). The switching of the reference frequency in t_e is required in order to avoid spectral overlapping of the X and the Y F_1 spectra in the combined spectra.

The two 2D FID data matrixes thus obtained are a $N_e \times N_{dX}$ matrix for X ($S_X(t_e, t_{dX})$) and a $N_e \times N_{dY}$ matrix for Y ($S_Y(t_e, t_{dY})$), where N_e is the sampling point along the indirect dimension and N_{dX} and N_{dY} are those along the direct dimension for X and for Y , respectively. After 1D-FT, phase correction, and apodization, we have two series of 1D processed 2D spectrum $S_X(t_e, \omega_{dX})$ and $S_Y(t_e, \omega_{dY})$, which are combined into one $N_e \times (N_{dX} + N_{dY})$ matrix, $S(t_e, \omega_d)$. This combined 2D matrix $S(t_e, \omega_d)$, then, is computed according to

$$C(\omega_1, \omega_2) = \int S(t_e, \omega_1) S(t_e, \omega_2) dt_e \quad (1)$$

in the same manner as the covariance method in homonuclear correlation experiment.

In Figure 2, the pulse sequence used in this study is shown. We applied a ^1H - ^{13}C - ^{15}N triple resonance experiment to obtain ^{13}C - ^{15}N heteronuclear correlations in solid-state through ^1H - ^1H spin diffusion [3] in the mixing time. Here, recoupling among ^{13}C - ^{13}C / ^{15}N - ^{15}N also occurs during the mixing time. Hence, this experiment also produced ^{13}C - ^{13}C / ^{15}N - ^{15}N homonuclear correlation spectra. Figure 3 shows ^{13}C and ^{15}N spectra of N-acetyl [1,2- ^{13}C , ^{15}N] DL-valine (NAV) [4]. To avoid spectral overlap in the indirect dimension, the reference frequencies of ^{13}C and ^{15}N channels in the evolution period were switched up +8 kHz and down -13 kHz. Otherwise, the ^{15}N peak at offset = 0.4 kHz and the two ^{13}C signals at -4.6 and 7.3 kHz are plotted in the same range and may be confusing.

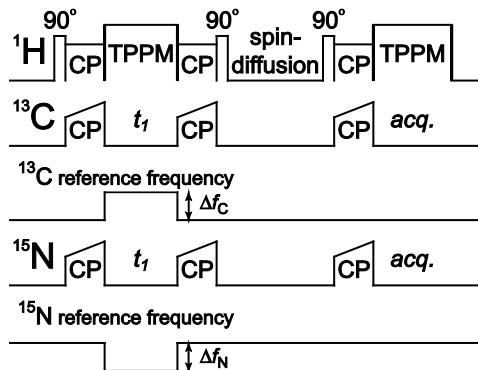


Fig. 2. Pulse sequence used in this study. The ^{13}C and ^{15}N magnetizations are correlated with each other through ^1H - ^1H spin diffusion, thus realizing CHHN, NHHC, CHHC, and NHHN correlation by this experiment.

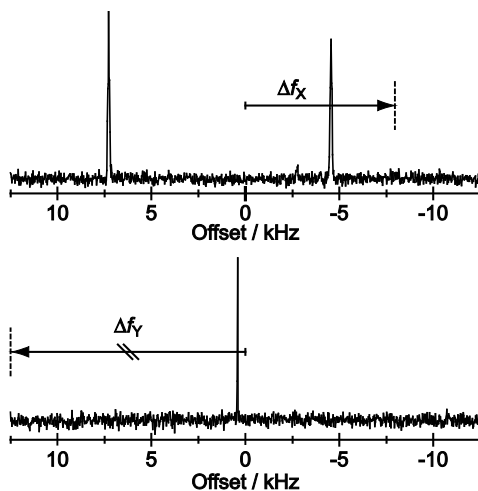


Fig. 3. 1D ^{13}C and ^{15}N spectra of NAV. The reference shift in the 2D covariance experiment (Fig. 1b) is indicated as arrows.

All experiments were performed on a 400 MHz OPENCORE NMR spectrometer [5] operating at 400.24, 100.65, and 40.56 MHz for ^1H , ^{13}C , and ^{15}N nuclei, respectively. A 5 mm triple-resonance Doty MAS probe was used at room temperature. The rf-field intensity for both ^1H 90° pulse and CP was 62.5 kHz, and both the nutation and the phase-modulation angles in the TPPM decoupling [6] were optimized for an RF intensity of ≈ 62.5 kHz to be 180° and $\pm 7.5^\circ$, respectively. The contact time for CP was 1.6 ms and the MAS frequency were 10 kHz. The ^{13}C and ^{15}N chemical shifts were calibrated in ppm by taking the chemical shift of solid adamantane as an external standard and NAV as an internal standard, respectively. For both ^{13}C and ^{15}N channels, $N_{\text{dX}}, N_{\text{dY}} = 2048$ data points were collected with t_{d} increment = 25.0 μs . 16 FIDs were accumulated for each t_{e} value with the relaxation delay of 2.0 sec, and the spectra were recorded for $N_{\text{e}} = 1024$ complex points along the t_{e} dimension (t_{e} increment = 25.0 μs) in the States method [7]. The total experimental time was about 19 hr * 2. With a dual-receiver system, this will be reduced to 19 hr. Note that, as will be shown below, 32 complex points are enough for the covariance method. Hence, 19 hr * 2 * 32 / 1024 = 1.19 hr may be required.

Figure 4 shows the 2D ^{13}C - ^{15}N HETCOR and ^{13}C - ^{13}C correlation spectra of NAV, where (a) is processed by 2D-FT with $N_{\text{e}} = 1024$ complex points and (b) is calculated by the covariance, equation (1), using $N_{\text{e}} = 32$ complex points, respectively. Both 2D spectra shows cross peaks among all labeled ^{13}C and ^{15}N peaks and are very similar. The cross-section spectra (the slice spectra) at ^{13}C -H peak along the indirect dimension are also shown in Figure 5. In the slice spectra, however, that by the 2D-FT method has the wiggle despite of the 1024 complex points, while that of the covariance approach does not even with the 32 complex points. In the indirect slice spectra in Figure 5, there is also slight difference in peak ratio between the 2D-FT (a) and the covariance spectrum (b). The difference is because 2D-FT spectra are not symmetrized but covariance spectra are, thus, 1D slice spectra of the indirect and direct dimensions are completely the same in the covariance method.

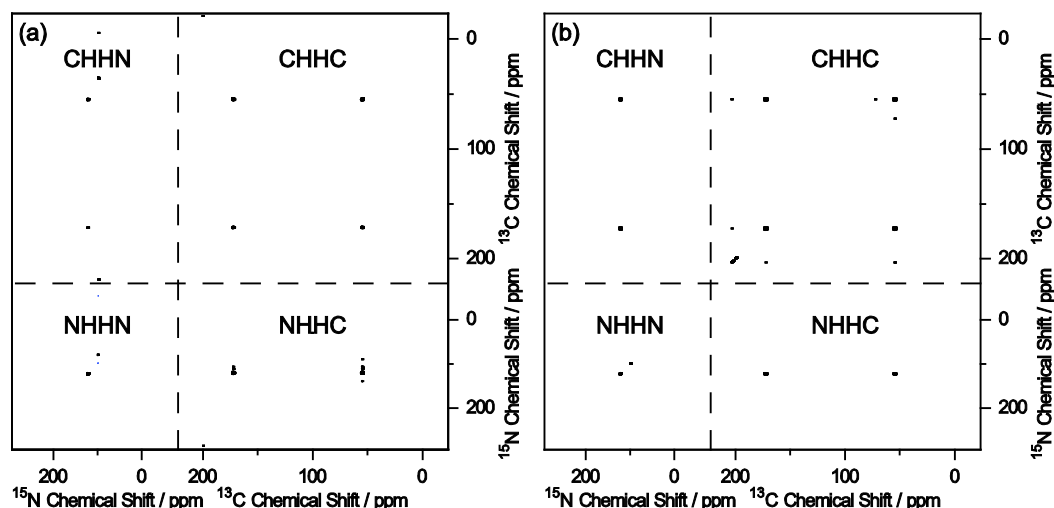


Fig.4. 2D mixed spectra of NAV processed by 2D-FT (a) and the covariance method (b). N_{e} was set to 1024 complex points for (a) and 32 complex points for (b), respectively.

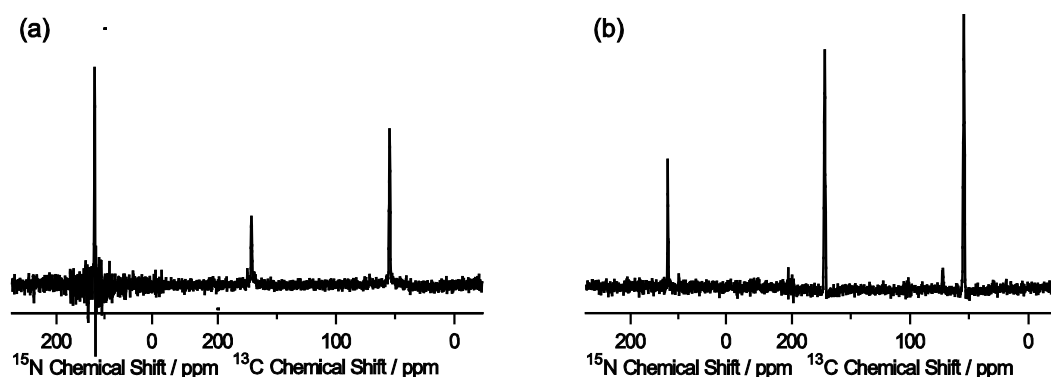


Fig.5. Corresponding slice spectra at ^{13}C -H peak along the indirect dimension. (a) is obtained by the 2D-FT method with $N_e = 1024$ complex points and (b) is calculated by the covariance technique with $N_e = 32$ complex points, respectively.

References

- [1] (a) R. Brüschweiler, and F. Zhang, Covariance nuclear magnetic resonance spectroscopy, *J. Chem. Phys.* **120** (2004) 5253-5260. (b) R. Brüschweiler, Theory of covariance nuclear magnetic resonance spectroscopy, *J. Chem. Phys.* **121** (2004) 409-414.
- [2] B. Hu, J. P. Amoureux, J. Trebosc, M. Deschamps, and G. Tricot, Solid-state NMR covariance of homonuclear correlation spectra, *J. Chem. Phys.* **128** (2008) 134502.
- [3] A. Lange, S. Luca, and M. Baldus, Structural Constraints from Proton-Mediated Rare-Spin Correlation Spectroscopy in Rotating Solids, *J. Am. Chem. Soc.* **124** (2002) 9704-9705.
- [4] S. D. Cady, and M. Hong, Amantadine-induced conformational and dynamical changes of the influenza M2 transmembrane proton channel, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105** (2008) 1483-1488.
- [5] (a) K. Takeda, A highly integrated FPGA-based nuclear magnetic resonance spectrometer, *Rev. Sci. Instrum.* **78** (2007) 033103. (b) K. Takeda, OPENCORE NMR: Open-source core modules for implementing an integrated FPGA-based NMR spectrometer, *J. Magn. Reson.* **192** (2008) 218-229.
- [6] A. E. Bennett, C. M. Rienstra, M. Auger, K. V. Lakshmi, and R. G. Griffin, Heteronuclear decoupling in rotating solids, *J. Chem. Phys.* **103** (1995) 6951-6958.
- [7] D. J. States, R. A. Haberkorn, and D. J. Ruben, A two-dimensional nuclear Overhauser experiment with pure absorption phase in four quadrants, *J. Magn. Reson.* **48** (1982) 286-292.

MRI using an OPENCORE NMR spectrometer

Munehiro Inukai, and ○Kazuyuki Takeda

Graduate School of Science, Kyoto University

Abstract: In this work we demonstrate MRI experiments using an OPENCORE NMR spectrometer, which is an open-design, FPGA-based NMR spectrometer originally designed for solid-state NMR experiments and equipped with three RF channels operational at up to 440 MHz. In order to make ^1H MRI experiments in static fields of up to 14.1 T feasible, we extended its operation frequency to 600 MHz, and built a two-channels field-gradient control extension on the OPENCORE NMR spectrometer. This work is an example of hardware modification in an open-design NMR spectrometer that has lowered the barrier of building spectrometers for those who intend to put their own new ideas in practice.

Recently, we reported on an open-design, field-programmable gate-array (FPGA)-based NMR spectrometer, referred to as the OPENCORE NMR spectrometer [1, 2]. It has a noteworthy feature that resources including FPGA source codes, a console software, circuit diagrams, and board drawing are open and available on our web site [3]. So far, several solid state NMR experiments were demonstrated using the OPENCORE NMR spectrometer. If the spectrometer is used in not only solid state NMR experiments but also MRI experiment, the spectrometer will encourage scientist and engineers who need to develop home-built MRI spectrometer because useful resources are available on web site. The purpose of this work is to modify the OPENCORE NMR spectrometer so as to perform MRI experiments at 14.1 T.

In order to carry out two-dimensional MRI experiments, we equipped the spectrometer with a two-channels field-gradient controller. Converting the two RF channels into the two-channels field-gradient controller, we constructed the spectrometer consisting of one RF transmitter, one signal receiver, and the two-channels field-gradient controller shown in Fig. 1. Also, we extended its operation frequency up to 600 MHz so that the spectrometer can carry out microimaging for magnetic field up 14.1 T. In order to extend maximum operation frequency from 440 MHz to 600 MHz without heavy hardware modification, we utilized DDS image frequency shown in Fig. 2 (a). So far the fundamental signal at 20 MHz was selected by cutting off the image frequencies, but instead, one of the image frequencies can be extracted by passing the signal though a band-pass filter. Figure 2 (b) shows a scheme to generate a higher frequency signal at 600 MHz. Mixing the DDS image signal at 180 MHz

キーワード：プロトンイメージング、MRI分光計、マイクロイメージング

ふりがな：いぬかいむねひろ、○たけだかずゆき

from DDS (I) and a RF source at 420 MHz from DDS (II), which can generate RF source at $5 \sim 420$ MHz, after though band pass filter, the spectrometer generates the signal at 600 MHz. Also we have to do something in the receiver, because the receiver digitizing a FID at 80 MHz is required to digitize it at 180 MHz, but it is possible by super-Nyquist sampling [4].

To test the spectrometer, we demonstrated two types ^1H imaging experiments. One type is microimaging to use stationery a 14.1 T MRI system. Another type is portable MRI to use a 1 T permanent magnet MRI system. In the poster, we will show images using the OPENCORE NMR spectrometer.

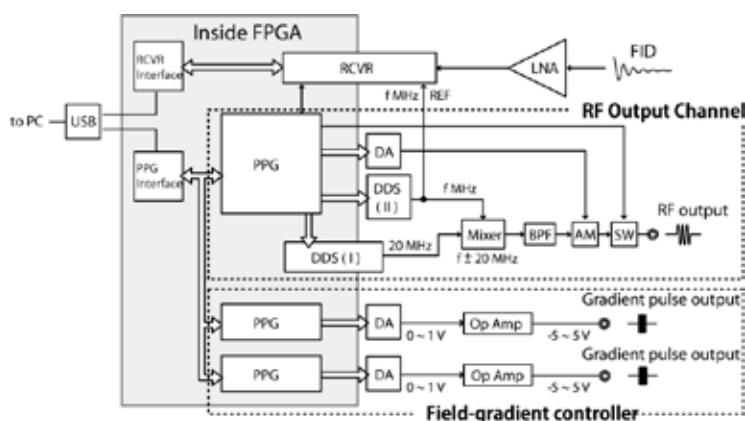


Fig. 1. A diagram for one RF transmitter, one signal receiver and a two-channels field gradient controller in the OPENCORE NMR spectrometer. The glossary is as follows. PPG: Pulse ProGrammer, DA: DA converter, DDS: Direct Digital Synthesizer, AM: Amplitude Modulator, SW: SWitch, RCVR: ReCeiveR, Op Amp: Operational Amplifier.



Fig. 2. (a) A schematic figure that DDS output is a superposition of a fundamental signal and image signals. (b) A scheme to generate a RF signal at 600 MHz using the DDS image at 180 MHz instead of the DDS fundamental signal at 20 MHz.

[Acknowledgement] The 1 T permanent magnet used in this work was provided by MR Technology, Inc.. This work has been financially supported by the CREST program of Japan Science and Technology Agency.

References

- [1]. K. Takeda, Rev. Sci. Instrum, **78**, 33103 (2007).
- [2]. K. Takeda, J. Magn. Reson. **192**, 218 (2008).
- [3]. <http://kuchem.kyoto-u.ac.jp/bun/indiv/takezo/opencorenmr/index.html>
- [4]. M. Negoro and K. Takeda, The 46th Annual meeting of the NMR Society of Japan(2007)

LC-CD-NMR の試み - 光学異性体の分離と化学構造解析を同時に行うために -

徳永 隆司¹, 岡本 昌彦¹, 田中 浩三¹, 都出 千里², ○杉浦眞喜子²

¹住友化学 有機合成研究所

²神戸薬科大学

Chiral LC-CD-NMR for Separation and Structural Analysis of Chiral Compound Mixture

Takashi Tokunaga¹, Masahiko Okamoto¹, Kozo Tanaka¹ and Chisato Tode²,

and ○ Makiko Sugiura

¹Organic Synthesis Research Laboratory, Sumitomo Chemical Co., Ltd., Osaka, Japan.

²Kobe Pharmaceutical University, Kobe, Japan.

LC-CD-NMR system for analyzing chiral compounds has been constructed, in which CD unit has been inserted between column and photodiode array units of LC-NMR system. With this hyphenated system, CD and UV chromatogram and NMR spectra are measured simultaneously.

The mixture of chiral pyridylalanine derivatives was used to analyze using this system, and structures were elucidated for these derivatives and optical isomers were discriminated.

近年、医薬品や農薬の分野において、特定の光学異性体のみが望む活性を有し、対掌体が活性を有しない、もしくは、深刻な副作用などの望まない活性を示す例が数多く知られてきている。そのため、工業プロセスで単一な光学活性体を製造することはますます重要になっており、プロセス管理上、光学活性体分析の重要度も高まっている。光学活性体の分析には、キラル液体クロマトグラフィーが最も広く用いられているが、この手法ではピークの同定に光学活性体それぞれの対掌体の標準品が必要であり、これらの調製に多大な労力とコストを要することになる。

LC-CD は、キラル高速液体クロマトグラフィー (LC) と円二色性検出器(CD 検出器) を連結させ、光学異性体を分離しそれぞれのコットン効果曲線の符号の違いからそれらを見分けることが出来るシステムであるが、CDクロマトグラムからは構造に関する情報を得ることは出来ない。一方 LC-NMR は、構造に関する情報を得るには優れているが、光学異性体を見分けることは出来ない。通常これら 2 種類の装置から別々に情報を得て、NMR スペクトルが同じでコットン効果曲線の符号の違うもの

LC-CD-NMR, 円二色性分光計(CD), 光学異性体

とくなが たかし, おかもと まさひこ, たなか こうぞう, とで ちさと,
○すぎうら まきこ

同士を光学異性体と特定するということがなされている。¹⁾

今回我々はこれら二つのシステムを結合させ、構造異性体と光学異性体を同時に解析出来るシステムの構築を試みた。即ち既存のLC-NMR にCD 検出器を連結させ、キラルカラムを用いることとした。連結の方法は、既存のLC-NMR の設定条件等なるべく変更することなく簡便に使用出来るよう、Fig.1 に示すようにカラムとPDA検出器の間に直列でCD検出器を組み込む形とした。

さらにこのシステムの有用性を検討するため、通常分析が困難となる系を想定してモデル化合物を合成し、解析を試みた。

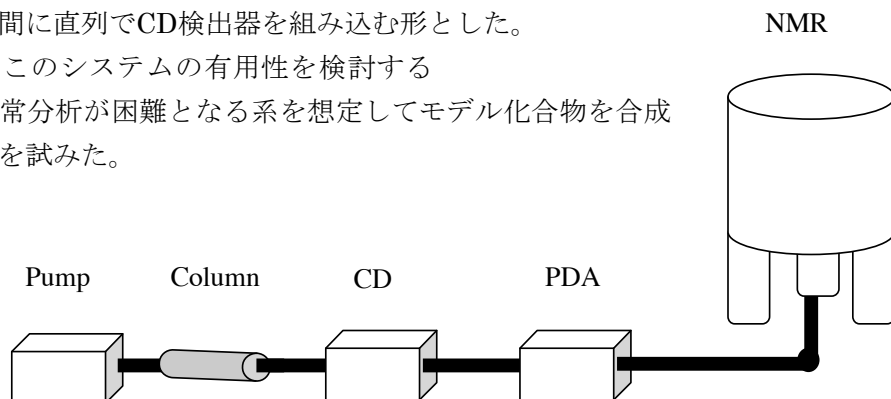


Fig. 1 Constructed LC-CD-NMR System

【実験の部】

LC-NMR は、Varian HPLCシステム (Prostar 230 ポンプ, Prostar 355 PDA) を連結した Varian INOVA-500 (¹H: 499 MHz) NMR 装置 (60μl フローセルプローブ付) を、またCD 検出器は日本分光 CD-2095を用いた。

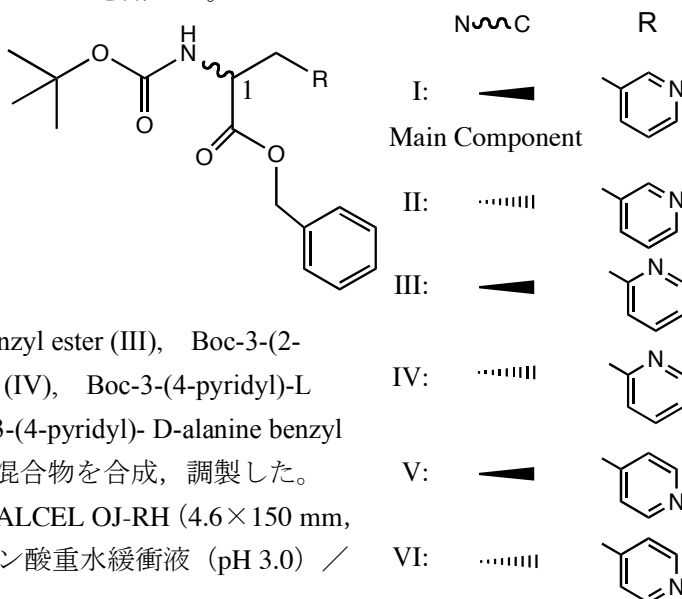
試料として、

Boc-3-(3-pyridyl)-L-alanine benzyl ester (I) を主成分に、対掌体である

Boc-3-(3-pyridyl)-D-alanine benzyl ester (II) 及び、位置異性体である

Boc-3-(2-pyridyl)-L-alanine benzyl ester (III), Boc-3-(2-pyridyl)-D-alanine benzyl ester (IV), Boc-3-(4-pyridyl)-L-alanine benzyl ester (V), Boc-3-(4-pyridyl)-D-alanine benzyl ester (VI) を微量成分とする混合物を合成、調製した。

LC条件は、カラム: CHIRALCEL OJ-RH (4.6×150 mm, 5 μm), 移動相: 10 mM リン酸重水緩衝液 (pH 3.0) /



アセトニトリル混液 (75 : 25) , 流速 : 1.0 mL/min, カラム温度 : 40 °C, 検出波長 : 254 nm (円二色性スペクトル) である。

【結果と考察】

Fig. 2 に測定で得られたCDクロマトグラムを, また Fig. 3 に同時に測定されたPDA検出器による波長254 nmのUVクロマトグラム示した。共に主成分のピーク以外に, 8本のピークが観測され, 両スペクトルのパターンはよく一致している。

これら主成分と Peak 1 ~ 8 に相当する成分の Stop-flow 測定で得られたNMRスペクトルを, ピリジン環部分を拡大して Fig 4 に示した。この図では, Peak 6 が主成分と同じスペクトルを示し, Peak 4 と 5, Peak 7 と 8 がそれぞれ同じスペクトルを示している。一方 Fig. 2 の CDスペクトルからは, Peak 6 (-) と主成分 (+), Peak 4 (+) と 5 (-), Peak 7 (+) と 8 (-) がそれぞれ逆符号となっており, これらの結果から Peak 6 が主成分の対掌体 II であり, またピーク 4 と 5, ピーク 7 と 8 同士がそれぞれ光学異性体であることも分かる。さらに, そのNMRスペクトルパターンから, ピーク 4, 5 は異性体 V, VI, ピーク 7, 8 は III, IV であることも推測できる。

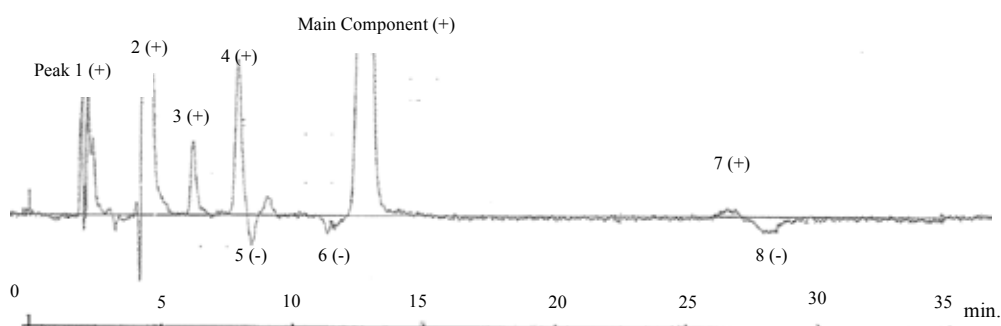


Fig. 2 LC-CD chromatogram of mixture sample

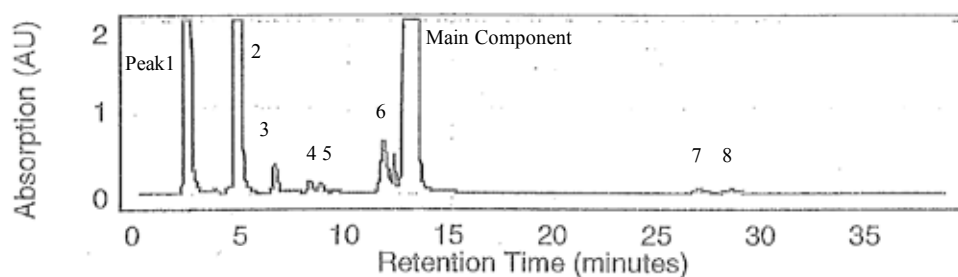


Fig. 3 LC-UV chromatogram of mixture sample (extracted at 254 nm)

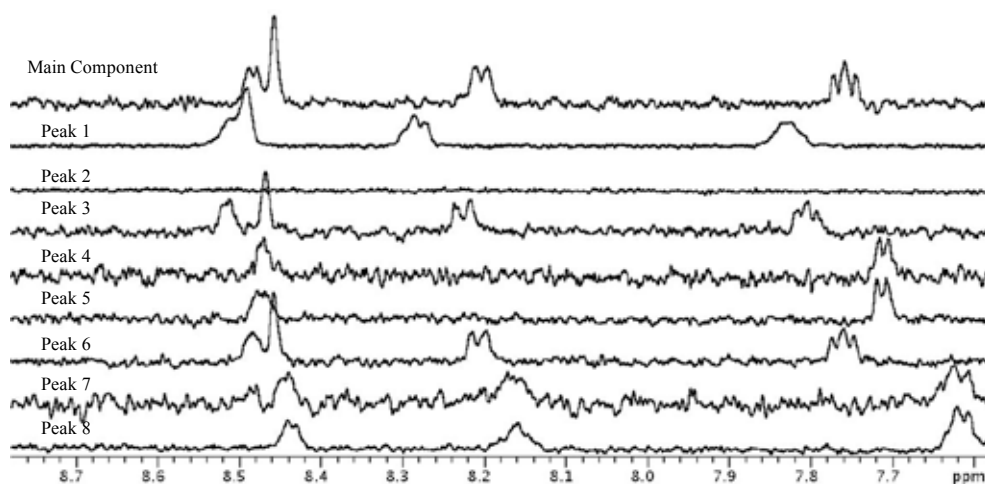


Fig. 4 ^1H -NMR spectra of main component and corresponding to peak 1–8 measured with LC-CD-NMR system. (Pyridyl region)

以上のように，LC-NMRにCD検出器を組み込むことで，単離精製することなく，構造に関する情報を得られるだけでなく，NMRでは区別できない光学異性体についても，一義的に特定することができる。今後，合成研究分野だけでなく，代謝の研究等にも広く応用可能であると思われる。

【文献】

- 1) Mistry, N., Roberts, A. D., Tranter, G. E., Francis, P., Barylski, I., Ismail, I. M., Nicholson, J. K., Lindon, J. C. *Analytical Chemistry*, **1999**, 71, 2838-2843.

Improvement in Analysis of Nonlinear Sampled Data○Takuya Yoshida¹, Yuji Kobayashi², and Tadayasu Ohkubo¹¹*Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, Suita, Japan.*²*Osaka University of Pharmaceutical Sciences, Takatsuki, Japan.*

The increased sensitivity provided by recent developments in NMR instruments makes fast NMR data acquisition methods increasingly attractive. It is now widely recognized that nonlinear sampling (NLS) technique makes it possible to reduce data acquisition time substantially. However, because fast Fourier transformation cannot be directly applied to NLS data, time-consuming methods, including maximum entropy reconstruction, are required. In this presentation, we will describe an improved reconstruction method using a priori information to constrain the spectrum and its fast implementation on GPU.

「目的」

近年、NMR装置の高感度化が進み少ない積算回数でも高いSN比が実現されるようになったが、通常の多次元NMR測定では各次元の分解能に依存したポイント数の積のデータ取得が必要であり、測定時間の短縮には至らない。そのため、非線形サンプリング(Nonlinear sampling; NLS)によって、多次元空間の一部のみをサンプリングすることが有効であると認識され盛んに応用されつつある[1]。NLSデータには高速フーリエ変換を適用することが出来ないため、試行スペクトルと観測データの残差を最小化するようなスペクトル再構成法を用いる必要がある。また、サンプリング数が周波数領域で必要な分解能を満たさず劣決定系となるため、解を正則化するための手法が必要となる。しばしば用いられる最大エントロピー法(MaxEnt)[2]では、式1の目的関数を最大化することによってスペクトルを再構成するため、測定データを満たすスペクトルのうち式中の“エントロピー”項 S を最大にするものが解となる。ここで、 S は一般に平坦なスペクトルで最大値を取り、推定されるスペクトルには特別なバイアスが無いと考えられることから、その使用が正当化される。しかし、多次元NMRスペクトルを数種類組み合わせる際、ほとんどの場合にはスペクトル間で相関がある。従って既知のスペクトルがある場合、平坦なスペクトルモデルが最善とはいえない。

非線形サンプリング、最大エントロピー法

○よしだたくや, こばやしゆうじ, おおくぼただやす

そこで、スペクトル再構成時に既知のスペクトル情報を取り入れる手法について検討した。

$$Q(f) = S(f) - \lambda \frac{1}{2} \chi^2(f) \quad (1)$$

「方法・結果」

スペクトル再構成における目的関数を式2のように既知情報と試行スペクトルの差に依存するペナルティ関数Rを含むものとした。

$$Q(f) = S(f) - \kappa R(f) - \lambda \frac{1}{2} \chi^2(f) \quad (2)$$

2次元のシミュレーションデータを用い、既知情報として1次元投影スペクトルデータを用いた場合、実質的には“エントロピー”項の寄与が無くてもNLSデータからスペクトルを再構成することが出来た。そこで、3次元以上のデータについても低次元スペクトル等の情報を用いた再構成を試みている。

また、スペクトル再構成は収束するまで繰り返し計算が必要であり、多次元NMRスペクトルの処理には大きな計算コストがかかる。目的関数の最適化において、その勾配を繰り返し計算するため、多数回のフーリエ変換・逆変換を行う。そこで、フーリエ変換をGPU (Graphics Processing Unit) を用いて並列実行することによってNLSデータを高速に処理するシステムを構築している。

[1] Sakakibara D. et al. (2009) *Nature*, 458, 102-5

[2] Hoch J. C. & Stern A.S. (1996) *NMR data processing*. Wiley-Liss, NY

Total compensation of pulse transients based on resonator response

Yutaka Tabuchi¹, Makoto Negoro¹, Kazuyuki Takeda² and Masahiro Kitagawa¹¹ Graduate School of Engineering Science, Osaka University² Graduate School of Science, Kyoto University

Abstract: We propose a method of designing the shape and phase of an rf-pulse so as to form intended profile in a resonator. The profile of the designed pulse is computed based on the resonator's response which can be measured using a pick-up coil placed beside the sample coil. The resultant profiles in a resonant circuit show decrease of transient phenomena even in the existence of non-linear devices. NMR spectra also shows much less phase distortion arising from the phase transient of the rf pulse in the resonator.

従来のパルス核磁気共鳴実験において、プログラムされたパルス磁場は我々が意図したものとは逸れ、スピンは振幅や位相について誤差を含んだラジオ波磁場を感じている。この誤差は分光計内のフィルタやアンプなどの回路素子や、プローブに用いられる共振回路の過渡現象に起因する。過渡現象による振幅や位相の誤差はスピンのダイナミクスを複雑にし、高速な変調を必要とする多重パルス実験や、正確なスピンコントロールを必要とする量子計算において特に問題となる。最近、我々は振幅の誤差に関する補償法を線形応答理論に基づいて展開した [1]。波形を大きく歪める共振回路をある応答関数によって近似させ、波形歪みを打ち消すことのできるパルス励起電圧波形を計算する手法を提案した。本研究ではプローブ回路を含めた分光計全体を詳細に評価し、得られた応答関数に基づいた補償法を提案する。

核磁気共鳴分光計内の D/A コンバータの出力電圧波形は、様々な要因によって歪み、パルス照射磁場としてスピン系に照射される。この歪みの原因をモデル化するために、我々は線形応答理論を分光計全体に適用する。D/A コンバータの出力電圧 $v(t)$ と照射磁場波形 $B_1(t)$ の間に線形性を仮定すると、線形応答理論によれば $v(t)$ と $B_1(t)$ の間の関係は

$$B_1(t) = h(t) * v(t) = \int_{-\infty}^t h(t-\tau) v(\tau) d\tau \quad (1)$$

と記述される。ここで $*$ 記号は畳み込み積分を意味し、また $h(t)$ は応答関数と呼ばれる波形歪みの原因を記述するモデルの核であり、Tesla/volts の次元を持つ。例えば全く歪みの無い理想的な場合であれば、 $h(t) = k\delta(t)$ と Dirac のデルタ関数と適当な比例係数 k によって与えられ、 $B_1(t) = kv(t)$ が導かれる。もし波形ひずみの原因 $h(t)$ を知ることができれば、任意の磁場照射波形 $B_1(t)$ を共振コイル内に与える電圧波形 $v(t)$ を計算することができる。ラプラス変換 $\mathcal{L}[a(t)] = A(s) = \int_0^\infty a(t) \exp(-st) dt$ を用いて、

$$v(t) = \mathcal{L}^{-1}[H(s)/B_1(s)] \quad (2)$$

と表現することができる。ここで $H(s)$ と $B_1(s)$ は $h(s)$, $B_1(s)$ のラプラス変換であり $\mathcal{L}^{-1}[\cdot]$ は逆ラプラス変換を意味する記号である。この電圧波形を“補償パルス”と呼ぶ。

キーワード: 過渡現象, 応答関数, 共振回路

たぶちゆたか, ねごろまこと, たけだかずゆき, きたがわまさひろ

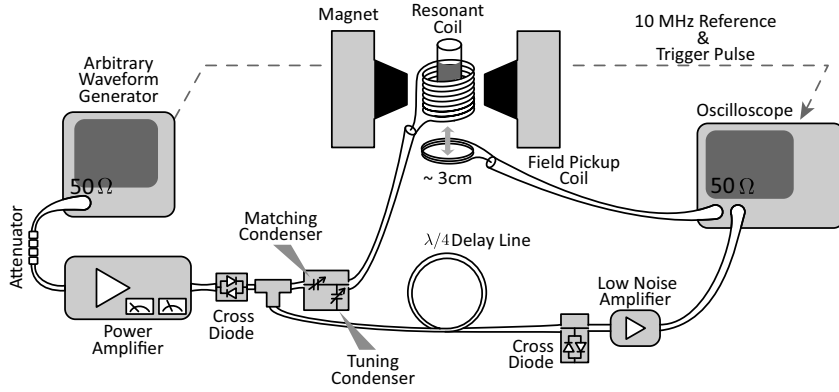


Fig. 1: A schematic diagram of the experimental setup.

線形応答理論によれば、応答関数は適当な入力に対する出力を得ることによって導くことができる。適当な入力電圧を $u(t)$ とし、対応する磁場波形を $y(t)$ とする。するとこの関係は

$$y(t) = h(t) * u(t) \quad (3)$$

となる。ここで $h(t)$ は前述の応答関数である。この応答関数を求めるために入力 $u(t)$ に対する応答磁場波形 $y(t)$ を実測することが出来れば、両辺をラプラス変換することで

$$H(s) = Y(s)/U(s) \quad (4)$$

が与えられる。この関係を式 (2) に代入することによって

$$v(t) = \mathcal{L}^{-1} \left[\frac{Y(s)}{U(s)B_1(s)} \right] \quad (5)$$

を得る。つまり、予めある適当な入力 $u(t)$ に対する応答 $y(t)$ を測定しておき、共振コイル内に発生させる磁場波形 $B_1(t)$ を与えることで補償パルスは計算することができる。

実験系は Fig. 1 のように構成した。任意波形発生器 (AWG7102, Tektronix) からの励起電圧波形はパワーアンプで増大されクロスダイオードと $\lambda/4$ 線から成るデュプレクサに入力される。共振回路は 12.7 MHz の共振周波数となるように調整し、給電路と整合がとられている。ネットワークアナライザによって測定した Q 値は約 35 であった。共振コイルからの磁場は 3cm 離れたピックアップコイルによって、また NMR 信号は増幅された後にデジタルオシロスコープ (DPO7254, Tektronix) によって観測される。

スピンの感じる照射磁場をピックアップコイルを用いて測定することによって、補償パルスの効果を確認した。ここではデュプレクサ以降 NMR 観測系は取り外している。初め

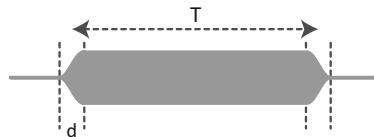


Fig. 2: A profile of an rf-pulse with cosine rising and trailing edges (transition time d) and a plateau (dutation T).

に系の応答を測定し、応答から補償パルスを構成した。任意波形発生器から 10 GS/s の時間分解能でステップ入力 $u(t) = \sin(\omega_0 t)$ ($t > 0$) を与え、アンプ直後の電力が約 10 W となるように減衰器を調整した。磁場応答 $y(t)$ はピックアップコイルを通してデジタルオシロスコープで観測され、標本化レートは任意波形発生器と同じ 10 GS/s に設定した。観測された応答 $y(t)$ は離散的なデータであり、数値的ラプラス変換 [2] を用いると補償パルスの計算ができる。目的磁場波形 $B_1(t)$ としてコサイン立ち上がりパルス (Fig. 2) を採用した。このパルス波形は次式のように定義される。

$$B_1(t) = \begin{cases} \frac{1}{2}[1 - \cos(\pi t/d)] \sin(\omega_0 t + \phi) & (0 \leq t < d) \\ \sin(\omega_0 t + \phi) & (d \leq t < T) \\ \frac{1}{2}[1 - \cos(\pi(T+d-t)/d)] \sin(\omega_0 t + \phi) & (T \leq t < T+d) \\ 0 & (\text{otherwise}) \end{cases} \quad (6)$$

ここで $T = 7 \mu\text{s}$, $d = 1 \mu\text{s}$ とし、式 (5) に基づいて補償パルスを計算した。計算結果を Fig. 3(b) に示す。

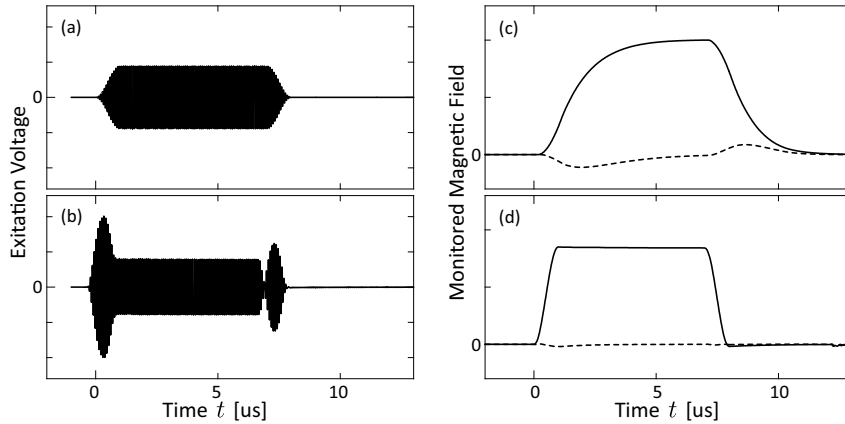


Fig. 3: (a) A cosine rise and trailing pulse generated by an arbitrary wave form generator, and (b) its compensation pulse, the shape of which was computed from Eq. (5). Both of them have the same carrier frequency of 12.7 MHz. The resultant magnetic field without compensation is shown in (c), and compensated one is in (d), demodulated into two orthogonal components. Solid and dashed lines denote the in-phase components and the quadrature-phase ones respectively.

Fig. 3(a)(b) のコサイン立ち上がりパルスとその補償パルスを励起電圧として与え、ピックアップコイルを通して共振コイルに生じる磁場波形をオシロスコープによって観測した。デジタル直交復調を施した結果を Fig. 3(c) (d) に示す。図から明らかなように、振幅の鈍りの改善と同時に、立ち上がりや立下りの位相変化の結果として生じる直交成分を良く抑制できていることが分かる。

次に水の ^1H NMR による補償パルスの効果を確認した。Fig. 1 の実験系においてステップ応答を計測し、この応答に基づいて補償パルスを計算する。0.298 Tesla のマグネットを用い、 $d = 1 \mu\text{s}$ とし、照射時間 T に対する FID 信号を観測した。Fig. 4 に照射時間に対するスペクトル波形を示す。従来のパルスを用いた場合と補償パルスを用いた場合の Nutation 周波数が等しくなるように可変減衰器を調整している。

パルスの立ち上がりや立下りに生じる位相の変化は、パルス照射時の FID スペクトルを分散波形へと導く。本実験ではパルス長さ $T = 4.3 \mu\text{s}$ が π パルスであり、従来のパルス照射では π パルス照射時に分散波形が観測されている (Fig. 4(a)). 一方補償パルスを用いることで分散波形は消失し、正弦的な Nutation の様子が見られる (Fig. 4(b)). これらの結果よりパルスの立ち上がり、または立下りにおける位相変化の影響を良く抑制していると言える。

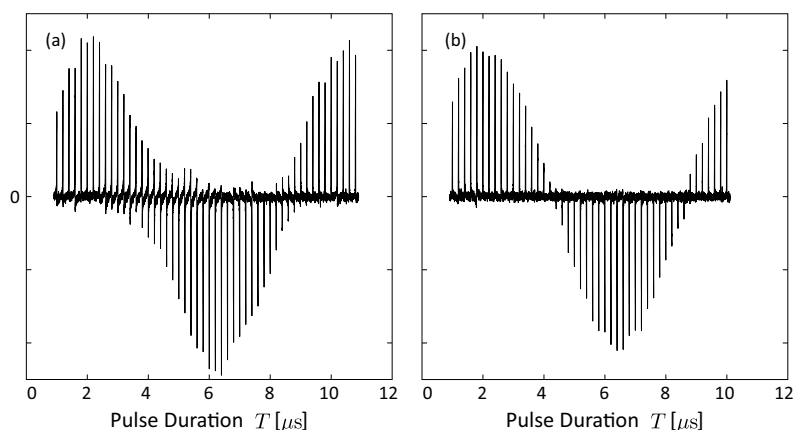


Fig. 4: Nutation of ^1H NMR spectra of water using (a) conventional cosine rise and fall pulse and (b) compensated one.

観測に関する不感時間については、全不感時間 $15 \mu\text{s}$ に対して $4 \mu\text{s}$ 程度の低減しか見られなかった。Fig. 3(d) から分かるように、実際には NMR 信号強度に対して十分に過渡信号が小さくなるような完全な補償は行えていない。これらの補償の不完全の原因としてパワーアンプやクロスダイオード等の非線形素子が考えられ、次のステップとして非線形モデルを採用した補償パルスの開発が必要となる。

本研究は補償パルスの構成法を提案し、その効果を実験により確認した。その結果、振幅と位相に関する誤差を良く抑制できていることを示した。共振器の振幅・位相過渡現象は共振器の時定数 $\tau = 2Q/\omega_0$ に対してパルス幅 T が小さくなればなる程顕著となる。本研究は Q 値の高いクライオコイルプローブ [3] や、周波数が低く高速な変調を必要とする固体材料に対する多重パルス実験、また正確なスピントロールを必要とする NMR/ESR 量子計算機の実現に十分な効果が発揮できると期待される。

Acknowledgement

この研究は科学技術振興機構 (JST) の戦略的創造研究推進事業 (CREST) の援助を受けて行われた。

References

- [1] K. Takeda *et al.*, J. Magn. Reson. **197**, 242-244 (2009).
- [2] S. Ichikawa, IEICE Tech. Rep., CAS **101**, pp. 107-114, Jun. 2001.
- [3] T. Mizuno, *et al.*, Rev. Sci. Instrum. **79**, 044706 (2008).

NQR を用いた靴に隠された物質探知

○中原優¹、篠原 淳一郎¹、Bryn Baritomp¹、
赤羽 英夫¹、糸崎秀夫¹
¹大阪大学大学院基礎工学研究科

Detection of substances hidden in shoes using NQR

○Yu Nakahara¹, Junichiro Shinohara¹, Bryn Baritomp¹, Hideo Akaba¹ and Hideo Itozaki¹
¹Graduate School of Science Engineering, Osaka University

In this paper we study the application of nuclear quadrupole resonance (NQR) to the detection of illicit substances hidden in shoes. By combining two gradiometer antennas in parallel, we formed a cloverleaf shaped antenna covering a 26cm square. After simulating the magnetic field distribution, we optimized the strong off-resonance comb (SORC) pulse sequence. As a result, we were able to obtain a clear NQR signal from a 200g sample of HMT in 5 seconds.

NQR(核四極子共鳴)は、化学物質を非接触で検知できる技術であり、その技術を活用したセキュリティ分野での活躍が期待されている。また、多くの爆発物や不正薬品には、NQR 反応を起こす ^{14}N を持つことから、NQR を用いた検知技術の有効性は大きいものと予想される。

現在、密輸方法として不正薬品を靴の中に隠匿し、国内に持ち込まれている事例がある。このような巧妙に隠匿され持ち込まれる不正物質に対し、NQR を用いてこの物質を検知するためには、靴の中にある少量の物質を短時間で検知できるアンテナの構造と NQR パルスシーケンスが必要となる。

そこで、本研究では靴の中に隠された化学物質に効率良く励起磁場を与え、その化学物質を検知できるアンテナ構造の検討を行った。

アンテナ構造

従来の NQR では、二つのコイルを磁場が反対向きに照射されるように接続し、遠方から一様に入ってくるノイズに対して差分型となり耐ノイズ性の高いグラジオメータを用いていた。一つのグラジオメータを用いた NQR 測定では、靴のように測定対象が複数あるときに信号感度を上げることができなかった。Fig.1(a)に作製した共振回路の回路図を示す。整合用コンデンサ C_1 と共振用コンデンサ C_2 を接続し、 C_2 に並列に二つのグラジオメータを接続している。この二つのグラジオメータを Fig.1(b)のように、グラジオメータの各ループが作り出す磁場が隣り合うループについて違う方向になるよう配置する。この二つのグラジオメータを固定し、四つのコイルを持つアンテナを作製した。各グラジオメータのループの直径は 13cm、巻き数 3 巻きである。

NQR、非接触検知、ヘキサメチレンテトラミン

著者ふりがな：○なかはらゆう、しのはらじゅんいちろう、ばりとんぱぶりん、あかばひでお、いとざきひでお

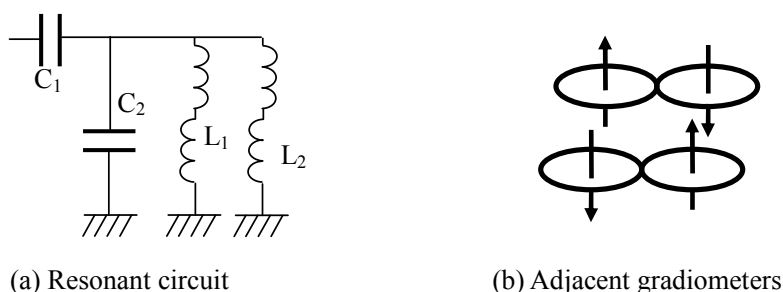


Fig.1 Structure of antenna

励起磁場の分布測定

作製したアンテナ(26cm×26cm)について、励起磁場の分布を見るための磁場シミュレーションを行った。磁場シミュレーションはアンテナ表面の磁場について、有限要素法を用いた解析ソフト Opera 3D を用いて行った。磁場の絶対値をアンテナの各箇所において解析した結果を Fig.2 に示す。

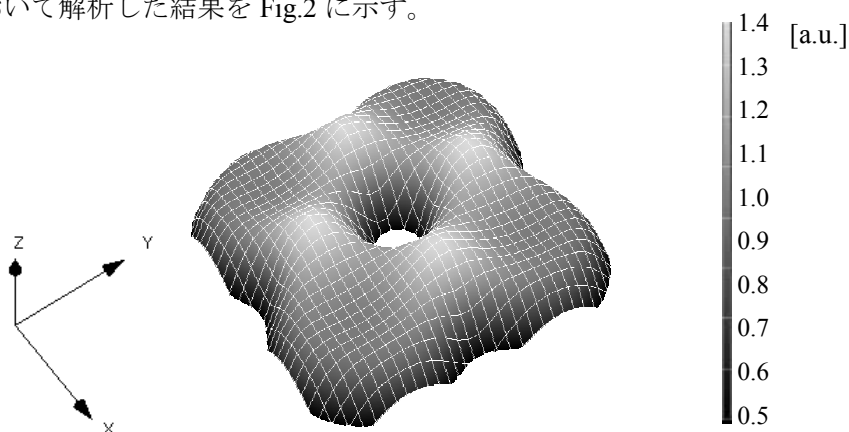


Fig.2 Magnetic field created by antenna

Fig.2 に励起磁場の強度の分布のシミュレーション結果では、xy 平面にアンテナがあり、z 軸がその場所での磁場の絶対値を示した。磁場強度は、アンテナ全体の中心では、磁場がほとんど無く、中心まわりで磁場強度は強くなりグラジオメータのループ同士の接点で最大となる。また、中心付近から離れるにつれて磁場強度が減少する。

コイル結合部では、隣り合ったコイルの磁束の流入と流出が重なり強め合って磁場が強くなる。逆にアンテナ全体の中心では、強め合った磁場が弱めあう方向に集まるので磁場が弱くなる。

NQR 信号の分布測定

作製したアンテナについて、アンテナの受信感度分布を測定した。アンテナ(26cm×26cm)の表面において HMT 100g (5cm×5cm×5cm)のサンプルを 2cm ずつ動かし、x-y 平面の各箇所 NQR 信号取得し、受信感度分布を作成した。励起磁場分布と同様に、グラジオメータのループ1つについて計測を行い、アンテナ全体に拡張している。測定に用いた NQR 励起信号については、周波数 3.312MHz、電力 146W、受信時間遅延時間 500 μ s、SORC シーケンス 4000 回積算 5 秒の測定を行った。この計測の結果を Fig.3 に示す。この計測では、測定時間をより短くするために SORC シーケンスを用いた。SORC (strong off-resonant comb: $(\theta_{90} - (\tau/2 - \theta_{90} - \tau/2 - \dots)_n)$)は、縦緩和 T_1 を待たずに励起パルスを打ち続け、FID 信号と ECHO 信号の足し合わせを取得するシーケンスである。このシーケンスでは、パルスとパルスの間隔を短くできるので、 T_1 の長い物質であっても短い時間で積算回数を増やすことができる。サンプル HMT(ヘキサメチレンテトラミン)4000 回積算において、FID シーケンスで計測時間 5 分かかるのに対して、SORC シーケンスでは測定時間 5 秒にまで減らすことができる。

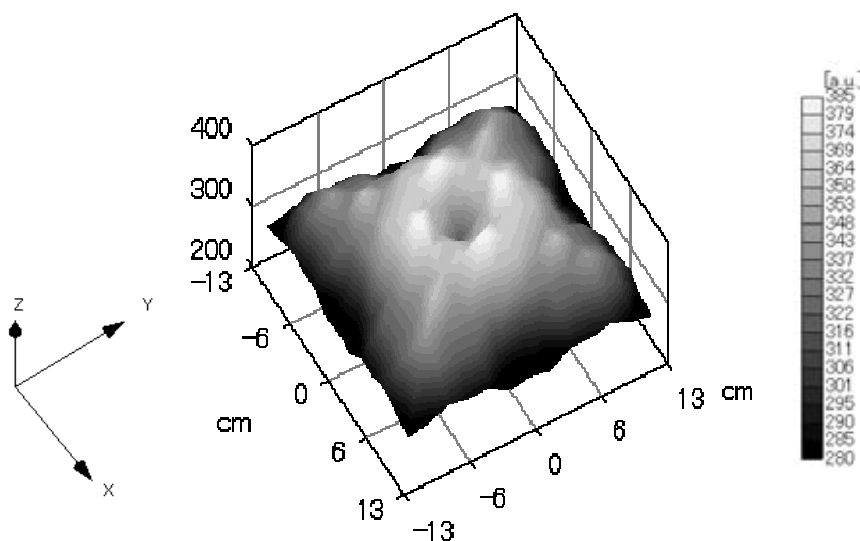


Fig.3 NQR signal strength distribution

Fig.3 では、xy 平面にアンテナがあり、z 軸がその場所での NQR 信号強度を示している。NQR 信号強度は、アンテナ全体の中心でほとんど取得できず、NQR 信号強度が中心を取り巻くように強くなっている。励起磁場の分布 Fig.2 と比較すると、最大励起磁場の部分で NQR 信号も最大となっている。励起磁場の分布に比べ、NQR 信号強度の変化が大きく、最大信号以外の部分で NQR 受信感度が大幅に落ち込む。これは、NQR 信号を取得するためには最適な 90° パルス幅が存在し、サンプルに照射される磁場がそれ以上でもそれ以下でも信号が減少してしまう。Fig.3 で、励起磁場が最大になるところでパルス幅を最適化している為、それ以外のところの場所で信号が十分磁場が照射されておらず、励起磁場の減少以上に受信感度が落ちている。さらにサンプルに大きさがあるため受信感度分布に乱れがある。

靴の中に入れたサンプルの NQR 信号取得

作製したアンテナについて、靴の中に隠匿されたサンプルを 5 秒の計測でどの程度の SNR で NQR 信号を取得できるかの計測を行った。サンプルは、Fig.4 に示すように靴の踵の底を削り、そこに HMT 100g を詰めたものである。靴の両足に入れているので計 200g の HMT を測定することとなる。なお、踵の底の厚さは 1cm である。

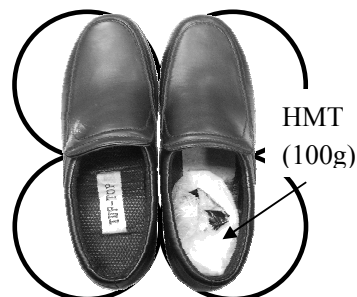


Fig.4 HMT hidden in shoes.
Circles show antenna placement

靴の中に 200g の HMT 入れたサンプルを、Fig.4 と同じようにアンテナの真上に置き信号測定を行った。周波数 3.312MHz、電力 146W、受信時間遅延時間 500 μ 秒、SORC シーケンス 4000 回積算 5 秒の測定を行った結果を Fig.5 に示す。測定した信号について SNR を計算しているが、このときのノイズの定義は受信周波数でサンプルを置いていないときの 3.312MHz でのノイズとしている。これは、受信周波数に共振回路があるので、その周波数のノイズも増幅され受信感度に大きく影響を与えるからである。

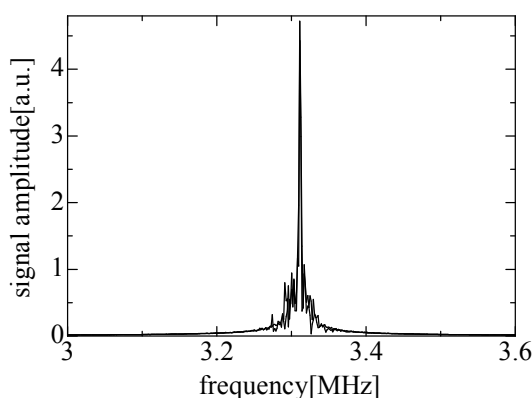


Fig.5 HMT signal

SORC シーケンス 4000 回積算 5 秒で靴の中の 200g の HMT において、SNR 2.0 の信号を得ることができた。

まとめ

本研究では、二つのグラジオメータをあわせたものをアンテナとし、広い面積に励起磁場を照射できるようになった。左右の靴について、同時に計測できるようになり、5 秒で SNR 2.0 の明瞭な信号を取ることに成功した。

参考文献

- 1) A. Konnai ; N. Odano ; T.Asaji ; Hyperfine Interact(2008) 181;93-98

低分子量生体分子のNMR立体構造/化学シフトを

BMRBデータベースへ登録するための日本サイト公開

○中谷 英一^{1,2}、松浦 孝範^{1,2}、Steven Mading³、原野 陽子²、小林 直宏²、Eldon L. Ulrich³、John L. Markley³、阿久津 秀雄²、中村 春木²、藤原 敏道²
¹科学技術振興機構-BIRD、²大阪大学蛋白質研究所、³ウィスコンシン大学マディソン-BioMagResBank

Release of SMSDep (Small Molecule Structure Deposition) website at PDBj in Japan.

○Eiichi Nakatani^{1,2}、Takanori Matsuura^{1,2}、Steven Mading³、Yoko Harano²、Naohiro Kobayashi²、Eldon L. Ulrich³、John L. Markley³、Hideo Akutsu²、Haruki Nakamura²、Toshimichi Fujiwara²

¹Japan Science and Technology Agency – BIRD, ²Institute for Protein Research, Osaka University, ³University of Wisconsin Madison, BioMagResBank

A data deposition website, “SMSDep” (Small Molecule Structure Deposition) has been released at PDBj in Japan in this autumn following at BMRB main site in University of Wisconsin Madison. The SMSDep is a data deposition system for the NMR structures of small biological molecules that fall outside the guidelines of the PDB (i.e. the molecule is a peptide with 23 or fewer residues, a polynucleotide with 3 or fewer residues, a polysaccharide with 3 or fewer sugar residues, or a natural product) along with their chemical shifts. These NMR structures are accepted by BMRB entry, not by PDB. Authors choose the website either ADIT-NMR or SMSDep based on the size of studied molecule. The deposition process in SMSDep is quite similar to that in ADIT-NMR. The website of “BMRB/PDB deposition tutorial” at PDBj will be available to support the data deposition of SMSDep and ADIT-NMR.

BMRB (Biological Magnetic Resonance Data Bank)では、PDB (Protein Data Bank)で登録を受け付けていない23残基以下のタンパク質や3塩基以下の核酸、3つ以下の糖鎖のNMR立体構造データの登録を受け付けている。PDBj (Protein Data Bank Japan) でも、そのような低分子量生体分子のNMRで決定された立体構造と化学シフトなどの

キーワード：データベース、BMRB、SMSDep

○なかたにえいいち、まつうらたかのり、Steven Mading、はらのようこ、こばやしなおひろ、Eldon L. Ulrich、John L. Markley、あくつひでお、なかむらはるき、ふじわらとしみち

BMRBデータベース登録を受け入れるウェブサイト「SMSDep」(Small Molecule Structure Deposition)をこの秋に公開する。SMSDepは従来のBMRB/PDBデータ登録ウェブサイト「ADIT-NMR」を基本として開発されており、利用や登録の方法はほぼ同様である。登録する生体高分子の大きさによって、登録者がSMSDepかADIT-NMRかを選択する。SMSDepでは登録時にPDB IDは発行されず、NMR化学シフトと立体構造の登録データの組に対して1つのBMRB登録番号(BMRB Accession Number)がSMSDepによって自動的に発行される。



Fig. 1 Top page of SMSDep



Fig. 2 Data inputting page of SMSDep

URL: <http://smsdep.protein.osaka-u.ac.jp/bmr-b-adit>

NMR構造の登録ではPDBフォーマットの原子座標ファイルと立体構造決定で利用した制限情報ファイルの提供が必須である。タンパク質と核酸の登録における原子座標の確認は、PDBの「Maxit」を使用してRamachandran plotsや χ^1 - χ^2 plots、2次構造特性などによる立体構造や記述の一貫性などの確認がPDBjによって行なわれる。これは23残基以上のタンパク質のNMR立体構造をADIT-NMRでPDBに登録するときの手続きと同様である。ただし、3残基未満についてはこのような検定は行わない。



Fig. 3 The top page of PDBj-BMRB website for BMRB/PDB data deposition tutorial.

URL: <http://bmrdep.protein.osaka-u.ac.jp>

また、PDBjのBMRBグループでは、SMSDepによるデータ登録受け付けを開始するのを機会に、PDBj-BMRBウェブサイトの「PDB/BMRB登録の手引き」の日本語ページを更新する。これらと併せてBMRBとPDBの簡易登録ツール「BESS」(BMRB Entry Support System)を開発し、よりNMRデータの登録しやすい環境づくりに向けて活動している。

ヒト基本転写因子TFIIE alpha 酸性ドメインの動的構造解析

○小松正史¹, 奥田昌彦¹, 長土居有隆¹, 菅瀬謙治², 西村善文¹

¹横浜市・生命ナノシステム・生体超分子システム科学

²サントリー生物有機科学研究所

NMR dynamics of the acidic domain of human TFIIE alpha

○ Tadashi Komatsu¹, Masahiko Okuda¹, Aritaka Nagadoi¹, Kenji Sugase²

Yoshihumi Nishimura¹

¹Lab. of Struct. Biol., Grad. Sch. of Supermol. Biol, Yokohama City University, Kanagawa, Japan.

²Suntory Institute for Bioorganic Research. Osaka, Japan.

In eukaryotic cells, many nuclear proteins contain intrinsically disordered regions under physiological conditions. Transcription of protein-encoding genes is performed by RNA polymerase II together with general transcription factors including TFIIE and TFIIH. We have already established the interaction mode between TFIIE and TFIIH; the acidic domain of TFIIE alpha contains an intrinsically disordered region in its free state and upon binding to the PH domain of the TFIIH p62 subunit, the disordered region takes an extended conformation forming a beta-sheet with the PH domain. Here, we have examined the dynamics of the acidic domain of TFIIE alpha upon binding to the PH domain of TFIIH by NMR R2 dispersion spectroscopy, which is a sensitive technique for characterizing to the chemical exchange processes on sub millisecond-millisecond time scale.

真核生物の特に核内蛋白質において、遊離状態では特定の立体構造を持たないがターゲットと結合すると特定の立体構造へとフォールディングする領域、天然変性領域を持つものが多く見られる。蛋白質をコードする遺伝子情報を元にmRNAを合成する過程、転写を制御する因子である転写因子と呼ばれる蛋白質の多くの部分でも天然変性領域が見られ、近年注目を集めているiPS細胞を誘導する転写因子もまた天然変性領域を持っている。転写因子の天然変性領域の動的構造と機能との相関を原子レベルでおこなうことは、転写を合理的に制御する研究をおこなうために重要である。

NMR緩和時間測定であるR2分散測定は、蛋白質の構造変化、酵素反応、蛋白質-リガンド結合などの重要なイベントを含む時間領域、サブミリ秒からミリ秒オーダーの化学交換(構造変化)を解析することができる。

mRNAを合成する際にRNA Polymerase IIが正確に機能することを補助する基本転写因子のうち、本研究室で機能と構造が明らかとなっているヒトTFIIH p62サブユニットPHドメインと天然変性領域で結合す

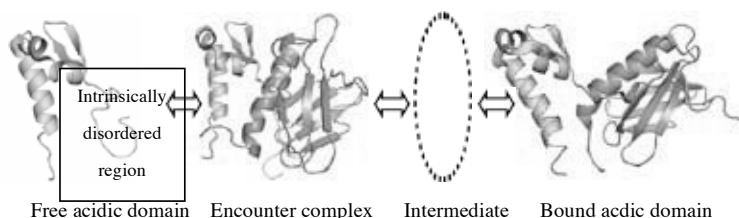


Fig. 1 Binding mode of the acidic domain of human TFIIE alpha to the PH domain of human TFIIH p62 subunit.

るalpha 酸性ドメインに ^1H - ^{15}N HSQC滴定と ^{15}N R2分散測定を行い、化学交換モデルの決定および分子認識機構を原子レベルで解明する。

【結果】

^{15}N 標識したTFIIE alpha 酸性ドメインと非標識のp62 PHドメインを用いて ^1H - ^{15}N 異種核単量子相関(HSQC)滴定を行った。この実験から ^{15}N 標識したTFIIE alpha 酸性ドメインのアミド基の ^{15}N 、つまり酸性ドメインの主鎖の立体構造変化の情報が得られる。PHドメインを加える前の酸性ドメインのN末端に対応するシグナルは、特定の立体構造のない領域で見られる ^1H 化学シフトの狭い範囲での集中が見られた。非標識のPHドメインを加えていくと酸性度メインN末端に対応するピークが連続的にわずかにシフトしていく現象(速い交換)とそれぞれの位置は変わらず、別の位置にもうひとつのピークが出現する現象(遅い交換)が同時に見られた。速い交換は酸性ドメインとPHドメインの非特異的な相互作用による複合体の形成、遭遇複合体の形成を示唆するものであり、特異的な複合体形成(遅い交換)と比べ、非常に速い交換速度を持つため別々に測定されたと推測される。

^{15}N 標識したTFIIE alpha 酸性ドメインと非標識のp62 PHドメインを用いて ^{15}N R2分散測定を行った。この実験から酸性ドメインの主鎖の動的構造に関する情報を得られ、ミリ秒からサブミリ秒オーダーの化学交換が存在する場合、R2分散曲線は減衰していくが、存在しない場合は水平である。

^{15}N R2分散測定の結果、酸性ドメインN末端のアミノ酸残基(F387, V390, D392)でR2分散曲線の減衰が観測された(Fig. 2)。またA391やコアの残基(F434)でもわずかにR2分散が観測された。酸性ドメインのN末端のアミノ酸残基F387-A391は、PHドメインと結合する際に、新たにbeta鎖(S0鎖)を形成している残基である(Fig. 3)。そのため、S0鎖上のF387とV390、S0鎖に近いD392で観測されたR2分散は、この立体構造変化を捉えたものであると考えられる。

現在、複数の濃度比でR2分散測定を行い、化学交換速度、存在比、化学シフト差の取得を行い、折りたたみ中間体などが存在するのかなどを解析している。

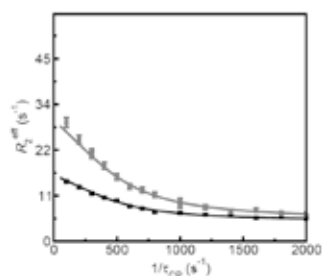


Fig. 2 ^{15}N R₂ relaxation dispersion profile for F387 of the acidic domain of TFIIE recorded at two static magnetic fields.

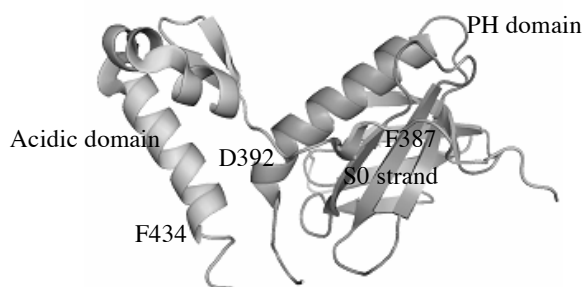


Fig. 3 Structure of the acidic domain of human TFIIE alpha bound to the PH domain of human TFIIF p62 subunit.

基本転写因子，天然変性領域，R2分散測定

〇こまつただし，おくだまさひこ，ながどいありたか，すがせけんじ，
にしむらよしふみ