

若手ポスター賞発表要旨

**Abstracts of
Young Scientists Poster Awards**

クモ牽引糸、野蚕絹糸間の著しい物性の違いと関連するポリアラニン領域の異なる分子間 β 構造の発現

○亀谷俊輔¹、山内一夫¹、朝倉哲郎^{1,2}

¹農工大院工・²農工大科学博物館

Difference in the β -sheet packing arrangements of polyalanine regions in spider and wild silkworm silks with different physical properties

○Shunsuke Kametani¹, Kazuo Yamauchi¹ and Tetsuo Asakura^{1,2}

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

²Nature and Science Museum, Tokyo University of Agriculture and Technology.

Many of the silk fibroins produced by silkworms and spiders consist largely of alternating blocks of polyalanine and glycine-rich domains and show a range of tensile properties. It is generally agreed that the exceptionally high tensile strength of spider dragline silk can be attributed to crystalline β -sheet regions formed by the polyalanine sequences. Solid-state NMR and X-ray diffraction show that the β -sheet packing arrangements depend on the length of the polyalanine repeats. Short repeats up to (Ala)₆ crystallized in a rectangular lattice, while longer repeats crystallized in a staggered lattice. The crystalline regions of *N. clavata* (Ala)₆ adopted mainly the former while those of *S. c. ricini* (Ala)₁₂ mainly the latter. We suggest that these differences in packing arrangements of polyalanine repeats may have important implications for tensile and other physical properties of these silks

【緒言】

クモ牽引糸は野蚕の一種のエリ蚕絹繊維と比較して、はるかに高い強度を示す(Fig.1a)。これらの絹の繊維強度は、一次配列中のアラニン連鎖領域(結晶領域)の β -sheet構造の存在に起因すると言われているが、クモ牽引糸とエリ蚕絹ではアラニン連鎖領域のアラニン数に著しい違いがあり、エリ蚕絹は2倍長い(Fig.1b,c)。

本研究では、その原因の解明と関連して、鎖長を変化させた一連の β -sheet構造を有するアラニンオリゴペプチドについて、¹³C CP/MASNMR、分子間REDOR、¹H driven spin diffusionNMR

(PDS)、粉末X線回折、分子動力学(MD)計算、¹³CNMR化学シフト計算を併用することで、アラニン連鎖域について分子間構造モデルを提出することを目的とした。

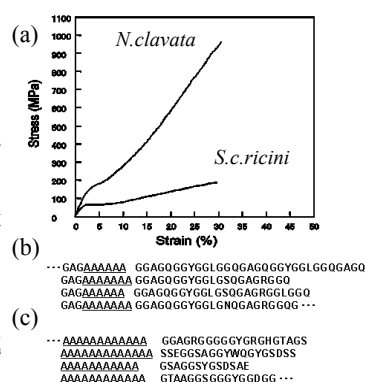


Fig.1 (a) Stress-strain curves of dragline silk and silkworm silks. The primary structures of (b)*N.clavipes* dragline silk and (c) *S.c.ricini* silk.

固体NMR、ポリアラニン、 β -シート構造

○かめたにしゅんすけ、やまうちかずお、あさくらてつお

【実験】

Fmoc 固相ペプチド合成法を用いて、一連のアラニンオリゴペプチド((Ala)_n n=3-8, 12)を合成した。その際、各種固体 NMR 測定の目的に応じて、適宜、残基特異的に¹³C ならびに¹⁵N ラベル化を行なった。また、(Ala)_{3,4}については、溶媒処理を変えることによって、100%平行型 (P-) と 100%逆平行型 (AP-) β-sheet 構造を調整した。クモ牽引糸およびエリ蚕絹のアラニン C α ラベル化は、経口投与にて行なった。

各種固体 NMR の測定は Bruker Avance 400 を用いて行なった。また、一連のアラニンオリゴペプチドについて、β-sheet 構造が P-または AP-であるか、決定するために FT-IR 測定を行なうとともに、さらに分子間配置の情報を得るために、粉末 X 線回折測定を行なった。¹³C NMR 化学シフト計算は、奈良女子大黒子教授との共同研究にて行なった。最終的に、分子間配置の異なる β-sheet 構造を提案するために、Material Studio を用いて MD 計算を行なった。

【結果】

アラニンオリゴペプチドの¹³C CP/MASNMR、粉末 X 線回折及び FT-IR スペクトル

一連のアラニンオリゴペプチド((Ala)_n n=3-8, 12)について、¹³C CP/MASNMR スペクトル(AlaC β 域)と粉末 X 線回折パターン(Fig.2)、ならびに FT-IR スペクトル(Fig.3)を測定した。(Ala)₃のデータは、P-および AP-の間で著しく異なることが分かる。P-および AP-を作り分けることのできる(Ala)₄の場合も同様であった。(Ala)₅以上では、一種類の β-sheet 構造のみ得られるが、(Ala)_{3,4}の P-および AP-間のパターンと比較することによって、(Ala)₅以上は、AP-構造であることがわかる。実際、(Ala)₅以上の¹³C=O、C α ピークはシングルであり、その化学シフト値は AP β-sheet 構造のデータと一致する。

さらに、一連の AlaC β ピークを比較すると、途中でスペクトルパターンが著しく異なることがわかる。すなわち、(Ala)_{5,6}では、約 20ppm のシングルピークのみであるが(両側ピークは末端基由来)、(Ala)₇以上からピークの線形が大きく変化する。その線形は、(Ala)₈ならびに(Ala)₁₂も同様である。また、粉末 X 線回折でも、(Ala)₆以下で観測される 2θ=19.2° のピークが、(Ala)₇以上では 2θ=20.4° にシフトする。すなわち、コンフォメーションは、いずれも AP-β-sheet 構造であるが、分子間構造が、(Ala)₇を境にそれ以上と以下で大きく異なることがわかる。

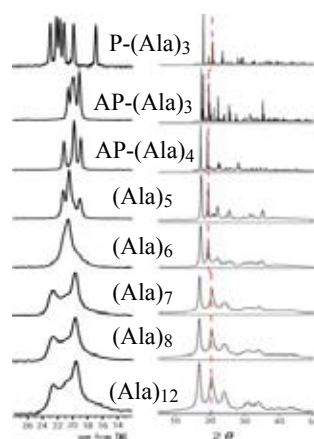


Fig.2 ¹³C CP/MASNMR spectra of Ala C β (left) and X-ray diffraction powder patterns (right) of Ala oligopeptides.

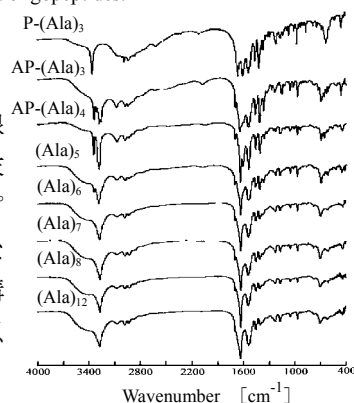


Fig.3 FT-IR spectra of Ala oligopeptides.

(Ala)₇の分子間構造の検討

次に、AP-(Ala)₇の分子間構造について、より詳細に解析を進めるために、中央の4残基目のみを選択的に¹³Cラベルした(Ala)₃[3-¹³C]Ala⁴(Ala)₃を合成し、そのAlaCβピークの線形をノンラベル試料(Ala)₇と比較した(Fig.4a,b)。17ppm付近の高磁場のブロードなピーク(矢印)の消失以外は、スペクトルは概ね一致した。17ppmのピークは、末端残基由来である。従って、AlaCβの3つの主ピークは、一本鎖中の局所構造の不均一性を反映したものではなく、分子間構造の不均一性を反映したことがわかる。

さらに、¹³C,¹⁵N均一ラベル化された(Ala)₇を用いてPDSO測定を行い、分子間構造の検討を

続けた(Fig.5)。mixing timeを100msに設定して測定したスペクトルにおいて、22.7ppm(A)と19.6ppm(C)間に相関ピークが得られ、この2つのピークを与える¹³C核は近い距離に存在していることが分かった。一方、真ん中の21ppm(B)のピークは相関ピークが見られず、対応する¹³C核は、他の2つの核から遠い位置に存在していることが分かった。このことから、22.7ppmと19.6ppmの¹³C核が近い分子間構造と21ppmの独立した分子間構造の存在が確認され、それぞれの構造は互いに離れた領域として存在していることが示唆された。実際、(Ala)₃[3-¹³C]Ala⁴(Ala)₃をTFAで処理した所(Fig.4c)、真ん中の21ppm付近のピークが見かけ上、消失した。これは、TFA処理によって、21ppmのピークを与える分子間構造が変化し、両側のピークを与える構造に変化したことに起因する。ただし、Fig.4cの2本のピークにおいて、高磁場のピーク強度が少し高いことから、高磁場ピークのすそに21ppmのピークが少し残っていると考えられる。

(Ala)₆及び(Ala)₇分子間構造モデルの作成

まず、(Ala)₇の構造モデルを作成するために、分子間REDORの測定を行った。(Ala)₃[3-¹³C]Ala⁴(Ala)₃ならびに(Ala)₄[¹⁵N]Ala⁵(Ala)₂を合成し、1:3の比率で混合した試料について、REDOR測定により異種核間原子間距離測定を行った。その結果、(Ala)₇の¹³Cβ核とシート間の位置にある¹⁵N核の距離は3.8±0.1Åと見積もることができた。さらに、AP-(Ala)₄およびP-(Ala)₃、AP-(Ala)₃についての単結晶X線解析による分子間構造、(Ala)₆及び(Ala)₇の粉末X線回折スペクトルならびにMD計算を行なうことによ

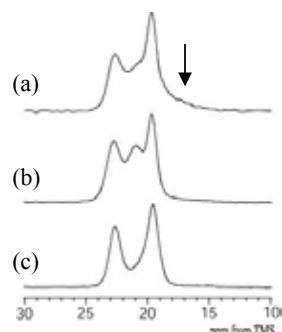


Fig.4 ¹³C CP/MAS spectra of AlaCβ in (Ala)₇. (a) natural abundance. (b) A₃[3-¹³C]A⁴A₃. (c) The same sample as (b) except for the TFA treatment.

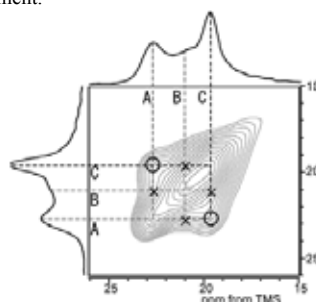


Fig.5 PDSO ¹³C NMR spectrum (AlaCβ region was expanded).

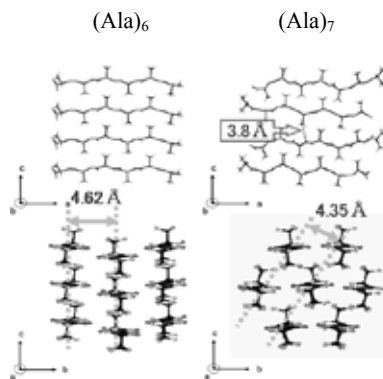


Fig.6 (a) Proposed β-sheet packing models of (Ala)₆ and (Ala)₇.

て、(Ala)₆ならびに(Ala)₇の構造モデルを提案した(Fig.6)。シート間の並びに違いがあり、(Ala)₆ではシート間が重なるが、(Ala)₇の主構造では、シート間がずれている。

(Ala)₆及び(Ala)₇分子間構造モデルに基づく¹³C NMR 化学シフト計算

(Ala)₆と(Ala)₇分子間構造モデルを用いて、¹³C NMR 化学シフト計算を行った(Fig.7)。すなわち、(Ala)₆と(Ala)₇構造について、着目した AlaC β核を取り囲む 5 本の分子鎖からなる集合体を作成、AlaC β¹³C NMR 化学シフト計算を行った。その結果、AP-(Ala)₇の AlaC βは 2 種類の異なった環境を反映して、約 5ppm のシフト差を与える 2 つの化学シフトを生

ずることを示した。また、AP-(Ala)₆の AlaC β化学シフトの計算値は、その間になる。これらの傾向は実測をよく説明する。

クモ牽引糸ならびにエリ蚕絹繊維の分子間構造の違い

クモ牽引糸、エリ蚕絹繊維の¹³C CP/MASNMR スペクトル(AlaC β域)と粉末 X 線回折パターンを Fig.8 にまとめた。比較のために(Ala)₆及び(Ala)₇の AlaC βピークを示した。クモ牽引糸ならびにエリ蚕絹繊維の AlaC β主ピークは、各々、(Ala)₆及び(Ala)₇の AlaC βピークと類似している。その天然繊維の粉末 X 線回折パターンは、特にクモ牽引糸では非晶部分が多い。結晶部分についてみると、エリ蚕絹繊維は、概ね、(Ala)₇型のパターンで再現できる。一方、クモ牽引糸は、(Ala)₆と(Ala)₇の混在型で再現できる。これは、AlaC βピークにおいて、(Ala)₆の線幅に比較してクモ牽引糸の線幅がかなり広く、一部、(Ala)₇のピークが混在することと対応している。

以上のように、クモ牽引糸中の(Ala)₆型構造の存在が、高い繊維強度の源になっていると考えられる。この構造の存在と高い繊維強度との関連についての研究は、今後、解明すべきテーマである。

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）、科学研究費補助金 基盤研究 S（課題番号 18105007；平成 18-22 年度）ならびに科学技術振興機構先端計測分析技術・機器開発事業（平成 20-22 年度）により実施された。

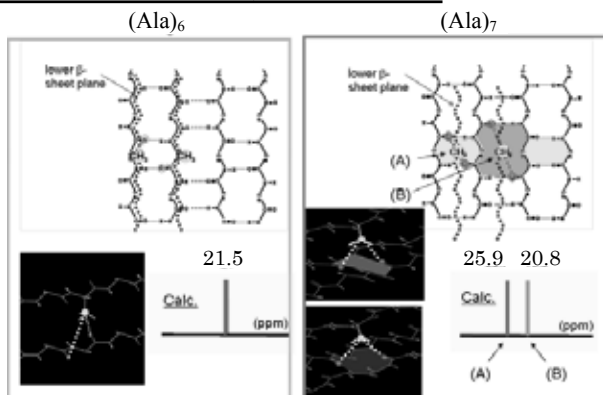


Fig.7 Calculated AlaC β chemical shifts of (Ala)₆ and (Ala)₇ (Stick spectra).

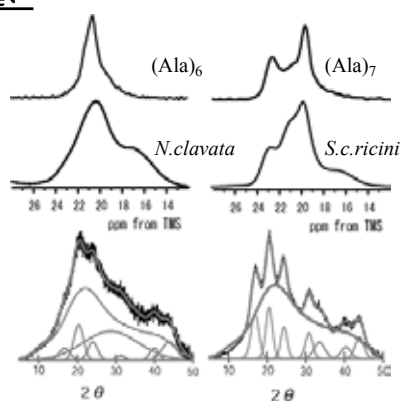


Fig.8 ¹³C CP/MAS NMR spectra of (Ala)₆, (Ala)₇, *N.clavata* and *S.c. ricini* silks. The X-ray diffraction powder patterns together with the simulation are also shown.

固体NMRによる抗菌ペプチドbovine lactoferrampinの細菌模倣膜中における動的構造解析

○堤 敦史¹, 吉良 敦史², 梅山 万左子¹, 川村 出¹, 内藤 晶¹

¹横国大・院工

²株式会社アルバック

Dynamic structure of bovine lactoferrampin in mimetic bacterial membranes as studied by solid-state NMR

○Atsushi Tsutsumi¹, Atsushi Kira², Masako Umeyama¹, Izuru Kawamura¹, and Akira Naito¹

¹Graduate School of Engineering, Yokohama National University.

²ULVAC, Inc.

Bovine lactoferrampin(LFampinB) is a new antimicrobial peptide found in the sequence of bovine lactoferrin, and consists of 17 amino acid residues. It is revealed that LFampinB affects to bacterial membranes which contain acidic phospholipids, and kills bacteria. This mechanism, however, is not revealed in a molecular level. In addition, proposed antimicrobial mechanisms are often depending on structure and orientation of peptides. Thus it is important to determine the orientation and local structure of LFampinB in biological membranes for further understanding of antimicrobial mechanism. In this report, we performed ¹³C, ³¹P NMR and ¹³C-³¹P REDOR measurements. The results show that LFampin formed α -helix from Leu³ to Phe¹¹. Furthermore the helix axis of LFampinB tilts 47° to membrane normal.

【序論】

Bovine lactoferrampin(LFampinB)は、乳汁中のタンパク質bovine lactoferrinより同定された、アミノ酸17残基からなる抗菌ペプチドである⁽¹⁾(Fig.1)。以前に発表した発表したbovine lactoferricin⁽²⁾と同様に、LFampinBは、酸性リン脂質を多く含む細菌膜に特異的に親和し、抗菌活性を発現することが知られているが、その分子レベルでの活性メカニズムは明らかにされていない。また、現在提唱されている抗菌活性のメカニズムには、ペプチドの構造や脂質膜中での配向に依存するものが存在するので、LFampinBの抗菌活性のメカニズムを理解する上で、生体膜中での配向や局所構造を分子レベルで明らかにすることが重要である。本研究では、¹³C固体NMR測定を行うことで、LFampinBの細菌模倣膜中での配向や動的構造を解析し、³¹P NMR測定から膜との相互作用解析を行い、抗菌活性との相関を明らかにすることを目的としている。

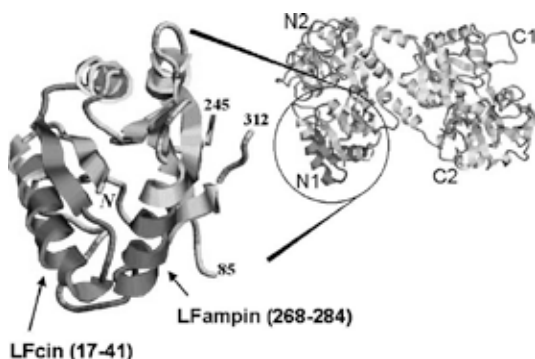


Fig.1 Bovine lactoferrin and derived peptides

固体NMR, 抗菌ペプチド, 化学シフト異方性

○つつみあつし, きらあつし, うめやままさこ, かわむらいずる, ないとうあきら

【実験】

Leu³,Leu⁴,Ala⁷,Phe¹¹,Gly¹²のカルボニル炭素が¹³C同位体標識されたアミノ酸を用いて、Fmoc固相合成法により部位特異的¹³C標識LFampinBを合成した。細菌模倣膜(DMPG:DMPC:CL=65:25:10,重量比)を形成させた後、ペプチド:脂質をモル比で1:10としてペプチドを細菌模倣膜分散系に滴下し、NMR測定試料とした。NMR測定にはChemagnetics CMX infinity-400 FT-NMR分光器を使用し、¹³C 静止状態DD-MASおよびCP-MAS NMR測定からLFampinBの動的構造を、³¹P NMR測定からペプチドとリン脂質の相互作用を、¹³C-³¹P REDOR測定から脂質頭部とLFampinBの¹³C 標識部位の距離を測定し、LFampinBの膜中の深度をそれぞれ測定した。

【結果と考察】

リン脂質膜との相互作用

³¹P NMR測定を行うことにより、ペプチドとリン脂質との相互作用によるリン脂質頭部基の運動性の変化を観測した。中性膜であるDMPC膜に対しては、膜を磁場に配向させる性質があることが判明したが、膜を乱す可能性を示唆する等方信号成分は現れなかった。酸性膜であるDMPG膜に対しては、相転移点を境に異方性が減少していることが観測された。これは、脂質二分子膜を形成した状態の膜と、膜構造に欠陥のある状態の交換が速いために起きたと考えられる。細菌模倣膜に対しては、LFampinBを加えた際に0 ppmに等方ピークが現れ、膜に欠陥が生じていることを示唆している(Fig.2)。

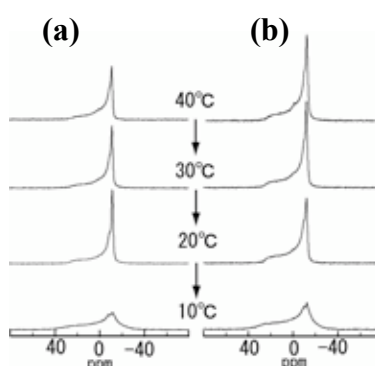


Fig.2 Temperature variation of ³¹P-Static NMR spectra (a) membrane only, (b) peptide: lipid=1:20

脂質膜中でのLFampinBの挙動

ペプチドがhelixを形成し、脂質二分子膜中で脂質膜面の法線の周りで一軸回転運動を行う様子をFig.3に表す。この回転運動の特徴は、helix軸が回転軸になるのではなく、脂質膜面の法線が回転軸になる点である。即ち、膜に親和性の高いアミノ酸残基は常に同じ側を向いている事を意味している。したがって、カルボニル炭素の異方性は個々のアミノ酸残基により異なる。この異方性の理論値 $\Delta\delta_{cal}$ は、回転軸に対するhelix軸の傾き ζ とhelix軸内のカルボニル平面の面角 γ を用いて以下の式のように表せる⁽³⁾。

$$\Delta\bar{\delta} = \frac{3}{2} \sin^2 \zeta (\delta_{11} \cos^2 \gamma + \delta_{33} \sin^2 \gamma - \delta_{22}) + (\Delta\bar{\delta})_{\zeta=0}$$

$$(\Delta\bar{\delta})_{\zeta=0} = \delta_{22} - \frac{\delta_{11} + \delta_{33}}{2} \quad \text{--- (1)}$$

この式より、化学シフトの異方性 $\Delta\delta$ は振幅 $3/2\sin^2\zeta$ を持ち、 γ に依存して振動すること

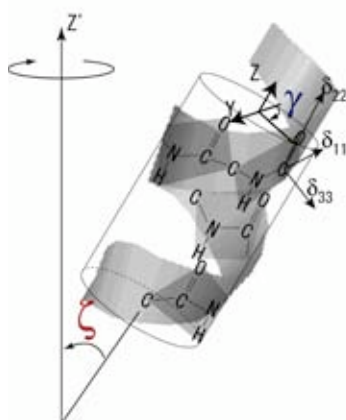


Fig. 3 X, Y, Z, coordinate system when a helix rotates about bilayer normal

が分かる(化学シフト振動パターン)。また、 ζ と各アミノ酸残基により異なる γ を決定するために以下の測定を行った。まず、水和試料による ^{13}C DD-MAS測定により、二次構造の決定を行った(Table1)。この結果、LFampinBはLeu³からGly¹²近傍までhelixを形成していることが判明した。次に、DD-Static測定から各アミノ酸残基の異方性の実測値 $\Delta\delta_{\text{obs}}$ を得た。最後に試料を凍結乾燥し、CP-MAS測定を行い各カルボニル炭素のテンソルの主値 δ_{11} , δ_{22} , δ_{33} を決定した。Fig.4にはAla⁷の測定結果の例を示す。 $\Delta\delta_{\text{cal}}$ と $\Delta\delta_{\text{obs}}$ の一致を示すRMSD値から、このhelixの脂質膜法線からの傾きを47°と決定した。また、(1)式の右辺の二項目を引いた以下の(2)式において、決定した ζ を固定し γ を変化させることで、helix内のカルボニル炭素における異方性の化学シフト振動パターン(Fig.5)が得られる。

$$\Delta\delta_{(r)\text{cal}} = \frac{3}{2} \sin^2 \zeta (\delta_{11} \cos^2 \gamma + \delta_{33} \sin^2 \gamma - \delta_{22}) \quad \text{--- (2)}$$

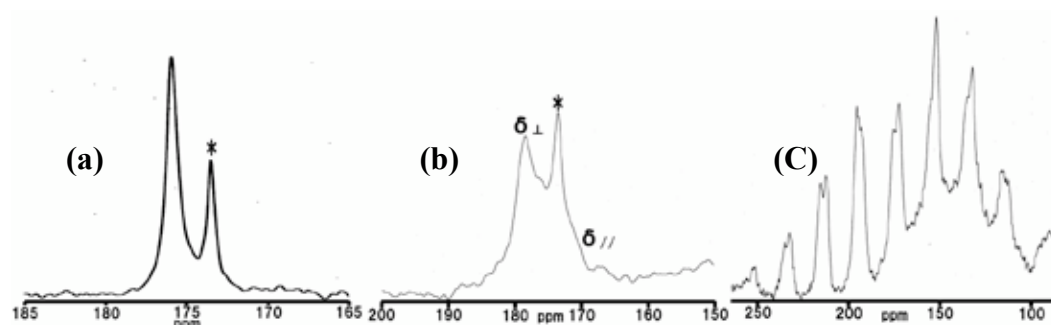


Fig.4 ^{13}C NMR spectra for $[1-^{13}\text{C}]$ Ala⁷ LFampinB (a) DD-MAS 4kHz (b) DD-Static (c) CP-MAS 2KHz * peak of lipid

Table1 ^{13}C NMR measurement results of the $[1-^{13}\text{C}]$ for LFampinB (ppm)

アミノ酸残基	$\delta_{\perp}$	$\delta_{\parallel}$	$\Delta\delta$	δ_{iso}	δ_{11}	δ_{22}	δ_{33}	二次構造
Leu ³	195.3	132.45	-62.85	174.35	248	178	97	Helix
Leu ⁴	156.21	213.48	57.27	175.3	250	188	88	Helix
Ala ⁷	178.69	170.5	-8.19	175.96	247	187	94	Helix
Phe ¹¹	172.45	176.29	3.84	173.73	249	173	99	random coil
Gly ¹²	171.08	173.75	2.67	171.97	247	171	98	Helix

この曲線を解析することにより、helixの種類や境界を判断することが出来る。Fig.5に見られる振動パターンから、Leu³からAla⁷までは α -helixを形成していることが判明した。さらに、LFampinBは α -helixを形成するがPhe¹¹近傍からC末端に向けて振動パターンから外れているので α -helixがここで、崩れていることがわかる。この構造はミセルで得られた構造とも合致する⁽⁴⁾。今回の測定では粉末試料を用いてCP-MAS測定を行い、各アミノ酸のセ

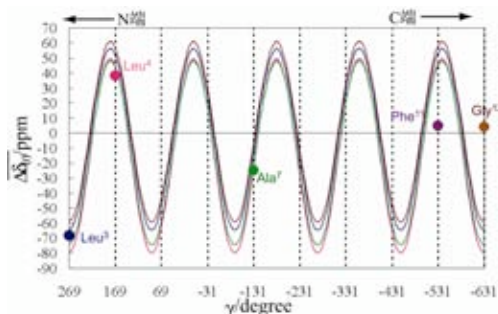


Fig. 5 Chemical shift oscillation for the $[1-^{13}\text{C}]$ chemical shift anisotropy of LFampinB

ンターバンドの化学シフト値がhelixからrandom coilへと変化していることが観測された。これは乾燥により、helix構造が部分的に崩れてしまった可能性が考えられる。

LFampinBの脂質膜中での深度

REDOR法は、REDOR効果による信号の減衰から、原子間距離を精密に測定する手法である。この手法を利用し、リン脂質の頭部基とLFampinB中の同位体標識したカルボニル炭素との距離を測定し、脂質膜中におけるLFampinBの深度決定を試みた。Fig.6からhelix中のN末端側とC末端側では共に5.9Å程度の距離が得られ、大きな差異はないことが判明した。この結果は、helixが膜法線に対して大きな角度で膜中に挿入しているため、膜中に深く埋もれる部位がないことを示している。しかし、部位によっては2スピン系の寄与が含まれている可能性が示唆されており、現在精度の高い距離の測定法を検討中である。

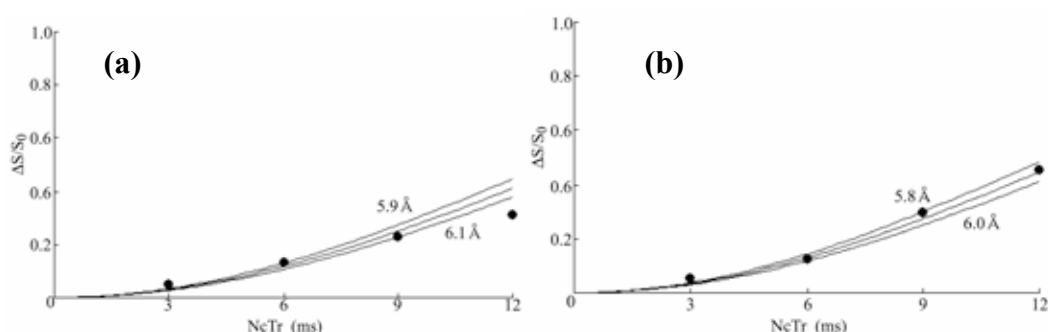


Fig.6 experimental data and theoretical REDOR curves fitting to LFampinB (a) $[1-^{13}C]$ Leu³ (b) $[1-^{13}C]$ Phe¹¹

【まとめ】

今回の結果や以前に行ったQCM測定やカリウムイオン濃度測定と合わせて、LFampinBは酸性膜を多く含む細菌膜に特異的に親和し、酸性膜に対して孔をあけるような性質があると判明した。また、その際にはLFampinBが両親媒性の α -helixを形成し、そのhelix軸を脂質膜面法線に対して47°傾けて膜表面部位に位置し、回転運動する動的構造および膜への挿入度が明らかになった(Fig.7)。今後は、これらの結果から、孔をあける作用との相関を明確にしていく予定である。

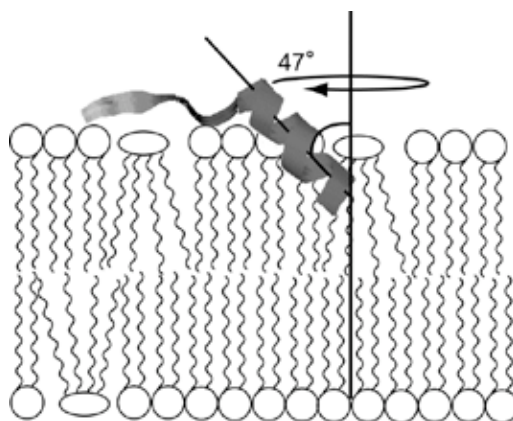


Fig.7 Structure of LFampinB bound to acidic lipid bilayer

【参考文献】

- (1) Van der kraan et al. 2004 *Peptides* 25, 177-183.
- (2) M.Umeyama et al. 2006 *Biochim. Biophys. Acta* 1758, 1523-1528.
- (3) S. Toraya et al. 2004 *Biophys. J.* 87, 3323-3335.
- (4) Evan F. Haney et al. 2007 *Biochim. Biophys. Acta* 1768, 2355-2364.

Implicit membrane modelを用いた分子動力学計算と 固体NMRスペクトルシミュレーションによる 膜結合ペプチド・マストパランXの構造解析

○池田恵介¹, 亀田倫史², 原田英里砂¹, 阿久津秀雄¹, 藤原敏道¹

¹ 阪大・蛋白研

² 産総研・CBRC

Structural Analysis of Membrane-bound Peptide, Mastoparan-X by Molecular Dynamics using Implicit Membrane Model and Solid-state NMR Spectral Simulation

○Keisuke Ikeda¹, Tomoshi Kameda², Erisa Harada¹, Hideo Akutsu¹,
and Toshimichi Fujiwara¹

¹*Institute for Protein Research, Osaka University, Osaka, Japan.*

²*Computational Biology Research Center, AIST, Tokyo, Japan.*

The molecular structure of a wasp venom peptide, mastoparan-X in lipid bilayers was determined by solid-state MAS NMR spectroscopy and molecular dynamics simulations. A structural ensemble including orientations of the peptide in membranes was obtained by the molecular dynamics calculation in implicit membranes, where the solvation energy was approximately estimated by the generalized Born/accessible surface area model. NMR spectra were simulated using the structures in the ensemble. (1) The conformation-dependent chemical shift was calculated by SHIFTX and SPARTA. (2) ¹³C NMR spectra, the intensities of which depend on the distance between ¹H spins in the peptide and ²H/³¹P spins in lipids were simulated by spin dynamics calculations. We extracted the molecular structure with respect to membranes and the orientation of the peptide including sidechains from the ensemble by a comparison between the observed and the predicted spectra.

1. 序論

固体NMRスペクトル測定によって、膜ペプチド・蛋白質を脂質二重膜に埋め込んだ状態で、原子分解能で構造を決定することが可能である。また、溶媒・脂質分子中の核スピンとタンパク質分中の核スピン間の双極子相互作用の測定から、膜中での分子の位置・配向を決定できる。しかし、¹³C完全標識試料では溶液NMRスペクトルと比較して一般的に分解能は低い。また、ピークのオーバーラップを避けるために、部位特異的に蛋白質を同位体標識すると得られる構造情報量が限られることも構造決定上問題となる。

本発表では、分解能の低いスペクトルからできる限り情報を取得し、限られた情報から脂質膜中での立体構造を決定することを目的とし、膜系の分子動力学計算と固体NMRスペクトル計算を組み合わせ、膜ペプチド・蛋白質の構造決定を行う方法を報告する。例として、リン脂質リポソームに強く結合しているハチ毒ペプチド・マストパランX (INWKGIAAMAKLL-NH₂)の構造解析結果を示す。

分子動力学計算, スペクトルシミュレーション, 膜ペプチド・蛋白質

○いけだけいすけ,かめだとし,はらだえりさ,あくつひでお,ふじわらとしみち

2. 方法

分子動力学計算:計算にはCHARMM力場(param 22 + CMAP)を使用した。二面角や原子間距離などの構造制限情報は加えなかった。高速に脂質膜中のペプチドの分子動力学計算を行うため、溶媒和エネルギーを一般化ボルンエネルギーと溶媒露出表面エネルギーの和で近似するimplicit membrane modelを用いた。レプリカ交換法を用いて(32 replicas、300-800 K)、構造空間を効率的にサンプリングした。初期構造としてextendした構造を用い、16 nsまで計算した(step size 2 fs、SHAKE拘束下)。

化学シフト予測:分子動力学計算から得られた構造アンサンブル中のマストパランXの分子構造それぞれについて、 C_α 、 C_β 、 C' の化学シフト値を計算した。予測にはSPARTAおよびSHIFTXを使用した。

^{13}C -Observation of X-Selective ^1H -Depolarization (COXSHD)スペクトル計算:COXSHDスペクトル測定により、シグナル強度がペプチド中の ^1H 核と重水素化脂質(DMPC- d_{67} /DMPG- d_{67})膜中の $^2\text{H}/^{31}\text{P}$ 核間の距離に依存しているスペクトルを得た。アンサンブルの構造・配向を用いてCOXSHD (1D)スペクトルをスピンドYNAMIX計算によって作成した。これまで解析されていない側鎖のスペクトル領域を加えた全領域(0-140 ppm)について計算した。

3. 結果・考察

主成分分析:分子動力学計算から得られた構造アンサンブル(7-16 ns、9000 structures)の原子座標について主成分分析を行ったところ、300 Kにおける分子構造は第1・第2主軸平面上で5つのクラスターに分類された(Fig. 1)。すべてのクラスターでペプチドは膜界面に存在していた。

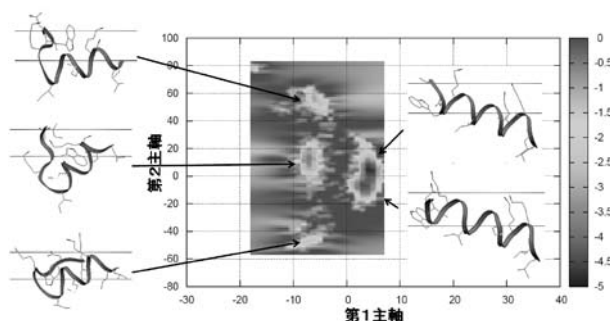


Fig. 1 Principle component analysis

主鎖構造:アンサンブルのうち、主鎖 C_α 、 C' 、側鎖 C_β 化学シフトレベルで実測値と一致している(RMSD < 1.3 ppm)構造は、N末1-2残基はフレキシブルな構造をとり、残りの3-14残基は α -helix構造を形成していた。この構造は主成分分析において、自由エネルギーが最も低いクラスターに存在していた。また、これは以前に報告されている主鎖構造と一致した(Biophys. J. 91, 1368)。

膜配向:COXSHDスペクトルに最も良くフィットする分子の配向・構造を決定した。ペプチド分子は膜面にほぼ平行に横たわり、ヘリックスの疎水面を膜中へ向けていた。この配向は主鎖構造同様、自由エネルギーの低いクラスターにみられるものであった。

側鎖構造:COXSHDスペクトルのフィットがよい構造についてTrp3の側鎖構造を解析した。可能な二面角として $(\chi_1, \chi_2) = (-60^\circ, 90^\circ)$ 、 $(-60^\circ, -30^\circ)$ 、 $(180^\circ, -90^\circ)$ が得られ、側鎖のインドール環を膜に深く挿入していることが明らかとなった。

4. 結論

Implicit membrane modelを用いた分子動力学計算によって、膜結合状態のマストパランXについて、実験的に妥当な構造空間を高速にサンプリングすることができた。計算構造とスペクトルシミュレーションを組み合わせた解析を用いることで、化学シフトと分解能の低い1D COXSHDスペクトルから、膜中でのペプチド分子の配向だけでなく、側鎖の構造を得ることが可能となった。本解析法は十分高速な計算であるため、膜蛋白質など大きな系に適用可能である。

Implementation of double resonance magic angle coil spinning experiments

○Munehiro Inukai, and Kazuyuki Takeda

Graduate School of Science, Kyoto University

Abstract: We present an extension of magic angle coil spinning (MACS) solid-state NMR spectroscopy to double-resonance experiments, enabling implementation of powerful double-resonance solid-state NMR methodologies including cross polarization, proton decoupling, and two-dimensional correlation spectroscopy etc., while still enjoying the merits that are intrinsic to MACS, such as high concentration sensitivity, eliminated magnetic susceptibility-induced field distortion, and an easy-to-use approach with the conventional and widespread hardware.

[Introduction]

In many applications of NMR to materials of chemical/biological interest, the concentration sensitivity, i.e., the sensitivity per unit sample volume, is often more important than that of the mass sensitivity, and the need to gain the former in NMR analysis of sparse, volume-limited samples stimulated development of a tiny detection coil called as a microcoil[1-3]. By reducing the size of the coil one can significantly enhance the filling factor (the ratio of the sample volume to the coil volume) and thereby the attainable concentration sensitivity. Magic Angle Spinning (MAS) has recently stimulated its combination with microcoil NMR in the context of concentration sensitivity, and among several reports on microcoil-MAS NMR spectroscopy[4-6], a remarkable idea put forth by Sakellariou et al. involves spinning of the microcoil together with the sample of interest, and wireless, inductive signal transmission between the spinning microcoil and the primary circuit of the MAS probe[7]. In this outstanding strategy, referred to as Magic Angle Coil Spinning (MACS), the coil can be wound directly around the capillary sample so as to gain the filling factor, while inhomogeneous magnetic field distortion due to bulk magnetic susceptibility of the wire of the microcoil is eliminated by spinning the microcoil at the magic angle. Furthermore, the importance of the MACS approach cannot be overstated from the practical point of view, because it requires no other than a standard, popularly used MAS probe, while any other approaches for microcoil MAS do require some hardware modification inside the MAS probe. Thus, the idea of MACS provides a versatile strategy toward high-resolution solid-state NMR measurements with enhanced concentration sensitivity. Currently, the MACS experiments are demonstrated in ^1H NMR, ^{29}Si NMR and ^{23}Na NMR, while it is often required in solid-state NMR to carry out double-resonance experiments (e.g., cross polarization, proton decoupling,

キーワード：マイクロコイル、マジック角コイル回転

ふりがな：○いぬかいむねひろ、たけだかずゆき

and two-dimensional correlation spectroscopy). In this work, we integrate MACS and double-resonance NMR spectroscopy into an easy-to-use, powerful, and sensitive analytical tool for polycrystalline and amorphous solid materials with a small volume of the order of 0.1 mm or less, opening a new arena of chemical analysis in which one can enjoy benefits from both MACS and double-resonance NMR spectroscopy.

[Double-resonance magic angle coil spinning]

Fig. 1a describes a circuit diagram for a doubly-tuned MACS resonator, to be put inside a rotor (a sample tube specially designed for MAS) and spun together with the rotor in the conventional doubly-tuned MAS probe. The doubly-tuned MACS resonator is composed of two capacitors C_1 and C_2 and two inductors L_1 and L_2 , and their mutual inductance is denoted by M . V_1 and V_2 represent electromotive forces induced by the primary circuit (not described in the figure) in the probe through the inductive couplings.

We wound two coils (inner diameter: 0.5 mm) with 80 μm polyurethane-coated copper wire, and assembled the doubly-tuned MACS resonator in an axially symmetric form using two chip capacitors, as shown in Fig. 1b. We put the two coils apart from each other, so that their coupling M is negligible.

In order to evaluate sensitivity enhancement introduced by employing the doubly-tuned MACS resonator, we examined the frequencies of nutation, i.e., rotational motion of nuclear magnetization under resonant radiofrequency irradiation, for both the ^1H and ^{13}C channels of a commercial MAS probe with and without the doubly-tuned MACS resonator shown in Fig. 1. In Fig. 2a, the ^1H and ^{13}C nutation frequencies are plotted for various radiofrequency powers, showing the enhancement factors of 5.4 ($=46.2/8.60$) and 7.0 ($=26.6/3.80$) for the ^1H and ^{13}C channels. Fig. 2b and c show ^{13}C CP-MAS spectra of an identical polycrystalline sample of uniformly ^{13}C -labeled L-alanine, where the sample was put into the rotor as usual in b, while the doubly-tuned MACS resonator was attached to the sample in c. As expected, the latter resulted in an enhancement factor of ca. 7 in the ^{13}C NMR sensitivity, in good agreement with the enhancement factor in the ^{13}C nutation efficiency described in Fig. 2a.

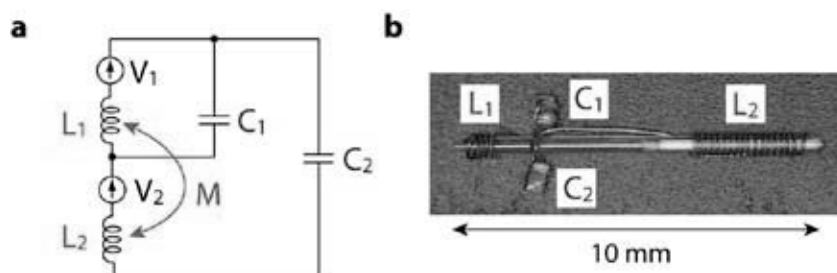


Figure 1. (a) A circuit diagram for implementing double-resonance MACS experiments. A doubly-tuned MACS resonator was fabricated with two $1 \times 0.5 \times 0.5$ mm chip capacitors, as shown in (b). This doubly-tuned MACS resonator is intended for ^1H - ^{13}C double-resonance solid-state NMR experiments in a magnetic field of 7 T, and the inductances L_1 and L_2 are adjusted so that the resonance frequencies match the Larmor frequencies for the ^1H (300 MHz) and ^{13}C (75 MHz) spins.

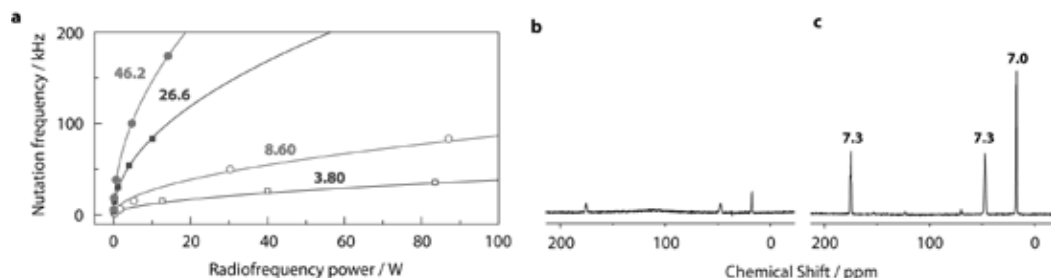


Figure 2. (a) Radiofrequency-power dependence of the nutation frequencies for the ^{13}C and ^1H spins in a commercial MAS probe doubly-tunable at frequency bands around 300 MHz and 75 MHz. The square symbols represent the ^{13}C nutation frequencies with (filled squares) and without (open squares) the doubly-tuned MACS resonator, and the circle symbols represent the ^1H nutation frequencies with (filled circles) and without (open circles) the MACS resonator. The data points were fitted by a square root function of the form $y = a\sqrt{x}$, and the coefficient a is depicted for each set of the data. (b,c) A ^{13}C CP-MAS spectrum of polycrystalline ^{13}C -labeled L-alanine obtained without the doubly-tuned MACS resonator (b) and with the MACS resonator (c). The numbers 7.0, 7.3, and 7.3 indicate the enhancement factors of the ^{13}C peak intensities. In both (b) and (c), the spinning frequency was 10 kHz and the signals were accumulated over 1000 times.

[Application to organic samples]

In Fig. 3a shown is a ^{13}C CP-MAS spectrum of partially ^{13}C - ^{15}N -labeled 42-mer amyloid peptide (A β 42), known to play a critical role in the etiology of Alzheimer's disease. Here the sample amount was ~ 0.1 mg, and the spectrum was obtained with double-resonance MACS by accumulating the ^{13}C NMR signal for 2.08 days, while the expected experimental time required to attain the same signal-to-noise ratio with the conventional probe exceeds 100 days. Fig. 3b shows another example of double-resonance MACS demonstrating two-dimensional ^{13}C - ^{13}C correlation experiment by means of dipolar-assisted rotational resonance (DARR) in polycrystalline ^{13}C -labeled histidine Multi-dimensional NMR.

[Summary]

Since the signal-to-noise ratio is proportional to the square root of the number of signal accumulations, this result indicates that double-resonance MACS accelerates the experimental time by a factor of ca. 49 compared to the same measurement with the conventional approach, making double-resonance solid-state MAS NMR of sparse materials feasible, and importantly, it has been possible simply by putting the doubly-tuned MACS resonator into a commercially available, standard and widespread double-resonance MAS probe without any hardware modification.

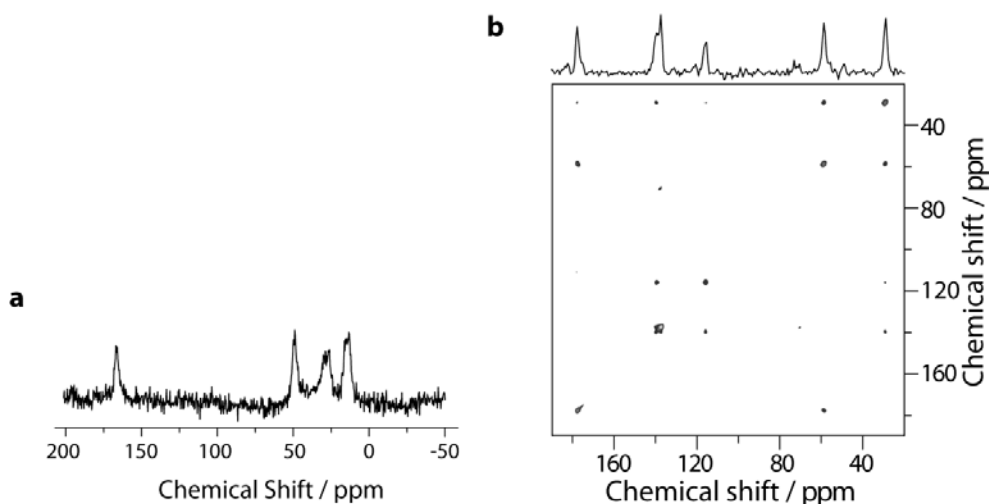


Figure 3. (a) A ^{13}C CP-MAS spectrum of A β 42 (~ 0.1 mg of sample) partially ^{13}C -labeled at the 35-Met and 42-Ala amino acid residues. (b) A two-dimensional ^{13}C - ^{13}C DARR correlation spectrum in uniformly ^{13}C -labelled polycrystalline histidine (0.1 mg of sample). Both data were acquired using the doubly-tuned MACS resonator.

[Acknowledgement]

We thank Prof. K. Takegoshi at Kyoto University and Prof. M. Kitagawa at Osaka University for fruitful discussions on the subject. The A β 42 sample used in this work was provided by Prof. K. Irie and Dr. Y. Masuda. This work has been financially supported by the CREST program of Japan Science and Technology Agency.

References

- [1] D.L. Olson, T.L. Peck, A.G. Webb, R.L. Magin and J.V. Sweedler, *Science* **270**, 1967 (1995).
- [2] K. Yamauchi, J.W.G. Janssen and A.P.M. Kentgens, *J. Magn. Reson.* **167**, 87 (2004).
- [3] A.P.M. Kentgens, J. Bart, P.J.M. van Bentum, A. Brinkmann, E.R.H. van Eck, J.G.E. Gardeniers, J.W.G. Janssen, P. Knijn, S. Vasa and M.H.W. Verkuijlen, *J. Chem. Phys.* **128**, 052202 (2008).
- [4] H. Janssen, A. Brinkmann, E.R.H. van Eck, J.M. van Bentum and A.P.M. Kentgens, *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 8722 (2006).
- [5] K. Yamauchi and T. Asakura, *Chem. Lett.* **35**, 426 (2006).
- [6] M. Inukai and K. Takeda, *Concepts in Magnetic Resonance* **33B**, **115** (2008).
- [7] D. Sakellariou, G. le Goff and J.-F. Jacquinot, *Nature* **447**, 694 (2007).

^2H MAS NMR による電気伝導性有機錯体 $(\text{EDO-TTF})_2\text{PF}_6$ の研究○松永 達弥¹, 水野 敬^{2,3}, 中野 義明⁴, 矢持 秀起⁴, 今城 文雄¹,
竹腰 清乃理^{1,3}¹京大院理, ²日本電子, ³CREST/JST, ⁴京大低物セ **^2H MAS NMR Study of
a Conductive Organic Complex $(\text{EDO-TTF})_2\text{PF}_6$** ○Matsunaga Tatsuya¹, Takashi Mizuno^{2,3}, Yoshiaki Nakano⁴, Hideki Yamochi⁴,
Fumio Imashiro¹, K. Takegoshi^{1,3}¹Graduate School of Science, Kyoto University, ²JEOL, ³CREST/Japan Science and
Technology Agency, ⁴Research Center for Low Temperature and Materials Sciences, Kyoto
University

After the first synthesis of the conductive organic complex, perylene-bromine, in 1954, numerous studies on its properties as well as mechanism of conduction have been reported, with the hope of product high-temperature superconductive materials. $(\text{EDO-TTF})_2\text{PF}_6$, which is one of the conductive organic complexes, shows transformation from metallic phase (HTP) to insulator phase (LTP) at ca. $T_c = 7^\circ\text{C}$. In this work, we apply ^2H magic-angle-spinning (MAS) NMR to partly deuterated $(\text{EDO-TTF})_2\text{PF}_6$ to analyze its transformation mechanism. It is shown that two resolved ^2H MAS signals coexist; the HTP signal appears at -2.9 ppm (34.6 $^\circ\text{C}$) and -1.3 ppm (-23.1 $^\circ\text{C}$) and the LTP signal stays at 7.1 ppm, respectively.

【初めに】

1954年に高伝導錯体 perylene-bromine が合成されて以降、有機錯体に導電性を賦与する研究は目覚ましい発展を遂げた。当初は有機錯体による高温超伝導の実現に強い関心を持たれたが、その過程で見つかった多彩な物性もまた新たな関心を集めている。本研究で取り上げた (ethylenedioxytetrathiafulvalene) $_2\text{PF}_6$ ($(\text{EDO-TTF})_2\text{PF}_6$) は高速、高効率な光誘起相転移が起きることで注目されている物質であり、また $T_c = 7^\circ\text{C}$ で金属-絶縁体転移(M-I 転移)をすることが知られている。このM-I 転移ではEDO-TTF の変形や電荷秩序化、 PF_6 の秩序化がほぼ同時に起こっているが何が転移機構を支配しているのかははっきりしていない。

伝導性有機錯体についてNMRを用いた研究は、 $(\text{DMe-DCNQI})_2\text{Li}^{[3]}$ や $\kappa-(\text{BEDT-TTF})_2\text{X}^{[4]}$ な

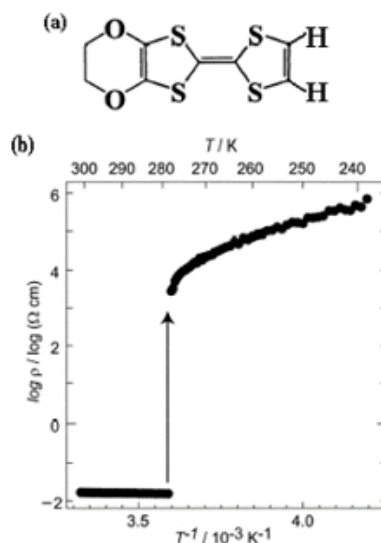


Fig.1 (a) A molecular model of EDO-TTF
(b) Temperature dependence of resistivity
(ρ) of $(\text{EDOTTF})_2\text{PF}_6$ ^[2]

Key Words: ^2H NMR, organic complex, $(\text{EDOTTF})_2\text{PF}_6$

著者ふり仮名：○まつながたつや、みずのたかし、なかのよしあき、やもちひでき、
いましてろふみお、たけごしきよのり

どがいくつかあるものの余り多くはない。これは ^{13}C などの同位体置換物質の合成に手間がかかることや、同位体置換の必要が無い ^1H では同種核間スピン相互作用が大きいことが主な理由である。そこで本研究では比較的簡単に合成できる ^2H 部分置換体を用いて $(\text{EDO-TTF})_2\text{PF}_6$ のM-I転移の解析を行った。この方法では置換によりHサイトを限定できる。また ^2H の四極子相互作用はMASで平均化することが出来るため化学シフトのみのシンプルな高分解能スペクトルが得られるという利点がある。

【実験】

EDO-TTFのビニル水素(Fig. 1(a)のH部分)を ^2H 部分置換した $\text{EDO-TTF-d}_2((\text{EDO-TTF-d}_2)_2\text{PF}_6)$ を試料として用いた。 $-20^\circ\text{C}\sim 30^\circ\text{C}$ での化学シフト及び T_1 の測定には14.1 T マグネット、Doty社製固体高分解能MASプローブ、JEOL-ECA分光計を用いた。試料の温度は試料と共にローターに詰めた $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ の ^{207}Pb MAS NMR スペクトルにより求めた。ローターをテフロンスペーサーで区切り、上下に $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ を、中央に試料を詰めることで互いが混ざり合うのを防いだ。

【結果】

Fig. 2に ^2H MAS NMR スペクトルのセンターバンドの温度変化を示す。どの温度でも2つのピークが見られ、その比率は相転移に伴い温度依存する。この挙動は一次相転移に従っている。高周波数側ピークが電気伝導を示す高温相(HTP)であり、低周波数側ピークが絶縁を示す低温相(LTP)である。ところがB3LYP/6-31G*での化学シフト計算^[5]によるとHTP、LTPどちらのピークも6~7ppm付近に3, 4本のピークが現れると計算された。したがってHTPのピークはこの計算結果と異なる化学シフトを持ち、このシフト差は伝導電子の影響だと考えた。HTPピーク強度の比率の温度依存性をFig. 3に示す。転移温度近傍でなくてもHTP、LTPの比率は温度と共に緩やかに変化する。これはFig. 1(b)の伝導率の変化に見られる明確な相転移の様子とは異なる。これは転移温度でのHTPの割合が約70%であることから、パーコレーション理論を用いると擬2次元的な伝導性を持つと考えられる。

Reference.

- [1] H. Inokuchi, Bull. Chem. Soc. Jpn. 1952, 25, 28.
- [2] A. Ota, H. Yamochi, G. Saito, J. Mater. Chem., 2002, 12, 2600.
- [3] Y. Shinohara, et al., Phys. Rev. B. 76.035128.
- [4] K. Miyagawa, K. Kanoda, Chem. Rev. 2004, 104, 5635.
- [5] Frisch, M. J., et al., Gaussian 03, Revision C. 02, Gaussian, Inc: Wallingford CT, 2004.

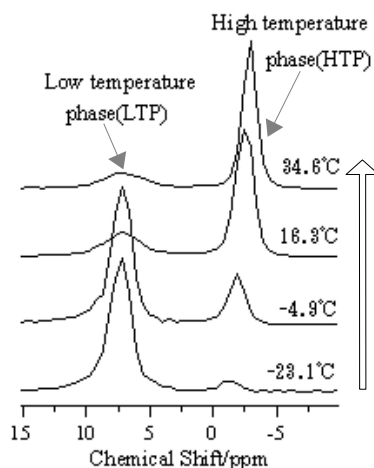


Fig.2 Temperature dependence of ^2H MAS NMR spectra of $(\text{EDO-TTF-d}_2)_2\text{PF}_6$ with increasing temperature (14.1 T). HTP signal moves from -2.9 ppm to -1.3 ppm, while LTP stays at 7.1 ppm, respectively.

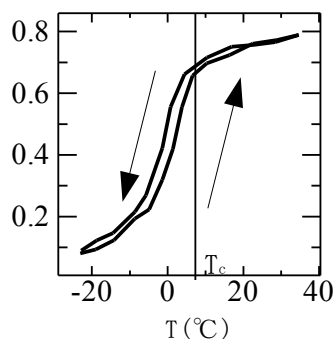


Fig.3 Temperature dependence of the peak intensity ratio of HTP .

超 1GHz 高温超伝導 NMR システムの開発 高温超伝導 500MHzNMR における 固体 NMR の磁場安定化手法

¹ 理化学研究所 SSBC, ² 横浜市立大学, ³ 上智大学, ⁴ 日本電子,

⁵ 神戸製鋼所, ⁶ 東京工業大学, ⁷ 物質・材料研究機構

○ 高橋雅人 ^{1,2}, 海老澤佑輔 ², 天明宏之助 ², 斉藤雄太 ³, 高尾智明 ³,
細野政美 ⁴, 濱田衛 ⁵, 山田和彦 ⁶, 木吉司 ⁷, 山崎俊夫 ¹, 前田秀明 ^{1,2}

Towards an HTS NMR spectrometer beyond 1GHz

- Field stabilization method for solid state NMR in a 500MHz HTS NMR -

¹RIKEN SSBC, ²Yokohama City Univ., ³Sophia Univ., ⁴JEOL Ltd.,

⁵Kobe Steel, Ltd., ⁶Tokyo Institute of Technology, ⁷NIMS

○Masato Takahashi^{1,2}, Yusuke Ebisawa², Konosuke Tennmei², Yuta Saito³,
Tomoaki Takao³, Masami Hosono⁴, Mamoru Hamada⁵, Kazuhiko Yamada⁶,
Tsukasa Kiyoshi⁷, Toshio Yamazaki¹, Hideaki Maeda^{1,2}

Achieving a higher magnetic field is important for higher sensitivity, better resolution and for solid state NMR. However, the common Low Temperature Superconductors (LTS) are incapable of generating in excess of 23.5 T. This project replaces the innermost Nb₃Sn coil of the 920MHz NMR with a Bi2223 High Temperature Superconductor (HTS) coil for operation beyond 1GHz⁽¹⁾. Unfortunately, the HTS coil has a small residual resistance and a joint resistance, which prevent the persistent mode of operation. Thus, an external power supply for the HTS is needed, which causes current ripples resulting in modulated spectra.

The difficulty of z^1 shimming in case of HTS magnet caused by its wire shape was indicated by Hahn et. al.⁽²⁾, which suggested that the z^1 shim and the HTS coil were magnetically coupled and affected each other. Such z^1 magnetic field fluctuation cannot be fully compensated by the conventional lock system. Thus, an external lock system which can continuously compensates z^1 component has been developed. A pair of microcoils is installed both above and below the sample. A PC calculates the change of z^0 and z^1 magnetic field errors and controls the currents of z^0 and z^1 compensation coils to stabilize the magnetic field.

The most volatile components of shims are basically z^0 and z^1 in conventional LTS magnets. This system is applicable to the solution and solid-state NMR, such as deuterium NMR and NMR spectroscopy in non deuterated solvents.

緒言

固体 NMR では、NMR の高磁場化が有効である。我々は、高温超伝導を用いた超 1GHz NMR システムの開発を開始した⁽¹⁾。装置は、溶液 NMR と固体 NMR に適用できる。今回、第 1 段階として、高温超伝導 500MHz NMR システムを開発し、固体 NMR 計測を行った。高温超伝導では永久電流モードで使えないため、外部電源から通

キーワード：高磁場 NMR、磁場安定化、外部ロック

たかはしまさと、えびさわゆうすけ、てんめいこうのすけ、さいとうゆうた、たか
おともあき、ほそのまさみ、はまだまもる、やまだかずひこ、きよしつかさ、やま
ざきとしお、まえだひであき

電するモードで運転する。この場合、高温超伝導線の磁化 ($10^{-6} \sim 10^{-8}$) や、外部電源の電流変化 (10^{-6}) による磁場変動を受けるため磁場を安定化させるロックシステムが必要になる。固体 NMR では ^2H 溶媒などを用いた内部ロックが使用できないため、外部ロックを行うことになる。

Hahn ら⁽²⁾は高温超伝導磁石では超伝導線がテープ状であるために発生する磁化のために z^1 シミングが難しくなることを指摘している。これと同様にテープ線に発生した磁化が外部電源の電流変化の影響を受けて変動し、 z^1 変動エラー磁場を作る可能性がある。さらに、超 1GHz NMR はつくば物質・材料研究機構に設置するが、近隣の大型マグネットの漏れ磁場で z^1 成分が生じる可能性がある。外部ロックの難しさは、ロックコイルとサンプルが別の場所に設置されるため、両者間の磁場の補正が必要なことにある。 z^1 成分が時間変動すると、単純な外部ロックでは、この補正が不可能になるため、本磁石では z^1 を常時補正できる外部ロックが必須である。このための外部ロックを開発したので報告する。

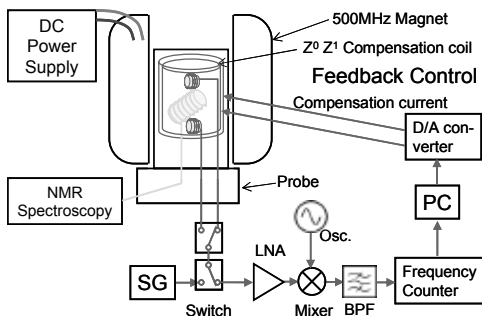


Fig. 1. A magnetic field stabilization system using two microcoils NMR and a frequency counter for z^0 and z^1 magnetic field compensation. This system is worked as an external lock system for solid state NMR using an external power supplied magnet.

実験結果と考察

固体 NMR 用に **Fig. 1** に外部ロックシステムの構成を示す。 z^1 成分を検知するために、固体 NMR プロブ内に ^7Li 溶液マイクロコイル (ロック用) を MAS ハウジングの上下に設置し、両方のマイクロコイルの FID 信号を周波数カウンタで交互に測定した。得られた磁場を用いて、プロブ内に設置した z^0 と z^1 の磁場補正コイルの電流を制御し、 z^0 、 z^1 磁場成分のフィードバック制御を行った。これにより磁場変動成分のうち z^0 、 z^1 方向の磁場を安定化することができる。その結果、**Fig. 2** に示すようにこれまでよりも長期にわたって安定した NMR 磁場と線形を作ることができた。この間、制御した補正電流値から z^0 、 z^1 磁場成分が変動していることが確認でき、この方式の有効性も実証できた。

通常の永久電流モードの NMR 磁石でも変動がもっとも大きい z^0 、 z^1 磁場成分を補正することがこの方法により可能となるため、従来からのロックが使用できない高分解能固体 NMR や重水素溶媒なしの溶液 NMR でも有用である。

- (1) T. Kiyoshi, A. Otsuka, S. Choi, S. Matsumoto, K. Zaitzu, T. Hase, M. Hamada, M. Hosono, M. Takahashi, T. Yamazaki, H. Maeda; IEEE Transactions on Applied Superconductivity, 18 (2008) 860-863.
- (2) S. Hahn, M.C. Ahn, J. Bascunan, W. Yao, Y. Iwasa; presented at the Applied Superconductivity Conference, 2008.

本開発は、(独) 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。

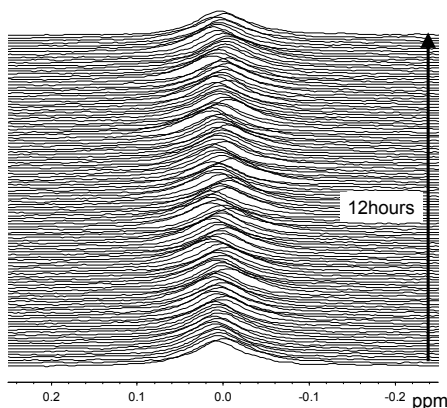


Fig. 2. A stacked plot of solid-state ^{13}C NMR for adamantane measured in the external current mode, while the external lock system continuously stabilize the magnetic field for 12 hours.

500MHz 高温超伝導NMR分光器による溶液NMR計測； 超1GHz NMRに向けて

○柳澤吉紀^{1, 2}, 中込秀樹², 細野政美³, 濱田衛⁴, 吉川正敏⁵,
大塚昭弘⁵, 木吉司⁶, 天明宏之助⁷, 渡辺健太⁷, 山崎俊夫¹,
高橋雅人^{1, 7}, 前田秀明^{1, 7}

¹理研SSBC, ²千葉大院・工学研究科, ³日本電子,
⁴神戸製鋼所, ⁵JASTEC, ⁶物質・材料研究機構, ⁷横浜市大院

Solution NMR measurements with a 500 MHz HTS NMR spectrometer; Towards a beyond 1 GHz NMR spectrometer

○Yoshinori Yanagisawa^{1, 2}, Hideki Nakagome², Masami Hosono³, Mamoru Hamada⁴,
Masatoshi Yoshikawa⁵, Akihiro Otsuka⁵, Tsukasa Kiyoshi⁶, Kohnosuke Tennmei⁷,
Toshio Yamazaki¹, Masato Takahashi¹, Hideaki Maeda^{1, 7}

¹RIKEN SSBC, Kanagawa, Japan, ²Graduate School of Engineering, Chiba University, Chiba, Japan, ³JEOL, Tokyo, Japan, ⁴Kobe Steel, Hyogo, Japan, ⁵JASTEC, Hyogo, Japan, ⁶National Institute for Materials Science, Ibaraki, Japan, ⁷Yokohama City University, Kanagawa, Japan

We have started a project to develop a 1.03 GHz NMR spectrometer using a Bi-2223 high temperature superconducting (HTS) coil. An innermost low temperature superconducting (LTS) coil of the 920 MHz NMR magnet installed in National Institute for Materials Science is to be replaced by an HTS insert coil. However, HTS coil generates a magnetic field drift after the magnet excitation caused by magnetization of HTS. Furthermore, current ripple of the DC power supply for the LTS/HTS magnet causes a magnetic field fluctuation. These problems must be solved for high resolution solution NMR measurements such as protein research, as they require a magnetic field stability of 10^{-10} . In this paper, we firstly describe a LTS/HTS 500 MHz NMR magnet developed as a first step towards 1.03 GHz NMR, and secondly we will show results on; (1) magnetic field drift caused by magnetization of the HTS and magnetic field fluctuation caused by current ripple; (2) field stabilization by internal deuterium lock; (3) basic NMR test results; and (4) 2D- and 3D- NMR measurements on protein solutions.

1. 緒言

我々は高温超伝導 (HTS) コイルを用いた超1GHz (1.03 GHz) のNMRスペクトロメータの開発を進めている[1]。HTSは臨界磁場が30T以上あり、超1GHz (>23.5T) のNMR磁石を実現できる唯一の超伝導線材である。超1GHz磁石では、高磁場コイルにHTS、低磁場コイルにLTSを用いる。HTSコイルには微小な残留抵抗があるため永久電流モードで運転した場合、NMR磁石として必要な磁場安定度 (10^{-8} /h) を実現できない。その

超1GHz NMR, 磁場変動, タンパク質

○やなぎさわよしのり, なかごめひでき, ほそのまさみ, はまだまもる, よしかわまさとし, おおつかあきひろ, きよしつかさ, てんめいこうのすけ, わたなべけんた, やまざきとしお, たかはしまさと, まえだひであき

ため電源通電モードで運転する必要があるが、電源電流リップルにより磁石磁場が変動してしまうので、これを安定化しなければ高分解能NMR計測は不可能である。さらにHTS線材は強い磁化を持ち、励磁後にこれが緩和するのでHTS磁石磁場の値が一方向にドリフトしてしまう。これが大きいと、 ^2H 内部ロックが動作せず、磁場安定化ができなくなる可能性がある[2]。これまで、重水素内部ロックの応答性評価と制御の最適化、電源通電モードにおけるLTS NMR磁石の磁場変動安定化手法の開発を行い、通電モードでも溶液NMR計測に必要な安定磁場が実現できることを明らかにしてきた[3]。今回は LTS/HTS 1.03 GHz NMR開発の第1ステップとしてLTSとHTSを組み合わせた 500 MHz NMRスペクトロメータを開発し、LTS NMR磁石と同等の磁場安定度を実現し、タンパク質の多次元NMR計測を実証したので、報告する。

2. 実験方法

強い電磁力に対抗して銅合金シートで補強したBi-2223 高温超伝導テープ線材(4.55mm×0.36mm)をポリマーテープでラップし、内層コイルを製作した。コイルの製作法としては、ダブルパンケーキ方式(テープレコーダのテープを巻く様な巻き方、それを積み上げる)とソレノイド巻き方式(糸巻きを巻く様な巻き方)がある。超伝導線のテープ形状を考慮すれば、パンケーキ方式での製作が容易であるが、磁場の均一度の観点からはソレノイド方式が良い。ここでは、数種類のコイルの試作を経て、ソレノイドコイルの製作に成功した。HTSコイルは内径81.2mm、外径121mm、高さ375mmである。このHTSコイルを既存のLTS磁石の内層LTSコイルと置き換えることでHTS/LTS NMR磁石を製作した。磁石は500 MHz NMR装置として運転した。既に基礎研究により、 ^2H 内部ロックは $\pm 1.5\text{ppm}$ までの振幅の磁場揺らぎを 10^{-10} まで安定化できることが明らかになっている[3]。この条件を満たす直流電源として1ppm以下の電流安定度を持つ高安定化直流電源(Danfysik社)を開発した。NMR磁石を通電モードで運転すると、そのままでは電流リードからの熱侵入が大きく冷媒の液体ヘリウムが急速に蒸発してしまう。そのため、本磁石では、ジュール熱の発生と室温から低温部への熱伝導を低く抑制するために、電流リードの一部に高温超伝導のバルク体を用いた。更に、4ケルビン極低温冷凍機を液体ヘリウム槽の上部に設置し、蒸発したヘリウムガスを液体ヘリウムに再凝縮するように工夫した[4]。これらによりヘリウムの蒸発が抑制され、長期間の連続運転を行うことができた。冷凍機としては2種類使用し、各々について2ヶ月間運転し比較した。

以上の磁石を励磁し、理化学研究所において、通電下でのNMRによる評価試験を行った。計測・評価試験の項目は次の通りである。

- (1) 励磁後の磁場ドリフト
- (2) 重水素内部ロックによる磁場変動の安定化実証
- (3) 線形計測や感度計測などの基礎特性
- (4) タンパク質の多次元NMR計測による総合的な性能検証

3. 結果と考察

(1) **磁場ドリフトと磁場変動**: Figure 1 に第1回目の励磁直後の磁場変動を示す。磁場の計測には市販のNMRメータ(Metrolab Instruments社)を用いた。励磁直後に電流が一定になった後にも、磁場の値だけが大きく上昇($1.9 \times 10^{-5}/\text{h}$)する。上昇率は徐々に低下し、15時間後には $6.7 \times 10^{-7}/\text{h}$ になる。一方、図に破線で第2回目の通電の結果を示す。この通電では、電流を1%余分に流し(145A)、次に定格の144Aまで戻すいわゆるオーバーシュート(オーバーフィールド)通電[5]を行った。この場合、初

期の磁場ドリフトが抑制されている。これは、本手法により、HTSの磁化の緩和が抑制されるためである。本現象については、既にHTSコイルを用いた別の実験で確認している[5]。この様にLTS/HTSコイルの磁場ドリフトの抑制にはオーバーシュート通電が非常に有効であることが明らかになった。

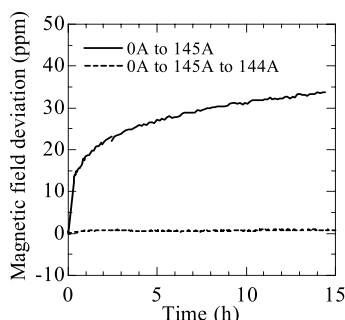


Fig. 1. Magnetic field drift after the magnet excitation. Solid line and dashed line show drift after the normal excitation and the overshooting excitation.

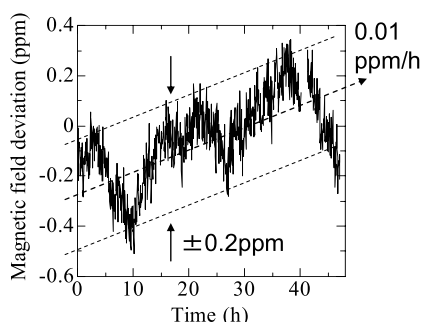


Fig. 2. Magnetic field fluctuation after the normal excitation at the 20th day.

Figure 2 に第1回目の通電による励磁から20日後の磁場変動を示す。磁場の値は重水素化アセトン溶媒中の1%クロロホルムのピーク周波数から求めた。驚くべきことに、この時点でもHTSの磁化緩和による磁場ドリフトが残っているが、その値は $10^{-8}/\text{h}$ (0.01ppm/h)にまで低下しており、永久電流モードのLTS磁石と同程度の変動率が得られている。この長期変動に加え $\pm 0.2\text{ppm}$ の振幅で1日周期での変動と、さらに小さな短期変動がみられる。前者は電源の温度変動により電流値が変動するためであり、後者は電源の短期的な電流リップル（1分程度の周期）に起因する磁場変動である。今回用いた ^2H 内部ロックでは磁場変動が $\pm 1.5\text{ppm}$ 以下であれば安定化できるため、この時点でロックを適用するのに十分安定な磁場が得られたと判断した。

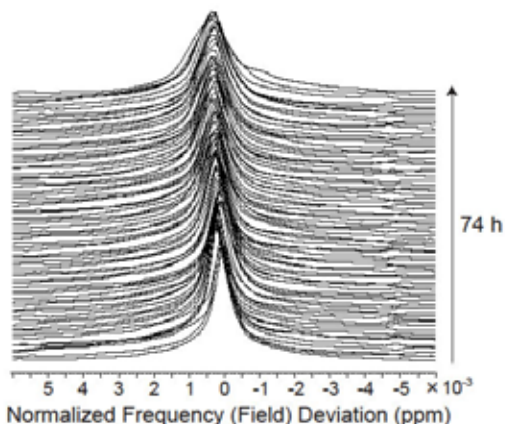


Fig. 3. Magnetic field stability with internal deuterium lock operation. Sample is 1% chloroform in acetone- d_6 .

(2) 内部ロックによる磁場安定化：Figure 3 に ^2H 内部ロックをかけた場合のNMRスペクトル周波数と線形の安定度を示す。サンプルは重水素化アセトン溶媒中の1%クロロホルムを用いて、74時間にわたって単発のスペクトルを計測した。計測中は磁場均一度の劣化を防ぐために z^1 、 z^2 に関してオートシムを動作させた。ピーク周波数の変位は 5×10^{-10} (0.5 ppb)であり、内部ロックにより永久電流モードのLTS磁石（ロック動作下）と同程度の安定度が得られることを実証できた。またスペクトルの半値幅は計測開始時0.67 Hz、計測終了時 1.31Hzであり、溶液NMR計測に必要な磁場安定度と磁場均一度が得られている。

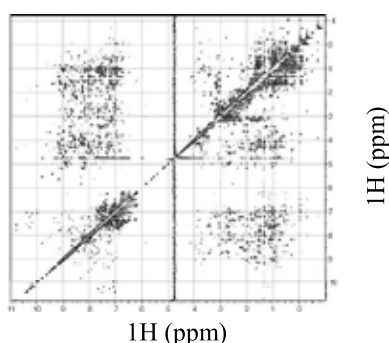


Fig. 4. NOESY using WATERGATE. Sample is 2mM lysozyme in 90% H₂O / 10% D₂O

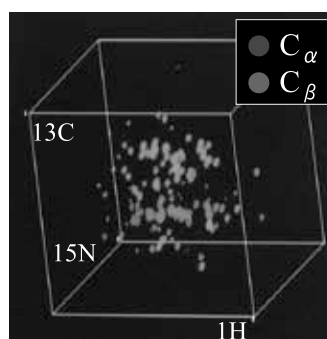


Fig. 5. HNCACB. Sample is double labeled 2mM chlorella ubiquitin in 90% H₂O / 10% D₂O

(3) 多次元NMR計測：以上の結果より、通電モードのLTS/HTS NMRにおいて多次元NMR計測を行うのに必要な基礎的要素を確立できた。そこで最後にリゾチームの2D-NOESY、標識クロレラユビキチンの3D-HNCACBの計測を行った(第2回目の励磁試験)。NOESYの結果をFig. 4に、HNCACBの結果をFig. 5 示す。磁場が不安定な場合に生じるであろう t_1 ノイズはなく、磁場変動は十分安定化できている。線形がよく水信号も十分抑制されている。以上の結果、LTS/HTS磁石を用いても、タンパク質の構造解析に用いる多次元NMR計測が十分可能である事を実証できた。

4. まとめ

世界ではじめて通電モードの高分解能LTS/HTS 500 MHz NMRを開発した。これを用いて、タンパク質の構造解析に用いる多次元NMR計測の可能性を実証した。以上により1.03 GHz NMR開発へむけた大きな突破口が開かれた。今後は、この技術に基づき、1.03 GHz NMRスペクトロメータの開発・評価を行う。本装置は、来年度には完成し、NMR計測を開始する予定である。

本開発は(独)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] T. Kiyoshi, A. Otsuka, S. Choi, S. Matsumoto, K. Zaitzu, T. Hase, M. Hamada, M. Hosono, M. Takahashi, T. Yamazaki, and H. Maeda, *IEEE Trans. Appl. Supercond.* **18** (2008) 860.
- [2] Y. Koyama, T. Takao, Y. Yanagisawa, H. Nakagome, M. Hamada, T. Kiyoshi, M. Takahashi, and H. Maeda, *Physica C* **469** (2009) 694.
- [3] Y. Yanagisawa, H. Nakagome, M. Hosono, M. Hamada, T. Kiyoshi, F. Hobo, M. Takahashi, T. Yamazaki, and H. Maeda, *J. Mag. Res.* **192** (2008) 329.
- [4] A. Otsuka, T. Kiyoshi, S. Matsumoto, K. Kominato, and M. Takeda, *IEEE Trans. Appl. Supercond.* **18** (2008) 852.
- [5] Y. Yanagisawa, H. Nakagome, Y. Koyama, R. Hu, T. Takao, M. Hamada, T. Kiyoshi, M. Takahashi, H. Maeda, *Physica C*, Article in press.

MR Iによる地盤液状化モデル系におけるレイリー・テイラー不安定性の可視化

○小林恭平¹, 石川堯洋¹, 巨瀬勝美¹, 半田晋也², 納口恭明³

¹筑波大・数理物質科学研究科

²日本学術振興会特別研究員

³独立行政法人 防災科学技術研究所

Visualization of the Rayleigh-Taylor instability in a soil liquefaction model system using magnetic resonance imaging

○Kyohei Kobayashi¹, Takashi Ishikawa¹, Kose Katsumi¹, Shinya Handa², Yasuaki Nohguchi³

¹Institute of Applied Physics, Tsukuba University, Ibaraki, Japan.

²Japan Society for the Promotion of Science, Tokyo, Japan.

³National Research Institute for Earth Science and Disaster Prevention, Ibaraki, Japan.

In 2001, a soil liquefaction model system constructed in a PET (polyethylene terephthalate) bottle was invented for scientific education and promotion of disaster prevention. This model, consisting of water and two kinds of sands with different grain sizes, had a layered structure resulting from mixing and sedimentation. When the bottle is mechanically shocked from outside like an earthquake, sand boiling induced by liquefaction is observed. In 2002, Nohguchi proposed a hypothesis that this sand boiling is caused by the Rayleigh-Taylor instability of the water film produced between the two sand layers and the liquefied intermediate sand layer. In this work we applied MRI to the liquefaction model system to verify the hypothesis proposed by Nohguchi.

1. はじめに

液状化現象とは地下水位の高い地盤に地盤などにより外部から力が加えられた時に、その地盤があたかも液体のような振る舞いになる現象である。液状化現象は地中から水を含んだ土砂が噴出する噴砂と呼ばれる現象も引き起こすが、そのメカニズムの詳細は分かっていない。2001年、科学教育や災害防止を目的としてペットボトルを用いた液状化現象のモデルシステムが開発された[1]。このモデルシステムは水と径の異なる2種類のガラスビーズから作られ、十分に振り混ぜた後、平らな面に静かに置き、外部から振動を与えることで液状化現象や噴砂現象の様子を再現できる系となっている。また、この系における噴砂現象は2002年、納口により、レイリー・テイラー不安定性によるものではないかと提案された[2]。そこで昨年度からこの系における水の挙動をMRIで可視化し、液状化のメカニズムを解明することを目的としてMR撮像を行ってきた。これまでの研究では液状化現象の過程で起きるレイリー・テイラー不安定性および、噴砂現象を可視化し、納口によって提案されていた仮説(Fig.1)の正当性を示唆する結果を得た[3, 4]。

液状化現象, レイリー・テイラー不安定性

○ こばやしきょうへい, いしかわたかひろ, こせかつみ, はんだしんや, のうぐちやすあき

ところが石川らの発表における撮像条件では、液状化の現象を完全に理解し、種々の解析をするための時間分解能および空間分解能が十分に足りていないと言えなかった。そこで本研究では、撮像手法の改善に加えてモデル系の粘性を高めることにより、現象の起こる時間スケールを拡大し、時間分解能や画像のSNRを向上させることを目的とした。

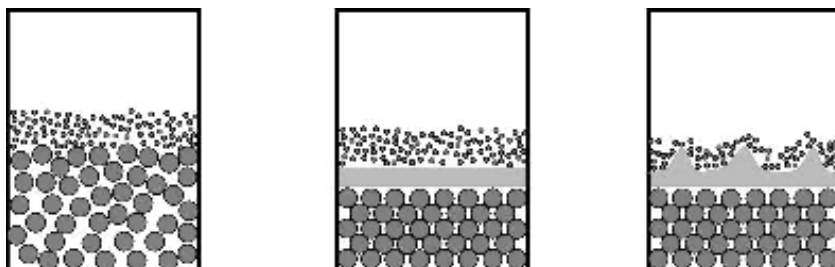


Fig.1 填砂現象のメカニズムの仮説

2. 試料と実験装置

試料は、500 mlペットボトルの中に粒径の異なる2種類のガラスビーズと50%エタノール水溶液を入れて作成した(Fig.2)。まず、径の大きなガラスビーズ(平均粒径0.2 mm)は187.0 gで一定とし、径の小さなガラスビーズ(平均粒径0.05 mm)は25 g、50 gの2種類を用い、それぞれに50%エタノール水溶液440 mlを入れ、さらに水溶液に含まれるプロトンの T_1 を短縮させるために塩化ガドリニウム水溶液を0.05 ml程度加えた。この試料はFig.3のように上から順にエタノール水溶液、0.05 mmガラスビーズ層、0.2 mmガラスビーズ層という層構造を形成する。このときガラスビーズが堆積した層にも溶液は存在している。堆積した0.05 mmガラスビーズ層の厚さは25 g 試料で5 mm、50 g 試料では10 mmとなっている。また、流体の粘性を高めて現象の時間変化をゆるやかにするために、それぞれの試料は、冷蔵庫で約5℃に冷却した後に実験に使用した。

Fig.4 に本研究で使用したMRI装置の全体像を示す。本システムは、永久磁石磁気回路（静磁場強度0.2 T、ギャップ250 mm、25 ppm均一領域150 mm球）、勾配磁場コイル、RFプローブ、コンパクトMRIコンソールからなる。磁石のギャップには、挿入型勾配磁場コイル(ギャップ160 mm)と500 mlペットボトル容器のサイズに適した開口系80 mm、高さ150 mmのRFプローブを挿入した。



Fig.2 液状化モデルシステム

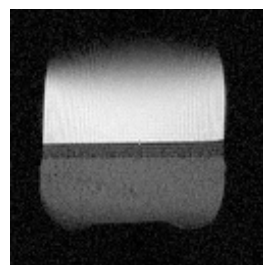


Fig.3 液状化モデル系の
スピンエコー法による鉛直断層
(TR / TE = 800ms / 10 ms)

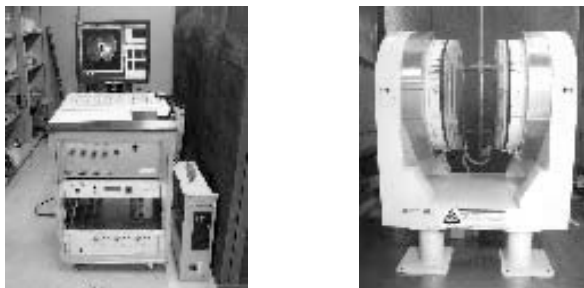


Fig.4 0.2 T永久磁石磁気回路とMRIコンソール

3. 実験方法

まず，MR画像の画素強度解析の基礎データとなる，試料の各層に対する成分を，それぞれ内径20 mm，高さ30 mmの樹脂製容器の中に入れ，2Dスピンエコー法でTRとTEを変化させて撮像し，エタノール水溶液の T_1 ， T_2 を算出した．なお，撮像はそれらのサンプルの温度を5℃に保持して行った．

試料の撮像は，それらを冷蔵庫から取り出して十分に振った後，気泡緩衝材に包み装置に挿入し，約5分経過させガラスビーズが完全に沈降してから行った．撮像シーケンスには，プロトン密度強調高速スピンエコー法(slice thickness = 7.5 mm, matrix size = 128×64, pixel size = 0.8×1.6 mm, TE = 10 ms, ETL = 32, NEX = 1)を用い，0.05 mmガラスビーズ25 gの試料はTR = 700ms，0.05 mmガラスビーズ50 gの試料はTR = 800 msでそれぞれ撮像した．なお，填砂現象を誘起するために，電磁ソレノイドを用いてペットボトルのふたをパルスシーケンスに同期して軽く打撃した．

4. 実験結果と考察

Fig.5，Fig.6に直径0.05 mmのガラスビーズをそれぞれ25 g，50 g 使用した試料の画像を示す．撮像結果は左端の画像が衝撃を与える前のモデル系の状態で，2枚目以降はFig.6が1.4秒間隔，Fig.7は1.6秒間隔の画像になっている．この図を見ると，両方の系において2枚目の画像では2種類のガラスビーズ層の間に溶液層が現れていることが分かる．そして3，4枚目の画像ではこの溶液層が波状の不安定性を形成し填砂現象が起きていることが分かる．これは上部に位置する径の小さなガラスビーズ層とその間にある溶液層の間にレイリー・テイラー不安定性と呼ばれる密度不安定性が起きたためと考えられる．

また，前回の報告における直径0.05 mmガラスビーズ50 gの試料で，水を用いた試料の撮像ではTR = 500 ms程度が填砂現象を見る上での下限だったが，エタノール水溶液を用いた試料を使用することにより，TR = 800 msでの撮像でも十分な時間分解能と画像の高い画像のSNRを達成することができた．

また直径0.05 mmガラスビーズ25 gの系でもレイリー・テイラー不安定性および填砂現象は確認でき，上層の厚さの違いによる填砂脈の波長の違いを確認できたため，水を用いた場合とエタノール水溶液を用いた場合とで，液状化現象における水の挙動は変わらないことを示すことができた．

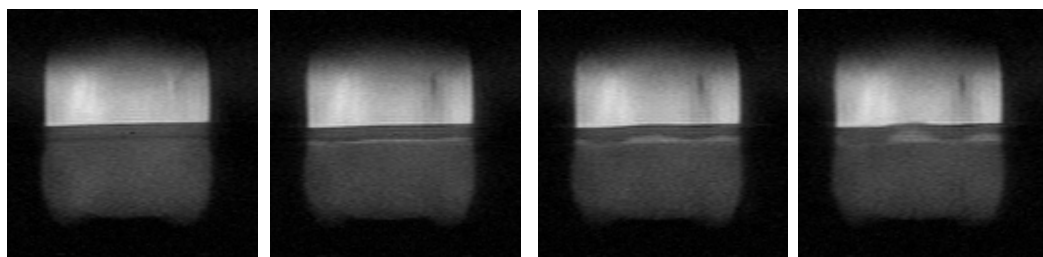


Fig.5 液状化モデル系の撮像結果(0.05mm径ビーズ25g, 溶液層の $T_1/T_2 = 180\text{ms}/145\text{ms}$)

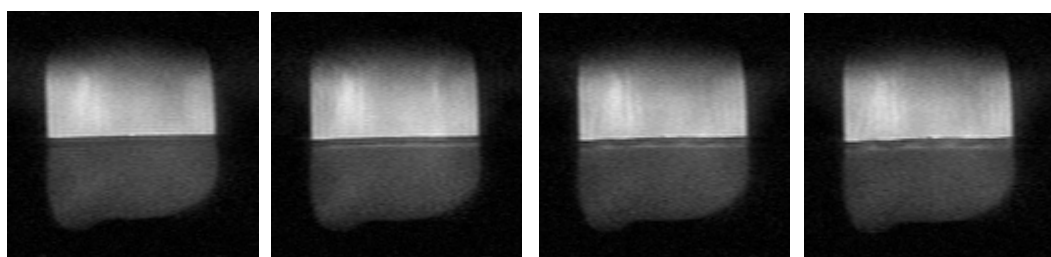


Fig.6 液状化モデル系の撮像結果(0.05mm径ビーズ50g, 溶液層の $T_1/T_2 = 200\text{ms}/120\text{ms}$)

6. むすび

50%エタノール水溶液を用いたエキジョッカーを用いて撮像を行うことにより、時間分解能や空間分解能を向上させることができ、再現性良く液状化現象の過程を撮像できるようになった。

今後は長方形の容器を用いた場合や、より大きな容器での液状化現象の過程を撮像していく予定である。

参考文献

- [1] 宮地良典, 兼子尚知: 地質ニュース 570(2002) 26.
- [2] Y.Nohguchi, Proceedings of the 37th Japan National Conference on Geotechnical Engineering 2003(2002)
- [3] 石川堯洋, 地盤液状化モデル系を用いたレイリー・テイラー不安定性のMRIによる可視化, NMR討論会講演要旨集, p346-347, 2008, つくば

三次元ファントムを用いたMRIにおける静磁場電流シミング手法の開発

○繁木良介¹, 安達聖¹, 半田晋也², 巨瀬勝美¹

¹筑波大学 数理物質科学研究科・電子物理工学専攻

²日本学術振興会特別研究員P D

Static magnetic field shimming for MRI using a geometrically specified 3D phantom

○Ryosuke Shigeki¹, Satoru Adachi¹, Shinya Handa², and Katsumi Kose¹

¹*Institute Applied Physics, University of Tsukuba, Tsukuba, Japan.*

²*Japan Society for the Promotion of Science, Tokyo, Japan.*

The “gradient shimming” technique, that utilizes phase images acquired with shim current offsets, is now routinely used to obtain homogeneous magnetic fields [1]. However, if nonlinearity of the magnetic field gradients generated by the gradient coils is not corrected, evaluation of the magnetic field homogeneity is not exact. To solve this problem, the magnetic field distribution should be measured in the correct (not distorted) spatial coordinates [2]. In this study, we measured the magnetic field distribution using a 3D geometrical phantom, developed a shimming method, and evaluated the magnetic field homogeneity of a permanent magnet.

1. はじめに

MRIにおける静磁場や勾配磁場の不均一性を評価するために、三次元ファントムを用いる手法が、いくつか報告されている[1]. この手法の特長は、これらの不均一性が、正確な三次元座標において決定され、画像歪みの補正などに適用されることにある。

ところで、静磁場の均一化には、一般に、シムコイルが使用されている。シムコイルに流す電流の最適化には、これまで、位相画像を活用した、いわゆるグラジエントシミングが広く使用されてきた[2]. この手法は、各シムコイルが発生する磁場分布を位相画像から求め、静磁場ができるだけ均一になるように各シムコイルの電流値を決定する方法であるが、この手法では、勾配磁場の非線形性が評価・補正されていない限り、その磁場分布は正確な三次元座標において決定されているとはいえない。このため、グラジエントシミングは、ユーザーが使う範囲においては、実用的で全く問題のない方法であるが、研究者や開発技術者が、シムコイルの定量的な評価に基づいてシミングの有効性を評価する場合には問題がある。

そこで、本研究では、上記の問題を解決するために、三次元ファントムによって計測した、正確な三次元座標に基づいてシムコイルの作る不均一磁場を求め、それを用いてシミングを行う方法を開発したので、その結果を報告する。

3D geometrical phantom, shimming method

○ しげきりょうすけ, あだちさとる, はんだしんや, こせかつみ

2. 実験

2.1 実験装置

本研究で使用した低温室用コンパクト MRI システムを Fig.1 に示す. 本システムは, 雪氷の構造解析を目的としており, 永久磁石磁気回路は -5°C から 10°C まで温度制御可能な低温室内に, コンソールは低温室外に隣接して設置している. 永久磁石の使用は, 静磁場強度 1T, ギャップ 60mm, 30mm 球内での均一度 15.3ppm である. 永久磁石の均一度は, 工場製作時の温度 (25°C) で調節されているため, 通常使用する -5°C では静磁場の均一度が悪化する. そのため本システムでは, 空間的な変化がそれぞれ $X^2, XY, Y^2, Z^0, Z^2, Z^3$ に比例した磁場を発生する 6 個のシムコイルを使用している. 各シムコイルの電流値の設定は, それぞれ独立して -1.000A から 1.000A まで可能である.



Fig.1 The compact MRI system

2.2 三次元ファントムを用いた静磁場電流シミング法

MRI では, 均一な静磁場 H_0 に線形な磁場勾配 G を加えて, 試料の NMR 信号の位置を, 磁場強度に対応した歳差運動周波数 $\omega(x)$ で識別している. x 方向に沿った静磁場強度を $H(x)$ とすれば, $\omega(x)$ は

$$\omega(x) = \gamma H(x) = \gamma H_0 + \gamma Gx$$

と表される. ここで γ は磁気回転比である.

よって, 撮像対象とする試料の画像上での位置と, 実際の位置との関係は γH_0 を除くと磁場強度に比例する. 静磁場 H_0 が均一な場合に両者は直線的に対応するが, 不均一な場合には画像上での画素の位置の直線的位置からの「ずれ」として現われる. 逆に, 局所的な画素のずれを評価することにより, 静磁場分布を計測できる[3].

本研究で使用した三次元ファントムとその設計図を Fig.2 に示す. 直径 23.9mm, 厚みが 3mm で縦横に幅 1mm, 深さ 1mm の格子状の溝を掘ったアクリル板を重ね, 直径 26.0mm, 高さ 61mm の円筒容器に装填し, 撮像の際にはベビーオイル (Johnson & Johnson 社製) を充填した. 三次元ファントムにおいて, 溝が交差する点 (画像において描出される多数の直方体の頂点) を基準点とし, 局所的な画素のずれの評価に用いた.

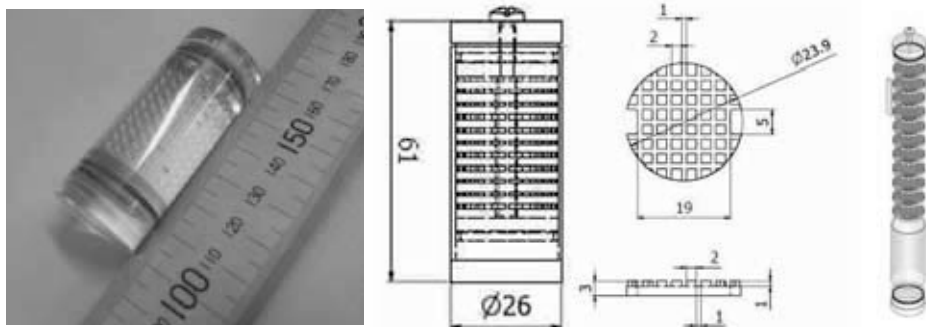


Fig.2 Photograph of the 3D phantom and its geometrical specification.

The unit of the numbers in the right figure is mm.

シムコイルが発生する磁場分布計測は、一つのシムコイルの電流値を 1.000A にして、他の電流値はゼロとしたときに得られるファントム画像と、シムコイルに流す電流値をすべてゼロとして撮像したファントム画像（基準画像）を比較し、基準点の画像上でのリード方向に沿った座標の差を計測することにより行った。基準点の画像上での座標の算出は自作 GUI ソフトウェアを使用した。撮像は 3D 強制回復スピンエコー法 (TR/TE = 100ms/10ms, NEX = 4, matrix size = 256³, voxel size = (100μm)³) を使用した。各シムコイルの磁場分布を以下に示す多項式で二乗近似し、シムコイルに流す電流値の最適化に用いた。

$$f(x, y, z) = \sum_{l,m,n=0}^N a_{lmn} \phi_{lmn}(x, y, z), \quad \phi_{lmn}(x, y, z) = x^l y^m z^n, \quad (l + m + n) \leq 3$$

上記の多項式において、係数が電流値に比例する。計算機上で各シムコイルに流す電流値の組み合わせを変更し、仮想的なシミングを行った。-1.000A から 1.000A の間で、基準画像における、基準点の原座標からのずれの平均二乗偏差（Root mean square: RMS）が最も小さくなるような電流値の組み合わせを数値的に探索した。

3. 結果と考察

Fig.3に、三次元ファントムの基準画像におけるサーフェスレンダリングと、スライス面の画像を示す。静磁場の不均一性により、リード方向（y方向）に沿って画素が移動し、画像歪みとして描出されている様子が分かる。

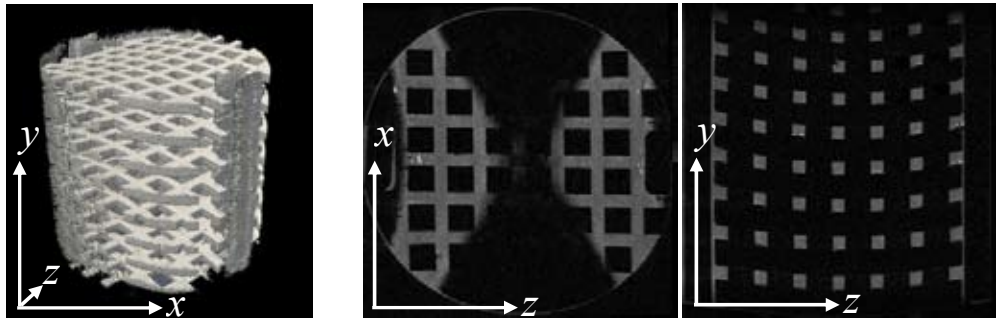


Fig.3 Reference image (no shim current)

各シムコイルが発生する磁場分布計測結果の一例として、Fig.4に、X²シムコイルのみに電流を加えて撮像したファントム画像のスライス面と、基準画像からの、基準点のリード方向に沿った移動量（座標の差）を求めたグラフを示す。解析した範囲は、17mm×17mm×19mmの直方体の領域である。グラフはX²シムコイルが発生する磁場分布を現す。

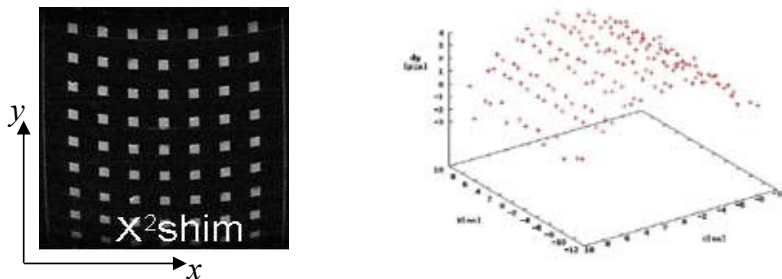


Fig.4 Result of the x² shim coil. Left: Phantom image acquired with full scale current for x² shim coil. Right: Magnetic field distribution produced by the x² shim coil.

Table 1 に、シムコイルに流す最適な電流値の組み合わせの数値探索結果を示す。この際、計算上では、解析領域内における基準点の実座標からのリード方向（ y 座標）の画素のずれの RMS は 1.38 ピクセルとなった。ここで、 z^3 シムコイルは軸を一致させ、半径を変えた二つの円形コイルをプローブの両側に配置しており、in と out は、その内側と外側のコイルを意味している。

Table 1. Result of the Current value acquired with the numerical search

Shim coil	X^2	XY	Y^2	Z^0	Z^2	Z^3 in	Z^3 out
Current (A)	-0.590	0.021	0.682	1.000	-1.000	-0.145	0.284

Fig.5 に各シムコイルに流す電流値を最適化して撮像したファントム画像と、基準画像のサーフェスレンダリングを示す。静磁場不均一性による画像歪みが大きく改善されている様子が分かる。Table 2 に二つの画像における、基準点の実座標からのリード方向に沿ったずれの最大値、最小値、RMS の値を示す。RMS の値が 4.2 ピクセルから 1.4 ピクセルに向上し、計算結果ともほぼ一致したため、本手法は有用であると考えられる。

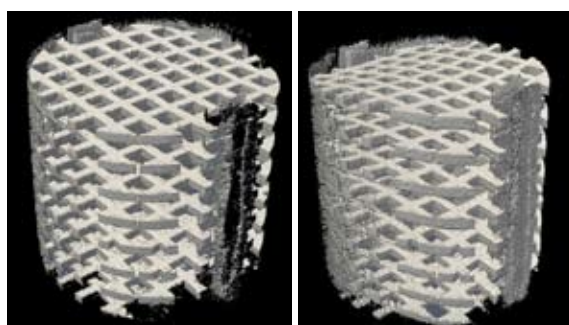


Fig.5 3D surface rendered images of the phantom acquired with and without optimum shim current

Table 2. Difference of the position of control points between two images

	Optimized image	Reference image
MAX(pixel)	4.2	10.9
MIN(pixel)	-4.9	-12.8
RMS(pixel)	1.4	4.2

4. 結語

三次元ファントムを用いて、低温室用コンパクト MRI システムにおける、シムコイルに流す電流値の最適化を行った。最適化した電流値を使用して撮像を行った結果、解析領域内のリード方向（ y 座標）画素のずれの RMS が 1.4 ピクセル程度となり、計算結果ともほぼ一致したため、本手法は有用であると結論した。

参考文献

- [1] D. Wang et al. "A nobel phantom and method for comprehensive 3-dimensional measurement and correction of geometric distortion in magnetic resonance imaging" Magn Reson Imag 2004; 22:529-42.
- [2] P. Van Zijl et al. "Optimized shimming for high resolution NMR using three dimensional Image based field mapping" J. Magn. Reson. 1994; A111: 203-207.
- [3] A. Kawanaka et al. "Estimation of static magnetic field and gradient fields from NMR image" J. Phys E: Sci. Instrum, 1986; 19:871-75.

○玉田大輝¹, 半田晋也², 巨瀬勝美³

1 筑波大学第三学群工学基礎学類, 2 日本学術振興会特別研究員 PD(国立環境研究所), 3 筑波大学大学院数理物質科学研究科

Development of an MRI Pulse Programmer Using an FPGA board

Daiki Tamada¹, Shinya Handa², Katsumi Kose³

¹College of Engineering Sciences, University of Tsukuba, ²JSPS Research fellow(National Institute for Environmental Studies), ³Institute of Applied Physics, University of Tsukuba

MRI require a complicated pulse programmer because three channel gradient waveforms and two channel RF waveforms must be controlled at high and amplitude resolution. Up to now, MRI pulse programmer using a DSP and a microprocessor are reported. However, their performance is limited by their architecture. In this study, we developed a more flexible MRI pulse programmer using an FPGA board.

1. はじめに

NMR スペクトロメータ及び MRI システムは化学分析や医療診断で広く使用されているが、近年それ以外の分野にも広く浸透しつつあり、装置も多様化している。よって多様な用途に適応した NMR/MRI システムの開発には容易に移植・改変が可能な Pulse Programmer が有効である。これまでに DSP、マイクロプロセッサ、FPGA などを用いた NMR 用、または MRI 用の Pulse Programmer が開発されている [1-3]。ところが、NMR 用の Pulse Programmer には多くの開発報告があるが、MRI 用のものは少ない。その理由として、MRI システムでは RF 波形のみでなく 3 チャンネルの勾配磁場を高精度に制御する必要があり、NMR 用に比べ複雑な機構になるためである。ところで、MRI 用のパルスプログラマとしては DSP やマイクロプロセッサを用いたものが報告されているが、それらも、ハードウェア上のフレキシビリティには限界がある。そこで、我々は FPGA を用いた高速かつフレキシブルな MRI 用 Pulse Programmer を開発した。

キーワード : FPGA, パルスプログラマー

○たまだだいき, はんだしんや, こせかつみ

2. パルスプログラマのハードウェア構成

FPGAの開発に当たって，XILINX社製のSpartan3A評価ボードを用いた．クロック周波数は50MHzで20nsの時間分解能を実現することができる．

この評価ボードには，12bitDAコンバータ (Linear Technology 社 製 LTC2624) が搭載されている．今回はこのDACを用いて波形を生成した．

また，PCからFPGAへのデータのダウンロードにはFTDI 社 製 USB モジュール FT245Rを用いた．

USB-FPGA間ではシリアル通信によってパルスのタイミング，イベント，グラジエントのamplitudeデータを連続して送信しイベントの数×48bit (6Byte) のデータビットとして送受信を行っている．Table. 1に48bitのデータのビット数の内訳を示す．

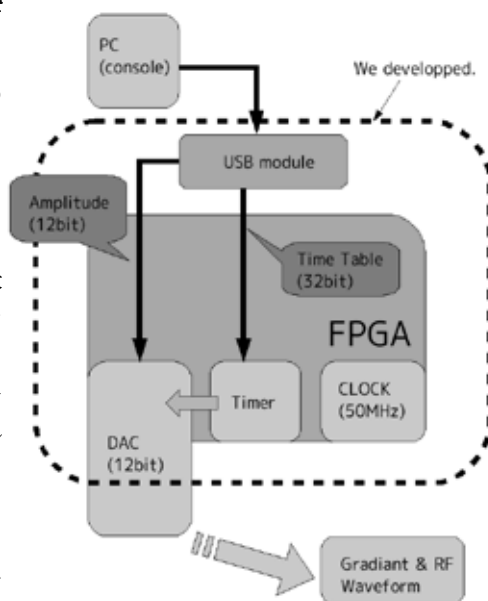


Fig.1 Architecture of PPG outline. Each data bits were sent out via USB.

Data Bits Description	Number of Bits
Timing Data Bits	32
Event ID Data Bits	4
Gradient Amplitude Data Bits	12

Table.1 Detail of the data bits for the pulse programmer. Timing Data Bits describe when each pulse send out. Event ID Data Bits show which event such as Gx,Gy,Gz,RF phase, RF trigger, AD trigger are selected. Gradient Amplitude Data Bits are amplitude for each pulse. This table can be edited in console program we developed.

○ソフトウェアの構成

FPGAの開発はverilogHDL言語を使用し，XILINX社の統合開発環境ISE上で行った．FPGA側のプログラムはタイミングモジュール，DACモジュール，クロック生成モジュール，シリアル受信モジュールで構成される．

PCから送信されたデータビットはシリアル受信モジュールで解析され，Timing

Data Bitsを読み出す．読み出された時に Timing Data Bits をタイミングモジュールに送信し，その時からモジュールのカウンターが 0 から 4294967295 までのカウントアップを開始する．この時，1 カウントは 20ns である．Timing Data Bits とカウンターの差が 0 になったときに DAC モジュールに Gradient Amplitude Data Bits, Event ID Data Bits が送信されてパルスが出力される．この時に次の命令の Timing Data Bits が読み出され，タイミングモジュールに送信される．これを繰り返すことによってシーケンスを発生させる．

PCからFPGAを制御するプログラム(Fig.2)のUSB制御部分はFTDI社のドライバを用いて開発した．また、Ubuntu9.04上でコンパイラにGCCを用いたプログラミング環境で開発を行った．このプログラムによってパルスのタイミングと，amplitudeデータ，出力ポートを10進数で入力することによって指定することができる．

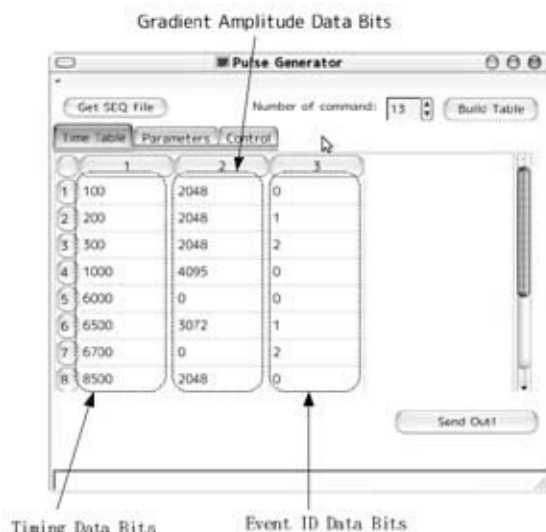


Fig.2 Pulse programmer control program

4. 実験結果

ホスト PC 上で繰り返し時間 0.6ms の FLASH シーケンスのテーブルを作成し，実際に Pulse Programmer を制御してパルスを出力した際の勾配磁場波形を Fig. 3 に示す．20ns の時間分解能でパルスを制御できることを確認した．DAC の立ち上がりの遅延時間は約 $5\mu s$ であった．

現在，DAC の出力レンジは 0~3.3V であるため，正負の勾配磁場を発生するためにはオフセットをかけて電圧を変換する必要がある．また，現在用いている DAC の分解能は 12bit であり，このままでは撮像に用いるにはやや不足するので，将来的により高い分解能の DAC を用いる予定である．

FPGA 側のプログラムを書き換えることによってさらに複雑なシーケンスも実現することが可能であり，多様な場合に対応できることを確認した．今後，我々は今回開発した Pulse Programmer を実際に MRI システムに接続して有用性を実験的に検証

する予定である.

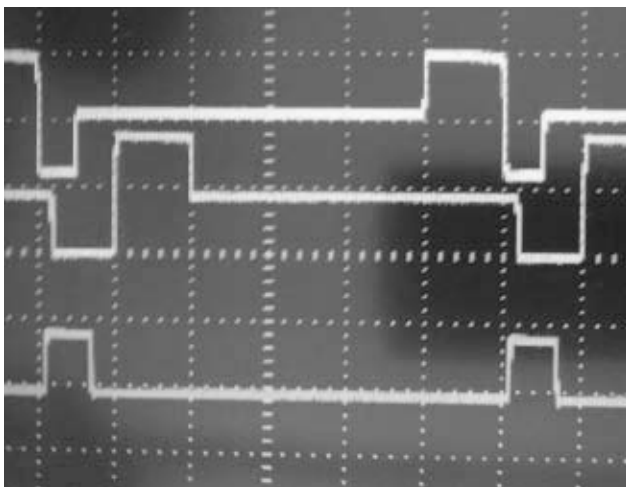


Fig.3 FLASH sequence gradient waveform. The horizontal axis is $100\mu\text{s}/\text{div}$. The vertical axis is $2.00\text{V}/\text{div}$. $\text{TR} = 600\mu\text{s}$.

-
1. K. Kose and T. Haishi, in *Spatially Resolved Magnetic Resonance*, edited by P. Blumler, B. Blumich, R. Botto, and E. Fukushima Wiley-VCH, New York, 1998, p. 703.
 2. S. Handa, T. Domalain and K.Kose, Single-chip pulse programmer for magnetic resonance imaging using a 32-bit microcontroller, *Rev. Sci. Instrum* 78, 084705 (2007).
 3. Kazuyuki Takeda, OPENCORE NMR: Open-source core modules for implementing an integrated FPGA-based NMR spectrometer, *J. Magn. Reson.* 192, 218-229 (2008)

Sensitivity enhancement of the Earth's magnetic field NMR using polarization method

○Hideo Sato-Akaba, Shota Watanabe, and Hideo Itozaki

Graduate School of Science Engineering, Osaka University, Toyonaka, Japan.

We have developed a low cost Earth's magnetic field NMR apparatus to investigate aqueous solutions. To enhance the signal intensity, a magnetic pre-polarization method was used. The coil constant of the solenoid coil for magnetic pre-polarization was 4.9 mT/A. The duration of the pre-polarization was dependant on the spin lattice relaxation times of the samples. Single shot proton FID signals from water (10-500 ml) were observed with a pre-polarization field of 49 mT and duration of 5 s. The estimated Earth's magnetic field inhomogeneity in our laboratory was approximately 170 nT over a cylinder of ϕ 70 x 140mm.

はじめに

地磁気NMRは、自然に存在する地磁気をNMR共鳴磁場としているため広範囲にわたり均質な磁場を得ることができる[1]。そのため比較的大きな試料空間を提供することが容易である。また、巨大で高価なマグネットを必要としないというメリットがあり安価に作成できる。しかしながら一方で、地磁気は ~ 0.04 mTと非常に微弱であることから水素原子核の磁化は微弱となりその検出が困難であるというデメリットがある。また共鳴周波数が ~ 1.5 kHzとなることからコイルによる検出感度は高磁場NMRにくらべ格段に低下する。それらを克服するため、地磁気NMRのような低磁場NMRでは数十mTほどの磁場をNMR信号受信前に印加しサンプルを磁化させるpre-polarization法を用いるのが一般的である。Pre-polarization法に使う空芯マグネットはNMR信号取得時には出力がゼロになっており、磁化読み取り磁場に使用しないので均質な磁場を必要としない。そのため均質な磁場を作るための補正用コイル等が不要となる。本研究では、地磁気NMR装置を作製しpre-polarization法の有効性、地磁気の磁場均質性について評価した。

システムの概要

地磁気NMR装置の主な構成は、RF送受信用ソレノイドコイル (635 mH, 280 Ω)、pre-polarization用ソレノイドコイル (54 mH, 1.78 Ω , 4.9 mT/A)、pre-polarization用コイル駆動制御回路、RF共振回路、小信号増幅回路 (~ 80 dB) からなり、それぞれ研究室で開発したものである。試料空間はおおよそ直径76 mm x 長さ140 mmとなっている。装置制御信号出力、FID信号取り込みには、AD/DAボード (NI DAQCard-6024E) を用いた。図1に全体の構成図を示す。制御ソフトはLabVIEWを用いて開発した。測定環境は、大阪大学豊中キャンパス研究室にて行っており特別な電磁遮蔽室は使っていない。

地磁気NMR, 偏極法, 装置開発

○あかばひでお, わたなべしょうた, いとざきひでお

地磁気NMR測定

より大きな磁化を生成させるため、pre-polarization法では地磁気と垂直な方向に磁場(強度:0~50 mT、継続時間:0.5~5 s)を印加しサンプルの磁化を行った。生成した磁化が減衰する前に送受信コイルを用いて90° RFパルスを送信する。FID信号の受信はRFパルス送信と同期して開始した。磁化強度が印加磁場に比例することから、FID信号強度も印加磁場に比例して増加することを確認した(図2)。信号強度は印加磁場に比例して大きくなるが、コイル電流に起因する発熱を避けるため今回作製した空冷コイルでは発生磁場強度の上限は約50mTとした。

水溶液の検出限界を評価するため、500 ml容器と100 ml容器に水10~500 mlを入れ水素原子核のFID信号を測定した。積算無しの測定において、SN=1とした場合の測定限界は0.5 mlであった。図3には水100mlからのFID信号の結果を示す。NMR信号は直接ADボードで取り込むため、信号の周期は地磁気でのラーモア周波数となっている。室温では水の T_2 は2.4 sであったが、FID信号の減衰から求めた T_2^* は0.10 sと短縮されていた。これは、磁場の不均質性による効果がFID信号の減衰に支配的であったためと考えられる。そこで、線幅 7.3Hzより磁場の不均質性を評価すると、研究室では試料領域(直径74x 長さ140 mm)において170 nT 程度であった。

最後に、今回非常に簡易な地磁気NMR装置を作製し、高感度化について実験を行った。Pre-polarization法(印加磁場:49 mT)を使うことにより水において測定限界0.5mlを達成することができ、地磁気を用いた水溶液のNMR研究に応用できることが示唆された。

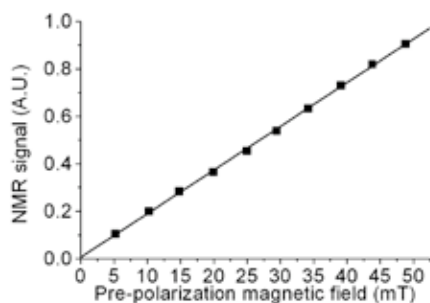


Fig. 2 Dependence of ^1H NMR signals on the pre-polarization magnetic field.

参考文献

[1] P.T. Callaghan, A. Coy, R. Dykstra, C. D. Eccles, M. E. Halse, M. W. Hunter, O.R. Mercier, and J. N. Robinson: Appl. Magn. Reson. **32**, 63-74 (2007)

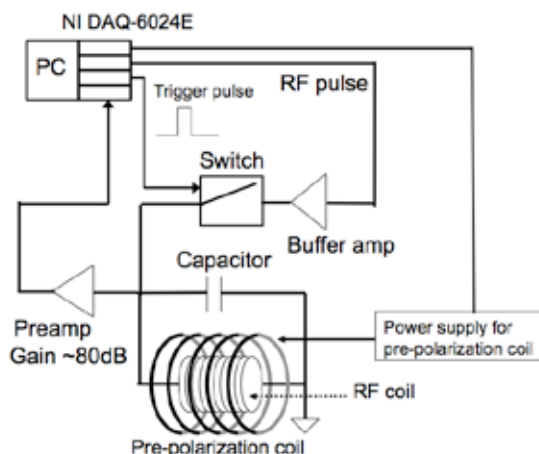


Fig. 1 Diagram of a homemade Earth's magnetic field NMR apparatus.

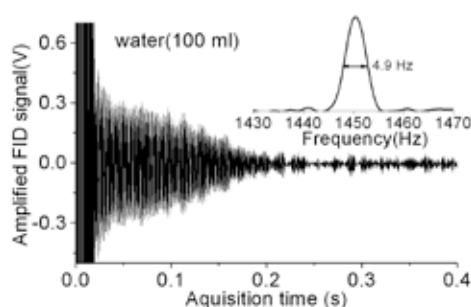


Fig. 3 Single shot FID signal from 100 ml water without magnetic field shimming.

○稲垣大介、赤羽英夫、糸崎秀夫
 大阪大学大学院基礎工学研究科

NQR Properties of nitrogen in amino group contained in salt of hydrochloride

○Daisuke Inagaki, Hideo Akaba, Hideo Itozaki
Graduate School of Science Engineering, Osaka University

The ^{14}N NQR properties of diethylamine hydrochloride, which has a chemical structure in the vicinity of nitrogen similar to that of methamphetamine, were investigated. The ^{14}N NQR frequency was found to be 1.006MHz at room temperature, although quantum chemical simulations using BHandHLYP method predicted a NQR frequency of 1.58 MHz. Relaxation times T_1 and T_2 of the nitrogen were 1.1s and 1.8 ms, respectively.

1. はじめに

核四極共鳴 (NQR) は共鳴吸収現象の一種であり、NMRのように外部磁場によるスピン整列を必要とせず、その共鳴周波数は分子中におけるスピン量子数 $I=1$ 以上の原子周辺の電場勾配に依存する。不正薬物の多くに含まれる ^{14}N 原子は $I=1$ でありNQR現象を起こすため、不正薬物の同定等への応用が期待される。

本研究は、不正薬物であるメタンフェタミン塩酸塩と ^{14}N 原子周辺の構造が類似するジエチルアミン塩酸塩 (Fig. 1) を用いて、ジエチルアミン塩酸塩のNQR共鳴周波数が77Kで1.0395MHzというEdmondsらの報告⁽¹⁾をもとに計測を行い、NQR共鳴をテストした。また、計測パラメータの最適化を図るために縦緩和時間(T_1)と横緩和時間(T_2^*)の評価も併せて行った。

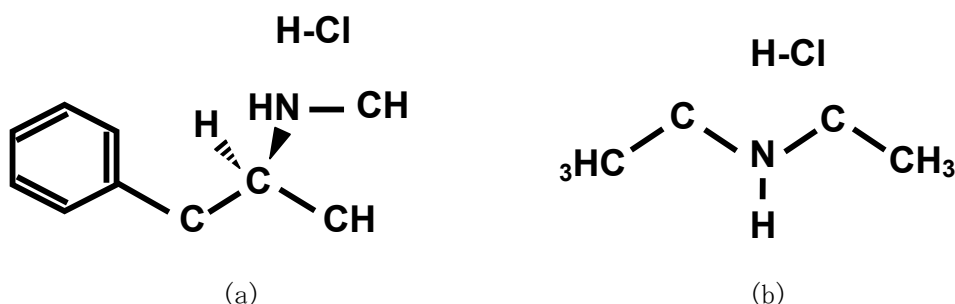


Fig.1 Structures of methamphetamine hydrochloride (a) and diethylamine hydrochloride (b)

NQR、量子化学計算、塩酸塩

○いながきだいすけ、あかばひでお、いとざきひでお

2. NQR測定

常温下でFIDシーケンスによるジエチルアミン塩酸塩12gの計測を行った。計測を行うにあたり、NQRコンソールにTecmag社製のApolloを使用し、NQR信号の送受信に用いるコイルは直径4.0cm、高さ3.0cmの筒に銅線を43回巻きつけたものを使用した。また、金属シールド内にコイルを設置することで、環境ノイズの低減に努めた。FIDシーケンスによる計測では、中心周波数1MHzの励起パルスを用い、パルス幅を30 μ s、オフセットを450 μ s、休止時間を1.2sに設定した。また、S/N比を向上させるために2000回の積算を行った。

計測の結果、1.006MHzで信号を確認することができた(Fig. 2)。計測された周波数がEdmondsらの報告1.0395MHzと一致しなかったのは、計測環境によって分子中の電場勾配が微小に異なるためと考えられる。

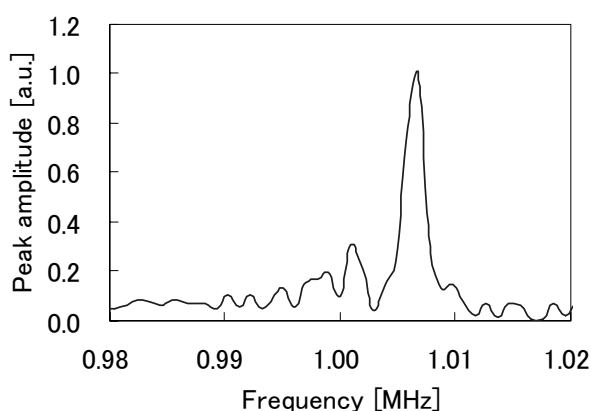


Fig. 2 ^{14}N NQR spectrum of diethylamine hydrochloride

T_1 と T_2^* について、反転回復法($(\pi)_0 - t - (\pi/2)_0 -$)およびFID信号の減衰により評価を行ったところ、 $T_1=1.1\text{ s}$ (Fig. 3)および $T_2^*=1.8\text{ ms}$ (Fig. 4)を得た。

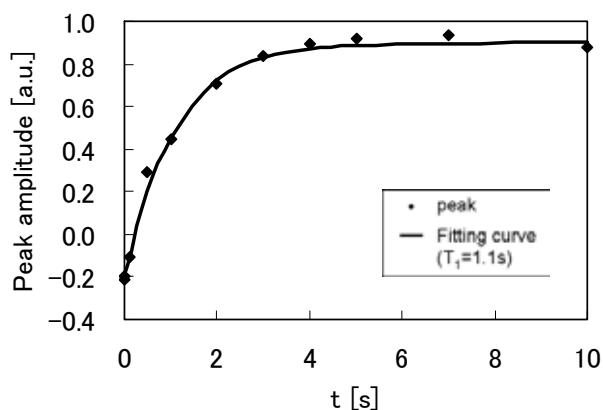


Fig. 3 Inversion recovery curve of ^{14}N NQR signal from diethylamine hydrochloride

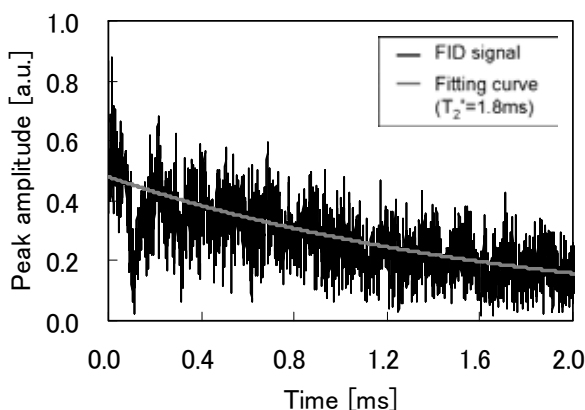


Fig.4 FID signal of diethylamine
A line shows fitting result for T_2^* .

T_1 は計測時間に影響し、 T_2^* は信号の減衰しにくさに影響する。今回の計測によって、ジエチルアミン塩酸塩は T_2^* が長いことから、励起パルスの照射後にNQR信号が減衰しにくく、信号を取得するのは容易であると考えられる。しかし、 T_1 が長いことから、励起された磁化ベクトルが緩和するのに時間がかかり、FIDシーケンスでは計測が非効率的である。よって、ジエチルアミン塩酸塩の計測では、1度の励起で複数回の積算を可能とするシーケンスが計測の効率化を図る上で有効であると考えられる。そこで、本研究ではSpin Lock Spin Echo (SLSE: $(\pi/2)_0 - (\tau - (\pi/2)_{90} - \tau)_n$)シーケンスを用いて再度計測を行い、計測の効率化に努めた。SLSEは位相が 90° 違う2種類のパルスを用いて磁化ベクトルをロックし、1度の励起で複数個のエコー信号を取得することができるシーケンスである。SLSEシーケンスによる計測において、2種類のパルスはどちらも中心周波数1MHz、パルス幅 $30\mu\text{s}$ とした。オフセットは $70\mu\text{s}$ 、休止時間は1.2sに設定し、パルス間隔 τ は $550\mu\text{s}$ とした。1回の励起で信号取得を16回行い、励起は2000回としたので、積算回数は32000回となった。これにより、計測時間がFID使用時と同じになった。計測の結果をFig. 5に示す。なお、Fig. 5の縦軸はFig. 2と同様のレンジとなるように規格化した。

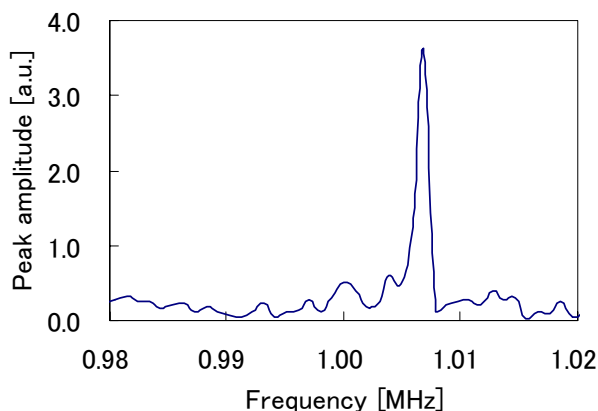


Fig. 5 ^{14}N NQR spectrum of diethylamine hydrochloride
measured with SLSE sequence

Fig. 2とFig. 5を比較すると、同じ計測時間内でSLSEシーケンスによって得られたNQR信号強度は、FIDシーケンスによって得られたNQR信号強度の約4倍となっている。これより、本研究のSLSEシーケンスを用いた計測はFIDシーケンスを用いた計測に比べて信号取得の効率がよいと考えられる。

3. シミュレーション

量子化学計算によるNQR共鳴周波数のシミュレーションでは、Gaussian03によって分子構造の最適化を行った後、電場勾配テンソルを計算し、NQR共鳴周波数を予測する。本研究では ^{14}N 原子核のNQRを用いるため、 ^{14}N 分子周辺の分子構造が類似していれば、シミュレーションによる予測誤差は同程度になると考えられる。本研究では、シミュレーションの計算方法に摂動法と密度汎関数法を用いてジエチルアミン塩酸塩NQR周波数を計算し、実測値との計算誤差を検討した。シミュレーション方法によってジエチルアミン塩酸塩の計算誤差に大きな差は見られず、最も精度良い結果でもBHandHLYPによる予測誤差52%と、一様に大きな誤差が出てしまった。これは、分子の集合体をサンプルとして計測を行っているのに対し、シミュレーションでは分子1個に焦点を当てているため、結晶内での分子構造が精度よく定められていないことが原因であると考えられる。

4. 結論

本研究を通して、ジエチルアミン塩酸塩のNQR信号を1.006MHzで確認することができた。また、ジエチルアミン塩酸塩の緩和時間についても、 $T_1=1.1\text{s}$ および $T_2^*=1.8\text{ms}$ であることを評価することができた。

Reference

- (1) D. T. EDMONDS, M. J. HUNT, AND A. L. MACKAY : “ Pure Quadrupole Resonance of ^{14}N in a Tetrahedral Environment ” , JOURNAL OF MAGNETIC RESONANCE 9, p. 66-74 (1973)

タイワンカブトムシ (*Oryctes rhinoceros*) 由来 オリクチンの溶液NMR構造解析・機能解析

○堀田彰一郎¹, 石橋純², 永田宏次¹, 宮川拓也¹, 山川稔^{2,3}, 田之倉優¹

¹東大・院・農生科

²生物研・生体防御

³筑波大・院・生命環境科学

NMR structure analysis of ORYCIN from the coconut rhinoceros beetle, *Oryctes rhinoceros*, led to its functional characterization as a novel serine protease inhibitor

○ Shoichiro Horita¹, Jun Ishibashi², Koji Nagata¹, Takuya Miyakawa¹, Minoru Yamakawa^{2,3} and Masaru Tanokura¹

¹Department of Applied Biological Chemistry, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, Japan.

²National Institute of Agrobiological Sciences, Tsukuba, Japan.

³Graduate School of Life and Environmental Biology, University of Tsukuba, Japan.

Oryctin was isolated from the hemolymph of the coconut rhinoceros beetle, *Oryctes rhinoceros*, in a process of searching for antibacterial peptides. However, the function of oryctin remains unknown. We have determined the three-dimensional structure of oryctin and revealed that it adopts a fold similar to Kazal-type serine protease inhibitors. The functional assays have shown that oryctin indeed inhibits chymotrypsin- α and elastase. The binding regions of oryctin to chymotrypsin- α and elastase have been identified based on the chemical shift perturbation.

序論

タイワンカブトムシ (*Oryctes rhinoceros*) の幼虫は、家畜糞尿などの堆肥中で成長し、細菌・ウイルス・カビ等の微生物の感染を受けやすい環境下に生息するため、各種微生物に対する生体防御機構が高度に発達している。オリクチンは 66 個のアミノ酸残基と 3 本のジスルフィド結合からなるタンパク質で、このタイワンカブトムシ幼虫の血リンパから精製・単離された。オリクチンに似たアミノ酸配列を有するタンパク質は他に見つかっていないため、新規の立体構造と抗菌作用機構を有すると期待された。しかし、大腸菌を宿主として得られた組換えオリクチンは天然物と同一のアミノ酸配列および同一のジスルフィド結合を有するにもかかわらずまったく抗菌活性を示さなかったため、オリクチンの機能に関する知見は再検討を余儀なくされた。オリクチンの機能解析として RNA 干渉によるオリクチン遺伝子のノックダウンが試みられているが、現在までにオリクチンの生体内機能を示唆するデータは得られていない。また、類似配列を有するタンパク質がないために、アミノ酸配列の相同性に基

Kazal-type serine protease inhibitor, ovomucoid, serine protease inhibitor

ほりたしょういちろう、いしばしじゅん、ながたこうじ、みやかわたくや、やまかわみのる、たのくらまさる

く機能推定も困難である。このような状況の下、われわれは、オリクチン分子の立体構造を決定し、立体構造の特徴や他のタンパク質との類似性から、オリクチンの機能を推定するという構造生物学的アプローチを選択した。本研究により、オリクチンがセリンプロテアーゼ阻害剤であるオボムコイドインヒビターと似た立体構造を有し、実際にセリンプロテアーゼ阻害活性を有することを明らかにした。

結果と考察

＜NMR 溶液構造解析＞

改変 pET-28a(+)プラスミドにオリクチン cDNA を組み込み N 末端側に TEV プロテアーゼで切除可能な 6×His タグを付加したオリクチンの発現ベクターを構築し、大腸菌 BL21 Star(DE3)に形質転換した。多核多次元 NMR 測定のため、 ^{13}C , ^{15}N 標識用最少培地でこの大腸菌を培養し、1 mM IPTG、37°C、6 時間発現誘導を行った。菌体破碎後、Ni-NTA Sepharose 精製、TEV プロテアーゼ消化、Mono S 精製し、濃縮・緩衝液交換により、50 mM NaPi (pH 6.8), 100 mM NaCl, 0.02% NaN_3 を含む 90% H_2O , 10% D_2O に溶解した 2 mM ^{13}C , ^{15}N 標識オリクチン試料を得た。この試料を用いて多核 2 次元 NMR および種々の 3 次元 NMR を測定し、観測可能なほぼすべての ^1H , ^{13}C , ^{15}N 原子の NMR シグナルを帰属した。NMR データに基づき得られた水素原子間距離制限 573 個、主鎖二面角制限 79 個、水素結合距離制限 3 個を構造情報として CYANA プログラムに入力し、オリクチンの立体構造を算出した。最終構造 10 個のアンサンブルにおいて、主鎖原子と水素を除く全原子の RMSD はそれぞれ 0.78 Å と 1.44 Å であった。

＜立体構造類似タンパク質の探索＞

Dali サーバー (http://ekhidna.biocenter.helsinki.fi/dali_server/) を用いた立体構造類似タンパク質の探索の結果、セリンプロテアーゼの一種である七面鳥由来オボムコイドインヒビター OMTKY3 との立体構造類似性 (Z 値は 2.4) が検出された。

＜プロテアーゼ阻害活性測定＞

オリクチンが OMTKY3 と同様にプロテアーゼ阻害活性を有するかどうか、セリンプロテアーゼ、システインプロテアーゼ、メタロプロテアーゼの 3 種に対する阻害活性測定を行ったところ、オリクチンはセリンプロテアーゼに対してのみ阻害活性を有することを見出した。セリンプロテアーゼの種類により阻害の程度は異なり、オリクチンは α -キモトリプシンを強く阻害 ($K_i = 6.9 \pm 0.7 \times 10^{-9} \text{ M}$)、エラスターゼを中程度に阻害する ($K_i = 2.7 \pm 0.2 \times 10^{-7} \text{ M}$) が、トリプシンに対しては全く阻害しないことを明らかにした。

＜化学シフト摂動法による相互作用部位の解析＞

オリクチン分子のプロテアーゼ認識に関わっている領域を調べるため、オリクチンのみとオリクチン+ α -キモトリプシンまたはエラスターゼとで化学シフトを比較し、化学シフトの変化量から相互作用部位を解析した。結果、オリクチンは両方のセリンプロテアーゼを共通する 3 つの領域で認識すると示唆された。

＜総括＞

本研究により、機能未知であったオリクチンの立体構造を決定し、オリクチンが新規セリンプロテアーゼ阻害剤であることを見出した。今後 RNAi 等の実験を通し、PPO 活性化系、血液凝固系に関して関連を調べる。

アサイメントフリーなNMR相互作用解析による蛋白質複合体構造の迅速決定

○小玉優哉^{1, 2, 3}, Michael L. Reese⁴, 榛葉信久², Volker Dötsch⁵, 鈴木榮一郎², 嶋田一夫^{3, 6}, 高橋栄夫³

¹バイオ産業情報化コンソーシアム, ²味の素(株), ³産業技術総合研究所・バイオメディシナル情報研究センター, ⁴Stanford

University, ⁵University of Frankfurt, ⁶東大・院薬系

Rapid determination of protein complex structure by assignment-free NMR approach

○Yuya Kodama^{1, 2, 3}, Michael L. Reese⁴, Nobuhisa Shimba², Volker Dötsch⁵, Ei-ichiro Suzuki², Ichio Shimada^{3, 6}, and Hideo Takahashi³

¹Japan Biological Informatics Consortium (JBIC), ²Ajinomoto Co., Inc., ³Biomedical Information Research Center (BIRC), National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), ⁴Stanford University, ⁵University of Frankfurt, ⁶The University of Tokyo

To obtain the information about protein-protein interfaces by NMR, the resonance assignments are generally essential, but are a time-consuming task, especially for a large protein. In this study, we present an effective and rapid approach for identification of the protein-protein interface, where we record only a few NMR spectra of a protein labeled with a unique combination of a single ¹⁵N-labeled amino acid and several site-specifically ¹³C-labeled amino acids to obtain the information about the amino acid types and number of the contact residues and then we search the molecular surface to satisfy the obtained information by computation. When the candidates are very limited, we can identify the contact residues. We also demonstrate that the information obtained by our assignment-free NMR approach is useful for rapid protein-protein docking study.

蛋白質間相互作用は、生体の代謝やシグナル伝達をはじめとした種々の現象に関与していることから、相互作用界面に関する情報を迅速に得ることは、創薬研究などを効率的に展開していく上で極めて重要となる。しかしながら、それらの情報を得るためには、例えばX線結晶構造解析においては結晶化の作業、NMR解析においてはNMRシグナルを帰属するための測定、解析作業が必要となり、多大な時間と労力を要することになる。そこで、我々は、対象とする個々の蛋白質の立体構造が既知であれば、NMRシグナルを帰属することなく、複合体の相互作用部位を迅速に同定できる手法の開発に取り組んだ。¹H-¹³C相関スペクトル上におけるシグナル分布は、各アミノ酸残基の原子タイプ[¹³C_x (x=α, β, γ,.....)]ごとに局在している。したがって、シグナルが出現する範囲が重ならないような安定同位体標識アミノ酸を複数選び、それらで標識

蛋白質間相互作用, 部位特異的安定同位体標識, ドッキングシミュレーション

○こだまゆうや, まいけるりーす, しんばのぶひさ, ふおるかーどっち, すずきえい
いちろう, しまだいちお, たかはしひでお

蛋白質を調製するならば、シグナルの化学シフト値から、アミノ酸の種類を同定することができる。さらに、この試料を用いて相互作用実験を行うならば、相互作用界面に存在するアミノ酸の種類と個数を知ることができる。蛋白質の表面において、観測対象の各アミノ酸に関するこの実験結果を最もよく満たす箇所が、相互作用界面である。ゆえに、立体構造が既知であれば、実験結果とアミノ酸残基の位置関係を基に、相互作用界面を形成するアミノ酸残基の特定が可能となる。我々はそのための解析用ソフトウェアを開発し、化学シフト変化が起きたシグナルの個数と立体構造情報から、相互作用界面を形成するアミノ酸残基を自動で決定できるようにした。このようにして、NMRシグナルを帰属することなく、1つのサンプルに対する実験結果から、極めて迅速に相互作用界面を同定することが可能となった。さらに、本手法により得られる相互作用界面の情報を拘束条件としてドッキングシミュレーションを行うことにより、複合体のモデル構造を迅速に構築することが可能である。

本研究では、複合体の立体構造が既知である、分子量26.4 kのyeast ubiquitin hydrolase (YUH)と8.6 kのyeast ubiquitin(Y-Ub)を用いて、本手法が正しく機能すること実証した。まず、部位特異的に標識されたYUHへY-Ubを滴定し、滴定前後のNMRスペクトルから、化学シフト変化が起きたシグナルの個数を得た。この実験結果を解析用ソフトウェアで処理することで、Fig. 1に示すように、相互作用界面を構成するアミノ酸残基の同定に成功した。さらに、得られた界面情報を基に、HADDOCK (*J. Am. Chem. Soc.*, 125, 1731-1737 (2003)) を用いてYUH-ubiquitin複合体構造の再構築を試みたところ、fraction of native contacts $\geq$ 0.3、ligand RMSD $\leq$ 5.0 Åの精度で複合体構造の再構築に成功した (Fig. 2)。実験結果に基づく複合体モデル構造を迅速に構築できることから、例えば構造情報に基づく創薬の初期段階などにおいて、今回示すストラテジーは有用であると考えられる。

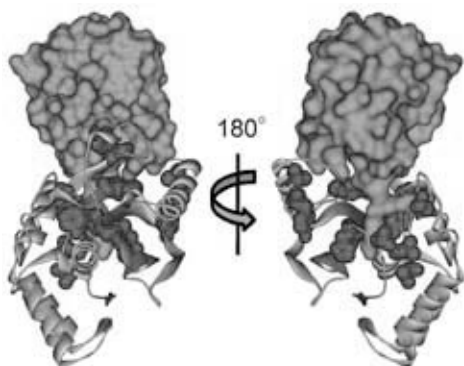


Fig. 1 The complex structure of YUH and ubiquitin, depicted as ribbon and surface representation, respectively (PDB code: 1CMX). The residues at the interaction surface of YUH, determined by our method, are depicted as CPK models.



Fig. 2 The structure of YUH-ubiquitin complex predicted by using HADDOCK (black ribbon) is superimposed onto the crystal structure of the complex (gray ribbon) by YUH. The predicted structure of YUH is not shown for clarity.

リポカリン型プロスタグランジンD合成酵素の立体構造と運動性

○加藤 信幸¹, 島本 茂^{1,2}, 圓尾 廣子¹, 吉田 卓也¹, 乾 隆³, 宮本 優也^{2,3}, 小林 祐次⁵, 藤森 功^{4,5}, 鶴村 俊治⁴, 有竹 浩介⁴, 裏出 良博⁴, 大久保 忠恭¹

¹大阪大学大学院薬学研究科, ²(独)学振特別研究員DC, ³大阪府立大学大学院, ⁴大阪バイオサイエンス研究所, ⁵大阪薬科大学

Structure and Dynamics of Lipocalin-type Prostaglandin D synthase

○Nobuyuki Kato¹, Shigeru Shimamoto^{1,2}, Hiroko Maruo¹, Takuya Yoshida¹, Takashi Inui³, Yuya Miyamoto^{2,3}, Yuji Kobayashi⁵, Ko Fujimori^{4,5}, Toshiharu Tsurumura⁴, Kosuke Aritake⁴, Yoshihiro Urade⁴ and Tadayasu Ohkubo¹

¹Graduate School of Pharmaceutical Science, Osaka University, ²JSPS Res. Fellow,

³Graduate School of Biological Science, Osaka Prefecture University, ⁴Department of Molecular Behavioral Biology, Osaka Bioscience Institute, ⁵Osaka University of Pharmaceutical Science

Abstract

Lipocalin-type prostaglandin (PG) D synthase (L-PGDS) possesses dual functions as a PGD₂-synthesizing enzyme and a transporter for lipophilic ligands. It catalyzes the isomerization of PGH₂ to produce PGD₂, an endogenous somnogen, in the brain. L-PGDS also has the ability to bind various lipophilic molecules such as retinoid, bilirubin, and biliverdin. Recently, we have determined the solution structure of L-PGDS - U-46619, substrate analog complex by NMR and revealed that the U-46619 binds to the upper end of the cavity. Comparison of complex structure with free form L-PGDS structure revealed that H2-helix and EF-loop located at the upper end of the β-barrel change the conformation to cover the entry of the cavity upon U-46619 binding.

【序論】

リポカリン型プロスタグランジン(PG)D合成酵素(L-PGDS, Fig.1)は、哺乳類の脳内に豊富に存在し、PGH₂から睡眠誘発に關与するPGD₂を産生する酵素であるとともに、レチノイドやビリルビン、ビリベルジンなどの大きさ、形状の異なる疎水性低分子のスカベンジャーとしての役割も担う多機能蛋白質である¹⁾。これまでの溶液NMR法による立体構造解析から、βバレル構造の内部にL-PGDSの所属するリポカリンファミリーの中でも特に大きな疎水性cavityを持ち、このことが大きさも化学構造も異なる様々な疎水性低分子との結合を可能にしていることが明らかとなった²⁾。さらに、βバレル内の疎水性cavityの上部に位置するEF-loopとリポカリン型プロスタグランジン D 合成酵素, プロスタグランジン, 溶液 NMR

○かとう のぶゆき、しまもと しげる、まるお ひろこ、よしだ たくや、いぬい たかし、みやもと ゆうや、こばやし ゆうじ、ふじもり こう、つるむら としはる、ありたけ こうすけ、うらで よしひろ、おおくぼ ただやす

H2-helixの立体構造変化がリガンド結合に重要であることが示唆された。

【実験】

大腸菌を用いた大量発現系で培地の栄養源に安定同位体化合物を用い ^{13}C 、 ^{15}N ラベルしたL-PGDSを調製した。L-PGDS単独、L-PGDS・U-46619複合体、およびP110A変異体についてHNCACBおよびCBCA(CO)NHを用いて主鎖帰属を、 $\{^1\text{H}\}-^{15}\text{N}$ NOE、 T_1 、 T_2 緩和時間測定から主鎖の運動性の解析を行った。

【結果および考察】

我々は、溶液NMR法を用いてL-PGDSと反応基質 PGH_2 の安定誘導体であるU-46619(Fig.2)の複合体構造を用いて決定し、U-46619がcavityの上部に結合することを明らかにした。さらにL-PGDSとU-46619複合体の構造を比較し、U-46619が結合する際にcavity上部に位置するEF-loopおよびH2-helixがU-46619を覆うように変化することが明らかとなった。(Fig.3)

構造変化の果たす役割を明らかにするため、L-PGDS、L-PGDS・U-46619複合体、および不活性型変異体L-PGDS P110Aの立体構造解析および緩和時間の測定等により運動性の解明を行った。 $\{^1\text{H}\}-^{15}\text{N}$ NOE、 T_1 、 T_2 緩和時間測定からL-PGDS単体では β バレル領域に比べて、cavity上部の開口している領域の運動性が高いことが明らかとなった。また、L-PGDSとU-46619複合体を比較して、特にEF-loopおよびH₂-helix領域の緩和時間に差があり、 $\{^1\text{H}\}-^{15}\text{N}$ NOEにおいてH₂-helix、CD-loop、EF-loop、GH-loopにおいて高い値が示されたことから、U-46619結合によってcavity上部の運動性が低下したと考えられた。これらのことから、リガンド結合に際して、cavity上部に位置しているEF-loopおよびH₂-helix領域の運動が重要であると考えられる。さらに現在、不活性型変異体であるP110A変異体の緩和時間測定を行い、変異がこの領域の運動性に与える影響を解析中である。

【文献】

¹⁾Inui T., et al. J.Biol.Chem.,278,2845-2852,(2003)

²⁾Shimamoto S., et al. J.Biol.Chem.,282,31373-31379,(2007)



Fig.1 NMR solution structure of lipocalin-type prostaglandin D synthase (PDB ID:2E4J)

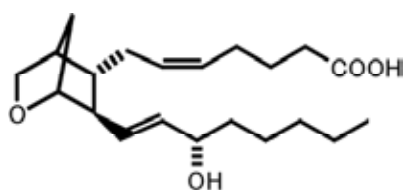


Fig.2 Chemical formula of U-46619

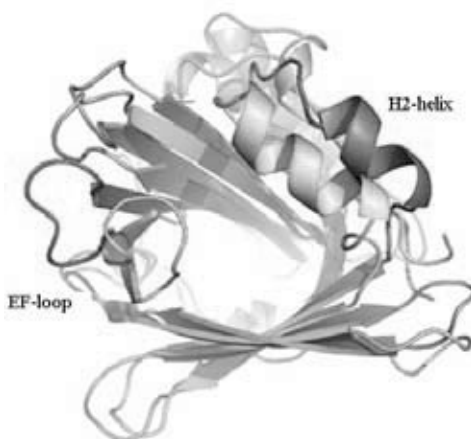


Fig.3 Superposition of free form of L-PGDS and L-PGDS-U-46619 complex

分子シャペロンカプセル化システムの構築

○増原泰英¹, 田中慎治¹, 河田康志², 松崎勝巳¹, 星野大¹¹京都大学大学院薬学研究科²鳥取大学大学院工学研究科・医学研究科**Construction of the Chaperonin Encapsulation System**○Yasuhide Masuhara¹, Shinji Tanaka¹, Yasushi Kawata², Katsumi Matsuzaki¹, Masaru Hoshino¹¹ Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, Kyoto, Japan² Graduate School of Engineering, Tottori University, Graduate School of Medical Science, Tottori University, Tottori, Japan

To analyze a protein with strong tendency of aggregation by high-resolution solution NMR, the novel chaperonin encapsulation system was developed. GroEL and GroES in *Escherichia coli*, also known as chaperonin, temporarily form a large complex to sequester a substrate protein in its hydrophilic space. Using an ATPase deficient mutant of GroEL, SR398 and a 12-residue GroEL-binding peptide, SBP, we succeeded to record a ¹H, ¹⁵N-HSQC spectrum of ubiquitin which was encapsulated in SR398/GroES cavity. Although the spectrum in complex corresponded well to that in solution, linewidth of each resonance peak was found to be broadened by two fold, indicating a restriction of mobility of ubiquitin probably due to the interaction through hydrophobic SBP tag sequence. To further improve the system, a removable SBP-tag sequence was designed.

【序論】溶液高分解能 NMR は、水溶液中におけるタンパク質の立体構造、ならびにその運動性を解析する手法として、今日の構造生物学において重要な役割を果たしている。しかし、測定に必要とされる高濃度のタンパク質存在下においては、測定タンパク質の非特異的な凝集や、化学交換などに起因するみかけの分子量の増大により、シグナルのブロードニングが起り、解析が困難、あるいは不可能になってしまうことが少なくない。この問題を克服するためには、測定タンパク質を1分子ずつ物理的に隔離し、非特異的な分子間相互作用を抑制することが最も有効であると考えられる。

そこで本研究では、大腸菌の分子シャペロン GroEL/GroES 複合体に着目した。GroEL/GroES 複合体は巨大な親水性の空洞を形成し、その内部に基質タンパク質を隔離する特徴を持つ (Fig. 1A)。この中に目的タンパク質を封入することを考えた。Fig. 1A の反応機構中に形成される GroEL, GroES, 基質タンパク質からなる三重複合体を安定に保つことにより、内部のタンパク質の会合を効率的に抑制することが可能であると考えられる。そこで、GroES と安定な複合体を形成することが知られてい

Molecular chaperone, Aggregation prone protein, Solution NMR

○まずはらやすひで, たなかしんじ, かわたやすし, まつぎきかつみ, ほしのまさる

る SR398 (Single Ring D398A) 変異型 GroEL を用いた。

GroEL は変性タンパク質を特異的に認識・結合する。任意のタンパク質を天然状態を保持したまま SR398 に結合させるため、GroEL に高い親和性で結合する 12 残基のペプチド配列 (SBP, Table1) を測定タンパク質に付加することを考えた (Fig. 1B)。測定タンパク質のモデルとして、溶液 NMR での解析が十分にされているユビキチン (Ubq) を用いた (Table1)。

^{15}N 標識 Ubq-SBP を用いて、SR398/GroES 複合体内に安定に封入し、その ^{15}N -HSQC スペクトルを獲得した。その結果、複合体中でのスペクトルは溶液中単体のものとよく一致し、ユビキチンの高次構造が保持されていることが明らかになった。その一方で各共鳴シグナルの線幅は 2 倍程度増大し、複合体内部での運動性が抑制されていることが示唆された。

【方法・結果】 Ubq の溶液中の高次構造は、シャペロン複合体の内部空洞より十分小さいため、複合体中でも十分な分解能で NMR 測定できると考えられる (Fig. 2)。それゆえ運動性低下の原因として、疎水性の高い SBP が GroEL の基質認識部位、あるいは内部空洞の内壁と相互作用している可能性が考えられた。上記の考察を基に、複合体中での運動性を改善するため、またより天然に近い配列で測定タンパク質を解析するため、SR398/GroES 複合体に封入後、測定タンパク質から SBP を取り除くシステムの開発に臨んだ。

封入後に SBP を取り除くため、SBP と測定タンパク質 Ubq の双方に Cys を導入し (SBP-C, Ubq-C)、ジスルフィド結合で両者を繋げて (Ubq-CC-SBP) SR398/GroES 複合体中に隔離した後、還元剤で結合を切断することを試みた (Fig. 1B)。

大腸菌株 BL21 (DE3) pLysS を用いて、 ^{15}N 標識した Ubq-C を作製した。一方、SBP-C は Fmoc 固相合成法により作製し、逆相 HPLC を用いて精製した。その後、SBP-C をジチオピリジンにより修飾し、SBP-C のチオピリジン体を精製した。チオピリジン体は遊離チオール基を選択的に求核攻撃するため、SBP-C のチオピリジン体を Ubq-C と反応させることで、高収率で Ubq-CC-SBP を得た。現在、得られた Ubq-CC-SBP を用いて、SR398/GroES との複合体を作製し、その NMR スペクトルの取得・解析を行っている。

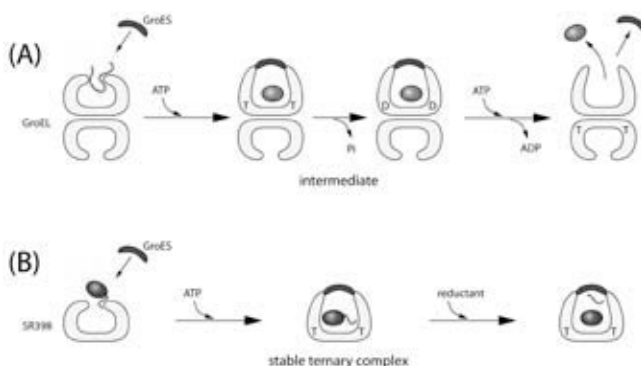


Fig.1 (A) Reaction cycle of GroEL and GroES.
(B) Chaperonin encapsulation system.

Table1 Sequences of model substrate proteins.

Abbreviation	Sequence
SBP	SWMTTPWGFLHP
Ubq-SBP	Ubq-SHHHHHHC-GGG-SWMTTPWGFLHP
Ubq-CC-SBP	Ubq-C-HHHHHH (Ubq-C) C-GGG-SWMTTPWGFLHP (SBP-C)

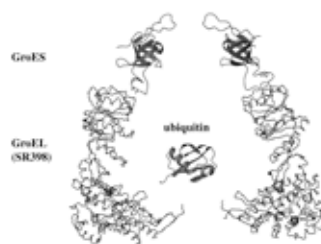


Fig.2 Structural model of the ternary complex.

化学交換を利用したアミロイド β タンパク質の過渡的オリゴマー会合体の検出

○山口貴宏¹, 松崎勝巳¹, 星野大¹

¹京大院薬

Transient oligomeric states of amyloid- β protein revealed by chemical exchange

○Takahiro Yamaguchi¹, Katsumi Matsuzaki, and Masaru Hoshino¹

¹Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, Kyoto, Japan.

The aggregation and fibril formation of amyloid β -protein (A β) are the hallmarks of Alzheimer's disease. A β is supposed to self-associate with each other and form nucleus through conformational change. Although nucleation is a critical step in the aggregation of A β , detailed mechanism is unknown because of its transient nature.

The peak intensity of an NMR signal depends on molecular motion, and is, in principle, expected to increase with temperature. By analyzing ¹H-¹⁵N and ¹H-¹³C HSQC spectra of A β - (1–40) in detail, however, we found that the signal intensity decreased with increasing temperature. These results suggest the presence of a chemical exchange, in which soluble A β may self-associate with each other, forming short-lived oligomers which rapidly dissociate into monomers.

【序論】

アルツハイマー病患者脳においてアミロイド β タンパク質(A β)の線維状凝集体(アミロイド線維)の沈着が見られる。アミロイド線維の形成機構として重合核依存性重合モデルが提唱されている。同モデルによると線維形成は凝集核形成過程と線維伸長過程に分けられる。凝集核は可溶性モノマー数分子が会合し、コンホメーション変化を伴って形成されると考えられるが、その過程は非常にエネルギー障壁が高く、自発的な凝集核の形成は極めて起こりにくい。一方、ひとたび凝集核が形成されると可溶性モノマーの凝集核への速やかな結合が進行する。アミロイド線維形成において凝集核の形成が律速であるが、凝集核は過渡的にしか存在しないため、その構造、及び形成機構の詳細は不明である。

一般に溶液NMRのシグナル強度は分子の回転相関時間に依存するため温度上昇に伴い増加する。ところが、A β を様々な条件下で測定したところ、そのピーク強度は温度上昇に伴い減少することが分かった。¹H-¹⁵N 並びに ¹H-¹³C HSQCスペクトルを詳細に解析した結果、可溶性モノマーと過渡的に形成されるオリゴマーとの間に化学交換が存在することが示唆された。

アミロイド β タンパク質, オリゴマー, 化学交換

○やまぐちたかひろ, まつざきかつみ, ほしのまさる

【実験】

^{15}N -A β -(1-40)、 $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -A β -(1-40) をそれぞれ90% $\text{H}_2\text{O}/10\%$ D_2O 、100% D_2O のリン酸緩衝液 (pH 6.5) に溶解し、それぞれ ^1H - ^{15}N 、 ^1H - ^{13}C HSQCスペクトルを様々な温度のもと測定した。HNCACB、HN(COCA)HA、HCCH-TOCSYにより各ピークの帰属を行った。

【結果と考察】

^{15}N -A β -(1-40)を用いて4 $^{\circ}\text{C}$ 、及び25 $^{\circ}\text{C}$ において ^1H - ^{15}N HSQCスペクトルを測定した (Fig. 1)。その結果、25 $^{\circ}\text{C}$ において著しいピーク強度の減少が観測された。ピーク強度の減少は可逆的であり、25 $^{\circ}\text{C}$ での測定後、再び4 $^{\circ}\text{C}$ で測定を行うと、はじめに測定したときと同じピーク強度を示した。よって、25 $^{\circ}\text{C}$ におけるピーク強度の減少はA β の不可逆な凝集によるものではないことが分かった。一般に溶液NMRのシグナル強度は分子の回転相関時間に依存するため温度上昇に伴い増加する。A β においてはこの逆の現象が見られたが、その原因の一つとして易動性のアミド水素と溶媒である水との交換速度の増加が挙げられる。そこで、非易動性水素核を指標として同様の測定を試みた。重水中で ^1H - ^{13}C HSQCスペクトルを測定し、 $^1\text{H}\alpha$ - $^{13}\text{C}\alpha$ の共鳴ピーク強度の温度依存性を解析した結果、 ^{15}N の場合と同様に温度上昇に伴いピーク強度の減少が見られた (Fig. 2)。

これらの結果により、温度上昇に伴うピーク強度減少の要因として、水との交換の他に化学交換の寄与が示唆される。化学交換に関する詳細は現段階では不明であるが、以下のように考察している。すなわち、水溶液中でA β モノマーは互いに会合しオリゴマーを形成するが、そのオリゴマーは過渡的で素早くモノマーに解離し、モノマー-オリゴマー間で平衡にある可能性が考えられる。これらの過渡的に形成されるオリゴマーが何らかの機構により安定化されることによりアミロイド線維形成の凝集核へと転移するのではないかと考えられる。

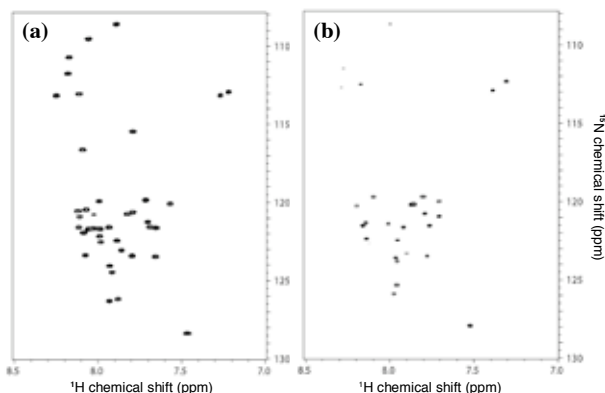


Fig. 1 ^1H - ^{15}N HSQC spectra of A β -(1-40) at 4 $^{\circ}\text{C}$ (a) and 25 $^{\circ}\text{C}$ (b).

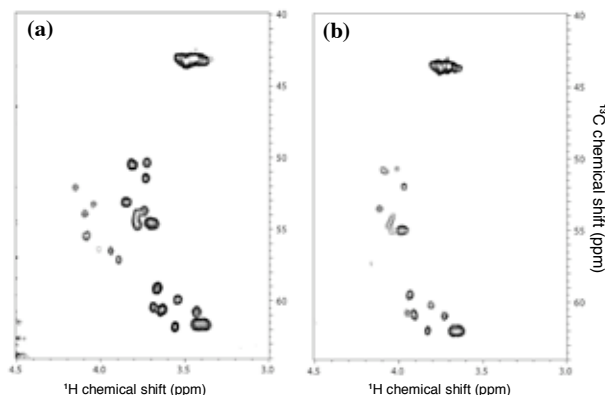


Fig.2 $\text{H}\alpha$ - $\text{C}\alpha$ region of ^1H - ^{13}C HSQC spectra of A β -(1-40) at 4 $^{\circ}\text{C}$ (a) and 25 $^{\circ}\text{C}$ (b).

オキシステロール結合タンパク質OSBPのdisorder領域と小胞体膜貫通タンパク質VAP-Aとの複合体形成機構

○古板恭子¹、Jee, JunGoo^{1,2}、深田はるみ³、三島正規^{1,4}、児嶋長次郎¹
¹奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科、²首都大学東京 戦略研究センター、³大阪府立大学 生命環境科学研究科、⁴首都大学東京 理工学研究科

NMR study of a mechanism for complex formation between a disordered region of OSBP and an ER membrane protein VAP-A

○Kyoko Furuita¹, JunGoo Jee^{1,2}, Harumi Fukada³, Masaki Mishima^{1,4} and Chojiro Kojima¹
¹Graduate School of Biological Sciences, ²Center for Priority Areas, Tokyo Metropolitan University, ³Graduate School of Life and Environmental Sciences, Osaka Prefecture University, ⁴Graduate School of Science and Engineering, Tokyo Metropolitan University

Oxysterol binding protein (OSBP) is a cytosolic receptor of cholesterol and oxysterols, and localized to the endoplasmic reticulum (ER) by the binding to cytoplasmic major sperm protein (MSP) domain of integral ER protein VAMP-associated protein-A (VAP-A). Interaction of OSBP with VAP-A requires FFAT motif of OSBP. In order to understand the interaction between VAP-A and OSBP, we have determined solution NMR structure of the complex between VAP-A MSP domain (VAP-A_{MSP}) and OSBP fragment containing FFAT motif (OSBP_F). Most residues in FFAT motif were found to directly interact with VAP-A_{MSP}. ¹⁵N hetero NOE of OSBP_F showed that OSBP_F was disordered in the unbound state. ¹⁵N-HSQC titration experiment of VAP-A_{MSP} with OSBP_F showed that VAP-A_{MSP} and OSBP_F formed an intermediate complex.

【導入】

Oxysterol binding protein (OSBP)は、オキシステロール及びコレステロールの細胞内受容体であり、脂質の恒常性に関わることが知られている。OSBPは通常の細胞では、小胞体膜表面に局在するが、この局在には、OSBPの中ほどにあるFFATモチーフと小胞体膜貫通タンパク質VAMP-associated protein-A (VAP-A)の細胞質側にあるMajor Sperm Protein (MSP)ドメインとの相互作用が必須である。本研究では、OSBPとVAP-Aとの相互作用の詳細を明らかにするために、①VAP-A MSPドメイン(human VAP-A 5-128, VAP-A_{MSP})とFFATモチーフを含むOSBPフラグメント(human OSBP 346-379, OSBP_F)からなる複合体の立体構造解析、②OSBP_Fの運動性の解析、および③VAP-A_{MSP}とOSBP_Fを用いたNMRタイトレーション等を行った。

溶液構造 中間複合体 天然変性タンパク質

○ ふるいた きょうこ、じー じゅんぐー、ふかだ はるみ、みしま まさき、こじま ちょうじろう

【結果】

① VAP-A_{MSP}:OSBP_F複合体の立体構造解析

複合体の立体構造は、まずCYANAを用いて構造計算を行い、得られた構造をAMBERにより精密化することで決定した。得られた立体構造をFigure1に示す。VAP-A_{MSP}は7本のβストランドおよび1つのαヘリックスを含み、逆平行βシートからなる免疫グロブリン様βサンドイッチ構造を有していた。OSBP_FはFFATモチーフ部分がストランド状、そのC末端側で屈曲し、VAP-A_{MSP}のβストランドC〜Fにわたって結合していた。複合体は静電的相互作用、疎水的相互作用および主鎖間の水素結合により安定化されていた。

② OSBP_Fの運動性の解析

OSBPのアミノ酸配列から、FFATモチーフを含むOSBPの中央の領域は構造を持たないと予測された。OSBP_Fに関して¹⁵N異種核NOEを測定したところ、フリーの状態では全ての残基が負のNOEを示し、フリーのOSBP_Fは構造を持たないことが示された。VAP-A_{MSP}との複合体形成時には、FFATモチーフ及びその周辺の残基は正のNOEを示し、構造が安定化することが示された。

③ NMRタイトレーション実験

¹⁵N標識VAP-A_{MSP}に対し、非標識OSBP_Fの¹⁵N-HSQCタイトレーション実験を行った。VAP-A_{MSP}のいくつかの残基は、OSBP_F混合比の増加にともない、2サイトモデル (R+L⇌RL: R, receptor; L, ligand) では説明できないピークの変化を示した。このことから、VAP-A_{MSP}とOSBP_Fは複合体形成においてなんらかの中間体を形成すると考えられた。

【考察】

以上の結果に加え、OSBP_Fの野生型及び変異体とVAP-A_{MSP}を用いたITC実験及びOSBP_F 変異体を用いたNMRタイトレーション実験の結果から、OSBPはVAP-A_{MSP}との結合において、FFATモチーフとその周辺の構造を持たない領域がVAP-A_{MSP}と非特異に相互作用して中間複合体を形成し、結合領域が構造をとることで最終的に安定な複合体に移行するという“fly-casting”経路をとると考えられる。

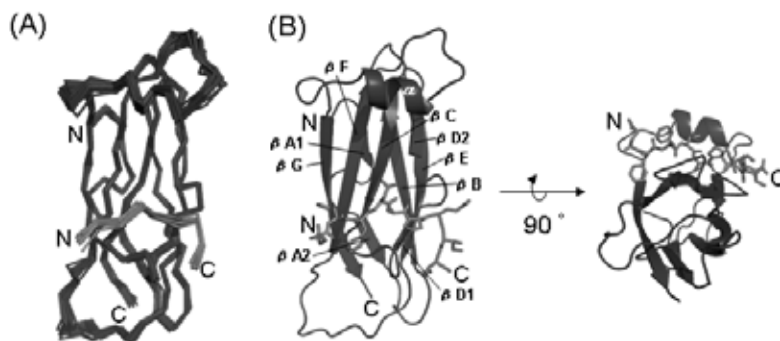


Figure 1. Solution structure of the complex between VAP-A (6-125) and OSBP (358-366).

(A) Superimposed picture of 20 lowest energy structures. (B) Ribbon representation of VAP-A_{MSP}. OSBP_F is shown in stick model.

NMR に基づくマウス外分泌ペプチド ESP4 の解析： 受容体特異的認識機構の解明にむけて

○谷口 雅浩¹、吉永 壮佐¹、はが 紗智子²、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

NMR analyses of mouse ESP4 to elucidate specific ligand-receptor recognition mechanism

○Masahiro Taniguchi¹, Sosuke Yoshinaga¹, Sachiko Haga², Kazushige Touhara²,
Hiroaki Terasawa¹

¹ Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kumamoto University

² Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo

Pheromones are defined as chemical substances that convey informations about social and reproductive behaviours in the same species. Recently, we identified a male-specific 7 kDa peptide from the extraorbital lacrimal gland (ELG) and named the peptide exocrine gland-secreting peptide 1 (ESP1). ESP forms a new multigene family which consists of 38 genes. ESP4 is expressed in the ELG, the Harderian gland and the submaxillary gland of both male and female. The purpose in this study is to elucidate specific ligand-receptor recognition mechanism based on structural analyses. We performed solution NMR analyses and revealed that ESP4 contains α -helical structures as well as ESP1 and has also an additional α -helix at the C-terminal region. We discuss about structure-activity relationship of ESP4 and ESP1 based on NMR analyses.

【序論】

フェロモンとは、同じ種の間で、社会行動や生殖行動に影響を与える物質である。多くの哺乳動物は、鼻腔下部にある鋤鼻器官でフェロモンを感知すると考えられている。フェロモンの重要な働きとして、同種の別個体を正確に認識する役割がある。個体認識の仕組みを理解する上で、受容体がどのようにしてフェロモンを厳密に認識するかを理解することは重要であるが、特異性発現のメカニズムの理解は十分でない。

東原らは、オスマウスの涙より分泌される新規ペプチドを同定した¹⁾。このペプチドが外分泌腺に分泌されることから、ESP (exocrine gland-secreting peptide) 1 と命名し、38種類からなる新規の多重遺伝子ファミリー (ESP ファミリー) を構成することを明らかにした²⁾。ESP4 は、眼窩外涙腺、顎下腺、ハーダー腺に分泌されている

フェロモン、ファミリー、立体構造解析

○たにぐちまさひろ、よしながそうすけ、はがさちこ、とうはらかずしげ、
てらさわひろあき

ファミリー分子である。我々は、ESP4 と ESP1 のアミノ酸配列相同性は高いにもかかわらず、これらが異なる受容体において認識されることを示唆する結果を得ている（未発表）。本研究は、ESP4 の立体構造および受容体認識機構を解明し、構造生物学の観点から受容体認識における特異性を明らかにすることを目的とする。

【実験】

$^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 標識した ESP4 を大腸菌の発現系により大量に発現させ、ニッケルアフィニティクロマトグラフィーにより粗精製を行い、ゲル濾過クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィーにて精製した。精製した試料を用いて、各種の多核多次元 NMR 測定を行い、信号の帰属を行った。NMR 測定は Bruker 社製クライオプローブ付属 AVANCE600 を用い、スペクトル解析には Olivia を使用した。

【結果と考察】

大腸菌を用いて発現した結果、ESP4 は単量体とジスルフィド結合に起因する二量体を形成していた。逆相クロマトグラフィーにて単量体と二量体を分離・精製し、マウス鋤鼻器官における鋤鼻神経系刺激活性を調べたところ、単量体のみが活性を持つことが分かった。また、単量体 ESP4 による刺激を受けた細胞は、ESP1 受容体を発現している細胞とは異なることから、これらの受容体が異なることが強く示唆された。

ESP4 単量体の立体構造決定に向けて、 $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 標識した ESP4 を用いて 各種の三次元測定を行い、NMR シグナルの帰属を完了した。NOESY、 $\{^1\text{H}\}$ - ^{15}N NOE、HNHA の各スペクトルの解析および化学シフト値に基づく二次構造解析の結果、ESP4 は C 末端領域に ESP1 には見られない α -ヘリックスを持つことが示唆された。そして、ESP4 を構成する α -ヘリックスのうち、1 本は負電荷に富んだ分子表面を、もう 1 本は正電荷に富んだ面を持つことを示唆するデータを得た。当研究室で立体構造を決定した ESP1 と比較すると、ESP4 の表面における電荷分布は、ESP1 の表面電荷分布と大きく異なることが推察された。受容体の特異的認識における、ESP4 に特徴的な C 末端領域の α -ヘリックスの存在や、分子表面の電荷分布の違いの関与を明らかにするために、ESP4 の立体構造決定に向けて NMR 解析を進めている。

【展望】

今後は、「1つのリガンドに対して受容体は1つである」というフェロモン認識における仮説³⁾を解明するために、ESP4 と ESP1 での受容体認識の差異を構造生物学的観点から明らかにしていく。

【参考文献】

- ¹⁾Kimoto H. *et al.*, *Nature*, **437**, 898-901 (2005)
- ²⁾Kimoto H. *et al.*, *Current biology*, **17**,1879-1884 (2007)
- ³⁾Luo M. *et al.*, *Current Opinion in Neurobiology*, **14**, 428-434 (2004)

YP20 ピロ化アミロイドβのオリゴマー形成に関するNMR解析

○岩本 成人¹、斉藤 貴志²、河野 俊之³、西道 隆臣²、
寺沢 宏明¹

¹熊本大・院・医薬、²理研・BSI、³三菱化学生命研

NMR study of oligomerization process of pyroglutamyl amyloid beta peptides

○Shigeto Iwamoto¹, Takashi Saito², Toshiyuki Kohno³, Takaomi C. Saido²,
Hiroaki Terasawa¹

¹Facul. of Med. and Pharm. Sci., Kumamoto Univ., ²RIKEN BSI, ³Mitsubishi Kagaku Inst. Life Sciences

Amyloid beta peptides (Aβ) are thought to be neurotoxic polypeptides in Alzheimer's disease (AD), one of the most common pathology of late-onset dementia. The neurotoxicity of AD was previously thought to be caused by amyloid fibrils. However, recent physiological studies indicate that soluble Aβ oligomers, intermediate in the formation of amyloid fibrils, may be potent neurotoxin. Especially, N-terminal pyroglutamyl-Aβ is more hydrophobic, resistant to degradation, and prone to aggregation. Moreover, senile plaques in AD patients are predominantly comprised of pyroglutamyl-Aβ. The purpose of this study is to elucidate the role of pyroglutamyl-Aβ at oligomerization process. We report here the NMR analyses of Aβ peptides and discuss the molecular mechanism of oligomerization.

【背景・目的】

社会の高齢化とともに、認知症の患者数は増加の一途をたどっている。主要な認知症の一つであるアルツハイマー病（AD）は、患者数が世界で1800万人に達しており、根本的な治療法の確立が求められている。アミロイドベータペプチド（Aβ）は、AD患者の脳内に典型的病理として認められる「老人斑」の構成主体であり、老人斑は、AβがAβオリゴマー、アミロイド線維を経て細胞外に蓄積することによって生じる。従来、老人斑を形成するアミロイド線維が、ADの神経毒性の原因と考えられてきた。しかし、近年、アミロイド線維を形成する前の中間体であるAβオリゴマーが、より強い毒性を有するということが示されてきた[1]。また、Aβはアミノ末端のピロ化により、さらに毒性が強まるという報告もある[2]。ピロ化Aβは、アミノ末端の1,2番目のアミノ酸がアミノペプチダーゼによって切断され、3番目に位置するグルタミン酸の側鎖がグルタミルシクラーゼにより環化されることで生じる。さらに、老人斑を構成するAβには様々な分子種が存在するが、ピロ化Aβは健常者に比べてAD患者に多いことも知られている[3]。本研究は、毒性が強いとされるピロ化AβについてNMR解析を行い、オリゴマー形成におけるピロ化Aβの果たす役割を明らかにすることを目的とする。

キーワード：アミロイドベータペプチド、オリゴマー、ピロ化

○いわもとしげと、さいとうたかし、こうのとしゆき、さいどうたかおみ、
てらさわひろあき

【実験】

^{15}N 標識、 ^{13}C 、 ^{15}N 標識 $\text{A}\beta$ を遺伝子組換え大腸菌を用いて大量発現させた。ニックエルアフィニティークロマトグラフィーによる粗精製の後、YUH (Yeast Ubiquitin Hydrolase) によってタグ部を切断し、逆相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 $\text{A}\beta$ を用いて、2 次元 ^1H - ^{15}N HSQC、各種 3 次元測定を行った。また、凝集能の高いピロ化 $\text{A}\beta$ についても、同様に精製法を確立した。さらに、安定同位体標識したピロ化 $\text{A}\beta$ を用いて、2 次元 ^1H - ^{15}N HSQC 測定、各種 3 次元測定による主鎖帰属を進めた。NMR 測定は、Bruker 社の 600 MHz (CRYOPROBE 付) の NMR 装置を用いて行い、スペクトル解析には NMRPipe, Olivia を使用した。

【結果・考察】

安定同位体標識した $\text{A}\beta$ を大量に得るため、ユビキチン融合タンパク質として $\text{A}\beta$ を大量発現できる発現系を構築した。そして、融合タンパク質として $\text{A}\beta$ を発現することで、 $\text{A}\beta$ の凝集抑制・発現量増加を達成した。 $\text{A}\beta$ は、ピロ化によって、アミノ末端の電荷減少・疎水性の増大が見られ、その凝集能が増大することが知られている。そのため、変性剤である尿素を精製段階で加え、 $\text{A}\beta$ の凝集を抑制することができた。さらに、アミノ末端のピロ化を促進する溶液条件についても検討を行った。

各種多次元 NMR 測定の結果、Phe4 や Arg5 といったアミノ末端を除き、 $\text{A}\beta$ とピロ化 $\text{A}\beta$ の間で、スペクトルの大きな変化は見られなかった。つまり、モノマー状態のコンフォメーションは、ピロ化の影響をほとんど受けないことが分かった。よって、 $\text{A}\beta$ のピロ化による毒性の原因として、電荷の消失による分子間の電荷の反発の減少や、Asp1, Ala2 の脱落に伴った、アミノ末端と疎水性の高い領域 (Lys16—Ala21) との分子内相互作用の増加が示唆された。

また、ピロ化 $\text{A}\beta$ について化学シフト値に基づく二次構造予測を行ったところ、ほぼランダムコイル状態と予測されたが、疎水性コアとされる Lys16—Ala21 以外にも、アミノ末端側で β ストランド構造を取り得る可能性が示唆された。

さらに、Photo-Induced Cross-linking of Unmodified Proteins (PICUP) により [4]、 $\text{A}\beta$ オリゴマーを光架橋させ、NMR 測定試料と同じ濃度の試料中に $\text{A}\beta$ オリゴマーが存在することを確認した。

【展望】

今後は、ピロ化によるアミノ末端の運動性への影響を、溶液 NMR を用いた緩和解析によって明らかにする。また、PICUP を用いて、 $\text{A}\beta$ とピロ化 $\text{A}\beta$ のオリゴマー形成能の違いについて検討する。そして、各種 $\text{A}\beta$ オリゴマーの中で、毒性の主因となるオリゴマーを明らかにする。さらに、*in vitro* で強い毒性を持つことが示された $\text{A}\beta$ オリゴマーについて *in vivo* 実験を行い、その毒性を解析する。

【参考文献】

- [1] Hardy, J. *et al.*, *Science*, **297**, 353-356, (2002)
- [2] Saido, T.C. *et al.*, *Neuron*, **14**, 457-466, (1995)
- [3] Piccini, A. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **280**, 34186–34192, (2005)
- [4] Bitan, G. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **276**, 35176–35184, (2001)