

第一日目
11月15日(月)
日本語セッション

Day 1 (Nov. 15, Mon.)
(Japanese Session)

L1

過渡的に形成される立体構造の常磁性緩和効果による解析

○三島正規¹ 金場哲平¹ 伊藤隆¹ 箱嶋敏雄² 三神すずか¹

¹首都大学東京、理工学研究科

²奈良先端科学技術大学院大学、情報科学研究科

Structural studies of transient structures using PRE

○Masaki Mishima¹, Teppei Kanaba¹, Yutaka Ito¹, Toshio Hakoshima², Suzuka Mikami¹

¹Graduate school of Science and Engineering, Tokyo Metropolitan University

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

Protein structures (complexes) to carry on their functions are formed transiently by integration of weak interactions. NMR technique is quite useful for these structures. We will present NMR studies for transient structure of split PH domain of Rho-kinase and SHARP/SMRT complex. Rho-kinase is known to play a crucial role in regulation of cytoskeleton, which possesses the split PH domain consists of the PH subdomain and the C1 subdomain. In this study, we report three dimensional structure of intact split PH domain using paramagnetic relaxation enhancement (PRE) and multidimensional NMR spectroscopy. Meanwhile, SHARP is a transcriptional repressor interacts with SMRT, a component of HDAC complex. We have determined structure of the SHARP/SMRT complex. We also discuss the detail of complex formation.

【研究背景・目的】

複雑な活性制御を担う蛋白質(複合体)では弱い相互作用の集積によって形成される過渡的な構造を利用してその機能が精緻に制御されており、NMRはこのような構造を解析する有効な手法である。特に近年では、過渡的に存在する構造について、PREやRDCを用いて、存在する準安定な構造の数やポピュレーションを見積もった解析も報告され (*J. Am. Chem. Soc.* 2010 132 694)(*J. Am. Chem. Soc.* 2010 132 8407)、よりいっその応用や展開が期待できる。

我々は、特に過渡的な構造の解析による生物機能の解明を目指して、常磁性緩和効果(PRE)等を用いた解析を行った。Split PHドメインでは、単に独立に存在すると考えられていたサブドメインについて、その配置の過渡的な配向を観測した。また転写抑制補因子複合体SHARP/SMRT形成が、弱い相互作用に基づいてリン酸化によって制御されることを見出し、その複合体の立体構造を決定した。

Key words ; PRE、過渡的構造、構造解析

○みしま まさき、かなば てっぺい、いとう ゆたか、はこしま としお、みかみすずか

【Rho-kinase のスプリット PH ドメインの構造解析】

低分子量 G 蛋白質 Rho の標的である Rho キナーゼの C 末端には、PH ドメインのシーケンスの途中に C1 ドメインが融合した構造が存在し、近年スプリット PH ドメインと呼ばれるドメインである。このドメインは Rho キナーゼの細胞内局在に必須であり、Rho キナーゼの機能にとって必須であることが知られている。我々は部位特異的にスピラベルを導入し、PRE を NMR を用いて観測することでこのスプリット PH ドメインの立体構造を解析した。現在までに低分解能ではあるが、PH サブドメインと C1 サブドメインとの配向を決定した(Fig. 1)。その結果、膜との相互作用に適していると推測されるサブドメイン配置を有していることを明らかにした。

【SHARP/SMRT 複合体の構造解析】

SHARP(SMRT/HDAC-associated repressor protein)はステロイドホルモン応答や Notch シグナル伝達経路における RBP-J κ と相互作用する転写抑制補因子であり、その SPOC ドメインにおいて、HDAC に含まれる転写抑制補因子 SMRT/NcoR と相互作用する。

我々は SPR、ITC、NMR を用いた解析から、SMRT の特定のアミノ酸のリン酸化によって SPOC ドメインとの相互作用が約 1000 倍増強されることを新たに見出した。興味深いことに複合体の SPOC ドメインの NMR スペクトルは、リン酸化 SMRT を用いた場合でも非リン酸化 SMRT を用いた相互作用が弱い場合でもほぼ同一であった。これはリン酸化に関わらずほぼ同様な複合体を形成することを示している。リン酸化を受けなくても SMRT はあるポピュレーションで複合体を形成(準備)しているが、リン酸化が起こると、ただちに複合体形成へ平衡が移動するとも考えられる。現在までに SPOC ドメイン/リン酸化 SMRT 複合体の立体構造を決定した(Fig. 2)。その複合体形成機構の詳細と NMR 解析について議論する。

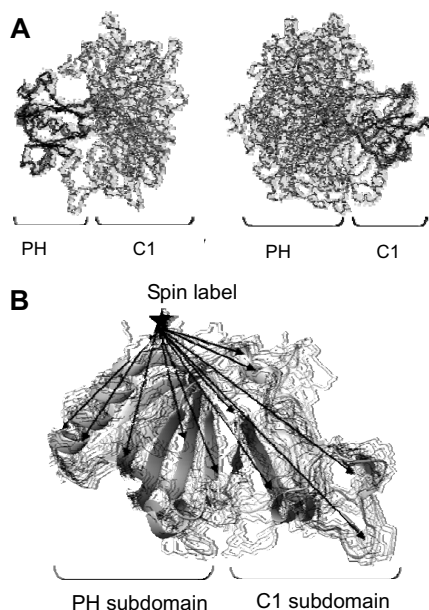


Fig. 1 Structure of the Split PH domain
(A) Ensemble structure calculated without PREs
(B) with PREs

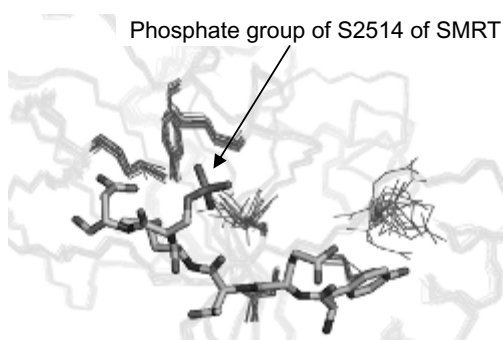


Fig. 2 Close up view of structure of the SHARP/SMRT complex
SHARP and SMRT are drawn as line and stick, respectively.

L2

45kDaプロテインキナーゼVRK1のNMR構造解析

○梶尾尚哉¹、小柴生造^{1,2}、横山順³、横山茂之^{1,4}、Ho Sup Yoon⁵、木川隆則^{1,6}

¹理研・生命分子システム基盤、²横浜市大・院生命ナノシステム、³大陽日酸(株)・つくば研、⁴東大・院理、⁵ナンヤン工科大・SBS、⁶東工大・院総理工

NMR structural analysis of 45 kDa protein kinase, VRK1

○Naoya Tochio¹, Seizo Koshiba^{1,2}, Jun Yokoyama³, Shigeyuki Yokoyama^{1,4}, Ho Sup Yoon⁵, and Takanori Kigawa^{1,6}

¹RIKEN Systems and Structural Biology Center, Kanagawa, Japan, ²Graduate School of Nanobioscience, Yokohama City University, Kanagawa, Japan, ³Tsukuba Lab., Taiyo Nippon Sanso Corp., Ibaraki, Japan, ⁴Graduate School of Science, University of Tokyo, Tokyo, Japan, ⁵School of Biological Sciences, Nanyang Technological University, Singapore, and ⁶Interdisciplinary Graduate School of Science and Engineering, Tokyo Institute of Technology, Kanagawa, Japan.

Vaccinia related kinase 1 (VRK1) is a serine/threonine protein kinase composed of 396 amino acid residues (M.W. 45 kDa), which is known to mediate the cell response to DNA damage by phosphorylation of the p53 tumor suppressor. Toward the structure determination of VRK1, we prepared various kinds of stable-isotope labeled samples and then tried many kinds of NMR experiments. With respect to the sample preparation, we applied the cell-free protein synthesis system to produce the highly deuterated samples, the amino acid-selective labeled samples, the Stereo-Array Isotope Labeling (SAIL) samples, and the methyl-selective labeled samples. As for the NMR analyses, we had successfully assigned about 90% of the backbone resonances using the standard TROSY-type experiments and the amino acid-selective labeling technique. The methyl resonances of Ile, Leu, Val, Ala, and Met were assigned using the HMCM[CG]CBCA and/or a series of 3D/4D NOESY experiments. We also measured residual dipolar couplings aligned in polyacrylamide gel. Based on these data, we have successfully determined the solution structure of human VRK1. We will discuss general aspects of structure determination of proteins with the large molecular weight by using NMR spectroscopy.

Vaccinia related kinase 1 (VRK1)は、全長396残基(分子量45 kDa)からなるセリン/スレオニンキナーゼであり、癌抑制因子p53をリン酸化することによりDNA損傷への応答を制御すると考えられている。VRK1の溶液構造をNMR法により決定するため、我々はこれまで無細胞タンパク質合成技術を活用して、高度重水素化標識試料、アミノ酸

VRK1, 選択標識, 無細胞タンパク質

○とちおなおや, こしばせいぞう, よこやまじゅん, よこやましげゆき, Yoon Ho Sup, きがわたかのり

選択標識試料、立体整列標識(SAIL)試料を調製し、各種三重共鳴TROSYスペクトルや三重／四重共鳴NOESYスペクトルを測定することで約90%の主鎖帰属を達成したことを前回報告した。さらに我々は、メチル選択標識試料を調製し、HMCM[CG]CBCAや三重／四重共鳴NOESYスペクトルを測定することで、メチル基の帰属およびNOEの帰属を行い、これまでに得られた主鎖の化学シフト情報やSAIL標識体由来の距離情報、残余双極子相互作用(RDC)の情報も活用することで、VRK1の立体構造決定に成功した。本研究を基に、高分子量蛋白質のNMR構造解析に有効な手法について議論する。

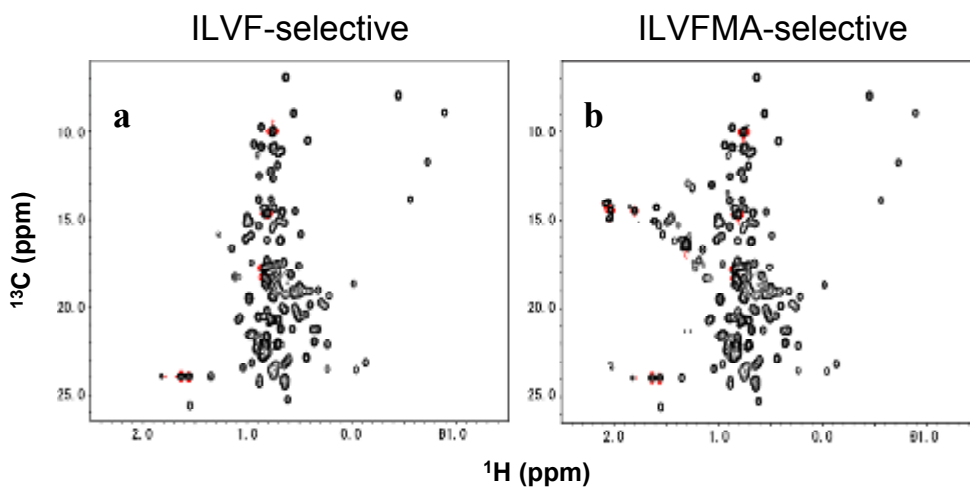


Figure 1. Methyl regions of $^1\text{H},^{13}\text{C}$ HSQC spectra of (a) ILVF- and (b) ILVFMA-selective labeled VRK1.



Figure 2. Solution structure of human VRK1.

L3

Deuterium-decoupled 3D HCA(N)CO に支援された 重水溶媒中におけるタンパク質の立体構造解析

○小椋賢治, 久米田博之, 稲垣冬彦
北海道大学大学院先端生命科学研究院

Structure determination of proteins in $^2\text{H}_2\text{O}$ solution aided by a deuterium-decoupled 3D HCA(N)CO experiment ⁽¹⁾

Kenji Ogura, Hiroyuki Kumeta and Fuyuhiko Inagaki
Faculty of Advanced Life Science, Hokkaido University

We developed an NMR pulse sequence, 3D HCA(N)CO, to correlate the chemical shifts of protein backbone $^1\text{H}\alpha$ and $^{13}\text{C}\alpha$ to those of $^{13}\text{C}'$ in the preceding residue. By applying ^2H decoupling, the experiment was accomplished with high sensitivity comparable to that of HCA(CO)N. When combined with HCACO, HCAN and HCA(CO)N, the HCA(N)CO sequence allows the sequential assignment using backbone $^{13}\text{C}'$ and amide ^{15}N chemical shifts without resort to backbone amide protons. This assignment strategy was demonstrated for $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -labeled GB1 dissolved in $^2\text{H}_2\text{O}$. The quality of the GB1 structure determined in $^2\text{H}_2\text{O}$ was similar to that determined in H_2O in spite of significantly smaller number of NOE correlations. Thus this strategy enables the determination of protein structures in $^2\text{H}_2\text{O}$ or H_2O at high pH values.

In protein NMR studies, backbone amide protons play an essential role in sequential resonance assignment of isotopically enriched proteins. Many NMR pulse sequences for $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -labeled proteins have been designed to detect the correlations between amide protons and other nuclei (e.g., ^{15}N , $^{13}\text{C}'$, $^{13}\text{C}\alpha$, and $^{13}\text{C}\beta$). However, under alkaline conditions, this assignment strategy is not applicable since amide protons cannot be observed due to the rapid exchange of amide protons with the solvent protons. Therefore, protein NMR studies are restricted to solutions with pH of less than 7.5. To overcome this problem, we propose a new pulse sequence, 3D HCA(N)CO, designed for $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -labeled proteins dissolved in $^2\text{H}_2\text{O}$, is presented for the correlation of a pair of $^1\text{H}\alpha$ and $^{13}\text{C}\alpha$ chemical shifts to the $^{13}\text{C}'$ chemical shift of the preceding residue. By combining HCA(N)CO with 3D HCAN, HCA(CO)N and HCACO, we propose a new sequential assignment strategy based on both the amide ^{15}N and $^{13}\text{C}'$ chemical shifts.

3D HCA(N)CO, ^2H decoupling, GB1

○おぐらけんじ, くめたひろゆき, いながきふゆひこ

The deuterium-decoupled 3D HCA(N)CO experiment (Fig. 1) is used to obtain inter-residue (and weaker intra-residue) connectivities between the $^1\text{H}\alpha$, $^{13}\text{C}\alpha$ and $^{13}\text{C}'$ nuclei. The pulse sequence is a so-called ‘out-and-back’ style. The final magnetization transfer path from $^{13}\text{C}\alpha$ to $^1\text{H}\alpha$ uses a gradient-enhanced scheme. For proteins dissolved in $^2\text{H}_2\text{O}$, the ^{15}N T_2 elongation due to ^2H -decoupling during the ^{15}N evolution or delay period is helpful to allow sensitivity enhancement of this experiment.

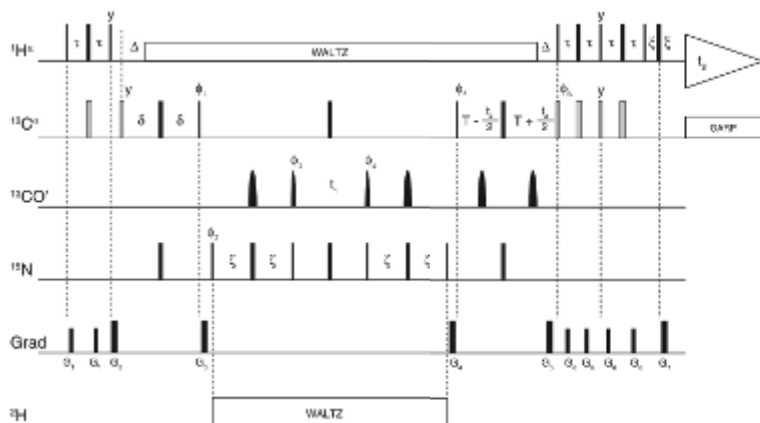


Fig. 1 Pulse sequence of the deuterium-decoupled HCA(N)CO experiment. Narrow and wide pulses have flip angles of 90° and 180° , respectively. All pulses are applied along the x -axis, except where otherwise indicated. ^1H broadband decoupling is performed with the 4.8 kHz WALTZ16 sequence. ^2H decoupling is performed with the WALTZ16 sequence using 0.3 kHz rf field centered at 7.5 ppm. $^{13}\text{C}\alpha$ decoupling during acquisition period is achieved using a 4.3 kHz GARP1 field. The carriers for the ^{15}N and $^{13}\text{C}'$ pulses are positioned at 56 and 174 ppm, respectively. The $^{13}\text{C}\alpha$ -selective 90° and 180° pulses (black bars) are applied at rf field strengths of 4.6 and 10.3 kHz, respectively, which are adjusted so that they do not excite $^{13}\text{C}'$ nuclei. The other ^{13}C pulses on 56 ppm (grey bars) are applied

with an rf field of 15.6 kHz. Carbonyl pulses have a shaped amplitude profile corresponding to the center lobe of a $\sin x/x$ function, and a duration of 89.2 and 80.8 μs for the 90° and 180° pulses, respectively. Durations are $\tau = 1.6$ ms, $\Delta = 3.3$ ms, $\delta = 14$ ms, $\zeta = 14$ ms, $T = 14$ ms, and $\xi = 0.6$ ms. Phase cycling is as follows: $\phi_1 = 4(y)$, $4(-y)$; $\phi_2 = 8(x)$, $8(-x)$; $\phi_3 = 2(x)$, $2(-x)$; $\phi_4 = 60^\circ$; $\phi_5 = x$, $-x$; $\phi_6 = x$; Acq. = x , $-x$, $-x$, x , $2(-x)$, x , x , $-x$, x , $-x$, $-x$, x . Quadrature detection in t_2 is obtained by inverting the polarity of G_3 together with ϕ_6 . The strengths and durations of gradients are: $G_1 = (0.5$ ms, 2 G/cm), $G_2 = (1$ ms, 15 G/cm), $G_3 = (0.3$ ms, 10 G/cm), $G_4 = (0.4$ ms, 13 G/cm), $G_5 = (2$ ms, 24 G/cm), $G_6 = (0.5$ ms, 2 G/cm), $G_7 = (0.5$ ms, 24 G/cm)

NMR experiments were carried out at 25°C on a sample of $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -labeled 1.2 mM *Streptococcal* GB1 domain dissolved in $^2\text{H}_2\text{O}$. The one- and three-dimensional spectra of HCACO, HCA(CO)N, HCAN, and HCA(N)CO were recorded on a Varian Inova 600 spectrometer. Figure 2 shows a comparison of the 1D spectra of HCACO, HCA(CO)N, HCAN, and HCA(N)CO with or without ^2H decoupling. As expected, HCACO (Fig. 2a) showed the highest sensitivity among the experiments. The sensitivities of other three spectra relative to the HCACO spectrum were 0.28 for HCA(CO)N (Fig. 2b), 0.47 for HCAN (Fig. 2c), and 0.13 for HCA(N)CO without ^2H decoupling (Fig. 2d). As the low sensitivity of the HCA(N)CO experiment was mainly due to the long delay time, we thought that ^2H

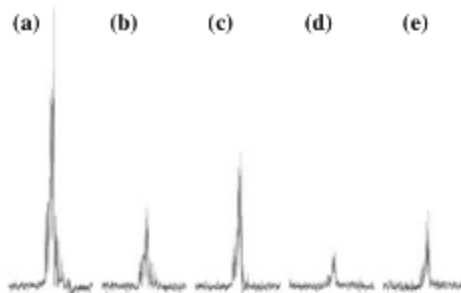
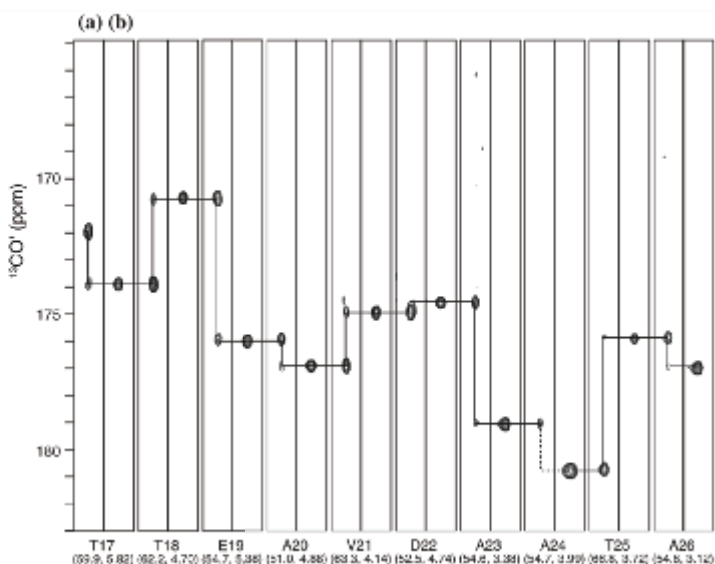


Fig. 2 Comparison of 1D spectrum of 1.2 mM $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -labeled GB1 in $^2\text{H}_2\text{O}$ recorded at 600 MHz with 16 scans: **a** HCACO, **b** HCA(CO)N, **c** HCAN, **d** HCA(N)CO without ^2H decoupling, and **e** HCA(N)CO with ^2H decoupling

decoupling during the ^{15}N evolution period or the delay would be effective in improving sensitivity. The sensitivity of the HCA(N)CO experiment by the introduction of ^2H decoupling (Fig. 2e) was increased about 2-fold, resulting in the relative sensitivities compared to those of the HCA(CO)N and HCACO to be 0.96 and 0.27, respectively. Therefore, we concluded that the HCA(N)CO experiment with ^2H decoupling can be practically applied to the resonance assignment of $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -labeled proteins dissolved in $^2\text{H}_2\text{O}$.

Figure 3 shows strip plots taken from the HCACO (right strips) and HCA(N)CO (left strips) spectra of the GB1 domain in $^2\text{H}_2\text{O}$ sliced at the $^{13}\text{C}\alpha$ and $^1\text{H}\alpha$ chemical shifts of the residues indicated along the x-axis. Solid lines connect the sequential assignment from Thr 17 to Ala 26 using the $^{13}\text{C}'$ chemical shifts. As described previously, the HCA(N)CO experiment shows the correlation from the $^{13}\text{C}\alpha$ and $^1\text{H}\alpha$ to the stronger $^{13}\text{C}'(\text{i}-1)$ and weaker $^{13}\text{C}'(\text{i})$ signals. As the HCACO experiment shows the $^{13}\text{C}'(\text{i})$ signals only, the $^{13}\text{C}'(\text{i}-1)$ and $^{13}\text{C}'(\text{i})$ signals can be easily distinguished on the HCA(N)CO strips. In Fig. 3, all the signals needed for the sequential assignment, except for $^{13}\text{C}'(\text{i})$ signal of Ala 24, were detected on the HCA(N)CO and HCACO strips. This sequential assignment process using the $^{13}\text{C}'$ chemical shifts was confirmed by another approach using ^{15}N chemical shifts taken from both the HCAN and HCA(CO)N spectra (data not shown).

Fig. 3 Strips from a 3D HCA(N)CO and b 3D HCACO spectra of GB1 in $^2\text{H}_2\text{O}$ taken at the $^{13}\text{C}\alpha$, $^1\text{H}\alpha$ chemical shifts of the residue indicated along the x-axis. Solid and dashed lines indicate the sequential backbone assignment paths using $^{13}\text{C}'$ chemical shifts from Thr 17 to Ala 26 of the GB1 domain



To verify the usefulness of the present assignment strategy and to assess quality of the NMR structure that does not resort to backbone amide protons, we examined the precision of the protein structure determined in $^2\text{H}_2\text{O}$. For this purpose, the structures of the GB1 domain dissolved in $^2\text{H}_2\text{O}$ and in H_2O were calculated using the Cyana software package. For the sample dissolved in $^2\text{H}_2\text{O}$, 749 cross peaks were incorporated from the ^{13}C -edited NOESY spectra whereas, for the sample dissolved in H_2O , 488 and 806 cross peaks were incorporated from the ^{15}N -edited and ^{13}C -edited NOESY spectra, respectively. The structures of GB1 were

calculated using NOE restraints obtained in the $^2\text{H}_2\text{O}$ and H_2O solutions (Fig. 4). The structural statistics are summarized in Table 1. Surprisingly, despite a lack of distance restraints from the ^{15}N -edited NOESY spectrum, the structural rmsd value of backbone atoms in the $^2\text{H}_2\text{O}$ solution (0.40 Å) is nearly equal to that in the H_2O solution (0.48 Å). The structural rmsd value is generally considered to depend on the number of long-range distance restraints, while short-range distance restraints do not contribute to the improvement in structural rmsd values. As summarized in Table 1, in $^2\text{H}_2\text{O}$ and H_2O solutions, 134 of 235 and 148 of 534 upper distance limits were categorized as long-range restraints, respectively. The structural rmsd values of GB1 in both solutions appears to be determined by the number of long-range distance restraints. In the aromatic region, in particular, the number of cross peaks were much larger in $^2\text{H}_2\text{O}$ than those in H_2O . This result shows that distance restraints derived from aromatic protons are essential to improving the structural rmsd because aromatic groups play a key role in the construction of the hydrophobic core of the protein.

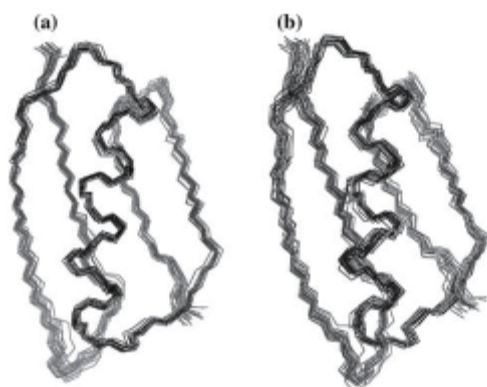


Fig. 4 Superposition of the low energy 20 structures of the GB1 domain calculated using distance restraints derived from the ^{13}C -edited NOESY in $^2\text{H}_2\text{O}$ (a) and the ^{13}C - and ^{15}N -edited NOESY in H_2O (b)

Table 1 NMR-derived restraints and structural statistics of the GB1 domain

| | In $^2\text{H}_2\text{O}$ | In H_2O |
|--|---------------------------|-------------------------|
| NOESY cross peaks | | |
| ^{15}N -edited NOESY | – | 488 |
| ^{13}C -edited NOESY (aliphatic region) | 636 | 722 |
| ^{13}C -edited NOESY (aromatic region) | 113 | 84 |
| NCE upper distance restraints | | |
| Short-range ($ i - j \leq 1$) | 74 | 318 |
| Medium-range ($1 < i - j < 5$) | 27 | 68 |
| Long-range ($ i - j \geq 5$) | 134 | 148 |
| Dihedral angle restraints (ϕ and ψ) | | |
| | 108 | 108 |
| Restrains violations | | |
| Distance restraints violated by >0.3 Å | 0 | 0 |
| Torsion angle restraints violated by $>3^\circ$ | 0 | 0 |
| Structural coordinates rmsd (3–55) (Å) | | |
| Backbone atoms | 0.40 | 0.48 |
| All heavy atoms | 0.99 | 1.00 |

Additionally, ^{13}C -edited NOESY experiments in $^2\text{H}_2\text{O}$ solutions provide some practical advantages over those in H_2O solutions as follow; (1) residual H_2O signals does not interfere with NOESY cross peaks in the $\text{C}\alpha$ - $\text{H}\alpha$ region, (2) increases in receiver gain allow the detection of relatively weak NOESY cross peaks, and (3) avoidance of baseline distortion and artifact noise generated from incomplete H_2O signal suppression allows the threshold level for peak picking to be lowered. Thus, it is concluded that the structure determination of small proteins dissolved in $^2\text{H}_2\text{O}$ is practically applicable, in spite of the lack of distance restraints derived from ^{15}N -edited NOESY spectra. The present strategy also allows the determination of the structure of proteins at alkaline pH values. This can benefit structure determination by NMR since proteins are much more soluble at higher pH values.

(1) K. Ogura, H. Kumeta & F. Inagaki: *J. Biomol. NMR* **47**, 243-248 (2010).

L4

蛋白質側鎖OH/SHの水素交換速度の解析

○武田光広¹、Chun-Jiun Yang²、JunGoo Jee²、小野明³、寺内勉³、
甲斐荘正恒^{1, 2}

¹名大院・理 ²首都大院・理工 ³SAIL テクノロジーズ (株)

NMR Hydrogen exchange study of side-chain OH/SH groups in proteins

○Mitsuhiro Takeda¹, Chun-Jiun Yang², JunGoo Jee², Akira Mei Ono³, Tsutomu Terauchi³
and Masatsune Kainosho^{1, 2}

¹ Graduate School of Science, Nagoya University, Nagoya, Japan.

² Graduate School of Science and Engineering, Tokyo Metropolitan University.

³ SAIL Technologies

Side-chain hydrogen bonds in proteins play an important role in stabilizing their structures and mediating their functions. Especially, slowly exchanging hydroxyl (OH) and sulfhydryl (SH) groups are assumed to have structurally or functionally important roles. However, there were no means to exclusively identify such slowly exchanging OH/SH groups in proteins. Here we present a new method for evaluating the hydrogen exchange rates of individual side-chain OH/SH groups in a protein. In this approach, the carbon atoms attached to the OH/SH groups are selectively enriched by ¹³C, and their NMR signals are observed in a H₂O/D₂O mixture, where isotopomer-resolved peaks are observed for slowly exchanging groups. We present the application of this method in terms of protein structure determination and interactions.

蛋白質側鎖の水酸基(OH)、サルフィドリル基(SH)を介した側鎖水素結合は、蛋白質の構造安定化や機能発現に重要な役割を担う。一般に溶液中においては、同水素結合は短寿命で水との交換速度が非常に速いが、蛋白質中や蛋白質ーリガンド間には水との交換速度が遅い長寿命の側鎖水素結合が形成される場合もある。このような溶液中において安定に存在する水素結合を網羅的に同定しNMRにより解析することは蛋白質の構造安定化や分子間相互作用の理解において重要な知見を与えてくれる。

我々は新たに同位体シフト効果と安定同位体標識技術を利用したOH/SHの水素交換速度解析法を開発した。従来のNMR水素交換実験では交換性水素を観測対象とするが、本手法では官能基に隣接した炭素を軽水/重水(1:1)混合溶液中において観測する点を特徴とする。同炭素の化学シフト値は結合した官能基の交換性水素が軽水素と重水素との場合とで同位体シフト効果により変化する。そのため、軽水/重水混合溶媒中において同炭素を観測すると、水素/重水素交換が同位体シフト差の時間スケール(～10s⁻¹)より遅い場合、2つの同位体異性体シグナルが分離して観測され、逆に交換が速ければ平均化したシグナルが観測される。本手法は同現象の観測に基づいており、

SAIL, 側鎖交換性水素, 水素結合

○たけだみつひろ, ちゅんじゅん やん, じゅんぐー じー, おの
あきら, てらうち つとむ, かいのしょうまさつね

その成否は同位体シフトによるシグナル分裂を明瞭に観測可能か否かにある。そこで、我々はSAIL技術[1]を利用し本解析に最適な安定同位体標識パターンを持つ各種アミノ酸を合成した。例えば、チロシンOHの解析の場合、芳香環の $^{13}\text{C}_\zeta$ 原子が観測対象となるので、Fig. 1に示す安定同位体標識パターンを持つ、 ζ -SAIL Tyrを合成した。同アミノ酸の芳香環は、 $^{13}\text{C}_\zeta$ 以外の芳香族炭素は ^{12}C としている。また、芳香族水素は ϵ 位を重水素化して、 $^1\text{H}_\delta$ - $^{13}\text{C}_\zeta$ 間相関スペクトルによる $^{13}\text{C}_\zeta$ の帰属を可能としている。 ζ -SAIL Tyrを分子量 18.2 kDaの大腸菌シストランソイソメラーゼ(EPP1b)に取り込ませその ^{13}C スペクトルを測定すると、鋭な $^{13}\text{C}_\zeta$ シグナルが観測された(Fig. 2)。同タンパク質は、3残基のチロシン(30, 36, 120)を含むが、軽水/重水(1:1)混合溶媒においては、Tyr-30とTyr-36において $^{13}\text{C}(-\text{OH})$ と $^{13}\text{C}(-\text{OD})$ の位置に対応したシグナルが分離して観測されたのに対して、Tyr-120においては、その中間の位置に平均化されたシグナルが観測された。この結果は、前者2つのOHの交換速度が同位体シフト差の時間スケール(この場合 $\sim 40 \text{ s}^{-1}$)より遅く、後者はそれより速いことを示す[2]。

本発表では、同原理に基づく、EPP1b蛋白質中のシステ

インのSH[3]、セリン、スレオニンのOHの解析と、その応用研究としてNMR構造の精密化と蛋白質リガンド間側鎖水素結合の解析について紹介する。

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

[参考文献]

- 1) M. Kainosho, et al., (2006) *Nature* **440**: 52-57.
- 2) M. Takeda, et al., (2009) *J Am Chem Soc* **131**: 18556-18562.
- 3) M. Takeda, et al., (2010) *J Am Chem Soc* **132**: 6254-6260.

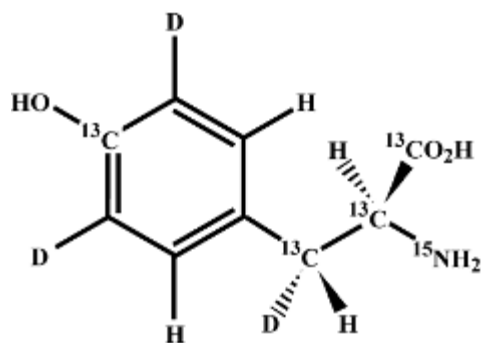


Figure 1. Stable isotope labeling pattern of ζ -SAIL Tyr. ^{12}C atoms are not shown in the figure.

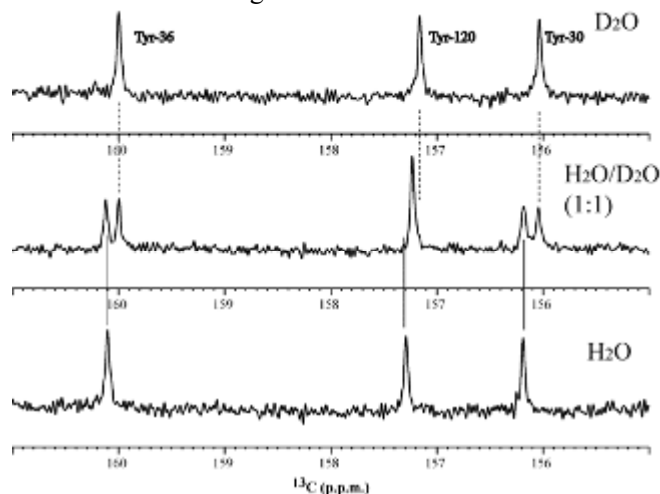


Figure 2. Observation of deuterium isotope shift effect on the $^{13}\text{C}_\zeta$ peaks. ^1H -decoupled ^{13}C NMR spectra on 0.5 mM of EPP1b selectively labeled by ζ -SAIL Tyr under conditions of 100% H_2O , 50% $\text{H}_2\text{O}/50\% \text{D}_2\text{O}$ and 100% D_2O at 40 °C and 14.1 T. $^{13}\text{C}_\zeta$ atoms attached to slowly exchanging OH groups gives two-line signals in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (1:1) mixture.

L5

高圧力 NMR 法による Lys48 結合型ジユビキチンの構造揺らぎ

○北原亮、平野貴志、矢木真穂、秦和澄、赤坂一之、加藤晃一
立命大・薬¹、名市大院・薬²、岡崎統合バイオ分子研³、近大・高圧研⁴

High-pressure NMR characterizes conformational fluctuation of Lys48-linked diubiquitin

Ryo Kitahara¹, Takashi Hirano², Maho Yagi^{2,3}, Kazumi Hata¹, Kazuyuki Akasaka⁴ and Koichi Kato^{2,3}

¹College of Pharmaceutical Sciences, Ritsumeikan University, Kusatsu, Japan, ²Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya-City University, Nagoya, Japan, ³IMS Okazaki National Institute, Okazaki, Japan, ⁴High Pressure Protein Research Center, Kinki University, Kinokawa, Japan

Comparisons of pressure induced changes in chemical shifts and spin-spin relaxation constants R_2 between mono-ubiquitin and K48-linked linear diubiquitin at neutral pH, showed that high pressure stabilized the “open” conformation for the linear diubiquitin. In addition, both proximal and distal subunits exhibited the alternative form N_2 under high pressure as observed in mono-ubiquitin. Intriguingly, the pressure induced N_1 -to- N_2 conformational transition also took place in the subunits of cyclic diubiquitin which was a model of the “closed” form of diubiquitin. The transition into N_2 taking simultaneous reorientations of the C-terminal segment and helix could render the interfacial hydrophobic groups between the subunits well hydrated, resulting in the “open” conformation of linear and cyclic diubiquitin. We think that the open-closed motion of diubiquitin is tightly coupled with the intrinsic conformational fluctuation of subunits.

緒言： ポリユビキチンはプロテアソームを介した蛋白質分解のシグナルとしての役割など多くの分子と相互作用するため、分子認識の観点からその構造揺らぎの解明が必要となる。相互作用標的が多様であることに加え、Lys11 または Lys48 を介したポリユビキチン化により機能が異なるなど、構造と機能の分子基盤は不明である。我々は、コンフォメーション平衡の研究に優れた高圧力 NMR 法によりユビキチン、NEDD8、SUMO2 など複数のユビキチン様蛋白質での比較解析から、E1-E2-E3 カスケードを有するユビキチンホモログ間にものみ保存された高エネルギー構造（準安定

高圧力、ポリユビキチン、構造揺らぎ

○きたはらりょう、ひらのたかし、やぎ・うつみまほ、はたかずみ、あかさかかずゆき、かとうこういち



Fig.1 : K48-linked diubiquitin. (Left) open conformation. (Right) Closed conformation.

構造、局所変性構造)の存在を明らかにした。ポリユビキチンの構造揺らぎの制御機構の解明を目的として、2つのユビキチンが重合した K48 結合型ジユビキチンについて各ユビキチンサブユニットの構造揺らぎと、2つのサブユニットの配向 (Fig. 1) の圧力効果について検証した。

実験 : 遠位、近位を別々に ^{15}N 同位体標識した直鎖型ジユビキチンを作成した。Closed 構造のモデルとして2つのサブユニットの K48 と G76 を互いに結合した環状型ジユビキチンも作製した。3000 気圧(20 °C, pH6.8)までの範囲で上記3つの試料について ^{15}N -HSQC 測定、 ^{15}N スピンスピン緩和測定を行った。

結果と議論 : 直鎖型ジユビキチンの遠位サブユニット、近位サブユニットおよび環状ジユビキチンについて、単体ユビキチンと化学シフトの比較解析を行った。直鎖状及び環状ジユビキチンでは、X 線結晶構造解析により知られている closed 構造にてサブユニット間の疎水界面に位置する残基で化学シフト差が明確であった。このことは、溶液中でも同様の closed 構造をとることを示唆する。単体ユビキチンと環状ユビキチンの化学シフト値を完全な open 構造と closed 構造の極限值と考えると、溶液中の直鎖状ジユビキチンでは closed 構造に比べ open 構造が安定であった。加圧により、直鎖型及び環状型で観測された化学シフト差は小さくなり、3000 気圧では結合部分を除き単体のそれと一致した。これは、直鎖型、環状型ともに加圧下でサブユニット界面が水和した open 構造が安定化されたことを示すとともに、open 構造が closed 構造に比べ部分モル体積が小さいことを意味する。

スピンスピン緩和速度定数の圧力依存性から、直鎖型ジユビキチンの遠位、近位サブユニットともに、加圧により α ヘリックスと C 末端 β ストランド部分で R_2 値の増加が観測された。この結果は以前報告した単体のそれと類似しており、各サブユニットで N_2 構造への状態転移が生じていることを示す。一方、環状ジユビキチンでは、 α ヘリックスと C 末端 β ストランド部分に加え、サブユニット界面の多くの部位で僅かながら R_2 の増加が観測された。環状ジユビキチンにおいても、水和した open 様構造へ転移したことを示し、転移がマイクロ～ミリ秒領域で生じていることも示唆する。環状ジユビキチンの例が示すように、分子全体のコンフォメーション変化が、サブユニットが有する固有の3次構造揺らぎとともに生じている点は大変興味深い。

第二日目
11月16日(火)
英語セッション

**Day 2 (Nov. 16, Tue.)
(English Session)**

L6

蛋白質・ペプチドの溶液 NMR へのスルホベタイン類の応用

○若松 馨¹, 王海梅¹, 五十嵐 麗樹¹, 神谷 歩¹, 高橋 雅彦¹, 手塚 福栄¹, 向 隴¹, 石井 毅¹, 細田 和男¹, 行木 信一¹, 菅瀬 謙治²

¹群大・工

²サントリー生物有機科学研究所

Application of sulfobetaines to solution NMR of proteins and peptides

○Kaori Wakamatsu¹, Haimei Wang¹, Kazuki Igarashi¹, Ayumi Kamiya¹, Masahiko Takahashi¹, Fukuei Tezuka¹, Long Xiang¹, Takeshi Ishii¹, Kazuo Hosoda¹, Nobukazu Nameki¹, Kenji Sugase²

¹Graduate School of Engineering, Gunma University, Kiryu, Gunma, Japan.

²Suntory Institute for Bioorganic Research, Shimamoto-cho, Osaka, Japan.

Aggregation of proteins and peptide results in low purification yields as well as poor spectral qualities. We previously reported that non-detergent sulfobetaines (NDSBs) are quite useful in protein NMR because they stabilize proteins against heat and prevent precipitation of protein-peptide complexes. Here we report that NDSBs are also useful for preparing protein and peptide samples and that NDSBs are better additives for high temperature NMR measurements than amino acids. We will also discuss the mechanisms whereby NDSBs stabilize proteins and guidelines for using NDSBs in sample preparation and NMR measurements.

【はじめに】

蛋白質やペプチドが凝集すると NMR スペクトルの質が劣化するだけでなく、サンプルの調整も困難になる。NDSB 等のスルホベタイン類は蛋白質の安定性を高め、高温での NMR 測定を可能にする事、蛋白質・ペプチド複合体の凝集沈殿を防ぐ事を発表者らは報告してきた。今回、スルホベタイン類の凝集防止作用は蛋白質やペプチドの精製の迅速化と収率向上に有用である事、凝集しやすいペプチドの安定化にも有効である事を報告する。また、アルギニン/グルタミン酸などの凝集防止剤に比べて、NDSB は高温でも良質のスペクトルを与えることを報告する。更に、スルホベタインの安定化メカニズムについても議論する。

【結果】

(1) サンプル調製への NDSB の応用：

m4I3C(14)はGPCRの一種であるm4ムスカリン性アセチルコリンレセプターの部分ペプチドで、m4レセプターと同様Gi1αを特異的に活性化することができるため、GPCRとGTP結合蛋白質との相互作用の解析に役立つと期待される。しかし、このペ

安定化, 凝集, サンプル調製

○わかまつ かおり, おう かいばい, いがらし かずき, かみや あゆみ, たかはしまさひこ, てづか ふくえい, こう りゅう, ほそだ かずお, なめき のぶかず, すがせ けんじ

プチドは凝集してアミロイド化しやすいという問題があった。我々が合成した NDSB-new は m4I3C(14) のアミロイド化を防止し、分解能の高いスペクトルを与えた。

安定同位体ラベルした m4I3C(14) はユビキチンとの融合タンパク質として発現させるが、この融合タンパク質も凝集しやすく、通常の限外濾過では 50 μ M 以上に濃縮する事ができなかった。しかし、NDSB-new の存在下では 2 mM まで濃縮しても沈殿しなかった。また、この融合タンパク質の HSQC スペクトルはモノマーのユビキチンのシグナルを示した。同様に、凝集しやすい aFGF も NDSB-new を加えることにより、限外濾過中に凝集・目詰まりを起こさず、高い収率で迅速に精製することができた。

(2) NDSB と他の凝集防止剤との比較：

アルギニンとグルタミン酸を 50 mM ずつ添加すると、蛋白の凝集が効果的に防止され、良質のスペクトルが得られると報告されている。そこで、これらのアミノ酸やグリセロールが NDSB のように高温でも良質のスペクトルを与えるかを調べた。その結果、アルギニンとグルタミン酸の等モル混合物（やアルギニンのみ）の存在下では蛋白質の熱安定性が低下し、高温での感度が大きく低下すること、グリセロールは熱安定性は NDSB 同様高めるが、粘度上昇のためにスペクトルの質が低下することがわかった。なお、NDSB の種類により熱安定化の効果は大きく異なり、凝集は強く防止してもスペクトルの質を低下させる物がある事がわかった。すなわち、凝集防止と良質のスペクトルとは直接対応しないので、サンプルに凝集体が観察されないことだけを指標にサンプル条件を最適化すると、期待通りのスペクトルが得られない可能性がある。

(3) NDSB が蛋白質の安定性を向上させるメカニズム：

NDSB が蛋白質を安定化するメカニズムとして、(i) グリセロールのように水和を上昇させる、(ii) 疎水性表面をマスクする、(iii) 蛋白質分子をコンパクトにする、(iv) 蛋白質のくぼみに入り込む、など多くの可能性が考えられる。発表では種々の物理化学的手法を用いて解析した結果について報告し、安定化のメカニズムについて議論する。

(4) NDSB の利用方法：

NDSB を蛋白やペプチドの NMR に利用する時の指針についても報告する予定である。

L7

Allosteric Control of Environmental Sensors

Kevin H. Gardner¹

¹*Departments of Biochemistry and Pharmacology, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, TX USA*

Many biological processes are regulated by environmental cues *via* control of protein conformation, leading to functional changes. Commonly, this is mediated by sensory protein domains that bind both protein targets and biochemical cofactors, using changes in the concentration or conformation of those cofactors to trigger allosteric changes in the sensory domain. Notably, domains with the same overall structure can be extremely versatile, using different input stimuli and effector activities in various proteins.

To understand the mechanisms used by these sensory domains in diverse settings, we have relied on solution NMR spectroscopy in combination with other biophysical and biochemical approaches. One route we have pursued is to compare the properties of several members of one family of regulatory domain: the Per-ARNT-Sim (PAS) domains, found in thousands of proteins found in all three kingdoms of life. As expected, these small modules (~130 aa) participate in both intra- and intermolecular protein/protein interactions essential for this regulation. Intriguingly, many PAS domains internally bind organic cofactors that confer sensitivity to various different stimuli, thus integrating sensory and regulatory functions within a small protein domain.

Here I will present results from our studies of photosensory PAS domains, which utilize *in situ* laser irradiation of samples during NMR experiments to trigger a light-induced covalent bond formation within these proteins. This bond formation generates protein conformational changes that unfold a critical alpha-helix, leading to activation of downstream effectors. We have used a combination of experimental and computational approaches to further examine this linkage, letting us quantitatively describe how alterations in protein/cofactor interactions perturb the folding/unfolding equilibrium and subsequent functional state of the protein.

In parallel, NMR, crystallographic and functional studies on PAS domains from the human hypoxia response system have provided a foundation for understanding how these domains serve within heterodimeric transcription factors. Interestingly, these domains share several common features with the light-regulated systems, including ligand binding and alternative protein conformations, despite having completely different biological contexts. Taken together, these data identify common facets of PAS-based signaling and lay the foundation for artificial control of these systems in the future.

L8

RNAアプタマー:プリオンタンパク質部分ペプチド複合体の構造及びA3Gタンパク質のDNA上のスライディングの解析

古川亜矢子¹, 真嶋司¹, 岩岡諒¹, 越田高史¹, 永田崇², 森下了³, 梁明秀⁴, 高折晃史⁵, 西川富美子⁶, 西川諭⁶, 〇片平正人¹

¹京大・エネ研, ²横浜市大・生命ナノ, ³セルフリーサイエンス, ⁴横浜市大・医, ⁵京大・医, ⁶産総研

Structure of RNA Aptamer:Prion Protein Complex and Sliding of A3G on DNA

Ayako Furukawa¹, Tsukasa Mashima¹, Ryo Iwaoka¹, Takafumi Koshida¹, Takashi Nagata², Ryo Morishita³, Akihide Ryo⁴, Akifumi Takaori⁵, Fumiko Nishikawa⁶, Satoshi Nishikawa⁶ and 〇Masato Katahira¹

¹Institute of Advanced Energy, Kyoto Univ., ²Nanobio., Yokohama City Univ., ³CellFree Sci., ⁴Grad. Sch. Med., Yokohama City Univ., ⁵Grad. Sch. Med., Kyoto Univ., and ⁶AIST.

RNA aptamer against the prion protein has the potential toward its therapeutic application. We already reported the unique quadruplex structure of the aptamer. Here, we present the structural analysis of the aptamer in complex with the binding region of the prion protein. The stacking interaction between the guanine tetrad plane of the aptamer and the Trp residue of the prion protein contributes to binding. The electrostatic interaction between the phosphate groups of the aptamer and the Lys residues of the prion protein also seems to contribute.

We demonstrated that the enzymatic reaction (deamination) of anti-HIV A3G protein can be monitored in real-time by using NMR signals. Then, the monitoring suggested that A3G slides on DNA with a 3'→5' directionality. Here, we present the recent applications of the real-time monitoring to examine the sliding model.

[序]

①プリオンタンパク質に対するRNAアプタマーの複合体の解析 正常型プリオンタンパク質に対するRNAアプタマーは、高い親和性で結合して正常型を安定化する事で、異常型への転換を阻害する事ができる。この為プリオン病の治療への応用が期待されている。またプリオンタンパク質は、アルツハイマー病を引き起すと考えられているアミロイドβオリゴマーの受容体である事が最近分かった。そしてRNAアプタマーを結合させる事によってプリオンタンパク質を不活化する事で、アルツハイマー病の発症を抑制できる可能性が指摘されている。我々は昨年、プリオンタンパク質に対するRNAアプタマーが、特異な4重鎖構造を形成する事を報告した。またプリオンタンパク質のどの部位にアプタマーが結合するのかも同定した。今回は、RNAアプタマーとプリオンタンパク質の結合部位の複合体の構造解析の結果を報告する。

アプタマー, リアルタイムモニタリング, プリオン

ふるかわあやこ, ましまつかさ, いわおかりょう, こしだたかふみ, ながたたかし, もりしたりょう, りょうあきひで, たかおりあきふみ, にしかわふみこ, にしかわさとし, 〇かたひらまさと

②A3Gタンパク質の酵素反応のリアルタイムモニタリングとスライディングモデルの検証 我々は昨年、抗HIV活性を有するヒトA3Gタンパク質の酵素(デアミネーション)反応を、NMRシグナルを用いてリアルタイムでモニタリングできる事を示した。そしてこのモニタリングの結果、A3GがDNA上を3' →5' の方向性を持ってスライディングする事が示唆された。今回モニタリングの手法のさらなる応用を行い、スライディングモデルの検証を行った結果を報告する。

[結果と考察]

①プリオンタンパク質に対するRNAアプタマーの複合体の解析

RNAアプタマーr(GGAGGAGGAGGA)とプリオンタンパク質の結合部位ペプチド12-merの複合体の構造解析を行った。当初100 mMの塩濃度下で解析を行った際には、アプタマーとの分子間NOEが、ペプチドのN末側にのみ観測された。次に塩濃度を5 mMまで下げたところ、分子間NOEがペプチドのC末側にも観測されるようになった。最終的な構造解析はこの条件下で行った。

アプタマーが形成するグアニン-テトラッド平面と結合ペプチドのトリプトファン残基との間でスタッキング相互作用が見出された。またアプタマーのリン酸基と結合ペプチドのリジン残基との間の静電相互作用も見出された。これらの相互作用は、結合ペプチドの変異体を用いた結合能変化の実験ともよく一致していた。

プリオンタンパク質上のアプタマーが結合する部位は、アミロイドβオリゴマーが結合する部位と重なっている。従って本アプタマーによって、プリオンタンパク質のアミロイドβオリゴマーの受容体としての機能を阻害できる可能性が示唆される。

②A3Gタンパク質の酵素反応のリアルタイムモニタリングとスライディングモデルの検証

A3Gによるデアミネーション反応の基質となるシトシンを離れた位置に2つ配した1本鎖DNAを用い、NMRシグナルを利用した反応のリアルタイムモニタリングを行った。昨年度報告したように、DNAの5' 端寄りに配置されたシトシンの方が、3' 端寄りに配置されたシトシンより、効率的にデアミネーションされてウラシルに変換される事が確認された。

次に2つのシトシンの間の1本鎖DNA領域に相補的なDNAを添加する事で、この領域を2本鎖状態とした。A3Gは2本鎖DNAには結合できないので、これによって2つのシトシン間をスライディングによって移動する事ができなくなる。この条件下で反応のモニタリングを同様に行った。その結果2重鎖領域の導入によって、5' 端寄りに配置されたシトシンと3' 端寄りに配置されたシトシンの反応の起こり易さが、影響を受ける事が分かった。これはスライディングモデルを支持する結果だと考えられる。

本リアルタイムモニタリングの手法は、従来の生化学的な解析手法と比べて、高い空間分解能と時間分解能を有している。空間及び時間分解能をさらに高める事を目指して、DNA上の特定のシトシン残基にのみ¹³C安定同位体標識を施したものを複数調製した。これらを用いたリアルタイムモニタリングの実験も現在進行させている。

L9

NVL2のN末端にある新規ヌクレオリン結合ドメインの構造と機能

藤原芳江¹, 藤原健一郎², 合田名都子¹, 岩谷奈央子^{1,3}, 天野剛志¹, 白川昌宏³, ○廣明秀一¹

¹神戸大・院医・構造生物学, ²塩野義製薬研究所・³京大・院工・分子工学

Structure and Function of The N-Terminal Nucleolin Binding Domain of Nuclear Valocine Containing Protein Like 2 (NVL2)

Yoshie Fujiwara¹, Ken-ichiro Fujiwara², Natsuko Goda¹, Naoko Iwaya^{1,3}, Takeshi Tenno¹, Masahiro Shirakawa³, ○Hidekazu Hiroaki^{1,2}, and Daisuke Kohda¹

¹*Division of Structural Biology, Graduate School of Medicine, Kobe University, Hyogo, Japan.*

²*Shionogi Reserch Laboratories, Shionogi & Co. , Osaka, Japan*

³*Division of Molecular Engineering, Graduate School of Engineering, Kyoto University, Kyoto, Japan.*

N-terminal regions of AAA-ATPases (ATPase associated to various cellular activities) often contain a domain that defines the specific functions of the enzymes such as substrate specificity and subcellular localization. Thus, determination of 3D structure of N-terminal domains of AAA-ATPases may address its molecular function. We have determined the solution structure of an N-terminal unique domain (UD) isolated from nuclear VCP-like protein 2 (NVL2^{UD}). NVL2^{UD} contains three alpha helices whose organization resembles that of a winged-helix motif, whereas a pair of β -strands is missing. The structure is unique and distinct from other known AAA-ATPases, such as VCP (class-II) or MIT-domain of Vps4 (class-I). The domain solely exhibited nucleolar localizing activity when expressed in *HeLa* cell. We also identified nucleolin from *HeLa* cell extract as binding partners of this domain.

近年のゲノム研究から、高等生物の遺伝子産物の7割以上がマルチドメイン蛋白質であることが明らかになった。マルチドメイン蛋白質の物性の統一的な理解は多くの蛋白質の機能発現機構の解明につながり、生命現象の本質的な理解に貢献する。我々は、分子中央に共通のAAAドメインを持ち、多彩な細胞機能に係るAAA-ATPaseを研究対象として、マルチドメイン蛋白質に共通の分子機構の解明を進めている。AAA-ATPaseはATPの加水分解エネルギーを利用して分子シャペロンとして機能する酵素である。ペルオキシソーム形成不全症に関連する遺伝子産物(PEX1/PEX6)、神経伝達物質放出時の膜融合(NSF)、ER依存的蛋白質分解による品質管理(VCP)、有糸分裂に必要な微小管切断酵素(katanin)、ウイルス増殖時の膜構造変形(Vps4)、など医学・生物学的にも重要な遺伝子産物を多く含んでいる。こうしたAAA-ATPaseの機能の多様性は、配列の

Relaxation analysis, Tom20, Presequence

ふじはらよしえ, ふじはらけんいちろう, ごうだなつこ, いわやなおこ, てんのたけ

し、しらかわまさひろ, oひろあきひでかず

相同性が特に低いN末端ドメインが担っていると予想される(Fig. 1)。そこで、我々は構造生物学の観点からI型/II型AAA-ATPaseのと機能分類を進めるために、それぞれのN末端ドメインの解析を半網羅的に行ってきた。これまでに、当時立体構造未知であったPEX1のN末端ドメイン(ref 1)、Vps4のN末端MITドメイン(ref 2)、katanin p60のN末端のMITドメインバリエーションの構造決定を行ってきた (Fig 2)。今回、II型AAA-ATPaseの中でも他との配列相同性の低い、核内VCP様タンパク質2 (NVL2 = nuclear VCP-like protein 2)のN末端の新規ドメインの溶液構造を決定し、さらに構造に基づいてその細胞内機能の精査を行ったので報告する。このドメインは同じ遺伝子のスプライシングバリエーションNVL1には完全に欠如していることから、我々はNVL2-unique domain (NVL2^{UD})と命名した。

【実験】

【バイオフィォマティクス解析によるドメイン境界の決定】

NVL2の配列情報解析の結果からは、NVL2のN末端およびオルトログと考えられるショウジョウバエsmallmindedまで比較的高い保存性を示した。なお、NVL2の機能ホモログとして考えられていた酵母Rix7には相同性は認められなかった。新規、構造未知のドメインの立体構造を決定するにあたり、我々はCLUSTALXを用いた相同性検索、GlobProtや須山らの開発したDomCutによるドメイン境界予測などを用いて、mouse NVL(1-93)をNMR試料候補とした。しかし、この試料の¹H-¹⁵N-HSQCのスペクトルは、構造決定に理想的ではなかった。これはドメイン末端に存在するcoiled-coil形成可能性の高い残基のためであると考えられた。そこでcoiled-coil予測プログラムCOILSを利用して、coiled-coil形成をnegative designしながら、C末端側を段階的に切除していくことで、HSQCスペクトルの質の向上が見られた。そのようにしてmouse NVL2(1-72)を構造決定とした。併せて、今回用いたcoiled-coilのnegative design法を利用してドメイン境界を精密決定するサーバ “Domain boundary optimizer” を作成し、公開している(ref 4, 5)。

【NMR構造決定】

NMRシグナルの解析は約0.7mMの¹³C/¹⁵N-NVL2^{UD}試料を用いて、500MHzおよび600MHz NMR装置を用いて定法により行った。立体構造計算は、当初CYANA 2.0.17を、最終的な計算をCYANA 2.1を用いて行い、得られた結果を更にCNS 1.2を用いて精密化した。CYANAの二つの構造計算結果およびCNSによる最終的な精密構造の間の差はわずかである。立体構造計算には計994個のNOEによる距離制限情報、計46x2

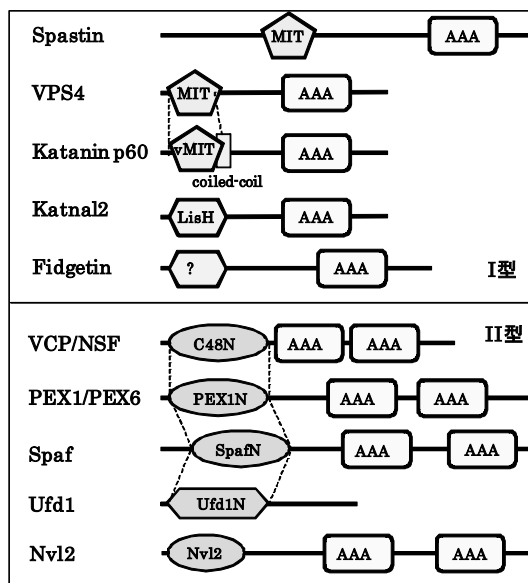


Fig. 1 Domain architectures of AAA-ATPases

個のTALOSから得られた主鎖二面核制限情報、H/D交換実験から決定された20組の水素結合情報を用いた。得られた20構造のアンサンブルの主鎖RMSDは0.42Å、側鎖重原子を含めると1.04Åであった。構造ならびに化学シフト情報はPDBおよびBMRBに登録した(PDB:2RRE, BMRB:11250)。

【相互作用パートナーの探索】

10%FBSを添加した

DMEM培地中で培養したHeLa細胞を、およそ107個集めて、細胞抽出総蛋白質を調製した。この細胞抽出液を大腸菌にて組換え生産したGST-NVL2(1-93)またはGSTのみと氷上で混合し、グルタチオンセファロースで捕集したのち、SDS含有バッファで溶出した。得られた溶液をSDS-PAGEで解析したところ約32kDの位置に特異的に結合した蛋白質バンドが認められたため、それをゲルから切り出し、質量分析装置により同定した。得られたのは核小体蛋白質nucleolinのC末フラグメントであった。全長のnucleolinがNVL2と相互作用するかどうかを調べるために、GST-NVL2(1-74)に結合する蛋白質を、抗nucleolin抗体を用いてWestern blottingにより検出した。

【結果と考察】

NVL2^{UD}は、互いに直行する3本のhelixからなり、構造的にはwinged-helix-turn-helixモチーフのhelix部分の構造に類似していた(Fig. 3., ref. 6)。またこのドメインは核小体局在シグナルをもち、ドメイン単独で核小体に局在することを確認した。HeLa細胞抽出液を用いた、NVL2^{UD}の結合相手の探索実験からは、核小体の主要な構造蛋白質の一つnucleolinのC末端断片が得られた。そこで、再度HeLa細胞抽出液を樹脂に固定させたNVL2^{UD}に反応させ、その溶出液に対して抗nucleolin抗体を用いて免疫検出を行ったところ、nucleolin全長ならびにいくつかの分解物が検出された。更に、nucleolinのN末端の長大な天然変性領域部分を省いたC末端およそ半分を大腸菌で組換え発現し、



Fig. 3 Solution structure of NVL2 unique domain. The residues corresponding to nucleolar localization signal are shown (right).

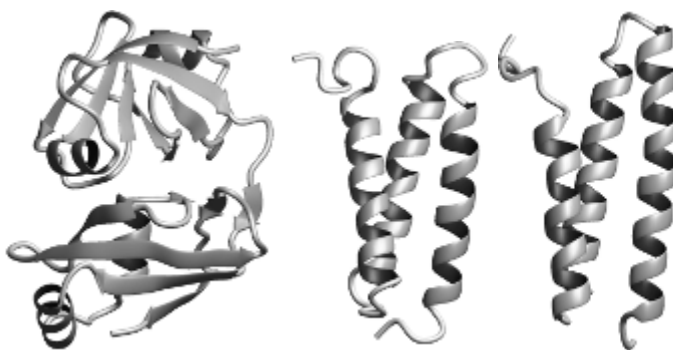


Fig. 2 Examples of 3D structures of N-terminal domains of AAA-ATPases. left, PEX1-NTD (PDB:1WLF), middle, MIT-domain of hVps4b (PDB:1WR0), right N-terminal variant MIT-domain of katanin p60 (PDB:1RPA).

NVL2^{UD}との相互作用を検証したところ試験管内での結合が見られた。しかしこの結合は、系にRNaseを入れて混入しているRNAを消化除去してしまうと著しく減弱することから、大腸菌から持ち込まれたRNA成分が介在した相互作用であることが示唆された。これらの結果から、NVL2^{UD}の核小体局在モチーフR/K-R/K-X-R/Kの核小体局在は、核小体蛋白質nucleolinへの単純な結合ではなく、一本鎖RNA+ nucleolin複合体を認識していることが示唆された。このメカニズムは、他の核小体局在シグナルの局在機構とも共通である可能性が高い。

今回の解析結果に、これまで我々が行ってきた他のAAA-ATPaseの分子機能の類似性をあわせて考察すると、NVL2は他のAAA-ATPaseとは異なる分子ロジックを内包していることが顕著になった。例えば微小管切断酵素、katanin p60のN末端ドメインの構造と微小管認識部位は、配列相同性が低いにもかかわらず、同じI型AAA-ATPaseに属するVps4のMITドメインと基質であるESCRT-IIIとの相互作用部位とよく似ていた。Vps4は、細胞膜や後期エンドソーム膜上で繊維を形成するESCRT-III複合体を切断・脱重合する酵素であり、微小管を切断するkatanin p60とよく似ている。同じような構造=機能間の類似関係は、II型AAA-ATPaseであるペルオキシソーム形成因子PEX1のN末端ドメインと、VCP/p97の構造および細胞内機能との間にも見出されている。しかし、今回解析した、NVL2^{UD}はこれらのどれとも似ていないユニークなヒストン様フォールドを持つドメインであり、オルガネラ膜近傍で働く他のII型AAA-ATPaseとは構造、機能の両面で異なっていた。

【今後の展望】

構造の類似性を機能メカニズムの相似性に拡張する我々の手法は、AAA-ATPaseの分子機構の理解に有効である。AAAドメインを分子の動力部とするならば、そのN末端はそのAAA-ATPaseの機能を特徴付ける固有のドメインが位置していて、分子機能に特化したアタッチメントに相当する、というのがその一般則である。構造ならびに相互作用インタフェースの空間的類似性をもとに、マルチドメイン蛋白質の分子が内包する作動原理を解明するという今回試した手法を、今後は更に多くのマルチドメイン蛋白質の機能解明に役立てていきたい。そのためには、ドメインの立体構造情報のみならず、天然変性領域を多く含むリンカー部位の物性情報をも統合的に活用した、人工的なキメラ分子を積極的に設計する、いわゆる合成生物学的アプローチが有効であると考えられる。

【文献】

1. Shiozawa, K., et al., Structure of the N-terminal domain of PEX1 AAA-ATPase: characterization of a putative adaptor-binding domain. *J Biol Chem.* 279 50060-50068. (2004)
2. Takasu, H., et al., Structural characterization of the MIT domain from human Vps4b. *Biochem Biophys Res Commun.* **334** 460-465. (2005).
3. Iwaya, N., et al., A common substrate recognition mode conserved between katanin p60 and Vps4 governs microtubule severing and ESCRT-III disassembly. *J Biol Chem.*, 285 16822-168229 (2010).
4. Iwaya, N., et al., Fine-tuning of protein domain boundary by minimizing potential coiled coil regions. *J Biomol NMR* 37 53-63. (2007).
5. "Domain boundary optimizer", <http://www.mbs.cbrc.jp/coiled-coil/>
6. Fujiwara, Y., et al., Structural insights of nucleolar localization signal of NVL2 by direct interaction to nucleolin. *submitted.* (2010).

L10

NMR-based structural analysis of (large) protein complexes in solution

Tobias Madl^{1,2}, Bernd Simon³, Frank Gabel⁴, Cameron D. Mackereth⁵, Michael Nilges⁶ & Michael Sattler^{1,2}

¹Helmholtz Zentrum München, Neuherberg, Germany; ²TU München, Garching, Germany
³EMBL, Heidelberg, Germany; ⁴Institut de Biologie Structurale, Grenoble, France; ⁵Institut Européen de Chimie & Biologie (IECB), Pessac, France; ⁶Institut Pasteur, Paris, France

Eukaryotic multi-domain proteins play crucial roles in the regulation of gene expression and cellular signalling. As their conformations often depend on dynamic domain rearrangements it is important to use solution techniques for their structural analysis. We have developed a versatile and efficient protocol for determining the quaternary structure of multi-domain proteins and protein complexes in solution by combining experimental data derived from solution state NMR as well as Small Angle X-ray and/or Neutron Scattering (SAXS/SANS) experiments [1,2]. Information about the relative orientation of domains or subunits is obtained from NMR residual dipolar couplings (RDCs). Long-range (up to 20Å) distance restraints are obtained from paramagnetic relaxation enhancements (PRE) using spin-labeled proteins and/or RNA. We demonstrate the utility of ¹³C direct-detected PREs in providing additional distance restraints that complement ¹H PREs, both quantitatively as well as qualitatively [3]. We show that the solvent PRE data can be directly used for structural refinement of molecular interfaces. The RDCs, PREs (from covalent spin labels), solvent PREs and SAS data are jointly used for structure calculation in ARIA/CNS supplemented with additional information from chemical shift perturbation or biochemical data. The combined NMR/SAS protocol is demonstrated with a protein-RNA complex involving splicing factor U2AF65, but it is generally applicable also for high molecular weight complexes.

In a second example, NMR structural analysis of the recognition of nuclear export cargo will be presented. The conformation of a 27-residue nuclear export signal (NES) peptide in a 150 kDa export complex was determined using state-of-the-art isotope-labeling and NMR methods. A combination of amide and methyl proton-detected triple resonance experiments, ¹H NOESY and ¹³C direct detection was required to obtain chemical shift assignments and to determine the conformation of the peptide. In addition to few intermolecular NOEs, solvent PRE were used to refine the structure of peptide-protein binding interface in the 150 kDa protein complex.

[1] F. Gabel, B. Simon, M. Nilges, M. Petoukhov, D. Svergun, M. Sattler, *J Biomol NMR* **2008**, *41*, 199.

[2] B. Simon, T. Madl, C. D. Mackereth, M. Nilges, M. Sattler, *Angew Chem Int Ed Engl* **2010**, *49*, 1967.

[3] T Madl, IC Felli, I Bertini, M Sattler *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 7285.

L11

動的核分極(DNP)法を使った高磁場 高感度固体NMR

○松木 陽¹, 高橋 大樹¹, 植田 啓介¹, 出原 敏孝², 小川 勇²,
中村 新治³, 戸田 充³, 穴井 孝弘³, 阿久津 秀雄¹, 藤原 敏道¹

¹阪大・蛋白研

²福井大・遠赤セ

³日本電子

High Field, High Sensitivity Solid-State NMR at 14T by Dynamic Nuclear Polarization

○Yoh Matsuki¹, Hiroki Takahashi¹, Keisuke Ueda¹, Toshitaka Idehara², Isamu Ogawa²,
Shinji Nakamura³, Mitsuru Toda³, Takahiro Anai³, Hideo Akutsu¹, Toshimichi Fujiwara¹

¹ *Institute for Protein Research, Osaka University*

² *Research Center for Development of Far-Infrared Region, University of Fukui*

³ *JEOL Ltd.*

We report solid-state CW DNP/NMR experiments under currently highest external field condition of 14.1 T (600 MHz for ¹H frequency), which would allow increased resolution in NMR spectrum. To perform the experiments, we have combined a commercial high-resolution solid-state NMR spectrometer with a 395-GHz gyrotron oscillator, sub-millimeter (sub-mm) wave transmission and low-temperature gas supplier systems that we developed. The gyrotron generated the sub-mm wave with power output of about 40 W in the second harmonic TE₀₆ mode. Sufficient amount of power for DNP (0.5-3W) was transmitted to the sample using a smooth-wall circular waveguide system. DNP enhancements of $\epsilon \sim 10$ and ~ 20 were achieved at 90 K and 50 K, respectively, for ¹³C-glucose in the presence of biradical TOTAPOL.

固体NMRは、生体分子や材料などの高分解能な構造解析法として確立している。生体分子については、非結晶状態にある蛋白質の構造決定にも応用できることが示されている。しかし、ラジオ波分光学であるNMRは、他の分光法に比べて感度が低いことが欠点である。感度向上により、より複雑な生体物質や表面などの微量物質の解析が可能になる。感度を向上させる方法としては、より高い磁場を用いることが一般的だが、高分解能磁場を向上させるのは容易ではない。そのため光ポンピング法やパラ水素法など多くの方法が開発されているが、高分解能固体NMRを大きく高感度化する汎用的な方法としてもっとも有望な方法が、電子スピン分極を核スピンに高磁場で移す動的核分極法(DNP)である。この方法は、オーバハウザー効果として古くから知られているが、最近、高輝度サブミリ波光源ジャイロトロンなど高磁場で電子スピン遷移を飽和させる技術が利用できるようになり実験が可能になった。

動的核分極(DNP)法, 高磁場条件, 固体NMR

○まつきよう, たかはしひろき, うえだけいすけ, いではらとしたか, おがわいさむ,
なかむらしんじ, とだみつる, あないたかひろ, あくつひでお, ふじわらとしみち

私たちは、動的核分極(DNP)法を使った固体NMRの感度向上を、これまでで最も高い外部磁場条件($B_0=14.1\text{T}$, プロトン共鳴周波数で 600MHz)で実現した。マイクロ波発信源として高輝度、高周波数ジャイロトロン(FU CW II)を開発、導波システムと液体 N_2 (or He)を使った試料冷却システムも製作して、市販の 600MHz NMR装置(Varian Infinity Plus)と組み合わせ、DNP-NMRシステムを構築した。このシステムの開発と実験結果について報告する。

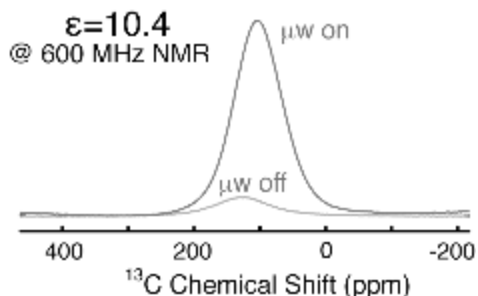


Figure 1. NMR signal of ^{13}C -labeled glucose observed via CP with and without microwave irradiation.

ジャイロトロンFU CW IIは高さ約 1.7m の電子管である。ジャイロトロンの発振には静磁場強度 7T における二次高調波条件を用い、 TE_{06} モードにおいて 395GHz , 約 40W の出力を得た。このうちDNPのために十分な $0.5\text{--}3\text{W}$ をオーバード円形導波管でMAS NMRプローブ中の試料まで伝達した。電子スピン源となる安定ラジカル分子として水溶性バイラジカルTOTAPOLを用い、静止試料のCP測定による ^{13}C 測定で ^1H 分極の大きさを測定した。その結果 $^{13}\text{C}_6$ -glucoseの信号強度を約10倍増強出来ると示した($\epsilon \sim 10$ @ 90K , Figure 1)。また、サブミリ波最大強度での照射では、かえってDNP効率の低下を観測した。これは、遠赤外線であるサブミリ波により試料温度が上昇したことが原因かもしれない。

電子スピン分極の格子への熱緩和を抑えられれば、有効に分極を核スピンのに伝えられDNP効率はさらに向上できると考えられる。そこで更なる低温条件を得るために蒸発液体Heを使って試料を冷却、スピニングする新しい $e\text{-}^1\text{H}$ 二重共鳴プローブシステムを製作した。このプローブでは真空層により断熱性を向上させている。このために液体ヘリウム・デュワーとヘリウムガス・トランスファー・チューブを製作した。試料温度 50K においてDNP用グラスマトリクス(d_8 -glycerol/ $\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O} = 6/3/1$ wt/wt/wt)の ^1H NMR信号を 90 度パルスによる直接励起で観測し、現時点で信号強度の増強は20倍程度まで観測できている ($\epsilon \sim 20$ @ 50K)。

この他に、DNP効率を最適化しDNP機構を明らかにするためのNMR外部磁場依存性実験、試料回転の効果、マイクロ波出力安定化のための工夫なども行った。また、DNP効率を最適化するために、周波数可変ジャイロトロンも製作した。これにより高分解能NMRマグネットの磁場強度を掃引することでDNP条件を調べる必要がなくなる。これらの結果をあわせて紹介する。

Reference:

[1] Matsuki Y., Takahashi H., Ueda K., Idehara T., Ogawa I., Toda M., Akutsu H. and Fujiwara T., *Phys. Chem. Chem. Phys.* **12**, 5799- (2010)

L12

光照射 NMR によるレチナールタンパク質の光中間体の観測

○ 内藤 晶¹、友永雄也¹、日高徹郎¹、川村 出¹、西尾拓道¹、
大澤一弘¹、和田昭盛²、須藤雄気³、加茂直樹⁴
¹横浜国大院工、²神戸薬大、³名古屋大院理、⁴松山大薬

Detection of photo-intermediates in retinal proteins by in-situ photo-irradiated solid-state NMR

○Akira Naito¹, Yuya Tomonaga¹, Tetsurou Hidaka¹, Izuru Kawamura¹, Takudo Nishio¹, Kazuhiro Ohsawa¹, Akimori Wada², Yuki Sudo³, Naoki Kamo⁴
¹Graduate School of Engineering, Yokohama National University Yokohama, Japan, ²Kobe Pharmaceutical University Kobe, Japan, ³Graduate School of Science, Nagoya University Nagoya, Japan, ⁴College of Pharmaceutical Science, Matsuyama University, Matsuyama, Japan.

Pharaonis phoborhodopsin (*ppR* or sensory rhodopsin II) is a negative phototaxis receptor through complex formation with its cognate transducer (*pHtrII*) from *Natronomonas pharaonis*, leading to the photo-induced signal transduction. We first developed an in-situ photo irradiation system for solid-state NMR under the magic angle spinning condition. Using this photo-irradiation system, we could successfully irradiate green laser light (532 nm) to the sample in the rotor. Photo-irradiated solid-state NMR experiments were performed on [15-¹³C, 20-¹³C]retinal-*ppR*. In a ground state, ¹³C NMR signal of 20-C in retinal appeared at 13.5 ppm (*all-trans* retinal with protonated Schiff base) and the signal moved to the positions at 23.5, 22.9 and 21.0 ppm (13-*cis*, 15-*anti* retinal with deprotonated Schiff base) for M intermediate in the yield of 80% at -20 °C.

【Introduction】 *Pharaonis* phoborhodopsin (*ppR* or sensory rhodopsin II) is a negative phototaxis receptor through complex formation with its cognate transducer (*pHtrII*) from *Natronomonas pharaonis*, leading to the photo-induced signal transduction. Light absorption of *ppR* initiates *trans-cis* photoisomerization of retinal chromophores, followed by cyclic chemical reactions consisting of several intermediates (K, L, M, and O). This photochemical reaction cycle of *ppR* absorbs blue light and forms K(540), L(488), M(390), and O(560) intermediates. The M and O intermediates are thought to be active states. We therefore attempted to trap the M photo-intermediate to gain insight into the mechanism of signal transduction.

【Experimental】 We first developed an in-situ photo irradiation system for solid-state NMR

光照射固体 NMR、レチナールタンパク質、光中間体

○ないとうあきら、ともながゆうや、ひだかてつろう、かわむらいずる、にしおたく
どう、おおさわかずひろ、わだあきもり、すどうゆうき、かもなおき

under the magic angle spinning condition. In-situ continuous photo-irradiation was made by an optical fiber from outside the magnet through a tightly sealed piece of cap made of glass rod glued to the zirconia rotor. Using this photo-irradiation system, we could successfully irradiate green laser light (532 nm) of 5 mW to the sample in the rotor. Since the life time of M intermediate is much longer than those of the other intermediates (Fig. 1A), it is, therefore, expected to be trapped an M intermediate under continuous photo-irradiation condition in the solid-state NMR experiments. In-situ photo irradiated NMR signals were acquired by means of CP-MAS method with the spinning frequency of 4 kHz.

【Results and Discussion】 Photo-irradiated solid-state NMR experiments were performed on $[15\text{-}^{13}\text{C}, 20\text{-}^{13}\text{C}]$ retinal-*ppR* at 0 °C (Fig. 1B) and -20 °C (Fig. 1C). In a ground state, ^{13}C NMR signal of 20-C in retinal appeared at 13.5 ppm (all-*trans* retinal with protonated Schiff base) and the signal moved to the positions at 22.4 ppm (13-*cis*, 15-*anti* retinal with deprotonated Schiff base) for M intermediate at 0 °C. It was noted that at least three distinctive M intermediates were appeared at (23.5, 22.9, 21.0) ppm in *ppR* at -20 °C (Fig. 1C). The yields of the M-intermediates were 40% and 80% at 0 and -20 °C, respectively. This difference can be attributed to the life time of the M-intermediate whose life time at low temperature is longer than that at high temperature. It is of interest to point out that the single line was observed for the M-intermediate at 0 °C, while the multiple lines were observed at -20 °C. This can be attributed to the existence of the several different interactions between the retinal and protein. The M intermediates were also trapped for $[15\text{-}^{13}\text{C}, 20\text{-}^{13}\text{C}]$ retinal-*ppR/pHtrII* complex and the ^{13}C NMR signals were appeared at 21.3 and (23.5, 22.4, 21.3) ppm at 0 °C and -20 °C, respectively. It was noted that the signal of M intermediate for *ppR* was slightly different from those for *ppR/pHtrII* complex. This observation also showed that the interaction between retinal and protein of *ppR* is different from that of *ppR/pHtrII* complex.

In summary, we have successfully observed the M intermediates with several distinctive M states by in-situ photo-irradiated solid-state NMR.

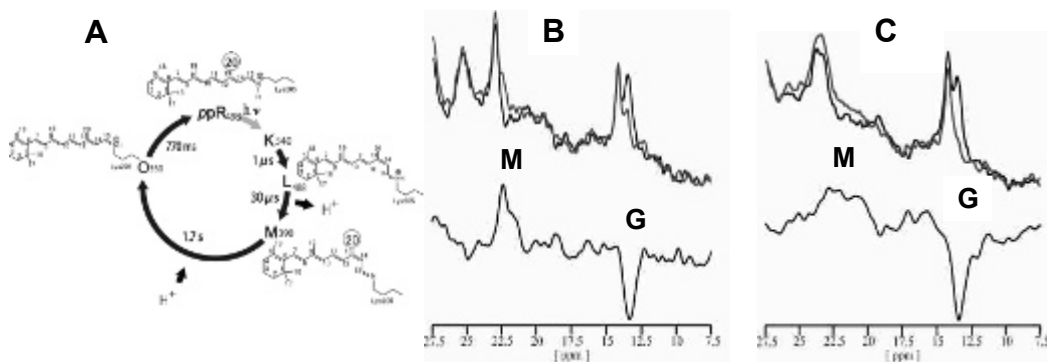


Figure 1. A. Photo cycle of *ppR*. Life time of the M-intermediate is 1.7 sec. B. ^{13}C NMR spectrum of *ppR*. Top spectra show those in the light and dark and bottom spectra show the difference spectra between light and dark at 0 °C. C. Same as B at -20 °C.

L13

NMR and MRI in Chemistry and Biomedical Physics & Engineering: My Research Profile of 43 Years in University

Hideaki Fujiwara

Department of Medical Physics and Engineering, Division of Health Sciences, Graduate School of Medicine, Osaka University, 1-7 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871 Japan.

As everybody knows who is engaged specially in NMR studies, first reports have appeared in 1946 in *Phys. Rev.*, where NMR has been reported for the first time using condensed matter as samples. Since then NMR has made extraordinary developments in Physics, Chemistry, Biology, Medicine and other related different fields. I was born in the same year of 1946, and I fortunately experienced a lot of interesting studies in university. First I engaged in the NMR study of carbanion, organometallic compounds which present as anions in solution, in Nagoya Institute of Technology to take the degree of bachelor in 1969, and then intermolecular interactions such as hydrogen bonding in solution were main subject of the research in Graduate School of Tohoku University to take the Ph.D (1974). Since then NMR has always attracted me in every possible way, although I moved to Faculty of Pharmaceutical Sciences (1976) and to Faculty of Medicine (1995) in Osaka University.

Sensitivity enhancement has long been a continuing target of research in NMR although the substantial method has changed with the times. For example, the sensitivity has been increased with the times in the history of NMR as the result of improvement in the electronic circuit of RF detection and amplification, use of high field magnet, introduction of new detection mode such as the pulsed-FT mode, and so on. Advances in this area can be seen in a special session of “NMR Sensitivity Enhancement” in the 42nd Annual NMR Symposium in Japan (2003, Osaka). Recent topic in this area may be the hyperpolarized nuclei which are produced by the photo-pumping or DNP technique where electromagnetic wave such as laser or micro/submilli-wave is utilized to “polarize” the spin state extraordinarily.

In recent 10 years the author has engaged in hyperpolarized noble gas NMR/MRI that includes development of the home-built polarizing equipment and applications to supramolecular solution chemistry and animal imaging, which still drives me to the pursuit of more interesting story in the near future.

Above NMR studies will be summarized in the presentation, expressing sincere gratitude for all of my colleagues and students as well as the members of domestic/international NMR Societies who have encouraged me in every way.

Protein structure determination using orientation induced TROSY shift changesShin-ichi Tate^{1,2}¹*Dept. Mathematical and Life Sciences, Hiroshima University, Japan.*²*SENTAN/JST, Japan.***Abstract**

As an extended application of the anisotropic spin interactions observed in solution, we have been studying the feasibility of the TROSY shift changes induced by weak alignment as alternative structural parameters to the residual dipolar couplings (RDCs). To take full advantage of TROSY in measuring the backbone ¹H-¹⁵N peaks for large proteins, particularly in high magnetic field, we focus on the use of the amide signals. The use of TROSY shift changes requires *a priori* values for the ¹⁵N chemical shift anisotropy (CSA) tensors in determining molecular alignment tensor, which gave some drawbacks in using TROSY application for this purpose. In this presentation, I will give practical protocols to use TROSY shift changes in determining molecular alignment tensor, whose values are practically compatible to those by the RDC. Some of the applications will be also described.

The use of anisotropic spin interactions in solution NMR, which was made possible by introducing techniques to weakly align a protein against the magnetic field. The use of the residual dipolar couplings (RDCs) has expanded NMR application to a various types of protein structural works, which include not only structural refinement but also structural prediction, validation and dynamics in a wider range of time scales over that seen by nuclear spin relaxation. In structural biology on large proteins or protein complexes consisting of subunits, the RDC-based analyses on domain or subunit arrangements are the most remarkable applications. Some researches in this line have been reported. In spite of the successful application of the RDC-based approach for determining the morphology of protein or protein complexes, this should have molecular size limitation that comes from the rapid transverse relaxation of the anti-TROSY components. This size limitation can be somewhat impaired by using the combinatorial use of HSQC and TROSY signals, which gives half values of the RDCs, or so-called J-scaling TROSY experiment that modulates scalar coupling contributions to TROSY chemical shifts, where a combination of the J-scaled and intact TROSY signals give scaled RDCs. Although these approaches can expand the size limit, to which the RDC-based analysis can be applied, they never fully take advantage of the TROSY

Keywords: TROSY, chemical shift anisotropy, protein structure

たて しんいち

characteristics. To further expand the size limitation in the protein morphological analyses, we should solely rely on the intact TROSY spectra to gain the molecular alignment tensor.

Under the motivation above, we have proposed the TROSY based alignment tensor analysis approach, DIORITE (Determination of the Induced ORientation by Trosy Experiments)^(1,2). The two major drawbacks are pointed in this approach. One is the small values of the TROSY shift changes, $\Delta\delta_{\text{TROSY}}$, induced by weak alignment. This comes from the co-linearity between N-H bond vector and the least shielded CSA tensor axis, σ_{11} , in a peptide plane. Another is this approach requires *a priori* ^{15}N CSA tensor values, which vary according to the local structure affected by torsion angle, hydrogen bonding, and so forth. Actually, their exact values are hardly to know *a priori*. Because of the significant variation in the ^{15}N CSA tensor values, the application of the ^{15}N RCSAs has been limited in use, although the ^{13}C carbonyl RCSAs are commonly used due to their less dependency on the local structure.

As a remedy for the small magnitudes of $\Delta\delta_{\text{TROSY}}$, we carefully tuned the acrylamide gel conditions, which include the gel concentration, mesh sizes, and gel shapes to be inserted into a sample tube. Based on many case studies on a various proteins in different sizes and shapes, we got an empirical rule to optimize the gel conditions according to the size and shape of protein. Overall, the alignment strength should be tuned have somewhat greater manitude than that used for the RDC measure to gain reliable data, because an average $\Delta\delta_{\text{TROSY}}$ value is almost half of the RDC in magnitude.

The problem comes from ^{15}N CSA variation was partly solved by using the secondary structure specific ^{15}N CSA values, which values are easily obtained from solution experiments on a small proteins using weak alignment, although the determination of the residue specific ^{15}N CSA values are not trivial. We found some improvement in the quality of the alignment tensor, which was judged as the identity to the corresponding tensor from the RDC, by using the secondary structure specific ^{15}N CSA tensors determined on ^{15}N labeled ubiquitin⁽³⁾. Recently Bax and co-workers have reported the residue specific ^{15}N CSA tensors on GB3 protein using elaborate experiments using mutants that align differently in bicelles⁽⁴⁾. Using the calculated secondary structure specific ^{15}N CSA tensors from Bax's set of ^{15}N CSA values for GB3, the quality of the alignment tensor by DIORITE was further improved.

In the presentation, we are going to show the details in the experimental protocols and optimization of the DIORITE experiments. We are going to also describe the structure refinement using the DIORITE restraints or the pseudo CSA restraints originally introduced by Bax in DNA structural refinement⁽⁵⁾.

References

1. Kurita, J.-i., Shimahara, H., Utsunomiya-Tate, N., and Tate, S.-i. (2003) *Journal of Magnetic Resonance* **163**, 163-173
2. Tate, S.-i., Shimahara, H., and Utsunomiya-Tate, N. (2004) *Journal of Magnetic Resonance* **171**, 284-292
3. Tate, S. (2008) *Anal Sci* **24**, 39-50
4. Yao, L., Grishaev, A., Cornilescu, G., and Bax, A. (2010) *J Am Chem Soc* **132**, 4295-4309
5. Grishaev, A., Ying, J., and Bax, A. (2006) *J Am Chem Soc* **128**, 10010-10011

L15

Structure determination of the helical 7-transmembrane receptor sensory rhodopsin

Daniel Nietlispach, Antoine Gautier, John P. Kirkpatrick, Helen R. Mott, Mark J. Bostock

Department of Biochemistry, University of Cambridge, Cambridge, United Kingdom.

Close to one-third of all the proteins in the genome are targeted to the various cellular membrane compartments of organisms where they fulfill their function as receptors, transporters, channels, electrical and photo-transducers and others. Due to their easy accessibility at the cell surface these proteins present more than 50% of all the existing drug targets in humans. But in view of their abundance membrane proteins are structurally still strongly underrepresented. Currently there are only about 250 unique membrane protein structures deposited in the PDB of which 30% are of eukaryotic origin with the remaining 70% being prokaryotic. For integral membrane proteins the α -helical type is more prevalent and while predominantly being bitopical it is the large group of polytopical proteins, which are least explored. In particular the seven-helical integral membrane proteins (7TM) have shown to be particularly elusive to structure determination. Here the G protein-coupled receptors represent the largest family of seven-helical TM proteins and despite recent spectacular achievements through X-ray crystallography they remain notoriously difficult to study.

We have been interested in the application of solution NMR spectroscopy methods towards the structure determination of seven-helical systems. We use the 7TM phototaxis receptor sensory rhodopsin pSRII as a model to demonstrate the feasibility of such studies by means of solution NMR spectroscopy. For the first time we present the full 3D structure determination of a 7TM receptor using NMR spectroscopy. The size of the protein-detergent micelle complex under investigation is on the order of 70 kDa. The quality of the pSRII structure ensemble is outstanding (backbone root mean squared deviation of 0.48 Å). Based on what we have learnt with pSRII we consider the success of similar NMR structural studies using other 7TM proteins such as GPCRs and see an encouraging future ahead.

L16

Probing cancer cell signaling by NMR: structure, interaction, and kinetics of the small GTPase cycle

Christopher B. Marshall, Mohammad Mazhab-Jafari, David Meiri, Geneviève M.C. Gasmi-Seabrook, Jason Ho, Robert Rottapel, Vuk Stambolic, and **Mitsu Ikura**

Division of Signaling Biology, Ontario Cancer Institute and Department of Medical Biophysics, University of Toronto, Toronto, Ontario, Canada, M5G 1L7

The Ras superfamily small GTPases play crucial roles in a variety of physiological processes including normal cell growth and tumourgenesis. To study the mechanisms and kinetics of the intrinsic and GAP-catalyzed GTPase activities, we developed an NMR-based assay to directly probe the conformation of the small GTPase Rheb during these reactions, which enabled us to examine the reaction kinetics in real time and in a site-specific manner (Marshall et al. *Science Signaling* 2009). We have further developed this NMR methodology to monitor nucleotide exchange reactions and perform GEF assays, and have applied it to other small GTPases including RhoA and Ras (Mazhab-Jafari et al., *J. Biol. Chem.* 2009; Gasmi-Seabrook et al. *J. Biol. Chem.* 2009). More recently we have established protocols for using the NMR approach to characterize the GAP and GEF activities present in extracts of mammalian cells. These NMR studies offer a wide range of useful applications in which NMR can be used as a read-out method of cell biology experiments. Combining structural, dynamic, and interaction studies of the proteins involved in the signaling processes, we can grasp a more precise and accurate picture of what could go wrong when these signaling proteins are genetically altered. The talk will review our recent studies on mutation analyses of oncogenic Rheb and Rho signaling processes as well as other cancer signaling systems we have studied thus far (Supported by CCSRI and CRS).

L17

Chemical shifts and dipolar couplings: how can they help?

Justin Lorieau, Nick Fitzkee, Alex Grishaev, John Louis, Yang Shen, and Ad Bax

Laboratory of Chemical Physics, NIDDK, NIH, Bethesda, MD 20892, USA

NMR chemical shifts provide important local structural information for proteins. Consistent structure generation from NMR chemical shift data has recently become feasible for proteins with sizes of up to 130 residues, and such structures are of a quality comparable to those obtained with the standard NMR protocol. Further enhancements in empirically derived relations between chemical shift and protein structure, together with small angle X-ray scattering data, hold promise to extend protein structure determination to systems much larger than can be studied using conventional approaches.

Study of membrane protein structure by solution NMR frequently poses particular challenges, as the rotational correlation time for such systems in the presence of the requisite detergents often is much longer than for water soluble proteins of comparable size. The protein and detergent choice are usually optimized for generating conditions that yield the optimal NMR spectral properties, preferably allowing complete spectral assignments and permitting the measurement of numerous RDCs. With the above mentioned novel computational approaches, the chemical shifts are yielding increasing structural restraints, while use of DNA-based liquid crystals in addition to stretched acrylamide gels permit the measurement of accurate RDCs. Application is demonstrated for the fusion domains of hemagglutinin. RDCs and relaxation measurements provide in micelles and bicelles provide important information on the dependence of structure and dynamics on the lipophilic environment.

第三日目
11月17日(水)
日本語セッション

**Day 3 (Nov. 17, Wed.)
(Japanese Session)**

L18

FLYAによる最小スペクトルデータセットを用いた自動構造解析

○池谷 鉄兵^{1,2}, 池 峻求³, 重光 佳基¹, 浜津 順平¹, 三島 正規¹, 伊藤 隆¹, 甲斐荘 正恒^{3,4}, Peter Güntert^{2,3,5}

¹ 首都大・理工, ² Goethe-University Frankfurt・生物物理, ³ 首都大・戦略研究センター, ⁴ 名大・構造生物学センター, ⁵ Goethe-University Frankfurt・Frankfurt Institute of Advanced Studies

Automated protein structure determinations from minimal sets of spectra using FLYA

○Teppei Ikeya^{1,2}, JunGoo Jee³, Yoshiki Shigemitsu¹, Jumpei Hamatsu¹, Masaki Mishima¹, Yutaka Ito¹, Masatsune Kainosho^{3,4} and Peter Güntert^{2,3,5}

¹ Graduate School of Science, Tokyo Metropolitan University, Tokyo, Japan

² Institute of Biophysical Chemistry, Goethe-University Frankfurt, Frankfurt am Main, Germany

³ Center for Priority Areas, Tokyo Metropolitan University, Tokyo, Japan

⁴ Structural Biology Center, Nagoya University, Nagoya, Japan

⁵ Frankfurt Institute of Advanced Studies, Goethe-University Frankfurt, Frankfurt am Main, Germany

The complete automation of protein structure determination is one of the challenges of biomolecular NMR spectroscopy that has, despite early optimism, proved difficult to achieve. The unavoidable imperfections of experimental NMR spectra, and the intrinsic ambiguity of peak assignments that results from the limited accuracy of frequency measurements, turn the tractable problem of finding the chemical shift assignments from ideal spectra into a formidably difficult one under realistic conditions. A purely computational algorithm (FLYA) was published that is capable of determining three-dimensional protein structures on the basis of uninterpreted spectra without manual interventions. Here, we will show that fully automated analyses of the spectra can yield protein structures using a minimal number spectra, and discuss the feasibility of using exclusively NOESY data.

NMRによるタンパク質立体構造決定の完全自動化は、今なお、生体系NMR分野において実用レベルに達していない開発困難な分野の1つである。これは、NMRスペクトルから得られるデータが常に不完全なものである点、スペクトル解像度向上には限界があり帰属の曖昧さをすべて除くことが不可能なためなどによる。我々は、ピークピッキングから、化学シフト帰属、NOEシグナル帰属、構造計算、構造最適化計算までの一連の流れを人手による介入をまったく加えずに、完全自動で構造解析可能なアルゴリズムFLYAを開発し、現在もさらなる機能向上を進めている。FLYAを使った完全自

自動構造計算, FLYA

○いけやてっぺい, じーじゅんぐー, しげみつよしき, はまつじゅんぺい, みしままさき, いたうゆたか, かいのしょうまさつね, ぎゅんたーとペーたー

動構造解析により、すでに複数のタンパク質の自動立体構造決定に成功しているが、これに加えて、FLYA法の際立った特徴は、手動解析では到底不可能なわずかなスペクトルのデータセットを用いても正確に構造決定可能な点にある。タンパク質構造決定に必須のスペクトルは、基本的に原子間距離拘束を含むNOESYスペクトルであり、化学結合を介するその他の多くのスペクトルはもっぱら化学シフトの帰属にのみ用いられる。これらスペクトルの測定と解析には、多くの時間と多大な労力が必要であることから、可能な限り少数のデータセットにより構造解析できることが望ましい。今回、SAIL法を用いたユビキチンタンパク質と非線形サンプリングおよび最大エントロピー法によりスペクトルを得た高度好熱菌TTHA1718タンパク質について、本手法を適用し、最小データセットを用いた際の自動構造解析の安定性について検証を行った。

【結果】

FLYAによる構造解析により、SAILユビキチンおよびTTHA1718タンパク質いずれに関しても、3D ^{13}C -および ^{15}N -resolved NOESYのわずか2つのスペクトルのみを用いた計算で、手動解析により得られた参照構造に対して、主鎖のRMSD値で、それぞれ0.87 Å, 1.02 Åと、非常に正確な構造を得ることができた。ここでは、自動ピークピッキングの段階から、ノイズシグナルの除去等の人手による解析を一切加えず、完全自動でNOESYのみを用いて構造決定を達成した。このことは、本手法にSAIL法や非線形サンプリング法を組み合わせることで、測定とスペクトル解析の両面の時間短縮につながり、従来法と比較して、極めて短時間に構造決定が可能となったことを示唆するものである。本手法を用いれば、分解速度の速い不安定タンパク質等の構造解析も可能となるなど、様々な応用が期待できる。

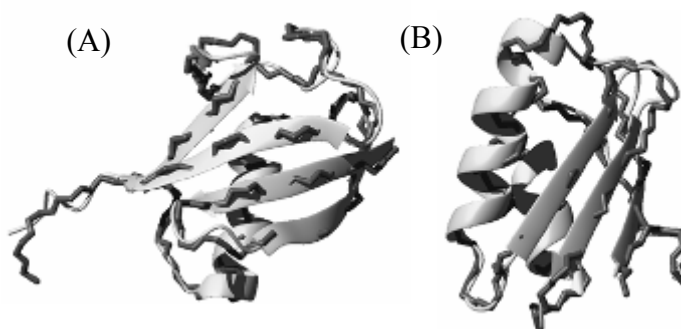


Figure 1. SAIL ubiquitin (A) and TTHA1718 (B) structures obtained using exclusively NOESY spectra for chemical shift assignment and structure calculation (ribbon model) superimposed on the conventionally determined NMR solution structure (cylinder model). Figure produced with the program MOLMOL.

【参考文献】

- 1) Ikeya, T., Takeda, M., Yoshida, H., Terauchi, T., Jee, J., Kainosho, M. & Güntert, P., Automated Structure Determination of SAIL Ubiquitin Using the SAIL-FLYA System, *J. Biomol. NMR* 44, 261-272 (2009)
- 2) Ikeya T., Terauchi T., Güntert P. and Kainosho M., Evaluations of stereo-array isotope labeling (SAIL) patterns for automated structural analysis of proteins with CYANA., *Magn. Reson. Chem*, 44, S152-S157 (2006).
- 3) López-Méndez, B. & Güntert, P. Automated protein structure determination from NMR spectra. *J. Am. Chem. Soc.* 128, 13112-13122 (2006).

L19

高分子量蛋白質の構造解析に適した安定同位体ラベル法 および測定法の開発

○竹内 恒^{1, 2}、高橋 栄夫^{1, 3}、嶋田 一夫^{1, 4}、Gerhard
Wagner²

¹産総研・バイオメディカル情報研究センター

²ハーバード大医、³横浜市大院・生命ナノ、⁴東大院薬

Development of labeling strategies and pulse sequences suitable for structural analyses of large proteins

○Koh Takeuchi^{1, 2}, Hideo Takahashi^{1, 3}, Ichio Shimada^{1, 4}, Gerhard Wagner²

¹BIRC, AIST, ²Harvard Med. Sch., ³Grad. Sch. Nanobiosci., Yokohama City Univ., ⁴Grad. Sch.
Pharm. Sci., The Univ. of Tokyo

Sequence specific back-bone assignments typically use uniform ¹³C/¹⁵N labeling with ¹H-detected triple resonance experiments. However, fast relaxation of ¹H nuclei hinders the application of ¹H-detected experiments for higher molecular weight systems or signals close to paramagnetic centers. To overcome these problems ¹³C-detected experiments have been used. However, direct ¹³C detection is complicated due to the scalar couplings causing crowded spectra and reducing sensitivity due to splitting peaks into multiplets. Here we present the use of ¹³C-¹²C alternate labeling in ¹³C-detected triple-resonance experiments to overcome one bond ¹³C-¹³C coupling by isotopic enrichment at alternating carbon sites. The carbon-detected experiments suitable for the labeling schemes, such as NCA and ¹³C_α-¹³C_α TOCSY will also be discussed.

溶液 NMR 法は水溶液中で蛋白質の立体構造、機能解析を行えるなど、他の手法とは一線を画す極めて有用な特徴を有する。このような特徴は、構造に基づく創薬、あるいは創薬ターゲット蛋白質の機能を理解するうえで非常に有効である。しかしながら、解析対象となる蛋白質が高分子量の場合、その有効性は大きく損なわれる。これは NMR 法が原子核の磁氣的励起状態から定常状態に戻る緩和過程を観測する分光法であるため、核の緩和が速くなる高分子量条件下では十分な情報が収集できないことに起因する。したがって、膜蛋白質、酵素など一般的に分子量が大きい創薬ターゲット蛋白質を解析するうえで上記は克服すべき課題である。

近年においては、蛋白質の重水素化、メチル位の ¹H-¹³C 選択標識、さらには SAIL 法など、高分子量蛋白質の解析に適した安定同位体標識法の開発に力がそそがれており。またそれら標識法を最大限に生かすための測定法の開発 (TROSY HSQC/HMQC) が進んだ。

安定同位体標識、異核測定、ピルビン酸

○たけうち こう、たかはし ひでお、しまだ いちお、げるはると わぐなー

これらの手法は水素核の緩和速度を遅らせることで、以前に比べ NMR 法が扱える蛋白質複合体の分子量を飛躍的に増大させることに成功した。しかしながら近年、これらの流れとは別に核磁気回転比が大きい¹³Cのため緩和速度の速い水素核の代わりにより緩和の遅い炭素、窒素核などを用いた測定法の開発が進んでいる。

¹³C を直接観測する場合に問題になるのが、¹³C-¹³C 間の強いカップリングである。筆者らは、¹³C 安定同位体標識に用いられるグルコースに替わり、¹³C 選択標識されたピルビン酸、グリセロール等のアミノ酸前駆体を用いることで、¹³C-¹²C 交互標識を達成できれば、アミノ酸連鎖帰属情報を含んだ ¹³C-¹⁵N 間の異核相関を残したままで、¹³C-¹³C 間の強い相関を回避し、¹³C の直接観測により適した安定同位体標識条件を達成することができるのではないかと考えた(fig. 1)。

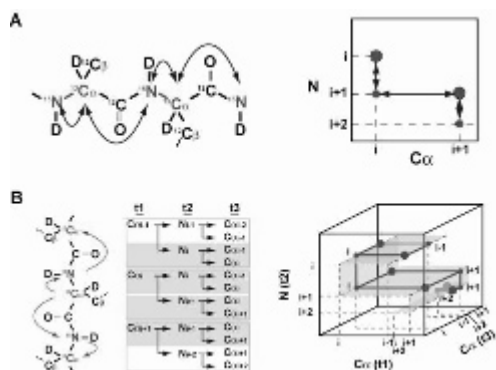


Fig. 2: ¹³C direct detection experiment suitable for ¹³C-¹²C alternate ¹³C-¹²C labeling: (A)NCA, (B)CANCA

また ¹³C-¹³C 間の強い相関がないことを利用して、この強い相関に遮られて通常観測できない遠位の ¹³C-¹³C 間相関を用いた ¹³C_α-¹³C_α、¹³C'-¹³C'間を連鎖的に相関づける新たな測定法(CACA-TOCSY)も開発した。(fig. 3)。本測定は主鎖連鎖帰属を可能とするとともに、アミノ酸選択的帰属情報、主鎖二面角情報などを含む非常に有用な解析手法である。また最近、この磁化移動原理を利用した新たな水素核測定法を開発したのでこれも合わせて報告する。

Takeuchi K, Wagner G et al.

2D NCA: *J Am Chem Soc.* (2008), 130, 17210

3D CANCA: *J Am Chem Soc.* (2010), 132, 2945

2D CACA-TOCSY: *J Biomol NMR.* (2010), 47, 55

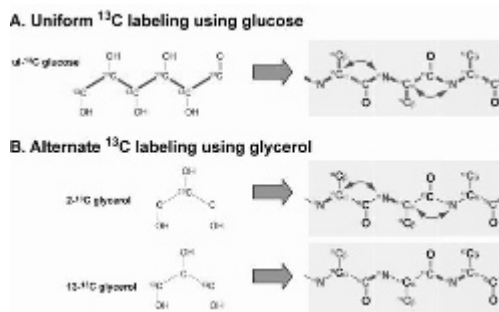


Fig. 1: Schematic representation of (A) uniform ¹⁵N/¹³C labeled and (B) alternate ¹³C-¹²C labeled protein

本発表では実際 2-¹³C グリセロールを用いることで、¹³C-¹³C 間の強い相関を回避し、直接観測時の ¹³C 炭素核測定法の感度を上昇させること、また本ラベル条件下で ¹³C_αを容易に重水素化できるため高分子量蛋白質の解析に適用可能であることを示す。また、¹³C-¹²C 交互標識に適した主鎖連鎖帰属のための測定法として、2D NCA,3D CANCA などを開発した (fig. 2)。

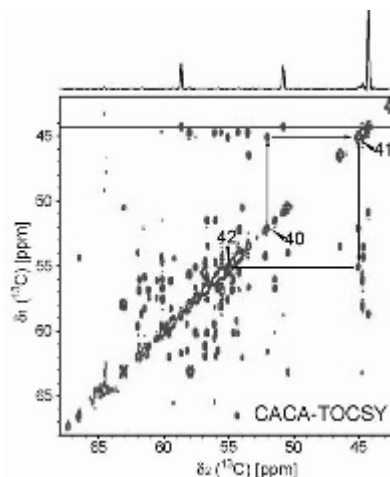


Fig. 3: CACA-TOCSY experiment

L20

緩和分散解析用プログラムGLOVE

○菅瀬謙治^{1, 2}, Jonathan C. Lansing², Peter E. Wright²

¹サントリー生有研

²スクリプス研

Processing relaxation dispersion data with a new software GLOVE

○Kenji Sugase^{1, 2}, Jonathan C. Lansing², and Peter E. Wright²

¹*Suntory Institute for Bioorganic Research, Osaka, Japan.*

²*The Scripps Research Institute, California, USA.*

Relaxation dispersion NMR spectroscopy is a very powerful technique to quantitate protein dynamics. It can characterize site-specific chemical (conformational) exchange processes in proteins on μs – ms time scales. A problem is, however, that it is difficult to fit relaxation dispersion data with existing software because 1) the theoretical equations of the relaxation dispersion are complicated, 2) there are a number of local minima of the objective functions, resulting in wrong parameters, and 3) some parameters should be fitted globally, for example, exchange rates and populations of adjacent residues. Here, we report a new software package called GLOVE (Global and Local Optimization of Variable Expressions) coded using C++. GLOVE utilizes Levenberg–Marquardt algorithm for non-linear least square fitting, and can fit R_1 , R_2 relaxation data and R_2 dispersion data.

近年の蛋白質の動的構造研究において、緩和分散法による揺らぎの解析が非常に注目を集めている。緩和分散法を用いると、マイクロ秒からミリ秒の時間領域における構造変化の情報を原子分解能で得ることができる。しかし、この解析には1) 緩和分散の理論式が非常に複雑であること、2) 無数の局所解から最適解を引き出す必要があること、3) いくつかのフィッティングパラメータ（例えば、空間的に近い関係にある残基の交換速度や状態の存在比）は、グローバルパラメータとしてフィットする必要があるので、から市販のソフトウェアでは解析が困難である。そこで、高速に緩和分散データを解析することを目的として、C++を用いて新規解析プログラムGLOVEを開発した。

GLOVEでは、Levenberg–Marquardt法による非線形最小二乗フィットを行う。テキストのインプットファイルに対して、テキストのアウトプットとXMGRフォーマットのグラフを返す。なお、インプットファイルは各種スクリプトを用いることによって、簡便に生成することができる。 R_2 分散データを解析するために、これまでに報告されている2状態交換モデルの近似式Luz-Meiboom equation、Ishima-Torchia equation、Carver-Richards equationを組み込んだ。2状態交換モデルでは、Levenberg–Marquardt法で必要な偏微分を解析解として実装してあるため非常に高速にフィッティングを行うことができる。一方、3状態交換モデルでは、近似式が解かれていないため行列の形でフィッティングの関数を組み込んだ。偏微分は数値解として求めている。

緩和分散法，最小二乗フィッティング

○すがせ けんじ、ジョナサン ランシング、ピーター ライト

これらの基本の関数に基づいて R_2 分散データの温度依存性や2成分系における濃度比依存性などを解析できるモデルを構築した。3状態交換モデルでは、誘導適合モデルや構造選択モデルなども利用することができる。

GLOVE には、無数にある局所解から最適解を効率的に引き出すための各種アルゴリズムが組み込まれている。例えば、stochastic 法では、それぞれのフィッティングパラメータの初期値を広い領域からランダムに設定しフィッティングすることを複数回（50-200 回程度）繰り返す。stochastic 法だけでは、荒いフィットしか得られないが、次に Monte Carlo with minimization 法を用いて stochastic 法で得られた最も良い解の周辺で細かくパラメータを変化させて複数回（100-1000 回程度）フィッティングを行うことで最適解が求められる。このアルゴリズムを直列に用いる手法は、網羅的にパラメータをスクリーニングする grid search 法と比較して圧倒的に速く最適解を見つけることができる。特に、元々の計算があまり速くない3状態交換モデルで有効である。また GLOVE の特徴の1つとして、グローバルパラメータとローカルパラメータを混在させてフィットできることが挙げられる。しかも、グローバルパラメータに指定する領域（残基）は、それぞれのパラメータ毎で異なっても構わない。例えば、Fig. 1 に示す転写因子 CREB の pKID ドメインが補助活性化因子 CBP の KIX ドメインに結合する様子を解析した例では、pKID と KIX の濃度は全ての残基で共通なグローバルパラメータとして設定した。そして、構造が折り畳まる速度とほどける速度を3つの領域で別々のグローバルパラメータとして設定した。他のパラメータは各残基固有のローカルパラメータとして扱った。

他にも、あるパラメータを固定値にしたり、ある数値領域からだけ解を得るようにフィッティングパラメータの探索領域に拘束をかけたりすることもできる。なお、GLOVE のメインコードは非線形最小二乗フィットを行うルーチンから構成されているため、GLOVE 自体は、 R_2 分散データの解析だけに特化したものでない。理論式を追加することによって、NMR データに限らず多様なデータを解析することが可能である。実際に、 R_1 , R_2 緩和実験や ZZ-exchange 実験にも対応している。

本討論会においては、GLOVE の詳細および実際の使用について報告する。

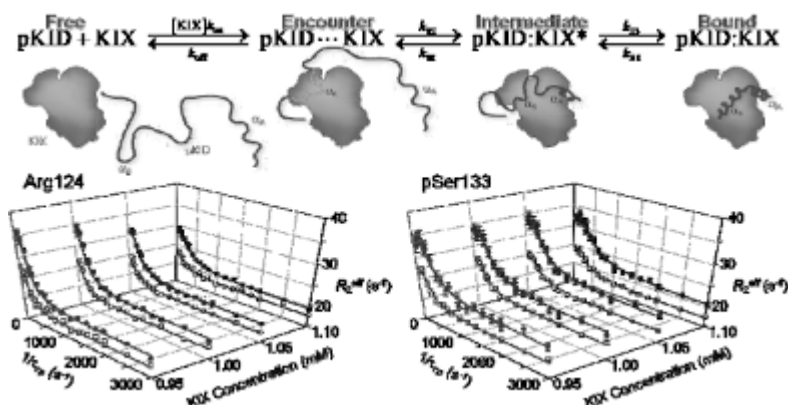


Fig 1. R_2 dispersion data analyzed by GLOVE: an application to coupled folding and binding processes of an intrinsically disordered protein.¹⁾

1) Kenji Sugase, H. Jane Dyson, Peter E. Wright, *Nature* **447**, 1021-1025 (2007)

L21

家蚕絹フィブロイン結晶部モデルペプチドのラメラ構造
に関する固体NMR構造解析
○鈴木悠, 小川達也, 朝倉哲郎
農工大院工

Structural analysis of model peptides from crystalline domain of *Bombyx mori* silk fibroin using solid state NMR

○Yu Suzuki, Tatsuya Ogawa and Tetsuo Asakura

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

The structure of the model peptide (AGSGAG)₅ from the crystalline domain of *Bombyx mori* silk fibroin was studied using solid-state NMR. The local structure for each Ala residue was determined from ¹³C CP/MAS NMR spectra of ten different [3-¹³C]Ala-(AGSGAG)₅ peptides differing in their ¹³C labeling positions. The highest field peak of the Ala Cβ carbon (16.7 ppm) assigned to a distorted β-turn and/or random coil changes significantly depending on the ¹³C labeling position. In addition, the local structure of each Ser residue was obtained from REDOR experiments of [1-¹³C]Gly-Ser-[¹⁵N]Gly by assuming the distance of random coil and β-sheet. By combining the structural information on Ala and Ser residues from solid state NMR, and statistical mechanical calculation, the probable lamella structures of (AGSGAG)₅ in the solid state were obtained. The effect of the introduction of Ser residue was also discussed on the basis of ¹³C solid state spin-lattice relaxation time observation.

【緒言】絹の優れた特性を理解し、それを再生医療の分野等で積極的に応用していくためには、絹に特徴的な連鎖について構造上の特徴を把握することが重要である。我々は、これまで、家蚕絹結晶部の単純化されたモデルペプチド(Ala-Gly)_nの繊維化後の構造 (Silk II型) について固体NMRによる詳細な解析を行い、sheet-turn-sheet が繰り返されたラメラ構造をとることを報告、それを基盤に再生医療用の新しい絹様材料を創製してきた¹。

本研究では、家蚕絹一次構造全体の49%を占め、より結晶部に近い(Ala-Gly-Ser-Gly-Ala-Gly)の繰り返し配列について、その構造を詳細に検討するとともに、一部のAla残基がSer残基に置き換わることによるラメラ構造へ及ぼす影響について検討した。

【実験】結晶部モデルペプチド(Ala-Gly-Ser-Gly-Ala-Gly)₅について、¹³C CP/MAS及び¹³C-¹⁵N REDOR測定用に系統的に安定同位体ラベル部位をずらした試料を合成した。合成はFmoc固相合成法にて行い、9M LiBrに溶解後、水に対して透析、その沈殿物をSilk II型試料とした。

【結果・考察】

(AGSGAG)₅ のラメラ構造

Ala¹³Cβラベル部位を系統的にかえた(AGSGAG)₅の¹³C CP/MAS NMRスペクトルから、すべてのAla残基について、distorted β-turn またはrandom coil(16.7 ppmのピーク面積)の割合を決定した。

絹フィブロイン, ラメラ構造, 固体NMR

○すずきゆう, おがわたつや, あさくらてつお

一方、各Ser残基の場合は、現時点では、 $[1-^{13}\text{C}]\text{Gly-Ser-} [^{15}\text{N}]\text{Gly}$ 間のREDOR測定から求めた。すなわち、Ser残基が random coilと β -sheetの典型的な原子間距離をとる場合を仮定して、実測の距離から割合を求めた。すべてのAlaおよびSer残基の割合を部位に対してプロットしたところ、両端では予想通り増加するが、ゆるやかながら、11及び19残基のところでは2箇所、極大となった(Figure 1黒色)。この傾向は、既報告の $(\text{AG})_{15}$ の場合と一致する(Figure 1灰色)。その割合がすべての部位で20%以上であることから、turnは、いたるところで起こると言えるが、このパターンは、sheet-turn-sheetが繰り返されたラメラ構造の出現を意味する。

さらに、このラメラ構造を定量的に解析するために、 $(\text{AGSGAG})_5$ についてturnが1箇所または2箇所存在することを仮定し、147個の分子鎖について統計力学的取り扱いを行った。すなわち、構造形成に伴って安定化または不安定化する局所的なエネルギーをパラメーターとした統計力学的計算を行い、fittingによって、出現確率の高いラメラ構造とパラメーターを決定した。

出現確率の高いラメラ構造の一例をFigure2に示した。 $(\text{AGSGAG})_5$ のturnが2箇所存在するラメラ構造において、周期的に β -sheetに關与するアミノ酸残基の数は8~11であった。最近、Gongら²は、再生家蚕絹フィブロインの膜について、AFMならびにTEM観察から約8残基からなるラメラ構造のモデルを提案しているが、研究手法は全く異なるにもかかわらず、我々の結果とも良く一致している。

$(\text{AGSGAG})_5$ SilkII型のSerC β の運動性評価

$(\text{AGSGAG})_5$ の ^{13}C スピン-格子緩和時間 $T_{1\rho}$ 測定の結果、SerC β ピークに $T_{1\rho}$ が2成分存在することが明らかとなった。温度上昇とともに $T_{1\rho}$ の値が小さくなったことから、どちらの緩和成分も、室温で遅い運動領域に存在している。 $T_{1\rho}$ の短い成分(運動性が高い)が約40%、長い成分(運動性が低い)が約60%であった。低い運動成分の存在は、分子間相互作用に関わるSer残基の存在を意味しており、FrazerらのX線解析の結果³、 $(\text{AG})_n$ よりも $(\text{AGSGAG})_m$ の方がシート間距離が増加すること、本研究では、後者の方が、random coilの割合が増加することから、Ser残基は側鎖のOH基の形成する水素結合を通して安定化に寄与するというよりも、側鎖のかさの増加による立体障害が大きいと考えられる。

[謝辞]本研究は一部、生物系特定産業技術研究支援センターイノベーション創出基礎的研究推進事業ならびに科学技術振興機構先端計測分析技術・機器開発事業により実施された。

【参考文献】

- [1] Asakura, T. et al.; *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, 129, 5703-5709.
 [2] Gong, Z. et al.; *Chem. Comm.*, **2009**, 7506
 [3] Frazer, D. et al.; *J. Mol. Biol.*, **1965**, 11, 706-712.

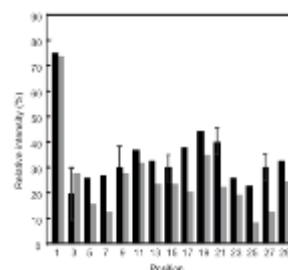


Figure 1 Fractions of distorted β -turn and/or random coil of $(\text{AGSGAG})_5$ as a function of different positions (black). The corresponding relative intensities of $(\text{AG})_{15}$ were also shown for a comparison (gray)

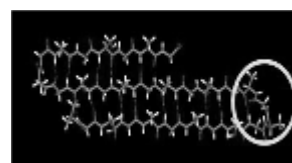


Figure 2 Typical lamellar structure of $(\text{AGSGAG})_5$ with distorted β -turn marked by yellow circle.

チオフラビンTが結合するポリグルタミン局所構造の固体NMR研究

○松岡茂¹, 村井元紀¹, 山崎俊夫², 井上将行¹¹東大薬²理研SSBC**Solid state NMR study on thioflavin T-bound polyglutamine local structure**○Shigeru Matsuoka¹, Motoki Murai¹, Toshio Yamazaki², and Masayuki Inoue¹¹Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo, Tokyo, Japan.²RIKEN SSBC, Yokohama, Japan.

Amyloids are insoluble non-crystalline aggregates formed by various proteins and peptides. Thioflavin T (ThT) is one of the most widely used amyloid-specific detectors, which shows fluorescence at 485 nm when binds to amyloids. ThT recognizes the common structural feature among amyloids despite the diversity in amino acid sequence. We are interested in the tolerance and specificity of the molecular recognition between ThT and amyloids, and undertook structural analyses of ThT-amyloid complexes using solid-state NMR. In this presentation, we will report a REDOR study to observe local structures in a synthetic short polyglutamine peptide (H-Q₈-OH) which are recognized by ThT.

序

アミロイドは難溶性の繊維状ポリペプチドであり、タンパク質あるいはその断片が異常なフォールディングを起こし、凝集することで形成される。体内でのアミロイドの蓄積は、難病であるアミロイドーシスの原因となる。現在、20種類以上のアミロイドーシスが報告されており、それぞれ異なるタンパク質に由来するアミロイドが発見されている。アミロイドのアミノ酸配列には多様性があり、全体構造の一義的な定義はできない。しかし、この構造多様性にも関わらず、全てのアミロイドに共通で用いられる検出試薬が多数開発されている。

チオフラビンT (ThT、図1) は、最も広く利用されるアミロイド検出薬の一つで、アミロイドに特異的に結合し485 nmの蛍光を発する¹。ThT-アミロイド間の分子認識は、アミロイド構造に対する特異性と多様なアミノ酸配列に対する寛容性を併せ持つ点で、酵素-基質間等で見られる厳密な特異的分子認識と異なり、その構造基盤は極めて興味深い。しかしながら、不均一固体であるアミロイドの中に僅かに形成されるThT結合サイトの構造解析は極めて困難であり、新しい方法論の開発が望まれる。

我々は、ThT-アミロイド間の分子認識が有する特異性と寛容性の構造基盤の解明を目標とし、ThT-アミロイド分子複合体の固体NMRによる構造解析に着手した。今回は、アミロイドのモデルとしてポリグルタミンペプチド (H-Q_n-OH) を用い、ThT結合サイトの局所構造をREDOR法により選択的に観測した (図1)。

Keywords: local structure, polyglutamine, rotational-echo double-resonance (REDOR)

キーワード: 局所構造、ポリグルタミン、回転エコー二重共鳴

○まつおかしげる, むらいもとき, やまざきとしお, いのうえまさゆき

ThT被染色性凝集体形成する短鎖ポリグルタミンペプチド

ハンチントン病に代表されるポリグルタミン病では、正常タンパク質に含まれるポリグルタミン領域が遺伝子変異により異常伸長することでアミロイド形成能を獲得し、神経細胞死を引き起こす。アミロイド形成に必要なポリグルタミン領域長は一般的に40残基以上とされている²。

はじめに我々は、グルタミン残基の連続配列のみからなるモデルペプチドH-Q_n-OHが

ThT被染色性凝集体を形成できる最短の長さを調べた。n = 5 ~ 10のH-Q_n-OHを合成して、ThT染色試験に供したところ、6残基以上の長さでThTによる蛍光染色が見られた。ただし、n = 6のH-Q_n-OHについては染色の再現性が悪く、ThT被染色凝集体の形成に試料の保存時間、温度が大きく影響することが分かった。また、蛍光強度のThT濃度依存性からn = 7 ~ 10のH-Q_n-OH

についてk_dを求めたところ、k_d = 0.1 μM前後の高親和性結合サイトとk_d = 6 μM前後の低親和性結合サイトがそれぞれ約1/50 mol/mol、約4/50 mol/mol存在することが確認された(表1)。これらの結合サイトの性質は、n = 7 ~ 10の間でほとんど変化しなかった。

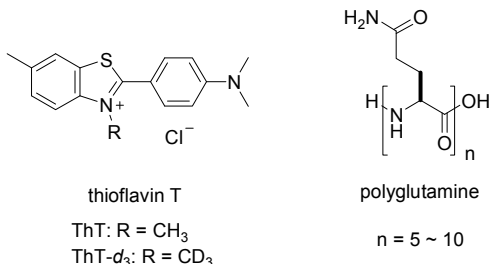


図1 チオフラビン T とポリグルタミンの構造

表1 H-Q_n-OH 凝集体の ThT 結合サイト数(N)との解離定数(k_d)*

| n | k _{d1} /μM | N ₁ /10 ⁻³ | k _{d2} /μM | N ₂ /10 ⁻³ |
|----|---------------------|----------------------------------|---------------------|----------------------------------|
| 7 | 0.17 | 20.1 | 6.45 | 77.7 |
| 8 | 0.11 | 19.4 | 5.72 | 65.0 |
| 9 | 0.10 | 21.7 | 6.66 | 86.3 |
| 10 | 0.15 | 25.1 | 7.42 | 82.4 |

*高親和性 (k_{d1}, N₁)と低親和性 (k_{d2}, N₂)の結合サイトが見られた。

ポリグルタミン凝集体の2次構造

H-Q_n-OH凝集体の2次構造を調べるため、粉末X線解析を行った(図2)。アミロイドの特徴であるβシート構造は、ペプチド主鎖が約4.8 Åの間隔で積み重なるため、この繰返し構造に相当する回折角2θ = 18.5°のピークを与える³。n = 5 ~ 10のH-Q_n-OHについて、凝集体の凍結乾燥物の回折パターンを比較したところ、n = 6 ~ 10のH-Q_n-OHにβシート構造が含まれることが確認された。本実験で用いたポリグルタミンの長さを考慮すると、分子間βシート構造が形成されたものと考えられる。

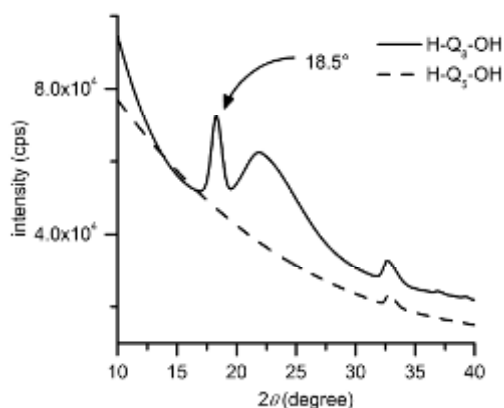


図2 H-Q₈-OH と H-Q₅-OH の粉末 X 線回折

ポリグルタミン凝集体内のThT結合サイト局所構造の選択的¹³C NMR観測

安定なThT被染色性凝集体を形成するH-Q_n-OH からQ₈を選び、固体NMRによるThT

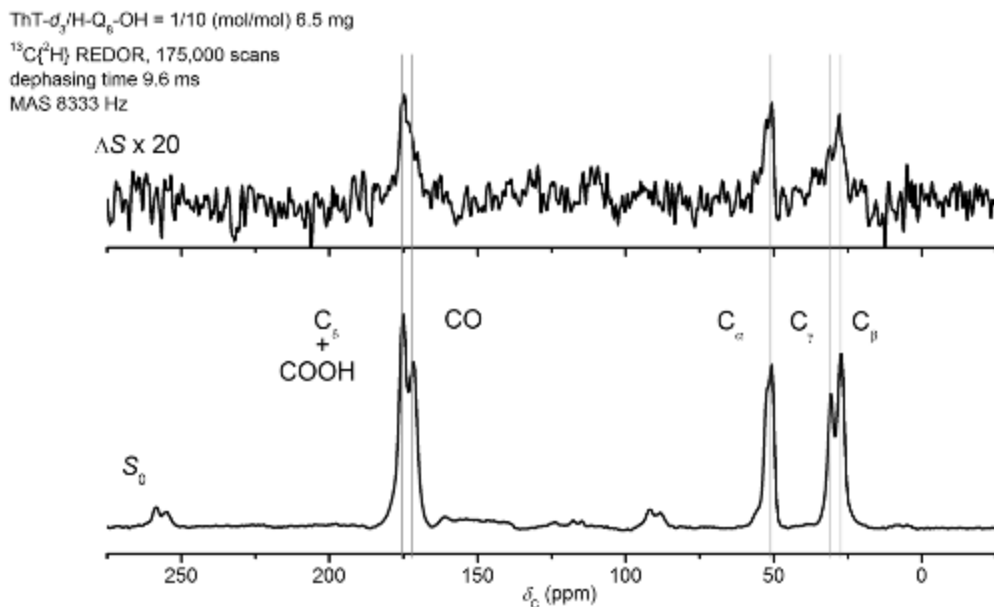


図3 ThT- d_3 /H-Q₈-OH (1/10)の $^{13}\text{C}\{\text{D}\}$ REDOR 差スペクトル (上、 ΔS) とスピネコースペクトル (下、 S_0)

ポリグルタミン複合体構造解析に用いた。図3下にH-Q₈-OHの天然存在比 ^{13}C NMRスペクトル (S_0) とその帰属を示す。CO、 C_α 、 C_β 、 C_γ 、 C_δ のそれぞれの炭素に由来する5つのシグナルが広い線幅で観測された。 C 末端カルボキシル基は側鎖カルボニル基 C_δ と重なるシグナルを与えた。一方、 $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ Glnを第1残基に導入したH- $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ Q-Q₇-OHの ^{13}C CP-MASでも、線幅の広いシグナルが観測されたことから、この線幅は8つのグルタミン残基間の化学シフトの分散に由来するものではなく、主に化学的環境の不均一性に由来するものであることが分かった。また、CO (172 ppm)、 C_α (51 ppm) は β シートを示唆する化学シフトを与えた⁴。

次に、 $^{13}\text{C}\{\text{D}\}$ REDOR差スペクトルを用いてH-Q₈-OH 凝集体内のThT結合サイト局所構造を選択的にNMR観測した⁵。すなわち、重水素標識を施したチオフラビン T (ThT- d_3)を合成し、ThT- d_3 をH-Q₈-OHに結合させ、分子間 $^{13}\text{C}\{\text{D}\}$ REDORによりThT- d_3 の重水素原子に近接するH-Q₈-OH上の炭素原子を選択観測した。 $^{13}\text{C}\{\text{D}\}$ REDORの差スペクトル (ΔS) ではThT- d_3 の CD_3 基に近接した ^{13}C だけがシグナルを与える。ThT- d_3 とH-Q₈-OHの分子数比は1:10とし、高親和性と低親和性の両結合サイトに対してThT- d_3 が等量存在する条件を選択した。低親和性結合サイトは高親和性結合サイトの4倍存在するので、 $^{13}\text{C}\{\text{D}\}$ REDORには低親和性結合サイトの寄与が大きくなる。測定には凍結乾燥試料を用いた。 $^{13}\text{C}\{\text{D}\}$ REDORの結果を図3に示す。 ΔS では、 β シート構造の表面に近い側鎖 C_β 、 C_γ 、 C_δ だけでなく、主鎖CO、 C_α でもREDOR減衰が確認され、ThT- d_3 の CD_3 が主鎖、側鎖の両方に近接する環境にあることが明らかとなった。また、REDOR減衰の大きさと時間展開の解析から、ThT- d_3 の CD_3 の周囲に複数のグルタミン残基が存在すると予想された。

現在、H-Q₈-OHの位置選択的 ^{13}C 標識体とThT- d_3 を用いた $^{13}\text{C}\{\text{D}\}$ REDORにより、結合構造の精密化を図っている。

参考文献

1. H. LeVine III, *Methods Enzymol.* **1999**, *309*, 274.
2. J. D. Lear, *Biophys. J.* **2000**, *78*, 2733.
3. L. Bonar, A. S. Cohen, M. M. Skinner, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1969**, *131*, 1373.
4. (a) H. Saito, R. Tabeta, A. Shoji, T. Ozaki, I. Ando, T. Miyata, *Biopolymers* **1984**, *23*, 2279; (b) H. Saito, *Magn. Reson. Chem.* **1986**, *24*, 835.
5. A. Schmidt, T. Kowalewski, J. Schaefer, *Macromolecules* **1993**, *26*, 1729.

○松森信明, 山口敏幸, 前田佳子, 安田智一, 岡崎宏紀, 大石徹,
村田道雄
阪大院理

Solid-State NMR Studies on Molecular Interactions in Lipid Rafts

○Nobuaki Matsumori, Toshiyuki Yamaguchi, Yoshiko Maeta, Tomokazu Yasuda, Hiroki Okazaki, Tohru Oishi, and Michio Murata

Department of Chemistry, Graduate School of Science, Osaka University, Toyonaka, Japan.

Lipid rafts are membrane domains rich in sphingolipids, such as sphingomyelin (SM), and cholesterol (Chol), and are assumed to play essential roles in biological processes such as signal transduction and cholesterol shuttling. However, details on the molecular recognitions in lipid rafts have yet to be elucidated. To reveal the structure basis of raft formation, we are taking three approaches; 1) determination of SM orientation in lipid bilayers by analyses of ^2H quadrupolar couplings, dipolar couplings and chemical shift anisotropies; 2) conformation analysis of SM using bicellar system; and 3) analysis of molecular interactions for SM-SM and SM-Chol using REDOR method. Based on the results, we will propose a possible molecular mechanism in forming lipid rafts.

脂質ラフトはスフィンゴミエリン(SM, Fig. 1)およびコレステロール(Chol, Fig. 1)を主成分とする細胞膜ドメインであり、周囲の細胞膜とは異なる相状態を有している。この脂質ラフトは、特異的に集積した膜タンパク質を介したシグナル伝達のプラットフォームとして機能していると考えられている。しかし、脂質ラフトは形成と離散を繰り返しているため、分子レベルでの相互作用解析はほとんど行われていない。

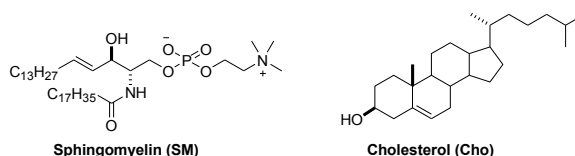


Fig. 1. Structures of sphingomyelin (SM) and cholesterol

そこで本研究では、まず種々の標識化 SM を調製し、膜中における双極子相互作用や化学シフト異方性(CSA)、 ^2H 四極子相互作用を測定し、ラフト相および非ラフト相での SM の分子配向を決定した。これにバイセルを用いて解析した SM の配座を加味し、SM の膜中での構造を詳細に決定した。次に ^{13}C 及び ^{19}F で標識した SM や Chol を調製し、REDOR 法による分子間相互作用の直接観測を行った。これらの結果を基に、ラフト中における SM-SM 間や SM-Cho 間相互作用について考察する。

まず、ラフトおよび非ラフト中での SM の分子配向を決定するために、Fig. 2 に示すような種々の同位体標識 SM を調製し、双極子相互作用や CSA, ^2H 四極子相互作用の測定を行った。これらの値は「回転軸の方向」および「回転軸のゆらぎ (order parameter)」

脂質ラフト, スフィンゴミエリン, コレステロール

○まつもりのぶあき, やまぐちとしゆき, まえたよしこ, やすだともかず, おかざきひろき, おおいしとおる, むらたみちお

に依存することから、観測値を解析することで SM のアミド平面およびオレフィン平面の配向を決定できる(Fig. 2)。その結果、アミド部分は Chol の有無に関係なくほぼ同様の配向を取っているが、Chol 存在下、つまりラフト相ではオーダーが顕著に増加することが明らかとなった。同様に SM のオレフィン部分についても配向を決定したので併せて報告する。また、SM のアシル鎖については、Fig. 2 に示すように位置特異的に ^2H を導入し、 ^2H NMR からそれぞれの部位での運動性を評価した。その結果、Chol 非存在下ではアシル鎖の先端に行くにつれてオーダーが減少するのに対し、Chol 共存下ではアシル鎖中央部分でのオーダーが顕著に増加することを見出した。さらにアシル鎖は C2'-C3'結合でゴーシュ型を取っていることも明らかとなった。このように部位特異的に標識を導入することによって、SM 各部位での配向および運動性を評価することが可能となった。

つぎに SM の膜環境での配座を求めるために、SM を用いてバイセルを調製した。小型バイセルを用いることで溶液 NMR の測定が可能となり、NOE および $^3J_{\text{HH}}$ から SM の配座を決定した(Fig. 3)。この配座に、上で求めた SM の配向情報を加えることで、SM の極性部位の構造を決定した。

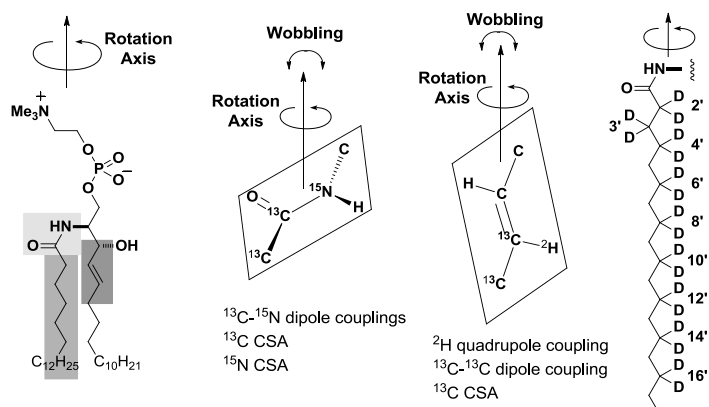


Fig. 2. Orientation determination of SM amide and olefin planes in lipid bilayers using various isotope-labeled SMs. The orders of acyl chain were also evaluated using sitespecifically- ^2H -labeled SMs.

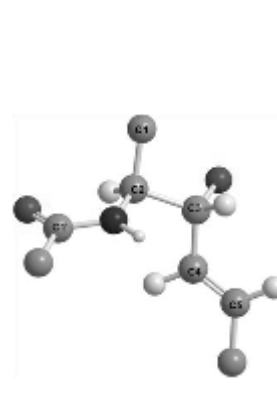


Fig. 3. Partial conformation of SM determined by NOE and $^3J_{\text{HH}}$ in isotropic bicelle

最後に分子間の相互作用を解析した。Fig. 4 に示すように、種々の標識化 SM および Chol の組み合わせで REDOR 測定を行った。この際、 ^{19}F 標識 SM やコレステロールはラフト形成能を保持していることを確認した。測定結果から考察される分子間相互作用およびラフト形成の分子機構については、発表にて議論する。

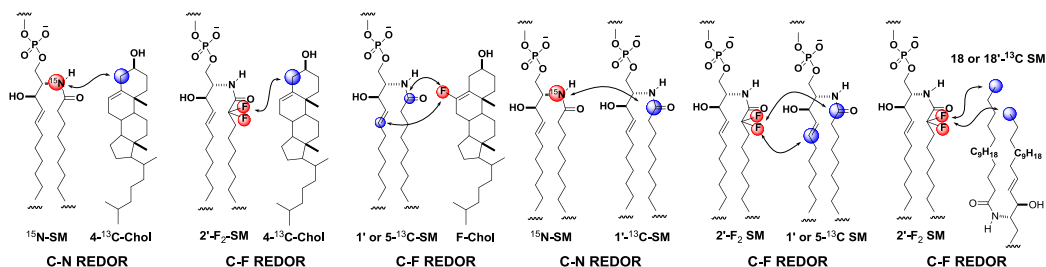


Fig. 4. Combinations of labeled SM-Chol and SM-SM for REDOR experiments.

L24

NMRの信号と雑音

○竹腰清乃理^{1,2}

¹京大・理

²CREST・JST

Noise and Signal in NMR

○K. Takegoshi^{1,2}

¹*Department of Chemistry, Graduate School of Science, Kyoto, Japan.*

²*CREST, JST, Japan.*

Two methods for sensitivity enhancement and denoise in NMR are presented. One is a signal analysis method on the basis of phase correlation between NMR signals and excitation pulse. This what we shall call phase-covariance analysis is compatible with the conventional signal accumulation and apparent gain of signal-to-noise ratio is demonstrated. The other approach (APodization after Receiver-gain Increment during Ongoing sequence with Time (APRICOT)) is to reduce the digitization noise for a given dynamic range; the receiver gain is dynamically increased to use as many number of bits as possible for all FID points. Before FT, the apodization that compensates the effect of the time-dependent gain is applied to restore the original profile.

NMRの感度向上の為に最近開発した（１）位相共分散(phase-covariance analysis)法と（２）動的なレシーバーゲイン調整(APRICOT)法による雑音除去と小信号の高精度観測について発表する。

（１）の方法はパルス位相と信号位相間に存在する位相関係を用いる方法であり、そのような関係がない雑音アーティファクトピークを除去するのに有効である。

（２）の方法は、巨大な信号と小信号が共存する場合の小信号におけるダイナミックレンジが足りない問題を（部分的に）解決する方法である。時間が許せば（３）クライオコイル法などの信号増強方についての最新の結果も発表する。

（１）位相共分散法¹

信号－雑音比(signal-to-noise ratio; SNR)が悪い試料の場合に、我々は何回もの積算を行う。この積算の際にいわゆる位相回しを行う。つまり、励起パルス系列の位相と観測レシーバの位相関係を保ちながら、X、Y、-X、-Yなどと変えて積算を行い、種々のartifactを相殺する。この位相回しにおいて我々は励起の位相と信号の位相の間には相関があるということを仮定しており、また実際に相関はある。一方、雑音信号に対してはそのような相関は考えられないために、積算前のスペクトルの各点で位相を求め、励起位相に対する相関を取ることで信号と雑音を見分けることが可能になる。

アラニンとグリシンをKBrに混ぜて薄めた固体粉末試料の¹³C MASスペクトル（積算3600回）を図1 aに示した。このスペクトルで一番大きなノイズ信号（A）とメチル

キーワード： Covariance, Dynamic range, Denoise

○たけごしきよのり

信号 (B)での位相を代表として解析したのが図2である。レシーバ位相を変えずにパルス位相は1度刻みで変えて測定した結果を示した。予想通り信号地点では明らかな相関が見られ、雑音地点では相関は見られない。各地点において相関係数を求め、積算したスペクトル(図1a)に乗算したものが図1bである。ノイズが抑えられていることが判る。ただしこの方法は信号強度が変わるために定量解析には適さない。

(2) APRICOT法²

NMRの観測データであるFID信号はコイル～信号アンプ～A/D変換という経路を通過してデジタルデータとなり、FTされスペクトルになる。信号アンプの役割は微小なFID信号をA/D変換器のレンジまで増幅することであり、通常、FIDの最も大きな部分(最初の方)がA/Dのレン

ジをはみ出さないように設定する。ここで問題はFIDの後ろの方ではA/D変換のレンジを生かしきれていないということで、信号アンプの増幅率(ゲイン)をFIDの減少に伴って大きくしてA/Dのレンジを常に十分に活用することを試みた。

図3にCH₂を¹³Cでラベルしたグリシンの固体¹³C MASスペクトルを示した。上が通常のゲイン一定で測定で下がゲインを動的に変えた結果である。ゲインを変えるとFIDが当然ゆがむためにFT前にゲイン変化の補正を行っている。いわゆる量子化ノイズが減少してノイズに埋もれていた天然存在比のC=O炭素のピークがくっきり観測されるようになった。

References

1. J. Fukazawa and K. Takegoshi, Phys. Chem. Chem. Phys. 2010,12 11225-11227.
2. K. Takeda and K. Takegoshi, Submitted.

Acknowledgements

I thank Dr. Takeda and Mr. Fukazawa in my laboratory who have actually accomplished these works.

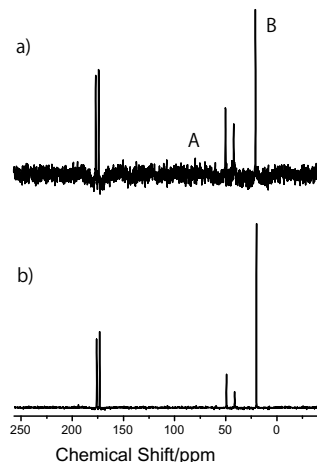


Fig. 1 Phase-covariance analysis; before (a) and after (b).

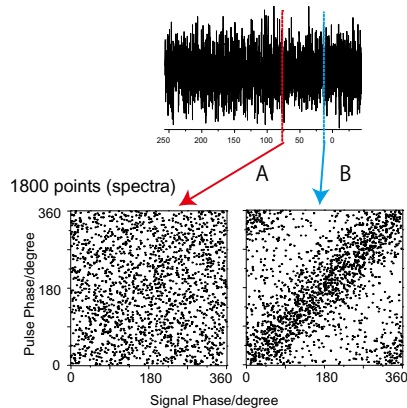


Fig. 2 One of the spectra and plot of pulse/signal phases at the designated points.

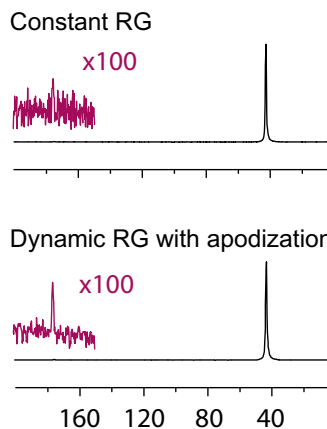


Fig. 3 Result of APRICOT

L25

マジック角円板回転法：薄膜試料のための新しい高分解能固体NMR法

○犬飼宗弘¹, 野田泰斗¹

¹京都大学大学院理学研究科

DISK MAS: High-resolution solid-state NMR of a thin-film on a spinning disk at the magic-angle

○Munehiro Inukai¹, and Yasuto Noda¹

¹ Graduate School of Science, Kyoto University

We present a new technique on magic-angle spinning (MAS) nuclear magnetic resonance (NMR) for a thin-film on a substrate. With the conventional spinning module, a thin-film on a circular substrate of 12 mm diameter was spun together with the MAS rotor at 5 kHz, and NMR signals of the thin-film was detected with an outer solenoid coil. We demonstrate ²⁷Al MAS NMR of a thin-film aluminum (thickness: 2 μm) and ⁷Li MAS NMR of a thin-film LiCoO₂ (thickness:200 nm). This work opens the door for high-resolution solid-state NMR of functional thin-film devices, such as a thin-film lithium-ion secondary battery, a thin-film solar cell, and a thin-film organic electroluminescence.

現在、薄膜リチウムイオン電池、薄膜太陽電池、有機ELなどの機能性を持つ先端薄膜デバイスの開発が盛んに行われている。薄膜デバイスは基材に原子・分子を積層することで形成される薄膜材料から構成される。薄膜試料をターゲットとしたMAS測定の感度は、試料の量が非常に少ないため著しく低下する。感度を上昇させるため、試料の量を増やす様々な工夫がなされている。フレキシブルな薄膜デバイスの場合、試料管(ロータ)に丸めて入れることで、試料の量を増やすことができるため、通常のMAS測定が可能である。しかし石英や雲母などの折り曲げられない基材に成膜した薄膜試料をMAS測定するためには、内径サイズに基材ごと切断して、試料の量を増やすため、ロータに複数枚詰め、これを測定していた。しかしながら薄膜試料を複数枚に切断することは、同一試料の化学変化を追う実験、切断することのできない薄膜デバイスなどには不向きである。

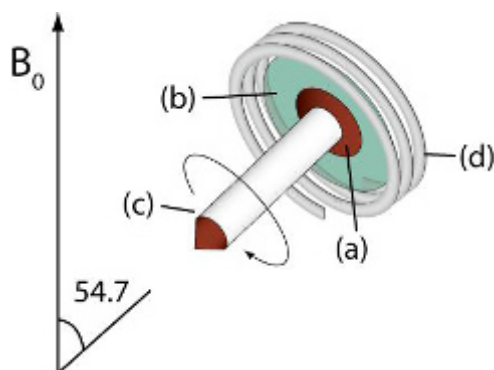


Figure 1. A schematic description of DISK MAS. A substrate-holder (a) adhering a substrate (b) is attached on top of a 4 mm MAS rotor (c). A RF coil (d) is located around a thin-film deposited on a substrate. The RF coil is connected to a single resonant circuit (not shown in this figure).

マジック角回転, 薄膜

○いぬかいむねひろ, のだやすと

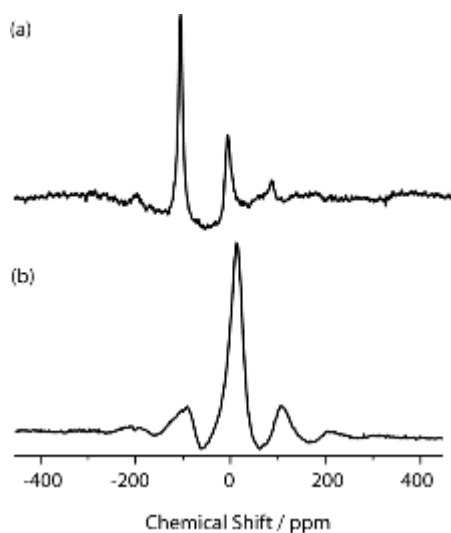


Figure 2. ^{27}Al MAS spectra of (a) a thin-film aluminum with approximate thickness of $2\ \mu\text{m}$ using the DISK MAS (acquisition time $\sim 12\ \text{h}$, ν_0 : 78 MHz ν_r : 7.4 kHz), and (b) bulk aluminum using a conventional MAS probe (acquisition time: 20 s, ν_0 : 78 MHz ν_r : 7.4 kHz). To spin the rotor, the bulk aluminum was mixed with KBr.

我々は、基材に成膜している薄膜試料をターゲットとした新しい高分解能固体NMRのテクニックを提案する。ロータの上部に基材ホルダを取り付け、その上に基材を貼り付ける。そしてロータと共に基材をMASさせ、基材上の薄膜試料の周辺に設置したRFコイルを用いて励起パルスの照射、NMR信号の観測を行う(図1)。近年提案されたpiggy-back法^[1] –ロータの上部に直径1 mm以下の微小試料管を取り付け回転させ、外部に設置した微小コイルでNMR信号を検出する手法– と比べて、提案する手法はよりサイズの大きい基材ホルダ、基材を取り付けている。我々は、基材ホルダ、基材が振れ回り運動をしなければ、高速試料回転を行うことができるのではないかと考え実験を行った。その結果、直径12 mm、厚さ0.5 mmの円形石英基板を5 kHz、直径7 mm、厚さ0.5 mmのものを8 kHzで回転させることに成功した。このように基材ごとMASさせる手法 –DISK MASと名付ける– は、従来法と比べてより広い基材上に成膜している薄膜試料を観測できるため、試料の量は10–25 倍になる。そのため、今まで感度的に難しかった1枚の薄膜試料の観測が期待できる。

DISK MASにより、直径7 mmの石英基板に成膜させた厚さ $2\ \mu\text{m}$ の金属アルミニウムを7.4 kHzで回転させ、 ^{27}Al MAS測定に成功した(図2)。そして通常のMASプローブで観測したバルク金属アルミニウムと違う形のスペクトルが観測された。現在解析中である。また薄膜固体リチウムイオン電池の正極材に用いられる LiCoO_2 の薄膜試料(厚さ: 200 nm)の ^7Li MAS測定にも成功している。将来、薄膜固体リチウムイオン電池などのデバイスそのものを測定する予定である。また形状的な利点として、薄膜の表面に垂直な方向から光レーザーを照射するなどの外部作用を行うことが可能である。そのため外部作用in situの高分解能固体NMRもDISK MASにより可能となる。

参考文献

[1] 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).

謝辞 この研究は、JSTのCRESTの援助を受けて行われた成果です

(国立環境研¹, Univ. Minnesota²) ○三森文行¹, 渡邊英宏¹, 高屋展宏¹,
Michael Garwood², Edward J. Auerbach²

Mechanisms of T_2 relaxation of tissue water in human brain
(Natl. Inst. for Environmental Studies¹, Univ. Minnesota²)

F.Mitsumori¹, H.Watanabe¹, N.Takaya¹, M. Garwood², EJ Auerbach²

Transverse relaxation time T_2 of the water molecule in human brain is utilized for disease diagnosis as well as for functional mapping of the brain. We recently found that the apparent transverse relaxation rate $R_2^{\dagger} (= 1/T_2^{\dagger})$ of tissue water in human brain is well described as a linear combination of the regional non-hemin iron concentration $[Fe]$ and the macromolecular mass fraction $f_M (= 1 - \text{water fraction})$, $R_2^{\dagger} = \alpha[Fe] + \beta f_M + \gamma$ in a wide range of the static field B_0 . The B_0 dependent change in each coefficient of α , β , and γ suggested a unique mechanism for contribution of iron and macromolecules.

【はじめに】組織水プロトンの T_2 緩和時間は MRI において組織コントラストをもたらす重要なパラメータであり、病変の診断や、脳機能イメージングにおける賦活部位の検出に広く用いられている。 T_2 緩和の機構は水分子を取り巻く磁気的環境や分子運動で規定されるはずであるが、ヒト脳のような複雑系ではこれまで解明が試みられなかった。私たちはこれまで、4.7T においてヒト脳の見かけの緩和速度 ($R_2^{\dagger} = 1/T_2^{\dagger}$) が局所の非ヘム鉄濃度 ($[Fe]$) と高分子量分画 (f_M) を用いて、 $R_2^{\dagger} = \alpha[Fe] + \beta f_M + \gamma$ (1) と記述できることを報告してきた[1]。今回、1.5~7T の広い磁場範囲において式(1)が成立することを確認し、 α , β , γ の磁場依存性からヒト脳の T_2 緩和機構に関する手がかりを得た。

【方法】ヒト脳の MRI 測定には、Varian 社の Inova (1.5T, 1.9T, 4.7T)、Siemens 社の Magnetom Trio (3T, 7T) を用いた。信号検出器は 1.9, 4.7, 7T では TEM 型、1.5, 3T では birdcage 型検出器を用いた。それぞれの磁場強度での測定数は、男女各 6 名 (1.5T)、男 7 + 女 3 名 (1.9T)、男 5 名 (3T)、男 2 名 + 女 2 名 (4.7T)、男 6 名 (7T) で、いずれも国立環境研究所または Minnesota 大学の IRB 承認を受けた。 T_2^{\dagger} の測定には MASE (multi-echo adiabatic spin echo) 法を用いた[2]。MASE 測定は 180° パルスには 7ms の hyperbolic secant 型パルスを 2 個用いて偶数番目のエコーのみを収集し、1 回の励起で 6 エコー (7T のみ 4) を測定した。パルス繰り返し時間は 4 秒 (7T のみ 5 秒)、最小の echo spacing は 13ms、エコータイム (TE) は 26~156ms である。 α , β , γ は前頭皮質、尾状核、被殻、視床、淡蒼球、前頭白質の 6 部位で実測した R_2^{\dagger} を同部位の $[Fe]$, f_M を用いて重回帰分析を行って得た。

【結果と考察】図 1 に 1.5T, 1.9T, 3T, 4.7T, 7T で得たヒト脳の T_2^{\dagger} マップを示す。 T_2^{\dagger} が磁場依存変化を示すことが明らかである。図 1 の T_2^{\dagger} マップ上で前述の 6 部位 R_2^{\dagger} を実測し、

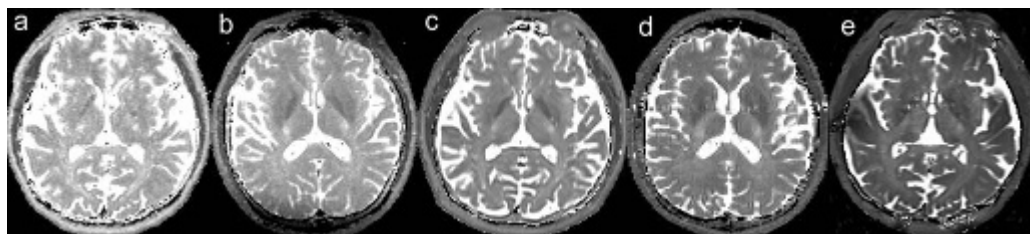


Fig.1. T_2^{\dagger} maps of human brain at (a) 1.5T, (b) 1.9T, (c) 3T, (d) 4.7T, and (e) 7T.

キーワード：ヒト脳、横緩和、鉄

○みつもり ふみゆき、わたなべ ひでひろ、たかや のぶひろ、マイケル ガーウッド、エドワード オーバハ

式(1)を用いて重回帰分析を行うと、いずれの磁場強度 (B_0) においても観測された R_2^{\dagger} は $[Fe]$ と f_M の線形結合で良く説明されることがわかった。実測および式(1)で計算された R_2^{\dagger} を $[Fe]$ に対してプロットした結果を図2に示す。また、ここで得られたそれぞれの B_0 における相関式の α 、 β 、 γ はそれぞれ異なる形の B_0 依存性を示すことがわかった。すなわち、 α は B_0 に比例して増大 (図3)、 β は B_0 の自乗に比例 (図4)、 γ は B_0 によらずほとんど一定である。 α の B_0 依存性は、フェリチン水溶液やフェリチンをドープしたゲル試料中の水プロトン R_2 の B_0 依存性と完全に一致し[3]、脳内においても水溶液と同じ緩和機構が働いていることを示す。一方、高分子量分画の寄与を示す β の挙動は、拡散や化学交換に由来する dynamic dephasing による緩和と一致する。また、 $[Fe]$ にも f_M にも依存しない定数項 γ は大部分が古典的な dipole-dipole 相互作用によるものであることを示している。

【結 語】ヒト脳組織水プロトンの横緩和速度は局所の非ヘム鉄濃度と高分子量分画の線形結合で良く説明できる。それぞれの寄与の磁場依存性より、鉄の寄与はフェリチン鉄が水溶液中で示す緩和と同じ機構、高分子の寄与は拡散や化学交換、残りの定数項では古典的な dipole-dipole 相互作用が主として働いていると考えられる。

【参考文献】

- [1] Mitsumori F, Watanabe H, Takaya N, Magn. Reson. Med., 62, 1326 (2009).
- [2] Mitsumori F, Watanabe H, Takaya N, Garwood M, Magn. Reson. Med., 58, 1054 (2007).
- [3] Gossuin Y, Roch A, Muller RN, Gillis P, Bue FL, Magn. Reson. Med., 58, 1054 (2007).48, 959 (2002)

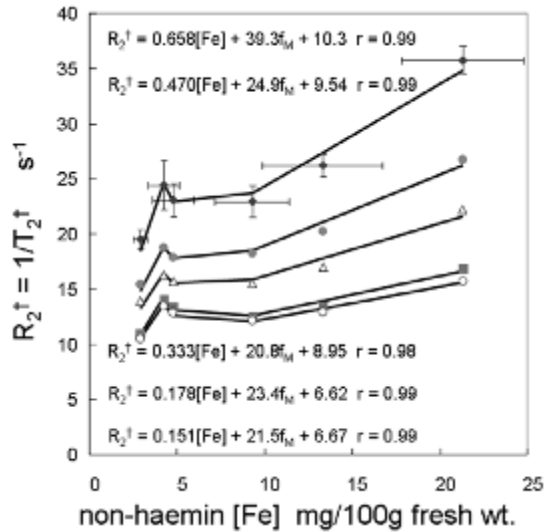


Fig.2. Observed R_2^{\dagger} in 6 brain regions at 1.5T(\circ), 1.9T(\blacksquare), 3T(\triangle), 4.7T(\bullet), and 7T(\blacklozenge) plotted against the regional $[Fe]$. Solid lines show calculated values using equation (1).

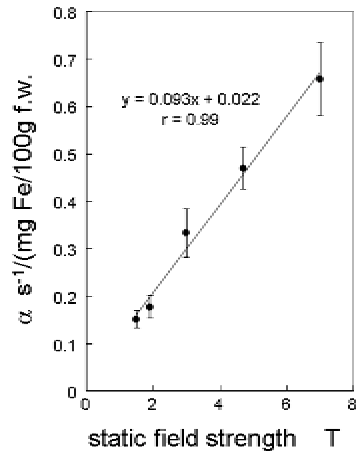


Fig. 3. B_0 dependence of α

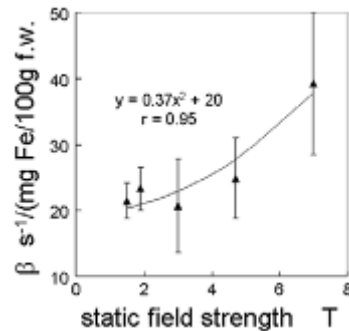


Fig. 4. B_0 dependence of β

衣食住へのバイオマス活用促進に向けた異種相関解析技術の構築

菊地淳^{1,2,3,4}、伊達康博^{1,3}、坂田研二³、福田真嗣^{3,5}、近山英輔^{1,3}

¹理研 PSC, ²理研 BMEP, ³横浜市生命, ⁴名大院生命農, ⁵理研 RCAI

Application of hetero-correlation methods toward promotion of effective use of plant biomass

Jun Kikuchi^{1,2,3,4}, Yasuhiro Date^{1,3}, Kenji Sakata³, Shinji Fukuda^{3,5}, Eisuke Chikayama^{1,3}

¹RIKEN PSC, ²RIKEN BMEP, ³Yokohama City Univ., ⁴Nagoya Univ., ⁵RIKEN RCAI

Humans have been received enormous benefit from ecosystem services since the beginning of our histories. Plant biomass is the most typical beneficial chemical products from ecosystem services, however, “biomass recalcitrance” is critical issue to overcome for effective use in our city-life and industries. Here, we will discuss our strategy for characterization of plant biomass based on hetero-correlation methods, statistically calculated between NMR and other –omics like data matrices.

<緒言> 地球の物質循環には生態系が深く関与し、植物のバイオマス生産、動物摂食による有機物変換と地理的分散、そして微生物叢分解へと有機的に連環する。この物質循環は生命 38 億年の進化史でゲノム情報に刻まれてきた自然の理であり、短い人類史を省みても農林水産業・水確保といった生態系サービスを受容し続けてきている。この生態系サービスからの主な受益物質は複雑な高分子・低分子混合物であるバイオマスで、産業革命以前は地産地消で 5F

カスケード利用（食料・繊維・飼料・肥料・燃料）されてきた。一方でこの分子複合系というバイオマスの特性故に、要素分解的に研究と実用化を進める先端科学研究からは置き去りにされてきた。しかし高分子・低分子の分子複合系を対象とするアプローチがブレークスルーとなり得る一例が食品研究で、加工性・食感・腹持ち等々、多糖類・蛋白質・脂質・塩・水分の混合物が絶妙に連環した複雑系の未開拓分野である。本要旨ではまず、我々の目指す衣食住へのバイオマス活用²⁾のうち特に“食”を意識したアプローチについて、難分解性多糖類の腸内細菌叢分解から述べる。

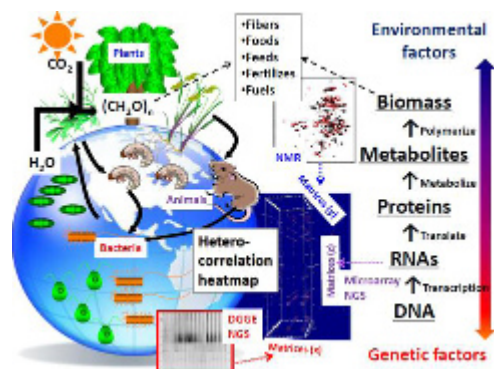


Fig.1. Concept of our strategy for efficient use of plant biomass by analysis of environmental metabolic systems based on hetero-correlation methods, such as microbiota (x) – metabolites (y). Left illustration is altered from ref.3.

植物バイオマス、生態系サービス、異種相関

○きくちじゅん、だてやすひろ、さかたけんじ、ふくだしんじ、ちかやまえいすけ

<腸内細菌複合叢を例題とした多糖類分解・代謝因子解析技術の構築>

冒頭で述べた生命 38 億年の進化史でも藍藻が酸素発生を行う前の地球では、嫌気性細菌叢が有機物を CO₂ や CH₄ へと代謝する環境にあり、ヒトや動物の腸内細菌叢にも類似のガス代謝能がメタゲノム情報に刻まれている。しかし原始地球の嫌気性微生物叢との大きな違いは栄養源にあり、難分解性多糖類が大量に入力される。こうしたバイオマスの摂食に相関して増殖し、なおかつ宿主の自己免疫力向上に関わる有用細菌は演者らも関

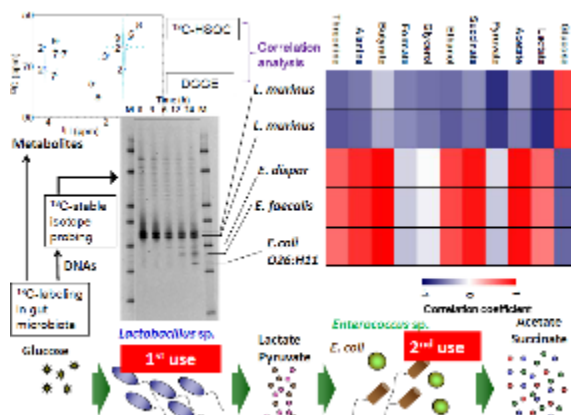


Fig.2. One of example for our hetero-correlation methods in the analysis of metabolic dynamics between metabolites (x) and gut microbiota (y). These figures are altered from ref.7.

心があり、その比較ゲノムと代謝能解析⁴⁾、代謝動態解析⁵⁾、糖代謝物質の腸管防御作用⁶⁾、微生物叢・代謝物異種相関解析⁷⁾の例も紹介したい。

<他のバイオマスの生産・分解に関わる遺伝子・微生物叢との異種相関解析技術構築>

衣食住のライフラインにバイオマスの有効活用化を推進していくためには、原料となる植物の炭素代謝経路解析⁸⁾、代謝関連遺伝子座との相関⁹⁾、代謝ネットワーク解析を目指した物質アノテーション技術¹⁰⁾といった研究課題がある。筆者らはこれら低分子代謝物研究の基盤を構築してきており、さらに最近では高分子バイオマスへの解析基盤構築を始動している¹¹⁾。また、バイオマス分解に関わる微生物叢の情報も数値マトリックス化することで、上述の腸内細菌叢の解析で培ってきた NMR 情報との共相関解析を遂行することも可能になってきた¹²⁾。本会では、これらの最新トピックスの一部にもふれたい。

<参考文献>

- 1) Schindler *et al.* (2010) *Nature* **465**, 609-612.
- 2) 菊地淳 (2008) *植物の生長調節* **43**, 144-155; 菊地淳ら, (2009) *難培養性微生物研究の最新技術 II*, CMC 出版, 147-155; 菊地淳ら, (in press) *未利用バイオマスの活用技術と事業性評価*, Sci&Tech 出版.
- 3) Sekiyama *et al.* (submitted) *Anal. Chem.*
- 4) Morita *et al.* (2008) *DNA Res.* **15**, 151-161.
- 5) Fukuda *et al.* (2009) *PLoS ONE* **4**, e4893; Nakanishi *et al.* (submitted) *J. Proteome Res.*
- 6) Fukuda *et al.* (submitted) *Nature*.
- 7) Date *et al.* (2010) *J. Biosci. Bioeng.* **110**, 87-93.
- 8) Kikuchi *et al.* (2004) *Plant Cell Physiol.* **45**, 1099-1104; Kikuchi *et al.* (2007) *Method Mol Biol.* **358**, 273-286; Sekiyama *et al.* (2007) *Photochemistry* **68**, 2320-2329; Tian *et al.* (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 18532-18541; Ohyama *et al.* (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 725-730.
- 9) Mochida *et al.* (2009) *BMC Genomics* **10**, e563.
- 10) Chikayama *et al.* (2008) *PLoS ONE* **3**, e3805; Akiyama *et al.* (2008) *In Silico Biol.* **8**, e27; Sekiyama *et al.* (2010) *Anal. Chem.* **82**, 1643-1652; Chikayama *et al.* (2010) *Anal. Chem.* **82**, 1653-1658.
- 11) 篠阿弥字ら, 第 49 回 NMR 討論会要旨集 YP9; 森哲哉ら, 第 49 回 NMR 討論会要旨集 P78.
- 12) 飯倉智弘ら, 第 49 回 NMR 討論会要旨集 YP8; 小倉立己ら, 第 49 回 NMR 討論会要旨集 P6.

L28

固体¹⁵N NMR法を用いたカーボンアロイ触媒の酸素還元活性の研究

○黒木重樹

東京工業大学・院・理工・有機・高分子物質専攻

Oxygen Reduction Activity of Pyrolyzed Polypyrroles studied by ¹⁵N Solid-State NMR

○Shigeki Kuroki

Dept. of Organic and Polymeric Materials Tokyo Institute of Technology, Ookayama, Meguro-ku, Tokyo 152-8552 Japan

¹⁵N labeled polypyrrole is prepared as a precursor of N-doped carbon catalysts and is pyrolyzed at several different temperatures in a nitrogen atmosphere. The oxygen reduction reaction is evaluated and solid-state ¹⁵N NMR and XPS spectra of the samples are measured. The relationship between oxygen reduction activity and the chemical structure, combined with principal component analysis is discussed. The iron-free pyrolyzed polypyrrole samples display quite poor catalytic activity for oxygen reduction, whilst the iron-containing pyrolyzed polypyrrole samples display better oxygen reduction activity. Using principal component analysis of the XPS and ¹⁵N solid-state NMR spectra, it is found that most pyridinic, quaternary, and pyridinium-like or pyrrolic nitrogen atoms in the samples are not related to oxygen reduction reaction. However, the samples which contain a larger proportion of some particular type of pyridinic nitrogen atoms show a higher activity for the oxygen reduction reaction.

[緒言] 固体高分子形燃料電池 (PEFC) は、低温での発電が可能のため耐高温用断熱材などを使わなくても良いというメリットがあるものの、高い触媒機能を有する高価な白金を使用しなければならないというコスト上の大きなデメリットがある。白金は、PEFC の燃料極及び空気極の両極で使用されている。特に、空気極においては未だに酸素還元触媒として白金が多量に使用されている。このような状況下、白金に代わる高い酸素還元反応 (ORR) 特性と安定性を有する新触媒の開発が、国内外で精力的に進められている。

これまで、いくつかの全く白金を用いなくても高い ORR 特性を示す触媒が提案されている。1964 年、Jasinski は遷移金属ポルフィリンやフタロシアニンが酸素還元特性を示すことを最初に報告した¹。この他、酸化物、窒化物、炭化物、カルコケナイド化合物などのセラミックス材料の ORR 特性が検討されている。しかしながら、これらの触媒の発電性能は白金と比較して十分ではなく、また耐久性の面でも問題があり実用化に至ってはいない。

現在、世界中の多くの研究者が、遷移金属、炭素、窒素含有前駆体の混合物を高い温度で熱処理することにより高活性の酸素還元触媒を得ることに成功している。我々も鉄及びコバルトフタロシアニンと熱硬化性樹脂の混合物を熱処理した試料 (カーボン窒素含有カーボン、酸素還元反応、固体¹⁵N NMR

○くろきしげき

ンアロイ触媒と命名)が高い ORR 活性を示すことを報告した^{2,3}。その酸素還元活性点に関し、様々なモデル^{4,5}が提案されているが、まだ結論には達していない。そこで、我々は窒素含有高分子の熱処理物の化学構造、特に窒素原子周りの構造が酸素還元活性にどのような寄与をおよぼしているかを XPS と固体 NMR を組み合わせて考察を試みた。

[試料] Zelenay らの化学的に調製された Co-Polypyrrole-Carbon composite (Co-PPy-C) が熱処理することなしに、高い ORR 活性を示すことを踏まえ、試料には、ポリピロール (PPy) を選んだ。¹⁵N NMR 測定のため、¹⁵N ラベルピロールをモノマーに用い、2つの酸化剤 FeCl₃ またはペルオキシ二硫酸アンモニウム (APS) を用い、ポリピロール (各々 PPyFe および PPyA と今後呼ぶ) を合成した。このようにして合成された PPy を赤外線加熱炉中で窒素雰囲気、1 時間 700°C~900°C で熱処理することにより、試料を得た。試料はその熱処理温度を踏まえ、例えば PPyFe の 700°C 処理の場合は、PPyFe700 と呼ぶ。

[結果と考察] 図 1 に本研究で用いた熱分解 PPy 試料の酸素還元ボルタモグラムを示す。ここから、得られた各々の試料の ORR 活性を表 1 にまとめる。この結果より、PPyFe が PPyA に比較して高い ORR 活性を示すことがわかる。最も高い ORR 活性を示したのは PPyFe900 であった。

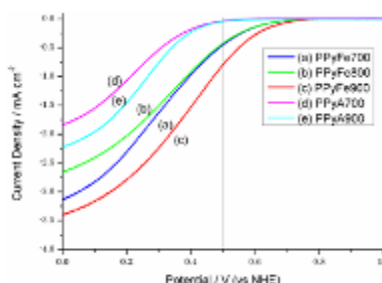


Figure 1. RDE voltammograms of PPyFe and PPyA samples pyrolyzed at various temperatures

Table 1 E_{onset} and current density at 0.5 V of pyrolyzed PPy's

| Sample | E_{onset} * (V) | Current density at 0.5 V (mA cm ⁻²) |
|----------|-------------------|---|
| PPyFe700 | 0.75 | -0.453 |
| PPyFe800 | 0.74 | -0.432 |
| PPyFe900 | 0.76 | -0.796 |
| PPyA700 | 0.55 | -0.036 |
| PPyA900 | 0.58 | -0.044 |

* defined as the voltage at which a reduction current density of $-10 \mu\text{A cm}^{-2}$ is observed.

Table 2 Elemental mass composition plus the H/C and N/C atomic ratios of PPyFe and PPyA samples pyrolyzed at various temperatures

| Sample | C | H | N | H/C (atomic ratio) | N/C (atomic ratio) |
|----------|-------|------|-------|--------------------|--------------------|
| PPyFe700 | 80.32 | 1.49 | 15.97 | 0.22 | 0.17 |
| PPyFe800 | 72.27 | 1.10 | 12.34 | 0.18 | 0.15 |
| PPyFe900 | 76.95 | 0.85 | 10.29 | 0.13 | 0.11 |
| PPyA700 | 64.61 | 1.28 | 11.92 | 0.24 | 0.16 |
| PPyA900 | 75.91 | 0.85 | 10.28 | 0.13 | 0.12 |

表 2 に各々の試料の元素分析の結果を示す。この結果より熱処理温度の上昇に伴い、炭素に対する窒素含有量が減少することがわかる。また、熱処理温度が共通な試料ではその C/N 比もほぼ同じであることがわかる。表 2 の結果と図 1、表 1 が示す ORR

活性から、試料の窒素含有量と ORR 活性には相関がないことがわかる。

これらの試料の TEM 像から、PPyA700 はアモルファス炭素であり、グラファイト層の規則的積層構造は全く見られない一方、PPyFe700 はやはり多くがアモルファス炭素であるが、いくらかの規則的グラファイト層の積層構造が見られた。また、金属状態の鉄粒子の存在も確認できた。PPyA900 および PPyFe900 はかなり規則的なグラファイト層の積層構造の存在が増え、そのサイズはグラファイト 1 面の大きさと 5nm 程度、積層数は 10 枚以下であった。PPyFe900 では金属状態の鉄粒子を確認できなかった。

熱分解 PPy 試料の ESR 測定より、全ての試料で 3409G に $g=2.00$ に対応する信号が観測され、これは典型的な炭素材料に見られる信号である。これ以外に、PPyFe には信号強度は弱い、かなりブロードな金属状態の鉄に帰属される信号と、1500G に $g=4.28$ に対応する鋭い信号が観測されている。これは Fe^{3+} に帰属され、いずれにせよ PPyFe は微量の鉄種を含有していることがわかった。

図 2 に熱分解 PPy 試料の N1sXPS スペクトルを示す。窒素含有炭素中のピリジン型 (398eV)、ピロール型 (400eV)、4 級窒素 (401eV) の存在が確認された。各々、線形はかなり類似しているが、最も ORR 活性の高い PPyFe900 はほとんどピロール型に帰属される 400eV の信号は消滅していることがわかる。

次に熱分解 PPy 試料の固体 ^{15}N CP/MAS スペクトルを図 3 に示す。熱分解前の PPy は 120ppm に 1 本のピロール型窒素に帰属される信号のみが観測されていたが、熱処理温度の上昇に伴い、260ppm にピリジン型窒素に帰属される信号が出現する。同時に、140ppm 付近にピリジン型とは異なる水素が直接結合していない窒素に帰属される信号が観測されている。これは 4 級窒素由来の信号と推測され、固体 NMR でこのような 4 級窒素の存在が確認されたのは初めてのことである。

さて、ORR 活性と相関がある窒素種を特定するため、多変量解析としてよく知られる主成分分析 (PCA) を XPS スペクトルと SSNMR スペクトルに適用した。ここでは紙面の都合上 PCA の詳細は述べず、その結果のみを図 4 および 5 に示す。

PCA の結果、第一主成分 PC1 は XPS、SSNMR とともに全体の 75% 以上の情報を保持している。熱処理温度の上昇に伴い PC1 の減少していることがわかる。また、PC1 には全ての窒素種 (ピリジン型、ピロール型、ピリジニウム型、4 級窒素) からの寄与が含まれていることがわかる。この PC1 と表 1

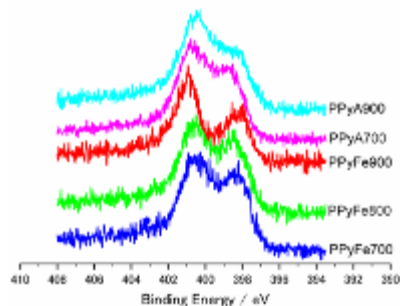


Figure 2. N1s XPS spectra of the pyrolysed PPy samples.

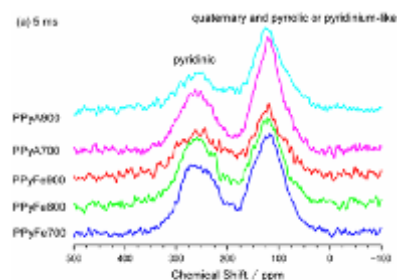


Figure 3. ^{15}N CP/MAS NMR spectra of pyrolysed PPy samples with contact times of 5 ms.

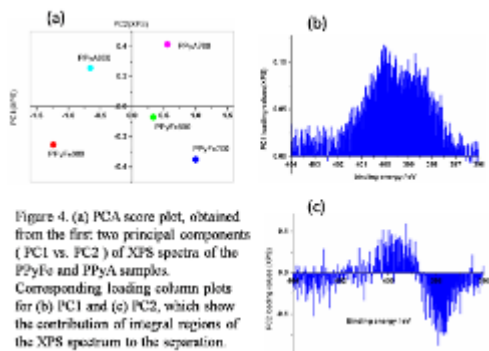


Figure 4. (a) PCA score plot, obtained from the first two principal components (PC1 vs. PC2) of XPS spectra of the PPyFe and PPyA samples. Corresponding loading column plots for (b) PC1 and (c) PC2, which show the contribution of integral regions of the XPS spectrum to the separation.

で示した ORR 活性の間には相関がなく、系中の 75%以上の窒素は ORR 活性と関係がないことが推測される。

一方、第二主成分 PC2 は XPS、SSNMR とともに、高活性な PPyFe は負の PC2 スコアを示し、低活性な PPyA は正の PC2 スコアを示していることがわかる。ORR 活性と PC2 スコアの関係を図 6 に示す。良好な相関関係が得られ、PC2 スコアの減少に伴い、ORR 活性が

良くなっていくことがわかる。PC2 に寄与する窒素種を調べると、XPS、SSNMR とともに、ピリジン型が負の、ピロール型+ピリジニウム型が正の寄与があることがわかり、4 級窒素の PC2 への寄与はほとんど見られない。したがって、ある特別な種類のピリジン型窒素が増加し、ピロール型+ピリジニウム型窒素が減少することにより ORR 活性が良くなるということが推論される。

[結論]XPS および SSNMR の PCA の結果、熱分解 PPy の系では、残存窒素のうち、75%以上の窒素が ORR 活性と相関がなく、ある特別な種類のピリジン型窒素の増加、それに伴うピロール型+ピリジニウム型窒素の減少が ORR 活性の向上に寄与していることがわかった。それでは、ある特別な種類のピリジン型窒素とはどのような窒素だろうか？Dodelet らによって示された図 7 の金属配位ピリジン (FeN₂/C)(a)モデル⁴は、ある特別な種類のピリジン型窒素が ORR 活性に有効であり、ピリジニウム型窒素の生成を抑えると我々の実験結果をよく説明する。

本研究は NEDO プロジェクト「固体高分子形燃料電池実用化戦略的技術開発/要素技術開発/カーボンアロイ触媒」の委託を受けて行った。

文献

1. Jasinski, R. *Nature* 1964, **201**, 1212-1213.
2. Nabaie, Y.; Moriya, S.; Matsubayashi, K.; Lyth, S.M.; Malon, M.; Wu, L.; Islam, N.M.; Koshigoe, Y.; Kuroki, S.; Kakimoto, M.; Miyata, S.; Ozaki, J. *Carbon*, 2010, **48**, 2613-2624.
3. Wu, L.; Nabaie, Y.; Moriya, S.; Matsubayashi, K.; Islam, N. M.; Kuroki, S.; Kakimoto, M.; Ozaki, J.; Miyata, S. *Chem. Commun.* 2010, **46**, 6377-6379.
4. Lefevre, M.; Dodelet, J.P.; Bertrand, P. *J. Phys. Chem. B* 2002, **106**, 8705- 8713.
5. Ikeda, T.; Boero, M.; Fe, S.F.; Terakura, K.; Oshima, M.; Ozaki, J. *J. Phys. Chem. C* 2008, **112**, 14706-14409.

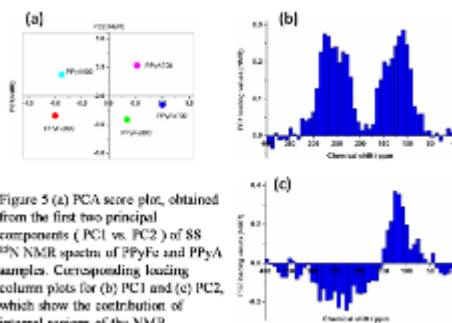


Figure 5 (a) PCA score plot, obtained from the first two principal components (PC1 vs. PC2) of 88 ¹⁵N NMR spectra of PPyFe and PPyA samples. Corresponding loading column plots for (b) PC1 and (c) PC2, which show the contribution of integral regions of the NMR spectrum to the separation.

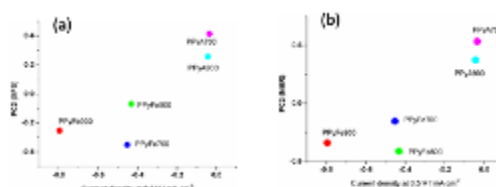


Figure 6. The relationship between the current density at 0.5 V and the PC2 value of the XPS (a) and the SSNMR data (b).

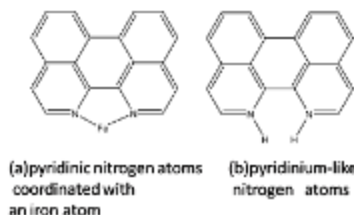


Figure 7. Which kind of pyridinic nitrogen is active for ORR ?

固体NMRによるAl-MCM-41ならびに類似触媒材料中のAlの配位環境解析

○高橋利和¹, 岩浪克之¹, 林 繁信², 坂倉俊康¹, 安田弘之¹

¹産総研・環境化学技術研究部門

²産総研・計測フロンティア研究部門

Solid-state NMR Analysis of Coordination Environment of Al in Al-MCM-41 and related catalyst materials

○Toshikazu Takahashi¹, Katsuyuki Iwanami¹, Shigenobu Hayashi², Toshiyasu Sakakura¹, and Hiroyuki Yasuda¹

¹Research Institute for Innovation in Sustainable Chemistry, AIST, Ibaraki, Japan.

²Research Institute for Instrumentation Frontier, AIST, Ibaraki, Japan.

Al-MCM-41 (Si/Al = 20, d = 2.8 nm) shows exceptionally high activities to cyanosilylation and some related reactions of carbonyl compounds among silica-alumina catalysts. We have found a positive correlation between the catalytic activity and the Al^[VI] contents in the different Al-MCM-41's of various pore diameters. This fact suggests that the Al^[VI] is the active site or its precursor. Recently, Bell and their coworkers proposed that wide-opened Al^[IV] sites in zeolites with large pore size, such as Beta or H-USY, show reversible Al^[IV] / Al^[VI] interchange accompanying association / dissociation of two coordination water molecules. Each the ²⁷Al MQMAS NMR spectrum of Al-MCM-41 and H-Y zeolite has shown a Al^[VI] signal having large P_Q values (6.2 MHz, 8.2 MHz, respectively). Thus an Al^[VI] site in Al-MCM-41 being more distorted than that of H-Y was found; that possibly be the active site precursor.

【はじめに】我々はAl-MCM-41がカルボニル化合物のシアノシリル化等ケイ素置換求核剤とカルボニル化合物との反応に特異的に高い触媒活性を示す事実を見出し^[1,2]、その機構解明を目指して固体NMRを用いた構造解析を行っている。これまでにAl-MCM-41のNMRスペクトルに見出されるAl^[VI]のほとんどが表面の酸性プロトンのNa⁺へのイオン交換/H⁺への再交換に伴ってAl^[IV]⇌Al^[VI]の可逆的変化を行うことを見出し、この事実から大部分のAl^[VI]は表面に存在することを示した。また¹H-²⁷Al FSLG HETCORにおいてAl^[VI]中に水を配位した大きな四極子結合をもつ特異なサイトを見出した。このサイトのP_Qはピークの形から6-7MHzと見積もられた。孔径の異なるAl-MCM-41についてAl^[VI]の量と触媒活性の間に相関があることも見出した^[3]。

最近、BellらはBeta型、H-USY型等孔径の大きなゼオライトについて、Al^[IV]の一部が水和/脱水過程で可逆的にAl上の配位水を結合/解離し、Al^[IV]/Al^[VI]間を行き来するモデルを提案している (Scheme) ^[4,5]。これらの触媒材料中の、特にAl^[VI]サイトの配位環境の特徴を抽出し、構造の候補を絞るためにMQMASの実験を行った結果、Al-MCM-41のAl^[VI]はH-Y型のそれよりも大きなP_Q値を示すことが明らかとなった。

²⁷Al MQMAS NMR, 可逆的配位数変化, ¹H-²⁷Al FSLG HETCOR

○たかはしとしかず, いわなみかつゆき, はやしげのぶ, さかくらとしやす, やすだひろゆき

【実験と結果】 Al-MCM-41 (Si/Al = 20) は既報に従って調製した^[1]。H-Yゼオライトは Tosoh HSZ-320NAA (Si/Al = 2.3, Na⁺型)を 1 M NH₄Cl aq. によって処理した後、550 °C / 12 h 焼成した。固体 NMR は AVANCE 400 WB、4 mm ¹H-X BB MAS プロープを用いた。測定に先だち、サンプルは湿度 50%の室内に 1 日放置して水和させた。MQ-MAS は 3 パルスの z-filter 付きシーケンスを用い、待ち時間 50 ms で積算して得られた F2 軸上の FID128 枚をローター半回転周期にシンクロしつつ States 法にて取得し、Shearing 変換によって 2D スペクトラムを得た。

図 1 左に Al-MCM-41 の、右に H-Y ゼオライトの MQMAS の 2D チャートを示す。それぞれ一部分離不完全ながら Al^[IV]、Al^[VI]に 1 ないし 2 成分のシグナルが観測された。重心を見積り、その F1、F2 座標から求めた δ_{so} 、P_Q 値を表 1 にまとめた。

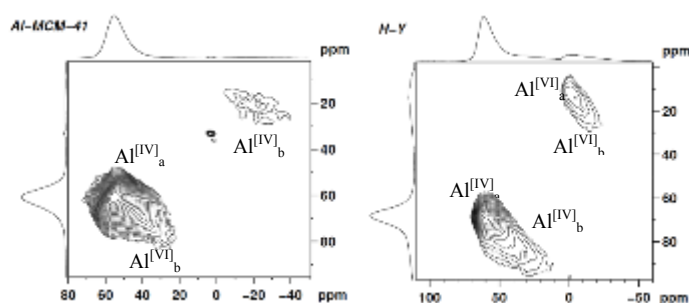


Fig. 1. ²⁷Al 3Q-MQMAS spectra of Al-MCM-41(left) and H-Y(right). 3 Pulse (z-filter) conditions with 2.4 μ s (183 kHz) - t1 - 0.7 μ s, 20 μ s (4.7 kHz), was applied. Sample rotation: 12.5 kHz

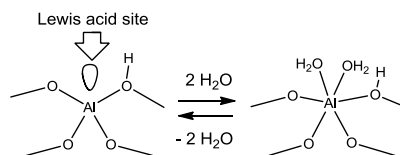
オライト等にはない特異なサイトが反応活性に関わっていると考えられる。Al^[VI]については H-Y ゼオライトよりもより小さな P_Q 値を示した。結晶中よりはアモルファス中の方が Al(III)にとってよりリラックスした配位環境にあると解釈しうる。一方、Al-MCM-41 の Al^[VI]については H-Y よりも大きな P_Q 値が得られ、よりストレスが加わった Al^[VI]の存在を示唆する。この値はこのサイトの ¹H-²⁷Al FSLG HETCOR で見出されたツインピークパターンから推定された値 6-7 MHz より大きい。ここまでの検討で活性サイ

トの構造を絞りこむための手掛かりが得られた。なお、MQMAS に関して貴重な助言をいただいた日本電子株式会社の中井利仁博士に謝意を表す。本研究は新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO) の支援の下に行われた。

Table 1. Summary of NMR Parameters obtained from Fig. 1

| | | Al ^[IV] _a | Al ^[IV] _b | Al ^[VI] _a | Al ^[VI] _b |
|-----------|----------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| Al-MCM-41 | δ_{so} (ppm) | 58.4 | 68.6 | - | 2.8 |
| | P _Q (MHz) | 3.6 | 6.8 | - | 8.2 |
| H-Y | δ_{so} (ppm) | 64.0 | 4.3 | 7.2 | 1.2 |
| | P _Q (MHz) | 72.8 | 8.6 | 5.3 | 6.2 |

【文献】 [1] Iwanami, Choi, Lu, Sakakura, Yasuda, *Chem. Commun.*, 1002 (2008). [2] Iwanami, Sakakura, Yasuda, *Catal. Commun.*, **10**, 1990 (2009). [3] 岩浪, 高橋, 坂倉, 安田, 触媒 450 (2010). [4] Bokhoven, Koningsberger, Kunkeler, Bekkum, Kentgens, *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 12842 (2000). [5] Drake, Zhang, Gilles, Liu, Nachimuthu, Perera, Wakita, Bell, *J. Phys. Chem. B*, **110**, 11665 (2006).



Scheme. Reversible coordination number change that will provide the active site.

【考察】いずれのサンプルも比較的大きな P_Q を示す Al^[VI]が見出された (表 1)。フレームワーク Al^[IV]が水を配位結合して生成したものと考えて矛盾がない。一方 Al-MCM-41、H-Y ゼオライトそれぞれのシアノシリル化触媒活性は擬一次速

度定数の比較において 1.6 min⁻¹、6.7 × 10⁻⁴ min⁻¹ と大きく隔たっており^[1]、細孔内拡散の容易さを考慮しても H-Y ゼ