

P101

NMR を用いた緑茶カテキンとリン脂質膜との相互

作用メカニズムの解明

○植草 義徳^{1,2}, 上平 (石島) 美弥², 杉本 収², 丹治 健一²,
中村 浩蔵³, 石井 剛志², 熊澤 茂則², 加藤 晃一¹,
内藤 晶⁴, 中山 勉²

¹自然科学研究機構・岡崎統合バイオサイエンスセンター,
²静岡県大院・生活健, ³信州大・農, ⁴横浜国大院・工

Investigation of the interaction mechanism between tea catechins and phospholipid membranes by NMR spectroscopy

○Yoshinori Uekusa^{1,2}, Miya Kamihira-Ishijima², Osamu Sugimoto², Ken-ichi Tanji²,
Kozo Nakamura³, Takeshi Ishii², Shigenori Kumazawa², Koichi Kato¹, Akira Naito³,
and Tsutomu Nakayama²

¹Okazaki Institute for Integrative Bioscience, National Institutes of Natural Sciences

²Department of Food and Nutritional Sciences, University of Shizuoka

³Department of Bioscience and Biotechnology, Shinshu University

⁴Graduate School of Engineering, Yokohama National University

Epicatechin gallate (ECg), a galloyl-type green tea polyphenol, strongly interacts with phospholipid membranes. Our previous NOE experiments revealed an important site of ECg–phospholipid membranes interaction: the B ring and galloyl moiety of ECg locate near the γ position of phospholipid. To elucidate the mechanism of this interaction, we measured the interatomic distance between the carbonyl carbon of ECg and the phosphorus of phospholipid by ³¹P–¹³C rotational echo double resonance (REDOR) method in solid-state NMR spectroscopy. Based on the results of REDOR and previous solution NMR experiments, it was revealed that the galloyl moiety of ECg contributes to stabilization of catechin molecules in the phospholipid membranes through cation– π interaction between the galloyl ring and quaternary amine of the phospholipid head-group.

【序論】緑茶中に含まれるカテキン類は食品機能性成分として広く認知されており、様々な生理的効果を有することが報告されている。特に galloyl 基を持つ epicatechin gallate (ECg) (Fig. 1) はこれを持たないカテキン類に比べ高い活性を示すことが多い。我々は、カテキン類の生理活性強度の違いは、細胞膜であるリン脂質二重層に対する相互作用の違いや取り込みの差を反映していると推測しており、カテキン類とリン脂質膜との相互作用を解明することは生理活性強度の違いを分子レベルで理解する上
キーワード：カテキン, リン脂質膜, カチオン– π 相互作用

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

で重要であると考えている。先行研究において、リン脂質膜に対する親和性が高い ECg を用いて、 ^1H - ^1H 同種核及び ^1H - ^{13}C 異種核 NOE 相関実験を行い、ECg の B 環と galloyl 基がリン脂質分子の γ 位に近接して相互作用していることを明らかにした。本研究では、固体 NMR の ^{31}P - ^{13}C rotational echo double resonance (REDOR) 法を用いて原子間距離を精密に測定することで、リン脂質膜中における ECg 分子の分子配置情報を取得し、詳細なリン脂質膜との相互作用メカニズムを解明することを目的としている。さらに拡散係数を測定することにより、水溶液中とリン脂質膜中におけるカテキン分子の運動性について検討を行った。

【実験方法】 拡散係数は、ECg を D_2O に溶解あるいは DMPC と DHPC で構成されたバイセルに再構成させた状態で JEOL JNM ECA-600 NMR 分光器を用いて測定した。ECg のカルボニル炭素を ^{13}C ラベルした ^{13}C -ECg は化学合成することにより得た。この ^{13}C -ECg を multilamellar vesicle (MLV) に再構成させて水和試料を調製し、急速凍結・凍結乾燥により粉末試料を作製した後、分子間原子間距離を ^{13}C - ^{31}P REDOR 法により測定した。REDOR 測定には xy-4 compensation pulse 法を用いて Chemagnetics CMX infinity-400 NMR 分光器にて測定した。

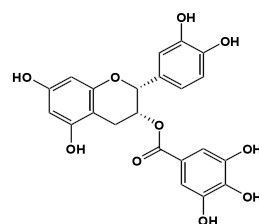


Fig. 1. Chemical structure of ECg.

【結果と考察】 ECg の拡散係数は、水溶液中では 5.99×10^{-10} [m^2/s] であったのに対し、バイセル中では水溶液中と比べて 1/3 程度であった。得られたバイセル中での ECg の拡散係数はバイセル自身の拡散係数とよく一致したことから、ECg 分子はリン脂質膜中で膜の揺らぎと同程度の運動性を有していることが推測された。この知見は、先行研究の溶液 NMR を用いた T_1 測定結果からも支持される。次に、 ^{13}C -ECg のカルボニル炭素とリン脂質分子のリン原子との分子間 ^{13}C - ^{31}P 原子間距離を ^{13}C - ^{31}P REDOR 実験により測定したところ、この原子間距離は $5.3 \pm 0.1 \text{ \AA}$ と算出された。Fig. 2 に REDOR 実験で得られた原子間距離と溶液 NMR の同種核及び異種核 NOE 実験の結果を基に作製した ECg 分子とリン脂質膜との相互作用モデル図を示す。ECg の galloyl 基平面はリン脂質分子コリン基に存在するアンモニウムイオン (カチオン) 近傍に位置することにより、galloyl 基の芳香環に存在する π 電子とカチオン- π 相互作用していることが推察された。また、先行研究の NOE 相関測定により、ECg の B 環と galloyl 基はリン脂質膜中で π - π 相互作用によりスタッキング構造をとっていることが予想されていたが、この π - π 相互作用がリン脂質分子との間で働くカチオン- π 相互作用をより強め、膜中における ECg 分子の安定性をより高めていると考えられた。以上より、カテキン類が生理的機能を発揮するためには、カテキン類の疎水性が駆動力となるリン脂質膜への高い親和性だけでなく、リン脂質膜中におけるカチオン- π 相互作用に起因したエネルギー安定化が重要であると考えられる。従って、ECg はこの二つの機能を持つ galloyl 基を有するため、リン脂質膜と強い相互作用を示し、数多くの生理活性作用に至るものと考えられる。

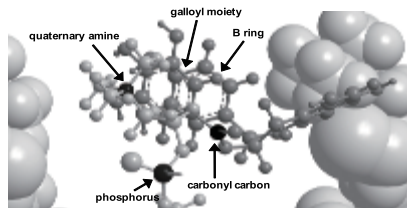


Fig. 2. Schematic representation of the interaction between ECg and phospholipid membranes.

Magnetic Alignment of Bicelle Composed of Un-, and Saturated Phosphatidylcholine as Studied by Solid State NMR SpectroscopyNaoko Uekama¹, Satoru Tuzi², and ○ Katsuyuki Nishimura¹¹Institute for Molecular Science, ²University of Hyogo

We have reported the development of new bicelle composed of un-, and saturated lipids together with phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate (PIP₂) in which can be magnetically aligned at room temperature stably. In this study, we explored the origin of enhancement factor of magnetic alignment of the developed bicelle above by changing the composition of lipids.

Introduction: Conventional bicelle prepared from the hydrated mixture of saturated lipids possessing short and long acyl-chains at proper composition forms planer lipid bilayer and can be magnetically aligned under static magnetic field from 30 to 40 °C. Triba et al., proposed a bicelle prepared by mixture of saturated lipid 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DMPC) and unsaturated lipid 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (POPC) for long acyl chain lipids, and 1,2-dihexanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DHPC) for short acyl chain lipid, respectively, in order to achieve magnetic alignment at temperature lower than that of conventional bicelle¹). In the following we refer above bicelle to as POPC/DMPC/DHPC-bicelle. However we found out that POPC/DMPC/DHPC-bicelle magnetically aligned only at narrow temperature range. Furthermore, we also found out that addition of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) to the bicelle at proper molar ratio enables significant enhancement of magnetic alignment. Our developed bicelle magnetically aligned over 3 hold larger temperature range than that of POPC/DMPC/DHPC-bicelle, stably.

Experimental: POPC/DMPC/DHPC-bicelle, and PIP₂/POPC/DMPC/DHPC-bicelle, and SIPC/POPC/DMPC/DHPC-bicelle were prepared with q value of 3.0. Orientational properties of those bicelles were compared based on ³¹P-NMR. All of NMR experiments were

固体 NMR バイセル

○ うえかま なおこ、つじ さとる、にしむら かつゆき

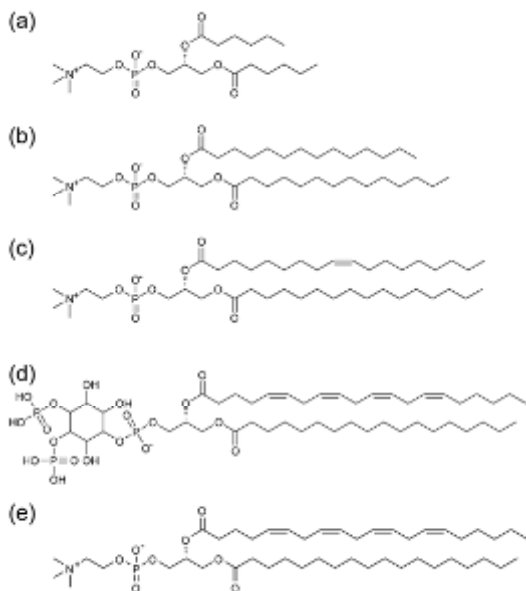


Fig. 1 Molecular structure of lipid of (a)DHPC, (b) DMPC, (c) POPC, (d) PIP₂, and (e) SAPP used in this study.

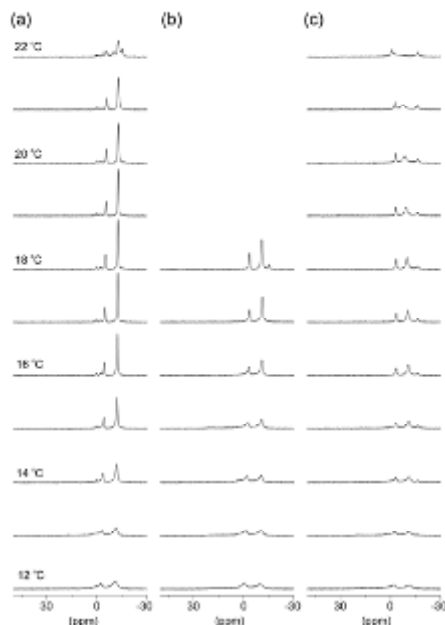


Fig. 2 ³¹P-NMR spectra of (a) PIP₂/POPC/DMPC/DHPC-bicelle, (b) POPC/DMPC/DHPC-bicelle (c) SAPP/POPC/DMPC/DHPC-bicelle, respectively.

carried out using Varian INOVA 400 spectrometer equipped with JEOL 6 mm o.d. narrow bore MAS probe at static mode.

Results and Discussions: Figure 1 shows the molecular structure of lipids used in this study. Figure 2 shows the comparison of ³¹P-NMR spectra for (a) PIP₂/POPC/DMPC/DHPC-bicelle, (b) POPC/DMPC/DHPC-bicelle, and (c) SAPP/POPC/DMPC/DHPC-bicelle, respectively. The peaks around -3 and -11 ppm are originated from DHPC and POPC/DMPC mixture, respectively. The peak around -15.5 ppm is δ_{\perp} edge of axially symmetric powder pattern of ³¹P chemical shift anisotropy from multi lamella vesicles (MLVs). As shown in Figure 2 (a), PIP₂/POPC/DMPC/DHPC -bicelle was magnetically aligned stably from 14 to 20°C. In contrast, POPC/DMPC/DHPC-bicelle was magnetically aligned only at 16 °C. At 18 °C, δ_{\perp} edge of axially symmetric powder pattern of ³¹P chemical shift anisotropy from MLVs was appeared. Furthermore, magnetic alignment of SAPP/POPC/DMPC/DHPC-bicelle was lower than those of other bicelles. Thus we concluded that polar head region of PIP₂ may contribute to the enhancement of magnetic alignment of bicelle.

References

(1) Triba MN, Devaux PF, Warschawski DE, *Biophys. J.* **2006**, *91*, 1357.

P103

B_1^+ , B_1^- マッピングを用いた高磁場でのヒト脳画像の不均一補正

○渡邊英宏, 高屋展宏, 三森文行
独立行政法人 国立環境研究所

Non uniformity correction of human brain image at high field using B_1^+ and B_1^- mapping

○Hidehiro Watanabe, Nobuhiro Takaya, Fumiyuki Mitsumori
National Institute for Environmental Studies

A new method of correcting image non-uniformity at high field is proposed. Image non-uniformity originates from the spatial distribution of RF transmission and reception fields, represented as B_1^+ and B_1^- , respectively. In our method, B_1^+ mapping was performed *in vivo* by a phase method. In B_1^- mapping, images with multiple TEs were acquired with a multi-echo adiabatic spin echo (MASE) sequence which enables homogeneous excitation. By T_2 fitting of these images an M_0^{MASE} map was obtained, in which signal intensity was expressed as the product of B_1^- and $M_0(1-e^{-TR/T_1})$. The ratio of this M_0^{MASE} map to the B_1^+ map showed a similar spatial pattern in different human brains. These ratios of M_0^{MASE} to B_1^+ in 24 subjects were averaged and then fitted to obtain a universal ratio map of B_1^-/B_1^+ (ρ). Uniform image intensity was achieved by using both the measured B_1^+ and calculated B_1^- from the ρ map.

1. はじめに

高感度の特徴を持つ高磁場 MRI は、高精細で高分解能な画像化が可能であるものの、高周波磁場 (B_1) 分布に起因する画像の不均一性の克服が課題である。特に高磁場 MRI では、誘電体である測定対象の被検体の大きさとその内部での波長とが同程度となるため、電磁波の振る舞いが複雑になり、中心付近に高信号が認められる高磁場特有の画像が現れる。この誘電体内での高周波磁場に関して送信 B_1 と受信 B_1 とが異なり、それぞれ複素ベクトルの B_1^+ と B_1^{-*} で表せることが近年報告され (1) (* は、複素共役を示す)、高磁場での実験結果などからこの考え方は受け入れられつつある。そこで、この考え方にもとづいて 4.7 T での測定結果の検討を行い、ヒト脳内の B_1^+ 、 B_1^- マッピングおよび補正法を提案、開発し、均一画像を取得することができたので報告する。(但し、 $B_1^+ = |B_1^+|$ 、 $B_1^- = |B_1^{-*}|$)

2. 方法

全身用 4.7 T MRI 装置 INOVA (Varian, USA) で、送受信兼用体積 TEM コイルを用いて、ヒト脳内の基底核スライス面上 (スライス厚: 2.5 mm) での測定を行った。 B_1^+ マッピングには、高速計測が可能な位相法を用い、断熱パルスで構成される 2 種類の SE 画像から求めた位相差分布から B_1^+ 分布を計算した。次に、均一送信が可能な断熱

高周波磁場、画像不均一性、回転磁場系

○わたなべひでひろ, たかやのぶひろ, みつもりふみゆき

パルスを用いた CPMG パルス列で構成される multi-echo adiabatic spin echo (MASE) パルスシーケンスによりマルチエコー画像を取得し、 $S = M_0^{\text{MASE}} \exp(-TE/T_2)$ によるフィッティングを行い M_0^{MASE} 画像を算出した。この画像強度は B_1^- と $M_0(1-\exp(-TR/T_1))$ の積で表せ、測定条件 $TR = 4s$ のもとでヒト脳内の灰白質、白質領域にて $M_0(1-\exp(-TR/T_1))$ は 10% 程度以内の強度変化に留まる。従って M_0^{MASE} 画像は、 B_1^- 分布として近似できる。

3. 結果

得られた B_1^+ 、 B_1^- 分布は、ボランティアに係わらずそれぞれほぼ同様の形状を示した。そこで、 B_1^-/B_1^+ 分布を計算した結果、こちらも同様の形状を示すことがわかった (Fig. 1)。この結果は、 B_1^-/B_1^+ がボランティアに依存しない一定の関数 ρ で表現でき、直接測定ができない B_1^- を測定可能な B_1^+ で推定できることを示唆している。そこで、関数 ρ を求めるために、 B_1^-/B_1^+ の平均画像 (n=24) を計算した。得られた平均画像には組織依存による信号差が若干認められるため、2次元曲面の多項式関数によるフィッティングを行い、関数 ρ を算出した。次に、 B_1^+ 分布と、 ρB_1^+ で計算される B_1^- 分布とを用いて補正を行った結果、ヒト脳画像の均一度向上が確認できた (Fig. 2)。次に、 B_1^+ 、 B_1^- 補正を行った画像に対して緩和時間補正を行って、水含有量分布を反映する M_0 画像を求めた。この画像から淡蒼球などの複数の部位で水含有量を測定した結果、既報値と同等な値が得られた。

4. 結語

提案、開発した B_1^+ 、 B_1^- 分布測定および画像補正法は、高磁場 MRI でのヒト脳画像の均一度向上に有用である。

References

1. Hoult D. I. The principle of reciprocity in signal strength calculations – a mathematical guide, *Concepts Magn. Reson.*, 2000; **12**: 173-183.

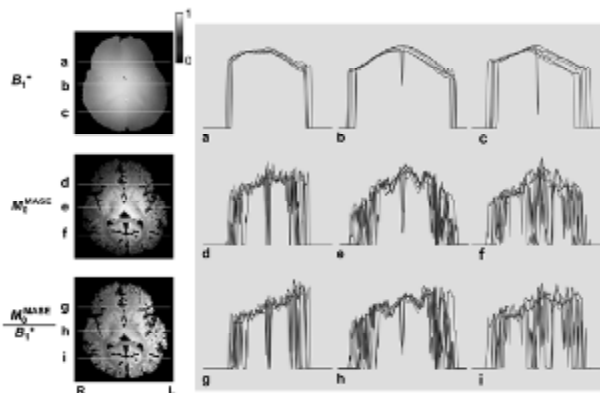


Fig. 1. Maps of B_1^+ , M_0^{MASE} and M_0^{MASE}/B_1^+ in one subject are shown at the left. Profiles along the three lines in each map in 5 subjects are overlaid at the right. An M_0^{MASE} map was generated by removing CSF after fitting MASE images with multiple TEs. Profiles in each map had similar patterns in different subjects.

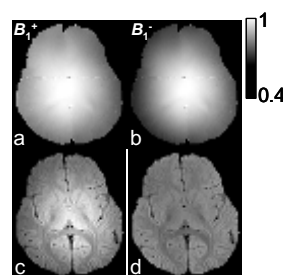


Fig. 2. Non-uniformity correction of MASE images obtained from a single subject using both B_1^+ (a) and B_1^- (b) maps. An M_0^{MASE} image (c) was generated after fitting the MASE images with multiple TEs. A more uniform image was obtained after B_1^- correction (d).

P104

超音波を併用したMRイメージングによる薄膜構造の検出

○小倉卓哉¹, 新田尚隆², 本間一弘²

¹産業技術総合研究所 光技術研究部門

²産業技術総合研究所 ヒューマンライフテクノロジー研究部門

Detection of Membranes by MR Imaging with Ultrasonic

○Takuya Ogura¹, Naotaka Nitta² and Kazuhiro Homma²

¹Photonics Research Institute, AIST, Tsukuba, Japan.

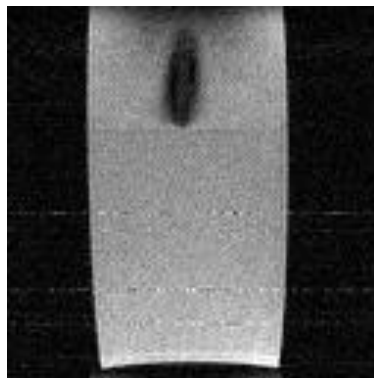
²Human Technology Research Institute, AIST, Tsukuba, Japan.

In recent MR imaging studies, the measurement of MR imaging with sending mechanical vibrations to objects is called “MR Elastography”, and is watched. In this study, we have detected very thin membranes which by MRI sending ultrasonic waves [MHz range] to samples. Phantoms are pure water in the plastics container which thin films as a boundary plane are attached. Measurements are modified diffusion-weighted imaging methods. As a result, they can be detected that ultrasonic waves are reflected by the thin films.

It is difficult that the thin boundary plane inside homogeneous matters is visualized by MRI. But it is indicated possibility that the boundary plane can be clearly and easily visualized through imaging propagation of ultrasonic waves.

近年のMRイメージングにおいて、測定対象に力学的振動を加えながらMRI撮像を行う計測法が注目されており、MR Elastography と呼ばれている。本研究では測定対象にMHz帯の超音波を加えながらMRI撮像を行うことで、従来は撮像が困難であった微細な構造を検出することを目的とした。

ファントムとしてはプラスチック容器中に薄膜を貼りつけたのち、容器内に純水を充填したものを用いた。これにより薄膜が純水中の境界面とみなせる。これをスピンエコー系の拡散強調撮像法により測定した結果、超音波が純水中を伝搬する様子や薄膜



による超音波の反射を撮像できた。これらの結果から、従来のMRIでは困難であった一様なファントム内の境界面を明瞭に可視化できる可能性が示された。

MR Elastography, ultrasonic wave, MHz range

○おぐらたくや, いったなおたか, ほんまかずひろ

P105

¹H-NMRメタボロミクスの医療応用 ーその3 ーバイオフィリドにおけるマーカー定量

安藤一郎¹、廣瀬卓男¹、竹内和久^{1,2}、今井潤¹、佐藤博¹、○藤原正子¹
¹東北大・薬 ²(医)宏人会中央クリニック

Clinical application of ¹H NMR metabolomics-3. Marker quantification in bio-fluid

Itiro Ando¹, Takuo Hirose¹, Kazuhisa Takeuchi^{1,2}, Yutaka Imai¹, Hiroshi Sato¹, ○Masako Fujiwara¹

¹ Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University, Sendai, Japan,

²CKD Center, Koujinkai Central Hemodialysis Clinic, Sendai, Japan

Quantitative analysis of metabolites is important in ¹H NMR-based metabolomics of plasma. Human plasma contains a high density of proteins which heavily adsorb the commonly-used standard compound of TSP (sodium 3-(trimethylsilyl) propionate 2, 2, 3, 3-*d*₄). We have evaluated calcium formate as an alternative standard in 1D single-pulse ¹H NMR spectra to quantify plasma metabolites and found excellent linearity with those obtained by biochemical analysis. Formate, however, is not always available for internal standard in medical analysis because it presents in plasma endogenously. Then, we examined the applicable conditions of TSP as an internal standard such as dilution of plasma and concentration of TSP.

【はじめに】

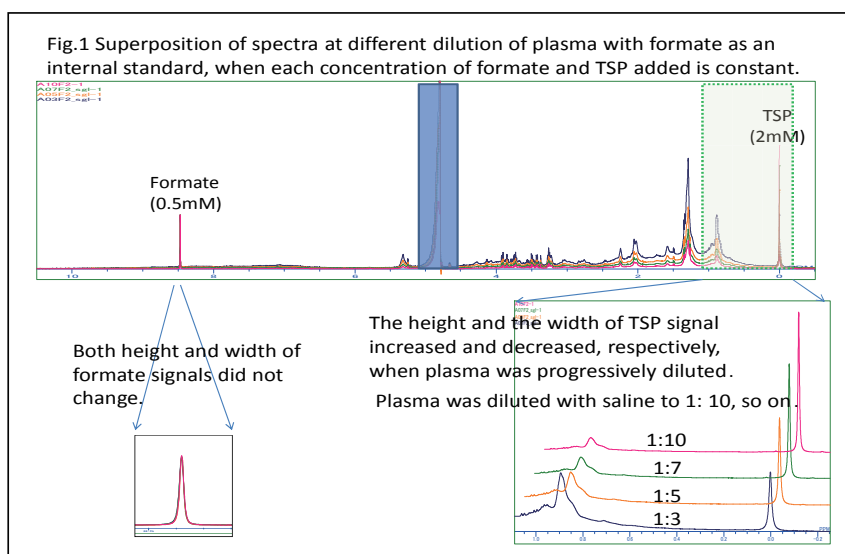
NMR メタボロミクスの臨床応用としてパターン認識法が有用であるが、パターン比較のためにはスペクトルの縦横両軸が校正されていなければならない。(この点は構造解析を目的とする NMR 法ではほとんど問題とならない。)また、マーカー候補が発見された時には定量する必要がある。¹H NMR スペクトルは、1種類の内部標準を添加するだけで多くのカテゴリーの分子の一斉定量が可能であり、メタボロミクス解析には大きな特長になる。NMR 分析が可能なバイオフィリドは血液(血漿、血清)、尿、涙、唾液、髄液、透析廃液など多いが、これらの NMR 測定で信頼性のある内部定量標準物質を開発することは極めて重要となる。

【血漿における内部標準物質】

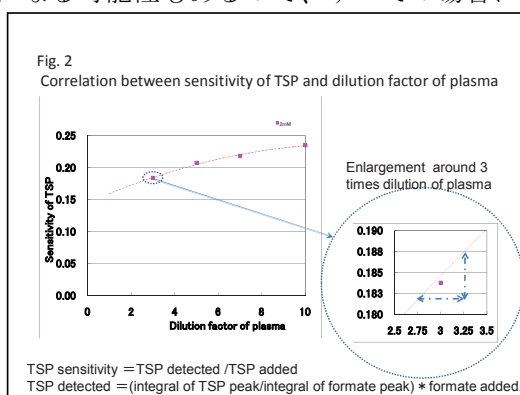
尿や廃液などの低分子成分のみのバイオフィリドでは一般に TSP または DSS (sodium 2,2 dimethyl -2-silapentane-5-sulfonate-*d*₆) が定量標準物質として用いられているが、血漿中ではいずれも多量のアルブミンに吸着するため信号強度が大きく低下するので定量分析ができない(Fig.1)。そこで吸着しない低分子として蟻酸カルシウムを検討したところ、高精度で定量解析が可能なることを明らかにした。腎臓病患者の血漿を用いて glucose と creatinine の定量値を¹H NMR のスペクトル

キーワード: メタボロミクス、バイオフィリド、定量

あんどういちろう、ひろせたくお、たけうちかずひさ、いまいゆたか、さとうひろし、ふじわらまさこ



のピーク積分値から求め、生化学検査値と比較したところよい線形性を得た。しかし蟻酸は内在性であり病態マーカーになる可能性もあるので、すべての場合に用いられない。また蟻酸の T1(縦緩和時間)は長い (6.5 s) ため定量的測定には 1 時間程度要し多検体測定には不利である。緩和時間の短い、内在しない化合物の定量標準物質としての開発が必要となる。同時に TSP の濃度や血漿の希釈条件などを検討し、吸着度合いの補正係数を見積もる事が出来れば実用手法として用いることが出来よう。(Fig.2)



TSP と DSS のアルブミンに対する吸着合い比較も検討する。

【パルスや希釈条件の検討】

また混合物の NMR 測定では CPMG パルスを用いることで、早い緩和時間の高分子成分を除去し、低分子成分のみの信号を得ることが出来るが、CPMG はシャープカットではないフィルターなので、いくつかの分子についてはコントロール困難な強度低下を起こす可能性がある。また、照射パルスの精度も結果に影響するので、メタボライトの定量に関しては single-pulse 1D の方がむしろ有利な面がある。我々は 1D スペクトルにおいて低分子の定量性を検討し、生化学データと比較した結果、非常に良い線形性を得た。さらに医学的に貴重である少量サンプルでも精度良い測定を行うため、血漿の希釈条件と TSP の濃度条件などメタボロミクスに適切なプロトコルを検討した。

文献

I.Ando, T. Hisose, K. Takeuchi, Y. Imai, M. Fujiwara, *et al.*, Quantification of molecules in ^1H -NMR metabolomics with formate as a concentration standard. (2010), *J. Toxicol. Sci.* 35, 253-256

P106

野外集団における植物-昆虫-共生細菌間相互作用に介在する化学物質と昆虫遺伝形質の共相関解析

○佐々木宏和^{1,2}、土田努³、坪井裕理²、近山英輔^{1,2}、菊地淳^{1,2,4,5}

¹横大院・生命、²理研・PSC、³理研・ASI、⁴名大院・生命農、⁵理研・BMEP

Correlation analysis between phytochemicals and insect genetic traits involved in plant-insect-symbiont interactions for field-harvested samples.

○Hirokazu Sasaki^{1,2}, Tsutomu Tsuchida³, Yuuri Tsuboi³,

Eisuke Chikayama^{1,2}, Jun Kikuchi^{1,2,4,5}

¹Grad. Sch. NanobioSci., Yokohama City Univ.; ²RIKEN PSC;

³RIKEN ASI; ⁴Grad. Sch. Bioagr. Sci., Nagoya Univ.; ⁵RIKEN BMEP

An ecosystem is a living community which depends on each member and its surrounding environment, especially in terms of acquiring chemical energy. Thus far, however, chemicals involved in the interactions between plants, insects, and symbionts are largely unknown. In this study, we conducted extensive survey of the genetic traits of the pea aphids, endosymbiotic bacteria, and chemical components of legume plants. From the NMR-based metabolomic analyses, we identified some phytochemicals which might be involved in the plant adaptation of the pea aphids with specific symbionts. Further, we will discuss the plant-insect-endosymbiont interactions in eco-system based on the results of 3D-correlation analysis.

【序論】 数物系分野ではカオス理論のように複雑系を扱う手法が進展しているが、生物分野では特定分子へと還元主義的に記述する報告が殆どで、自然環境から受ける複雑な多因子を前提としたアプローチは開拓の余地ある。生態系において植物は食物網の最上位に位置し、それを餌にする動物の化学物質供給源となっている。既知生物種の過半数を占める昆虫類の多くは、自身を形成し、エネルギーとなる化学物質を特定の

植物に依存しており、それらの化学物質を効率よく利用するための仕組みを備えている。近年、植物適応に関与するのは昆虫自身の遺伝子だけではなく、昆虫の体内に生息する共生微生物である場合も報告されてきた¹⁾。しかし多様な植物化学成分のうち、どの物質が植物適応に関与し、昆虫や共生細菌がどのように利用しているのかについては未解明な点が多く、本研究でその三者共相関を解析することとした(Fig. 1)。

食物網、環境共生システム、昆虫

○ささきひろかず、つちだつとむ、つばいゆうり、ちかやまえいすけ、きくちじゅん

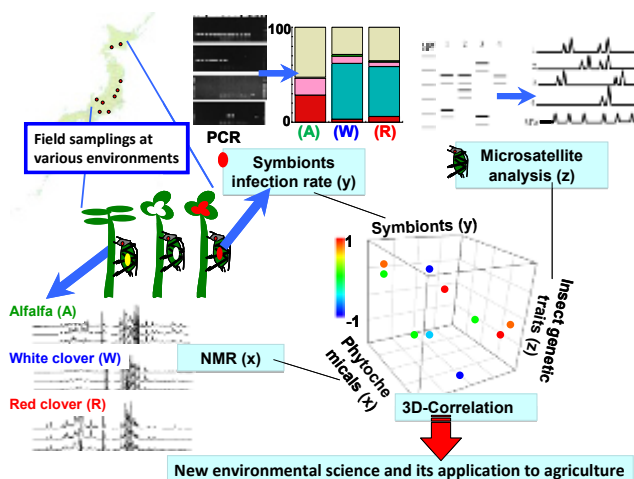


Fig.1 Concept of our correlation analysis plants(x) – insects(y) – symbionts (z) for field-harvested samples.

【方法】 ここでは北海道から東海地方にまで至る7地点の野外集団から採集した3種類のマメ科植物と、それを常食とするエンドウヒゲナガアブラムシ *Acyrtosiphon pisum*、さらにはアブラムシ体内の共生細菌叢を対象として、野外環境中におけるこれら三者の関係を包括的に解明することとした。これら野外集団から採取したアルファルファ (A)、シロツメクサ (W)、アカツメクサ (R) の各代謝混合物を0.1M-KPiで抽出し、¹H-NMR計測を行った。各植物群集中のアブラムシも同時に採取し、粉碎後に昆虫宿主と内在共生細菌が混在したDNAを得た。共生細菌感染率は、菌種特異的プライマーでPCRを行い検出した。宿主の遺伝形質は遺伝子座に特異的なマイクロサテライトマーカー²⁾で検出した。

【結果と考察】

まず植物について¹H-NMRデータから主成分分析を行うと、化学組成が植物種ごとに大きく異なることが確認できた。一方、アブラムシ共生細菌叢にも植物種ごとに

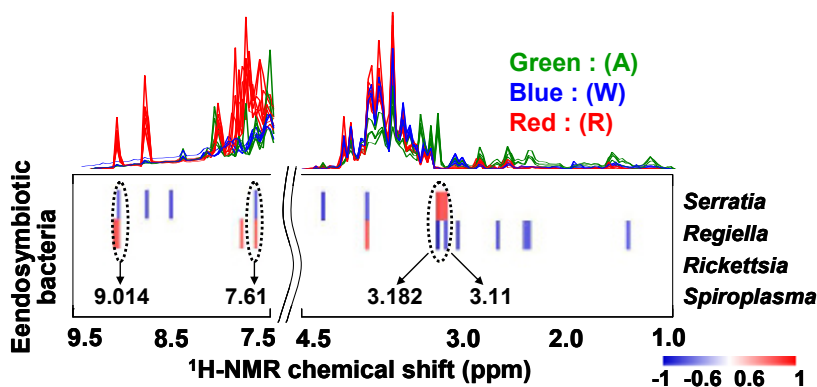


Fig. 2 Correlation analysis between phytochemicals(x) and symbionts(y).

大きな違いが検出され、植物の化学組成とアブラムシ共生細菌叢の間には何らかの関係が存在することが示唆された。そこで¹H-NMRによる植物化学組成データとアブラムシ共生細菌感染データを数値マトリックス化し共相関解析³⁾を行った結果、植物化学物質と共生細菌との間には特異的な相関関係が存在することが明らかになった

(Fig. 2)。HSQC、TOCSY、さらには2D-J計測と代謝物データベース⁴⁾を用いて植物化学成分を同定したところ、ある特定の代謝物が、特定の共生細菌を持つアブラムシの分布を規定している可能性が示唆された。

【展望】 本会では、植物化学物質と共生細菌叢の関係に加え、現在進行中のマイクロサテライトマーカーを用いたアブラムシ遺伝型の解析結果についても報告する。さらには、植物化学物質と共生細菌叢にアブラムシ遺伝型を含めた三次元相関解析の結果から、自然集団における植物-昆虫-共生細菌間関係の実態についても議論したい。本研究の取り組みやその解析手法は、害虫管理技術等の様々な応用につながることも期待される。こうした応用的展開についても、あわせて議論する予定である。

【参考文献】

- 1) Tsuchida *et al.*, (2004) *Science.*, **333**, pp1989.
- 2) Caillaud *et al.*, (2004) *Molecular Ecology Notes.*, **4**, 446-448.
- 3) Mochida *et al.*, (2009) *BMC Genomeics.*, **10**, e568.
- 4) Chikayama *et al.*, (2008) *PLoS ONE.*, **3**, e3805; Akiyama *et al.* (2008) *In Silico Biol.* **8**, e27; Chikayama *et al.*, (2010) *Anal. Chem.*, **82**, pp1653.

P107 フェリチンを含むゼラチンゲル中における水の T_2 緩和速度

○高屋 展宏、渡邊 英宏、三森 文行
国立環境研究所

Transverse relaxation rate of the water molecule in gelatin gel doped with ferritin.

○Nobuhiro Takaya, Hidehiro Watanabe, Fumiyuki Mitsumori
National Institute for Environmental Studies, Tsukuba, Ibaraki, Japan

We reported that the apparent transverse relaxation rate ($R_2^\dagger = 1/T_2^\dagger$) of the tissue water in human brain is well explained with a linear combination of relaxations due to ferritin iron ([Fe]) and the macromolecular mass fraction ($f_M = 1 - \text{water fraction}$). We are attempting to mimic the relaxation using simple model systems. In one model system of agarose and ferritin the water relaxation was described as the similar linear combination, but the contribution of agarose was almost B_0 independent. With another model of gelatin and ferritin the relaxation of water due to gelatin showed the B_0 dependence. Difference in the above two systems suggested the difference in relaxation mechanisms.

【はじめに】

我々はヒト脳in vivo測定により、ヒト脳組織水の見かけの横緩和速度 R_2^\dagger は組織中の非ヘム鉄濃度[Fe]と高分子量分画 f_M の線形結合で表せることを報告した[1]。昨年はこのモデルとして、フェリチン鉄とアガロースの濃度(f_{agarose})を系統的に変化させた試料水の横緩和速度 R_2 がin vivoと同様に、[Fe]と f_{agarose} の線形結合 $R_2 = \alpha [\text{Fe}] + \beta f_{\text{agarose}} + \gamma$ (定数項) で表せることを示した[2]。今回は、マトリックスをより生体に近いゼラチンゲルに換えて同様の解析を行い、アガロースゲルとゼラチンの横緩和機構の違いを検討した。

【方法】

試料は精製 フェリチンとゼラチンを用いて[Fe]を0~30mg/100gに、ゼラチン分画(f_{gelatin})を0, 0.025, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 の6段階になるように調整した。 T_2 測定はCPMG法を用い室温で1.5T, 4.7T, 11.7T, 18.8Tの4種類の異なる磁場強度で測定を行った。

1.5, 4.7T は VARIAN 社製の横型イメージング装置、11.7, 18.8T は日本電子社製の縦型NMR装置を用いた。シークエンスの条件は 90° , 180° パルスに $270 \mu\text{s}$, $540 \mu\text{s}$ の square pulse を用いてエコースペーシングは 2ms で統一した。

【結果と考察】

フェリチン水溶液の横緩和速度(R_2)は[Fe]に比例して直線的に増大し、その比例係数(k_2)は観測磁場強度に依存して直線的に増大した。ゼラチンゲルにおいて[Fe]を変化させた場合も R_2 はこれに比例して増大した。

フェリチン、ゼラチンゲル、横緩和速度

○ たかや のぶひろ、わたなべ ひでひろ、みつもり ふみゆき

k_2 値は水溶液の場合と同様、観測磁場強度に依存して直線的に増大した。測定で得られた R_2 を $R_2 = \alpha [Fe] + \beta f_{\text{gelatin}} + \gamma$ (f_{gelatin} : ゼラチン分画) の式で重回帰分析を行った。この際、 γ は鉄、ゼラチンの項が共に0の場合、すなわち、イオン強度、pHを合わせた水の R_2 の実測値を用いた。重回帰分析の結果、鉄の寄与する項の係数 α 、ゼラチンの寄与する項の係数 β ともに B_0 とともに増大した(表1)。高分子量分画 f_M に相当する項の係数 β の磁場依存性についてアガロースとゼラチンについて比較すると、ゼラチンは相関係数 $r = 0.99$ の高い B_0 依存性を示し、 y 切片は小さいのに対し、アガロースでは B_0 依存部分の相関係数は低く ($r = 0.65$)、大きな y 切片を示すことがわかる(図1)。 B_0 に依存しない部分は古典的的双極子相互作用、 B_0 依存部分は化学交換や拡散に由来する緩和機構が働いていると考え、両者では主として作用する緩和機構が異なり、ゼラチンがよりヒト脳に近いと考えられる。また、表にあげる α 、 β もゼラチンゲルが *in vivo* での測定値により近い値になっている。

B_0	1.5T	4.7T	11.7T	18.8T
α [Fe]	0.27 ± 0.0062	0.52 ± 0.012	0.98 ± 0.036	1.4 ± 0.062
β [Gel]	8.37 ± 0.888	26.3 ± 1.75	74.7 ± 5.08	104 ± 8.76
γ [const]	0.42	0.30	0.38	0.64
correlation coefficient	1.00	1.00	0.99	0.99

Table1. Coefficients of α and β obtained with a multiple regression analysis for the observed R_2 values in gelatin gels doped with various amounts of ferritin at four B_0 strengths. γ was from a buffer solution containing no ferritin nor gelatin.

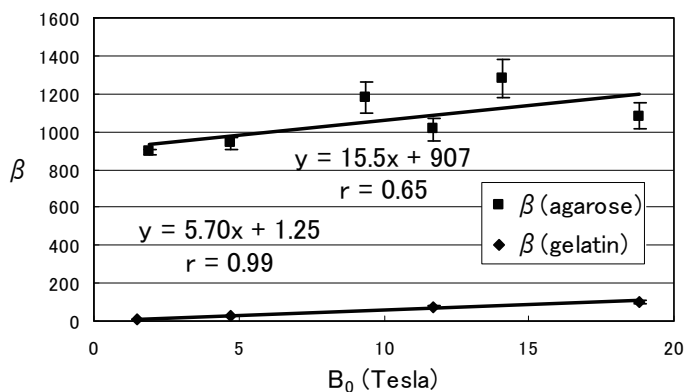


Fig.1 B_0 dependence of coefficient β in two model systems of gelatin gel and agarose.

4.7T	α	β	γ
<i>in vivo</i>	0.47	24.9	9.54
gelatin	0.52	26.4	0.30
agarose	0.24	93.7	0.43

Table2. Comparison of β values *in vivo*, in gelatin, and in agarose gels at 4.7T.

【参考文献】

- [1] F. Mitsumori, H. Watanabe, N. Takaya, Magn. Reson. Med., Vol.62, 1326-1330 (2009).
- [2] 高屋展宏、渡邊英宏、三森文行 第48回 NMR 討論会講演要旨集, p374(2009)

P108

京浜工業地帯由来水棲生物の代謝プロファイリング技術の検討

○葭田 征司¹、伊達 康博^{1,4}、守屋 繁春^{1,2,3}、菊地 淳^{1,2,4,5}

¹横市院生命、²理研BMEP、³理研ASI、⁴理研PSC、⁵名大院生命農

Investigation of metabolic profiling methods for aquatic organism from Keihin region

○Seiji Yoshida¹, Yasuhiro Date^{1,4}, Shigeharu Moriya^{1,2,3}, Jun Kikuchi^{1,2,4,5}

¹Grad. Sch. NanoBioSci., Yokohama City Univ.; ²RIKEN BMEP; ³RIKEN ASI; ⁴RIKEN PSC; ⁵Grad. Sch. Bioagr., Nagoya Univ.

Preservation and deviation of homeostasis can be evaluated by statistical analysis of changes in major metabolite composition, this new-field is so called as metabonomics. Similar study, environmental metabonomics, is also introduced in wild-life samples, such as fishes. Relationship between variations of chemical compositions in fish and environmental changes in their habitat is important for consideration of taste, safety and quality in fishery product. Therefore, we are exploring differences of metabolic profiling in fish from both natural and artificial environment. We focused on the yellowfin goby that is a primary consumer in the Keihin region. Extraction conditions of muscle and internal organs in fish were successfully determined by ¹H-NMR measurements. Then, we processed the NMR spectra to a data matrix, and compared yellowfin goby in natural and artificial environments by PCA.

[序論] あたかも生物が利己的な DNA に情報支配されているかの如く、遺伝要因に還元する生命科学研究が興隆している。しかし、生物は種々の環境要因に巧みに応答し、恒常性を維持している。この環境要因による恒常性の維持と逸脱は化学組成の変動に鋭敏に現れることから、代謝混合物データの統計計算で評価する分野がメタボノミクスである¹⁾。当初は薬物動態や食事ストレスの応答評価が適用範囲の中心であったが、生育環境や摂餌の寄与が主要代謝物組成の変動に現れることは自然環境のミミズや魚介類でも同様であり、最近では NMR 装置の機関互換性を利用した国際メタボノミクス Prj も進行している²⁾。我々は、魚介類に特有の旬の時期が生育する水環境の変動を反映し主要代謝物の化学組成も同期して変動するを考え、餌と海水を制御可能な人工環境、制御できない自然環境の両方から採取した魚の代謝プロファイリング技術の構築を目指すこととした(Fig.1)。

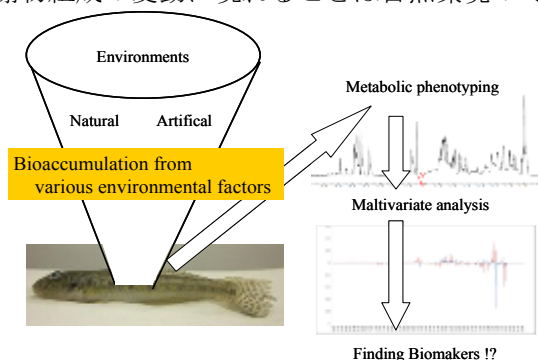


Fig.1 Concept of our environmental metabonomics study of fish grown in natural and artificial environments.

環境メタボノミクス、恒常性、富栄養化水

○ よしだ せいじ、だて やすひろ、もりや しげはる、きくち じゅん

[方法] ここでは、富栄養化した京浜工業地帯の水圏食物連鎖における一次消費者で、水棲環境域が狭いマハゼに着目した。鶴見川に生息するマハゼ及び人工環境下で飼育したマハゼの筋肉部（切り身）と内臓部それぞれを凍結乾燥し、フードミキサーにより粉碎後、水溶媒および各種有機溶媒を用いて抽出条件を検討した。抽出条件決定後、各サンプルは¹H-NMRを用いて計測し、得られた多検体スペクトルデータをbin化処理によりマトリックス化した後、フリーソフトウェアRを用いた主成分分析計算で評価した。

[結果及び考察] 自然環境に生息していたマハゼ[◇]および人工環境下で飼育したマハゼ[□]それぞれの内臓部および筋肉部を¹H-NMRで計測し、PCA解析を行った（Fig.2）。内臓部のPCA解析結果では、由来となる環境の違いによってクラスタリングされ、脂質成分の構成に大きな差異があることが明らかとなった。また、自然環境に生息するマハゼでは個体間のバラつきが大きいのに対し、人工環境下で飼育されたマハゼでは、個体間のバラつきが比較的小さいことも明らかとなった。また、筋肉部におけるPCA解析結果においても、生育環境の違いによってクラスタリングされる傾向がみられ、特に8.3 ppm付近のシグナルに特徴的な差異が観察された。以上のことから生活環境の違いは、マハゼの内臓部および筋肉部における主要代謝物の化学組成へと反映されることを見出した。このことは、環境的な要因がヒトの「味覚」へと影響を与え得ることを意味しており、環境と化学組成の関係性をより詳細に解明することで、環境技術や養殖産業等への波及効果も期待できる。現在、今回の解析で得られた主要代謝物における化学組成の差異が、摂食した餌の違いにどの程度影響されるかについても調べており、最新結果を本会で議論したい。

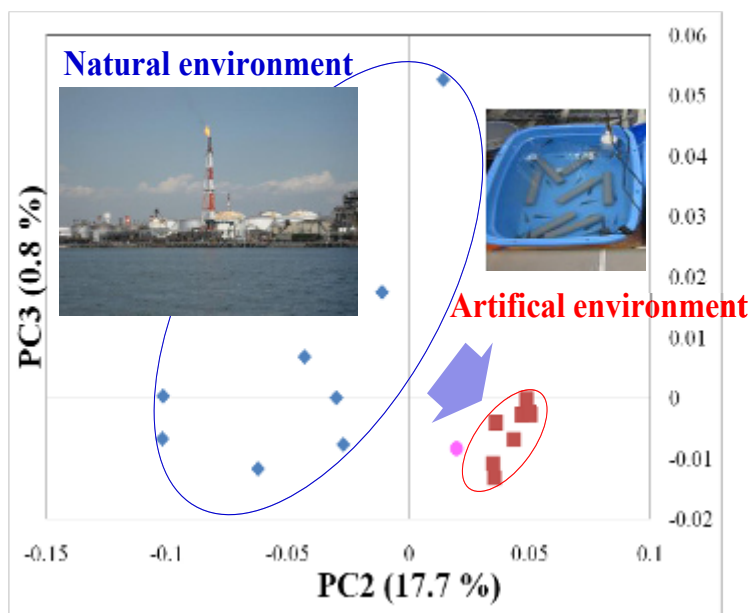


Fig.2 PCA of internal organ samples of yellowfin goby. Natural (left) and artificial (right) environments were classified for both PC2 and PC3 directions.

[参考文献]

- 1) Nicholson & Lindon, *Nature*, **455**, 1054-1056 (2008); 吉田欣史、久原とみ子、菊地淳 ぶんせき **7**, 371-378 (2009); 菊地淳, *遺伝子医学* **16**, 81-85 (2010).
- 2) Viant et al. *Environ. Sci. Tech.*, **43**, 219-225 (2009).

P109

オントロジー工学を利用したNMRデータ解析、評価 およびデータベース登録を支援するツール、MagROシ ステムの開発

○小林直宏¹、原野陽子¹、池上貴久¹、児嶋長次郎¹、佐藤純子¹、
中村春木¹、阿久津秀雄¹、藤原敏道¹

¹阪大・蛋白質研

A new tool using ontology engineered data structure, MagRO system, designed for analysis and validation of NMR data as well as assistance in deposition to the public database.

○Naohiro Kobayashi¹, Yoko Harano¹, Takahisa Ikegami¹, Chojiro Kojima¹, Junko Sato¹,
Haruki Nakamura¹, Hideo Akutsu¹ and Toshimichi Fujiwara¹

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

Owing to the recent developments of NMR techniques for biomolecules, a lot of useful information has been archived in the public database like PDB and BMRB. On the other hand, the data structure required for the database has been getting more complicated, which strongly discourages the NMR scientists to exchange the NMR data each other. This is because the NMR study tends to provide highly hierarchical information cross-linked between a number of NMR experiments and parameters. In this study, we have designed a core program which can manage the complicated data structure using ontology engineering techniques, called “MagRO (**M**agnetic **R**esonance **O**ntology)” system. Using the core program, we have developed a GUI based analysis tool with the spectrum viewer, Sparky, for NMR data analysis as well as tool for assistance on deposition to NMR database, BMRB.

【緒言】 生体高分子の NMR は近年の測定技術、解析技術の向上により、難易度の高い試料に関しても多くの有用な知見が蓄積されるようになってきた。その一方でデータ構造は多様化し、研究者間でのデータ交換を一層困難にしている。本研究では、オントロジー工学を応用することで、よりシステムティックに解析環境に適合できるよう NMR データ構造を設計し、NMR データの解析、評価を効率的に行いながら同時にデータベースへの登録も支援する MagRO (**M**agnetic **R**esonance **O**ntology) システムを開発した。本システムを利用することで、簡略化された GUI とデータフォーマット、イベント処理などを記述するファイル群をコンパクトなコードにより記述することが可能となり、解析環境の大胆な改変、コピーを実現し、BMRB など複雑なデータベースへの登録作業を更なる高効率化、自動化することが期待できる。

【方法】 GUI構築系、NMRデータ呼び出し、書き込み、データフォーマットなどデータ処理をオントロジー記述ファイルにしたがって実行する MagRO-CoreをWindows系、MacOSX系、Linux系OSについて全てC言語によって開発した。

Ontology, Database, Data validation

○こばやしなおひろ、はらのようこ、いけがみたかひさ、さとうじゅんこ、なかむらはるき、あくつひでお、ふじわらとしみち

またスペクトルビューアーおよび GUI 表示機能をもつプログラムである Sparky を用いることでスペクトル描画および GUI ウィンドウを構成し、MagRO-Core を実行するイベント処理および GUI 構築を Python-TkInter にて開発した。

【結果と考察】 シンプルなオントロジー要素群を読み込むコードとオントロジー記述ファイル群によるシステム構成であるため、処理系、GUI 構築系の開発は極めて簡略化されている（図1）。開発されたシステムはインストールが容易であり、特別なライブラリを必要としない。簡略化された GUI 群は解析操作を直感的に行うことを可能とした。オントロジー記述ファイルを研究者間で交換するだけで解析環境が共有でき、それらをデータベース公開などの方法により将来的な研究者コミュニティによる更新、データ登録作業などの自動化への応用が可能となった。解析中に BMRB などへの登録に必要な情報等を準備できる機能は NMR 立体構造における化学シフト登録時に特に威力を発揮するものと期待できる。

開発されたツールはフリーソフトウェアとして公開を予定しており、PDBj-BMRB サイトより近日中にダウンロード可能となる。

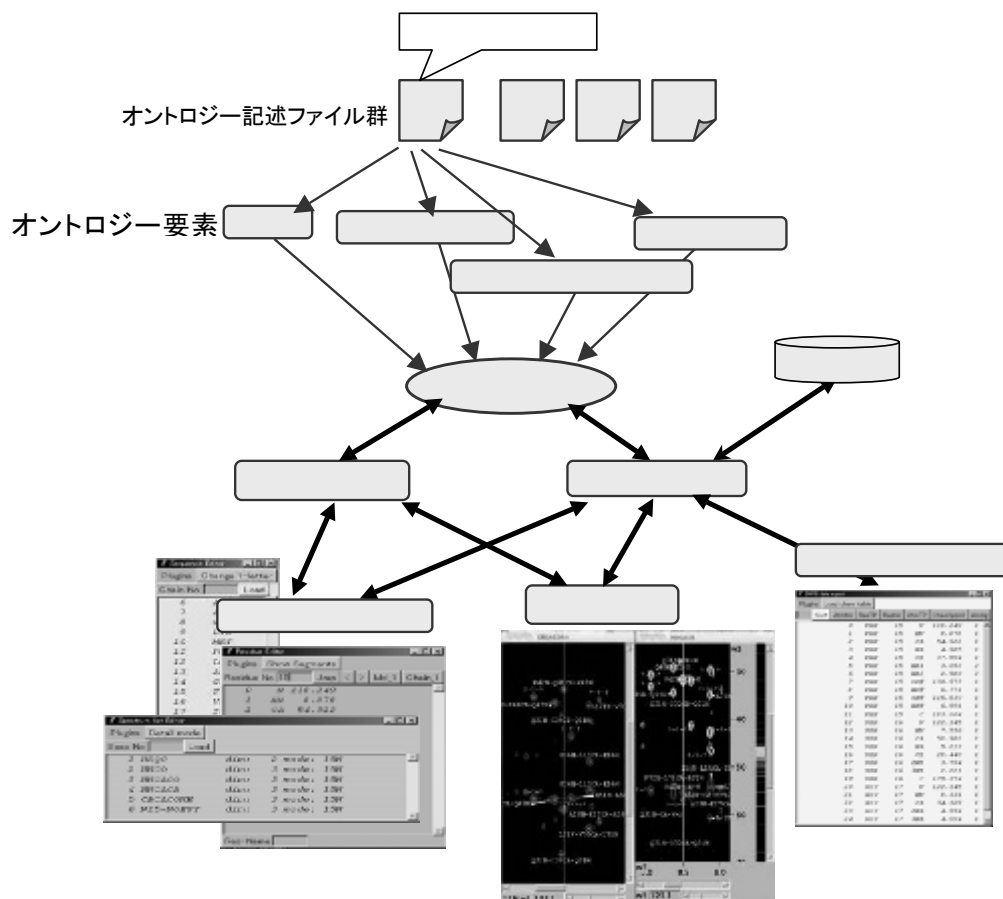


図1. 開発されたオントロジー工学を応用したデータ構造処理プログラム MagRO システムの概略図

P110

迅速かつ堅牢な NMR スペクトル解析支援技術の開発

○横地政志¹, 小橋川敬博¹, 齊尾智英², 稲垣冬彦¹

¹ 北大先端生命

² 北大生命科学

Development of computer assisted technique for efficient and robust NMR spectral analysis

○Masashi Yokochi¹, Yoshihiro Kobashigawa¹, Tomohide Saio², Fuyuhiko Inagaki¹

¹ Faculty of Advanced Life Science, Hokkaido University

² Graduate School of Life Science, Hokkaido University

NMR spectral pattern matching gives strong evidence for reliable NMR signal assignments. Human brain is extremely good at the pattern recognition rather than computer especially in NMR assignment analyses. Well-trained analyst can distinguish a signal from a spectral noise (e.g. ripple) and detect small signal distortions due to overlaps. However, NMR signals are distributed in high dimensional NMR spectra, which make it difficult to treat an amount of spectral data. Spectral pattern recognition by computer can make this important but redundant task much easier. We demonstrate here that the accuracy of NMR assignment prediction is greatly improved by using spectral intensity as well as peak list information. These tools contribute to improve the reliability of NMR data analysis.

【序】 スペクトル上には、シグナルの強度、線幅、オーバーラップすること
に因る歪みが表現されている。従来これらのスペクトル情報は解析者が直接解
釈していた。特にオーバーラップが起きている際には、まずスペクトルを眺め、
可能性が高い帰属仮説を立て、頭の中で描いた予想スペクトルと矛盾が生じな
いかどうか等の検討が日常的に行われている。ブロードニングを起こした微弱
なシグナルや微妙なシグナルの変形が解析を左右することは珍しくない。従来、
計算機上でスペクトル情報を顕に解釈させることは、計算機のスピード制限や
プロトコルが未確立などの理由で実用的でなかった。しかし、計算機がスペ
クトルを解釈することが可能になれば、解析結果に客観的評価を与えることが
可能になり、さらに信頼性の高いシグナル帰属を行えることが期待される。今
回、計算機がスペクトルパターンを直接認識する形式を提案するとともに、任
意のスペクトル間の相関係数を求める方法を考案した。

帰属解析, 相関係数

○よこちまさし、こばしがわよしひろ、さいおともひで、いながきふゆひこ

【スペクトル相関係数】 帰属候補 A と B が任意の 3次元スペクトル上に交差シグナルの出現が予想できるとする、交差シグナルを含む切片 A、切片 B を一次元データとして取り出し、2つの切片の共通領域について、スペクトル強度の相関を測定する。2つの切片がどの程度スペクトルパターンが相似であるかどうか相関係数で検定する。

【相関係数の選択】 統計解析でよく利用されている相関係数として、線形相関、順位相関などが提案されている。NMR のスペクトル解析には、どの相関係数が適切であるかを探るため、3種類の相関係数（線形相関、スピアマンの順位相関係数、ケンドールの順位相関係数）について正しい解析結果を評価させて検討した。Fig. 1 の各種相関係数の分布で矢印を施した残基にはシグナルのオーバーラップがある。ノンパラメトリックで抽象性の最も高い相関係数であるケンドールの順位相関係数が堅実な評価を与えることが分かった。巨大な対角ピークが存在し得る NMR スペクトルの場合、他の2つの相関係数はその強度が相関係数に影響されやすいことも予想されるため、ケンドールの順位相関係数をスペクトルパターンの相似を検定する方法として採用した。

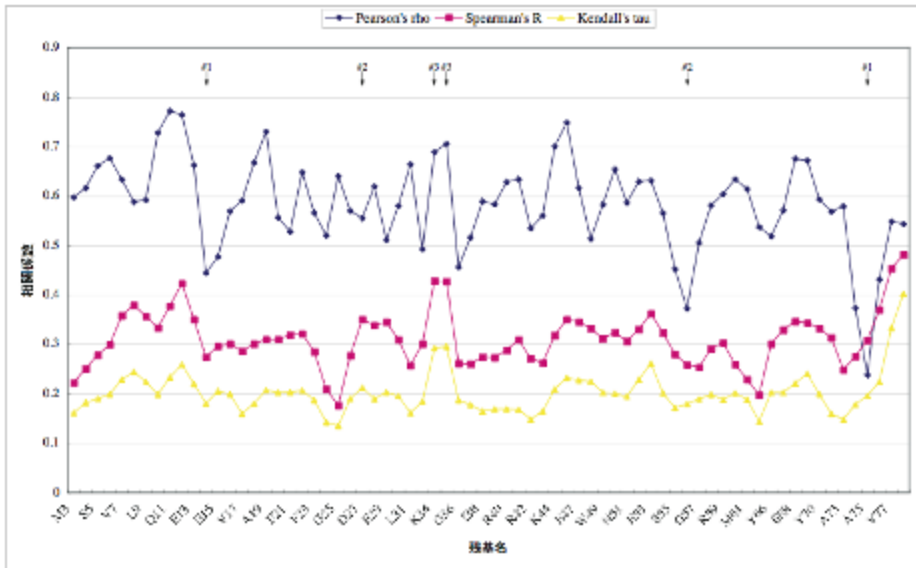


Fig. 1 Distribution of correlation coefficients

【帰属予測精度の向上】一連の主鎖連鎖帰属用のスペクトルを用いて、候補を選出するためのスコア関数を作成し帰属候補を計算させ、正しい解析結果と比較した。(Fig. 2)

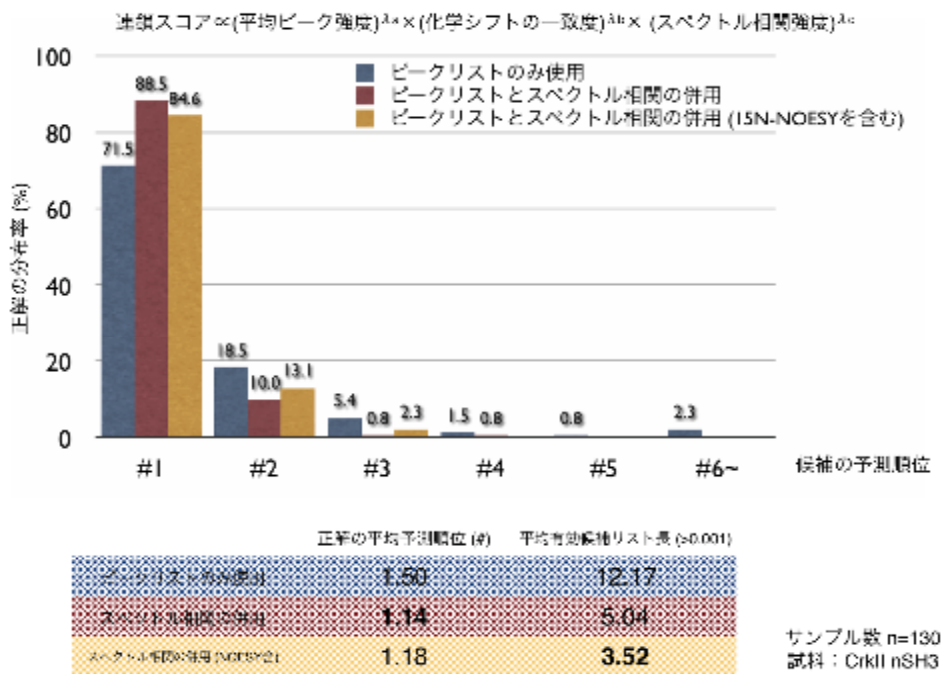


Fig. 2 Accuracy of prediction of assignment using the spectral correlation

ピークリストのみを使用する場合に比べてスペクトル相関を併用した方が正解の平均予想順位が1により近づき、平均の有効候補リスト長は半減した。さらに 15N edited NOESY を加えた場合に、平均予想順位は同程度ではあるが、有効リスト長はさらに短縮した。候補がより良く絞り込めるため、結果的に帰属解析を迅速に進めることが可能になる。一般的な PC を用いた場合、相関係数計算のための計算時間について、初回のみデータキャッシュ作成のために 10~20 秒程度かかるが、次回以降は各スピン系について帰属候補計算は一秒以下に抑えられた。また、このツールを用いて、当研究室において 300 残基程度のタンパク質の主鎖帰属解析を迅速に行うことができた。

【主鎖連鎖帰属のための帰属候補呈示ツール】 ツールの使いやすさも迅速な解析にとって重要な要素である。帰属候補呈示ツールは、当研究室で開発、配布

している NMR 解析支援ソフトウェア「Olivia」に統合されている。以下にプログラムの操作画面を示す。(Fig. 3)

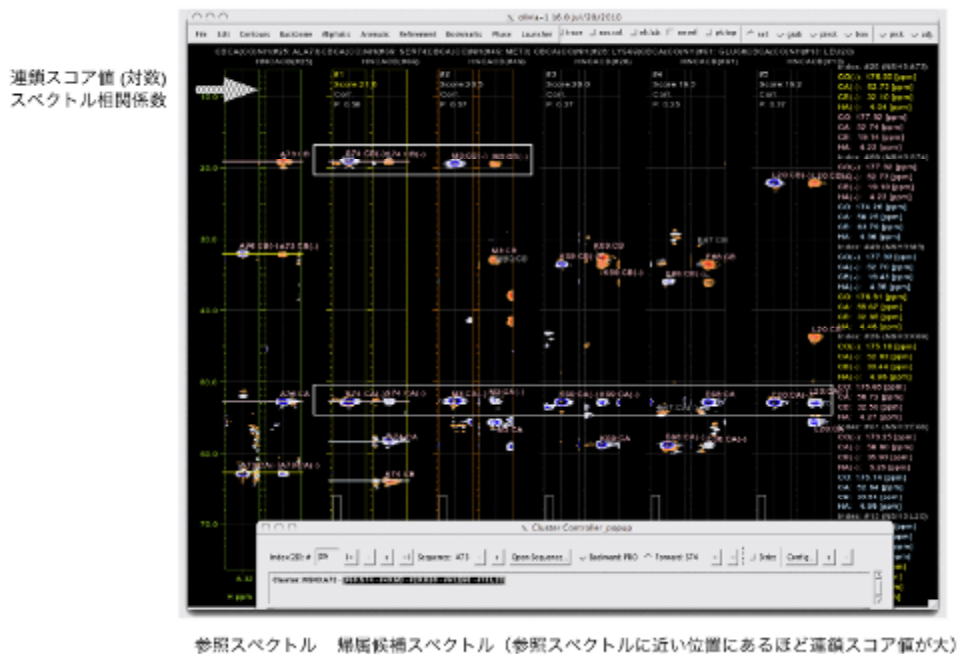


Fig. 3 Assignment candidates presentation tool using the spectral correlation

左端の参照スペクトルに連鎖するスピンのスペクトルがスコア関数でソートされた順番に従ってグラフィカルに表示され、同時にスペクトルを見ながら比較することが可能である。図中では、正しい帰属候補が参照スペクトルの隣に表示されている。帰属候補スペクトル中のシグナルを選択して現れるポップアップウィンドウ上で、連鎖の確定や切断を行うことができる。

【堅牢な自動帰属解析への応用】帰属予測精度の向上には、スペクトル相関係数が大きな役割を果たしている。ところで、個々の解析結果の信頼性を保証しないことは、従来の自動解析ツール一般的な大きな問題となっている。個々の帰属結果の信頼度を知ることができないために、解析者は自動解析された結果を全て一様に見直す必要があり、自動解析結果は参照程度に利用されることが多い。この問題点を解決するような帰属解析の自動化ツールも作成し、良好な結果が得られることも確認した。

P111

第一原理量子化学計算と古典分子動力学計算による化学シフト・構造相関の評価

○近山英輔^{1,2}、尾形善之¹、森岡祐介²、菊地淳^{1,2,3}
¹理研PSC、²横浜市大院生命ナノ、³名大院生命農

Chemical shift-structure correlation with *ab initio* quantum chemical methods and classical molecular dynamics

Eisuke Chikayama^{1,2}, Yoshiyuki Ogata¹, Yusuke Morioka², Jun Kikuchi^{1,2,3}

¹RIKEN PSC, ²Graduate School of Bionano., Yokohama City University, ³Graduate School of Bioagri. Sci., Nagoya University

Abstract: Recent high performance computing (HPC) technologies enable us *ab initio* calculations in quantum chemistry by method such as post Hartree-Fock (post-HF) and density functional theory (DFT). Achieving highly accurate results, however, needs further optimizations of levels of theory including method and basis set, solvent effects, molecular ensembles, ways of calibrations to experimental values. There is only a small number of studies yet in causes and effects between calculated shielding constants and molecular ensembles in numbers of levels of theory. We here performed principal components analysis (PCA) for analyzing relation between calculated shielding constants and molecular ensembles. The shielding constants were calculated for coordinates of an ethanol molecule in a vacuum by using *ab initio* quantum calculations with the levels of theory for methods of HF, B3LYP(a DFT), and MP2 (a post-HF); and for basis sets of 6-31G(d) and cc-pVTZ. Molecular ensembles were calculated by classical molecular dynamics at 298.15 K in 10 ns.

<概要> 近年、様々な post-Hartree-Fock(post-HF)法／密度汎関数法(DFT)による遮蔽定数の高負荷計算が可能になってきた。しかし真に実用足る高精度の遮蔽定数計算法を確立するためには、メソッド／基底セットを含む理論レベルの選定、溶媒効果、分子構造のアンサンブル、実験値との補正法など数々の要因を最適化する必要がある。特に多数の分子構造アンサンブルと第一原理計算による化学シフト予測値の正確性との関係についての研究例はまだ少ない。今回我々は、エタノール分子の 10 ns の古典定温定積分子動力学(MD)計算により生成された 100 構造に対し、HF/B3LYP(DFT)/MP2(post-HF)のメソッドと 6-31G(d)/cc-pVTZ の基底セットによる理論レベルを用いた第一原理量子化学計算により遮蔽定数を求め、主成分分析による遮蔽定数・分子構造相関解析を行った。

<方法> エタノール分子のエネルギー最小化を真空中で行い、1 ns の平衡化の後、1 ns、2 ns、10 ns、の MD シミュレーションを行った。力場は CACTUS (<http://cactus.nci.nih.gov/>)でエタノール分子の Mol2 フォーマット(Tripos)ファイルを取得し、acpype (<http://code.google.com/p/acpype/>)を用いて GROMACS 用 GAFF 力場を生成した。MD は倍精度の GROMACS 4.0.5 で修正 Wolf 法を静電力計算に用い、真空中、298.15 K の定温シミュレーションを Nose-Hoover 法で行った。10 ps (1 ns/2 ns シミュレーション時)、100 ps (10 ns)毎にエタノールの分子構造をサンプルし、計 100 構造を得た。

キーワード： 第一原理計算、分子動力学、主成分分析

○ちかやまえいすけ、おがたよしゆき、もりおかゆうすけ、きくちじゅん

エタノール分子の配位を一意に決定する 2 個の 2 面角(水素原子による等価な二面角を除いたものは H(Mol2 ファイル中で自動割当された原子インデックス 8)-C(2)-C(1)-O(4)と C(2)-C(1)-O(4)-H(3)で定義し計算した。MD で得られた各構造の座標についての遮蔽定数の第一原理計算は、Gaussian09 で HF、B3LYP、MP2 の 3 種の理論レベルと 6-31G(d)、cc-pVTZ の 2 種の基底セットについて計算した(ただし、MP2/cc-pVTZ については計算が終了しなかったためこの要旨の結果では報告されていない)。故に 1 理論レベル、1 基底セットにつき 100 構造のエタノール分子内原子の遮蔽定数を得た。10 ns の MD シミュレーションの結果から計算された 5 種の理論レベルと基底セットの全 500 構造の遮蔽定数を R 2.11.1 の prcomp 関数を用いて相関行列の主成分分析を計算し、主成分スコアとローディングを求めた。

<結果と考察> 真空中の 1 ns の平衡化後 1 ns と 2 ns の MD シミュレーションでは十分にエタノール分子の 2 面角空間をサンプリングしないが、10 ns では十分に全ての 2 面角の安定配置(ゴーシュ型、 -60° , 60° , 180°)に行き渡っていることがわかった(Fig. 1a)。従って、10 ns の MD シミュレーションで得られた 100 構造を第一原理量子化学計算の構造セットとして用いることにした。MP2/cc-pVTZ を除く 5 種の組み合わせによる理論レベルを用いて遮蔽定数を計算し、H/C/O の 9 個の全原子の化学シフトを全理論レベル全 100 構造並べ行列データを作成し、相関行列による主成分分析を行った。その結果、第一主成分(PC1)方向に 40.5%の寄与率で理論レベルによる重心のずれが見出せた(Fig. 1b)。しかし分子構造アンサンブルによる分布は理論レベル間でオーバーラップしていた。また PC1 のローディングは全ての原子について同符号の値を持ち大きな差は見出せなかった。まとめると、全原子的遮蔽定数のずれが理論レベルの違いによって生み出されるが、しかし分子構造のアンサンブルによるずれは理論レベルの違いに対抗した。他では、PC2 のローディングにより、メチル・メチレン水素原子と他原子とでの遮蔽定数において逆相関を見いだした。

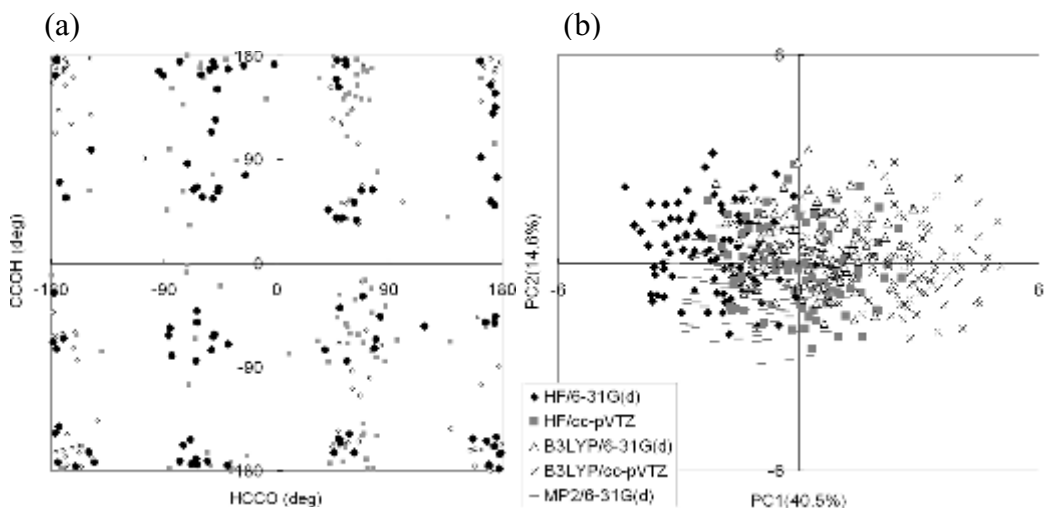


Figure 1. (a) Map of dihedral angles CCOH vs. HCCO in an ethanol molecule. Plot of 1 ns (open dark diamond), 2 ns (dark square), and 10 ns (black circle). Each type has 100 points (molecular conformations). (b) PCA score plot of shielding constants of all the atoms in an ethanol molecule in PC1 and PC2 for five types of simulations varying levels of theory and basis sets.

P112

生体高分子NMR立体構造のPDB登録における化学シフト 必須登録

○中谷英一^{1,2}、小林直宏²、原野陽子²、松浦孝則²、阿久津秀雄²、
中村春木²、藤原敏道¹

¹科学技術振興機構-BIRD、²阪大蛋白研

Mandatory chemical shift deposition to PDB/BMRB with biological NMR structures

○Eiichi Nakatani^{1,2}, Naohiro Kobayashi², Yoko Harano², Takanori Matsuura², Hideo Akutsu², Haruki Nakamura², Toshimichi Fujiwara²

¹JST-Institute for Bioinformatics Research and Development

²Institute for Protein Research, Osaka University

Chemical shifts are basic parameters to elucidate biomolecular structures and interactions. PDB (Protein Data Bank) and BMRB (BioMagResBank) will introduce new policy that NMR structure must be deposited with the chemical shifts. The new deposition system and procedure have been developed in collaboration with wwPDB (World Wide Protein Data Bank) members of RCSB-PDB, PDBj, PDBe and BMRB. Here, we explain the new features of chemical shift mandatory deposition, updated data processing systems at the PDBj and other deposition sites.

原子に帰属された化学シフトは一連の実験によって初めて決められる基本的なNMRデータである。このデータに基づき相互作用を調べるなど、化学シフトを利用した実験を行なうことができる。さらに近年は立体構造と化学シフトの関係が明らかになり、100残基程度の蛋白質では化学シフトのみから構造を推定できるようになった。

PDB (Protein Data Bank) では、生体高分子のNMR構造をPDB登録する際には同時に化学シフトデータをBMRB (BioMagResBank) に登録することが近日中に必須となる。この「化学シフト必須登録」はwwPDB (World Wide PDB; RCSB, PDBj, PDBe, BMRBの4者共同連合体) の枠組みで議論と開発を進めており、上記全ての登録サイトで実施する。BMRB/PDB登録方法はこれまでと大きな違いはないが、今回の更新では以下の変更点が挙げられる。

1. データ登録ウェブサイト (ADIT-NMR; <http://nmradit.protein.osaka-u.ac.jp/bmr-adit>) に化学シフト登録が必須となるような機能が設けられた。
2. 登録する化学シフトデータの記述形式は「NMR-STAR 3.1」に統一された。
3. 原子座標と化学シフトファイル間で原子命名法の整合性確認を登録者が行うツールが公開された。
4. これまで独立していたPDBとBMRBの登録処理は、PDB→BMRBの順で行われる。

データベース、BMRB、データ登録

○なかたにえいいち、こばやしなひろ、はらのようこ、まつうらたかのり、あくつひでお、なかがわあつし、なかむらはるき、ふじわらとしみち

【ADIT-NMRのウェブ機能上の制約】

新しいADIT-NMRの登録セッションでは、ファイルアップロード用のページと登録データ入力用のページを区別する。まずPDB登録する生体高分子立体構造の原子座標ファイルとその決定で使用した制限情報ファイルおよびBMRB登録する化学シフトファイルをアップロードする。この次に、登録情報入力のセッションに進むことができる。

また、PDBとBMRB登録の最終的なデータ提出はボタン一つで同時に行う。

Multiple files may be uploaded by repeated use of this form.

Step 1: Select a file to upload:

Step 2: Select the type of data in this file:
 Coordinate file (either PDB format or mmCIF format) (A Coordinate upload is required. *)
 Constraints (A Constraint upload is required. *)
 NMR data (Contains: <<resolving solvent>>) (Convert data files to NMR-STAR. (Assigned chemical shifts are required. * (Additional types of NMR data are optional.))
 Image file describing the structure of a non-studied residue or ligand.

If the file contains some data that is understandable by the ADIT-NMR software, it will be used to pre-populate fields in the interface. Once you have passed the upload screen and begun editing the session, (it will be possible to return to this screen to upload more files, but it will not be possible to automatically fill the fields within the interface from those files.)

Step 3: Choose file operation:

Upload The file is not actually saved on the server until this is pressed. (For large coordinate files, upload can sometimes take a minute or two.)	Check Coordinates (Click only. Does not save the file.)	Validate Coordinates (Click only. Does not save the file.) (For large coordinate files, validation can sometimes take a minute or two.)
--	---	--

(*Note *) Depositors of protein structure deposits are **strongly encouraged** to use the Protein Structure Validation Suite (PSVS) and/or the CSDO package to check their protein structure files before uploading them.

Step 4: Repeat steps 1-3 for each file you upload into the deposition.

Fig 1. New web page for file uploading in ADIT-NMR

【化学シフトデータのNMR-STAR 3.1フォーマットによる記述】

「化学シフト必須登録」では、BMRBが受け取る化学シフトデータの記述形式はIUPAC準拠の原子命名法に基づいた「NMR-STAR 3.1」のファイルのみとなる。これまではNMR研究でよく利用されるソフトウェアと互換性のある旧BMRBの登録フォーマット「NMR-STAR 2.1」でも受け付けていたが、今後は登録者がNMR-STAR 3.1で作成するかBMRBのツール (<http://bmrprotein.osaka-u.ac.jp/deposit>) でフォーマット転換をした上でBMRBに提供する。

【原子座標と化学シフトファイルにおける原子命名法の整合性確認】

原子座標と化学シフトファイルをADIT-NMRに転送する前に、登録者は両記述における残基（塩基）配列と原子命名法の整合性確認を登録者が行う。このツールを使用すれば登録者がファイルを作成する段階で確認ができる。

Coordinates versus Assigned Chemical Shifts Checker				
Coordinates file (PDB or mmCIF format):	<input type="text" value=""/>			
You may test up to 5 Assigned chemical shift files against the coordinate file at once with this form.				
Assigned chemical shift file 1 (NMR-STAR 3.1 format):	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Assigned chemical shift file 2 (NMR-STAR 3.1 format):	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Assigned chemical shift file 3 (NMR-STAR 3.1 format):	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Assigned chemical shift file 4 (NMR-STAR 3.1 format):	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>

Fig 2. Web checker for nomenclature consistency between PDB and Chemical Shifts

<http://nmradit.protein.osaka-u.ac.jp/cgi-bin/bmr-b-adit/standalone-shift-coord>

【PDBとBMRB登録処理の順序】

これまでADIT-NMRのPDB登録とBMRB登録はそれぞれのデータ校閲者によって互いに独立して処理を行っていたが、今後はPDBの校閲者が構造データと登録情報の検査と形式記述のファイルを作成した後、BMRB校閲者がその処理済みの記述内容（主に残基配列や原子命名法）を基にNMR実験情報、化学シフトデータの検査を行う。

現在、近日中に運用を開始する「化学シフト必須登録」の実現に向けて、PDBjだけでなくwwPDBのグループ全体で議論および開発、登録処理のトレーニングを行っている。本発表ではPDBjで更新したADIT-NMRやファイル共有システム、および新ツールや登録手続きの変更点について説明する。

P113

固体高分解能NMRの感度向上: クライオコイルMASプローブによるアプローチ

○水野 敬¹、野田 泰斗²、竹腰清乃理²
(¹日本電子(株), ²京大院・理)

Sensitivity enhancement of high-resolution solid-state NMR: a Cryocoil MAS probe's approach

○Takashi Mizuno¹, Yasuto Noda², K. Takegoshi²
(¹JEOL ltd., ²Grad Sch. Sci, Kyoto Univ.)

There is so-called "cryo-probe" in solution-state in which the detection system of coil and preamplifier are cooled below ~ 30 K but the sample is kept at room temperature in order to enhance the S/N as 3 to 6 times. Recently, we have developed our "cryocoil MAS probe" in which we introduce the concept of "cryo-probe" in solution-state into high-resolution solid-state NMR. In our 2nd prototype of the "cryocoil MAS probe" is tuned to ${}^6\text{Li}$ at 7 Tesla. ${}^6\text{Li}$ ($I=1$) has good property of resolution due to small quadrupolar coupling but is hard to be observed in a sense of sensitivity because of low gyromagnetic ratio (1/6.5 of that of ${}^1\text{H}$) and low natural-abundance(7.6%), which should be overcome by our "cryocoil MAS". In the context, we show the ${}^6\text{Li}$ MAS NMR spectrum as the demonstration of the cryocoil MAS.

■序論 NMR検出コイル・プリアンプなどの信号検出系を極低温(30K以下)に冷却し、試料を検出系から断熱して室温下に置くことにより、検出系の熱雑音低下・Q向上によって3~6倍程度のS/N向上を達成するプローブ装置は、溶液NMRにおける「クライオプローブ」として知られる。我々は、この手法を固体高分解能NMRプローブに適用する「クライオコイルMASプローブ」を段階的に開発・製作した(Figure 1)[1]。

■実験 クライオコイルMASプローブによる固体高分解能NMRの感度向上の例として、試作2号機における ${}^6\text{Li}$ MAS-NMRの実験結果を示す。磁石は7.1Tワイドボアマグネット。プローブは試作2号機で行った。 ${}^6\text{Li}$ NMR測定の間周波数は44.3492 MHz(0.0ppm, LiCl 1M水溶液基準)。varian社製の5φ試料管で試料回転速度は最大10 kHzまで出せるが、スピン拡散を促進するため、今回は5 kHzで測定した。試料は800°Cで12時間本焼した LiCoO_2 の ${}^6\text{Li}$ 95%標識試料60mg。

■結果・考察 ${}^6\text{Li}$ MAS NMRの1次元スペクトルと比較すると、検出系を室温時に置いたときを基準にした低温運転時のS/N

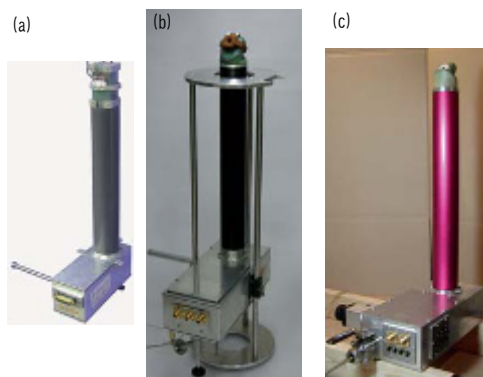


Figure 1: Photographs of prototype of Cryo-Coil MAS probe. (a) The 1st prototype. (b) The 2nd prototype. (c) The 3rd prototype (under construction)

Key Words: 感度向上, Cryocoil, プローブ

○みずの たかし、のだ やすと、たけごし きよのり

向上率は3.07倍であった (Figure 2)。また、クライオコイルMASスペクトルの応用例として ${}^6\text{Li}$ - ${}^6\text{Li}$ 2次元交換NMRの結果を示す (Figure 3)。2次元磁化交換スペクトルを通常のNMRプローブでは4日以上かかるところ約12時間以内に効率よく測定することができた。メインピーク (0 ppm) とマイナーピーク (3.8 ppm, -5 ppm) との間に明確なクロスピークを確認することができた。今後、測定条件を変えたりなどしてデータを収集し、拡散様式 (運動によるものか、スピン拡散によるものか) の違い、各マイナーピークの帰属を明らかにし、電池の充放電特性のメカニズムを調べる。

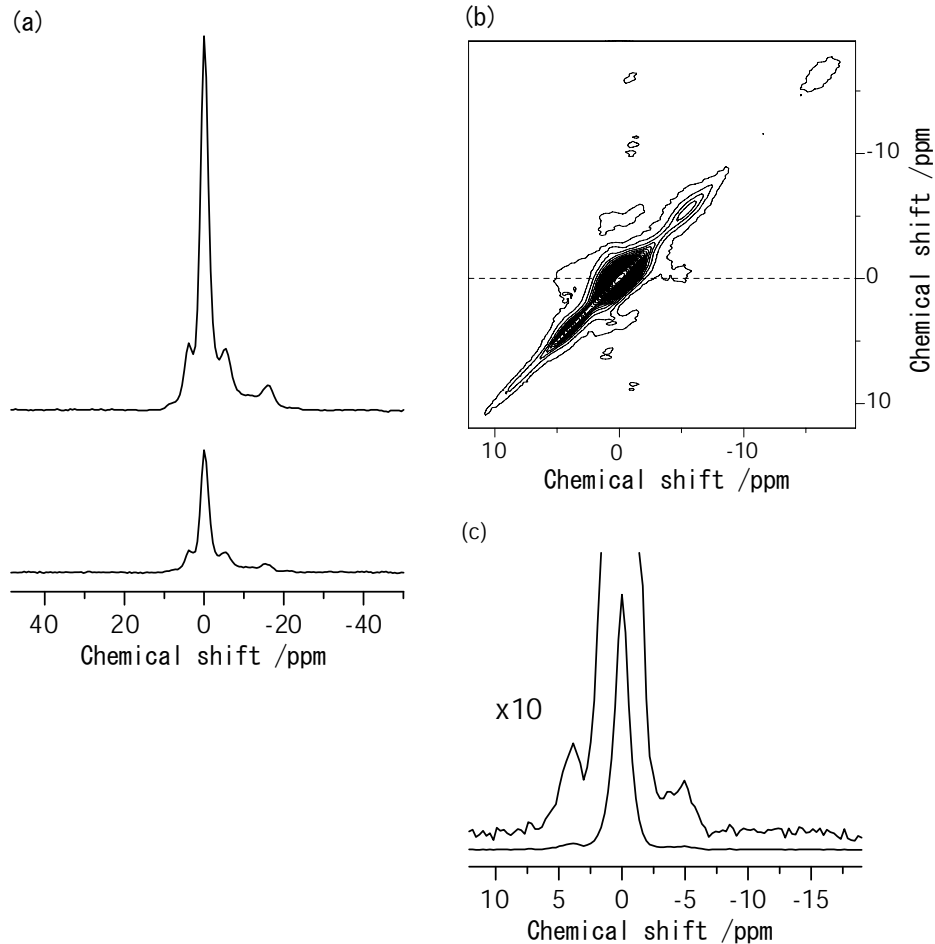


Figure 2: Demonstration of S/N enhancement of ${}^6\text{Li}$ MAS-NMR by the cryocoil MAS probe. (a) Comparison of S/N w/ or w/o cryo-operating by the prototype-2nd. ${}^6\text{Li}$ MAS-NMR by Hahn-echo. Sample: 95% Labeled ${}^6\text{LiCoO}_2$. Spinning speed= 5 kHz. Bottom: Coil temperature=298 K, Amp. temperature =298K, 90° pulse width=10.0 μs (input 157 W). Top: Coil temperature=17 K, Amp. temperature =47 K, 90° pulse width=5.0 μs (input 157 W). (b) ${}^6\text{Li}$ - ${}^6\text{Li}$ 2D exchange NMR with cryo-operating by the prototype-2nd. 16 scans with each 256 t1 points (sampling time of 333 μs) were accumulated. Mixing time=200 ms. Recycle delay of 5 s. spinning speed =5 kHz. (c) The 1D slice spectrum corresponding with the dotted line in (b). 10 times scale-up spectrum is also shown.

謝辞 本研究は、CREST/JST(平成17年度採択)により財政的に支援された。

参考文献: [1] T. Mizuno et al., Rev. Sci. Instrum. 79 (2008) 044706, T. Mizuno et al., Rev. Sci. Instrum. 80 (2009) 124702.

P114

(発表取消のため欠番)

P115

NMRを利用した有機化合物の定量における解析条件の妥当性確認

○三浦亨、齋藤剛、大手洋子、井原俊英
(独) 産業技術総合研究所 計測標準研究部門

Validation of NMR process parameters in quantitation of organic compounds

○Toru MIURA, Takeshi SAITO, Yoko OHTE, Toshihide IHARA
National Metrology Institute of Japan, AIST

Abstract

Quantification using NMR is one of the attractive methods for purity determination of organic compounds. We have optimized data acquisition and process parameters, and optimized their associated uncertainties for the quantification. Last year, we proposed a process parameter set for quantification; in this presentation, quantitative validation of the process parameter set was demonstrated using quantification experiment between two reference materials whose purity was certified.

【緒言】 NMRを利用した定量法は、測定核種の信号量の基準となる標準物質があれば測定対象物質毎の検量線を必要とせず多くの物質に対して迅速に正確な定量値が得られる分析法として期待されている¹⁾。我々は、昨年、測定結果の解析条件について最適化を行い、再現性の高い解析条件を提案した²⁾。今回は、その解析条件で得られた定量値と標準物質の認証値とを比較することにより、解析条件の定量的な妥当性確認を行ったので報告する。

【方法】 評価には、内標準物質として、純度を特性値とする1,4-BTMSB-d₄標準物質(1,4-bis(trimethylsilyl)benzene-d₄、和光純薬工業 (TRM)、認証値:純度 99.8 % ± 0.2 % (k=2)) を、測定対象物質として、クロロフェナピル(和光純薬工業 (TRM)、認証値:純度 99.6 % ± 0.5 % (k=2)) を、それぞれ用いた。測定対象物質及び内標準物質を精密に電子天秤ではかり取り、acetonitrile-d₃ (Acros Organics) で試料溶液としたものをNMR測定に供した。NMR測定はJNM-ECS400 (日本電子) を用いて

定量用に最適化した条件 (Table 1) で測定を行い、得られたデータをMNova 6.11 (MESTRELA RESEARCH) で解析し、Figure 1に示すスペクトルを得た。最適化した

Table 1. Optimized NMR measurement and process parameter sets.

Measurement conditions	
nucleus	¹ H (500.13622 MHz)
spectral width	5990.423 Hz (0.00 ppm)
acquisition time	4 s
number of transients	10
pulse width	12.0 us
decouple	¹³ C (acquisition period, MPRG)
relaxation delay	0.0 s
temperature	25 °C

Process conditions	
window function	off
phase correction	manual
baseline correction	on
integration	30 Hz outside of ¹³ C satellite

キーワード：定量NMR、解析条件、妥当性確認

著者ふりがな：○みうらとおる、さいとうたけし、おおてようこ、いはらとしひで

解析条件 (Table 1) ならびに、これらのパラメータのうち一つのみ (すなわち、窓関数のON/OFF、位相補正の自動/マニュアル、ベースライン補正の有/無、積分の自動/マニュアル) を変えた解析条件で、それぞれ得た純度を測定対象物質の認証値と比較して、解析条件の定量的な妥当性確認を行った。

【結果・考察】各解析条件により得られた結果をFigure 2に示した。調製を3回行い、それぞれの試料溶液の4つのピークから得た純度 ($n=12$) の平均値を5つの異なる解析条件についてプロットした。エラーバーとしては、解析条件の影響を比較しやすくするため、調製のばらつきを除外したピーク間のばらつき (標準偏差の2倍) を示した。最適化した解析条件により得られた結果は、ばらつきの範囲内で認証値と一致し、解析条件の定量的な妥当性が確認された。同様に、自動位相補正により得られた結果も、ばらつきの範囲内で認証値と一致した。一方、ベースライン補正なし、自動積分、窓関数有 (指数関数0.2 Hz) の解析条件により得られた結果は、認証値と一致しなかった。特に自動積分に関しては、純度のかたよりに加えて、ばらつきも大きくなった。以上のことから、かたよりの無い定量値を得るためには適切な解析条件の設定が重要であり、これまでに最適化した解析条件の定量的な妥当性が確認できた。引き続き、他の解析ソフトウェアを使用した検討や、他の窓関数と定量値との関係性、位相補正と定量値の関係性などについても検討を行い、発表時に詳細に報告する。

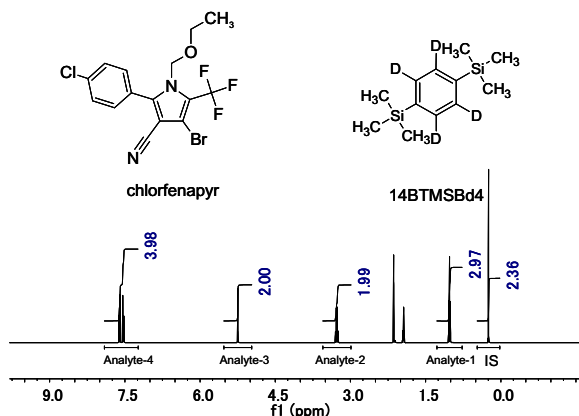


Figure 1. ^1H NMR spectrum of Chlorfenapyr processed by optimized process parameter sets.

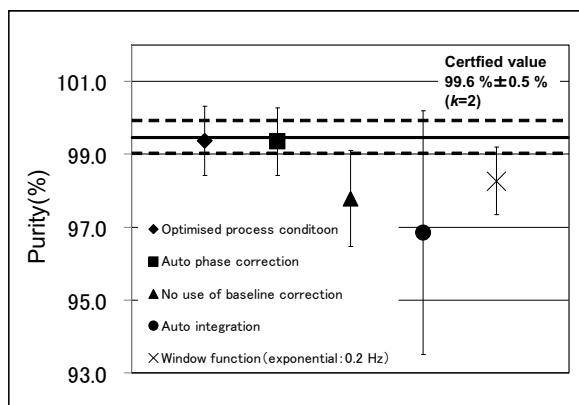


Figure 2. Purity obtained from different data processes for an NMR data of chlorfenapyr standard.

【謝辞】本発表で用いたNMRの測定条件及び解析条件は、qNMR共同研究開発の成果によるものであり、共同研究者である国立医薬品食品衛生研究所の杉本直樹博士、多田敦子博士、日本電子(株)の有福和紀氏、末松孝子博士、和光純薬工業(株)の吉田雄一博士、花王株式会社の小池亮博士、堀之内嵩暁氏に心より感謝申し上げます。

参考文献

- 1) T. Ihara, T. Saito, and N. Sugimoto, *Synthesiology* **2** (2009) 12-22.
- 2) T. Miura. et al. The 48th Annual Meeting of the NMR Society Japan (2009).

P116

体内に飲み込まれた物質の NQR による検知

○山根千英, 中原優, 篠原淳一郎, 赤羽英夫, 糸崎秀夫
大阪大学大学院基礎工学研究科

Detection of substances hidden in the body using NQR

○Yukihide Yamane, Yu Nakahara, Junichiro Shinohara, Hideo Sato-Akaba, Hideo Itozaki
Graduate School of Science Engineering, Osaka University

A nuclear quadrupole resonance (NQR) detection technique, which does not require a static magnetic field, can be applied to remote sensing more simply than a NMR technique. We evaluated the possibility that the NQR technique can detect the substances hidden in the body with a simple experiment using conductive salt solutions (saline solution) for simulating a human body. The calculation based on the conductivity indicated that skin effect measured in 0.9% salt solution decreased 20 % of RF magnetic fields measured in pure water. However, the results of experiments showed the possibility to detect the substances hidden in the body using NQR.

【はじめに】核四極共鳴(以下 NQR)は NMR と同じく共鳴吸収現象の一種であるが、核スピンの励起は NMR と違い固体中の原子核が感じる電場勾配に依存する。また、測定可能な原子核はスピン数 1 以上の原子核に限定されている。しかし、NQR による計測は核スピンを整列させるための静磁場が不要であるため、計測装置の簡易化が可能であり、ハンドヘルド型の検査装置への応用も期待できる。

本研究は、体内に飲み込まれた物質に対する、NQR によるリモートセンシングの可能性を検討したものである。身体を模擬した導電性媒質が、NQR 信号取得に与える影響をヘキサメチレンテトラミン(以下 HMT)を用いて評価した。身体の模擬物質として導電率の近い生理食塩水を用いた。身体の導電率は、生理食塩水の導電率 (1.6 S/m) より低い。同時に表皮効果の影響を、導電率をもとに計算を行い、実験結果との比較を行なった。

【実験内容】 実験は、アンテナに耐ノイズ性のあるグラジオメータを用いてシールド内で測定を行いノイズの減少に努めた。測定対象として HMT (200 g) を用い、導電性媒質の NQR 信号に対する影響を評価するために、アンテナとサンプル間の媒質を空気、純水、食塩水 (0.9 %, 3.0 %, 15 %) と変化させた。また、距離依存性を評価するために、アンテナからサンプルまでの距離を 0.01~0.05 m の間で変化させた。NQR の測定は、FID を用いて行なった。NQR 信号の取得条件には、RF 送信周波数：

キーワード：核四極共鳴, 非破壊検知, 電磁界シミュレーション

○やまねゆきひで, なかはらゆう, しのはらじゅんいちろう, あかばひでお, いとざきひでお

3.308MHz, RF 出力 : 320 W, 不感時間 : 400 s, 休止時 : 50 ms, 積算回数:1000 回を用いた。このとき、サンプル内部に磁場プローブを入れ、NQR 信号と同時に磁場計測を行った。食塩水の導電率 (0.9% : 1.6 S/m, 3.0% : 4.7 S/m, 15% : 16 S/m)¹をもとに、HMT の共鳴周波数 3.308 MHz における表皮深さの計算を行い、実験により得た送信磁場との比較を行なった。

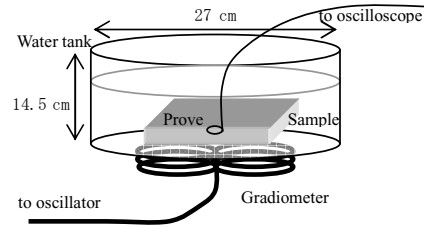


Fig.1 Experimental setup of the NQR measurement for HMT (200 g) in the conductive medium.

【実験結果】 Fig.2 はサンプルが受ける 3.308 MHz における送信磁場強度を測定したものである。表皮効果による減衰は、距離と導電率の増加に伴い大きくなることが予想通り確認された。Fig.3 は HMT の NQR 信号強度をプロットしたものである。導電率の増加に伴い、磁場強度の減衰と同様に NQR 信号の減少が確認された。距離 0.05 m の位置では純水と比べて最大 25% 以上の 90° パルス幅の増加が見られた。また、送信磁場と NQR 信号強度の減衰率は 0.04 m までの距離で比例関係が見られたが、距離 0.05 m では送信磁場に比べ、NQR 信号が約 20% 減衰した。これはパルス幅が長くなったため、パルス照射中に緩和が起こり、NQR 信号強度が低下したためだと考えられる。

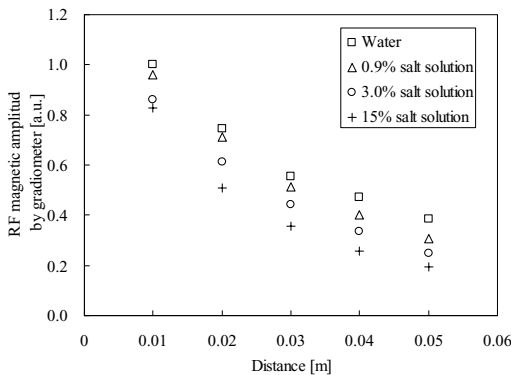


Fig.2 RF magnetic amplitude by gradiometer field plotted as a function of distance in the conductive salt solutions with different concentration of NaCl.

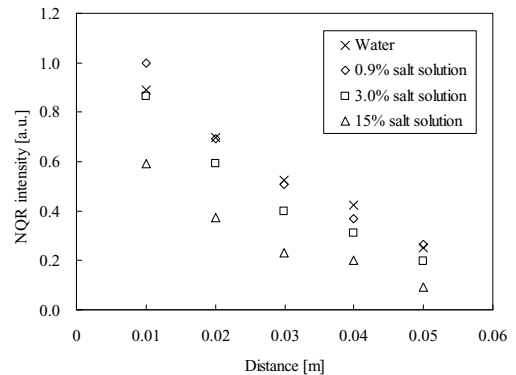


Fig.3 Decay of NQR intensity from HMT (200g) in the conductive salt solutions with different concentration of NaCl.

【結論】 送信磁場は、媒質中の導電率によって減衰していく。しかし、体内の導電率を越える 16 S/m (15% 食塩水相当) までの範囲において、アンテナから 0.05 m の距離で、HMT (200g) からの NQR 信号を確認することが出来た。また、磁場強度の減衰と NQR 信号の減衰が比例関係にあることから、送信磁場強度の測定を行うことで、NQR 信号の減衰を予測することが出来る。今回の実験は簡易的な模擬実験であるため、より身体の組成に基づいた媒質を用いた模擬実験が今後さらに必要である。

参考文献

1 Martin B. Kraichman : The resistivity of aqueous solutions of sodium chloride, Defense documentation center for scientific and technical information, AD437890, 1964

P117 NQR 周波数探査用 NQR・NMR 二重共鳴分光装置の開発

○赤羽英夫, Bryn Baritomba, 篠原淳一郎, 糸崎秀夫
大阪大学大学院基礎工学研究科

Development of an NQR・NMR double resonance spectrometer to search for NQR frequencies

○Hideo Sato-Akaba, Bryn Baritomba, Junichiro Shinohara, Hideo Itozaki
Graduate School of Science Engineering, Osaka University

We are developing a small NQR・NMR double resonance spectrometer to search for NQR frequencies and to detect NQR signals from small samples of several grams. The polarization transfer from proton to ^{14}N nuclei was done by a level crossing technique for enhancing the NQR signal intensity. A sample was shuttled between a high field (828 mT) and a low field (several mT) for polarization of protons, level crossing and free induction decay of ^{14}N nuclei using an air compressor and solenoid valves. A single-shot NQR signal from diethylamine hydrochloride was observed.

はじめに

爆発物、違法薬物、不良な医薬品等の検知を可能にする技術開発は、安全安心な社会の構築に貢献することができ、近年その技術開発が国際的にも期待されている分野である。しかし、密閉された物質を非接触で検知する手法は、未だ実用化されていない。我々の研究グループでは、核四極子共鳴法（NQR）を用いた検査装置の開発を行っている。NQR法は、固体中に存在するスピン1以上の原子核を特異的に検出できる方法であり、そのNQR周波数は原子核近傍の電場勾配によって決定される。そのため、物質同定だけでなく、同じ物質における結晶構造の違いにおいても識別が可能である。しかし、違法薬物や医薬品等の特殊な物質においては、そのNQR周波数がほとんど報告されておらず、今後データベースの構築が課題となっている。

主要なNQR周波数探査法には、直接目的とする原子核を計測する方法と水素原子核を用いて計測する方法がある。前者は、NQR装置を用いて行うことができるため、簡易に探査が可能であるが、探査時間が長くなる問題がある。一方、後者の方法は、NQR・NMR二重共鳴法を用い分子中に存在する水素原子核から磁化を目的とする原子核に移し計測することにより、比較的高感度にNQR周波数を探査することができる[1, 2]。しかし、装置の構成が複雑となり、また市販の装置がないため研究室で開発する必要がある。本発表では、NQR周波数を効率的に探索できるNQR・NMR二重共鳴装置の開発について報告する。

キーワード： NQR・NMR 二重共鳴分光装置, NQR 周波数探査, 装置開発

○あかばひでお, Bryn Baritomba, しのはらじゅんいちろう, いとざきひでお

システムの概要

装置の主要な構成は、プロトンの分極、NMR 測定を目的とする永久磁石による磁気回路 (828 mT)、二重共鳴用電磁石、NMR 計測用ブリッジ (~35MHz)、NQR 計測用ブリッジ (~1MHz)、エアコンプレッサーと電磁弁を用いたサンプルシャトル構造からなる。サンプルシャトル構造は、サンプルが感じる磁場を高速で切り替えることを可能にするものであり、NQR・NMR 二重共鳴に必要である。空気の流路を電磁弁で制御することにより、サンプルをおよそ 100ms 程度で移動することが可能である。装置制御信号の入出力にはマルチファンクション DAQ (NI USB-6259) を使い、制御ソフトの開発には LabVIEW を用いた。

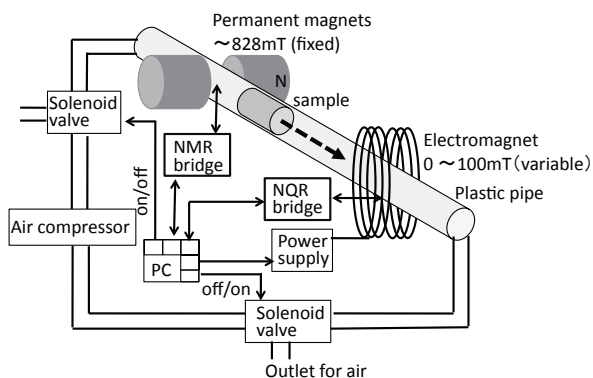


Fig 1 Schematic diagram of a homemade NQR・NMR double resonance system. The resonator coils for NMR and NQR, which were set at the middle of the magnets, were not shown.

測定結果

装置の評価として、NQR 周波数が既知であり、プロトン NMR 縦緩和時間と ^{14}N NQR 縦緩和時間が共に長い ($T_1 \geq 1$ s) ジエチルアミン塩酸塩を用いて NQR 信号の計測を行った。サンプル (~2 g) を 5 秒間高磁場下に置き、プロトンの分極を誘導する。その後 0.1s 程度で高磁場から低磁場にサンプルを移動する。磁化の移動は、プロトンのラーモア周波数が、窒素原子核の NQR 周波数を通過する時に最大となる。NQR 測定は、低磁場下で行った。Figure 2 は、積算せずに NQR 信号を取得した結果である。NQR 周波数は、500g のサンプルを用いて計測した 1.008MHz と一致していることから、ノイズではなく信号であることが分かる。プロトンからの磁化移動を行わなかった場合においては、1000 回積算を行っても信号を観測することはできなかった。

最後に、NQR・NMR 二重共鳴分光装置を開発し、磁化移動による NQR 信号の高感度化が可能か評価した。プロトン NMR 縦緩和時間と ^{14}N NQR 縦緩和時間が共に長い場合は、プロトンによる磁化移動が周波数探索において有効であると示唆された。

参考文献

- [1] J. Seliger and V. Žagar, NATO Science for Peace and Security Series B: Physics and Biophysics, 139-158 (2009).
- [2] J. Luznik et al., J. Appl. Phys. **102**, 084903 (2007).

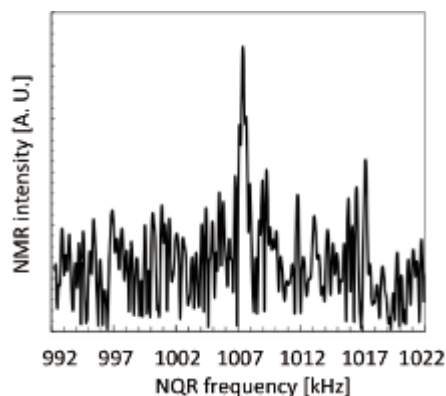


Fig 2 Single-shot polarization transfer ^{14}N NQR spectrum from diethylamine hydrochloride (2 g).

鍋島真美, 山路俊樹, 衣笠晋一, 齋藤剛
 (独)産業技術総合研究所 計測標準研究部門

Our activities on construction of reliable SDBS-NMR data

○Mami Nabeshima, Toshiki Yamaji, Shinichi Kinugasa, and Takeshi Saito
National Metrology Institute of Japan (NMIJ), AIST.

We have been constructing a reliable NMR database of SDBS (Spectral Database for Organic Compounds, SDBS-NMR) open freely through AIST's web site. SDBS-NMR compiles high quality solution state ^1H and ^{13}C NMR spectra which are acquired and evaluated by ourselves. Chemical structures for these spectra with their chemical shift assignments are also provided. We will discuss one of our activities to ensure the reliability of SDBS-NMR with (S)-1-(*tert*-butoxycarbonyl)-3-pyrrolidinol (SDBS No. 51972) as an example. ^{13}C NMR spectrum of this compound observed at 30°C showed two sets of resonances from pyrrolidine-ring carbons which are *cis* and *trans* to the carbonyl group; the resonances became one set when the spectrum was obtained at 70°C. This suggested these resonances were originated from two structures due to the restricted rotation around the carbamate C-N bond.

【はじめに】

SDBSは、産総研がWebで無料公開している有機化合物のスペクトルデータベース (SDBSWeb)であり、MS, IR, ^1H NMR, ^{13}C NMR, Raman, ならびにESRの6種類のスペクトルデータが集録されている。SDBS-NMRは、このうちの ^1H NMR, ^{13}C NMRスペクトルを収録しweb上で公開する活動をしており、具体的には汎用有機化合物試薬を中心に有機化合物試薬のNMR試料調製、NMRスペクトルの測定・評価を行い、データ公開のための評価基準を満たしたスペクトルには、シフト値や帰属情報付きの構造式、調製・測定条件を加えて公開する活動を行っている。昨年度のSDBSWebへのアクセスは、1日平均13万件を超し、その中の半数以上が、NMRへのものであった。SDBS-NMRでは、日々その品質向上を目指して高品質な溶液NMRスペクトル収集を行っている。

【SDBS-NMR構築への取り組み】

SDBSWebにスペクトルが公開されるまでの手順スキーム・測定条件はすでに発表した¹⁾。スペクトルの品質向上のため

①サンプル調製・測定時の取り組みとして

- 1 溶解性、溶液安定性、ならびにNMRピーク形状を考慮した溶媒の選択
- 2 スペクトルのS/N比を考慮した試料溶液のモル濃度調整
- 3 目的物質に合致した観測幅、積算回数、遅延時間の設定

溶液NMR, スペクトルデータベース, 有機化合物

○なべしままみ, やまじとしき, きぬがさしんいち, さいとうたけし

-4 立体障害や分子運動障害などが原因のピークのブロード化に対する、温度可変測定への解析

②スペクトル情報信頼性向上への取り組みとして

- 1 DEPT、gHMQC、gHMBC 等を利用した公開するスペクトル帰属の正確性の確保
- 2 IR、MS 等異なるスペクトル担当者間の情報共有による、化合物の問題確認
- 3 測定された構造異性体のスペクトルに対する検討
- 4 スペクトルや帰属時の問題点などの情報開示を続けている。

本発表では、これらの取り組みの具体的な例を示し、議論したい。

【事例】

Fig. 1 に SDBS 番号 51972 (S51972)の化合物、(S)-1-(*tert*-butoxycarbonyl)-3-pyrrolidinol の構造式を示した。この化合物を通常条件で測定した結果、 ^{13}C NMR にカーバメイトカルボニル基の C-N 結合回りの束縛回転²⁾の結果と考えられる二組の N の 5 員環の構造に起因され得るピークが観測された (Fig. 2)。これらのピークが束縛回転に起因するものか確認するために、測定温度を変化させて検討した。

Fig. 3 に 30°C、50°C、70°Cで測定した ^{13}C NMR スペクトルを示した。30°Cで観測された二組のピークが、70°Cでは一組になった。この結果から、この二組のピークはカーバメイトカルボニル基の C-N 結合回りの束縛回転であると結論づけ、Web へはそれぞれ特徴的な 30°Cと 70°Cのスペクトルを公開した。帰属は 2D データを利用してそれぞれの構造ごとに付与した。

【終わりに】

NMRで観測されたC-N結合回りの束縛回転に起因するスペクトルの変化を示した。SDBS-NMRでは、有機化合物の溶液NMRスペクトルの測定結果に隠された化合物の情報をユーザーに伝えるため、上記のような検討をはじめとした課題解決を継続して行っている。今後ともユーザーからの支持に応えることを目標にした取り組みを継続発展させて行く計画である。

参考文献

- 1) 鍋島他、第47回NMR討論会要旨集、P420
- 2) G.C.Levy, G.L.Nelson, *J. Am. Chem. Soc.*, **94**, 4897 (1972)

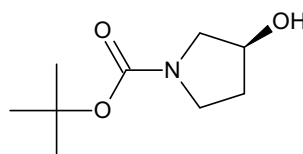


Fig. 1 Structure of the compound, S51972.

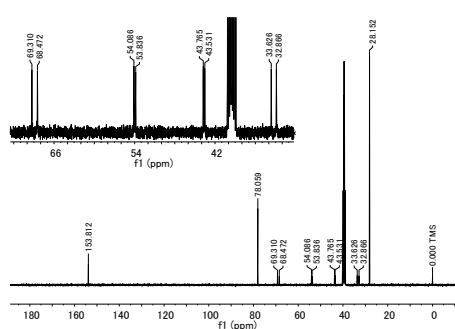


Fig.2 ^{13}C NMR spectra of the compound, S51972, and its expansion in DMSO- d_6 solution.

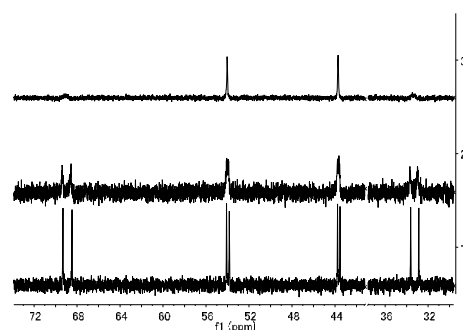


Fig.3 ^{13}C NMR spectra of the compound, S51972, obtained at 1) 30°C, 2) 50°C and 3) 70°C, respectively.

NQR 共鳴周波数自動探査装置

○篠原淳一郎、中原優、赤羽英夫、糸崎秀夫
大阪大学大学院基礎工学研究科

Automatic scanning for NQR frequencies

○Junichiro Shinohara, Yu Nakahara, Hideo Sato-Akaba and Hideo Itozaki
Graduate School of Science Engineering, Osaka University

Nuclear quadrupole resonance (NQR) spectroscopy has potential applications in the detection of illegal substances, such as narcotics which frequently include ^{14}N ($I=1$). To apply NQR to narcotic detection, the NQR frequency of each compound must be known. We introduce an automatic scanning system for finding NQR frequencies using the pulse method.

核四極子共鳴(NQR)は、物質固有の共鳴周波数の電波を照射し、核スピンを励起させた後の緩和過程に物質から放射される電波を計測することで検出できる。この方法は静磁場を必要としないことや共鳴周波数が物質固有であることから、物質の探査に応用が可能であり、現在では不正薬物の検知技術等のセキュリティー分野でも、その応用が期待されている。

しかし、不正薬物では NQR 周波数が調べられていない物質が多く、これらを効率的に収集することは重要な課題となっている。そこで本研究ではパルス法を用いて NQR 共鳴周波数探査の自動化について検討を行なった。

装置の概要

NQR 共鳴周波数探査の方法として、周波数を徐々に変化させながら計測を行い、NQR スペクトルの出現を確認することで NQR 周波数の同定を行なう方法である。

本装置は、これら探査に必要な周波数の走査と計測周波数におけるインピーダンスマッチングのためのコンデンサの調整を自動で行なう装置である。

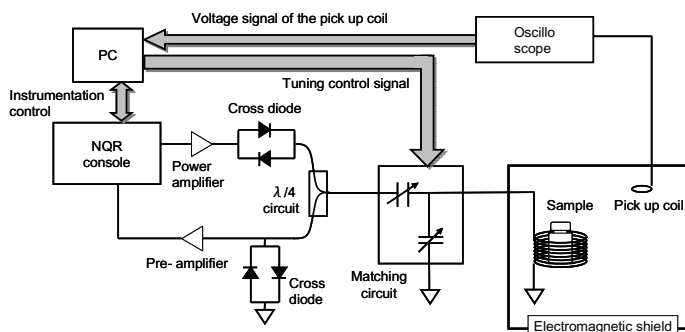


Fig.1 Setup of an automatic NQR frequency scanning system.

キーワード：NQR、パルス法、共鳴周波数探査

著者ふりがな：○しのはらじゅんいちろう、なかはらゆう、あかばひでお、いとざきひでお

共振器の自動調整

NQR 計測において、送信周波数の走査により共振点がずれるため、送信周波数の共振点に共振器を調整する必要がある。共振器の調整は2つの可変コンデンサにより行う。

本装置では、可変コンデンサにステッピングモーターを取り付け、モーター制御による調整機構を作製した。そして調整のアルゴリズムとしては、コイルから発信される磁場が最大となるよう調整する必要がある。そこで、周波数の走査に応じ送信される磁場が最大となるコンデンサの調整アルゴリズムを開発した。

本装置の共振器の回路を Fig3.(a)に示す。この回路のコイルからの送信磁場を、可変コンデンサの容量 C_1 、 C_2 を平面座標として送信磁場強度を示すと Fig3.(b)のようになる。共振器の調整アルゴリズムは、 C_1 と C_2 を送信磁場が最大となる地点へ誘導する。Fig3.(c)にアルゴリズムを示す。まず現在地を中心とした周囲の送信磁場を計測し、最大位置を見つける。次に、最大であった地点を中心とし、再度周囲の計測を行なう。これを中心地点が最大となるまで行なう。さらに、計測範囲を小さくし、同様に行うことで、送受信コイルのインピーダンスマッチングを調整する方法である。

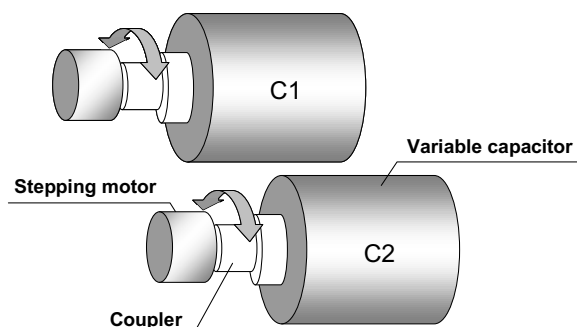


Fig.2 Mechanical adjustment of the capacitors for impedance matching and frequency tuning.

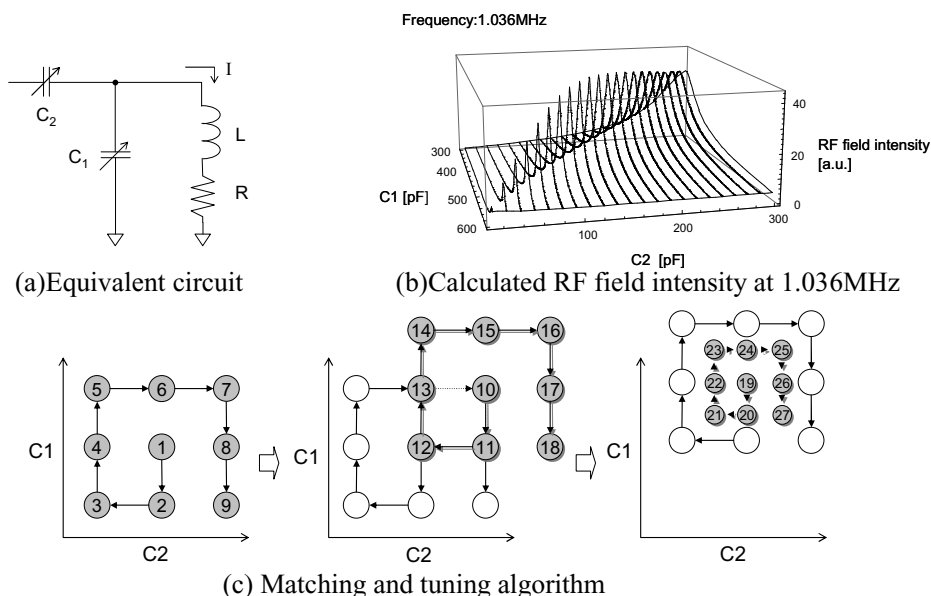


Fig.3 Matching and tuning mechanism. (a) Equivalent circuit of resonator. (b) RF field intensity for a fixed frequency calculated as a function of C_1 and C_2 . The maximum intensity is possible to obtain by selecting C_1 and C_2 . (c) Matching and tuning algorithm to search maximum RF field intensity by adjusting C_1 and C_2 automatically.

自動調整の評価実験

本装置の自動調整が正しい共振器の調整であるかを、以下の実験で評価した。

周波数を走査させ、自動調整を行なった場合と、1.2MHz に調整した共振器で自動調整を行なわず、C1 と C2 を固定した場合の送信磁場をピックアップコイルで計測し、その結果を Fig.4 に示す。

自動調整しない場合は、調整された周波数である 1.2MHz から離れるにつれ、RF コイルの送信磁場が小さくなった。一方、自動調整を行ないながら周波数を変化させた場合では、各周波数においても、RF コイルの送信磁場は、ほぼ一定の強さであった。この結果から、共振器の自動調整が正しく行なわれたことを確認した。

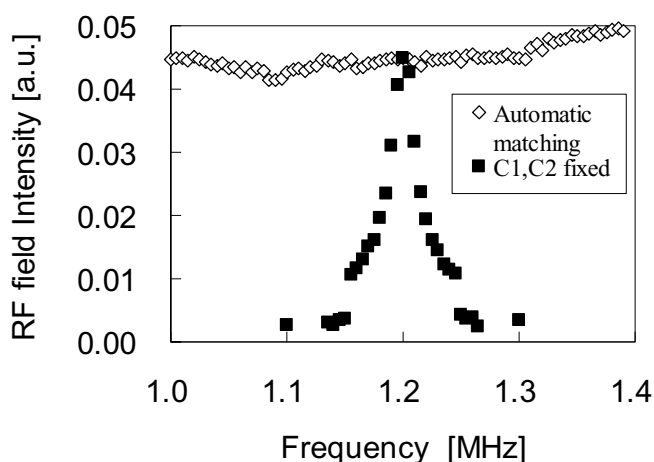


Fig.4 RF field intensities generated by the RF coil. The intensity was plotted as a function of RF frequency with and without automatic matching and tuning.

NQR 共鳴周波数自動探索手法

本装置の NQR 測定では、コンソールとして Apollo (Tecmag 社製) と、このコンソールソフトである NTNMR を用いて行った。NTNMR は Visual Basic 言語によるコマンド入力が可能であり、NQR 共鳴周波数探索の工程である共振器の調整と NQR 計測、及び計測結果を保存する一連の作業を、プログラムによって自動で行なった。

はじめに、計測する周波数において共振器の調整を手動により行なう。これは、共振器の初期状態が、計測周波数の共振点から大きく違う場合は、コンデンサの変化による送信出力の変化が正確に得られず、インピーダンスマッチングが正常に行なわれない可能性があるためである。そのため、最初の計測を行う周波数については、共振器を手動で調整しておき、そこからの小さな周波数変化に対して、共振器の自動調整が行なえる状態にしておく。その後の周波数探索の工程は、計測を行う周波数データを取得し、自動で共振器の調整を行う。共振器の調整後、NTNMR の計測コマンドを送り NQR 信号の計測を自動で行う。なお、ステッピングモーターは、励磁状態では NQR 計測においてノイズ源になった為、計測時はステッピングモーターへの電源供給を止めた。

NQR 共鳴周波数探索実験

NQR 共鳴周波数自動探索を、亜硝酸ナトリウムを用いて実験を行なった。

電磁シールド内に直径 115mm、高さ 120mm のソレノイドコイル (22 巻き) を設置し、プラスチック容器に入った亜硝酸ナトリウム (500g) をソレノイドコイルの内部中央に置いた。温度は室温 (298K) であり、送信出力 488W の SLSE シーケンス^[1]で計測を行った。また、積算回数は 500 回である。

計測周波数は、950kHz から 2kHz ずつ増加させながら計測した。その結果、1036kHz において NQR 信号のスペクトルを確認した。Fig.5 に NQR 共鳴周波数近傍の計測結果を示す。

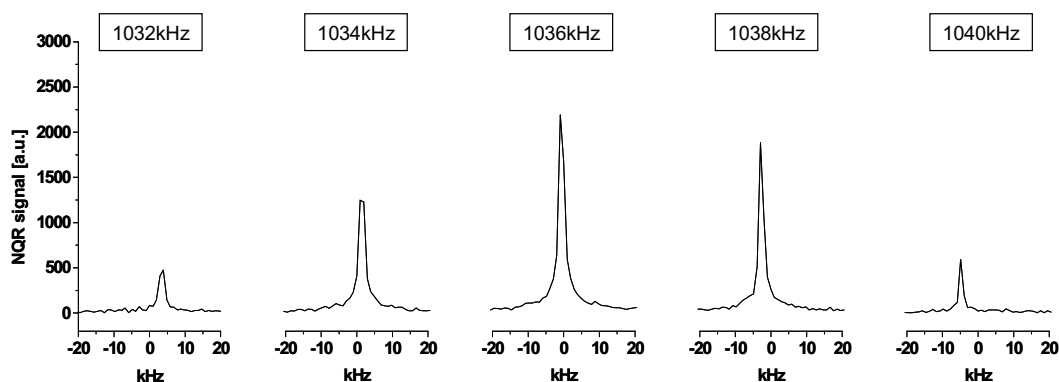


Fig.5 Demonstration of automatic scanning to search NQR frequency of sodium nitrite using a step of 2kHz. A peak was found at 1036kHz.

まとめ

本研究では、共振器の調整に必要なコンデンサの調整を解析し、コンデンサをステップモーターによって制御可能な機構の作製と、共振器が自動で調整されるアルゴリズムを開発した。そして、本装置の共振器の自動調整が、周波数を走査させた場合においても、一定の送信磁場強度であることを確認し、調整が正しく行なわれていることを明らかにした。

そして、共振器の自動調整を用いて、周波数を徐々に変化させながら NQR 共鳴周波数を探索する作業の自動化を行い、その有効性を亜硝酸ナトリウムの NQR 信号の取得で確認することができた。

これにより、本装置によって NQR 共鳴周波数探索が効率的に行なえる。

参考文献

[1] R.A. Marino, S.M. Klainer, Multiple spin echoes in pure quadrupole resonance, *J. Chem. Phys.* **67** (1977) 3388–3389.