

P61

ランタノイドプローブ法を用いたFKBP12-drug複合体構造解析—Differential Scanning Fluorometryを用いた迅速なLBT 2点固定コンストラクトのスクリーニング手法

○生塩 理尋¹、小橋川 敬博²、斉尾 智英¹、関口 光広³、横地 政志²、小椋 賢治²、稲垣 冬彦²

¹北大生命、²北大先端生命、³アステラス製薬

Structural analysis of FKBP12-drug complex by Lanthanoid probe – Fast screening method for stable LBT attached proteins using Differential Scanning Fluorometry

○Masahiro Ushio¹, Yoshihiro Kobashigawa², Tomohide Saio¹, Mituhiro Sekiguchi³, Masashi Yokochi², Kenji Ogura², Fuyuhiko Inagaki²

¹Grad. Sch. Life Sci. the Univ. of Hokkaido, ²Fac. Advanced Life Sci. the Univ. of Hokkaido,

³Astellas Pharma

Long-range distance and angular information is useful for the structural analysis of large proteins and protein-protein complexes. Paramagnetic lanthanide ions induce a pseudo-contact shift (PCS) and a residual dipolar coupling (RDC). They provide distance and angular information of the nuclei. Our laboratory developed a lanthanide-binding peptide tag linked to the target protein via two points: a disulfide bridge and a N-terminal fusion⁽¹⁾, which was successfully applied for the structural analysis of the Zip PB1 homo dimeric complex⁽²⁾. However, spacer length between the target and the lanthanide binding tag (LBT) should be optimized, and this step requires a number of trials and errors. Here we used differential scanning fluorometry (DSF), which afforded fast and systematic determination of the spacer length for structural analysis of FKBP12-drug complex.

【序論】高分子量タンパク質、もしくはタンパク質複合体を精度良く構造解析する際に、長距離情報や角度情報は有用である。こうした情報は常磁性ランタノイドを用いて、PCSやRDCを測定することで容易に得られる。PCSはランタノイドイオンを中心に約40Å以内の距離と角度の情報をあたえ、RDCは距離に依存しない分子の配向情報をあたえる。このようなランタノイドを用いた解析は、カルシウムなどの金属イオンと結合するタンパク質に対してはそのイオンをランタノイドに置き換える事で応用が可能である。また、金属イオンと結合しないタンパク質に対してもランタノイドをタンパク質に固定化するタグを用いれば解析が可能である。我々の研究室では、ペプチド性のランタノイド結合タグ(LBT)をタンパク質に2点で固定することによって、高精度の常磁性による構造情報の取得が可能であることを示してきた^{(1),(2)}。しかしながら、タンパク質とLBTの間の最適なスペーサー長および固定点を決定するために、

ランタノイド、LBT、FKBP

○うしおまさひろ、こばしがわよしひろ、さいおともひで、せきぐちみつひろ、よこちまさし、おぐらけんじ、いながきふゆひこ

様々なコンストラクトを作成し、複数のランタノイドを添加して ^1H - ^{15}N HSQCを測定して比較しなければならず、多くの手間がかかっていた。そこで、本研究ではDifferential Scanning Fluorometry (DSF)を用いて変性温度を測定し、それを利用することで適切なリンカー長を迅速に探索する手法を考案し、実際にFKBP12-drug複合体のランタノイドプローブ法による構造解析に応用した。

【実験】FKBP12の表面にシステイン変異を導入し、ランタノイド結合ペプチド配列をN末端に融合したコンストラクトを作成した。これを発現・精製し、TEV proteaseで消化してLBTのN末端システインを露出させた。その後、FKBP12のリガンドであるrapamycinを加えて複合体を作成し、DTNBで酸化する事で、LBTのN末端とFKBP12表面のシステインをジスルフィド結合によって架橋した。この実験は、FKBP12とLBTの間のスペーサー長を1~5残基に変えた5つのコンストラクト(L1、L2、L3、L4、L5)を用いて行った。これらの架橋した5つのコンストラクトについて、Luを1.0等量を添加した状態でDSFを用いて熱変性の T_m を測定した。また、L2、L3、L4、L5については数種類のランタノイドを加えて ^1H - ^{15}N HSQCを測定した。

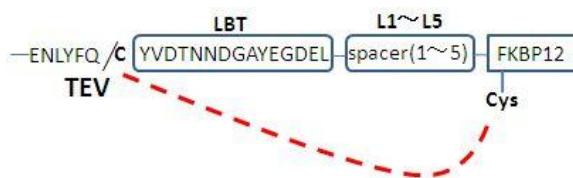


Fig. 1. Schematic representation of the FKBP12 constructs for lanthanide probe.

【結果・考察】DSFの結果、スペーサー長を1残基から2残基に伸ばす事で 0.7°C の T_m の上昇が見られ、さらに3~5残基に伸ばすことで約 4°C 程度と著しい T_m の上昇が見られた。以上の結果より、2残基以下のスペーサー長ではLBTの固定化により構造にひずみが生じ、熱力学的安定性が低下していることが示唆された。L2、L3、L4、L5のコンストラクトについてLuを加えて ^1H - ^{15}N HSQCを測定し、LBTが付加されていないFKBP12と比較した。その結果、L3、L4、L5においては固定点周辺にのみ化学シフト変化を示す残基が見られたが、L2においてはそれ以外にN末端の β -strandを裏打ちする α -helix上にも大きな化学シフト変化が見られ、LBTの固定により構造変化が生じていることが確認された。これは、DSFの結果を支持していた。L3およびL4についてはLu、Tm、Dy、Er、Tbの5種類のランタノイドを加えて ^1H - ^{15}N HSQCを測定し、最大で2~3ppm程度のPCSが観測されることを確認した。現在、これらを用いて複合体の構造解析を進めている最中である。

[参考文献]

- (1) Saio T, Ogura K, Yokochi M, Kobashigawa Y, Inagaki F. *J Biomol NMR*. 2009. **44**:157-66.
- (2) Saio T, Yokochi M, Kumeta H, Inagaki F. *J Biomol NMR*. 2010. **46**:271-80.

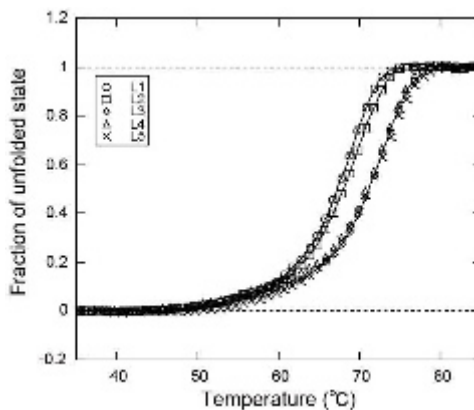


Fig. 2. Thermal unfolding of L1, L2, L3, L4 and L5 measured by DSF.

Molecular mobility of protein in agarose gels

○Bona Dai¹, Mika Hirose², Shigeru Sugiyama²,
Hiroyoshi Matsumura² and Shingo Matsukawa¹
Tokyo University of Marine Science and Technology¹
Grad. Sch. Engineering, Osaka University²

Abstract: The measurements of self-diffusion coefficient (D) and ^1H relaxation time (T_1 and T_2) have been carried out to clarify the influence of the gel network on the molecular mobility for the protein hen egg white lysozyme (HEWL) in agarose gels. The D values of HEWL decreased with increasing agarose concentration and the ^1H relaxation time showed no variation tendency.

1. Introduction

Agarose gels have been used in protein crystallization for promoting nucleation and controlling packing effects. Agarose gels reduce convection and prevent crystal sedimentation to provide high-quality protein crystals. It has been reported that the concentration of agarose gels exerts a tremendous influence on the protein nucleation [1]. However, the mechanism of protein nucleation in agarose gels has not been clearly understood. In this study, the ^1H NMR local and translational motion of protein in aqueous solution and agarose gels were investigated by ^1H NMR techniques. From the results, the influence on protein molecular motion of agarose gels will be discussed.

2. Materials and Methods

Sea plaque agarose (agarose SP) was purchased from Lonza (catalogue No. F5170A). Hen egg white lysozyme (HEWL) was purchased from Seikagaku (catalogue No. 100940). The 1.2 – 3.6w% agarose solutions were first prepared by dissolving agarose powder in water at 85°C. Powder of HEWL was dissolved in 0.1M sodium acetate (pH 4.5) on a concentration of 150mg/ml. The samples for NMR measurements were prepared by mixing equal volumes of agarose solution, HEWL solution and 0.1M sodium acetate at 55°C. The final agarose concentrations were 0 ~ 1.2w%. The solutions were transferred into the NMR tubes and kept at 4°C for 1 hour before NMR experiments.

Self-diffusion coefficient (D) measurements, spin-lattice relaxation time measurements (T_1) and spin-spin relaxation time (T_2) and were carried out on a Bruker Avance II 400WB spectrometer

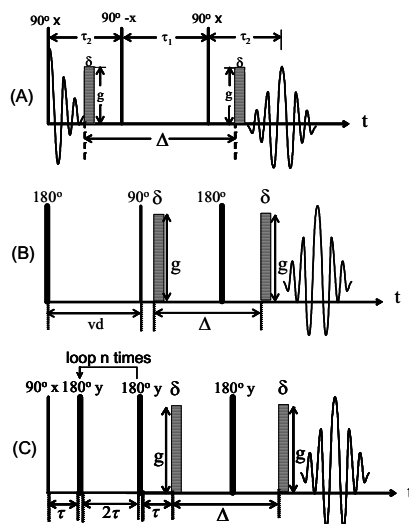


Fig. 1 (A) STE pulse sequence; (B) CPMG-spin-echo (se) sequence with gradients; (C) Inversion-recovery-spin-echo (se) sequence with gradients.

Key Words: molecular mobility/ protein/ agarose gel

operating at 400.13 MHz for protons by using STE pulse sequence (Fig.1 A), CPMG-spin-echo (se) sequence with gradients (Fig.1 B) and Inversion-recovery-spin-echo (se) sequence with gradients (Fig.1 C), respectively. The diffusion time was set as 5ms.

Results

The diffusion coefficients of HEWL in 0.1 M sodium acetate and agarose gels were determined by PFG-STE-Se ^1H NMR method. Comparison of the diffusional spin-echo attenuations, plotted in the form $\ln I$ versus $\gamma^2 g^2 \delta^2 (\Delta - \delta/3)$, for HEWL is depicted in Fig.2. The experimental data for each sample lie on individual straight lines. This indicates that the HEWL has single component diffusion during the observation time whether in solution or agarose gel. The slopes of the curves became gentler with increasing agarose concentration, which indicates the slowing in translational motion of the protein. The calculated D values of the HEWL are shown in table 1. D decreased with increasing agarose concentration. The three-dimensional polymeric network of hydrogels has a greater ability in restriction on the molecular motion of the protein than aqueous medium. This endows agarose gel the advantage for promoting protein nucleation. The HEWL diffuses among the gel network. An increase in the gel concentration causes decrease in the hydrodynamic mesh size of the gel network, leading to shrinkage of the interspaces between the bundles of the network and thus an increase of the obstruction effect.

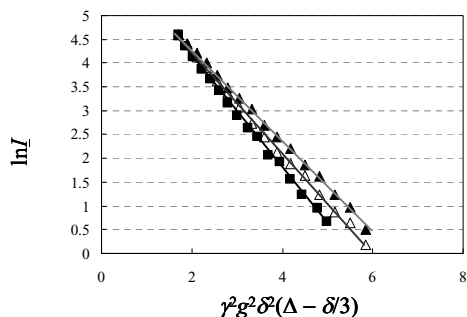


Fig.2 Diffusional spin-echo attenuations of HEWL in 0.1 M sodium acetate (■), 0.4w% agarose gel (△) and 1.2w% agarose gel (▲) by varying field gradient strength (g).

We also measured the ^1H relaxation time of HEWL by using the modified CPMG and inversion recovery sequences. The gradients were used to remove the signals of small molecules in the samples. There is no tendency for the change of relaxation time against the variation in agarose concentration. Therefore, it is difficult at present to say the effect of agarose concentration on the local motion of the protein.

Table 1 The proton relaxation times and diffusion coefficients of HEWL in 0.1M sodium acetate and agarose gels

Agarose concentration (w%)	^1H T_2 (ms)	^1H T_1 (ms)	Diffusion coefficient (D , m^2s^{-1})
0	21.90 (25.4°C)	1014.28 (25.4°C)	1.2901×10^{-10} (28.7°C)
0.4	15.25 (27.3°C)	853.66 (27.3°C)	1.1245×10^{-10} (27.3°C)
0.8	13.61 (25.5°C)	1161.2 (25.5°C)	1.0796×10^{-10} (25.5°C)
1.2	16.86 (27.6°C)	850.77 (27.6°C)	0.98871×10^{-10} (27.6°C)

Reference: [1] Tanabe K. *et al.* Applied physics express (2009) 125501.

NMR studies of 56 kDa *E. coli* nickel binding protein NikA

○Joanna Jakus¹, Yuusuke Tsuchie¹, Teppei Ikeya¹, Masaki Mishima¹, Daniel Nietlispach², Jeremy R. H. Tame³ and Yutaka Ito¹

¹*Department of Chemistry, Tokyo Metropolitan University, Hachioji, Tokyo, Japan.*

²*Department of Biochemistry, University of Cambridge, Cambridge, UK.*

³*Protein Design Laboratory, Yokohama City University, Yokohama, Japan.*

Abstract

Periplasmic NikA (502 a.a., 56kDa) is a nickel-binding component of *E. coli* permease. To determine NikA structure in solution and understand the structural basis of the conformational changes accompanying the nickel binding, we initiated solution NMR studies of NikA. We had already reported the backbone resonance assignment of apo-NikA, from analysis of TROSY-based triple-resonance 3D NMR spectra measured on perdeuterated samples. The secondary structures of NikA, predicted using the Chemical Shift Index (CSI) method from assigned carbon resonances, showed good coincidence with that in the crystal structure of Ni-bound NikA. Here, resonance assignment of side-chain methyl groups on selectively methyl protonated sample was performed by employing the strategy established by Kay and his co-workers for the methyl-assignment of 82kDa MSG protein.

Introduction

Nickel homeostasis inside the cells needs to be maintained for the normal functioning of several enzymes. The implied role of *E. coli* NikABCDE permease is to specifically transport Ni²⁺ ions from the periplasm to the cytoplasm. The mature periplasmic NikA (502 a.a., 56kDa) is the primary nickel-binding component of this system.

Two crystal structures of NikA show a contradictory picture of nickel binding. Heddle et al. [1] showed nickel binding to the large cleft between the two lobes of the protein, while Cherrier et al. [2] between two histidine residues in a distal site. From mapping of the existing backbone assignments [3] onto the crystal structure of Ni-bound NikA, the unassigned ¹H-¹⁵N HSQC cross-peaks were located around the cleft nickel-binding site, the line broadening of signals presumably arising from intrinsic conformational flexibility around the hinge region between two lobes. Structure determination in aqueous solution together with relaxation studies by NMR will provide better understanding of ligand recognition mechanism.

For global fold determination methyl-selectively ¹H/¹³C-labelled samples were prepared. Methyl groups are often localized to hydrophobic cores of proteins so that methyl distances measured from NOESY experiments enable to determine protein structures efficiently. This approach had previously been utilized for structural analysis of larger proteins [4,5].

Keywords: selective methyl protonation, nickel-binding protein, maximum entropy processing, nonlinear sampling

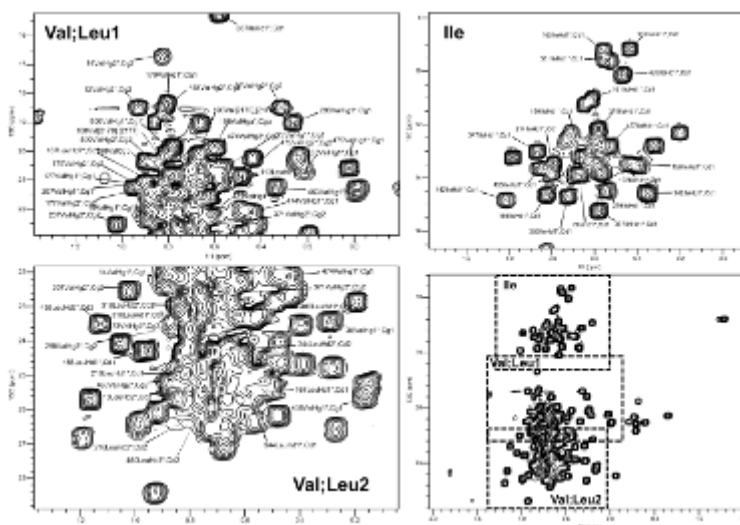


Fig. 1. ^1H - ^{13}C HMQC spectrum of the methyl region of the {Ile(δ 1 only), Lue($^{13}\text{CH}_3$, $^{12}\text{CD}_3$), Val($^{13}\text{CH}_3$, $^{12}\text{CD}_3$)} - U- $[\text{}^2\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}]$ -NikA sample. Assignments for selected residues are indicated.

Materials and Methods

Biosynthetic precursors of α -ketobutyrate and α -ketoisovalerate lead to production of ILV residues that are $^{13}\text{CH}_3$ -labeled only at single methyl positions. This strategy generates linear ^{13}C spin systems, avoiding magnetisation losses at the branch points of these side-chains. The gains in sensitivity outweigh the two-fold dilution of methyl groups [5]. Using this approach, {I(δ 1 only), L($^{13}\text{CH}_3$, $^{12}\text{CD}_3$), V($^{13}\text{CH}_3$, $^{12}\text{CD}_3$) - U- $[\text{}^2\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}]$ - NikA sample was obtained.

NMR experiments were measured at 303 K and all NMR samples were in 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.5) and 10% D_2O . A non-uniform sampling scheme and maximum entropy (MaxEnt) processing were used for obtaining triple-resonance 3D spectra. AZARA version 2.8 (Boucher W., unpublished) software package and CCPN Analysis [6] were used for processing and spectral analysis, respectively.

Results

We performed the following 3D NMR experiments: Ile/Leu-HM(CMCGBCA)NH and Val-HM(CMCBCA)NH for methyl proton correlations to amide NH group for (i) and (i+1) residues, Ile/Leu-(HM)CM(CGBCA)NH and Val-(HM)CM(CBCA)NH for methyl carbon correlations to amide NH group for (i) and (i+1) residues and 2D ^1H - ^{13}C HMQC for mapping of the methyl resonance assignments.

By employing those residue specific experiments on the methyl-selectively protonated samples, we were able to assign a large number of resonances in ^1H - ^{13}C HMQC spectrum (Figure 1). Analysis of NOE-derived distance restraints based on the backbone and side-chain methyl assignments is in progress.

References:

- [1] Heddle, J. *et al.* (2003) *JBC* **278**, p. 50322 [2] Cherrier, M. V. *et al.* (2005) *JACS* **127**, p. 10075 [3] Rajesh, S. *et al.* (2005) *JBNMR* **32** (2) p. 177 [4] Tugarinov *et al.* (2003) *JACS* **125** p. 5701 [5] Tugarinov *et al.* (2005) *ChemBioChem*. **6** (9) p. 1567 [6] Vranken, W.F. *et al.* (2005) *Proteins* **59** p. 687

P64

新規多糖類サクランのNMR構造解析

○立山誠治、市川正史、岡島麻衣子、金子達雄、大木進野
北陸先端大学院大

NMR structural analysis of novel polysaccharide, Sacran

○Seiji Tateyama, Masashi Ichikawa, Maiko Okajima, Tatsuo Kaneko and Shin-ya Ohki
Japan Advanced Institute of Science and Technology (JAIST)

The novel polysaccharide sacran extracted from *Aphanothece sacrum* has many desirable properties such as water retentivity, heavy metal adsorption and liquid crystallinity. However, the structure of sacran has not been well determined.

It was difficult to obtain the structural information using NMR due to the low solubility of sacran with high molecular weight. Therefore, the sacran was digested by using partial acidic hydrolysis with trifluoroacetic acid and enzymatic degradation, then the products were analyzed by ^1H , ^{13}C and HSQC NMR techniques. The results indicated that sacran is composed of several monosaccharide units such as rhamnose, xylose, ribose and glucose.

【緒言】

温暖化や化石燃料の枯渇といった背景のもと、バイオマスという生物由来資源の利用が注目を浴び、研究開発が盛んに行われている。

日本固有の藍藻であるスイゼンジノリから得られる多糖高分子サクラン¹⁾は、非常に高い分子量、保水性や金属吸着性、液晶性といった興味深い特徴を示し、新規な生物由来材料として注目を集めている。

しかしながら、サクランの構造はFT-MSにより一部の配列しか報告されておらず²⁾、構成単糖の種類や構造の多様性に加え、単糖間の結合様式の自由度のため構造解析が困難であり、明確な構造の解明には至っていない。新規材料を評価する上で構造解析と構造物性相関の解明は不可欠である。

そこで本研究ではGC-MSや各種NMR測定法を用いて新規多糖類であるサクランの構造解析を行い、また複雑な構造を有する多糖類の精確かつ簡便な構造解析法の検討を行った。

【実験】

サクランは1600万（静的光散乱法）の非常に大きな分子量を有し、また水を加えることにより容易にゲル状物質となるため、溶液NMR測定は困難であった。そこで化学構造解析の試料を得るため、サクランにトリフロロ酢酸、又は硫酸を加え、100℃、

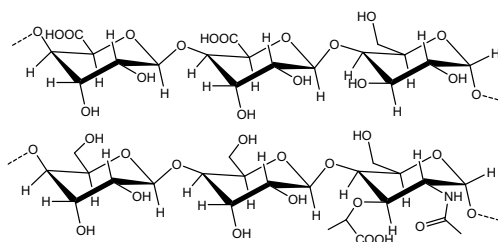


Fig. 1. Partial structures of sacran determined by FT-MS.

天然物構造解析、多糖、酵素分解

○たてやませいじ、いちかわまさし、おかじままいこ、かねこたつお、おおきしんや

90分間加熱して部分的に加水分解を行った。反応溶液を中和した後に透析（MWCO:500）により脱塩し、さらに透析を行い（MWCO:1000）、透析外液中に得られた産物の構造解析を各種NMR測定法、GC-MSを用いて行った。

またグルクロニダーゼ、セルラーゼ、ラクターゼ、ヤタラーゼ、ウェスターゼの種々の酵素を用いて酸分解物の酵素反応を行い、得られた分解物からサクランの構造を検討した。

【結果と考察】

酸分解により得られた糖の ^1H NMRスペクトルをFig.2 (a)に示す。3-4 ppm付近の複雑なピークは糖骨格の2-6位のプロトンに由来し、複数の糖の混合物では解析が困難である。それに対し、4.5-5.5 ppmは糖のアノマープロトンによる比較的シャープなピークが現れ、糖鎖還元末端側の構成糖によって特徴的なケミカルシフトを示す。そこでアノマープロトンのケミカルシフトを試薬標品の単糖と比較したところ、酸分解により得られた分解物はデオキシ糖であるラムノース(b)を主成分とし、少量のキシロース(c)とリボース(d)を含むことが確認された。1次元 ^{13}C 、HSQC、GC-MS測定においても同様の結果を示した。またSEC

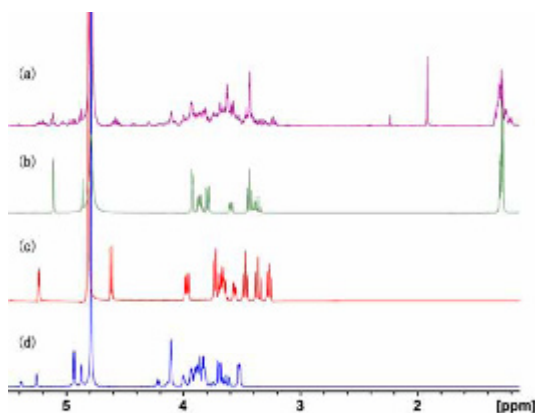


Fig. 2. ^1H NMR spectra of the products decomposed by acidic hydrolysis (a), rhamnose (b), xylose (c) and ribose (d).

(Size Exclusion Chromatography) の結果では酸分解の前後で大幅な分子量の変化はなく、酸分解により得られたこれらの単糖はサクランの分岐鎖として結合していることが示唆された。

酸分解後の透析内液にグルクロニダーゼを加えて酵素分解し、HSQC測定を行った結果、分解生成物はグルコースであることが確認された(Fig. 3)。この結果からサクラン中にはグルクロニド結合を持つグルコースの配列が存在すると考えられる。またセルラーゼ、ラクターゼ、ヤタラーゼ、ウェスターゼにおいても同様に酵素分解を行い、サクランの構造を検討した。

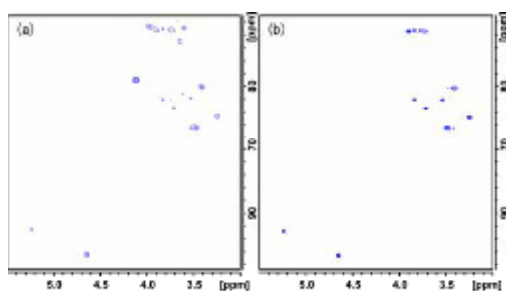


Fig. 3. HSQC spectra of the product decomposed by enzymatic degradation (a) and pure glucose (b).

【参考文献】

- 1) Okajima-Kaneko, M.; Ono, M.; Kabata, K.; Kaneko, T. *Pure Appl. Chem.* **2007**, *79*, 2039-2046.
- 2) Okajima-Kaneko, M.; Miyazato, S.; Kaneko, T. *Trans. Mater. Res. Soc. Jpn.* **2009**, *34*, 359-362.

³¹P-HOESY 法によるカナマイシン 3'-リン酸の立体構造研究○久保田 由美子¹、鶴澤 洵²、梅沢 洋二¹¹微生物化学研究所、理研基幹研²**Stereostructural study of kanamycin 3'-phosphate using ³¹P-HOESY**Yumiko Kubota¹, Jun Uzawa² and Yoji Umezawa¹¹Institute of Microbial Chemistry, Tokyo, ²Adv. Res. Inst. RIKEN

Abstract

Kanamycin, an aminoglycoside antibiotic that is produced by *Streptomyces kanamyceticus*, acts on the biosynthetic pathway of bacterial proteins. Kanamycin is a useful chemotherapeutic agent to inhibit the growth of Gram-positive and Gram-negative bacteria as well as tubercle bacilli. However, it is also known to be inactivated by its resistant bacteria. One of these resistant mechanisms is phosphorylation of the 3'-position of 6-amino-6-deoxy-D-glucose moiety of kanamycin. While the structure of inactivated product was clarified, no further detailed study on the structure has been performed. We will present the useful information on the conformation of kanamycin 3'-phosphate and others obtained by the results of HOESY (Heteronuclear Overhauser Effect Spectroscopy) method^{1,2,3} and spin-coupling constant between ³¹P and ¹H.

緒言

カナマイシン (**1**) は、放線菌 *Streptomyces kanamyceticus* が産生するアミノ配糖体抗生物質で、細菌のたんぱく質の生合成経路に作用してその遺伝情報を誤読させる。結核菌のほかグラム陽性菌、グラム陰性菌の発育を阻止する有用な化学療法剤の一つである。しかし耐性菌がつくる各種の酵素によって不活性化される。不活化の一例は、**1** の 6-Amino-6-deoxy-D-glucose の 3'位がリン酸化されることによる。研究が進み、**1** の化学的な改良が行われ、耐性菌や緑膿菌に有効である 3',4'-ジデオキシカナマイシン B (ジベカシン) が合成された。その後も多くの研究が行われている。不活化物であるカナマイシン 3'-リン酸 (**2**) (分子量 564)⁴) は、1971 年に NMR による構造解析で **1** の sulfate type の X線回折による構造⁵) と比較検討の上、INDOR (Internuclear Double Resonance) 法など当時の先端の技術を駆使して構造決定が行われた。酵素との相互作用においては、リン酸化される 6-Amino-6-deoxy-D-glucose が一番奥の位置にあると報告されている⁶)。しかし、リン酸基の配座に関する研究はあまり行われず、明確ではなかった。今回、我々は **2** について、最近の高磁場 NMR による様々な測定手法を駆使して再度、構造確認をすると共に、³¹P-HOESY 法と ³¹P-¹H 間のスピン結合定数の検討から、その配座等に関する有益な知見を得たので報告する。

立体構造, カナマイシン 3'リン酸, ³¹P-HOESY

○くぼた ゆみこ、うざわ じゅん、うめざわ ようじ

結果及び考察

Fig.1 に **1** および **2** の構造式を示す。

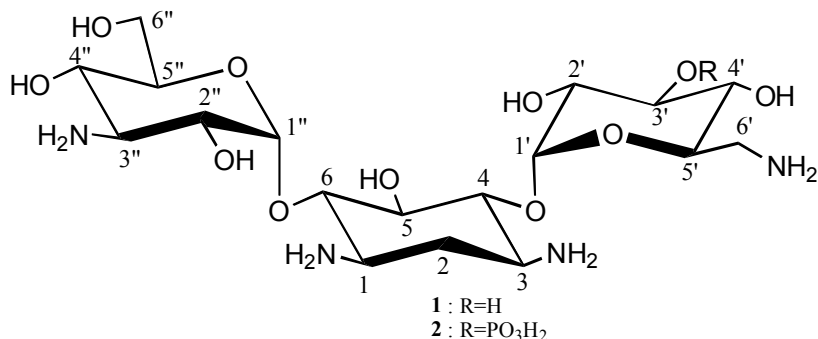


Fig. 1 Structures of kanamycin (**1**) and kanamycin 3'- phosphate (**2**)

今回、**2**を解析するにあたり、**1**も含めて、各種NMR(¹H, ¹³C, ³¹P, DQFCOSY, HSQC, HMBC, 1Dおよび2DのNOESY)を測定した。¹Hスペクトルを比較したところ、ピークの線幅が、**2**は全体的にシャープで、**1**はそれに比べて広い部分が多かった。溶液中の立体構造の解析は、¹H-¹H間のNOEによる距離情報を用いるのが一般的であるので、それぞれの一次元と二次元のNOEを比較したところ大きな違いは見られず、いずれもH-1'からH-4に、H-1''からH-6にNOEが観測された。これにより、糖間の配座はリン酸基の付いた部分以外は同じではないかと考えられる。

¹H {³¹P selective} スペクトルより、**2**は3'位プロトンのリンとのスピン結合定数が7 Hzであった。この結果により3'位プロトンとリンの立体配座は90度でなく、0度または180度に近いことが示唆された⁷⁾。

³¹P- HOESY 法で測定した結果

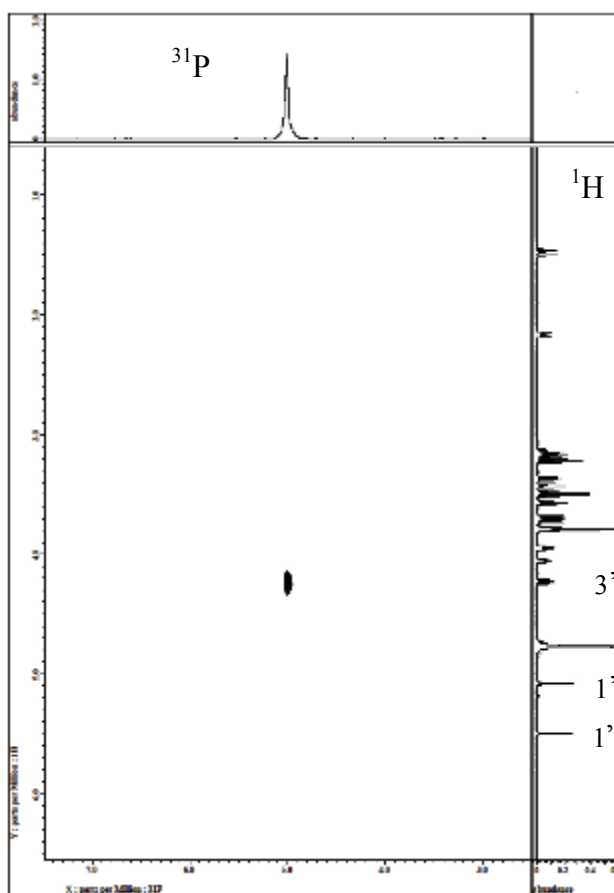


Fig.2 ³¹P- HOESY spectrum of kanamycin 3'- phosphate in D₂O.
10 mg/0.6 ml, Temp ; 25°C, Mix time ; 0.5 sec, CLM point ; 64, Acq time ; 0.2 sec, Relaxation delay ; 1.0 sec, Scan ; 512 , Total Acq. time ; 15 hr16 min

を Fig.2 に示す。リンと 3'位プロトンにのみクロスピークが見られ、3'位プロトン以外のプロトンとはクロスピークが観測されなかった。 $^3J_{HP}$ の大きさと HOESY 法の有無を Fig.3 により説明する。リン酸基のとるべき配座は a, b, c, d となり、これを実験結果と比較検討すると 3'位プロトンとリンは 0 度に近い b の配座と結論した。これらをまとめると、3-Amino-3-deoxy-D-glucose と 2-Deoxystreptamine の糖間の基本的な構造に違いは無い。

1H スペクトルの線幅が **1** の一部（主に糖の結合部位のプロトン）に広い部分があることは、結晶構造を基本にいくつかのサイトをとっており、それによりスペクトルの線幅が広がっているのではないかと思われる。**2** は、リン酸がつくことにより分子全体が固定化して早い運動しているものと考えられる。

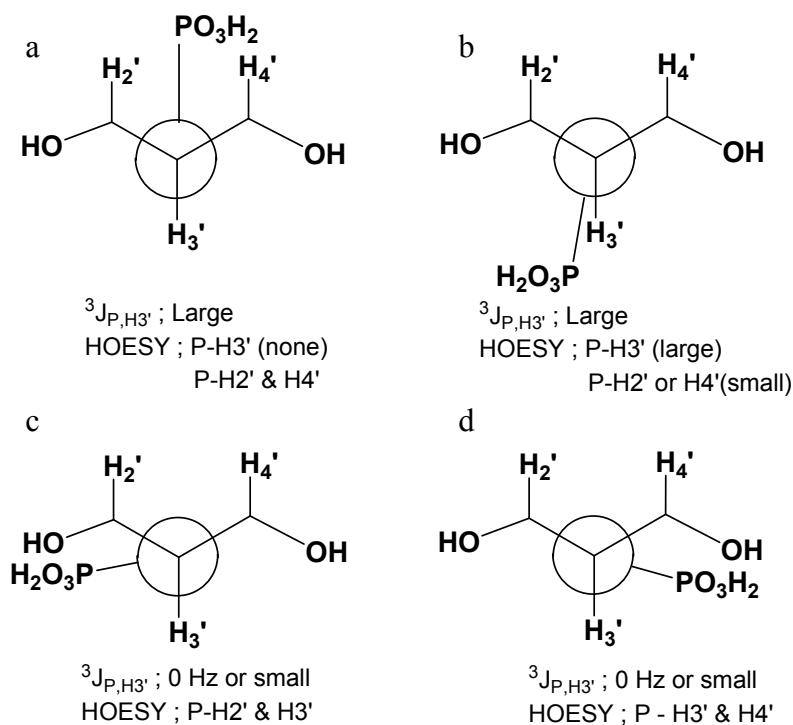


Fig.3 Relationship of torsion angle of 3'-phosphonate part, J value, amount of HOESY.

まとめ

^{31}P -HOESY 法は、感度がよくないことであまり使われていない。これは構造解析をする化合物の溶液中の運動が遅くなると、NOE 増加量が 2.2% 程度になってしまうからである⁸⁾。今回、分子量 564 のカナマイシン 3'-リン酸について、この測定法を使い、リンと 3'位プロトンにのみクロスピークを観測する結果を得た。この結果と、3'位プロトンとリンとのスピン結合定数から、カナマイシンの 6-Amino-6-deoxy-D-glucose の 3'位にリン酸基のついた構造について、立体構造に関する有益な知見が得られた。カナマイシン 3'-リン酸にヘテロ NOE があることは、分子全体の運動が早

くなっているものと思われる⁸⁾。

天然有機化合物には、リンを含む化合物も多い。構造解析においてリンに着目した測定法を有用な情報を得る手段として活用されることを期待する。

参考文献

1. P. Rinaldi, *J. Am. Chem. Soc.*, **105**, 5167 (1983).
2. C. Yu and G. C. Levy, *J. Am. Chem. Soc.*, **105**, 6994 (1983).
3. 鵜澤洵、柴田俊之、第 23 回 NMR 討論会、鳴子(1984).
4. H. Naganawa, *J. Antibiotics*, **24**, 823 (1971).
5. G. Koyama, *Tetrahedron Lett.* **9**, 1875 (1968).
6. O. Doi, *J. Antibiotics*, **22**, 273 (1969).
7. J. Thiem and B. Meyer, *Org. Magn. Reson.*, **11**, 50 (1978).
8. D. Neuhaus, “Nuclear Overhauser Effect”, *Encyclopedia of NMR*, John Wiley & Sons Ltd, **5**, 3290 (1996).

この問題を解決する方法として、如何にして隣接するメチレンプロトンを decouple し単純なスピン系にするかが重要になる。この homo decoupling 法の 2D-NMR への応用として、selective pulse を検討し、Selective J-resolved HMQC-1, -2 を開発した。

パルス系列

図 1 に Selective J-resolved-HMQC-1, -2 を示す。Selective J-resolved HMQC-1, -2 法は J-resolved HMQC-1, -2 の selective バージョンである。Pulse 系列は、HMQC を CT (constant time)-HMQC に変換し、この CT-HMQC 法と selective J-resolved 法を組み合わせる⁽²⁾⁽³⁾。Selective pulse の導入の目的は、隣接プロトンとのスピン結合の decoupling にある。Selective pulse は J 値を観測する互いのプロトンのみを励起し、他の隣接プロトンは励起しない。その結果、隣接プロトンとの J-modulation の影響が無しになり、隣接プロトンは decouple されることになる。このシグナルを J-resolved HMQC で観測する。なお、CT-HMQC 法に対して、HSQC 法を用いることは可能である。どちらの方法でもスペクトルにおいて大きな差はない。

HMQC 法の磁化は、炭素の化学シフトと、プロトン-プロトンのスピン結合で展開している。しかし、 Δt_1 は短く設定されるため、小さなスピン結合が検出できるほどには t_{1max} を展開していない。そのために、 f_1 方向では、スピンスピンカップリングを検出するは至らない。そこで、スピン結合に対しては、 t_{1max} が 300~500ms まで時間展開するようにスピン展開時間 ($\Delta 2$) に J-scaling パルス ($-nt_1/2-180(H,C)-nt_1/2-$) を導入、置き換える (図 1)。その結果、HMQC 磁化は化学シフトに対しては t_1 、プロトン-プロトンのスピン結合は nt_1 で時間展開する。そして、スピン結合定数は実際の値よりも n 倍の値として観測される。

High order spin 系について

プロトン H_A 、 H_B がそれぞれスピン結合し、その化学シフト差がスピン結合定数に等しいかあるいは小さい場合を考える (図 2)。このような場合は H_A 、 H_B の間のスピン結合は high order の関係にあり、 H_A 、 H_B のスピン結合定数を読みとることは困難となる。これに対して、 ^{13}C に結合した H_A 、 H_B との関係において、 H_A 、 H_B が 10Hz でスピン結合し、そして、 H_A と ^{13}C とは 125Hz で結合した場合を考える。図 2 に示すように、 H_A は $^1J_{CH}$ により大きく分裂し、 H_{A1} と H_{A2} に分裂する。 H_{A1} と H_B の化学シフト差は、スピン結合 J_{H_A, H_B} にたいし大きく広がるため、 H_{A1} 、 H_B との関係は、first order のスピン系になる。この ^{13}C に結合したプロトン H_{A1} を検出することにより H_A と H_B のスピン結合定数を読みとることが可能となる。しかし、multiplet に分裂した high order spin 系、例えば

$-CH_2-CH_A(OH)-CH_B(OH)-CH_2-$ のようなスピン系では、 H_A あるいは H_B のシグナルは隣接メチレン

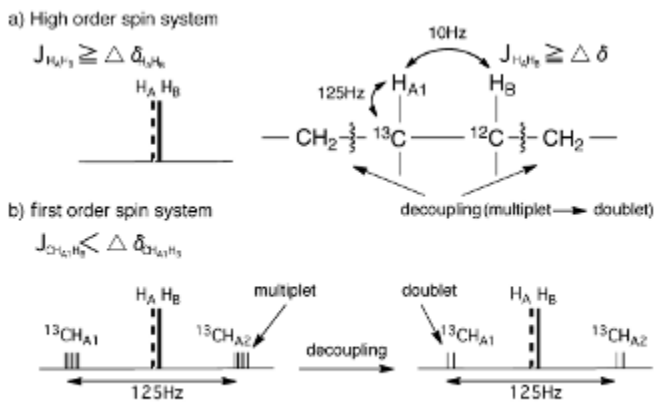


Fig.2 Measuring Proton-Proton Coupling Constants of High Order Spin Systems

ロトンと複雑に分裂するため、first order スピン結合であっても spin の解析は困難となる場合がある。この問題を解決する方法として、隣接する二つの CH_2 を decouple し、単純な AB スピン系として解析することが重要である。このようなプロトンのサテライトピークを利用した、high order のスピン系の解析法として、いくつが報告されているが、この問題の一つの解決法として、coupled mode での、Selective J-resolved-HMQC-1, -2 が有効であった。

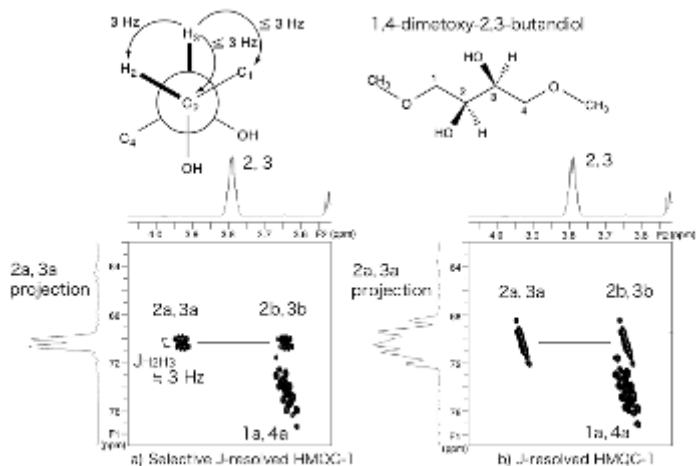


Fig.3 Selective J-resolved HMQC spectra of 1,4-dimethoxy-2,3-butanediol

J-resolved-HMQC スペクトル

図 3 は 1,4-dimethoxy-2,3-butanediol の J-resolved-HMQC-1 のスペクトルである。このスペクトルでは f_1 軸において、 J_{CH} は decoupled されている。2 位、3 位のプロトンの化学シフト (3.79ppm) は完全に一致しており、しかも、1 位、4 位のメチレンプロトンと複雑に分裂している。そのため、1D-NMR から直接 H2, H3 のスピン結合を読み取ることは出来ない。J-resolved-HMQC-1 スペクトル (図 3b) においては、 J_{CH} で二つに分裂し、プロトン-プロトンで 45 度傾斜した二つのクロスピークを観測する。しかし、クロスピークは multiplet に観測されているため、直接 H-2, H-3 の J_{HH} の値を読み取ることは困難である。

これに対して、Selective J-resolved HMQC-1 のスペクトル (図 3a) では、 f_1 軸において 1, 4 位の二つの隣接メチレンプロトンを decoupling するため、2, 3 位のクロスピークは doublet として観測される。そのクロスピークから、H2, H3 のスピン結合は 3Hz であり、その相対配位はゴーシュであることが分かる。この selective pulse の最小励起範囲は 2 位、3 位のプロトン化学シフトと J_{CH} で分裂したどちらか一方のサテライトピークの化学シフトをカバーすることが重要である。Selective pulse としてはシグナルの選択性の高い re-burp を使用した⁽⁴⁾。

抗生物質モナゾマイシンへの応用

図 4、図 5 にモナゾマイシンのオレフィン領域の selective J-resolved-HMQC-1, -2 スペクトルを示す。28, 29 位のプロトンは化学シフト値が接近しており、high order のスピン系の関係にある。この一次元 NMR スペクトルから、このプロトンの立体配置シーストランスを決めることは困難である。Selective J-resolved HMQC-1 スペクトルでは、H28, H29 は炭素の化学シフトの位置で $^1J_{\text{CH}}$ で大きく 2 本に分裂する。更に、プロトン-プロトンの J-分裂で傾斜したクロスピークを観測する。これはプロトンの 2D-J-分解のクロスピークに対応する。しかも、隣接プロトン H27, H30 が decouple されるため、H28, H29 は互いに doublet として観測される。そして、その分裂から $J_{\text{HH}}=15\text{Hz}$ を観測する。また、H12, H13 のクロスピークにおいても、 $J_{\text{HH}}=15\text{Hz}$ を観測する。その結果、H28 と H29, H12 と H13 の関

係は共にトランスの配置であることが容易に判別する。

図 5 に Selective-J-resolved HMQC-2 のスペクトルを示す。Selective J-resolved HMQC-1 ではクロスピークが f2 軸に平行に観測されるのに対して、Selective J-resolved HMQC-2 では、 J_{CH} で分裂したクロスピークは 45 度傾斜して観測される。Selective J-resolved HMQC-1 において、クロスピークが重なり解析が困難になる場合は、Selective J-resolved HMQC-2 のように、f1 軸にクロスピークを分散させることは重要である。

通常 HMQC 法では、 t_{lmax} が 20msec 位であるのに対して Selective J-resolved-HMQC 法では、観測するスピン結合定数の大きさに応じて、 nt_{lmax} を 333msec(3Hz) から 500msec(2Hz) ぐらいまで時間展開しなければならない。そのため、通常の HMQC 法に比べて、スペクトルの S/N が低下する。実際の測定に当たっては、この S/N の低下を考慮して積算時間を設定することが重要である。

まとめ

天然有機化合物の立体化学の研究においては、個々のプロトンのスピン結合定数を検出することが重要である。このプロトン-プロトンの解析には homo-decoupling 法は欠かせない方法である。しかし、2D-NMR 法ではこの homo-decoupling 法を導入しての測定は困難である。この homo-decoupling 法に代わる方法として、selective pulse を導入することが重要になる。Selective J-resolved HMQC 法は high order spin 系の解析するとき、隣接プロトンを decoupling し、複雑なクロスピークを単純化し解析を容易にすることができる有効な方法であることが判明した。

- 1). K. Furihata and H. Seto: *Tetrahedron Lett.* 42 (2001) 899-903
- 2). K. Furihata and H. Seto: *Tetrahedron.* 39 (1998) 7337-7340
- 3). K. Furihata, M. Tashiro and H. Seto: *Magn. Reson. Chem.* 47 (2009) 814-818
- 4). H. Green, R. Freeman, *J. Magn. Reson.* 93,93(1991).

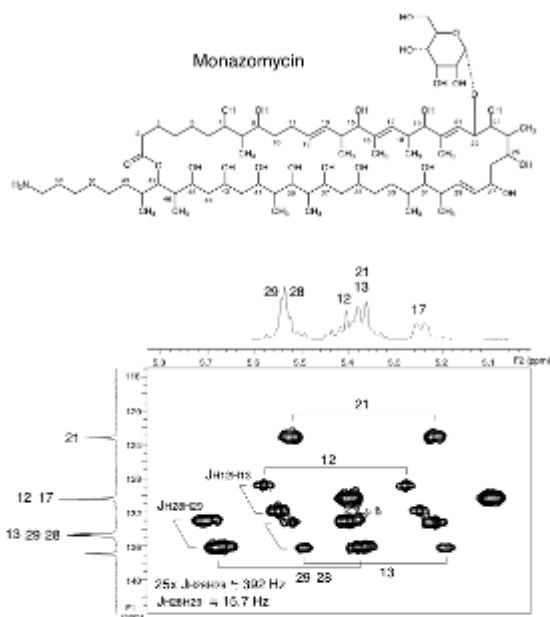


Fig.4 Selective J-resolved HMQC-1 of Monazomycin

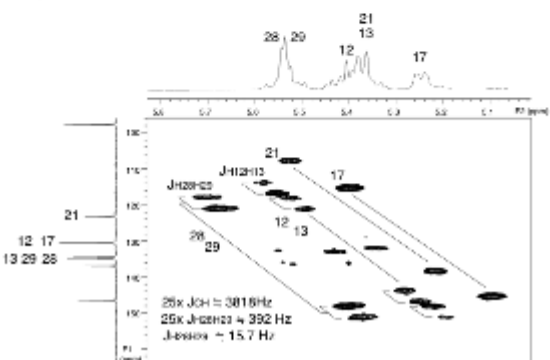


Fig.5 Selective J-resolved HMQC-2 of Monazomycin

P67

超高速MASのもとでの ^1H - ^{14}N 2次元固体NMR :

1 μL 以下の微量試料を数分で測定

○西山裕介¹、遠藤由宇生¹、根本貴宏¹、黒子弘道²、内海博明¹、山内一夫^{3*}、樋岡克哉¹、朝倉哲郎³

¹日本電子、²奈良女子大、³農工大院工

^1H - ^{14}N 2D solid-state NMR under very fast MAS:

A few minutes observation for a sample less than 1 μL

○Yusuke Nishiyama¹, Yuki Endo¹, Takahiro Nemoto¹, Hiromichi Kurosu², Hiroaki Utsumi¹, Kazuo Yamauchi³, Katsuya Hioka¹, and Tetsuo Asakura³

¹JEOL Ltd., 3-1-2 Musashino, Akishima, Tokyo 196-8558, Japan

²Department of Clothing Environmental Science, Nara Women's University, Nara 630-8506, Japan

³Department of Biotechnology, Tokyo University of Agriculture and Technology, Tokyo 184-8588, Japan

Sensitivity and resolution enhancement of ^1H detected ^{14}N HMQC NMR in the solid state at very fast MAS rates with a 1 mm MAS rotor is presented. Very fast MAS enhances the ^1H T_2' and efficiently decouples ^1H - ^{14}N interactions. The Micro-coil contributes to sensitivity enhancement via strong ^{14}N rf fields and high sensitivity per unit volume. ^1H - ^{14}N HMQC spectrum of glycine and glycyl-L-alanine at 70 kHz MAS are observed within few minutes for a sample volume of 0.8 μL .

窒素には ^{14}N と ^{15}N の2種類の安定同位体があり、どちらもNMRで測定可能な核種である。 ^{14}N は窒素原子の99.63%をしめ高い天然存在比を持つが、従来は観測が困難だと考えられてきた。これはスピン数が $I=1$ であり、固体NMRにおいては全てのsingle quantum(SQ)遷移が一次の四極子相互作用により数MHzのオーダーでブロードニングするためであり、溶液NMRにおいては四極子緩和のためにブロードニングするためである。近年、BodenhausenのグループおよびGanにより独立に固体 ^{14}N NMR測定が提案された[1]。この測定においては、 ^{14}N に隣接するスピン1/2核を用いてHMQCにより間接的に ^{14}N NMRスペクトルを観測する。本報告では、超高速試料回転による高感度・高分解能 ^1H 観測 $^1\text{H}/^{14}\text{N}$ 2次元相関固体NMR法を発表する[2]。

われわれは80 kHzの超高速MASを実現する1 mm MASシステムを開発した[3]。このような小径の試料管・信号検出コイルを用いたMASシステムには $^1\text{H}/^{14}\text{N}$ HMQCスペクトルを測定する上でさまざまな利点がある。1) ^1H の T_2' 緩和時間が長くなる。これは直接次元(^1H)および間接次元(^{14}N)双方の感度と分解能向上につながる。2) MASに同期した信号観測を行う次元のスペクトル幅が広がる。3) 単位体積あたりの感度が高くなる。4) ^{14}N への強いrf磁場照射は、効率よい信号励起を実現する。5) $^1\text{H}/^{14}\text{N}$ の間の異種核間双極子相互作用を効率よく消去することができ、分解能の向上につながる。

窒素14、1 mm MAS、固体NMR

○にしやま ゆうすけ、えんどう ゆうき、ねもと たかひろ、くろす ひろみち、うつみ ひろあき、やまうち かずお、ひおか かつや、あさくら てつお

図に70 kHzの超高速試料回転のもとで観測したグリシル-L-アラニンの $^1\text{H}/^{14}\text{N}$ HMQCスペクトルを示す。測定に要した時間は2分である。試料体積は0.8 μL である。このように超高速回転を用いることにより、微量試料の高速測定が実現した。

^{14}N NMRは同位体ラベルを必要とせず、 ^{14}N の四極子結合定数を通じて窒素の構造情報を得ることができる。当日はペプチドや絹をはじめとする生体試料への応用および量子化学計算と ^{14}N NMRの組み合わせを発表する。

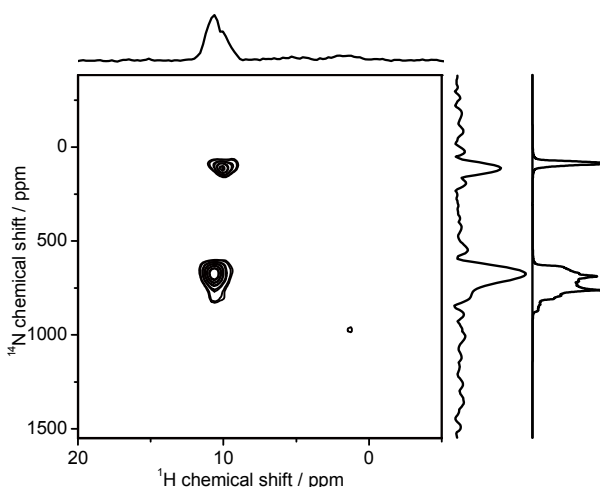


Figure ^1H detected ^{14}N HMQC spectrum of glycyl-L-alanine under 70 kHz MAS. SQ coherences were selected in the ^{14}N dimension. The spectrum was observed by JEOL JNM-ECA500 spectrometer operated under 11.7 T equipped with JEOL 1 mm CPMAS probe. Sixteen Hundred-twenty-eight t_1 points were observed. Two scans were performed per each t_1 point with a relaxation time of 2 s. This is the smallest number of scans required to select the ^{14}N SQ coherences. SR4 2_1 [4] was

applied during magnetization transfer period to recouple ^1H - ^{14}N dipolar interactions. Projections on the ^1H and ^{14}N dimensions and calculated slices are shown. Calculated spectra was obtained using previously reported values [5].

参考文献：

1. S. Cavadini, A. Lupulescu, S. Antonijevic, G. Bodenhausen, *J. Am. Chem. Soc.* 128 (2006) 7706-7707; Z. Gan, *J. Am. Chem. Soc.* 128 (2006) 6040-6041; S. Cavadini, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spec.* 56 (2010) 46-77.
2. Y. Endo, Y. Nishiyama, K. Yamauchi, K. Hioka, and T. Asakura, 51th ENC (2010).
3. Y. Nishiyama, Y. Endo, T. Nemoto, H. Utsumi, K. Yamauchi, K. Hioka, T. Asakura, submitted.
4. A. Brinkmann and A.P.M. Kentgens, *J. Am. Chem. Soc.* 128 (2006) 14758-14759.
5. D.T. Edmonds and P.A. Speight, *Phys. Lett.* 34A (1971) 325-326.

謝辞：本開発は(独)科学技術振興機構による産学イノベーション加速事業【先端計測分析技術・機器開発】の支援を得て行われております。

* present address: King Abdullah University of Science and Technology, Thuwal, Saudi Arabia

重水素デカップリングによる triplet-DNP 下における プロトンスピン拡散の促進

○根来 誠¹、中山 顕貴¹、立石 健一郎¹、香川 晃徳¹、
武田 和行²、北川 勝浩¹ (¹ 阪大院基、² 京大院理)

²H-decoupling-accelerated ¹H spin diffusion in triplet-DNP

○ Makoto Negoro¹, Kenki Nakayama¹, Kenichiro Tateishi¹, Akinori Kagawa¹,
Kazuyuki Takeda², and Masahiro Kitagawa¹
Graduate School of Engineering Science, Osaka University
Graduate School of Science, Kyoto University

Abstract: In Dynamic Nuclear Polarization (DNP) experiments applied to organic solids, efficient buildup of ¹H polarization is attained by partially deuterating host material with appropriate ¹H concentration. In such a dilute ¹H spin system, it is shown that the ¹H spin diffusion rate and thereby the buildup efficiency of ¹H polarization can further be enhanced by continually applying radiofrequency irradiation for deuterium decoupling during the DNP process. The ¹H spin diffusion coefficients are estimated from DNP repetition interval dependence of the initial buildup rate of ¹H polarization, and the result indicates that the spin diffusion coefficient is enhanced by a factor of 2 compared to that without ²H decoupling.

動的核偏極 (DNP) は電子スピン偏極を核スピンの高偏極状態を得る方法で、NMR 分光の感度を最大で γ_e/γ_n 倍向上させることが可能であり (γ_n : 対象核スピンの磁気回転比、 γ_e : 電子スピンの磁気回転比)、最近非常に活発に研究がすすめられている [1]。我々が研究している「光励起三重項電子スピンを用いた動的核偏極 (triplet-DNP)」では、この γ_e/γ_n の限界を超えた感度向上が可能で [2, 3]、これまでナフタレン単結晶中の ¹H スピンの信号感度を、105 K、0.3 T 下の熱平衡状態に比べて、約 21 万倍向上させることに成功している [4]。多くの DNP 実験ではサンプルに少量ドーブしたゲスト分子 (フリーラジカルや光励起分子) の電子スピン偏極がまずゲスト分子内の ¹H スピンに移され、その局在化した ¹H スピン偏極が「スピン拡散」によってホスト分子の ¹H スピン、そして興味の対象となる分子の ¹H スピンへと広がっていくと考えられている。対象物質の濃度が低い場合に、ホスト物質を部分的に重水素化することは、triplet-DNP だけでなくフリーラジカルを用いた従来の DNP でも、偏極の向上速度の効率化に有効であることが示されている [5, 6]。このときの ²H 化率が高すぎると ¹H スピン間の距離が遠くなりすぎ、¹H スピン拡散が起こりにくくなってしまうので、この ²H

Key Word: triplet-DNP, spin diffusion, ²D DQ decoupling

ねごろまこと、なかやまけんき、たていしけんいちろう、かがわあきのり、たけだかずゆき、きたがわまさひろ

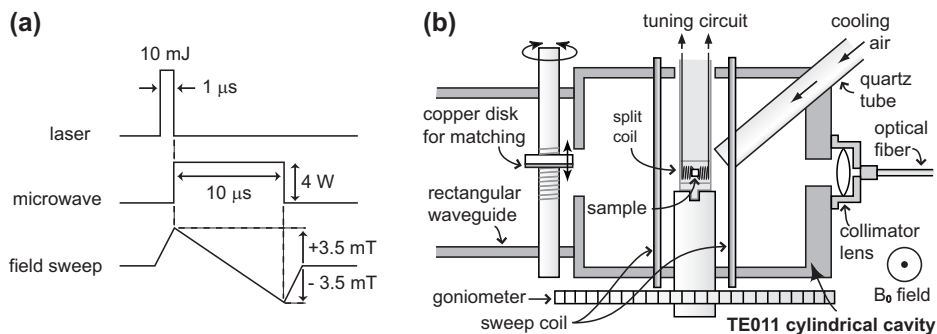


図 1: (a) An ISE sequence. (b) A schematic diagram of a TE011 cylindrical cavity ($Q=430$) with a field sweep coil and a split-type rf coil doubly-tuned at ^1H ($Q=12$) and ^2H spins ($Q=2.7$). Cooling air was blown at the sample and the coil in order to prevent heating due to continual decoupling irradiation.

化率には最適値が存在することが実験的に示されている [7]。また、 ^2H - ^1H 間双極子相互作用がスピン拡散の原動力となる ^1H - ^1H 間のフリップフロップ過程を平均化することは、 ^1H スピン拡散をさらに起こりにくくさせていると考えられる。本研究では ^2H 化サンプルにおいて、triplet-DNP の最中に連続的に ^2H デカップリングを施すことで ^1H スピン拡散が促進され、DNP の効率が向上されることを実験的に示す [8]。

サンプルには 0.05 mol% ペンタセンドープ 98.3% ^2H 化 *p*-テルフェニル単結晶 0.40 mg が用いられ、全ての実験は 0.4 T の磁場下、室温下で行われた。三重項電子の偏極を核スピンの伝えるための方法として図 1(a) に示す ISE(Integrated Solid Effect) と呼ばれるシーケンスを用いた [9]。光励起、マイクロ波照射、 ^2H デカップリング照射を同じサンプル位置で実現するための実験系を図 1(b) に示す。ここで用いられる rf コイルは内径 1mm で三層構造に 30 回巻かれたもので、 ^2H スピンの共鳴周波数において 1.2 W の入力で約 3 mT の振動磁場照射が可能である。このときの ^2H の Rabi 周波数は約 20 kHz である。

図 2(a) に、ISE を一回だけ行った後 100 μs 待って測られたマジックエコー信号を示す。この信号の線幅は ^1H 希釈領域の ^1H スピンの NMR 信号より広幅で、 ^1H - ^1H 同核双極子相互作用が線形を支配している ^1H リッチな領域からの信号、すなわち、ペンタセン内の ^1H からの信号であると思われる。ISE からの待ち時間を長くしていくと、このマジックエコー信号の強度は減っていき、逆にスピンエコー信号で観測される尖鋭な信号は図 2(b) に示すように徐々に増えていく。この尖鋭な信号は希釈領域の ^1H スピンからの NMR 信号、すなわち、 ^2H 化 *p*-テルフェニルの残留 ^1H からの NMR 信号と思われる。このようなスペクトル形状の変遷は、「DNP でゲスト分子内の ^1H スピンがまず偏極され、その局在化された偏極がホスト分子へと徐々にスピン拡散している」とされる描象が正しいことを示唆している。そして、このスピンエコー信号の待ち時間依存性は ^1H スピン拡散の早さを表わしていると考えられる。待ち時間に ^2H デカップリング照射を行ったときと行っていないときのその待ち時間依存性を図 2(c) に示す。この結果より ^2H デカップリングによって確かに ^1H スピン拡散が促進されていることが示された。

図 3 に ^2H デカップリングを行いながら 20 ms のインターバルで ISE を繰り返した場合とデカップリングなしの場合での ^1H 偏極向上の様子を示す。デカップリングを行った方

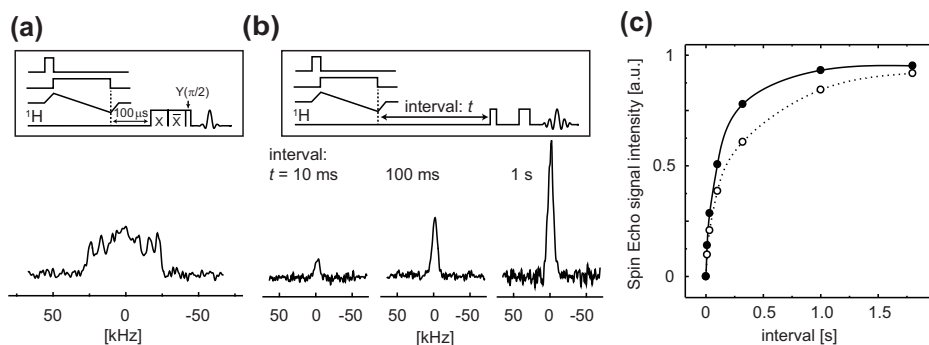


図 2: (a) ^1H NMR spectrum obtained with a magic echo sequence after a single-shot ISE sequence. (b) ^1H spectra obtained with a spin echo sequence after the single-shot ISE sequence. (c) The spin echo signal intensities for various intervals between the ISE sequence and the start of the spin echo sequence with (the filled circles and solid line) and without (the open circles and dotted line) ^2H decoupling.

がスピン拡散が促進され偏極向上曲線の傾きが大きいの。しかしながら、デカップリング照射のときの最終到達偏極率は照射なしのときに比べ低い。図 3 に、50 kHz オフレゾナンスの照射下での偏極向上の様子を示す。この照射下ではデカップリングが起きず、スピン拡散は促進されないの、照射なしのときと同じ傾きであった。最終到達偏極率はオンレゾナンス照射のときと同じであった。これらの結果より最終到達偏極率の減少は照射熱による影響と考えてよさそうで、照射熱によってサンプル温度が上昇し、スピン格子緩和が促進され最終到達偏極率が減少したものと考えている。熱をより効率的に除去できれば、最終到達偏極率は向上できると思われるが、これは今後の課題とする。

DNP 下での ^2H デカップリングのスピン拡散への効果をよりはっきり見極めるために、文献 [3, 7] で紹介されているシミュレーションとの比較によるスピン拡散係数の決定を行った。図 4 にそのシミュレーションにより求まる偏極向上曲線の初期傾きとインターバル時間とスピン拡散係数の関係を表わす等高線図が描れてる。そして、実験で得られたさまざまなインターバルでの偏極向上曲線の初期傾きも図 4 に示した。これらを比較することで、インターバル中に ^2H デカップリングを行ったときと行わないときでのスピン拡散係数は $\sim 2.0 \times 10^{-18}$ 、 $\sim 1.0 \times 10^{-18} \text{ m}^2/\text{s}$ と求められた。よって ^2H デカップリングによって DNP 中のスピン拡散係数が約 2 倍向上したことが分かった。

本研究ではペンタセンドープ 98.3% ^2H 化 *p*-テルフェニル単結晶において ^2H デカップリング下で triplet-DNP を行うことでスピン拡散が促進され、偏極の向上が加速されることが実験的に示された [8]。この方法は triplet-DNP だけでなく、 ^2H 化溶媒にフリーラジカルをドープする従来の DNP [6] にも当然適応可能である。本研究では部分的 ^2H 化サンプル下の ^1H スピン系に集中して議論してきたが、この「rf 照射によってスピン拡散を促進する」というコンセプトは様々なケースに応用できる。例えば、有機分子固体における ^{13}C や ^{15}N の感度向上を DNP で行うケースである。これらの核種は直接偏極させる方法 ($e^- \rightarrow ^{13}\text{C}$, ^{15}N) と間接的に偏極させる方法 ($e^- \rightarrow ^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$, ^{15}N) があり、前者の方がより効率的な場合もあることが報告されている [10]。しかしながら、これらの核ス

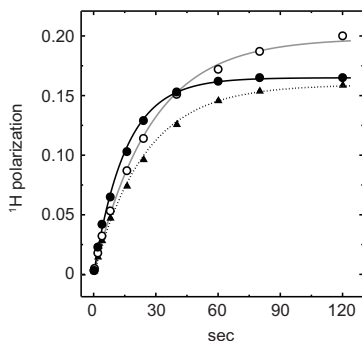


図 3: Buildup curves of ^1H polarization by repeating ISE with an interval of 20 ms without ^2H decoupling irradiation (open circles), with on-resonance ^2H decoupling irradiation (filled circles), and off-resonance (+50 kHz) ^2H decoupling irradiation (filled triangles).

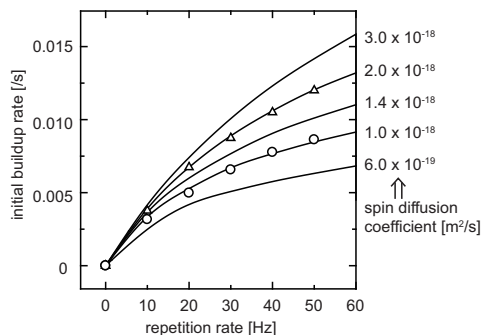


図 4: The initial buildup rate at various repetition rates obtained with (triangles) and without (circles) ^2H decoupling. Simulated data with various spin diffusion coefficients is also plotted (solid lines).

ピンは低核磁気回転比で低濃度な上に、まわりの ^1H スピンからの双極子相互作用の影響で ^{13}C 、 ^{15}N スピン拡散は非常に起こりにくくなっている。このような状況では、 ^1H デカップリングがこの妨げを排除し、 ^{13}C 、 ^{15}N スピンの偏極向上の速度は向上可能であろう。また、MAS 下におけるこのスピン系での ^{13}C 、 ^{15}N スピン拡散は絶望的に平均化されている。この状況下での DARR 照射はこれらを復活させ [11]、やはり ^{13}C 、 ^{15}N スピンの偏極向上速度の飛躍的向上を導くだろう。

本研究は CREST JST、科研費(新学術領域)、最先端研究開発支援プログラムの援助を受けて行われた。また、著者の根来誠と立石健一郎は G-COE の援助を受けている。

References

- [1] T. Maly, *et al.*, *J. Chem. Phys.* **128**, 052211 (2008).
- [2] D. Stehlik and H. M. Vieth, in *Pulsed Magnetic Resonance NMR, ESR and Optics*, (Oxford University Press, 1992) pp. 446-477.
- [3] K. Takeda, *Triplet State Dynamic Nuclear Polarization*, (VDM Verlag, 2009).
- [4] K. Takeda, K. Takegoshi and T. Terao, *J. Phys. Soc. Japan* **73**, 2313 (2004).
- [5] K. Takeda, K. Takegoshi and T. Terao, *J. Phys. Soc. Japan* **73**, 2319 (2004).
- [6] C. Song, *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 11385 (2006).
- [7] A. Kagawa, Y. Murokawa, K. Takeda, and M. Kitagawa, *J. Magn. Reson.* **197**, 9 (2009).
- [8] M. Negoro, K. Nakayama, K. Tateishi, A. Kagawa, K. Takeda, and M. Kitagawa, “ ^2H -decoupling-accelerated ^1H spin diffusion in dynamic nuclear polarization with photo-excited triplet electrons” to be appeared in *J. Chem. Phys.*
- [9] A. Henstra, T.-S. Lin, J. Schmidt and W. Wenckebach, *Chem. Phys. Lett.* **165**, 6 (1990).
- [10] T. Maly, A.-F. Miller, and R. G. Griffin, *Chem. Phys. Chem.* **11**, 999 (2010).
- [11] K. Takegoshi, S. Nakamura, and T. Terao, *Chem. Phys. Lett.* **344**, 631 (2001).

1. 03GHz 高温超伝導NMRシステムの開発 ～固体プローブの開発～

○海老澤佑輔¹, 肥後聡明¹, 細野 政美², 長谷隆司³, 宮崎隆好³,
藤戸輝昭⁴, 山田和彦⁵, 木吉司⁶, 高橋雅人^{1,7}, 山崎俊夫⁷, 前田秀明^{1,7}
¹横浜市立大学, ²日本電子, ³神戸製鋼所, ⁴プローブ工房, ⁵東京工業大学,
⁶物質・材料研究機構, ⁷理化学研究所SSBC

Towards a high temperature superconducting (HTS) NMR spectrometer operated at 1.03GHz

–development of a 1.03GHz solid state NMR probe -

○Yusuke Ebisawa¹, Toshiaki Higo¹, Masami Hosono², Takashi Hase³,
Takayoshi Miyazaki³, Teruaki Fujito⁴, Kazuhiko Yamada⁵, Tsukasa Kiyoshi⁶,
Masato Takahashi^{1,7}, Toshio Yamazaki⁷, Hideaki Maeda^{1,7}
¹Yokohama City Univ., ²JEOL Ltd., ³Kobe Steel, Ltd., ⁴Probe Laboratory Inc.,
⁵Tokyo Institute of Technology, ⁶NIMS, ⁷RIKEN SSBC

Achieving a higher magnetic field is important for higher sensitivity, better resolution and for solid state NMR. However, conventional low temperature superconductors (LTS) magnets are incapable of generating beyond 1GHz (23.5T). This project replaces the innermost LTS coil of the 920 MHz NMR with an HTS coil for operation beyond 1GHz⁽¹⁾. Unfortunately, the HTS coil is incapable of persistent mode operation; and therefore an external current mode by a power supply is required for the HTS, which causes current ripples resulting in modulated spectra. In this paper, we have developed an external field-frequency lock system, continuously stabilizing such magnetic field fluctuation as the Z^0 and Z^1 components; then we acquired excellent 2D spectra of amino acid (L-isoleucine) with external lock operation at 500MHz.

Based on this result, we started to develop a 1.03GHz solid state ^{13}C - ^1H NMR probe which installed the external lock system. Solid state NMR measurement will be made in 2011.

1, 緒言

固体NMRでは、NMRの高磁場化が有効である。我々は、高温超伝導を用いた超1GHz (1.03GHz) NMRシステムの開発を開始した。⁽¹⁾ 装置は溶液NMRと固体NMRに適用できる。第1段階として高温超伝導 (HTS) と低温超伝導 (LTS) を組み合わせたHTS/LTS 500MHz NMRシステムを開発し、固体NMR測定を実施した。高温超伝導は永久電流モードで使用できないため、外部電源から通電モードで運転する。この場合、高温超伝導線の磁化 ($10^{-6}\sim 10^{-8}$) や外部電源の電流変化 (10^{-6}) による磁場変動を受ける。我々は、マイクロコイルNMRを用いた外部ロックシステムによる磁場安定化により、生体試料 (L-isoleucine) について良好な多次元スペクトルを得た。更にこれに基づき、1.03GHz NMRの固体プローブの開発を開始した。ここでは、第2節で500MHzの結果を、第3節で1.03GHz プローブの開発を報告する。

キーワード: 高磁場NMR, 磁場安定化, 外部ロック

○えびさわゆうすけ, ひごとしあき, ほそのまさみ, はせたかし, みやざきたかよし, ふじとてるあき,
やまだかずひこ, きよいつかさ, たかはしまさと, やまざきとしお, まえだひであき

2, HTS/LTS 500MHz NMR による多次元 NMR スペクトル

2-1 実験方法

固体 NMR 用の外部ロックシステムの構成を Fig.1 に示す.

Z^0, Z^1 成分を検知するために, ^{13}C - ^1H 固体プローブの MAS ハウジングの上下に、微小な ^7Li 溶液マイクロコイルを設置し、両方のマイクロコイルの FID 信号を周波数カウンタで交互に測定した. 得られた周波数から、プローブ内に設置した Z^0, Z^1 磁場補正コイルに流す電流を PC で算出し、フィードバック制御することにより Z^0, Z^1 方向の磁場を安定化することができる. 我々は既に、アダマンタン粉末 ($\text{C}^{10}\text{H}^{16}$) をサンプルに用いた長時間の外部ロック線形試験で、磁場変動を $0.04\text{ppm}/25\text{h}$ に抑制できることを報告した. 今回は ^{15}N ^{13}C でラベル化された L-isoleucine の粉末の ^{13}C スペクトル (1scan) を 1 分毎に計測し、外部ロックによる長時間の磁場安定化効果を評価した. 磁石は最内層コイルを HTS コイルに置き換えた HTS/LTS 500MHz NMR を使用し、MAS の回転数 14kHz , TPPM (Two Pulse Phase Modulation) デカップリングで NMR 計測を行った. 次に、外部ロックシステムを用いてラベル化された L-isoleucine の 2 次元 NMR 計測 (^{13}C - ^{13}C NOESY) を行い、永久電流モードの LTS 500MHz NMR で計測したスペクトルと比較した.

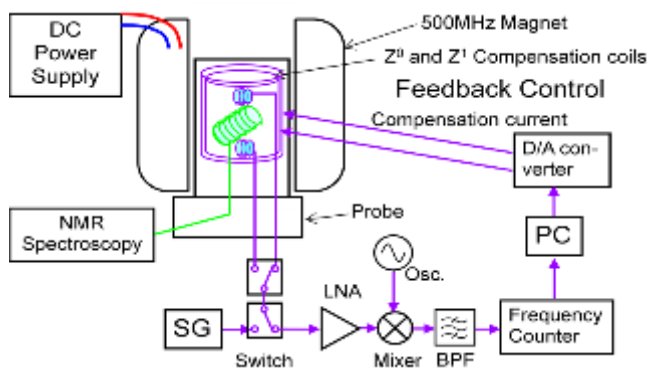


Fig.1 A magnetic field stabilization system using two NMR microcoils and a frequency counter for Z^0 and Z^1 magnetic field compensation. This system is worked as an external lock system for solid state NMR using an external current mode NMR magnet.

2-2 実験結果と考察

(1) 高温超伝導 500MHz による長時間外部ロック試験: L-isoleucine について、NMR スペクトル周波数と線形の安定度を Fig.2 に示す. それぞれ 15 時間にわたり連続して単発のスペクトルを計測した. Fig.2 [a] は外部ロックをかけない場合で、ピーク周波数の磁場変動は $1.2\text{ppm}/15\text{h}$ ($\approx 10^{-7}/\text{h}$) と、これは必要な磁場安定度を満たさない. 一方、[b] 外部ロックをかけた場合のピーク周波数の磁場変動は、 $0.24\text{ppm}/21\text{h}$ ($\approx 10^{-8}/\text{h}$) である. これは永久電流モードの LTS 磁石 ($10^{-8}/\text{h}$) と同程度の安定度⁽²⁾ であり、高温超伝導 NMR での外部ロッ

クは有用であることが実証された。これは、生体試料を用いた長時間の多次元 NMR 計測に十分適用できる安定度である。

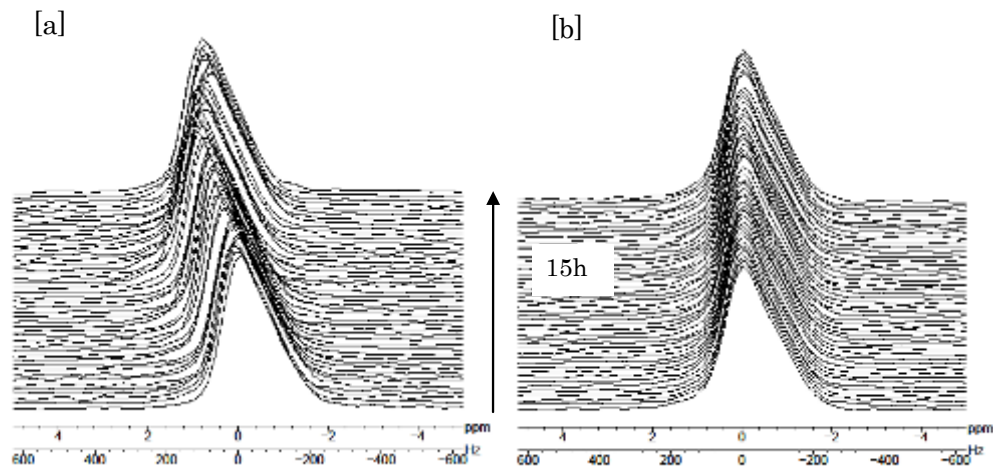


Fig.2 A stacked plot of solid-state ^{13}C NMR for L-isoleucine measured in the external current mode. [a] The spectrum was achieved without an external lock operation. [b] The spectrum was achieved with an external lock. External lock continuously stabilized the magnetic field.

(2) 2D-NMR 計測: 通電モードの HTS/LTS 500MHz NMR で L-isoleucine の 2D-NMR 計測 (^{13}C - ^{13}C NOESY) を行った。永久電流モードの LTS 磁石で測定したスペクトル[a] と外部ロックをかけて測定したスペクトル[b] を Fig. 3 に示す。HTS/LTS で測定した場合のスペクトル(Fig. 3 [b])は、磁場が時間的に不安定な場合に生じる T_1 ノイズはなく、磁場変動を抑えることができている。これは、Fig. 3 [a]の永久電流モードの LTS 500MHz NMR で測定したスペクトルと同等な品質のスペクトルである。以上の結果から、HTS/LTS NMR 磁石を用いても、タンパク質構造解析に用いる 2次元固体 NMR 計測が十分可能であることを実証した。

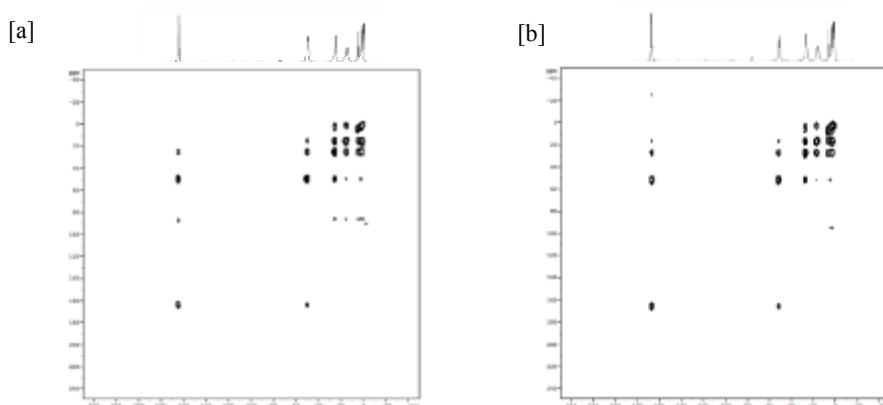


Fig.3 A 2D- ^{13}C - ^{13}C NOESY spectra of uniformly ^{13}C and ^{15}N labeled L-isoleucine (0.03mg). Both spectra were acquired at a spinning speed of 14kHz, and the measuring time was 34min.

[a] In the case of LTS magnet at ^{13}C NMR frequency of 125.7MHz. [b] In the case of HTS/LTS magnet with external lock.

3, HTS/LTS 1.03GHz NMR 用 (^{13}C - ^1H) 固体プローブの開発

高温超伝導 1.03GHz NMR は、現在 物質・材料研究機構に設置中である。

我々は HTS/LTS 500MHz NMR 実験の経験から、 Z^1 成分磁場を常時補正できる外部ロックシステムを搭載した 1.03GHz (^{13}C - ^1H) 固体プローブを開発した。前記の方法に基づいて、MAS ハウジング上下に外部ロック用の ^7Li 溶液マイクロコイル NMR を装着し、併せて Z^1 磁場補正用の補正コイルの製作を行った。マイクロコイル NMR をプローブの上下に設置した図を Fig. 4[a] に示す。[b] は下側のマイクロコイル、[c] は上側のマイクロコイルの図である。サンプル管 [d] は外径 2.5mm を使用し、MAS 回転数は最大 30kHz である。

HTS/LTS 1.03GHz NMR 磁石励磁後、2011 年に NMR 計測を開始する予定である。

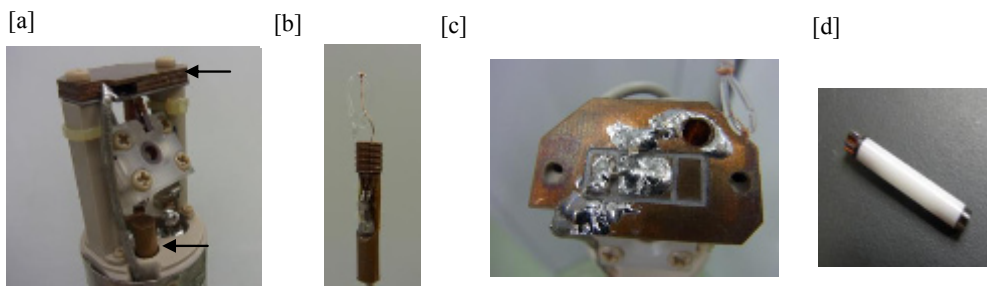


Fig.4 [a] Microcoils are set in the upper and lower side of a MAS. [b] Microcoil in the lower side. ; [c] Microcoil in the upper side. ; [d] 2.5mm of sample tube.

[参考文献]

- (1) T.kiyoshi, A.Otsuka, S.Matsumoto, K.Zaitzu, T.Hase, M.Hamada, M.Hosono, M.Takahashi, T.Yamazaki, H.Maeda; IEEE Transaction on Applied Superconductivity, 18 (2008) 860-863.
- (2) Y.Yanagisawa, H.Nakagome, M.Hosono, M.Hamada, T.Kiyoshi, F.Hobo, M.Takahashi, T.Yamazaki, and H.maeda; Towards beyond-1GHz solution NMR: internal 2H lock operation in external current mode, J.Mag.Res.192, 2008, 329-337.

本開発は、(独) 科学技術振興機構の産学イノベーション加速事業【先端計測分析技術・機器開発】による成果である。

固体NMRによるアナベナセンサリロードプシンの構造解析

○ 川村 出¹, Lichi Shi², Kwang-Hwang Jung³, Leonid Brown²,
Vladimir Ladizhansky²

¹横浜国立大学 大学院工学研究院

²ゲエルフ大学、³ソガン大学

Solid-state NMR structural study of *Anabaena* Sensory Rhodopsin

○ Izuru Kawamura¹, Lichi Shi², Kwang-Hwang Jung³, Leonid S. Brown²,
Vladimir Ladizhansky²

¹Faculty of Engineering, Yokohama National University, Yokohama, Japan.

²Department of Physics and Biophysics Interdepartmental Group,
University of Guelph, Ontario, Canada.

³Department of Life Science and Interdisciplinary Program of Integrated Biotechnology,
Sogang University, Seoul, Korea

Anabaena sensory rhodopsin (ASR) is a retinal-binding seven-helical transmembrane protein discovered in a photosynthetic cyanobacterium, *Anabaena*. Here, we show 3D chemical shift correlation and H/D exchange measurement on U-¹³C, U-¹⁵N labeled ASR sample in the native-like lipid environment by solid-state NMR. We report backbone and side chain assignments for the transmembrane and the loop regions, analysis of secondary structure, protonation states and hydrogen-bonding strength of many polar amino acid residues. H/D exchange pattern strongly suggests that ASR is located asymmetrically relative to the lipid bilayer, with the cytoplasmic part being more exposed to the solvent.

[序論]

アナベナセンサリロードプシン(*Anabaena* Sensory Rhodopsin: ASR)は真正細菌のシアノバクテリア中で発見されたレチナールを発色団にもつ7本膜貫通型タンパク質であり、光合成のための光捕集系タンパク質の発現制御に関与する光センサーと考えられている。その機能発現を理解するためには、レチナール光異性化によるタンパク質の構造変化や可溶性のトランスデューサータンパク質との相互作用などを調べる必要がある。また、これまでにGuelph大学の研究グループは、現時点で結晶構造が解かれていない海洋性細菌由来のプロテオロドプシン(PR)に対して多次元固体NMR測定を適用し、化学シフトの帰属をもとにして、このレチナール結合タンパク質の構造情報を明らかにしてきた[1, 2]。本研究では、ASRの機能発現メカニズムを明らかにするための第一段階として、3次元固体NMR測定による¹³C, ¹⁵N均一標識ASRのNMR信号帰属とH/D交換の実験を行い、細胞膜中での構造やトポロジーを解析した。

固体NMR, レチナール結合タンパク質, シグナルアサイメント

○ かわむら いずる, りち し, くわあん-ふわあん じゅん, れおにーど ぶらうん,
うらじみーる らじじゃんすきー

[実験] 大腸菌BL21 RIL株にHis-Tag付加ASRのプラスミドを形質転換し、M9最小培地で[U-¹³C, ¹⁵N]標識ASRを発現させた。菌体の集菌、破碎後の膜画分をDDM (n-dodecyl-β-maltoside)で可溶化し、Ni-NTA agaroseに結合させ、[U-¹³C, ¹⁵N]標識ASRを精製した。つづいてDMPC:DMPA=9:1の割合で調製したリボソームに、タンパク質:脂質=1:20(モル比)の割合で再構成し、3.2 mmのジルコニア試料管に約11 mgのタンパク質をパッキングした。NMR測定には、Bruker Avance III 800 MHzの分光器で3.2 mm E-free 3重共鳴プローブを用いた。MAS回転周波数は14.3 kHz、試料温度は5°Cの条件でCONCA, NCOCX, NCACXによる化学シフト相関を行った。また、H/D交換測定は¹H-¹⁵Nのコンタクトタイムを300 μsに設定し、溶媒にさらされているアミド部位を同定した。FIDデータの処理はNMR Pipeで行い、NMRスペクトル解析はCARAを用いて行った。

[結果と考察]

1D ¹⁵N NMRスペクトルや¹³C-¹³C相関スペクトルなどから、脂質に再構成したASRについて膜貫通領域の中央に位置するレチナールの配座、主鎖アミド窒素の¹⁵N NMR信号やAliphatic領域の¹³C NMR信号の分離などを評価した。典型的な炭素や窒素の線幅が0.5 ppmほどの良く分離したスペクトルが得られ、またシッフ塩基の¹⁵N NMR信号からレチナールはAll-trans型の配座のみをとっているため、暗順応状態のASRは極めて均一性の高いサンプルであることがわかった。つづいて、3D CONCA, NCOCX, NCACX測定を行った。残基間および残基内のスピン系を構築し、各スピン系を結んで、連鎖帰属を試みた。その結果、結晶構造では同定されていないBCループ領域をはじめとして、ASRの膜貫通領域においてはおよそ80%のアミノ酸残基について信号帰属を行うことができた。

H/D交換の実験を行い、脂質膜中でのトポロジーを評価した。短いコンタクトタイムにおいて¹H-¹⁵Nの交差分極による初期磁化は、ほとんど直接結合したプロトンの磁化を利用するため、重水と交換した部位は信号が消失する。そのためタンパク質中のプロリンは直接結合のプロトンを持たないため、軽水中でのNMRスペクトルでも信号は観測されない。その結果、全体的には細胞質側のアミノ酸残基が細胞外側に比べて水と交換しやすく、このことからASRは脂質二重膜に対して非対称に位置していることが示唆された。

[まとめ]

多次元固体NMR測定により、脂質膜環境中のASRについて多くの信号帰属と構造解析を行うことができた。今回の結果は、補色順応に関与するタンパク質の発現制御メカニズムおよびその機能に関わっているとされる可溶性のトランスデューサーとの相互作用解析に向けての基盤的な成果となった。

[文献]

1. L. Shi, M.A. Ahmed, W. Zhang, G. Whited, L.S. Brown, V. Ladizhansky (2009) *J. Mol. Biol.* 386 1078-1093.
2. L. Shi, E. Lake, M.A. Ahmed, L.S. Brown, V. Ladizhansky (2009) *Biochim. Biophys. Acta* 1788 2563-2574.

P71

アミロイド β プロトフィブリルの固体 NMR による立体構造解析

○土井崇嗣¹, 増田裕一¹, 武田和行¹, 入江一浩², 竹腰清乃理¹

¹京大院理, ²京大院農

Structural analysis of the protofibrils of amyloid β -protein using solid-state NMR

○Takashi Doi¹, Yuichi Masuda¹, Kazuyuki Takeda¹, Kazuhiro Irie², and K. Takegoshi¹

¹Graduate School of Science, Kyoto University, Kyoto, Japan. ²Graduate School of Agriculture, Kyoto University, Kyoto, Japan.

Alzheimer's disease (AD) is caused by abnormal deposition of 42-residue amyloid β -protein (A β 42) in the brain. In the process of fibrillation, A β 42 takes the form of an oligomer intermediate, which shows stronger neurotoxicity and is thus believed to play a crucial role in the pathogenesis of AD. To elucidate the supramolecular structure of the A β 42 protofibrils, a kind of soluble oligomers, intermolecular proximity of the Ala-21 residues in the A β 42 protofibrils was studied by ¹³C-¹³C rotational resonance experiments in the solid state. Unlike the A β 42 fibrils, no intermolecular ¹³C-¹³C correlation was found in the A β 42 protofibrils. This result suggests that there is no intermolecular parallel β -sheet in the A β 42 protofibrils.

【はじめに】

アルツハイマー病 (Alzheimer's disease : AD) の原因物質である 42 残基のアミロイド β タンパク (amyloid β -protein : A β 42) は、凝集することにより神経細胞毒性を示す。A β 42 の凝集中間体であるオリゴマーは、モノマー (単量体) やフィブリル (凝集体) に比べて毒性が遥かに高いことから、ADにおける神経細胞毒性の本体と考えられている。A β 42 のフィブリル形成には分子間平行 β -シート構造が重要であることが知られている^[1,2]が、オリゴマーにおける分子間 β -シートの有無は明らかにされていない。Walshらは、ゲル濾過クロマトグラフィーにより、直径 4-10 nm、長さ 200 nm 程度の可溶性オリゴマーであるプロトフィブリルを見出している^[3]。本研究では、A β 42 のオリゴマー形成機構を解明する目的で、A β 42 プロトフィブリルにおける分子間平行 β -シート構造の有無をRotational Resonance (R2) 法を用いて検証した。

【¹³C標識したA β 42 サンプルの調製】

A β 42 フィブリルにおいて分子間平行 β -シート領域に含まれているAla-21を¹³C標識したA β 42を化学合成した。R2法では、2つの¹³Cピークの化学シフト差とMAS速度を合わせることによって、双極子相互作用を復活させる。本研究では、分子間における双極子相互作用をR2法を用いて観測するため、Ala-21のCOのみを¹³C標識したA β 42と、C α のみを¹³C標識したA β 42を1:1で混合した (Fig. 1)。

キーワード: アミロイド β タンパク, プロトフィブリル, 分子間 β シート

ふりがな: ○どいたかし, ますだゆういち, たけだかずゆき, いらえかずひろ, たけごしきよのり

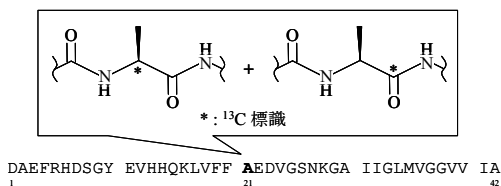


Fig. 1. Amino acid sequence of ^{13}C labeled A β 42.

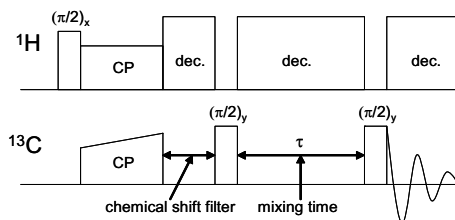


Fig. 2. A pulse sequence of 1D R2 experiment with chemical shift filter.

綿密な条件検討の結果、50 mM $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ (pH 7.4) 中において 37°C で 5 時間インキュベーションすると、プロトフィブリルの生成量が最も多くなることが分かった。これをゲル濾過クロマトグラフィーで分取した後、速やかに液体窒素で凍結・凍結乾燥させて、A β 42 プロトフィブリル (収量 2.6 mg) を調製した。 $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 溶液は揮発性緩衝液なので、凍結乾燥後の固体試料中の塩含有量は少ない。一方、同様の A β 42 溶液を 37°C で 48 時間インキュベーションしたものを遠心沈降させ、沈殿を減圧乾燥して、A β 42 フィブリル (収量 1.9 mg) を調製した。

【化学シフトフィルターを用いた次元 R2 実験】

双極子相互作用による磁化移動の有無を観測するため、Fig. 2 のパルスシーケンスを用いて次元 R2 実験を行った。本測定では CP の後、 ^{13}CO と $^{13}\text{C}_\alpha$ の化学シフト差を利用して ^{13}CO の磁化のみを残し、mixing time (τ) の間に R2 によって ^{13}CO から $^{13}\text{C}_\alpha$ へ移動した磁化を観測した。

A β 42 フィブリルの次元 R2 実験では、 ^{13}CO から $^{13}\text{C}_\alpha$ への磁化移動が観測された (Fig. 3A)。 ^{13}CO と $^{13}\text{C}_\alpha$ の分子間距離が近いという今回の結果の詳細は、A β 42 フィブリルの Ala-21 が分子間平行 β -シートを形成しているというこれまでの報告と一致している。一方、プロトフィブリルでは mixing time 100 ms でも $^{13}\text{C}_\alpha$ シグナルは観測されなかった (Fig. 3B)。R2 では 6\AA 以内の ^{13}C - ^{13}C 間の双極子相互作用が観測できることから、本結果は A β 42 プロトフィブリルが分子間平行 β -シートを形成していないか、あるいは分子間平行 β -シートを形成している分子の数が観測できないほど少ないことを示唆している。この結果からプロトフィブリルの形成過程には、分子間 β -シート構造における水素結合以外の相互作用 (疎水性相互作用、電気的相互作用など) が関与している可能性が考えられる。

References.

- [1] Morimoto, A. *et al.* (2004), *J. Biol. Chem.* **279**, 52781-52788.
- [2] Antzutkin, O. N. *et al.* (2002), *Biochemistry* **41**, 15436-15450.
- [3] Walsh, D. M. *et al.* (1997), *J. Biol. Chem.* **272**, 22364-22372.

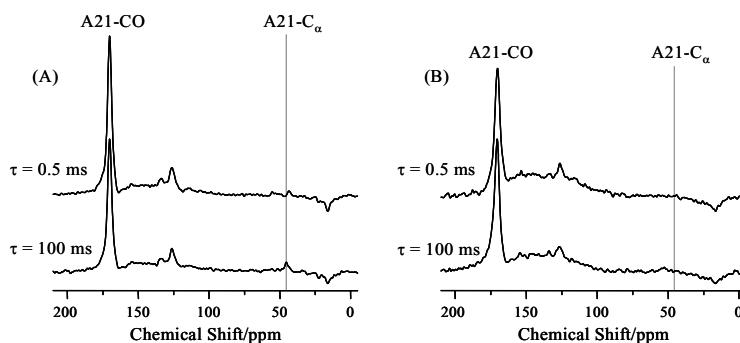


Fig. 3. ^{13}C 1D R2 spectra of A β 42 fibrils (A) and protofibrils (B).

固体NMRスペクトルシミュレーションによる高度好塩菌由来トランスデューサー膜タンパク質pHtrIIの動的構造解析

○池田恵介¹, 江川文子¹, 亀田倫史², 林こころ³, 児嶋長次郎^{1,3}, 阿久津秀雄¹, 藤原敏道¹

¹阪大・蛋白研

²産総研・CBRC

³奈良先端大・バイオ

Dynamic Structural Analysis of Halobacterial Transducer Transmembrane Protein, pHtrII by Solid-State NMR Spectral Simulations

○Keisuke Ikeda¹, Ayako Egawa¹, Tomoshi Kameda², Kokoro Hayashi³, Chojiro Kojima^{1,3}, Hideo Akutsu¹ and Toshimichi Fujiwara¹

¹Institute for Protein Research, Osaka University

²Computational Biology Research Center, AIST

³Graduate school of Biological Sciences, NAIST

The negative phototaxis of *N. pharaonis* halobacteria is triggered by the light activation of phoborhodopsin ppR. A transducer protein, pHtrII forms a complex with ppR on cell membranes. The structural change of ppR induced by photoirradiation is thought to be transmitted through the transmembrane helices and the membrane-adjacent HAMP domain of pHtrII to the cytoplasmic catalytic domain. However, little is known about the structure and dynamics of pHtrII. Here, we have investigated the structures and dynamics of a 159-residue fragment of pHtrII in DMPC bilayers by the solid-state NMR measurements, the spectral calculations and the molecular dynamics simulations. The ¹³C-¹³C spin diffusion and HCC-FLOPSY spectra were used to identify the rigid/mobile region and the secondary structures of the protein.

[序論] 高度好塩菌 *N. pharaonis* は負の走光性を示す。これは、細胞膜にあるフォボロドプシン ppR の光刺激に端を発する、一連のシグナル伝達経路を介して起こる鞭毛モーターの運動によるものである。ppR は細胞膜上でトランスデューサータンパク質 pHtrII と会合体を形成している。pHtrII は光刺激による ppR の構造変化を受容し、細胞内の触媒ドメインを活性化することで下流にシグナルを伝える。pHtrII の膜貫通ヘリックス領域と触媒ドメインの間には HAMP ドメインと呼ばれる保存された領域があり、これがシグナル伝達に重要な役割を演じていることが明らかとなっている。しかし、その詳細な立体構造およびシグナル伝達のみカニズムは不明である。

我々は、膜貫通領域と HAMP ドメインを含む pHtrII フラグメント、pHtrII (1-159) の構造とダイナミクスを明らかにするため、MAS 固体 NMR 測定、スペクトル計算および分子動力学計算を用いた解析を行った。

固体 NMR、スペクトルシミュレーション、膜タンパク質

○いけだけいすけ, えがわあやこ, かめだとし, はやしこころ, こじまちょうじろう, あくつひでお, ふじわらとしみち

[方法] ^{13}C , ^{15}N 均一標識 ρHtrII (1-159) を組み換え大腸菌発現系により発現・精製後、DMPCリポソームに再構成を行い、試料を得た。NMR測定には600MHz, 700MHz MAS固体NMR装置を用いた。二次元 ^{13}C - ^{13}C dipolar spin diffusionスペクトルおよびJ結合によるHCC-FLOPSYスペクトルを測定し、それぞれタンパク質中の運動性の低い強固な領域と運動性が高いフレキシブルな領域を検出した。 ρHtrII の分子動力学計算およびモデル構造作成にはCHARMmおよびparam19力場を用いた。また、implicit membrane modelを用いて脂質膜環境を再現した。立体構造からのスペクトル計算では、SHIFTXによるケミカルシフト予測(C^α , C')およびスピンドYNAMIXSに基づく信号強度計算を行った。

[結果・考察] ρHtrII (1-159)の二次構造解析を行うため、プローブ設定温度 -60°C 、混合時間25.6 msで ^{13}C - ^{13}C spin diffusionスペクトルを測定した。この低温条件は、タンパク質の運動を強く抑制し、すべての残基にわたる信号の観測を可能にする。また、この混合時間では1~2結合長程度の距離に及ぶ磁化移動が起こり、それよりも長距離ではほとんど起こらない。 C^α - C' スペクトル上の各クロスピークはほぼすべてが残基内の相関ピークであり、そのケミカルシフト値は核スピンの局所的環境(アミノ酸の種類や主鎖二面角)に依存している。つまり、このスペクトルは ρHtrII の残基特異的な二次構造情報を含んでいる。しかし、ピークの広幅化(~1.5 ppm)に起因するオーバーラップが残基特異的な信号の帰属と構造情報の取得を困難にしている。そこで、我々は、スペクトルシミュレーションにより、計算構造アンサンブルから、実測 C^α - C' スペクトルを矛盾なく説明する構造の選別を試みた。その結果、 ρHtrII のHAMPドメインは2つのヘリックスがフレキシブルなループで繋がれている構造をとっていることが示唆された。これは、これまでに報告されているESR実験の結果や、ホモログタンパク質の構造とよく一致している。また、HAMPドメインに続くC末領域にヘリックス構造が検出された。これは、 ρHtrII (100-159)の溶液NMR実験結果と一致している。

続いて、 ρHtrII (1-159)中の運動性の低い領域を同定するため、プローブ設定温度 -10°C でのspin diffusionスペクトルの解析を行った。 -60°C で測定されたスペクトルと比較すると、一部ピークの消失がみられた。これは運動性が増大した領域があるためと考えられた。そこで、信号が観測される領域を仮定してシミュレーションスペクトルを作成し、実測スペクトルとの差が最小化するような領域の探索を行った。その結果、 ρHtrII の膜貫通ヘリックスに加え、膜近傍30残基程度、特にHAMPドメインのN末側のヘリックスを含む残基の低い運動性が明らかとなった。

一方、運動性の高い残基の信号を観測するため、HCC-FLOPSYスペクトル測定を行った。 -10°C のスペクトル上に多数の信号を観測し、アミノ酸レベルで帰属を行うことができた。信号強度が大きいアミノ酸は、膜貫通部位から離れた領域に多く存在しており、 -10°C でのspin diffusion実験と矛盾しない結果が得られた。また、ケミカルシフト値の解析から、ヘリックスランダムコイル間で構造が揺らいでいる可能性が示唆された。

[結論] 本研究で我々は、脂質二重膜中の ρHtrII (1-159)の二次構造および運動性を残基レベルで明らかにした。また、本研究で開発した解析法は、 ^{13}C , ^{15}N 均一標識タンパク質試料の低分解能な固体NMRスペクトルからの効率的な情報の抽出およびその動的構造解析への利用を可能にする。今後、 ρpR と ρHtrII の相互作用、構造・運動性の光刺激による変化を本法で解析することにより、シグナル伝達のみか、メカニズムに迫ることができると考えている。

Stable isotope labeling of model peptides for local structure of spider dragline silk and the structural analysis using solid- state NMR○Yuya Satoh¹, Yasumoto Nakazawa² and Tetsuo Asakura¹¹Department of Biotechnology, Tokyo University of Agriculture and Technology, Japan²Nature and Science Museum, Tokyo University of Agriculture and Technology, Japan

Spider dragline silk is well-known as the strongest natural fiber and it is interesting to clarify the origin on the basis of the structure in the solid state. We synthesized several model peptides of the spider silk with different ¹³C labeling sites and ¹³C CP/MAS NMR analysis was performed by conformation-dependent chemical shifts. Especially, the conformations of Gly and Ala residues in the different sites of Gly rich-region and the conformational changes by stretching and pH changes were monitored by ¹³C CP/MAS NMR. The stretching was performed for poly(vinyl alcohol) membranes containing these model peptides as a mimic of spider dragline. The MD simulation of the peptide sequence in water under stretching was also performed to examine the structural change.

【緒言】クモ牽引糸は天然繊維の中で最も高強度でタフな高性能繊維と言われている。クモ牽引糸を構成する主要なタンパク質、MaSp1 (Major Ampullate Spidroin 1)は、配列中にAla連鎖領域とGly rich領域のよく保存されたモチーフが繰り返されている(Fig.1)。

これまで、Ala連鎖領域の構造は逆平行β-sheet構造とされてきたが、Gly rich領域の構造については未だ決定されていない。その理由の一つは、従来のクモ牽引糸に関する構造研究が、牽引糸自身をサンプルとして行なわれてきたため、局所構造の情報が平均化されてしまい、同じアミノ酸残基であっても局所構造が一次構造の位置によって異なる点を検討できないこと、一方、モデル化合物では選択的安定同位体ラベルによって局所構造の情報は得られるものの、一般に粉末として得られるので、クモが自然界で行なう延伸やpH変化による構造変化をミミックできないことに起因すると考えられる。

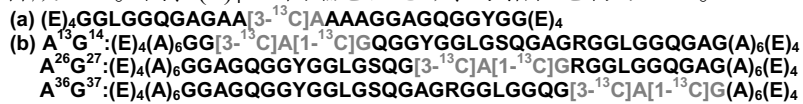
そこで、本研究では、MaSp1の一次構造をもとに、選択的ラベルを行なったモデルペプチドを合成、水に溶けた状態でクモが行なう延伸やpH変化によるクモ牽引糸の構造転移を固体NMR等を用いて検討することを目的とした。

Fig. 1 The primary structure of *Nephila Clavipes* MaSp1

クモ牽引糸、ポリアラニン、固体NMR

○さとうゆうや、なかざわやすもと、あさくらてつお

【実験】 (a)の配列ではAla連鎖中央部を[3-¹³C]Alaで、(b)の配列ではGly rich部位の3つの位置を[3-¹³C]Ala[1-¹³C]Glyで¹³CダブルラベルしたモデルペプチドをFmoc固相合成法により合成した。尚、(E)₄ で両端をはさみ、水溶性を付与した。



繊維化前モデル用に凍結乾燥処理を、繊維化後モデル用に延伸処理（モデルペプチドを含むポリビニルアルコール(PVA)フィルムを延伸）または酸性下沈殿処理を行い、¹³C CP/MAS NMR 測定を行った。化学シフトの二次構造依存性から局所構造変化を検討した。また、MD シミュレーションによって、水存在下で延伸した時のGly rich 領域の局所構造変化を検討し、実測結果と比較した。

【結果・考察】 ペプチド/PVA フィルムを作成すると、Ala残基は、Ala¹³以外は、一部、β-sheetとなる。延伸処理を行うと、C 端に近いA³⁶ 残基でβ-sheet 構成分が50%まで増加した。一方、N 端に近いA¹³ および中央のA²⁶ 残基では延伸に伴う構造変化は小さい。

また、酸性下沈殿処理を行うとAla 連鎖領域で劇的にβ-sheet を形成させ、C 端に近いA³⁶ 残基はすべてβ-sheet 構造となる。さらに、N 端に近いA¹³でも、やはり、β-sheet 構造が増加する。中央のA²⁶ 残基では、構造変化は小さい。これらの結果は、Ala連鎖領域がβ-sheet 構造をとる際、特にA³⁶ 残基はβ-sheet 構造に巻き込まれ易いことを示している。また、延伸前後で、Gly rich部位は3₁-helix 等の特殊な構造をとらないこともわかる。

一方、Gly残基は、延伸ならびに酸性下沈殿処理によって、G¹⁴,G²⁷でランダムコイルを保ち、G³⁷ではβ-sheet構造が増加した。このようにC端に近い残基がβ-sheet構造をとりやすい傾向はAla残基の場合と一致する。

MD シミュレーションの結果は、延伸に伴い、Ala¹³, Ala²⁶は緩やかにβ-sheetが増加するのに対し、A³⁶ 残基のβ-sheetの増加の割合はより著しい傾向があり、ペプチド/PVA フィルムの延伸による実測の結果と一致した。

[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。

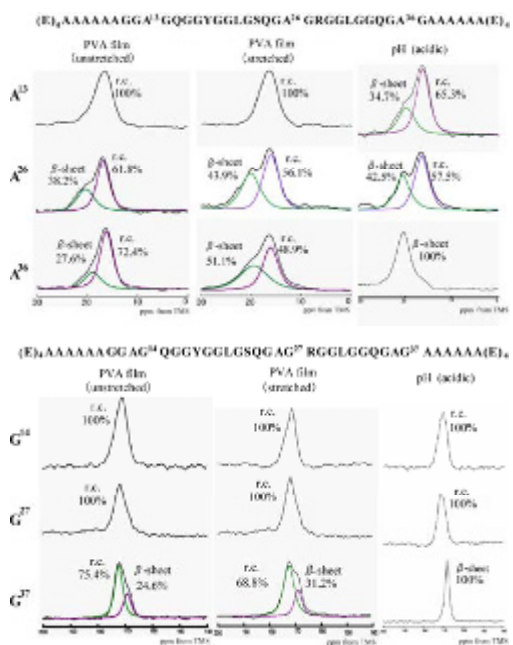


Fig. 2 ¹³C CP/MAS spectra (Ala Cβ region) of peptide/PVA film before and after stretching.

P74

アラニン連鎖ペプチドの分子間構造に関する 固体NMRによる研究

○亀谷 俊輔¹、鈴木 悠¹、青木 昭宏¹、西山 裕介²、
樋岡 克哉²、朝倉 哲郎¹

¹農工大院工・²日本電子(株)

Inter-molecular structures of alanine oligopeptides studied by solid-state NMR

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

²JEOL Ltd.Japan

The analytical methods to determine the inter-molecular structures of alanine oligopeptides in the solid state were developed on the basis of ^1H - ^1H spin diffusion NMR experiment, ^{13}C - ^{15}N inter-molecular REDOR observations, X-ray diffraction powder pattern and ^1H NMR chemical shift data together with the semi-empirical ^1H chemical shift calculations. The co-ordinates of $(\text{Ala})_4$ with anti-parallel (AP) β -sheet structure determined by single-crystal X-ray diffraction analysis were used to examine this analytical method. Then the methods were applied to analyze $(\text{Ala})_4$ with parallel β -sheet structure, and difference in the inter-molecular structures between $(\text{Ala})_6$ and $(\text{Ala})_7$ although both are AP β -sheet structures.

【緒言】

クモ牽引糸や野蚕の一種のエリ蚕絹繊維などの結晶領域はアラニン連鎖領域からなり、 β -sheet 構造を形成している。また、アミロイド繊維の中にも、アラニン連鎖領域が β -sheet 構造を形成するようになり、凝集することで発症するものが存在している。このように、繊維タンパク質中のアラニン連鎖部位は、構造形成に関して重要な役割を担っている場合が多々ある。

我々は、これまで、 β -sheet 構造を有する一連のアラニンオリゴペプチドについて、固体 NMR 構造解析を行い、分子間構造が鎖長とともに、大きく変化することを見出してきた。この構造やその変化は、それを含有するタンパク質の物性や機能に大きな影響を及ぼすので、その分子間構造を詳細に検討することは、極めて重要である。

本研究では、 ^1H - ^1H spin-diffusion 測定、 ^{13}C - ^{15}N 分子間 REDOR 測定、粉末 X 線測定、半経験的 ^1H NMR 化学シフト計算から得られる分子間構造情報等を組み合わせて、アラニンオリゴペプチド $(\text{Ala})_4$ 、 $(\text{Ala})_6$ および $(\text{Ala})_7$ について、分子間構造モデルの作成を行なった。クモ牽引糸とエリ蚕絹繊維の結晶部は、主に、 $(\text{Ala})_6$ および $(\text{Ala})_{12}$ であるが、後者の構造データは $(\text{Ala})_7$ と同様であるので、 $(\text{Ala})_7$ を取り上げた。

固体 NMR、分子間構造、アラニンオリゴペプチド

○かめたにしゅんすけ、すずきゆう、あおきあきひろ、にしやまゆうすけ、ひおかかつや、あさくらてつお

【実験】 Fmoc 固相ペプチド合成法を用いて、 $((\text{Ala})_n, n=4,6,7,12)$ を合成するとともに、分子間 REDOR 測定のために、残基特異的に ^{13}C 、 ^{15}N ラベル化したアラニンオリゴペプチドを合成した。粉末 X 線回折測定を行ない、ソフトウェア、DASH を用いて結晶格子情報を取得した。各種固体 NMR の測定は Bruker Avance 400 または JEOL ECX400 を用いて行なった。 ^1H - ^1H spin-diffusion 測定とそのビルトアップカーブのシミュレーションならびに半経験的化学シフト計算を行なった。これらの構造情報に、さらに MOPAC2009 計算を行い、分子間構造モデルの作製を行なった。

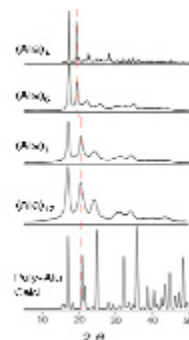


Fig.1 X-ray diffraction powder patterns of alanine oligopeptides (obsd) and poly-alanine (calcd) with AP β -sheet.

【結果】 $(\text{Ala})_4$ の逆平行(AP) β -sheet 構造の原子座標を単結晶 X 線構造解析によって求めたので、それを用いて一連の解析手法の妥当性を検証した。構造未知の $(\text{Ala})_4$ の平行 (P) β -sheet 構造ならびに $(\text{Ala})_6$ および $(\text{Ala})_7$ の AP β -sheet 構造の分子間構造をこの解析手法で検討すべく、構造情報を収集した。Fig.1 は、 $(\text{Ala})_n$ 、AP β -sheet 構造の粉末 X 線回折パターンである。 $(\text{Ala})_7$ 、 $(\text{Ala})_{12}$ は poly-alanine AP β -sheet 構造の計算パターンに近く、 $(\text{Ala})_4$ 、 $(\text{Ala})_6$ の場合と異なることがわかる。

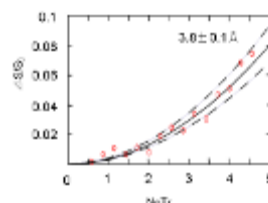


Fig.2 Determination of the distance between Ala $^{13}\text{C}\beta$ and ^{15}N nuclei of $(\text{Ala})_7$ by REDOR experiment.

ここでは、 $(\text{Ala})_7$ に関する NMR 構造情報の一部を示した。分子間 ^{13}C - ^{15}N REDOR 測定を行ない距離情報を得た。 $(\text{Ala})_3[3-^{13}\text{C}]\text{Ala}^4(\text{Ala})_3$ ならびに $(\text{Ala})_4[^{15}\text{N}]\text{Ala}^5(\text{Ala})_2$ を 1:3 の比率で混合した試料について、測定を行った結果を 1 例として Fig.2 に示した。そして、粉末 X 線回折測定から得られた距離情報を加えることで、ラフな結晶構造モデルを作成した。このモデルは、 $(\text{Ala})_4$ の AP β -sheet 構造と sheet 間の構造が異なる。

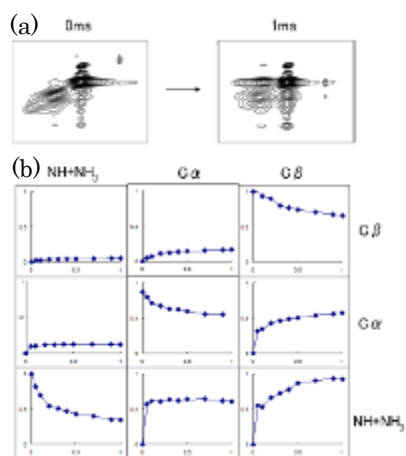


Fig.3 (a) ^1H - ^1H spin-diffusion spectra of $(\text{Ala})_7$ at 0ms and 1ms mixing time (b)Representative ^1H - ^1H spin-diffusion build up curves for $(\text{Ala})_7$

さらに、 $(\text{Ala})_7$ について、 ^1H - ^1H spin-diffusion パターンの測定を、mixing time を変化させて行い、ビルトアップカーブを作成した。そのシミュレーション等を加えて $(\text{Ala})_7$ 構造解析を進めた。 $(\text{Ala})_4$ の β -sheet 構造ならびに $(\text{Ala})_6$ の AP β -sheet 構造についても同様の手法で解析を進めた。

尚、本研究は一部、生物系特定産業技術研究支援センターイノベーション創出基礎的研究推進事業(平成 20-22 年度)、科学研究費補助金 基盤研究 S(課題番号 18105007; 平成 18-22 年度)ならびに科学技術振興機構先端計測分析技術・機器開発事業(平成 20-22 年度)により実施された。

P75

固体¹⁷O NMRによるメリチンの膜結合構造および配向の解析

○田制侑悟¹, 山田和彦², 川村出¹, 内藤晶¹

¹横国大院工

²東工大院理工

Analysis of structure and orientation of melittin bound to membrane by solid state ¹⁷O NMR

○Yugo Tasei¹, Kazuhiko Yamada², Izuru Kawamura¹ and Akira Naito¹

¹Graduate School of Engineering, Yokohama National University, Japan

²Department of Chemistry and Materials Science Graduate School of Science and Engineering, Tokyo Institute of Technology, Japan.

Melittin is a main component of *Apis mellifera*'s honeybee venom, and binds strongly to membrane. Morphological change of 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DMPC) bilayers containing melittin occur around the gel-to-liquid crystalline phase transition temperature (T_C). When temperature is above the T_C , giant vesicles are formed in the melittin-DMPC bilayers. When temperature is below the T_C , giant vesicles are disrupted to form small particles. When temperature is above the T_C , DMPC bilayer have magnetically aligned along the static magnetic field. In this study, [¹⁷O]Trp¹⁹-melittin is synthesized to observe ¹⁷O NMR for the melittin bound to membrane. ¹⁷O NMR of [¹⁷O]Trp¹⁹-melittin powder has provided with 7.3MHz and 0.6 for quadrupole coupling constant (C_Q) and asymmetry parameter (η_Q), respectively. We will discuss on the analysis of ¹⁷O NMR signal for membrane bound melittin in this conference.

【序論】

メリチンは*Apis mellifera*の毒液の主成分であり乾燥重量の50%を占める。一次構造はGly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Lys-Arg-Lys-Arg-Gln-Glnであり、26アミノ酸残基から成る両親媒性ペプチドである。メリチンは生体膜またはリン脂質モデル膜と強く結合し、溶血活性や電位駆動型イオンチャンネル活性等の生理学的機能をもつ。膜のゲル-液晶相転移点温度(T_C)より低い温度では膜分断作用により小さな膜断片が形成し、高い温度では膜融合作用により巨大な膜小胞を形成する。固体³¹P NMR測定から T_C より高い温度においては、膜が静磁場方向に配向し、さらに膜に結合したメリチン自身も磁場に配向し膜貫通 α -ヘリックス構造をとりヘリックス軸は膜法線に対して平行な軸まわりで回転運動していることが明らかになった[1][2]。このようなメリチンがもつ膜融合・分断活性を明らかにするため、固体¹⁷O NMRから四極子相互作用と化学シフト相互作用を解析し、メリチンの膜結合構造や配向の様子を解析することを目的とした。

固体¹⁷O NMR, 四極子相互作用, メリチン

○たせいゆうご, やまだかずひこ, かわむらいずる, ないとうあきら

【実験】

Fmoc 固相法を用いてカルボキシル基を ^{17}O 標識した標識率 75% の Trp^{19} (Fig.1) を用いて、選択的に ^{17}O 標識したメリチンを合成した。この場合、ペプチド中の Trp^{19} の ^{17}O 標識率は約 37.5% となる。アミノ酸残基の脱保護を行い、得られた粗試料を逆相 HPLC により精製した。目的としている膜結合した試料の調製は、合成した試料と DMPC をペプチド：脂質のモル比が 1:10 の割合になるように量りとり、トリスバッファーで水和することで得た。凍結と融解を繰り返し、多重膜小胞の膜試料を調製した。固体 NMR 測定は Bruker Biospin 社製 AVANCE III - 600 を用いて基準物質の水 (H_2O) の信号を 0ppm とした。励起パルスとして $1.6 \mu\text{s}$ の 90° パルスを用いて、高出力デカップリング (DD) を行い、信号を取り込んだ。マジック角回転の周波数は 14kHz に設定した。広領域のスペクトルの観測になるためリングングが起これやすいのでデジタルフィルターをかけてリングング信号を除去した。

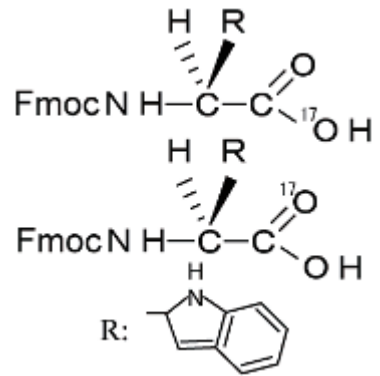


Fig.1 Structure of Fmoc [^{17}O]-Tryptophan

【結果と考察】

粉末(膜調製してない)の [^{17}O]- Trp^{19} -メリチンの固体 ^{17}O NMR 測定の結果を Fig.2 に示した。200 ppm から 300 ppm の間に 2 本の角を示すピークが試料由来の ^{17}O NMR 信号と思われる。低磁場側の信号は試料管に由来するジルコニア (ZrO_2) の酸素核の信号であり、高磁場の現れた信号はそのジルコニアの信号のスピニングサイドバンドに帰属できる。このスペクトルから四極子結合定数 $C_Q = 7.4 \text{ MHz}$ と、非対称因子 $\eta_Q = 0.6$ の値がシュミレーションスペクトルと比較することにより得られた。この値は膜結合状態のメリチンの ^{17}O NMR の相互作用パラメーターと比較してメリチンの膜結合構造や配向を求めるための基礎データとなる。今後膜結合メリチンの ^{17}O NMR スペクトルを観測し、これらのデータと合わせてメリチンの膜結合構造と膜に対する配向を求める予定である。

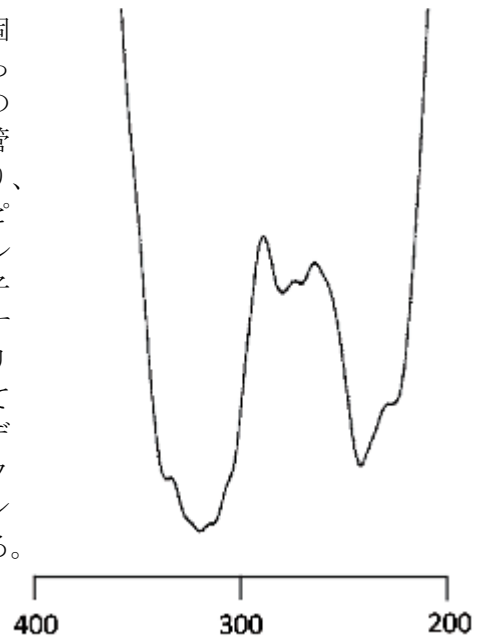


Fig.2 ^{17}O DD-MAS NMR spectra of [^{17}O]Trp-melittin

【参考文献】

- [1] S.Toraya et al. (2005) *Biophys. J.*, **89** 3214
- [2] S.Toraya et al. (2004) *Biophys. J.*, **87** 3323

P76

膜タンパク質ハロロドプシンの多次元固体NMR-同位体ラベルの最適化-

○田巻 初¹、樋口 真理花¹、江川 文子²、藤原 敏道²、横山 順^{3,4,5}、木川 隆則^{3,4}、下野 和実^{3,6}、染谷 友美³、白水 美香子³、横山 茂之^{3,7}、神谷 昌克¹、菊川 峰志¹、相沢 智康¹、河野 敬一¹、出村 誠¹

¹北大・院生命、²阪大・蛋白研、³理研 SSBC、⁴東工大・院総理工、⁵大陽日酸、⁶松山大・薬、⁷東大・院理

Solid State NMR of Membrane Protein Halorhodopsin - Optimization of Isotope Labeling -

○ Hajime Tamaki¹, Marika Higuchi¹, Ayako Egawa², Toshimichi Fujiwara², Jun Yokoyama^{3,4,5}, Takanori Kigawa^{3,4}, Kazumi Shimono^{3,6}, Tomomi Someya³, Mikako Shirouzu³, Shigeyuki Yokoyama^{3,7}, Masakatsu Kamiya¹, Takashi Kikukawa¹, Tomoyasu Aizawa¹, Keiichi Kawano¹ and Makoto Demura¹

¹Graduate School of Life Science, Hokkaido University, Sapporo, Japan. ²Institute for Protein Research, Osaka University, Osaka, Japan. ³RIKEN Systems and Structural Biology Center (SSBC), Yokohama, Japan. ⁴Interdisciplinary Graduate School of Science and Engineering, Tokyo Institute of Technology, Yokohama, Japan. ⁵Taiyo Nippon Sanso, Japan. ⁶College of Pharmaceutical Sciences, Matsuyama University, Matsuyama, Japan. ⁷Graduate School of Science, The University of Tokyo, Tokyo, Japan.

Rhodopsin is a membrane protein having a typical seven-transmembrane-helical structure. Archaeal rhodopsin, the structural family of rhodopsin, functions as light-driven ion pump or sensor. Halorhodopsin (HR), one of archaeal rhodopsin, is an inward-directed light-driven chloride pump. In the photo-excited state or chloride-bound state, HR would undergo dynamic structural changes such as helix moving, opening of uptake channel, etc. However, there is no direct evidence for these structural changes of HR. The purpose of this study is structural characterization of HR by using solid-state NMR. In this presentation, we introduce multi-dimensional magic angle spinning solid state NMR of uniformly and selectively ¹³C and ¹⁵N labeled HR, which is reconstituted with lipid, for the assignments and structural analysis. Sequential specific assignment and secondary structure analysis using Chemical Shift Index suggested the structural changes of extracellular loop by chloride binding to HR. Optimization of isotope labeling by spectral simulation was performed to design the assignment to extracellular loop of HR.

ハロロドプシン、アミノ酸選択ラベル、無細胞発現系

○たまき はじめ、ひぐち まりか、えがわ あやこ、ふじわら としみち、よこやま じゅん、きがわ たかのり、しもの かずみ、そめや ともみ、しろうず みかこ、よこやま しげゆき、かみや まさかつ、きくかわ たかし、あいざわ ともやす、かわの けいいち、でむら まこと

膜タンパク質は、エネルギー生産、細胞内外の物質輸送、シグナル伝達等に関与する。そのため、膜タンパク質の構造解析は、生命活動の解明といった基礎的領域から、創薬といった応用的領域まで、幅広い領域で重要である。我々は、創薬での主要なターゲットとして知られている、7 回膜貫通型 GPCR と同じ構造ファミリーである *Natronomonas pharaonis* haloRhodopsin (NpHR) の構造解析を、固体 NMR を用いて行っている。NpHR は光駆動型 Cl⁻ポンプ活性をもつ。また、2 番目と 3 番目の α -ヘリックス間に長いループ (BC ループ) 構造を持つことが知られている。BC ループが Cl⁻輸送に重要であるという報告がなされているが、Cl⁻輸送時のダイナミクスについては未だ不明である。本研究は、NpHR の Cl⁻輸送活性への膜外ループ領域の構造変化を固体 NMR で解明することを目的とした。我々は均一ラベル体とアミノ酸選択ラベル体を用いて、運動性の高い領域の選択的観測に取り組んだ。選択ラベル体のラベル化パターンについては、帰属の正確性が向上するよう最適化に取り組んだ。

実験

測定は、残基内相関測定である HCC-FLOPSY と残基間相関測定である HNCOCA を行った。分極移動に INEPT を用いることで、運動性の高い領域のみ選択的に測定した。装置は 500MHz と 700MHz の固体 MAS NMR 装置を使用した。

測定には、一様ラベル体とアミノ酸選択ラベル体を用いた。均一ラベル体は大腸菌発現系、M9 最少培地下、アミノ酸選択ラベル体は、無細胞発現系にて合成した。選択ラベル体のラベル化パターンは、NpHR のアミノ酸配列と、アミノ酸の化学シフト統計値を用いて、HNCOCA スペクトルでのピークの分散がよくなるよう最適化を行った。再構成には DMPC を用い、Cl⁻の有無による違いを見るため、Cl⁻結合型、非結合型の試料を調製した。

結果・考察

均一ラベル体について、HCC-FLOPSY と HNCOCA のスペクトルを用いることで、配列特異的に帰属を行ったところ、Cl⁻の有無により二次構造が異なることが CSI (化学シフトインデックス) より示唆された。

アミノ酸選択ラベル体について、HNCOCA スペクトルをシミュレーションしたところ、ピークが分散することを確認することができた。また、良好な HCC-FLOPSY スペクトルを得られたことから、無細胞系を用いて、良好な固体 NMR 試料を合成できることがわかった。

P77

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

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

¹横浜国大院・工学府、²東北大・多元研、³横浜国大・機器分析評価センター

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

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

¹Graduate School of Engineering, Yokohama National University

²Institute of Multidisciplinary Research Tohoku University

³Instrumental Analysis Center, Yokohama National University

Human calcitonin (hCT) is known as forming amyloid fibril in concentrated aqueous solution. We have shown that the fibrillation mechanism of hCT can be analyzed by the two step autocatalytic reaction mechanism. In this study, we investigated inhibition effect in the fibrillation of hCT. First, we investigated inhibition effect on a variety of solvent in fibrillation. The morphology of hCT in the initial step of fibrillation in HEPES aqueous solution was examined by means of TEM. It was revealed that the fibrillation rate became very slow and consequently spherical intermediate appeared. Second, we determined the role of Phe residue in fibrillation by comparing the fibrillation rates of hCT mutants (F19L-hCT) with that of Wt-hCT. ¹³C NMR experiments were performed on the fibrillations of hCT mutants at pH3.3, 5.3 and 7.4. The ¹³C NMR signals showed that structural transition of hCT mutants from random coil to β -sheet and random coil near C-terminal regions appeared during fibrillation. Rate constant, k_{1s} of hCT mutants are determined to be as fast as those of Wt-hCT, while k_{2s} of hCT mutants were decreased. These results suggest that Leu at the position of Phe in hCT mutants pronouncedly inhibit the fibril elongation process.

アミロイド線維形成はアルツハイマー病やパーキンソン病などで知られるアミロイド病の直接的な原因とされている。このアミロイド線維は中間体を経て自己触媒的に形成すること、結晶を形成せず、沈殿物を形成することが知られている。X線回折法や溶液NMRを用いることは適さない。よって、我々はこれまで固体NMRを使用することで、線維形成機構や線維構造に関する詳細な情報を提供してきた。

ヒトカルシトニン (hCT) は骨粗鬆症などの治療薬として使用されていたペプチドであったが、アミロイド様線維を形成することが確認されている。

solid-state NMR、amyloid fibril、amyloid fibril inhibitor

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

これまで、hCTは核形成過程と線維成長過程の2段階自己触媒反応機構で線維形成することを報告した。本実験では、溶媒とアミノ酸が果たす阻害効果および阻害機構について、固体NMRで解析し、検証したので報告する。

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

【結果と考察】

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

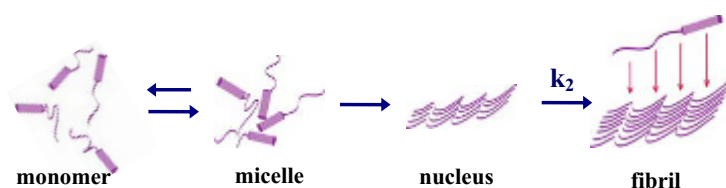


Fig.1 The mechanism of fibrillation

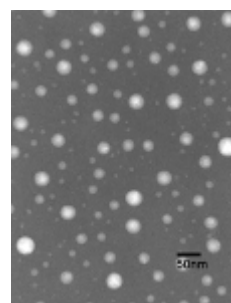


Fig.2 Wt-hCT image in the initial step of fibrillation in HEPES aqueous solution

(1) 線維形成において阻害効果のある溶媒の特定

Wt-hCTの線維化において、溶媒による阻害効果を検討した。最初に、電子顕微鏡にて同じ濃度の下で、酢酸水溶液下での線維化とHEPES水溶液下での線維化を観察した。その結果を以下で示す。

Table1. inhibition effect by 3 types of solvents

	sodium phosphate buffer	aqueous acetic acid	HEPES Buffer
Wt-hCT by TEM (0.0025g/l) protofibril	30mins 後	2days 後	7weeks 後
F19L-hCT by ¹³ C NMR (40g/l) CP-MAS Spectra	観測不能	27hours 後	11days 後

Table1 から、Wt-hCTにおいて、細い線維が確認され始めた時間を比較すると、酢酸水溶液では2日目で確認されたことに対し、HEPES水溶液では7週間で確認した。このことから、酢酸水溶液(pH3.3)よりも、HEPES水溶液(pH5.3)は線維形成を阻害して、

線維反応速度が格段に遅くなったと考えられる。また、この HEPES 水溶液中での線維化において、透過型電子顕微鏡 (TEM) を使用することで、Wt-hCT の中間体 (核) および中間体から線維が伸びて成長する様子が観測された (Fig.2)。これにより、ミセルが中間体に構造転移を起こしたと考えられる。

次に、hCT 変異体の線維化においても溶媒による阻害効果を検討するため、同様な実験を試みた。固体 NMR を用いて、線維形成過程を定量的に解析した。線維の構造解析では、Table2 で示す。酢酸水溶液下と HEPES 水溶液下を比較すると、構造上の変化は見られなかったため、溶媒によって構造が変化するのではないことが明らかになった。

線維成分を測定する CP-MAS 法の NMR スペクトル信号が伸長し始めた時間を比較すると、酢酸水溶液中での線維化に対し、HEPES 水溶液中では 10 倍も遅く、NMR スペクトル信号を確認することができた。以上から、Wt-hCT だけではなく、hCT 変異体でも HEPES 水溶液は線維反応速度という点において阻害効果があることが判明した。

(2) 阻害効果があるアミノ酸残基を特定

hCT の線維形成の促進要素として、Phe, Tyr 側鎖の芳香環同士から形成される $\pi - \pi$ stacking が考えられる。よって、その相互作用を失う hCT 変異体 (F19L-hCT) を作成し、hCT と比較することで、阻害効果のアミノ酸部位を特定する。

(2-1) 線維の構造解析

それぞれの溶媒下で Wt-hCT の線維化と hCT 変異体の線維化を行い、DD-MAS 法及び CP-MAS 法により観察したモノマーおよび線維の二次構造情報を Table 2 に示す。

Table 2 ^{13}C chemical shifts of hCT and its mutants (ppm from TMS) and their assignments

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

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

モノマー成分では、溶媒や変異体に関係なくペプチドの分子中央部では α -helix 構造、C 末端では random coil 構造を示していた。これは、線維形成前のペプチドの状態は溶媒や芳香族の数に影響を受けず、同一の構造を取っていることが分かる。次に、pH3.3 下で hCT 変異体 (F19L-hCT) の C 末端は random coil 構造から線維化後に

β -sheet 構造と random coil 構造の混在状態へと構造変化が起こった。Wt-hCT と比較すると、芳香環を一つ失うことで構造上、比較的柔らかい線維が形成したと考えられる。

(2-2) 線維形成機構における反応速度解析

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

hCT 変異体 (F19L-hCT) においては、線維成長の経時変化に着目した。まず、線維成分を測定する CP-MAS 法の NMR スペクトル信号 (Fig.3) は線維が β -sheet であることを示した。この線維成長の強度変化をプロットすると、一定時間後、線維成分が成長し始めたことから、二段階自己触媒反応機構で線維化が起こることが分かった。この機構で反応速度解析を行い、速度定数を導き出した。各条件下における速度定数を、同様に測定、計算し、Table 2 に示す。

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

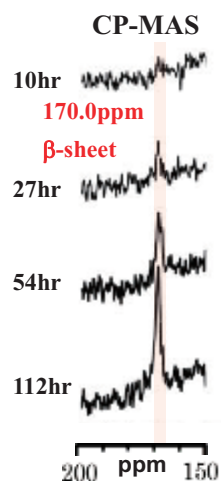


Fig.3 ^{13}C NMR spectra of $[1-^{13}\text{C}]\text{Gly}^{10}$, F19L-hCT at CP-MAS in the time course of fibril formation

Table3 Kinetics parameters for fibril formation of Wt-hCT, F19L-hCT and L₃-mutant hCT

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

(L₃-mutant hCT: 3 つの Phe を Leu に換わった hCT 変異体)

【結論】ヒトカルシトニンにおいて、線維形成を阻害する溶媒を検討した結果、HEPES は強い線維形成阻害効果を示すことが分かった。この HEPES 溶媒を用いて、線維形成過程を観測したところ球状の中間体の存在が明らかになった。次に阻害効果についてアミノ酸に着目すると、hCT 変異体を線維化することで、Wt-hCT に比べ反応速度が非常に遅く、構造も柔らかくなったことが判明した。これにより、線維形成の際、F19 のベンゼン環が関わっていることを示唆する。

P78

化学シフト摂動によるイオン液体前処理セルロースの固・液状態変化解析

○森哲哉^{1,2}, 坪井裕理³, 石田亘広¹, 志佐倫子⁴, 則武義幸⁴, 守屋繁春^{3,5,7}, 高橋治雄¹, 菊地淳^{2,5,6,7}

¹豊田中研, ²名大院農, ³理研ASI, ⁴トヨタ自, ⁵横浜市院生命, ⁶理研PSC, ⁷理研バイオマス

Solid-solution transition analysis of cellulose upon ionic liquid pretreatments by monitoring its chemical shift perturbation

○Tetsuya Mori^{1,2}, Yuuri Tsuboi³, Nobuhiro Ishida¹, Noriko Shisa⁴, Yoshiyuki Noritake⁴, Shigeharu Moriya^{3,5,7}, Haruo Takahashi¹, Jun Kikuchi^{2,5,6,7}

¹TOYOTA Central R&D Labs. Inc., ²Grad. Sch. Bioagri. Sci., Nagoya Univ., ³RIKEN ASI, ⁴TOYOTA Motor Corp., ⁵Grad. Sch. Bionano., Yokohama City Univ., ⁶RIKEN PSC, ⁷RIKEN Biomass Eng. Prg.

Plant biomass including cellulose is abundant renewable resources produced by H₂O and CO₂ through photosynthesis. However, “biomass recalcitrance” is significant issue for its effective use in biorefinery process as alternative oil resources. In other words, physicochemical analysis such as solid-solution transition, might be key technology for promotion of biorefinery era, whereas petroleum-derived polymers could be easily done. Therefore, we have tried for analysis of structural transition of ¹³C- labeled cellulose upon ionic liquid pretreatments using solid- and solution-state NMR. Especially, we monitored chemical shift perturbation of cellulose and ionic liquids before and after pretreatment processes.

【背景・目的】本学会の発展にも関係している化学工業は優れた工業製品を提供してきた半面、原料と製造エネルギーを地下資源に強く依存し、大量生産・消費社会構築にも関与してきた。一方で再生可能なバイオマス資源は古来から衣食住で衣服、食物繊維や紙・建材として地産地消型で活用されてきた。近年、こうした再生可能な植物バイオマス資源をカスケード利用するバイオリファナリーの導入により、循環型社会形成が模索されている¹⁻⁵⁾。しかし、その主成分であるセルロースは鎖間水素結合に基づく強固な結晶・非晶構造転移をするため、石油由来高分子とは異なる加工法が必要である。言い換えれば、セルロース前処理過程での構造変化を追跡できれば、より効率的な天然素材利用法の確立に繋がるのが期待される。そこで我々は、固体から溶液への状態変化を追跡できるようにするために、新規なNMR解析技術の開発を試みている⁶⁾。特に近年、バイオマス可溶化剤として注目されているイオン液体を用い、前処理前後の固体、および可溶化状態を溶液NMR法の化学シフト摂動情報から解析することを検討した。

セルロース, イオン液体, 化学シフト摂動

○もりてつや、つばいゆうり、いしだのぶひろ、しきのりこ、のりたけよしゆき、もりやしげはる、たかはしはるお、きくちじゅん

【方法・結果】 バイオマスの主成分である結晶性セルロースを試料とした、本研究の流れを図1に示した。酢酸菌による ^{13}C 標識化した結晶性セルロースについて、イオン液体の種類の違いとその反応時間を変えた前処理試料を作成した。イオン液体前処理前後の乾燥試料を固体NMR(^{13}C CP-MAS)、可溶化試料は溶液NMR(^1H および ^{13}C)計測を行った。2種のNMR装置を使い分けることで、固体から溶液への前処理過程でのセルロース構造変化を計測できることがわかった。特に ^{13}C 化学シフトと線幅が、各種イオン液体前処理条件での構造とダイナミクスの違いを良く反映していた。さらに ^{13}C - ^{13}C スピン結合に伴う2次元計測と(固体： ^{13}C - ^{13}C Refocused INADEQUATE、溶液： ^{13}C - ^{13}C CT-COSY)、1D-NMRデータの共相関解析から⁷⁾、イオン液体中と前処理後の非晶セルロースシグナルの帰属も遂行した。

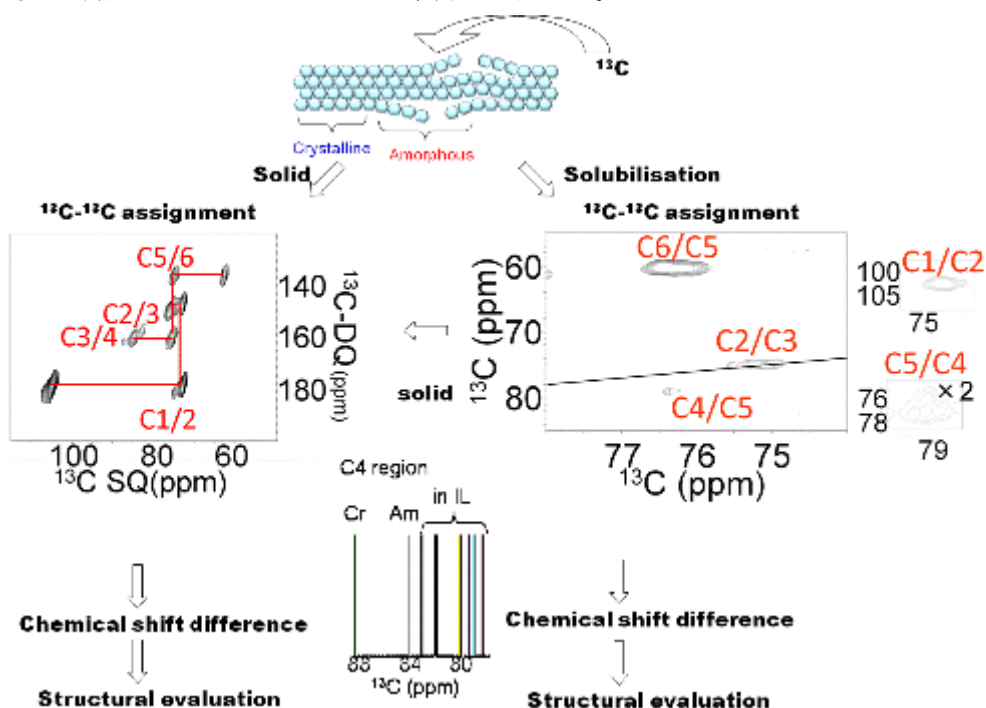


Fig. 1, Diagrammatic illustration of structural evaluation of cellulose

参考文献

- 1) Somerville C *et al.* (2010) *Science* **329**, pp790.
- 2) Rubin EM (2008) *Nature* **454**, pp841.
- 3) 菊地淳ら (2007) *ブレインテクノニュース*, **124**, pp16.
- 4) 菊地淳ら (2009) *難培養微生物研究の最新技術II*, pp147 CMC 出版.
- 5) 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*, サイエンス&テクノロジー出版.
- 6) 菊地淳 (2008) *植物の生長調節*, **43**, pp144.
- 7) Fukuda S *et al.* (2008) *PLoS ONE*, **4**, e4893.

P79

固体 ^{13}C NMR 法による MAS による天然ゴムの伸長構造の解析

浅野敦志、○北村成史、中澤千香子、黒津卓三
防衛大学校 応用化学群、応用化学科

Solid State ^{13}C NMR Study of Natural Rubber Stretched by the MAS

Atsushi Asano, Masashi Kitamura, Chikako Nakazawa, Takuzo Kurotsu

Department of Applied Chemistry, National Defense Academy, Japan

Soft materials, such as elastomers or rubbers, are deformed under the conditions of fast magic-angle spinning (MAS) and relatively moderate temperature. The deformation will cause a change of its original molecular motion, molecular orientation, and morphology. We found that a natural rubber (NR) after experience of MAS over 5 kHz and 60°C, which elongation against the rotor axis (cylindrical height direction) is restrained by teflon spacers, shows a wider static ^{13}C NMR line shape than that of a pristine NR. However, the static ^{13}C NMR spectrum of a stretched NR after the experience of MAS over 5 kHz and 60°C without teflon spacers resembles that observed by Kimura *et al.* in Polym. J., 2010. Furthermore, we found that ^{13}C NMR chemical shifts of NR under the MAS condition depends on temperature, but the temperature dependence under the static condition was different from those under the MAS condition.

<緒言>

エラストマーのような柔軟な試料で、等方的スペクトルを得るために MAS (Magic Angle Spinning; マジック角試料回転) 法を用いると、MAS 中に生じる内部圧力によりエラストマーが伸長変形し、分子運動などに影響を及ぼすことが考えられる。例えば、我々は天然ゴムの固体高分解能 ^{13}C DDMAS NMR スペクトルの化学シフト値が可逆的に温度依存性を示すことを報告した¹⁾。

本研究では、天然ゴムの静止状態のスペクトルと MAS 中のスペクトルの違いから、MAS 中に伸長された天然ゴムの配向挙動を論じた。さらに、静止状態の緩和時間と MAS 中の緩和時間の温度依存性から、配向したときの運動性の違いを議論する。

<実験>

試料は、(社)日本ゴム協会・新世代エラストマー技術研究分科会のラウンドロビン法で用いている 3 種類の天然ゴム (加硫天然ゴム: v-NR、未加硫天然ゴム: unv-NR、無添加の天然ゴム: NR) を用いた。 ^{13}C NMR スペクトルの測定は、Varian NMR systems 400 WB 型を用いた。各試料を 6.0 mm ϕ 試料管の中央部に約 3 mm 厚で充填し、テフロンスペーサーの有無で、高速 MAS 中での天然ゴムの伸長度を制御し、 ^{13}C NMR スペクトルおよび ^{13}C スピナー格子緩和時間 (T_1^C) を測定した。

Keywords : 配向, 緩和時間, マジック回転角

著者ふりがな : あさのあつし, きたむらまさし, なかざわかこ, くらつたくぞう

<結果・考察>

Fig.1 は、NR を固体 NMR ローター内の中央部に充填して、30°C で測定した静止状態固体 ^{13}C NMR スペクトルである。(a) は、NR を 60°C の真空中でアニリングした後に測定したスペクトル、(b) はテフロンスペーサーで 3 mm 厚の NR をはさみ、MAS = 5 kHz で回転させた後に測定したスペクトル、(c) はテフロンスペーサーを除いて、温度を 60°C に設定して MAS = 5 kHz で 12 時間回転させた後に測定したスペクトルである。(a) および (b) では、NR はローター内で延伸されなかったが、(c) では NR が写真に示すように試料管内の円筒の高さ方向に延伸され、6 倍の長さとなった。(b) のスペクトルは (a) に比べて異方的にブロード化した。これは、NR が MAS の圧力の影響を受けて、分子運動が束縛された状態のまま元に戻らないことを示している。また (c) では、それぞれのピークが一見 2 本に分かれたスペクトルとなった。このように 2 本に分かれるスペクトルは、住友ゴムの木村らにより観測されている²⁾。彼らによると、この複雑なピークは、NR の伸長方向と静磁場との成す角度により化学シフト値が変化するためと結論づけられている。我々の実験では、MAS 中での内部圧力による伸長であり、また静止状態においても静磁場とは MAS 角度を成しているにもかかわらず、同様のスペクトルが観測されている。一方、スペクトルの温度変化を観測すると、温度に依存して化学シフトが可逆的に変化した (Fig.2)。例えば、30°C から 80°C に温度を上昇させると、メチル基の ^{13}C DDMAS NMR 化学シフトは約 0.2 ppm 高磁場シフトし、二重結合部の ^{13}C NMR 化学シフトは約 0.1 ppm 低磁場シフトする。しかし、静止状態での ^{13}C NMR 化学シフト値はそれぞれ約 0.1 ppm、0.4 ppm と共に低磁場シフトし、MAS 中の温度依存性とは異なった。

Fig.3 には、MAS = 5 kHz および静止状態での NR の T_1^C 温度依存性を示した。詳細については当日発表する。

<参考文献>

- 1) 北村成史、浅野敦志、田中千香子、黒津卓三、*Polym. Prep., Japan*, **59(2)**, 3030 (2010)
- 2) Kimura *et al.*, *Polym. J.* 2010, **42**, 25-30.

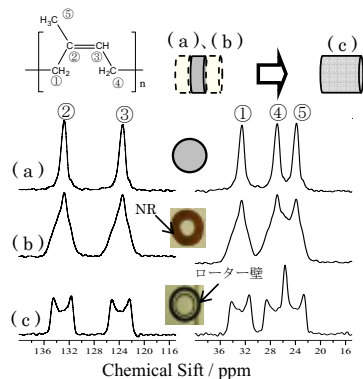


Fig.1 Solid state ^{13}C NMR spectrum of NR at 30°C without MAS.

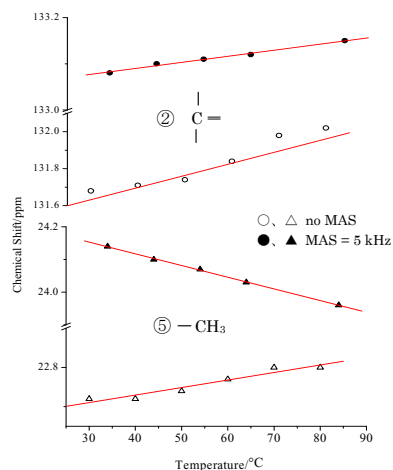


Fig.2 Temperature dependence of ^{13}C NMR Chemical Shift of NR.

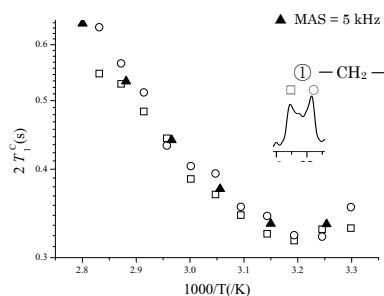


Fig. 3 Temperature dependence of T_1^C for NR under MAS of 5 kHz and without MAS.

P80

高速試料回転下の CP における接触時間の検証

芦田 淳

アジレント・テクノロジー

(バリアン・テクノロジーズ・ジャパン・リミテッド)

Contact Time Calibration at Cross Polarization under Fast Magic Angle Spinning

Jun Ashida

Agilent Technologies Japan Ltd. (Varian Technologies Japan Ltd.)

Because of the low sensitivity of ^{13}C Solid State NMR, Cross-Polarization (CP) technique is generally used to obtain higher ^{13}C signal intensity. In order to obtain maximum intensity, it is necessary to calibrate contact time carefully for every sample. However, in some cases, because of the low signal-to-noise ratio or long relaxation time, it is not easy to calibrate. Therefore we often start the experiment without adjustment, and use the value from our experience.

Contact time of 0.5-2.0ms and >5.0us are usually used as standard for crystal and amorphous regions, respectively. However these numbers are introduced more than 10 years ago.

Recently, a rotor size is becoming smaller, so we can spin the sample faster and can input higher RF power. In this paper, the contact time dependence of sample spinning speed, RF power, and the pattern of CP are described.

【緒言】

固体 ^{13}C -NMR では、厳密な定量性が求められる場合を除いて一般的には、 ^{13}C の低い天然存在比 (1.1%) と比較的小さな磁気回転比 (^1H の 1/4) に起因する低感度を補うために $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -CP (Cross Polarization: 交差分極) 法が用いられる。得られる感度を最大化するためには、試料ごとの接触時間 (contact time) の調整が必要であるが、感度が低い試料では調整に時間がかかるため、ある程度パラメータを適当に見積もって測定を仕掛けることがしばしばある。成書や総説には、結晶系試料であれば 0.5~2ms、アモルファス試料であれば 5ms 前後と記載してあることが多い。

ところで近年、小さな口径のローターを用いて、より試料を速く回し、より強い RF パルスを照射する機会が増えてきている。交差分極法で得られる信号強度 $I(t)$ は、 $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ の交差緩和時間 T_{CH} と回転系でのスピナー格子緩和時間 $T_{1\rho}$ を用いて、

$$I(t) \propto I(0) \lambda^{-1} \cdot \left\{ 1 - \exp(\lambda t / T_{\text{CH}}) \cdot \exp(-t / T_{1\rho}^{\text{H}}) \right\} \quad \text{ここで } \lambda = 1 + T_{\text{CH}} / T_{1\rho}^{\text{C}} - T_{\text{CH}} / T_{1\rho}^{\text{H}}$$

と表わされる。交差緩和時間 T_{CH} が運動性に、スピナー格子緩和時間 $T_{1\rho}$ が照射される

CP、高速 MAS

あしだ じゅん

RF パルス強度に依存しているので、小口径ローターでは大きな影響があるのではないかと予想され、上で述べた接触時間の設定が現在でも最適かどうかについて検討を行った。

【実験】

実験には Varian NMR System 600MHz と 3.2mm 以下のローター径の固体 T3 MAS プローブを用いた。

【結果・考察】

図 1 に、グリシンの試料回転速度が 5kHz (点線)、10kHz (破線)、20kHz (実線) における ^{13}C -(CW)CPMAS 測定でのメチレン炭素のピーク強度の接触時間依存性を示す。試料回転速度が 5kHz の時は接触時間=1.5ms の時にメチレン炭素のピーク強度が最大になるが、10kHz では 5.5ms、20kHz の時は 7.5ms において最大となり、明らかに最大信号強度を得るための最適な接触時間が長くなっている。また、カルボニル炭素についても同様の傾向が見られた。

図 2 には、試料回転速度が 20kHz における連続波 (CW: 実線) および強度変調 (linear-ramp: 点線) CP 時のグリシンのメチレン炭素のピーク強度の接触時間依存性を示す。試料回転速度が 20kHz とある程度高速回転なので、Linear-Ramp CP の方がはるかに大きい強度の信号がえられているが、最適の接触時間にはそれほど大きな差が見られなかった。

ポスターでは、他にも様々な条件下における CP/MAS スペクトルのピーク強度の接触時間依存性について考察する予定である。

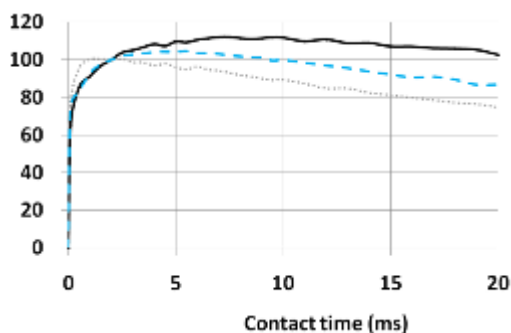


Figure 1. Peak intensity of glycine methylene carbon of ^{13}C -CPMAS spectra. The peak intensity at 2ms contact time is normalized to 100 in each spinning speed.

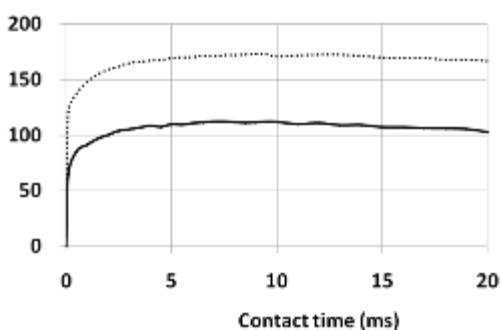


Figure 2. Peak intensity of glycine methylene carbon of ^{13}C -CPMAS spectra. The peak intensity at 2ms contact time of CW-CP is normalized to 100 for both CW (solid line) and linear-ramp (dotted line) CP.