# 第49回 NMR 討論会

The 49th Annual Meeting of the Nuclear Magnetic Resonance Society of Japan

- 会期: 2010年11月15日(月),16日(火),17日(水) November 15 (Mon.) – 17 (Wed.),2010
- 会 場 : タワーホール船堀 **Tower Hall Funabori** 〒134-0091 東京都江戸川区船堀 4-1-1, Tel: 03-5676-2211
- 共催:新学術領域研究「過渡的複合体が関わる生命現象の統合的理解」

# 第1日目 11月15日(月)/ Day 1 (Nov. 15, Mon.) 日本語セッション / Japanese session

# 9:25~9:30

開会の挨拶 日本核磁気共鳴学会会長

# 9:30~10:45

#### 座長 児嶋 長次郎

- L1 過渡的に形成される立体構造の常磁性緩和効果による解析 Structural studies of transient structures using PRE 〇三島 正規<sup>1</sup>,金場 哲平<sup>1</sup>,伊藤 隆<sup>1</sup>,箱嶋 敏雄<sup>2</sup>,三神 すずか<sup>1</sup>(<sup>1</sup>首都大理工,<sup>2</sup>奈良先端 情報)
- L2 45 kDa プロテインキナーゼ VRK1 の NMR 構造解析 NMR structural analysis of 45 kDa protein kinase, VRK1
   ○栃尾 尚哉<sup>1</sup>,小柴 生造<sup>1,2</sup>,横山 順<sup>3</sup>,横山 茂之<sup>1,4</sup>, Ho Sup Yoon<sup>5</sup>,木川 隆則<sup>1,6</sup> (<sup>1</sup>理研生命分子システム基盤,<sup>2</sup>横浜市大・院生命ナノシステム,<sup>3</sup>大陽日酸株式会社,<sup>4</sup>東大・院理,<sup>5</sup>ナンヤン工科大 SBS,<sup>6</sup>東工大・院総理工)
- L3 Deuterium-decoupled 3D HCA(N)CO に支援された重水溶媒中におけるタンパク質の立体 構造解析 Structure determination of proteins in <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O solution aided by a deuterium-decoupled 3D HCA(N)CO experiment 〇小椋 賢治, 久米田 博之, 稲垣 冬彦(北大先端生命)

# 10:45~11:35

#### 座長 神田 大輔

L4 蛋白質側鎖 OH/SH の水素交換速度の解析
 NMR Hydrogen exchange study of side-chain OH/SH groups in proteins
 ○武田 光広<sup>1</sup>, Chun-Jiun Yang<sup>2</sup>, JunGoo Jee<sup>2</sup>, 小野 明<sup>3</sup>, 寺内 勉<sup>3</sup>, 甲斐荘 正恒<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>名大理, <sup>2</sup>首都大, <sup>3</sup>SAIL テクノロジーズ)

# L5 高圧力 NMR 法による Lys48 結合型ジユビキチンの構造揺らぎ High-pressure NMR characterizes conformational fluctuation of Lys48-linked diubiquitin 〇北原 亮<sup>1</sup>,平野 貴志<sup>2</sup>,矢木 真穂<sup>2,3</sup>,秦 和澄<sup>1</sup>,赤坂 一之<sup>4</sup>,加藤 晃一<sup>2,3</sup> (<sup>1</sup>立命大薬, <sup>2</sup>名市大院薬,<sup>3</sup>岡崎統合バイオ,<sup>4</sup>近大高圧研)

11:35~12:05 日本核磁気共鳴学会総会

Meeting of the NMR Society of Japan

### 13:05~14:35 ポスターセッション(偶数番号)

Poster Session (even numbers)

# 若手ポスター賞ポスター発表審査

Poster presentations for Young Scientists Poster Awards

# 14:35~18:00

# 若手ポスター賞口頭発表審査

Oral presentations for Young Scientists Poster Awards

# 14:35~15:25

# 座長 朝倉 哲郎、藤原 敏道

- YP1 42 残基のアミロイドβ(Aβ42)凝集体におけるクルクミンの相互作用部位の固体 NMR による解析
   Analysis of interaction sites of curcumin with the fibrils of 42-residue amyloid β-protein(Aβ 42) using solid-state NMR
   ○増田 裕一<sup>1</sup>, 福地 将志<sup>1</sup>, 谷田川 達也<sup>1</sup>, 武田 和行<sup>1</sup>, 入江 一浩<sup>2</sup>, 竹腰 清乃理<sup>1</sup>(<sup>1</sup>京大理, <sup>2</sup>京大農)
- YP2 固体 NMR による脂質膜表面において誘起される SWAP-70 PH ドメインの構造変化および機能の解析
  A Solid-state NMR study of structural alteration and function of the PH domain induced at the membrane surface
  ○徳田 尚美<sup>1</sup>,川合 克久<sup>1</sup>,八木澤 仁<sup>1</sup>,福井 泰久<sup>2</sup>,辻 暁<sup>1</sup>(<sup>1</sup>兵庫県立大学大学院 生命理学研究科,<sup>2</sup>Natl. Hlth. Res. Inst., Taiwan)
- YP3 固体 NMR 法および gauge-including projector augmented-wave(GIPAW)法による有機凝集構 造の解析と構造精密化 Structural analysis and refinement of organic aggregation structure by combination of the solid-state NMR spectroscopy and the gauge-including projector augmented-wave (GIPAW) calculation 〇鈴木 不律, 梶 弘典(京大化研)
- YP4 光照射固体 NMR による光受容タンパク質 ppR-pHtrII 複合体の負の走光性発現に関わる Tyr174 の局所動的構造変化の解析
  Analysis of local dynamical and structural change at Tyr174 of photoreceptor protein ppR-pHtrII complex in relation to the negative phototaxis by in situ photo-irradiated solid-state NMR
  〇日高 徹郎<sup>1</sup>, 友永 雄也<sup>1</sup>, 川村 出<sup>1</sup>, 和田 昭盛<sup>2</sup>, 須藤 雄気<sup>3</sup>, 加茂 直樹<sup>4</sup>, 内藤 晶<sup>1</sup> (<sup>1</sup> 横浜国立大学大学院工学府,<sup>2</sup> 神戸薬科大学薬学部,<sup>3</sup>名古屋大学大学院理学研究科,<sup>4</sup>松山大 学薬学部)
- YP5 <sup>6</sup>Li MAS NMR による LiCoO<sub>2</sub> の微視的機構の解析:イオン拡散とスピン拡散 <sup>6</sup>Li MAS NMR of LiCoO<sub>2</sub> from a microscopic viewpoint: ion diffusion and spin diffusion ○野田 泰斗<sup>1</sup>, 水野 敬<sup>2</sup>, 竹腰 清乃理<sup>1</sup>(<sup>1</sup>京大理, <sup>2</sup>日本電子(株))

#### 15:25~16:05

### 座長 池上 貴久、加藤 晃一

YP6 地磁気 NMR を用いたボトル内液体物の検査
 Screening bottled liquids using Earth's Field NMR
 ○渡邉 翔大<sup>1</sup>,赤羽 英夫<sup>1</sup>,糸崎 秀夫<sup>1</sup>(<sup>1</sup>大阪大学院基礎工学研究科糸崎研究室)

- YP7 NQR リモートセンシングの電磁界シミュレーション
   Electromagnetic simulators of NQR remote sensing
   ○中原 優<sup>1</sup>, 糸崎 秀夫<sup>1</sup>, 赤羽 英夫<sup>1</sup>, 篠原 淳一郎<sup>1</sup> (<sup>1</sup>大阪大学院基礎工学研究科糸崎研究室)
- YP8 廃水・廃棄物処理系バイオプロセスにおける<sup>13</sup>C 結晶セルロース分解過程の固・液時系 列変動データマイニング
   Data mining of solid to solution dynamics during <sup>13</sup>C crystal cellulose degradation in the waste disposal bioprocess
   ○飯倉 智弘<sup>1,2</sup>, 伊達 康博<sup>1,2</sup>, 山澤 哲<sup>3</sup>, 菊地 淳<sup>1,2,4,5</sup> (<sup>1</sup>横市院生命, <sup>2</sup>理研 PSC, <sup>3</sup>鹿島技研, <sup>4</sup>理研 BMEP, <sup>5</sup>名大院生命農)
- YP9 バイオマス・プロファイリングの実用に向けたサンプル条件の縦横的探索
   Correlation exploration of pretreatment conditions for application of biomass profiling.
   ○篠 阿弥宇<sup>1</sup>, 坪井 裕理<sup>2</sup>, 林 裕志<sup>3</sup>, 菊地 淳<sup>1,3,4,5</sup> (<sup>1</sup>理研 PSC, <sup>2</sup>理研 ASI, <sup>3</sup>横市大院生命, <sup>4</sup>名大院生命農, <sup>5</sup>理研 BMEP)

16:05~16:20 休憩 / Break

16:20~17:10

# 座長 河合 剛太、若松 馨子

- YP10 N…H…O 水素結合におけるプロトン移動ポテンシャル解明への核磁気緩和の適用
   Application of nuclear magnetic relaxation to elucidation of proton transfer potential of N…H…O type
   hydrogen bond
   ○仲野 朋子<sup>1</sup>, 益田 祐一<sup>1</sup> (<sup>1</sup>お茶大院・理)
- YP11 <sup>13</sup>Cメチル基をプローブとして用いるリジン側鎖を介した塩橋の解析法の開発 A method developed for analysis of salt bridges mediated by lysine side chains using <sup>13</sup>C-methyl groups as probes
  ○服部 良一<sup>1,2</sup>, 大木 出<sup>2</sup>, 古板 恭子<sup>1</sup>, 池上 貴久<sup>1</sup>, 深田 はるみ<sup>3</sup>, 白川 昌宏<sup>4</sup>, 藤原 敏道<sup>1</sup>, 児嶋 長次郎<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>阪大・蛋白研, <sup>2</sup>奈良先端大・バイオ, <sup>3</sup>阪府大・生命環境, <sup>4</sup>京大・工)
- YP12 ホスト-ゲスト化学による磁場配向誘起を用いた RDC 構造解析
   Structural Analysis with RDC induced by host-guest chemistry
   ○諸原 理<sup>1</sup>,藤田 大士<sup>1</sup>,佐藤 宗太<sup>1</sup>,山口 芳樹<sup>2</sup>,加藤 晃一<sup>3,4,5</sup>,藤田 誠<sup>1,5</sup> (<sup>1</sup>東大院工,<sup>2</sup>理研,<sup>3</sup>名市大院薬,<sup>4</sup>岡崎統合バイオ,<sup>5</sup>CREST)
- YP13 Nonlinear sampling と 3D MaxEnt を用いた迅速な 4D NOESY 測定の有用性の検証 Application of nonlinear sampling and 3D MaxEnt processing to 4D NOESY experiments ○重光 佳基<sup>1</sup>, 池谷 鉄兵<sup>1,2</sup>, 土江 祐介<sup>1</sup>, 三島 正規<sup>1</sup>, Daniel Nietlispach<sup>3</sup>, Markus Waelchli<sup>4</sup>, PeterGuentert<sup>2</sup>, Brian O. Smith<sup>5</sup>, 伊藤 隆<sup>1</sup> (<sup>1</sup>首都大理工, <sup>2</sup>Institute of Biophysical Chemistry, J. W. Goethe-University Frankfurt, <sup>3</sup>Department of chemistry, University of Cambridge, <sup>4</sup>ブルカーバイオスピ ン, <sup>5</sup>Division of Biochemistry and Molecular Biology, University of Glasgow)
- YP14 イノシトールリン脂質組み込み Nanodisc を用いたタンパク質-膜間相互作用解析
   Phosphoinositide incorporated Nanodisc:A tool for studying protein-membrane interactions
   ○吉田 直樹<sup>1</sup>,小橋川 敬博<sup>2</sup>,原田 幸祐<sup>1</sup>,小椋 賢治<sup>2</sup>,横川 真梨子<sup>2</sup>,稲垣 冬彦<sup>2</sup>(<sup>1</sup>北大院 生命科学構造生物,<sup>2</sup>北大先端生命構造生物)

17:10~18:00

### 座長 片平 正人、廣明 秀一

YP15 カルモジュリンC末端残基の構造と機能における役割
 The role of C-terminal residues of calmodulin on its structure and function
 ○黄 多率<sup>1</sup>,北川 千尋<sup>2</sup>,中冨 晶子<sup>2</sup>,大木 進野<sup>1</sup>(<sup>1</sup>北陸先端大学院大,<sup>2</sup>北大)

- YP16 放線菌由来カリウムチャネル KcsA のゲーティング機構の構造生物学的解析 Structural basis underlying the dual gate properties of KcsA ○今井 駿輔<sup>1</sup>, 大澤 匡範<sup>1</sup>, 竹内 恒<sup>1</sup>, 嶋田 一夫<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>東大薬, <sup>2</sup>BIRC/AIST)
- YP17 NMR スピンラベル法を用いた酵母ミトコンドリア酸化還元トランスロケータ Tim40 と FAD 結合型酸化酵素 Erv1 の相互作用解析
   NMR spin-label analysis on the interactions between an oxidative translocator Tim40 and a FAD-linked sulfhydryl oxidase Erv1 in yeast mitochondria
   ○安西 高廣<sup>1</sup>, 河野 慎<sup>1</sup>, 寺尾 佳代子<sup>1</sup>, 遠藤 斗志也<sup>1</sup>(<sup>1</sup>名大院理)
- YP18 マウスフェロモン ESP1—受容体間相互作用の構造生物学的研究
   Structural study of interactions between mouse pheromone ESP1 and ESP1 receptor
   ○平金 真<sup>-1</sup>, 吉永 壮佐<sup>-1</sup>, 佐藤 徹<sup>-2</sup>, はが 紗智子<sup>-2</sup>, 嶋田 一夫<sup>-3</sup>, 東原 和成<sup>-2</sup>, 寺沢 宏明<sup>-1</sup>
   (<sup>1</sup>熊大院薬, <sup>2</sup>東大院農学生命, <sup>3</sup>東大院薬)
- YP19 転写抑制コファクターSHARP/SMRT 複合体の試料調製及び構造解析 Structural studies on the transcriptional corepressor complex SHARP/SMRT and its preparation 〇三神 すずか, 伊藤 隆, 三島 正規(首都大理)

18:10~

# 日本核磁気共鳴学会評議員会(401 会議室)

# 第2日目 11月16日(火)/ Day 2 (Nov. 16, Tue.) 英語セッション / English session

# 9:30~10:35

Chairperson: Hideo Akutsu

# L6 Application of sulfobetaines to solution NMR of proteins and peptides

OKaori Wakamatsu<sup>1</sup>, Haimei Wang<sup>1</sup>, Kazuki Igarashi<sup>1</sup>, Ayumi Kamiya<sup>1</sup>, Masahiko Takahashi<sup>1</sup>, Fukuei Tezuka<sup>1</sup>, Long Xiang<sup>1</sup>, Takeshi Ishii<sup>1</sup>, Kazuo Hosoda<sup>1</sup>, Nobukazu Nameki<sup>1</sup>, Kenji Sugase<sup>2</sup> (<sup>1</sup>Grad. Sch. Eng., Gunma Univ., <sup>2</sup>Suntory Inst. Bioorg. Res.)

# L7 Invited Lecture 1 Allosteric Control of Environmental Sensors OKevin Gardner (Departments of Biochemistry and Pharmacology, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, TX USA)

10:35~10:50 Break / 休憩

10:50~12:20 Chairperson: Fuyuhiko Inagaki

# L8 Structure of RNA aptamer:prion protein complex and sliding of A3G on DNA

Ayako Furukawa<sup>1</sup>, Tsukasa Mashima<sup>1</sup>, Ryo Iwaoka<sup>1</sup>, Takafumi Koshida<sup>1</sup>, Takashi Nagata<sup>2</sup>, Ryo Morishita<sup>3</sup>, Akihide Ryo<sup>4</sup>, Akifumi Takaori<sup>5</sup>, Fumiko Nishikawa<sup>6</sup>, Satoshi Nishikawa<sup>6</sup>, ○Masato Katahira<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Inst. Advanced Energy, Kyoto Univ., <sup>2</sup>Nanobio., Yokohama City Univ., <sup>3</sup>CellFree Sci., <sup>4</sup>Grad. Sch. Med., Yokohama City Univ., <sup>5</sup>Grad. Sch. Med., Kyoto Univ., <sup>6</sup>AIST)

# L9 STRUCTURE AND FUNCTION OF THE N-TERMINAL NUCLEOLIN BINDING DOMAINOF NUCLEAR VALOCINE CONTAINING PROTEIN LIKE 2 (NVL2)

Yoshie Fujiwara<sup>1</sup>, Ken-ichiro Fujiwara<sup>2</sup>, Natsuko Goda<sup>1</sup>, NaokoIwaya<sup>3</sup>, Takeshi Tenno<sup>1</sup>, Masahiro Shirakawa<sup>3</sup>, OHidekazu Hiroaki<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Grad.Sc.Med., Kobe Univ., <sup>2</sup>Shionogi Co Ltd., <sup>3</sup>Grad.Sch.Eng., Kyoto Univ.)

# L10 Invited Lecture 2

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

Tobias Madl<sup>1,2</sup>, Bernd Simon<sup>3</sup>, Frank Gabel<sup>4</sup>, Cameron D. Mackereth<sup>5</sup>, Michael Nilges<sup>6</sup>, ○Michael Sattler<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>Helmholtz Zentrum München, Neuherberg, Germany; <sup>2</sup>TU München, Garching, Germany <sup>3</sup>EMBL, Heidelberg, Germany; <sup>4</sup>Institut de Biologie Structurale, Grenoble, France; <sup>5</sup>Institut Européen de Chimie & Biologie (IECB), Pessac, France; <sup>6</sup>Institut Pasteur, Paris, France)

12:20~13:50 Lunch / 昼食 (12:20~13:40 新評議員会と新理事会(401会議室))

## 13:50~14:40 Chairperson: Kiyonori Takegoshi

# L11 High Field, High Sensitivity Solid-State NMR at 14T by Dynamic Nuclear Polarization (DNP)

<sup>O</sup>Yoh Matsuki<sup>1</sup>, Hiroki Takahashi<sup>1</sup>, Keisuke Ueda<sup>1</sup>, Toshitaka Idehara<sup>2</sup>, Isamu Ogawa<sup>2</sup>, Shinji Nakamura<sup>3</sup>, Mitsuru Toda<sup>3</sup>, Takahiro Anai<sup>3</sup>, Hideo Akutsu<sup>1</sup>, Toshimichi Fujiwara<sup>1</sup> (<sup>1</sup> Institute for Protein Research, Osaka University, <sup>2</sup>Research Center for Development of Far-Infrared Region, University of Fukui, <sup>3</sup>JEOL)

# L12 Detection of photo-intermediates in retinal proteins by in-situ photo-irradiated solid-state NMR

○Akira Naito, Yuya Tomonaga<sup>1</sup>, Tetsurou Hidaka<sup>1</sup>, Izutu Kawamura<sup>1</sup>, Takudo Nishio<sup>1</sup>, Kazuhiro Ohsawa<sup>1</sup>, Akimari Wada<sup>2</sup>, Yuki Sudo<sup>3</sup>, Naoki Kamo<sup>4</sup> (<sup>1</sup>Grad. Sch. Eng. Yokohama Natl Univ, <sup>2</sup>Kobe Pharm. Univ., <sup>3</sup>Grad. Sch. Sci. Nagaya Univ. <sup>4</sup>Dept. Pharm. Matsuyama Univ.)

# 14:40~15:20

# Chairperson: Takehiko Terao

# L13 Honorary Lecture

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

OHideaki Fujiwara (Department of Medical Physics and Engineering, Division of Health Sciences, Graduate School of Medicine, Osaka Universit)

15:25~15:35 Break / 休憩

15:35~16:00

# Chairperson: Yutaka Ito

# L14 **Protein structural determination using orientation induced TROSY shift changes** Oshin-ichi Tate (Grad. Sch. Sci., Hiroshima Univ.)

# 16:00~16:40

# Chairperson: Yoshifumi Nishimura

# L15 Invited Lecture 3

#### Structure determination of the helical 7-transmembrane receptor sensory rhodopsin Obaniel Nietlispach, Antoine Gautier, John P. Kirkpatrick, Helen R. Mott, Mark J. Bostock (Department

of Biochemistry, University of Cambridge)

# 16:40~18:00

# Chairperson: Masatsune Kainosho

# L16 Invited Lecture 4

**Probing cancer cell signaling by NMR: structure, interaction, and kinetics of the small GTPase cycle** Christopher B. Marshall, Mohammad Mazhab-Jafari, David Meiri, Geneviève M.C. Gasmi-Seabrook, Jason Ho, Robert Rottapel, Vuk Stambolic, and OMitsu Ikura (Division of Signaling Biology, Ontario Cancer Institute and Department of Medical Biophysics, University of Toronto)

# L17 Invited Lecture 5

# Chemical shifts and dipolar couplings: how can they help?

Justin Lorieau, Nick Fitzkee, Alex Grishaev, John Louis, Yang Shen, and OAd Bax (Laboratory of Chemical Physics, NIDDK, NIH)

18:00~20:30 Banquet / 懇親会 (Tower Hall 2F 桃源)

# 第3日目 11月17日(水)/ Day 3 (Nov. 17, Wed.) 日本語セッション / Japanese session

#### 9:30~10:45

#### 座長 楯 真一

- L18 Automated protein structure determinations from minimal sets of spectra using FLYA ○池谷 鉄兵<sup>1,2</sup>,池 畯求<sup>3</sup>,浜津 順平<sup>1</sup>,三島 正規<sup>1</sup>,伊藤 隆<sup>1</sup>,甲斐荘 正恒<sup>3,4</sup>, Peter Guentert<sup>2</sup> (<sup>1</sup>首都大理工,<sup>2</sup>Goethe-University Frankfurt 生物物理,<sup>3</sup>首都大戦略研究センター,<sup>4</sup>名大構造生物 学センター)
- L19 高分子量蛋白質の構造解析に適した安定同位体ラベル法および測定法の開発 Development of labeling strategies and pulse sequences suitable for structural analyses of large proteins ○竹内 恒<sup>1,2</sup>,高橋 栄夫<sup>1,3</sup>,嶋田 一夫<sup>1,4</sup>, Gerhard Wagner<sup>2</sup> (<sup>1</sup>産総研・バイオメディナル情報 研究センター,<sup>2</sup>ハーバード大医,<sup>3</sup>横浜市大院・生命ナノ,<sup>4</sup>東大院薬)
- L20 緩和分散解析用プログラム GLOVE Processing relaxation dispersion data with a new software GLOVE 〇菅瀬 謙治<sup>1,2</sup>, Jonathan C. Lansing<sup>2</sup>, Peter E. Wright<sup>2</sup> (<sup>1</sup>サントリー生有研, <sup>2</sup>The Scripps Res. Inst.)
- 10:45~11:00 休憩 / Break

#### 11:00~12:15

#### 座長 山本 泰彦

- L21 家蚕絹フィブロイン結晶部モデルペプチドのラメラ構造に関する固体 NMR 構造解析 Structural analysis of synthetic model peptides from crystalline domain of *Bombyx mori* silk fibroin using solid state NMR
   〇鈴木 悠,小川 達也,朝倉 哲郎(農工大工)
- L22 チオフラビンTが結合するポリグルタミン局所構造の固体 NMR 研究 Solid state NMR study on thioflavin T-bound polyglutamine local structure ○松岡 茂<sup>1</sup>,村井元紀<sup>1</sup>,山崎 俊夫<sup>2</sup>,井上 将行<sup>1</sup>(<sup>1</sup>東大院薬,<sup>2</sup>理研 SSBC)
- L23 脂質ラフトにおける分子間相互作用の固体 NMR 解析 Solid-State NMR Studies on Molecular Interactions in Lipid Rafts ○松森 信明,山口 敏幸,鈴木 孝,前田 佳子,安田 智一,岡崎 宏紀,大石 徹,村田 道雄 (阪大院理)

12:15~13:15 昼食 / Lunch

#### 13:15~14:45

#### ポスターセッション(奇数番号)

Poster Session (odd numbers)

14:45~16:00

#### 座長 内藤 晶

L24 NMR の信号と雑音 NMR signal and noise 〇竹腰 清乃理(<sup>1</sup>京大理)

- L25 マジック角円板回転法:薄膜試料のための新しい高分解能固体 NMR 法 DISK MAS: High-resolution solid-state NMR of a thin-film on a spinning disk at the magic-angle 〇犬飼 宗弘<sup>1</sup>,野田 泰斗<sup>1</sup>(<sup>1</sup>京大理)
- L26 ヒト脳組織の T<sub>2</sub>緩和機構 Mechanisms of T<sub>2</sub> relaxation of tissue water in human brain 〇三森 文行<sup>1</sup>, 渡邉 英宏<sup>1</sup>, 高屋 展宏<sup>1</sup>, Michael Garwood<sup>2</sup>, Edward J. Auerbach<sup>2</sup> (<sup>1</sup>国立環境研究 所, <sup>2</sup>Univ. of Minnesota)
- 16:00~16:15 休憩 / Break

#### 16:15~16:40

### 座長 三森 文行

L27 衣食住への植物バイオマス有効活用化を目指した異種相関解析技術の構築 Development of hetero correlation methods for effective use of plant biomass 〇菊地 淳<sup>1,2,3,4</sup>, 伊達 康博<sup>1,3</sup>, 坂田 研二<sup>3</sup>, 福田 真嗣<sup>5</sup>, 近山 英輔<sup>1,3</sup> (<sup>1</sup>理研 PSC, <sup>2</sup>理研 BMEP, <sup>3</sup>横市院生命, <sup>4</sup>名大院生命農, <sup>5</sup>理研 RCAI)

#### 16:40~17:30

### 座長 林 繁信

- L28 固体 <sup>15</sup>N NMR 法を用いたカーボンアロイ触媒の酸素還元活性の研究 Oxygen Reduction Activity of Pyrolyzed Polypyrroles studied by <sup>15</sup><sup>N</sup> solid-state NMR 〇黒木 重樹(東工大・院・理工)
- L29 固体 NMR による Al-MCM-41 ならびに類似触媒材料中の Al の配位環境解析 Solid-state NMR Analysis of Coordination Environment of Al in Al-MCM-41 and related catalyst materials 〇高橋 利和, 岩浪 克之, 林 繁信, 坂倉 俊康、安田 弘之(産総研)

# 17:30~17:35 閉会の挨拶 第 49 回 NMR 討論会世話人代表

# ー般ポスター発表 / Poster presentation

P1 固液界面における分子間相互作用の構造生物学的解析法の開発 Transferred Cross-Saturation Method under Magic Angle Spinning for Structural Analyses of Protein - Protein Interaction at the Solid - Liquid Interface ○豊永 翔<sup>1</sup>,大澤 匡範<sup>1</sup>,横川 真梨子<sup>1</sup>,嶋田 一夫<sup>1,2</sup>(<sup>1</sup>東大・院薬系,<sup>2</sup>産総研・バイオメデ ィシナル情報研究センター) 新しい NMR 差スペクトル法 P2 New NMR Difference Spectroscopy ○鵜澤 洵<sup>-1</sup>, 久保田 由美子<sup>-2</sup>, 堀 浩<sup>-3</sup>, 関 宏子<sup>-4</sup>, 丑田 公規<sup>-1</sup>(<sup>1</sup>理研基幹研, <sup>2</sup>微化研, <sup>3</sup>玉川大生命科学部,<sup>4</sup>千葉大分析センター) P3 低分子リガンド-標的タンパク質の新規エピトープマッピング法 A novel epitope-mapping method by NMR ○水越 弓子<sup>1,2</sup>,阿部 綾<sup>1,2</sup>,竹内 恒<sup>2</sup>,嶋田 一夫<sup>2,3</sup>,高橋 栄夫<sup>2,4</sup> (<sup>1</sup>(社)バイオ産業情報化) コンソーシアム,<sup>2</sup>(独) 産総研・バイオメディシナル情報研究センター,<sup>3</sup> 東大薬,<sup>4</sup> 横浜市大院・ 生命ナノ) 常磁性ランタニ ドプローブ法を用いた薬剤探索 P4 Paramagnetic lanthanide probe as a tool for drug discovery ○斉尾 智英<sup>1</sup>, 小椋 賢治<sup>2</sup>, 小橋川 敬博<sup>2</sup>, 横地 政志<sup>2</sup>, 稲垣 冬彦<sup>2</sup> (<sup>1</sup>北大生命, <sup>2</sup>北大先端生 命) P5 950 MHz NMR による蛋白質の<sup>13</sup>C 直接観測 <sup>13</sup>C-direct detection of protein using 950 MHz NMR ○古板 恭子 1, 池上 貴久 1, 藤原 敏道 1, 児嶋 長次郎 1.2 (1 阪大・蛋白研, 2 奈良先端大・バイ 才) P6 バイオマスの特性とその分解に関わる微生物叢の共相関解析の試み Correlation analysis of the microbiota responsible for a variety of biomass characters ○小倉 立己<sup>1</sup>, 伊達 康博<sup>1,2</sup>, 菊地 淳<sup>1,2,3,4</sup> (<sup>1</sup>横市大院生命, <sup>2</sup>理研 PSC, <sup>3</sup>名大院生命農, <sup>4</sup>理研 BMEP) P7 The Orange Domain of Basic-Helix-Loop-Helix Transcription Factor SHARP2 binds to class B E-box sequence Mohammed S. Mustak<sup>1</sup>, Riyo Yoshikawa<sup>1</sup>, Kazuya Takahashi<sup>1</sup>, Ojeiru F. Ezomo<sup>1</sup>, Yuta Nakamura<sup>1</sup>, KazuyaYamada<sup>2</sup>, OShunsuke Meshitsuka<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Institute of Regenerative Medicine and Biofunction, Graduate School of Medical Science, Tottori University, 86 Nishi-machi, Yonago 683-8503, Japan. <sup>2</sup>Department of Health and Nutritional Science, Faculty of Human Health Science, Matsumoto University, 2095-1 Niimura, Matsumoto, Nagano 390-1295 Japan) **P8** プリオンタンパク質への結合様式による抗プリオン化合物の分類と作用機構の解明 Classification of anti-prion compounds based on the binding properties of prion proteins ○鎌足 雄司, 早野 陽介, 山口 圭一, 細川-武藤 淳二, 桑田 一夫(岐阜大学人獣感染防御研究 センター) Musashil タンパク質-標的 RNA 複合体に含まれる新たな核酸塩基認識機構 P9 NMR Study of Musashi1 in complex with target RNA: The role of Aromatic stacking for specific RNA recognition ○大山 貴子<sup>1</sup>, 永田 崇<sup>2</sup>, 今井 貴雄<sup>3</sup>, 岡野 栄之<sup>3</sup>, 山崎 俊夫<sup>1</sup>, 片平 正人<sup>4</sup> (<sup>1</sup>理研・生命分 子システム、<sup>2</sup>横市大院・生命ナノシステム、<sup>3</sup>慶大・医、<sup>4</sup>京大・エネルギー理工学研究所)

- P10 乾燥・高塩およびジャスモン酸によって誘導されるイネ根特異的タンパク質 RSOsPR10 の構造機能解析
   Structure and function relationships of rice protein RSOsPR10, which is specifically induced in roots by drought, salt and jasmonic acid
   ○鈴木 倫太郎, 藤本 瑞, 土屋 渉, 山崎 俊正 (農業生物資源研究所)
   P11 IgAl ヒンジ領域のPro残基シス/トランス異性化平衡への糖鎖付加の影響とその構造的
  - 要因 Structural basis for the effect of glycosylation on cis/trans isomerization of prolines in IgA1-hinge peptide 〇山崎 和彦<sup>1</sup>,成松 由規<sup>2</sup>,古川 早苗<sup>2</sup>,森井 尚之<sup>1</sup>,成松 久<sup>2</sup>,久保田 智巳<sup>2</sup>(<sup>1</sup>産総研・バ イオメディカル,<sup>2</sup>産総研・糖鎖医工)
- P12 Mapping the Interactions of the Intrinsically Disordered p53 Transactivation Subdomains with the TAZ2 Domain of CBP by NMR ○新井 宗仁<sup>1,2</sup>, Josephine C. Ferreon<sup>1</sup>, H. Jane Dyson<sup>1</sup>, Peter E. Wright<sup>1</sup> (<sup>1</sup>The Scripps Research Institute, <sup>2</sup>東大総文)
- P13 Major facilitator superfamily トランスポーターLacY の輸送機構の解明 Elucidation of the transport mechanism of the major facilitator superfamily transporter LacY ○古川 大祐<sup>1</sup>, 吉浦 知絵<sup>1</sup>, 町山 麻子<sup>1</sup>, 湊 雄一<sup>1</sup>, 上田 卓見<sup>1</sup>, 嶋田 一夫<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>東大・院薬 系, <sup>2</sup>産総研・バイオメディシナル情報研究センター)
- P14 細胞質ダイニンの微小管親和性制御機構の解明
   Structural Mechanism for Affinity-Regulation of Cytoplasmic Dynein
   ○宝田 理<sup>1</sup>,西田 紀貴<sup>1</sup>,吉川 雅英<sup>2</sup>,嶋田 一夫<sup>1,3</sup> (<sup>1</sup>東大薬,<sup>2</sup>東大医, <sup>3</sup>BIRC, AIST)
- P15 In-cell NMR 法を用いた生細胞内におけるプロテイン G B1 ドメインの高次構造解析 Structure determination of protein G B1 domain in living cells by in-cell NMR spectroscopy ○花島 知美<sup>1</sup>, 浜津 順平<sup>1</sup>, 池谷 鉄平<sup>1</sup>, 三島 正規<sup>1</sup>, Peter G・ntert<sup>2</sup>, 白川 昌宏<sup>3</sup>, 伊藤 隆<sup>1</sup> (<sup>1</sup>首都大院・理工, <sup>2</sup>Frankfurt 大, <sup>3</sup>京大院・工)
- P16 転移交差飽和法を用いたインスリンーインスリン受容体の相互作用解析
   Direct Determination of the Insulin-Insulin Receptor Interface Using Transferred Cross-Saturation Experiments
   ○中村 壮史<sup>1,2,3</sup>,高橋 栄夫<sup>3</sup>,高橋 三雄<sup>1</sup>,榛葉 信久<sup>1,2,3</sup>,鈴木 榮一郎<sup>1,2</sup>,嶋田 一夫<sup>3,4</sup>
   (<sup>1</sup>味の素ライフ研,<sup>2</sup>バイオ産業情報化コンソーシアム,<sup>3</sup>産総研 BIRC,<sup>4</sup>東大薬)
- P17 気孔密度を正に制御するストマジェンの構造解析 Structure analysis of Stomagen: a positive regulator of stomatal density ○竹内 誠<sup>-1</sup>, 菅野 茂夫<sup>2</sup>, 嶋田 知生<sup>2</sup>, 西村 いくこ<sup>2</sup>, 森 正之<sup>3,4</sup>, 大木 進野<sup>-1,4</sup> (<sup>1</sup>北陸先端 大学院大,<sup>2</sup>京大理,<sup>3</sup>石川県立大,<sup>4</sup>JST 先端計測)
- P18 疎水性コア安定 化によるシトクロム c の熱安定性の増大と機能調節
   Enhancement of thermostability and control of redox activity of cytochrome c through stabilization of its hydrophobic core
   ○太 虎林,入江 清史,長友 重紀,山本 泰彦(筑波大院数物)
- P19 ミミズ由来 R型レクチン C 末端ドメインのラクトースとの結合状態での NMR 構造 NMR structure of the C-terminal domain of an R-type lectin from earthworm in the lactose-binding state ○逸見 光<sup>1</sup>, 久野 敦<sup>2</sup>, 海野 幸子<sup>2</sup>, 平林 淳<sup>2</sup>(<sup>1</sup>農研機構・食総研, <sup>2</sup>産総研・糖鎖医工学研 究センター)
- P20 巨大タンパク質複合体のモデル構築を目的とした残基選択的交差飽和法の開発
   Development of residue selective cross-saturation (RSCS) method for modeling a large protein-protein complex
   ○小澤 新一郎<sup>1</sup>, 五十嵐 俊介<sup>1</sup>, 鈴木 勉<sup>2</sup>, 甲斐荘 正恒<sup>3,4</sup>, 大澤 匡範<sup>1</sup>, 嶋田 一夫<sup>1,5</sup> (<sup>1</sup>東大 薬, <sup>2</sup>東大工, <sup>3</sup>名大理, <sup>4</sup>首都大東京戦略研究センター, <sup>5</sup> 産総研バイオメディシナル情報研究センター)

- P21 ウマミオグロビン二量体の NMR による構造研究
   Studies on the structure of horse myoglobin dimer by NMR spectroscopy
   ○長尾 聡,雨貝 真実,宇仁 武史,廣田 俊(奈良先端大物質創成)
- P22 CO 分子を外部配位子とするヘムー四重鎖 DNA 複合体の構造解析 Structural characterization of heme-DNA complex possessing CO molecule as an exogenous ligand ○斉藤 香織<sup>1</sup>, 太 虎林<sup>1</sup>, 長友 重紀<sup>1</sup>, 三田 肇<sup>2</sup>, 山本 泰彦<sup>1</sup>, 逸見 光<sup>3</sup>(<sup>1</sup>筑波大院数物, <sup>2</sup>福岡工大工・生命環境,<sup>3</sup>農研機構・食総研)
- P23 3D NOESY 測定に対する非線形サンプリングの有用性の検証
   Applications of nonlinear sampling scheme for 3D NOESY experiments
   ○大西 香穂里<sup>1</sup>, 重光 佳基<sup>1</sup>, 土江 祐介<sup>1</sup>, Daniel Nietlispach<sup>2</sup>, 三島 正規<sup>1</sup>, 池谷 鉄兵<sup>1</sup>, 伊藤
   隆<sup>1</sup> (<sup>1</sup>首都大院・理工, <sup>2</sup> Dept. of Biochem., Univ. of Cambridge)
- P24 NMR によるヒストンヌクレオソームコアの立体構造解析 The structural analysis of the nucleosome core by NMR spectroscopy
   ○森脇 義仁<sup>1</sup>, 佐藤 昌彦<sup>1</sup>, 長土居 有隆<sup>1</sup>, 立和名 博昭<sup>2</sup>, 胡桃坂 仁志<sup>2</sup>, 西村 善文<sup>1</sup>(<sup>1</sup>横浜 市大・生命ナノシステム・生体超分子システム科学,<sup>2</sup>早稲田大・理工学術院・先進理工学部)
- P25 溶液 NMR を用いた、ヒトチューブリンチロシン化酵素の構造解析 Structural analysis of the tubulin tyrosine ligase from human by solution NMR spectroscopy ○佐伯 邦道<sup>1</sup>,前崎 綾子<sup>2</sup>,伊藤 隆<sup>1</sup>,三島 正規<sup>1</sup>(<sup>1</sup>首都大院理工,<sup>2</sup>奈良先端科学技術大学院 大学)
- P26 準安定状態が安定化されたユビキチン変異体
  Higher energy state mutant of ubiquitin
  ○北沢 創一郎<sup>1</sup>, 矢木 真穂<sup>2,3</sup>, 菅瀬 謙治<sup>4</sup>, 加藤 晃一<sup>2,3</sup>, 北原 亮<sup>1</sup>(<sup>1</sup>立命大薬, <sup>2</sup>名市大院 薬, <sup>3</sup>岡崎統合バイオ, <sup>4</sup>サントリー生有研)

P27 酵母発現系を用いたタンパク質の安定同位体標識法の開発 -難発現高分子量タンパク質の立体構造解析に向けて一
Development of Isotope Labeling Strategy using Yeast Expression System -for a structural analysis of difficult to express large molecular weight proteins-○大浪 真由美<sup>1</sup>, 杉木 俊彦<sup>1</sup>, 竹内 恒<sup>2</sup>, 嶋田 一夫<sup>2,3</sup>, 高橋 栄夫<sup>2,4</sup> (<sup>1</sup>バイオ産業情報化コン ソーシアム,<sup>2</sup>産総研・バイオメディシナル情報研究センター,<sup>3</sup>東大院薬,<sup>4</sup>横浜市大院・生命ナ ノ)

- P28イネの SUMO 転移反応における結合酵素 E2 の多重結合部位の役割<br/>Roles of multi-binding sites of conjugating enzyme E2 in SUMOylation in rice<br/>〇土屋 渉,神藤 平三郎,鈴木 倫太郎,藤本 瑞,山崎 俊正(農業生物資源研究所)
- P29 細菌の走化性における連鎖的なシグナル伝達機構の構造生物学的解明 Structural Elucidation of the Sequential Signal Transduction Mechanism in Bacterial Chemotaxis ○凑 雄<sup>-1</sup>,町山 麻子<sup>1</sup>,上田 卓見<sup>1</sup>,嶋田 一夫<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>東大薬,<sup>2</sup>産総研バイオメディシナル情 報研究センター)
- P30平行型四重鎖 DNA で形成されるアデニン四量体(A-カルテット)の研究<br/>Structural characterization of A-quartet formed in all-parallel G-quadruplex DNA<br/>〇中野 佑亮,太 虎林,長友 重紀,山本 泰彦(筑波大院数物)
- P31 EB1 による微小管ダイナミクス制御機構についての構造研究
   Structural studies of the regulation of microtubule dynamics by EB1
   ○金場 哲平<sup>1</sup>, 森 智行<sup>2</sup>, 前崎 綾子<sup>2</sup>, 伊藤 隆<sup>1</sup>, 箱嶋 敏雄<sup>2</sup>, 三島 正規<sup>1</sup>(<sup>1</sup>首都大院理工, <sup>2</sup>奈良先端大情報)

- P32 溶液 NMR 法による MBF1/Jun/Fos/DNA 転写因子複合体の構造解析 Structural studies of the MBF1/Jun/Fos/DNA transcription factor complex by solution NMR 〇川崎 久美子<sup>1</sup>, 永井 義崇<sup>1</sup>, 広瀬 進<sup>2</sup>, 白川 昌宏<sup>3</sup>, 伊藤 隆<sup>1</sup>, 三島 正規<sup>1</sup>(<sup>1</sup>首都大理工, <sup>2</sup>国立遺伝研,<sup>3</sup>京大工)
- P33 Dynamics Study of Aromatic Rings by the SAIL-NMR Method upon Ligand Binding ○楊 淳竣<sup>1</sup>, 武田 光広<sup>2</sup>, JunGoo Jee<sup>1</sup>, 小野 明<sup>3</sup>, 寺内 勉<sup>3</sup>, 甲斐荘 正恒<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>首都大理工, <sup>2</sup>名大理, <sup>3</sup>SAIL テクノロジーズ)
- P34 タキプレシンとリポ多糖複合体の構造解析
   Structural analysis of Tachyplesin-LPS complex
   櫛引 崇弘<sup>1</sup>, ○神谷 昌克<sup>1</sup>, 相沢 智康<sup>1</sup>, 熊木 康裕<sup>2</sup>, 菊川 峰志<sup>1</sup>, 出村 誠<sup>1</sup>, 川畑 俊一郎<sup>3</sup>, 河野 敬一<sup>1</sup> (<sup>1</sup>北大院生命,<sup>2</sup>北大院理,<sup>3</sup>九大院理)

P35 NMR解析に基づくマウス外分泌ペプチドESP4の立体構造と受容体特異的認識に関する研究
Structure and specific ligand-receptor recognition mechanism of mouse peptide ESP4 based on NMR analyses
〇谷口 雅浩<sup>1</sup>, 吉永 壮佐<sup>1</sup>, はが 紗智子<sup>2</sup>, 東原 和成<sup>2</sup>, 寺沢 宏明<sup>1</sup> (<sup>1</sup>熊大院薬, <sup>2</sup>東大院農学 生命)

- P36 ピロ化 Aβのオリゴマー形成に関する構造生物学的研究
   Structural study for oligomerization of pyroglutamyl-amyloid beta peptides
   ○岩本 成人<sup>1</sup>, 斉藤 貴志<sup>2</sup>, 河野 俊之<sup>3</sup>, 西道 隆臣<sup>2</sup>, 寺沢 宏明<sup>1</sup> (<sup>1</sup>熊大院・薬,<sup>2</sup>理研・BSI, <sup>3</sup>三菱化学・生命研)
- P37 Mal TIR ドメインの溶液構造 Solution structure of Mal TIR domain 狩野 裕考<sup>1</sup>, 榎園 能章<sup>2</sup>, ○久米田 博之<sup>2</sup>, 小椋 賢治<sup>2</sup>, 瀬谷 司<sup>3</sup>, 稲垣 冬彦<sup>2</sup>(<sup>1</sup>北大院生命 科学構造生物,<sup>2</sup>北大先端生命構造生物,<sup>3</sup>北大院医学免疫)
- P38 In-cell NMR を用いた生細胞内におけるカルモジュリンN 末端ドメインの高次構造解析 Structure determination of Calmodulin N-terminal domain in living cells by in-cell NMR spectroscopy ○細谷 沙織<sup>1</sup>, 濱津 順平<sup>1</sup>, 佐々木 敦子<sup>1</sup>, 榊原 大介<sup>1</sup>, 三島 正規<sup>1</sup>, 吉益 雅俊<sup>2</sup>, 林 宣宏<sup>3</sup>, 伊藤 隆<sup>1</sup> (<sup>1</sup>首都大院・理工,<sup>2</sup>理研・生体超分子,<sup>3</sup>東工大院・生命理工)
- P39 (発表取消のため欠番)
- P40
   <sup>19</sup>F 標識タンパク質を用いたヒト細胞における in-cell NMR
   <sup>19</sup>F labeled protein NMR spectroscopy in human cells
   ○村山 秀平<sup>1</sup>, 猪股 晃介<sup>1</sup>, 大野 綾子<sup>2</sup>, 栃尾 豪人<sup>1</sup>, 白川 昌宏<sup>1</sup>(<sup>1</sup>京大院工, <sup>2</sup>徳大院医)
- P41 HMGB2 タンパク質に含まれる 2 つのドメインの相対配向とリンカーの役割
   Preferential domain orientation of a full length HMGB2 protein and the role of the linker region
   ○上脇 隼一<sup>1</sup>, 楯 直子<sup>2</sup>, 楯 真一<sup>1,3</sup> (<sup>1</sup>広島大学大学院・理,<sup>2</sup>武蔵野大学・薬, <sup>3</sup>SENTAN/JST)

P42 NMR を用いたフラグメント化及び再統合による低分子阻害剤の構築
 Development of a low molecular weight inhibitor by NMR-based fragmentation and defragmentation strategy
 ○小野 克輝<sup>1,2</sup>, 上田 寛<sup>3</sup>, 加藤-高垣 こずえ<sup>1,3</sup>, 谷村 隆次<sup>3</sup>, 竹内 恒<sup>2</sup>, 嶋田 一夫<sup>2,4</sup>, 高橋 栄夫<sup>2,5</sup> (<sup>1</sup>JBIC, <sup>2</sup>産総研・バイオメディシナル情報研究センター, <sup>3</sup>JBIC・東レ分室, <sup>4</sup>東大・院・薬学系, <sup>5</sup>横浜市大院・生命ナノ)

P43 主鎖<sup>15</sup>N 核の緩和時間測定による脂肪酸結合タンパク質 FABP4 の運動性の解析 Backbone dynamics of free and ligand-bound FABP4 studied by <sup>15</sup>N relaxation ○森戸 昭等<sup>1</sup>, 猪股 晃介<sup>1</sup>, 森川 耿右<sup>2</sup>, 杤尾 豪人<sup>1</sup>, 白川 昌宏<sup>1</sup> (<sup>1</sup>京大院・工,<sup>2</sup>阪大・蛋白 研)

- P44 べん毛フック長さ制御タンパク質 FliK の NMR 構造解析 Structure analysis of FliK by NMR 水野 志乃<sup>2</sup>, ○編田 宏一<sup>1</sup>, 小林 直宏<sup>3</sup>, 藤原 敏道<sup>3</sup>, 相沢 慎一<sup>2</sup>, 楯 真一<sup>1</sup>(<sup>1</sup>広島大・院理, <sup>2</sup>県立広島大・生命環境, <sup>3</sup>阪大・蛋白研)
- P45 高等植物フィトクロム・ヒスチジンキナーゼ様ドメインの ATPase 活性と構造解析 ATPase activity and structure analysis for histidine kinase like domain of higher plant phytochrome ○西ヶ谷 有輝<sup>1,2</sup>, Jee, JunGoo<sup>3</sup>, 田中 利好<sup>4</sup>, 河野 俊之<sup>4</sup>, 倉田 理恵<sup>1</sup>, 深尾 陽一朗<sup>1</sup>, 加藤 悦 子<sup>5,6</sup>, 高野 誠<sup>5</sup>, 山崎 俊正<sup>5</sup>, 児嶋 長次郎<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>奈良先端大・バイオ, <sup>2</sup>阪大・蛋白研, <sup>3</sup>首都 大・戦略研究センター、<sup>4</sup>三菱化学生命科学研、<sup>5</sup>農業生物資源研、<sup>6</sup>名大院・生命農)
- P46 バイセルに結合したマガイニン2の構造解析
   Structural analysis of Magainin 2 bound to phospholipid bicelles
   ○細田和男<sup>1</sup>,向 職<sup>1</sup>,稲岡斉彦<sup>1</sup>,河野俊之<sup>2</sup>,若松 馨<sup>1</sup>(<sup>1</sup>群大工,<sup>2</sup>三菱化学生命研)
- P47 Zc3h12a N 末端ドメインの溶液構造
   Solution structure of Zc3h12a N-terminal domain
   ○津嶋 崇<sup>1</sup>, 榎園 能章<sup>2</sup>, 足立 わかな<sup>2</sup>, 横地 政志<sup>2</sup>, 竹内 理<sup>3,4</sup>, 審良 静男<sup>3,4</sup>, 稲垣 冬彦<sup>2</sup>
   (<sup>1</sup>北大院生命科学構造生物,<sup>2</sup>北大先端生命構造生物,<sup>3</sup>阪大微研自然免疫,<sup>4</sup>阪大免疫学フロン ティア研究センター自然免疫)
- P48 リポカリン型プロスタグランジン D 合成酵素の 15d-PGJ<sub>2</sub> 認識機構
   Structural Analysis of 15d-PGJ<sub>2</sub> Recognition by Lipocalin-type Prostaglandin D Synthase
   ○加藤 信幸<sup>1</sup>, 島本 茂<sup>1,2</sup>, 吉田 卓也<sup>1</sup>, 秦 殊斌<sup>1</sup>, 小林 祐次<sup>3</sup>, 有竹 浩介<sup>4</sup>, 裏出 良博<sup>4</sup>, 大久保 忠恭<sup>1</sup> (<sup>1</sup>阪大院薬, <sup>2</sup>(独)学振特別研究員 DC, <sup>3</sup>大薬大, <sup>4</sup>大阪バイオ研)
- P49 溶液 NMR 法によるマルチドメイン蛋白質の構造決定の試み Attempt to determine three dimensional structure of an intact multi-domain protein by solution NMR ○宮崎 健介,金場 哲平,伊藤 隆,三島 正規(首都大理工)
- P50 In-cell NMR による高度好熱菌 TTHA1718 蛋白質の生細胞内動態解析
   <sup>15</sup>N NMR relaxation studies ofTTHA1718 protein in living cells by in-cell NMR spectroscopy
   ○濱津 順平<sup>1</sup>, Daniel Nietlispach<sup>2</sup>, 花島 知美<sup>1</sup>, 池谷 鉄兵<sup>1</sup>, 細谷 沙織<sup>1</sup>, 三島 正規<sup>1</sup>, 白川 昌宏<sup>3</sup>, 伊藤 隆<sup>1</sup> (<sup>1</sup>首都大理, <sup>2</sup>Dept. of Biochem., Univ.of Cambridge, <sup>3</sup>京大工)
- P51 NF-κB シグナリングに関わるユビキチン結合型 Zn<sup>2+</sup>フィンガードメインの構造・機能 解析 Structural and functional analyses of ubiquitin-binding Zn<sup>2+</sup> domain in NF-κB signaling pathway ○天野 剛志<sup>1</sup>,市川 大哉<sup>2</sup>,池上 貴久<sup>3</sup>,廣明 秀一<sup>1</sup>(<sup>1</sup>神戸大院医,<sup>2</sup>神戸大医,<sup>3</sup>阪大蛋白研)

P52 細胞内セラミド輸送タンパク質 CERT の小胞体-Golgi 体間局在変化を制御するリン酸化 依存的分子内相互作用の構造生物学的解析
Phospholyration dependent intramolecular interaction revealed by NMR might regulate ER-Golgi shuttling of CERT
○杉木 俊彦<sup>1</sup>,高橋 栄夫<sup>2,3</sup>,竹内 恒<sup>2</sup>,花田 賢太郎<sup>4</sup>,嶋田 一夫<sup>2,5</sup> (<sup>1</sup>バイオ産業情報化コン ソーシアム,<sup>2</sup>産総研・バイオメディシナル情報研究センター,<sup>3</sup>横浜市大院・生命ナノ,<sup>4</sup>国立感 染研・細胞化学,<sup>5</sup>東大院薬)

- P53 ループ変異による蛋白質ダイナミクスの変化−高圧法 NMR を用いた E.coli DHFR の研究 Effect of loop mutation on protein dynamics - A high pressure NMR study of E.coli DHFR ○Sunilkumar N. Puthenpurackal<sup>1,2</sup>,前野 覚大<sup>1,2</sup>,和田 侑士<sup>3</sup>,楯 真一<sup>3</sup>,赤坂 一之<sup>2</sup>(<sup>1</sup>近大生 物理工,<sup>2</sup>近大高圧蛋白研センター,<sup>3</sup>広大理)
- P54 アメロジェニンの自己集合の性質
   Self-assembly properties of amelogenin
   ○熊木 康裕<sup>1</sup>, 相沢 智康<sup>2</sup>, 神谷 昌克<sup>2</sup>, 出村 誠<sup>2</sup>, 河野 敬一<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>北大理, <sup>2</sup>北大先端生命)

- P55 コア変異による蛋白質ダイナミクスの変化-高圧 NMR 法を用いた staphylococcal nuclease V66K 変異体の研究
  Effect of mutation in the core on protein dynamics A high pressure NMR study of staphylococcal nuclease V66K.
  ○前野 覚大<sup>1,2</sup>,秦 和澄<sup>3</sup>,北原 亮<sup>4</sup>, Michael Chimenti<sup>5</sup>, Bertrand E. Garcia-Morene<sup>5</sup>, Julien Roche<sup>6</sup>, ChristianRoumestand<sup>6</sup>, Karine M. Guillen<sup>6</sup>, Catherine A. Royer<sup>6</sup>, 赤坂 一之<sup>2</sup> (<sup>1</sup>近大生物理工, <sup>2</sup>近大 高圧蛋白研センター, <sup>3</sup>立命大 GIRO, <sup>4</sup>立命大薬, <sup>5</sup>Johns Hopkins Univ. Biophysic, <sup>6</sup>INSERM.CBS)
- P56 IQGAP1 の CH ドメインの NMR 構造およびアクチン認識機構の解析 NMR structure of the CH domain of IQGAP1 and its implications for the actin recognition mode ○梅本 良<sup>1,2</sup>,西田 紀貴<sup>1</sup>, 荻野 新治<sup>1,2</sup>,嶋田 一夫<sup>1,3</sup> (<sup>1</sup>東大院薬, <sup>2</sup>JBIC, <sup>3</sup>BIRC,AIST)
- P57 ホメオボックス遺伝子産物 Six3 の Six domain の立体構造解析
   NMR studies on the six domain of Six3
   ○下條 秀朗<sup>1</sup>, 岡村 英保<sup>1</sup>, 長土居 有隆<sup>1</sup>, 池田 啓子<sup>2</sup>, 川上 潔<sup>2</sup>, 西村 善文<sup>1</sup> (<sup>1</sup>横浜市大・院生命ナノシステム,<sup>2</sup>自治医大・分子病態治療研究センター・細胞生物)
- P58 CD44 リガンド結合ドメインの構造平衡が細胞のローリング活性に与える影響の解明 CD44-mediated cell rolling regulated by two-state conformational equilibrium of the hyaluronan-binding domain.
  ○鈴木 美穂<sup>1</sup>, 西田 紀貴<sup>1</sup>, 荻野 新治<sup>1</sup>, 早坂 晴子<sup>2</sup>, 宮坂 昌之<sup>2</sup>, 嶋田 一夫<sup>1,3</sup> (<sup>1</sup>東大薬, <sup>2</sup>阪大医, <sup>3</sup>BIRC,AIST)
- P59 NMR 試料管内転写による RNA の NMR スペクトルの測定 In tube transcription for NMR measurement of RNA 斎藤 裕之<sup>1</sup>, 伊谷野 悠里<sup>1</sup>, 牛田 千里<sup>2</sup>, 清澤 秀孔<sup>3</sup>, ○河合 剛太<sup>1</sup> (<sup>1</sup>千葉工大工, <sup>2</sup>弘前大農 生, <sup>3</sup>遺伝研・新領域融合研究セ)
- P60 Nox5 の活性酸素発生機構の解明 Structural basis of Nox5 activation mechanism
   ○猪熊 聡夫<sup>1</sup>, 久米田 博之<sup>2</sup>, 本坊 和也<sup>2</sup>, 住本 英樹<sup>3</sup>, 稲垣 冬彦<sup>2</sup> (<sup>1</sup>北大院生命科学構造 生物,<sup>2</sup>北大先端生命構造生物,<sup>3</sup>九大医学生化学)

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 Structual analysis of FKBP12-drug complex by Lanthanoid probe – Fast screening method for stable LBT attached proteins using Differential Scanning Fluorometry 〇生塩 理尋<sup>1</sup>, 小橋川 敬博<sup>2</sup>, 斉尾 智英<sup>1</sup>, 関口 光広<sup>3</sup>, 横地 政志<sup>2</sup>, 小椋 賢治<sup>2</sup>, 稲垣 冬彦<sup>2</sup> (<sup>1</sup>北大生命, <sup>2</sup> 北大先端生命, <sup>3</sup> アステラス製薬)

- P62 Molecular mobility of protein in agarose gels OBona Dai<sup>1</sup>, Mika Hirose<sup>2</sup>, Shigeru Sugiyama<sup>2</sup>, Hiroyoshi Matsumura<sup>2</sup> and Shingo Matsukawa<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Tokyo University of Marine Science and Technology, <sup>2</sup>Grad. Sch. Engineering, Osaka University)
- P63 NMR studies of 56 kDa E. coli periplasmic nickel binding protein NikA.
   OJ. E. Jakus<sup>1</sup>, 土江 祐介<sup>1</sup>, 池谷 鉄兵<sup>1</sup>, 三島 正規<sup>1</sup>, D. Nietlispach<sup>2</sup>, J.R.H. Tame<sup>3</sup>, 伊藤 隆<sup>1</sup>
   (<sup>1</sup>首都大学東京大学院 理工学研究科, <sup>2</sup>Department of Biochemistry, University of Cambridge,
   <sup>3</sup>横浜市立大学 大学院生命ナノシステム科学研究科)
- P64 新規多糖類サクランの NMR 構造解析
   NMR structural analysis of novel polysaccharide, Sacran
   〇立山 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)
- P65 <sup>31</sup>P-HOESY 法によるカナマイシン 3'-リン酸の立体構造研究 Stereostructural study of kanamycin 3'-phosphate using <sup>31</sup>P-HOESY ○久保田 由美子<sup>1</sup>, 鵜澤 洵<sup>2</sup>, 梅沢 洋二<sup>1</sup>(<sup>1</sup>微化研, <sup>2</sup>理研基幹研)

- P66 High Order Spin 系の解析----Selective J-resolved HMQC 法の応用
   Selective J-resolved HMQC, A New Method for Measuring Proton-Proton Coupling Constants of High Order Spin System.
   ○降旗 一夫(東京大学 大学院農学生命科学研究科)
- P67 超高速 MAS のもとでの<sup>1</sup>H-<sup>14</sup>N 2 次元固体 NMR:1 μL 以下の微量試料を数分で測定 <sup>1</sup>H-<sup>14</sup>N 2D solid-state NMR under very fast MAS: A few minutes observation for a sample less than 1 μL 〇西山 裕介<sup>1</sup>, 遠藤 由宇生<sup>1</sup>, 根本 貴宏<sup>1</sup>, 黒子 弘道<sup>2</sup>, 内海 博明<sup>1</sup>, 山内 一夫<sup>3</sup>, 樋岡 克哉<sup>1</sup>, 朝倉 哲郎<sup>3</sup> (<sup>1</sup>日本電子, <sup>2</sup>奈良女子大, <sup>3</sup>農工大院工)
- P68 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 <sup>2</sup>H-decoupling-driven <sup>1</sup>H spin diffusion in triplet-DNP 〇根来 誠<sup>1</sup>,中山 顕貴<sup>1</sup>,立石 健一郎<sup>1</sup>,香川 晃徳<sup>1</sup>,武田 和行<sup>2</sup>,北川 勝浩<sup>1</sup>(<sup>1</sup>阪大基, <sup>2</sup>京大理)
- P69 1.03GHz 高温超伝導 NMR システムの開発 ~固体プローブの開発~ Towards a high temperature superconducting (HTS) NMR spectrometer operated at 1.03GHz
  - development of a 1.03GHz solid state NMR probe ○海老澤 佑輔<sup>1</sup>, 肥後 聡明<sup>1</sup>, 細野 政美<sup>2</sup>, 長谷 隆司<sup>3</sup>, 宮崎 隆好<sup>3</sup>, 藤戸 輝昭<sup>4</sup>, 山田 和彦<sup>5</sup>, 木吉 司<sup>6</sup>, 高橋 雅人<sup>1,7</sup>, 山崎 俊夫<sup>7</sup>, 前田 秀明<sup>1,7</sup> (<sup>1</sup>横浜市立大学, <sup>2</sup>日本電子, <sup>3</sup>神戸製鋼所, <sup>4</sup>プローブ工房, <sup>5</sup>東京工業大学, <sup>6</sup>物質・材料 研究機構, <sup>7</sup>理化学研究所 SSBC,)
- P70 固体 NMR によるアナベナセンサリーロドプシンの構造解析
   Solid-state NMR study of Anabaena Sensory Rhodopsin
   ○川村 出<sup>1,2</sup>, Lichi Shi<sup>2</sup>, Kwang-Hwang Jung<sup>3</sup>, Leonid Brown<sup>2</sup>, Vladimir Ladizhansky<sup>2</sup> (<sup>1</sup>横浜国 大, <sup>2</sup>Univ. Guelph, <sup>3</sup>Sogang Univ.)
- 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
   Structural analysis of the protofibrils of amyloid β-protein using solid-state NMR
   ○土井 崇嗣<sup>1</sup>, 増田 裕一<sup>1</sup>, 武田 和行<sup>1</sup>, 入江 一浩<sup>2</sup>, 竹腰 清乃理<sup>1</sup>(<sup>1</sup>京大理, <sup>2</sup>京大農)
- P72 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
  Dynamic structural analysis of transmembrane Halobacterial transducer protein, pHtrII by solid-state NMR spectral simulations
  〇池田 恵介<sup>1</sup>, 江川 文子<sup>1</sup>, 亀田 倫史<sup>2</sup>, 林 こころ<sup>3</sup>, 児嶋 長次郎<sup>1,3</sup>, 阿久津 秀雄<sup>1</sup>, 藤原 敏道<sup>1</sup> (<sup>1</sup>阪大蛋白研, <sup>2</sup>産総研 CBRC, <sup>3</sup>奈良先端大)
- P73 クモ牽引糸局所構造モデル化合物の安定同位体ラベルと固体 NMR 構造解析
   Isotope labeling of model peptides for local structure of spider dragline silk and the structural analysis using solid- state NMR
   ○佐藤 佑哉<sup>1</sup>, 中澤 靖元<sup>2</sup>, 朝倉 哲郎<sup>1</sup> (<sup>1</sup>農工大院工, <sup>2</sup>農工大科博)
- P74 アラニン連鎖ペプチドの分子間構造に関する固体 NMR による構造解析 Structural Analysis of Inter-molecular Arrangement of Alanine Oligopeptides using Solid State NMR ○亀谷 俊輔<sup>1</sup>, 鈴木 悠<sup>1</sup>, 青木 昭宏<sup>1</sup>, 西山 裕介<sup>2</sup>, 樋岡 克哉<sup>2</sup>, 朝倉 哲郎<sup>1</sup> (<sup>1</sup>農工大院工, <sup>2</sup>日本電子)
- P75 固体<sup>17</sup>O NMR によるメリチンの膜結合構造および配向の解析 Analysis of structure and orientation of melittin bound to membrane by solid state <sup>17</sup>O NMR ○田制 侑悟<sup>1</sup>,山田 和彦<sup>2</sup>,川村 出<sup>1</sup>,内藤 晶<sup>1</sup>(<sup>1</sup>横国大院工,<sup>2</sup>東工大院理工)
- 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-Solid State NMR of Membrane Protein Halorhodopsin Optimization of Isotope Labeling ○田巻 初<sup>1</sup>, 樋口 真理花<sup>1</sup>, 江川 文子<sup>2</sup>, 藤原 敏道<sup>2</sup>, 横山 順<sup>3,4,5</sup>, 木川 隆則<sup>3,4</sup>, 下野 和実<sup>3,6</sup>, 染谷 友美<sup>3</sup>, 白水 美香子<sup>3</sup>, 横山 茂之<sup>3,7</sup>, 神谷 昌克<sup>1</sup>, 菊川 峰志<sup>1</sup>, 相沢 智康<sup>1</sup>, 河野 敬一<sup>1</sup>, 出村 誠<sup>1</sup>(<sup>1</sup>北大院生命,<sup>2</sup>阪大蛋白研,<sup>3</sup>理研,<sup>4</sup>東工大,<sup>5</sup>大陽日酸,<sup>6</sup>松山大,<sup>7</sup>東大)

- 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 Analyses of amyloid fibrillation mechanism and its inhibition effect of hCT as studied by solid-state NMR ○渡邉(伊藤) ひかり<sup>1</sup>, 上平 美弥<sup>2</sup>, 近藤 正志<sup>3</sup>, 佐藤 道夫<sup>3</sup>, 中越 雅道<sup>3</sup>, 内藤 晶<sup>1</sup>(<sup>1</sup>横国 大工,<sup>2</sup>東北大多元研,<sup>3</sup>横国大機器分析評価センター)
- 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 Solid-solution transition analysis of cellulose upon ionic liquid pretreatments by monitoring its chemical shift perturbation
  ○森 哲哉<sup>1,2</sup>, 坪井 裕理<sup>3</sup>, 石田 亘広<sup>1</sup>, 志佐 倫子<sup>4</sup>, 則武 義幸<sup>4</sup>, 守屋 繁春<sup>3,5,7</sup>, 高橋 治雄<sup>1</sup>, 菊地 淳<sup>2,5,6,7</sup> (<sup>1</sup>豊田中研, <sup>2</sup>名大院農, <sup>3</sup>理研 ASI, <sup>4</sup>トヨタ自, <sup>5</sup>横市院生命, <sup>6</sup>理研 PSC, <sup>7</sup>理研バイオマス)
- P79 固体 <sup>13</sup>C NMR 法による MAS による天然ゴムの伸張構造の解析 Solid State <sup>13</sup>C NMR Study of Natural Rubber stretched by the MAS 浅野 敦志, ○北村 成史, 中澤 千香子, 黒津 卓三(防大応化)
- P80 高速試料回転下での CP における接触時間の考察
   Some Contact Time at Cross Polarization under Fast Magic Angle Sample Spinning
   芦田 淳(アジレント・テクノロジー グループバリアン・テクノロジーズ・ジャパン・リミテッド)
- P81
   <sup>23</sup>Na-MQMAS NMR 法による高分子 Na 塩の研究
   <sup>23</sup>Na-MQMAS NMR studies on Na ion complexes of polmers
   ○平沖 敏文<sup>1</sup>,藤江 正樹<sup>1</sup>,荒樋 周<sup>1</sup>,畠山 盛明<sup>2</sup>,齋藤 公児<sup>2</sup>(<sup>1</sup>北大院工,<sup>2</sup>新日鐵先端研)
- P82 リチウムイオン二次電池用微細孔セパレータ内のイオン拡散解析
   Analysis of ionic mobility in the porous separator for Li ion battery
   ○森川 卓也<sup>1</sup>,橋本 康博<sup>1</sup>,乙部 博英<sup>1</sup>,山本 挙<sup>1</sup>,吉野 彰<sup>2</sup>(<sup>1</sup>旭化成株式会社 基盤技術研究所,<sup>2</sup>旭化成株式会社 吉野研究室)
- P83 <sup>6</sup>Li/<sup>7</sup>Li MAS NMR による LiCoO<sub>2</sub>の構造解析
   <sup>6</sup>Li/<sup>7</sup>Li MAS NMR studies on LiCoO<sub>2</sub>
   ○村上 美和<sup>1</sup>,野田 泰斗<sup>2</sup>,竹腰 清乃理<sup>2</sup>,荒井 創<sup>1</sup>,内本 喜晴<sup>1</sup>,小久見 善八<sup>1</sup>(<sup>1</sup>京大産官 学連携本部,<sup>2</sup>京大理)
- P84 アルカリボロハイドライドにおけるイオンのダイナミクス
   Ion dynamics in alkali borohydrides
   ○治村 圭子,林 繁信(産業技術総合研究所 計測フロンティア研究部門)
- P85 ゼオライトにおけるブレンステッド酸点の観測
   NMR measurements of Bronsted acid sites on zeolites
   ○小島 奈津子、林 繁信(産総研計測フロンティア)
- P86 固体 NMR 法による酸化グラファイト層間内の C<sub>60</sub>分子の運動状態の研究 Solid-state NMR study of physical properties of C60 molecule intercalated in Graphite Oxide ○桑原 大介<sup>1</sup>, 井上 大輔<sup>2</sup>, 鈴木 勝<sup>1</sup>, 中村 敏和<sup>3</sup>, 石川 誠<sup>4</sup>, 三浦 浩治<sup>4</sup> (<sup>1</sup>電通大先進理 工,<sup>2</sup>電通大量子物質,<sup>3</sup>分子研,<sup>4</sup>愛教大物理)
- P87 固体 NMR による表面修飾 BN ナノ粒子の構造と修飾有機分子の結合状態
   Structures of surface-modified boron nitride nano-particles and bonding states of organic molecules studied by high-resolution solid-state NMR
   ○相馬 洋之,林 繁信((独)産総研)
- P88 固体 NMR による VHxDy(x+y≒0.8)の相構造の研究 Study of phase structures in VHxDy(x+y≒0.8) using solid-state NMR ○鈴木 陽, 林 繁信 (産総研)

- P89 ピロリン酸系プロトン導電体の固体 NMR
   Solid state NMR study of proton conductors based on metal pyrophosphates
   ○西田 雅一<sup>1</sup>, 源嵜 晃司<sup>2</sup>, 深谷 治彦<sup>1</sup>, 兼松 渉<sup>1</sup>, 日比野 高士<sup>2</sup> (<sup>1</sup>産総研中部, <sup>2</sup>名大院環境)
- P90 高磁場固体 <sup>43</sup>Ca NMR によるトバモライト生成過程の解析 Hydrothermal formation of tobermorite studied by solid-state <sup>43</sup>Ca NMR
   ○名雪 三依<sup>1</sup>,橋本 康博<sup>1</sup>,綱嶋 正通<sup>1</sup>,菊間 淳<sup>1</sup>,松野 信也<sup>1</sup>,丹所 正孝<sup>2</sup>,清水 禎<sup>2</sup>, 松井 久仁雄<sup>3</sup>(<sup>1</sup>旭化成(株),<sup>2</sup>(独)物質・材料研究機構,<sup>3</sup>旭化成建材(株))
- P91 ε-Keggin 型ポリ酸の固体 <sup>95</sup>Mo NMR Solid state <sup>95</sup>Mo NMR of ε-Keggin polyoxomolybdates
   ○飯島 隆広<sup>1</sup>, 西村 勝之<sup>1</sup>, 山瀬 利博<sup>2,3</sup>, 丹所 正孝<sup>4</sup>, 清水 禎<sup>4</sup> (<sup>1</sup>分子研, <sup>2</sup>MO デバイス, <sup>3</sup>東工大, <sup>4</sup>物材機構)
- P92 固体 NMR による微生物産生ポリアミノ酸およびそのポリマーブレンドの構造解析 Structural analysis of microbial poly(aminoacid)s and their polymer blends by solid NMR 前田 史郎<sup>1</sup>, ○黄前 真吾<sup>1</sup>, 熊 輝<sup>1</sup>, 国本 浩喜<sup>2</sup>(<sup>1</sup>福井大院工,<sup>2</sup>金沢大院自然)
- P93 固体 NMR を用いた石炭灰粘度に与える構造および組成因子の解析 Solid-state NMR analyses of structure and composition of coal ash 林 雄超<sup>1</sup>, ○出田 圭子<sup>2</sup>, 宮脇 仁<sup>2</sup>, 持田 勲<sup>3</sup>, 尹 聖昊<sup>2</sup>(<sup>1</sup>九大総理工, <sup>2</sup>九大先導研, <sup>3</sup>九大炭素センター)
- P94 超偏極<sup>129</sup>Xe NMR による触媒担体のポア評価
   Hyperpolarized<sup>129</sup>Xe NMR of Xe in Catalysis Pores
   ○服部 峰之<sup>1</sup>, 平賀 隆<sup>1</sup>,中田 真一<sup>2</sup>(<sup>1</sup>産総研光技術,<sup>2</sup>秋田大工学資源)
- P95 固体 NMR によるポリフルオレン膜の分子配向解析 Molecular orientation analysis of polyfluorene films ○福地 将志,福島 達也,後藤 淳,梶 弘典(京大化研)
- P96
   石炭の多核固体 NMR—有機成分と無機成分の構造—

   Multinuclear Solis-state NMR of Coal—Organic and Inorganic Structure—

   〇金橋 康二,高橋 貴文(新日鐵先端研)
- P97 無機化合物の固体<sup>1</sup>H NMR における高速 MAS と CRAMPS の分解能の比較 Comparison of spectral resolution between high-speed MAS and CRAMPS in <sup>1</sup>H solid-state NMR for inorganic compounds ○西浦 達也<sup>1</sup>,金橋 康二<sup>2</sup>(<sup>1</sup>三島光産株式会社,<sup>2</sup>新日本製鐵株式会社)
- P98 フッ素レス NMR プローブを用いた微量フッ素の化学形態解析 ○高橋 貴文<sup>1</sup>, 金橋 康二<sup>1</sup>, 根本 貴弘<sup>2</sup> (<sup>1</sup>新日本製鐵, <sup>2</sup>日本電子)
- P99 LED パッケージの劣化に関するマイクロプローブを用いた固体 NMR 構造解析 Structural analysis of LED package by solid-state NMR using micro probe 三輪 優子<sup>1</sup>, ○石田 宏之<sup>1</sup>, 三好 理子<sup>1</sup>, 樋岡 克哉<sup>2</sup>, 朝倉 哲郎<sup>3</sup>(<sup>1</sup>㈱東レリサーチセ, <sup>2</sup>日本電子㈱, <sup>3</sup>農工大院工)
- P100 配向試料の各種 NMR 法による評価 Characterizations of the oriented materials by NMR techniques 吉水 広明, 岡澤 誠裕, 奥村 祐生, 傘 俊人(名工大院工)
- 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 Investigation of the interaction mechanism between tea catechins and phospholipid membranes by NMR spectroscopy
   ○植草 義徳<sup>1,2</sup>, 上平(石島) 美弥<sup>2</sup>, 杉本 収<sup>2</sup>, 石井 剛志<sup>2</sup>, 熊澤 茂則<sup>2</sup>, 中村 浩蔵<sup>3</sup>, 丹治 健一<sup>2</sup>, 加藤 晃一<sup>1</sup>, 内藤 晶<sup>4</sup>, 中山 勉<sup>2</sup> (<sup>1</sup>岡崎統合バイオ, <sup>2</sup>静岡県大院・生活健, <sup>3</sup>信州大・農, <sup>4</sup>横浜国大院・工)

- P102 不飽和脂質を含有するバイセルに関する固体 NMR を用いた研究 Magnetic Alignment of Bicelle Composed of Un-, and Saturated Phosphatidylcholine as Studied by Solid State NMR Spectroscopy 上釜 奈緒子<sup>1</sup>, 辻 暁<sup>2</sup>, ○西村 勝之<sup>1</sup>(<sup>1</sup>分子科学研究所, <sup>2</sup>兵庫県立大学)
- 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 Non-uniformity correction of human brain imaging at high field using  $B_1^+$  and  $B_1^-$  mapping 〇渡邉 英宏, 高屋 展宏, 三森 文行 (国立環境研究所)
- 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
   detection of membranes by MR imaging with ultrasonic
   ○小倉 卓哉,新田 尚隆,本間 一弘(産業技術総合研究所)

P105 <sup>1</sup>H-NMR メタボロミクスの医療応用 ーその 3ーバイオフルイドにおけるマーカー定量 Quantitative NMR Metabolomics in Biofluid 安藤 一郎<sup>1</sup>, 廣瀬 卓男<sup>1</sup>, 竹内 和久<sup>1,2</sup>, 今井 潤<sup>1</sup>, 佐藤 博<sup>1</sup>, ○藤原 正子<sup>1</sup>(<sup>1</sup>東北大薬, <sup>2</sup>(医) 宏人会)

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
Correlation analysis between phytochemicals and insect genetic traits involved in plant-insect-symbiont interactions for field-harvested samples.
○佐々木 宏和<sup>1,2</sup>, 土田 努<sup>3</sup>, 坪井 裕理<sup>2</sup>, 近山 英輔<sup>1,2</sup>, 菊地 淳<sup>1,2,4,5</sup> (<sup>1</sup>横市院・生命, <sup>2</sup>理研・PSC, <sup>3</sup>理研・ASI, <sup>4</sup>名大院・生命農, <sup>5</sup>理研・BMEP)

- P107 フェリチンを含むゼラチンゲル中における水のT<sub>2</sub>緩和速度
   Transverse relaxation rate of the water molecule in gelatin gel doped with ferritin.
   ○高屋 展宏,渡邉 英宏,三森 文行(国立環境研究所)
- 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
   Investigation of metabolic profiling methods for aquatic organism from Keihin region
   葭田 征司<sup>1</sup>, 守屋 繁春<sup>1,2,3</sup>, 菊池 淳<sup>1,2,4,5</sup> (<sup>1</sup>横市院・生命,<sup>2</sup>理研・BMEP,<sup>3</sup>理研・ASI,<sup>4</sup>理研・PSC,<sup>5</sup>名大院・生命農)

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
A new tool using ontology engineered data structure, MagRO system, designed for NMR data analysis, validation and deposition to the public database.
○小林 直宏, 原野 陽子, 池上 貴久, 児嶋 長次郎, 佐藤 純子, 中村 春木, 阿久津 秀雄, 藤原 敏道 (大阪大学蛋白質研究所)

P110 迅速かつ堅牢な NMR スペクトル解析支援技術の開発 Development of assistive technique for efficient and robust NMR spectral analysis ○横地 政志<sup>1</sup>, 小橋川 敬博<sup>1</sup>, 齊尾 智英<sup>2</sup>, 稲垣 冬彦<sup>1</sup> (<sup>1</sup>北大先端 生命, <sup>2</sup>北大生命科学)

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 Chemical shift-structure correlation with ab initio quantum chemical methods and classical molecular dynamics
○近山 英輔<sup>1,2</sup>,尾形 善之<sup>1</sup>,森岡 祐介<sup>2</sup>,菊地 淳<sup>1,2,3</sup> (<sup>1</sup>理研 PSC,<sup>2</sup>横浜市大院生命ナノ, <sup>3</sup>名大院生命農)

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
 Mandatory chemical shift deposition to PDB/BMRB with biological NMR structures
 ○中谷 英一<sup>1,2</sup>,小林 直宏<sup>2</sup>,原野 陽子<sup>2</sup>,松浦 孝則<sup>2</sup>,阿久津 秀雄<sup>2</sup>,中村 春木<sup>2</sup>,藤原 敏道<sup>2</sup>
 (<sup>1</sup>科学技術振興機構-BIRD、<sup>2</sup>阪大蛋白研)

- 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 Sensitivity enhancement of high-resolution solid-state NMR: a Cryocoil MAS probe's approach ○水野 敬<sup>1</sup>,野田 泰斗<sup>2</sup>,竹腰 清乃理<sup>2</sup>(<sup>1</sup>日本電子(株),<sup>2</sup>京大理)
- 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
   Validation of NMR process parameters in quantitation of organic compounds
   〇三浦 亨,齋藤 剛,大手 洋子,井原 俊英(独立行政法人 産業技術総合研究所 計測標準研究部門)
- P116 体内に飲み込まれた物質の NQR による検知 Detection of substances hidden in the body using NQR ○山根 千英<sup>1</sup>, 中原 優<sup>1</sup>, 篠原 淳一郎<sup>1</sup>, 赤羽 英夫<sup>1</sup>, 糸崎 秀夫<sup>1</sup>(<sup>1</sup>阪大基)
- P117 NQR 周波数探査用 NQR・NMR 二重共鳴分光装置の開発
   Development of an NQR・NMR double resonance spectrometer to search for NQR frequencies
   ○赤羽 英夫, Bryn Baritompa, 篠原 淳一郎, 糸崎 秀夫(大阪大学 大学院基礎工学研究科)
- P118 SDBS の NMR データ品質向上を目指した取り組み
   Our activities on construction of reliable SDBS-NMR data
   ○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)
- P119 NQR 共鳴周波数自動探査装置 Automatic scanning for NQR frequencies ○篠原 淳一郎<sup>1</sup>, 中原 優<sup>1</sup>, 赤羽 英夫<sup>1</sup>, 糸﨑 秀夫<sup>1</sup>(<sup>1</sup>阪大基)

# 口頭発表要旨

# **Lecture Abstracts**

# 第一日目 11月15日(月) 日本語セッション

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

# **L1** 過渡的に形成される立体構造の常磁性緩和効果による 解析 〇三島正規<sup>1</sup>金場哲平<sup>1</sup>伊藤隆<sup>1</sup>箱嶋敏雄<sup>2</sup>三神すずか<sup>1</sup> <sup>1</sup>首都大学東京、理工学研究科

2奈良先端科学技術大学院大学、情報科学研究科

# Structural studies of transient structures using PRE

•Masaki Mishima<sup>1</sup>, Teppei Kanaba<sup>1</sup>, Yutaka Ito<sup>1</sup>, Toshio Hakoshima<sup>2</sup>, Suzuka Mikami<sup>1</sup> <sup>1</sup>Graduate school of Science and Engineering, Tokyo Metropolitan University <sup>2</sup>Graduate school of Information Science, Nara Institute of Science and Technology

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

# 【研究背景・目的】

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

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

Key words; PRE、 過渡的構造、 構造解析

○みしま まさき、かなば てっぺい、いとう ゆたか、はこしま としお、みかみ すずか 【Rho-kinase のスプリット PH ドメインの 構造解析】

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

# 【SHARP/SMRT 複合体の構造解析】

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

我々は SPR、ITC、NMR を用いた解析か ら、SMRT の特定のアミノ酸のリン酸化に よって SPOC ドメインとの相互作用が約 1000 倍増強されることを新たに見出した。



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



Fig. 2 Close up view of structure of the SHARP/SMRT compelx

SHARP and SMRT are drawn as line and stick, respectively.

興味深いことに複合体の SPOC ドメインの NMR スペクトルは、リン酸化 SMRT を用 いた場合でも非リン酸化 SMRT を用いた相互作用が弱い場合でもほぼ同一であった。 これはリン酸化に関わらずほぼ同様な複合体を形成することを示している。リン酸化 を受けなくても SMRT はあるポピュレーションで複合体を形成(準備)しているが、リ ン酸化が起こると、ただちに複合体形成へ平衡が移動するとも考えられる。現在まで に SPOC ドメイン/リン酸化 SMRT 複合体の立体構造を決定した(Fig. 2)。その複合体 形成機構の詳細と NMR 解析について議論する。 45kDaプロテインキナーゼVRK1のNMR構造解析

○栃尾尚哉<sup>1</sup>、小柴生造<sup>1,2</sup>、横山順<sup>3</sup>、横山茂之<sup>1,4</sup>、Ho Sup Yoon<sup>5</sup>、 木川隆則<sup>1,6</sup> <sup>1</sup>理研・生命分子システム基盤、<sup>2</sup>横浜市大・院生命ナノシステム、 <sup>3</sup>大陽日酸(株)・つくば研、<sup>4</sup>東大・院理、<sup>5</sup>ナンヤン工科大・SBS、 <sup>6</sup>東工大・院総理工

# NMR structural analysis of 45 kDa protein kinase, VRK1

○Naoya Tochio<sup>1</sup>, Seizo Koshiba<sup>1,2</sup>, Jun Yokoyama<sup>3</sup>, Shigeyuki Yokoyama<sup>1,4</sup>, Ho Sup Yoon<sup>5</sup>, and Takanori Kigawa<sup>1,6</sup>

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

Vaccinia related kinase 1 (VRK1) is a serine/threonine protein kinase composed of 396 amino acid residues (M.W. 45 kDa), which is known to mediate the cell response to DNA damage by phosphorylation of the p53 tumor suppressor. Toward the structure determination of VRK1, we prepared various kinds of stable-isotope labeled samples and then tried many kinds of NMR experiments. With respect to the sample preparation, we applied the cell-free protein synthesis system to produce the highly deuterated samples, the amino acid-selective labeled samples. As for the NMR analyses, we had successfully assigned about 90% of the backbone resonances using the standard TROSY-type experiments and the amino acid-selective labeling technique. The methyl resonances of 11e, Leu, Val, Ala, and Met were assigned using the HMCM[CG]CBCA and/or a series of 3D/4D NOESY experiments. We also measured residual dipolar couplings aligned in polyacrylamide gel. Based on these data, we have successfully determined the solution structure of human VRK1. We will discuss general aspects of structure determination of proteins with the large molecular weight by using NMR spectroscopy.

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

# VRK1, 選択標識, 無細胞タンパク質

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



Figure 1. Methyl regions of <sup>1</sup>H,<sup>13</sup>C HSQC spectra of (a) ILVF- and (b) ILVFMA-selective labeled VRK1.



Figure 2. Solution structure of human VRK1.

-37-

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

○小椋賢治,久米田博之,稲垣冬彦 北海道大学大学院先端生命科学研究院

# Structure determination of proteins in <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O solution aided by a deuterium-decoupled 3D HCA(N)CO experiment <sup>(1)</sup> Kenji Ogura, Hiroyuki Kumeta and Fuyuhiko Inagaki Faculty of Advanced Life Science, Hokkaido University

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

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

3D HCA(N)CO, <sup>2</sup>H decoupling, GB1

○おぐらけんじ、くめたひろゆき、いながきふゆひこ

The deuterium-decoupled 3D HCA(N)CO experiment (Fig. 1) is used to obtain inter-residue (and weaker intra-residue) connectivities between the  ${}^{1}\text{H}\alpha$ ,  ${}^{13}\text{C}\alpha$  and  ${}^{13}\text{C}'$  nuclei. The pulse sequence is a so-called 'out-and-back' style. The final magnetization transfer path from  ${}^{13}\text{C}\alpha$  to  ${}^{1}\text{H}\alpha$  uses a gradient-enhanced scheme. For proteins dissolved in  ${}^{2}\text{H}_{2}\text{O}$ , the  ${}^{15}\text{N}$  T<sub>2</sub> elongation due to  ${}^{2}\text{H}$ -decoupling during the  ${}^{15}\text{N}$  evolution or delay period is helpful to allow sensitivity enhancement of this experiment.



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

with an rf field of 15.6 kHz. Carbonyl pulses have a shaped amplitude profile corresponding to the center lobe of a sin *x*/x function, and a duration of 89.2 and 80.8 µs for the 90° and 180° pulses, respectively. Durations are  $\epsilon = 1.6$  ms,  $\Delta = 3.3$  ms,  $\delta = 14$  ms,  $\zeta = 14$  ms, T = 14 ms, and  $\xi = 0.6$  ms. Phase cycling is as follows:  $\phi_1 = 4(y)$ , 4(-y):  $\phi_2 = 8(x)$ , 8(-x);  $\phi_3 = 2(x)$ , 2(-x);  $\phi_4 = 60°$ ;  $\phi_5 = x, -x$ ;  $\phi_6 = x$ ; Acq. = x, -x, -x, x, z = 2(-x, x, -x), x, -x, -x, -x, x. Quadrature detection in  $t_2$  is obtained by inverting the polarity of  $G_3$  together with  $\phi_6$ . The strengths and durations of gradients are:  $G_1 = (0.5 \text{ ms}, 13 \text{ G/cm})$ ,  $G_2 = (1 \text{ ms}, 15 \text{ G/cm})$ ,  $G_3 = (0.3 \text{ ms}, 10 \text{ G/cm})$ ,  $G_4 = (0.4 \text{ ms}, 23 \text{ G/cm})$ ,  $G_2 = (0.5 \text{ ms}, 24 \text{ G/cm})$ ,  $G_6 = (0.5 \text{ ms}, 2 \text{ G/cm})$ ,  $G_7 = (0.5 \text{ ms}, 24 \text{ G/cm})$ .

NMR experiments were carried out at 25°C on a sample of  ${}^{13}C/{}^{15}N$ - labeled 1.2 mM *Streptococcal* GB1 domain dissolved in  ${}^{2}H_{2}O$ . The one- and three-dimensional spectra of HCACO, HCA(CO)N, HCAN, and HCA(N)CO were recorded on a Varian Inova 600 spectrometer. Figure 2 shows a comparison of the 1D spectra of HCACO, HCA(CO)N, HCAN, and HCA(N)CO with or without  ${}^{2}H$  decoupling. As expected, HCACO (Fig. 2a)

showed the highest sensitivity among the experiments. The sensitivities of other three spectra relative to the HCACO spectrum were 0.28 for HCA(CO)N (Fig. 2b), 0.47 for HCAN (Fig. 2c), and 0.13 for HCA(N) CO without <sup>2</sup>H decoupling (Fig. 2d). As the low sensitivity of the HCA(N)CO experiment was mainly due to the long delay time, we thought that <sup>2</sup>H



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

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

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

Fig. 3 Strips from a 3D HCA(N)CO and b 3D HCACO spectra of GB1 in  $^{2}$ H<sub>2</sub>O taken at the  $^{13}$ Cx,  $^{14}$ Hz chemical shifts of the residue indicated along the x-axis. Solid and dashed lines indicate the sequential backbone assignment paths using  $^{13}$ C' elsemical shifts from Thr 17 to Ala 26 of the GB1 domain



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

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



All heavy atoms

0.99

1.00

GB1 domain calculated using distance restraints derived from the <sup>13</sup>C-edited NOESY in <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O (a) and the <sup>13</sup>C- and <sup>15</sup>N-edited NOESY in H<sub>2</sub>O (b)

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

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

# 蛋白質側鎖OH/SHの水素交換速度の解析

○武田光広<sup>1</sup>、Chun-Jiun Yang<sup>2</sup>、JunGoo Jee<sup>2</sup>、小野明<sup>3</sup>、寺内勉<sup>3</sup>、 甲斐荘正恒<sup>1, 2</sup> <sup>1</sup>名大院・理<sup>2</sup>首都大院・理工 <sup>3</sup>SAIL テクノロジーズ (株)

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

OMitsuhiro Takeda<sup>1</sup>, Chun-Jiun Yang<sup>2</sup>, JunGoo Jee<sup>2</sup>, Akira Mei Ono<sup>3</sup>, Tsutomu Terauchi<sup>3</sup> and Masatsune Kainosho<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup> Graduate School of Science, Nagoya University, Nagoya, Japan.

<sup>2</sup> Graduate School of Science and Engineering, Tokyo Metropolitan University.

<sup>3</sup> SAIL Technologies

Side-chain hydrogen bonds in proteins play an important role in stabilizing their structures and mediating their functions. Especially, slowly exchanging hydroxyl (OH) and sulfhydryl (SH) groups are assumed to have structurally or functionally important roles. However, there were no means to exclusively identify such slowly exchanging OH/SH groups in proteins. Here we present a new method for evaluating the hydrogen exchange rates of individual side-chain OH/SH groups in a protein. In this approach, the carbon atoms attached to the OH/SH groups are selectively enriched by  $^{13}$ C, and their NMR signals are observed in a H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O mixture, where isotopomer-resolved peaks are observed for slowly exchanging groups. We present the application of this method in terms of protein structure determination and interactions.

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

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

SAIL, 側鎖交換性水素, 水素結合

Oたけだみつひろ、ちゅんじうん やん、じゅんぐー じー、おの あきら、てらうち つとむ、かいのしょうまさつね その成否は同位体シフトによるシグナル分 裂を明瞭に観測可能か否かにある。そこで、 我々はSAIL技術[1]を利用し本解析に最適 な安定同位体標識パターンを持つ各種アミ ノ酸を合成した。例えば、チロシンOHの解 析の場合、芳香環の<sup>13</sup>C<sub>ζ</sub>原子が観測対象とな るので、Fig. 1に示す安定同位体標識パタ ーンを持つ、ζ-SAIL Tyrを合成した。同ア ミノ酸の芳香環は、<sup>13</sup>C<sub>ζ</sub>以外の芳香族炭素は <sup>12</sup>Cとしている。また、芳香族水素はε位を重 水素化して、<sup>1</sup>H<sub>δ</sub>-<sup>13</sup>C<sub>ζ</sub>間相関スペクトルによ る<sup>13</sup>C<sub>ζ</sub>の帰属を可能としている。ζ-SAIL Tyr を分子量 18.2 kDaの大腸菌シストランスイ

ソメラーゼ(EPPIb)に取り込 ませその<sup>13</sup>C スペクトルを測 定すると、尖鋭な<sup>13</sup>C<sub>c</sub>シグナル が観測された(Fig. 2)。同タ ンパク質は、3残基のチロシ ン(30, 36, 120)を含むが、軽 水/重水(1:1)混合溶媒におい ては、Tyr-30 と Tyr-36 にお いて<sup>13</sup>C(-OH)と<sup>13</sup>C(-OD)の位置 に対応したシグナルが分離し て観測されたのに対して、 Tyr-120 においては、その中 間の位置に平均化されたシグ ナルが観測された。この結果 は、前者 2 つの0Hの交換速度

が同位体シフト差の時間ス ケール(この場合 ~40 s<sup>-1</sup>) より遅く、後者はそれより速 いことを示す[2]。

本発表では、同原理に基づ く、EPPIb蛋白質中のシステ HO  $I_{3C}$  D H  $I_{3C}$   $I_{3C}$ 

**Figure 1.** Stable isotope labeling pattern of  $\zeta$ -SAIL Tyr. <sup>12</sup>C atoms are not shown in the figure.



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

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

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

#### [参考文献]

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

# 高圧力 NMR 法による Lys48 結合型ジュビキチンの構造揺らぎ

〇北原亮、平野貴志、矢木真穂、秦和澄、赤坂一之、加藤晃一 立命大・薬<sup>1</sup>、名市大院・薬<sup>2</sup>、岡崎統合バイオ分子研<sup>3</sup>、近大・高圧研<sup>4</sup>

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

Ryo Kitahara<sup>1</sup>, Takashi Hirano<sup>2</sup>, Maho Yagi<sup>2,3</sup>, Kazumi Hata<sup>1</sup>, Kazuyuki Akasaka<sup>4</sup> and Koichi Kato<sup>2,3</sup>

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

Comparisons of pressure induced changes in chemical shifts and spin-spin relaxation constants  $R_2$  between mono-ubiquitin and K48-linked linear diubiquitin at neutral pH, showed that high pressure stabilized the "open" conformation for the linear diubiquitin. In addition, both proximal and distal subunits exhibited the alternative form N<sub>2</sub> under high pressure as observed in mono-ubiquitin. Intriguingly, the pressure induced N<sub>1</sub>-to-N<sub>2</sub> conformational transition also took place in the subunits of cyclic diubiquitin which was a model of the "closed" form of diubiquitin. The transition into N<sub>2</sub> taking simultaneous reorientations of the C-terminal segment and helix could render the interfacial hydrophobic groups between the subunits well hydrated, resulting in the "open" conformation of linear and cyclic diubiquitin. We think that the open-closed motion of diubiquitin is tightly coupled with the intrinsic conformational fluctuation of subunits.

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

高圧力、ポリユビキチン、構造揺らぎ

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



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

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

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

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

スピンースピン緩和速度定数の圧力依存性から、直鎖型ジユビキチンの遠位、近位 サブユニットともに、加圧によりαヘリックスとC末端βストランド部分で R2値の 増加が観測された。この結果は以前報告した単体のそれと類似ており、各サブユニッ トで N2構造への状態転移が生じていることを示す。一方、環状ジユビキチンでは、 αヘリックスとC末端βストランド部分に加え、サブユニット界面の多くの部位で僅 かながら R2の増加が観測された。環状ジユビキチンにおいても、水和した open 様構 造へ転移したことを示し、転移がマイクロ~ミリ秒領域で生じていることも示唆する。 環状ジユビキチンの例が示すように、分子全体のコンフォメーション変化が、サブユ ニットが有する固有の3次構造揺らぎとともに生じている点は大変興味深い。
# 第二日目 11月16日(火) 英語セッション

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

### **蛋白質・ペプチドの溶液 NMR へのスルホベタイン類の応用** 〇若松 馨<sup>1</sup>, 王 海梅<sup>1</sup>, 五十嵐 麗樹<sup>1</sup>, 神谷 歩<sup>1</sup>, 高橋 雅彦 <sup>1</sup>, 手塚 福栄<sup>1</sup>, 向 瓏<sup>1</sup>, 石井 毅<sup>1</sup>, 細田 和男<sup>1</sup>, 行木 信一<sup>1</sup>, 菅瀬 謙治<sup>2</sup> <sup>1</sup>群大・工 <sup>2</sup>サントリー生物有機科学研究所

### Application of sulfobetaines to solution NMR of proteins and peptides

oKaori Wakamatsu<sup>1</sup>, Haimei Wang<sup>1</sup>, Kazuki Igarashi<sup>1</sup>, Ayumi Kamiya<sup>1</sup>, Masahiko Takahashi<sup>1</sup>, Fukuei Tezuka<sup>1</sup>, Long Xiang<sup>1</sup>, Takeshi Ishii<sup>1</sup>, Kazuo Hosoda<sup>1</sup>, Nobukazu Nameki<sup>1</sup>, Kenji Sugase<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Graduate School of Engineering, Gunma University, Kiryu, Gunma, Japan.* <sup>2</sup>*Suntory Institute for Bioorganic Research, Shimamoto-cho, Osaka, Japan.* 

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

【はじめに】

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

【結果】

(1) サンプル調製への NDSB の応用:

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

安定化、凝集、サンプル調製

○わかまつ かおり,おう かいばい,いがらし かずき,かみや あゆみ,たかはし まさひこ,てづか ふくえい,こう りゅう,ほそだ かずお,なめき のぶかず,すが せ けんじ プチドは凝集してアミロイド化しやすいという問題があった. 我々が合成した NDSBnew は m4I3C(14)のアミロイド化を防止し,分解能の高いスペクトルを与えた.

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

(2) NDSB と他の凝集防止剤との比較:

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

(3) NDSB が蛋白質の安定性を向上させるメカニズム:

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

(4) NDSB の利用方法:

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

# L7

## Allosteric Control of Environmental Sensors

### Kevin H. Gardner<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departments of Biochemistry and Pharmacology, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, TX USA

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

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

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

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

**L8** 

RNAアプタマー: プリオンタンパク質部分ペプチド複合体の 構造及びA3Gタンパク質のDNA上のスライディングの解析 古川亜矢子<sup>1</sup>, 真嶋司<sup>1</sup>, 岩岡諒<sup>1</sup>, 越田高史<sup>1</sup>, 永田崇<sup>2</sup>, 森下了<sup>3</sup>, 梁明秀<sup>4</sup>, 高 折晃史<sup>5</sup>, 西川富美子<sup>6</sup>, 西川諭<sup>6</sup>, 〇片平正人<sup>1</sup> <sup>1</sup>京大・エネ研, <sup>2</sup>横市大・生命ナノ, <sup>3</sup>セルフリーサイエンス, <sup>4</sup>横市大・ 医, <sup>5</sup>京大・医, <sup>6</sup>産総研

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

Ayako Furukawa<sup>1</sup>, Tsukasa Mashima<sup>1</sup>, Ryo Iwaoka<sup>1</sup>, Takafumi Koshida<sup>1</sup>, Takashi Nagata<sup>2</sup>, Ryo Morishita<sup>3</sup>, Akihide Ryo<sup>4</sup>, Akifumi Takaori<sup>5</sup>, Fumiko Nishikawa<sup>6</sup>, Satoshi Nishikawa<sup>6</sup> and OMasato Katahira<sup>1</sup>

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

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

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

[序]

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

アプタマー,リアルタイムモニタリング,プリオン

ふるかわあやこ,ましまつかさ,いわおかりょう,こしだたかふみ,ながたたかし,もり したりょう,りょうあきひで,たかおりあきふみ,にしかわふみこ,にしかわさとし,○ かたひらまさと ②A3Gタンパク質の酵素反応のリアルタイムモニタリングとスライディングモデルの 検証 我々は昨年、抗HIV活性を有するヒトA3Gタンパク質の酵素(デアミネーション) 反応を、NMRシグナルを用いてリアルタイムでモニタリングできる事を示した。そし てこのモニタリングの結果、A3GがDNA上を3'--->5'の方向性を持ってスライディン グする事が示唆された。今回モニタリングの手法のさらなる応用を行い、スライディ ングモデルの検証を行った結果を報告する。

#### [結果と考察]

#### ①プリオンタンパク質に対するRNAアプタマーの複合体の解析

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

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

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

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

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

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

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

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

Yoshie Fujiwara<sup>1</sup>, Ken-ichiro Fujiwara<sup>2</sup>, Natsuko Goda<sup>1</sup>, Naoko Iwaya<sup>1, 3</sup>, Takeshi Tenno<sup>1</sup>, Masahiro Shirakawa<sup>3</sup>, OHidekazu Hiroaki<sup>1, 2</sup>, and Daisuke Kohda<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Division of Structural Biology, Graduate School of Medicine, Kobe University, Hyogo, Japan.

<sup>2</sup>Shionogi Reserch Laboratories, Shionogi & Co., Osaka, Japan

<sup>3</sup>Division of Molecular Engineering, Graduate School of Engineering, Kyoto University, Kyoto, Japan.

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

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

Relaxation analysis, Tom20, Presequence

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

し, しらかわまさひろ, oひろあきひでか ず

相同性が特に低いN末端ドメインが担っ ていると予想される(Fig. 1)。そこで、 我々は構造生物学の観点からI型/II型 AAA-ATPaseのと機能分類を進めるた めに、それぞれのN末端ドメインの解析 を半網羅的に行ってきた。これまでに、 当時立体構造未知であったPEX1のN末 端ドメイン(ref 1)、Vps4のN末端MITド メイン(ref 2)、katanin p60のN末端の MITドメインバリアント(ref 3)の構造決 定を行ってきた (Fig 2)。今回、II型 AAA-ATPaseの中でも他との配列相同 性の低い、核内VCP様タンパク質2 (NVL2 = nuclear VCP-like protein 2)N末端の新規ドメインの溶液構造を決定 し、さらに構造に基づいてその細胞内機



Fig. 1 Domain architectures of AAA-ATPases

能の精査を行ったので報告する。このドメインは同じ遺伝子のスプライシングバリア ントNVL1には完全に欠如していることから、我々はNVL2-unique domain (NVL2<sup>UD</sup>)と命名した。

【実験】

【バイオインフォマティクス解析によるドメイン境界の決定】 NVL2の配列情報解析の結果からは、NVL2のN末端およろ90残基までが、哺乳動物 のNVL2およびオルトログと考えられるショウジョウバエsmallmindedまで比較的高 い保存性を示した。なお、NVL2の機能ホモログとして考えられていた酵母Rix7には 相同性は認められなかった。新規、構造未知のドメインの立体構造を決定するにあた り、我々はCLUSTALXを用いた相同性検索、GlobProtや須山らの開発したDomCut によるドメイン境界予測などを用いて、mouse NVL(1-93)をNMR試料候補とした。 しかし、この試料の<sup>1</sup>H<sup>-15</sup>N·HSQCのスペクトルは、構造決定に理想的ではなかった。 これはドメイン末端に存在するcoiled-coil形成可能性の高い残基のためであると考え られた。そこでcoiled-coil予測プログラムCOILSを利用して、coiled-coil形成を negative designしながら、C末端側を段階的に切除していくことで、HSQCスペクト ルの質の向上が見られた。そのようにしてmouse NVL2(1-72)を構造決定とした。併 せて、今回用いたcoiled- coilのnegative design法を利用してドメイン境界を精密決定 するサーバ "Domain boundary optimizer"を作成し、公開している(ref 4, 5)。 【NMR構造決定】

NMRシグナルの解析は約0.7mMの<sup>13</sup>C/<sup>15</sup>N·NVL2<sup>UD</sup>試料を用いて、500MHzおよび 600MHz NMR装置を用いて定法により行った。立体構造計算は、当初CYANA 2.0.17 を、最終的な計算をCYANA 2.1を用いて行い、得られた結果を更にCNS 1.2を用いて 精密化した。CYANAの二つの構造計算結果およびCNSによる最終的な精密構造の間 の差はわずかである。立体構造計算には計994個のNOEによる距離制限情報、計46x2 個のTALOSから得られた 主鎖二面核制限情報、H/D 交換実験から決定された 20組の水素結合情報を用 いた。得られた20構造のア ンサンブルの主鎖RMSD は0.42Å、側鎖重原子を含 めると1.04Åであった。構 造ならびに化学シフト情 報はPDBおよびBMRBに 登録した(PDB:2RRE, BMRB:11250)。

【相互作用パートナーの 探索】

10%FBS を 添 加 し た

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

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

【結果と考察】

NVL2<sup>UD</sup>は、互いに直行する3本のhelixからなり、構造的にはwinged-helix-turn-helix モチーフのhelix部分の構造に類似していた(Fig. 3., ref. 6)。またこのドメインは核小 体局在シグナルをもち、ドメイン単独で核小体に局在することを確認した。HeLa細



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

胞抽出液を用いた、NVL2<sup>UD</sup> の結合相手の探索実験からは、 核小体の主要な構造蛋白質の 一つnucleolinのC末端断片が 得られた。そこで、再度HeLa 細胞抽出液を樹脂に固定させ たNVL2<sup>UD</sup>に反応させ、その 溶出液に対して抗nucleolin抗 体を用いて免疫検出を行った ところ、nucleolin全長ならび にいくつかの分解物が検出さ れた。更に、nucleolinのN末 端の長大な天然変性領域部分 を省いたC末端およそ半分を 大腸菌で組換え発現し、 NVL2<sup>UD</sup>との相互作用を検証したところ試験管内での結合が見られた。しかしこの結合は、系にRNAseを入れて混入しているRNAを消化除去してしまうと著しく減弱することから、大腸菌から持ち込まれたRNA成分が介在した相互作用であることが示唆された。これらの結果から、NVL2<sup>UD</sup>の核小体局在モチーフR/K-R/K-X-R/Kの核小体局在は、核小体蛋白質nucleolinへの単純な結合ではなく、一本鎖RNA+ nucleolin複合体を認識していることが示唆された。このメカニズムは、他の核小体局在シグナルの局在機構とも共通である可能性が高い。

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

### 【今後の展望】

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

【文献】

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

## L10

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

Tobias Madl<sup>1,2</sup>, Bernd Simon<sup>3</sup>, Frank Gabel<sup>4</sup>, Cameron D. Mackereth<sup>5</sup>, Michael Nilges<sup>6</sup> & <u>Michael Sattler<sup>1,2</sup></u>

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

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

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

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

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

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

### 動的核分極(DNP)法を使った高磁場 高感度固体NMR

○松木 陽<sup>1</sup>,高橋 大樹<sup>1</sup>,植田 啓介<sup>1</sup>,出原 敏孝<sup>2</sup>,小川 勇<sup>2</sup>,
中村 新治<sup>3</sup>,戸田 充<sup>3</sup>,穴井 孝弘<sup>3</sup>,阿久津 秀雄<sup>1</sup>,藤原 敏道<sup>1</sup>
<sup>1</sup>阪大・蛋白研
<sup>2</sup>福井大・遠赤セ
<sup>3</sup>日本電子

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

○Yoh Matsuki<sup>1</sup>, Hiroki Takahashi<sup>1</sup>, Keisuke Ueda<sup>1</sup>, Toshitaka Idehara<sup>2</sup>, Isamu Ogawa<sup>2</sup>, Shinji Nakamura<sup>3</sup>, Mitsuru Toda<sup>3</sup>, Takahiro Anai<sup>3</sup>, Hideo Akutsu<sup>1</sup>, Toshimichi Fujiwara<sup>1</sup> <sup>1</sup> Institute for Protein Research, Osaka University <sup>2</sup>Research Center for Development of Far-Infrared Region, University of Fukui <sup>3</sup> JEOL Ltd.

We report solid-state CW DNP/NMR experiments under currently highest external field condition of 14.1 T (600 MHz for <sup>1</sup>H frequency), which would allow increased resolution in NMR spectrum. To perform the experiments, we have combined a commercial high-resolution solid-state NMR spectrometer with a 395-GHz gyrotron oscillator, sub-millimeter (sub-mm) wave transmission and low-temperature gas supplier systems that we developed. The gyrotron generated the sub-mm wave with power output of about 40 W in the second harmonic TE<sub>06</sub> mode. Sufficient amount of power for DNP (0.5-3W) was transmitted to the sample using a smooth-wall circular waveguide system. DNP enhancements of  $\varepsilon \sim 10$  and  $\sim 20$  were achieved at 90 K and 50 K, respectively, for <sup>13</sup>C-glucose in the presence of biradical TOTAPOL.

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

動的核分極(DNP)法, 高磁場条件, 固体NMR

oまつきよう,たかはしひろき,うえだけいすけ,いではらとしたか,おがわいさむ, なかむらしんじ,とだみつる,あないたかひろ,あくつひでお,ふじわらとしみち 私たちは、動的核分極(DNP)法を使っ た固体NMRの感度向上を、これまでで 最も高い外部磁場条件(B<sub>0</sub>=14.1T、プロ トン共鳴周波数で600MHz)で実現した。 マイクロ波発信源として高輝度、高周波 数ジャイロトロン(FU CW II)を開発、導 波システムと液体N<sub>2</sub>(or He)を使った試 料冷却システムも製作して、市販の 600MHz NMR装置(Varian Infinity Plus)と 組み合わせ、DNP-NMRシステムを構築 した。このシステムの開発と実験結果に ついて報告する。



Figure 1. NMR signal of <sup>13</sup>C-labeled glucose observed via CP with and without microwave irradiation.

ジャイロトロンFU CW IIは高さ約1.7mの電子管である。ジャイロトロンの発振には 静磁場強度7Tにおける二次高調波条件を用い,TE<sub>06</sub>モードにおいて395GHz,約40W の出力を得た。このうちDNPのために充分な0.5-3Wをオーバーモード円形導波管で MAS NMRプローブ中の試料まで伝達した。電子スピン源となる安定ラジカル分子と して水溶性バイラジカルTOTAPOLを用い,静止試料のCP測定による<sup>13</sup>C測定で<sup>1</sup>H分極 の大きさを測定した。その結果<sup>13</sup>C<sub>6</sub>-glucoseの信号強度を約10倍増強出来ると示した(ε ~10@90K, Figure 1)。また,サブミリ波最大強度での照射では,かえってDNP効率の 低下を観測した。これは、遠赤外線であるサブミリ波により試料温度が上昇したこと が原因かもしれない。

電子スピン分極の格子への熱緩和を抑えられれば,有効に分極を核スピンに伝えられDNP効率はさらに向上できると考えられる。そこで更なる低温条件を得るために蒸発液体Heを使って試料を冷却,スピニングする新しいe-<sup>1</sup>H二重共鳴プローブシステムを製作した。このプローブでは真空層により断熱性を向上させている。このために液体へリウム・デュワーとへリウムガス・トランスファー・チューブを製作した。試料温度50KにおいてDNP用グラスマトリクス(d<sub>8</sub>-glycerol/D<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O = 6/3/1 wt/wt/wt)の<sup>1</sup>HNMR信号を90度パルスによる直接励起で観測し,現時点で信号強度の増強は20倍程度まで観測できている ( $\epsilon$ ~20 @ 50K)。

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

#### **Reference:**

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

## 光照射 NMR によるレチナールタンパク質の光中間体の観測

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

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

OAkira Naito<sup>1</sup>, Yuya Tomonaga<sup>1</sup>, Tetsurou Hidaka<sup>1</sup>, Izuru Kawamura<sup>1</sup>, Takudo Nishio<sup>1</sup>, Kazuhiro Ohsawa<sup>1</sup>, Akimori Wada<sup>2</sup>, Yuki Sudo<sup>3</sup>, Naoki Kamo<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Graduate School of Engineering, Yokohama National University Yokohama, Japan, <sup>2</sup>Kobe Pharmaceutical University Kobe, Japan, <sup>3</sup>Graduate School of Science, Nagoya University Nagoya, Japan, <sup>4</sup>College of Pharmaceutical Science, Matsuyama University, Matsuyama, Japan.

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

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

[Experimental] We first developed an in-situ photo irradiation system for solid-state NMR

光照射固体 NMR、レチナールタンパク質、光中間体

○ないとうあきら、ともながゆうや、ひだかてつろう、かわむらいずる、にしおたく どう、おおさわかずひろ、わだあきもり、すどうゆうき、かもなおき under the magic angle spinning condition. In-situ continuous photo-irradiation was made by an optical fiber from outside the magnet through a tightly sealed piece of cap made of glass rod glued to the zirconia rotor. Using this photo-irradiation system, we could successfully irradiate green laser light (532 nm) of 5 mW to the sample in the rotor. Since the life time of M intermediate is much longer than those of the other intermediates (Fig. 1A), it is, therefore, expected to be trapped an M intermediate under continuous photo-irradiation condition in the solid-state NMR experiments. In-situ photo irradiated NMR signals were acquired by means of CP-MAS method with the spinning frequency of 4 kHz.

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

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



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

## L13

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

Hideaki Fujiwara

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

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

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

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

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

## 分子配向依存的TROSYシフト変化を用いたタンパク質構 造解析 ○<sup>插</sup>真一<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup>広島大学大学院・理・数理分子 <sup>2</sup>(独)科学技術振興機構・先端計測

## Protein structure determination using orientation induced TROSY shift changes

Shin-ichi Tate<sup>1,2</sup> <sup>1</sup>Dept. Mathematical and Life Sciences, Hiroshima University, Japan. <sup>2</sup>SENTAN/JST, Japan.

### Abstract

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

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

Keywords: TROSY, chemical shift anisotropy, protein structure

たて しんいち

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

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

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

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

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

#### References

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

# L15

# Structure determination of the helical 7-transmembrane receptor sensory rhodopsin

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

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

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

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

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

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

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

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

-71-

# L17

## Chemical shifts and dipolar couplings: how can they help?

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

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

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

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

-74-

# 第三日目 11月17日(水) 日本語セッション

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

FLYAによる最小スペクトルデータセットを用いた自動構 造解析 〇池谷 鉄兵<sup>1,2</sup>,池 晙求<sup>3</sup>,重光 佳基<sup>1</sup>,浜津 順平<sup>1</sup>,三島 正規<sup>1</sup>, 伊藤 隆<sup>1</sup>,甲斐荘 正恒<sup>3,4</sup>, Peter Güntert<sup>2,3,5</sup> <sup>1</sup> 首都大・理工,<sup>2</sup> Goethe-University Frankfurt・生物物理,<sup>3</sup> 首 都大・戦略研究センター,<sup>4</sup>名大・構造生物学センター,<sup>5</sup> Goethe -University Frankfurt・Frankfurt Institute of Advanced Studies

# Automated protein structure determinations from minimal sets of spectra using FLYA

°Teppei Ikeya<sup>1,2</sup>, JunGoo Jee<sup>3</sup>, Yoshiki Shigemitsu<sup>1</sup>, Jumpei Hamatsu<sup>1</sup>, Masaki Mishima<sup>1</sup>, Yutaka Ito<sup>1</sup>, Masatsune Kainosho<sup>3,4</sup> and Peter Güntert<sup>2,3,5</sup>

<sup>1</sup> Graduate School of Science, Tokyo Metropolitan University, Tokyo, Japan

<sup>2</sup> Institute of Biophysical Chemistry, Goethe-University Frankfurt, Frankfurt am Main, Germany

<sup>3</sup> Center for Priority Areas, Tokyo Metropolitan University, Tokyo, Japan

<sup>4</sup> Structural Biology Center, Nagoya University, Nagoya, Japan

<sup>5</sup> Frankfurt Institute of Advanced Studies, Goethe-University Frankfurt, Frankfurt am Main, Germany

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

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

自動構造計算, FLYA 〇いけやてっぺい, じーじゅんぐー, しげみつよしき, はまつじゅんぺい, みしまま さき, いとうゆたか, かいのしょうまさつね, ぎゅんたーとペーたー 動構造解析により、すでに複数のタンパク質の自動立体構造決定に成功しているが、 これに加えて、FLYA法の際立った特徴は、手動解析では到底不可能なわずかなスペク トルのデータセットを用いても正確に構造決定可能な点にある。タンパク質構造決定 に必須のスペクトルは、基本的に原子間距離拘束を含むNOESYスペクトルであり、化 学結合を介するその他の多くのスペクトルはもっぱら化学シフトの帰属にのみ用い られる。これらスペクトルの測定と解析には、多くの時間と多大な労力が必要である ことから、可能な限り少数のデータセットにより構造解析できることが望ましい。今 回、SAIL法を用いたユビキチンタンパク質と非線形サンプリングおよび最大エントロ ピー法によりスペクトルを得た高度好熱菌TTHA1718タンパク質について、本手法を適 用し、最小データセットを用いた際の自動構造解析の安定性について検証を行った。

【結果】

FLYAによる構造解析により、SAILユビキチンおよびTTHA1718タンパク質いずれに関しても、3D<sup>13</sup>C-および<sup>15</sup>N-resolved NOESYのわずか2つのスペクトルのみを用いた計算で、手動解析により得られた参照構造に対して、主鎖のRMSD値で、それぞれ0.87Å, 1.02Åと、非常に正確な構造を得ることができた。ここでは、自動ピークピッキング

の段階から、ノイズシグ ナルの除去等の人手によ る解析を一切加えず、完 全 自 動 で NOESY の み を 用 いて構造決定を達成した。 このことは、本手法に SAIL法や非線形サンプリ ング法を組み合わせるこ とで、測定とスペクトル 解析の両面の時間短縮に つながり、従来法と比較 して、極めて短時間に構 造決定が可能となったこ とを示唆するものである。 本手法を用いれば、分解 速度の速い不安定タンパ



*Figure 1.* SAIL ubiquitin (A) and TTH17118 (B) structures obtained using exclusively NOESY spectra for chemical shift assignment and structure calculation (ribbon model) superimposed on the conventionally determined NMR solution structure (cylinder model). Figure produced with the program MOLMOL.

ク質等の構造解析も可能となるなど、様々な応用が期待できる。

【参考文献】

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

 高分子量蛋白質の構造解析に適した安定同位体ラベル法 および測定法の開発
○竹内 恒<sup>1, 2</sup>、高橋 栄夫<sup>1, 3</sup>、嶋田 一夫<sup>1, 4</sup>、Gerhard
<sup>1</sup>産総研・バイオメディナル情報研究センター
<sup>2</sup>ハーバード大医、<sup>3</sup>横浜市大院・生命ナノ、<sup>4</sup>東大院薬

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

○Koh Takeuchi<sup>1, 2</sup>, Hideo Takahashi<sup>1, 3</sup>, Ichio Shimada<sup>1, 4</sup>, Gerhard Wagner<sup>2</sup> <sup>1</sup>BIRC, AIST, <sup>2</sup>Harvard Med. Sch., <sup>3</sup>Grad. Sch. Nanobiosic., Yokohama City Univ., <sup>4</sup>Grad. Sch. Pharm. Sci., The Univ. of Tokyo

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

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

近年においては、蛋白質の重水素化、メチル位の<sup>1</sup>H-1<sup>3</sup>C 選択標識、さらには SAIL 法など、 高分子量蛋白質の解析に適した安定同位体標識法の開発に力がそそがれており。またそ れら標識法を最大限に生かすための測定法の開発(TROSY HSQC/HMQC)が進んだ。

安定同位体標識、異核測定、ピルビン酸

○たけうち こう、たかはし ひでお、しまだ いちお、げるはると わぐなー

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

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





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

Takeuchi K, Wagner G et al. 2D NCA: J Am Chem Soc. (2008), 130, 17210 3D CANCA: J Am Chem Soc. (2010), 132, 2945 2D CACA-TOCSY: J Biomol NMR. (2010), 47, 55



B. Alternate <sup>13</sup>C labeling using glycerol



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

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



### 緩和分散解析用プログラムGLOVE

○菅瀬謙治<sup>1, 2</sup>, Jonathan C. Lansing<sup>2</sup>, Peter E. Wright<sup>2</sup> <sup>1</sup>サントリー生有研 <sup>2</sup>スクリプス研

### Processing relaxation dispersion data with a new software GLOVE

OKenji Sugase<sup>1, 2</sup>, Jonathan C. Lansing<sup>2</sup>, and Peter E. Wright<sup>2</sup> <sup>1</sup>Suntory Institute for Bioorganic Research, Osaka, Japan. <sup>2</sup>The Scripps Research Institute, California, USA.

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

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

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

緩和分散法,最小二乗フィッティング

○すがせ けんじ、ジョナサン ランシング、ピーター ライト

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

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

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



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

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

家蚕絹フィブロイン結晶部モデルペプチドのラメラ構造 に関する固体NMR構造解析 〇鈴木悠,小川達也,朝倉哲郎 農工大院工

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

○Yu Suzuki, Tatsuya Ogawa and Tetsuo Asakura Department of Biotechnology, Tokyo University of Agriculture and Technology, Japan

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

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

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

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

【結果・考察】

(AGSGAG)5 のラメラ構造

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

絹フィブロイン, ラメラ構造, 固体NMR

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

さらに、このラメラ構造を定量的に解析するために、 (AGSGAG)5についてturnが1箇所または2箇所存在すること を仮定し、147個の分子鎖について統計力学的取り扱いを行

**Figure 1** Fractions of distorted  $\beta$ -turn and/or random coil of (AGSGAG)<sub>5</sub> as a function of different positions (black). The corresponding relative intensities of (AG)<sub>15</sub> were also shown for a comparison (gray)

なった。すなわち、構造形成に伴って安定化または不安定化する局所的なエネルギー をパラメーターとした統計力学的計算を行い、fittingによって、出現確率の高いラメ ラ構造とパラメーターを決定した。

出現確率の高いラメラ構造の一例をFigure2に示した。 (AGSGAG)5のturnが2箇所存在するラメラ構造において、 周期的にβ-sheetに関与するアミノ酸残基の数は8~11であ った。最近、Gongら<sup>2</sup>は、再生家蚕絹フィブロインの膜に ついて、AFMならびにTEM観察から約8残基からなるラメ ラ構造のモデルを提案しているが、研究手法は全く異なる にもかかわらず、我々の結果とも良く一致している。



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

### (AGSGAG)<sub>5</sub>SilkII型のSerCβの運動性評価

(AGSGAG)<sub>5</sub>の<sup>13</sup>Cスピン-格子緩和時間T<sub>IC</sub>測定の結果、SerCβピークにT<sub>IC</sub>が2成分存 在することが明らかとなった。温度上昇とともにT<sub>IC</sub>の値が小さくなったことから、ど ちらの緩和成分も、室温で遅い運動領域に存在している。T<sub>IC</sub>の短い成分(運動性が高 い)が約40%、長い成分(運動性が低い)が約60%であった。低い運動成分の存在は、 分子間相互作用に関わるSer残基の存在を意味しており、FrazerらのX線解析の結果<sup>3</sup>、 (AG)<sub>n</sub>よりも(AGSGAG)<sub>m</sub>の方がシート間距離が増加すること、本研究では、後者の方 が、random coilの割合が増加することから、Ser残基は側鎖のOH基の形成する水素結合 を通して安定化に寄与するというよりも、側鎖のかさの増加による立体障害が大きい と考えられる。

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

### 【参考文献】

[1] Asakura, T. et al.; J. Am. Chem. Soc., 2007, 129, 5703-5709.

- [2] Gong, Z. et al.; Chem. Comm., 2009, 7506
- [3] Frazer, D. et al., J. Mol. Biol., 1965, 11, 706-712.

# **L22** *チオフラビンTが結合するポリグルタミン局所構造の固体NMR研究*〇松岡茂<sup>1</sup>,村井元紀<sup>1</sup>,山崎俊夫<sup>2</sup>,井上将行<sup>1</sup> <sup>1</sup>東大薬 <sup>2</sup>理研SSBC

### Solid state NMR study on thioflavin T-bound polyglutamine local structure

○Shigeru Matsuoka<sup>1</sup>, Motoki Murai<sup>1</sup>, Toshio Yamazaki<sup>2</sup>, and Masayuki Inoue<sup>1</sup> <sup>1</sup>Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo, Tokyo, Japan. <sup>2</sup>RIKEN SSBC, Yokohama, Japan.

Amyloids are insoluble non-crystalline aggregates formed by various proteins and peptides. Thioflavin T (ThT) is one of the most widely used amyloid-specific detectors, which shows fluorescence at 485 nm when binds to amyloids. ThT recognizes the common structural feature among amyloids despite the diversity in amino acid sequence. We are interested in the tolerance and specificity of the molecular recognition between ThT and amyloids, and undertook structural analyses of ThT-amyloid complexes using solid-state NMR. In this presentation, we will report a REDOR study to observe local structures in a synthetic short polyglutamine peptide (H-Q\_8-OH) which are recognized by ThT.

### 序

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

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

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

Keywords: local structure, polyglutamine, rotational-echo double-resonance (REDOR) キーワード:局所構造、ポリグルタミン、回転エコー二重共鳴

○まつおかしげる, むらいもとき, やまざきとしお, いのうえまさゆき

### ThT被染色性凝集体形成する短鎖ポリグルタミンペプチド

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

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

配列のみからなるモデルペプチドH-Q<sub>n</sub>-OHが ThT被染色性凝集体を形成できる最短の長さを調べた。 $n = 5 \sim 10$ のH-Q<sub>n</sub>-OHを合成し て、ThT染色試験に供したところ、6残基以上の長さでThTによる蛍光染色が見られた。 ただし、n = 6のH-Q<sub>n</sub>-OHについては染色の再現性が悪く、ThT被染色凝集体の形成に 試料の保存時間、温度が大きく影響することが分かった。また、蛍光強度のThT濃度

 $k_{\rm d1}/\mu M$ 

0.17

0.11

0.10

0.15

n

7

8

9

10

依存性からn=7~10のH-Q<sub>n</sub>-OH について $k_d$ を求めたところ、 $k_d$  = 0.1  $\mu$ M前後の高親和性結合サイ トと $k_d$  = 6  $\mu$ M前後の低親和性結 合サイトがそれぞれ約1/50 mol/mol、約4/50 mol/mol存在する ことが確認された(表1)。これ らの結合サイトの性質は、n=7~ 10の間でほとんど変化しなかっ た。

### ポリグルタミン凝集体の2次構造

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

られる。



表 1 H-Q<sub>n</sub>-OH 凝集体の ThT 結合サイト数(N)との解離定数(k<sub>d</sub>)\*

 $N_1/10^{-3}$ 

20.1

19.4

21.7

25.1

\*高親和性 (k<sub>dl</sub>、N<sub>l</sub>)と低親和性 (k<sub>d2</sub>、N<sub>2</sub>)の結合サイトが見られた。

10 15 20 25 30 35 40 20(degree)

責造が形成されたものと考え 図2H-Q<sub>8</sub>-OHとH-Q<sub>5</sub>-OHの粉末X線回折

### ポリグルタミン凝集体内のThT結合サイト局所構造の選択的<sup>13</sup>C NMR観測

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



図1 チオフラビンTとポリグルタミンの構造

 $k_{d2}/\mu M$ 

6.45

5.72

6.66

7.42

 $N_2/10^{-3}$ 

77.7

65.0

86.3

82.4

-85-



図3 ThT- $d_y$ /H-Q<sub>8</sub>-OH (1/10)の<sup>13</sup>C{D} REDOR  $\equiv$ スペクトル (上、 $\Delta S$ ) とスピンエコースペクトル (下、 $S_0$ ) ポリグルタミン複合体構造解析に用いた。図3下にH-Q<sub>8</sub>-OHの天然存在比<sup>13</sup>C NMRスペ クトル ( $S_0$ ) とその帰属を示す。CO、C<sub>α</sub>、C<sub>β</sub>、C<sub>γ</sub>、C<sub>8</sub>のそれぞれの炭素に由来する5 つのシグナルが広い線幅で観測された。C末端カルボキシル基は側鎖カルボニル基C<sub>8</sub> と重なるシグナルを与えた。一方、 [1,2-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>] Glnを第1残基に導入した H-[1,2-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]Q-Q<sub>7</sub>-OHの<sup>13</sup>C CP-MASでも、線幅の広いシグナルが観測されたことから、 この線幅は8つのグルタミン残基間の化学シフトの分散に由来するものではなく、主 に化学的環境の不均一性に由来するものであることが分かった。また、CO (172 ppm)、 C<sub>a</sub> (51 ppm) はBシートを示唆する化学シフトを与えた<sup>4</sup>。

次に、<sup>13</sup>C{D} REDOR差スペクトルを用いてH-Q<sub>8</sub>-OH 凝集体内のThT結合サイト局 所構造を選択的にNMR観測した<sup>5</sup>。すなわち、重水素標識を施したチオフラビン T (ThT- $d_3$ )を合成し、ThT- $d_3$ をH-Q<sub>8</sub>-OHに結合させ、分子間<sup>13</sup>C{D} REDORによりThT- $d_3$ の重水素原子に近接するH-Q<sub>8</sub>-OH上の炭素原子を選択観測した。<sup>13</sup>C{D} REDORの差 スペクトル ( $\Delta$ S) ではThT- $d_3$ のCD<sub>3</sub>基に近接した<sup>13</sup>Cだけがシグナルを与える。ThT- $d_3$ とH-Q<sub>8</sub>-OHの分子数比は1:10とし、高親和性と低親和性の両結合サイトに対して ThT- $d_3$ が等量存在する条件を選択した。低親和性結合サイトは高親和性結合サイトの 4倍存在するので、<sup>13</sup>C{D} REDORには低親和性結合サイトの寄与が大きくなる。測定 には凍結乾燥試料を用いた。<sup>13</sup>C{D} REDORの結果を図3に示す。 $\Delta$ Sでは、 $\beta$ シート構 造の表面に近い側鎖C<sub>β</sub>、C<sub>γ</sub>、C<sub>6</sub>だけでなく、主鎖CO、C<sub>α</sub>でもREDOR減衰が確認され、 ThT- $d_3$ のCD<sub>3</sub>が主鎖、側鎖の両方に近接する環境にあることが明らかとなった。また、 REDOR減衰の大きさと時間展開の解析から、ThT- $d_3$ のCD<sub>3</sub>の周囲に複数のグルタミン 残基が存在すると予想された。

現在、H-Q<sub>8</sub>-OHの位置選択的<sup>13</sup>C標識体とThT- $d_3$ を用いた<sup>13</sup>C{D} REDORにより、結合構造の精密化を図っている。

### 参考文献

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

L23

**脂質ラフトにおける分子間相互作用の固体 NMR 解析** 〇松森信明,山口敏幸,前田佳子,安田智一,岡崎宏紀,大石徹, 村田道雄 阪大院理

### Solid-State NMR Studies on Molecular Interactions in Lipid Rafts

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

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

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

脂質ラフトはスフィンゴミエリン(SM, Fig. 1)およびコレステロール(Chol, Fig. 1)を 主成分とする細胞膜ドメインであり、周囲の細胞膜とは異なる相状態を有している。 この脂質ラフトは、特異的に集積した膜タンパク質を介したシグナル伝達のプラット

ホームとして機能していると考え られている。しかし、脂質ラフト は形成と離散を繰り返しているた め、分子レベルでの相互作用解析 はほとんど行われていない。



そこで本研究では、まず種々の Fig. 1. Structures of sphingomyelin (SM) and cholesterol

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

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

脂質ラフト, スフィンゴミエリン, コレステロール

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

-88-

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

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



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

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

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



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

L24

### NMRの信号と雑音

○竹腰清乃理<sup>1,2</sup> <sup>1</sup>京大・理 <sup>2</sup>CREST・JST

### Noise and Signal in NMR

oK. Takegoshi<sup>1, 2</sup>
<sup>1</sup>Department of Chemistry, Graduate School of Science, Kyoto, Japan.
<sup>2</sup>CREST, JST, Japan.

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

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

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

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

(1) 位相共分散法1

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

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

キーワード : Covariance, Dynamic range, Denoise

○たけごしきよのり

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

(2) APRICOT法<sup>2</sup>

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

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

図3にCH<sub>2</sub>を<sup>13</sup>Cでラベルしたグリシンの固体<sup>13</sup>C MASスペクトルを示した。上が通常のゲイン一定で 測定で下がゲインを動的に変えた結果である。ゲイ ンを変えるとFIDが当然ゆがむためにFT前にゲイ ン変化の補正を行っている。いわゆる量子化ノイズ が減少してノイズに埋もれていた天然存在比の C=O炭素のピークがくっきり観測されるようにな った。

### References

1. J. Fukazawa and K. Takegoshi, Phys. Chem. Chem. Phys. Col. 2010,12 11225-11227.

2. K. Takeda and K. Takegoshi, Submitted.

### Acknowledgements

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



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



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







Fig. 3 Result of APRICOT

### マジック角円板回転法:薄膜試料のための新しい 高分解能固体NMR法

○犬飼宗弘<sup>1</sup>,野田泰斗<sup>1</sup> <sup>1</sup>京都大学大学院理学研究科

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

OMunehiro Inukai<sup>1</sup>, and Yasuto Noda<sup>1</sup> <sup>1</sup> Graduate School of Science, Kyoto University

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

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



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

マジック角回転,薄膜

○いぬかいむねひろ,のだやすと



Figure 2. <sup>27</sup>Al MAS spectra of (a) a thinfilm aluminum with approximate thickness of 2  $\mu$ m using the DISK MAS (acquisition time ~ 12 h, v<sub>0</sub>: 78 MHz v<sub>r</sub>: 7.4 kHz), and (b) bulk aluminum using a conventional MAS probe (acquisition time: 20 s, v<sub>0</sub>: 78 MHz v<sub>r</sub>: 7.4 kHz). To spin the rotor, the bulk aluminum was mixed with KBr.

我々は、基材に成膜している薄膜試料をターゲットとした新しい高分解能固体NMR のテクニックを提案する。ロータの上部に基材ホルダを取り付け、その上に基材を貼 り付ける。そしてロータと共に基材をMASさせ、基材上の薄膜試料の周辺に設置した RFコイルを用いて励起パルスの照射、NMR信号の観測を行う(図1)。近年提案された piggy-back法<sup>[11]</sup> ーロータの上部に直径1 mm以下の微小試料管を取り付け回転させ、 外部に設置した微小コイルでNMR信号を検出する手法ー と比べて、提案する手法はよ りサイズの大きい基材ホルダ、基材を取り付けている。我々は、基材ホルダ、基材が 振れ回り運動をしなければ、高速試料回転を行うことができるのではないかと考え実 験を行った。その結果、直径12 mm、厚さ0.5 mmの円形石英基板を5 kHz、直径7 mm、 厚さ0.5 mmのものを8 kHzで回転させることに成功した。このように基材ごとMASさせ る手法 -DISK MASと名付ける- は、従来法と比べてより広い基材上に成膜してい る薄膜試料を観測できるため、試料の量は10-25 倍になる。そのため、今まで感度的 に難しかった1枚の薄膜試料の観測が期待できる。

DISK MASにより、直径7 mmの石英基板に成膜させた厚さ2 µmの金属アルミニウムを 7.4 kHzで回転させ、<sup>27</sup>A1 MAS測定に成功した(図2)。そして通常のMASプローブで観測 したバルク金属アルミニウムと違う形のスペクトルが観測された。現在解析中である。 また薄膜固体リチウムイオン電池の正極材に用いられるLiCoO<sub>2</sub>の薄膜試料(厚さ:200 nm)の<sup>7</sup>LI MAS測定にも成功している。将来、薄膜固体リチウムイオン電池などのデバ イスそのものを測定する予定である。また形状的な利点として、薄膜の表面に垂直な 方向から光レーザーを照射するなどの外部作用を行うことが可能である。そのため外 部作用in situの高分解能固体NMRもDISK MASにより可能となる。

### 参考文献

[1] H. Janssen, A. Brinkmann, E.R.H. van Eck, J.M. van Bentum and A.P.M. Kentgens, J. Am. Chem. Soc. 128, 8722 (2006).

謝辞 この研究は、JSTのCRESTの援助を受けて行われた成果です

### ヒト脳組織のT<sub>2</sub>緩和機構

### (国立環境研<sup>1</sup>, Univ. Minnesota<sup>2</sup>)○三森文行<sup>1</sup>, 渡邉英宏<sup>1</sup>, 高屋展宏<sup>1</sup>, Michael Garwood<sup>2</sup>, Edward J. Auerbach<sup>2</sup>

### Mechanisms of T<sub>2</sub> relaxation of tissue water in human brain (Natl. Inst. for Environmental Studies<sup>1</sup>, Univ. Minnesota<sup>2</sup>) <u>F.Mitsumori<sup>1</sup></u>, H.Watanabe<sup>1</sup>, N.Takaya<sup>1</sup>, M. Garwood<sup>2</sup>, EJ Auerbach<sup>2</sup>

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

【はじめに】組織水プロトンの T<sub>2</sub>緩和時間は MRI において組織コントラストをもたらす重 要なパラメータであり、病変の診断や、脳機能イメージングにおける賦活部位の検出に広く 用いられている。T<sub>2</sub>緩和の機構は水分子を取り巻く磁気的環境や分子運動で規定されるはず であるが、ヒト脳のような複雑系ではこれまで解明が試みられなかった。私たちはこれまで、 4.7T においてヒト脳の見かけの緩和速度 (R<sub>2</sub><sup>†</sup> = 1/T<sub>2</sub><sup>†</sup>) が局所の非ヘム鉄濃度 ([Fe]) と高 分子量分画 (f<sub>M</sub>)を用いて、R<sub>2</sub><sup>†</sup> =  $\alpha$ [Fe] +  $\beta$ f<sub>M</sub> +  $\gamma$  (1)と記述できることを報告してきた[1]。 今回、1.5~7T の広い磁場範囲において式(1)が成立することを確認し、 $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ の磁場依存性か らヒト脳のT<sub>2</sub>緩和機構に関する手がかりを得た。

【方 法】ヒト脳の MRI 測定には、Varian 社の Inova (1.5T, 1.9T, 4.7T)、Siemens 社の Magnetom Trio (3T, 7T) を用いた。信号検出器は 1.9, 4.7, 7T では TEM 型、1.5, 3T では birdcage 型検出器を用いた。それぞれの磁場強度での測定数は、男女各 6 名 (1.5T)、男 7 +女3名 (1.9T)、男5名 (3T)、男26+女28名 (4.7T)、男6名 (7T) で、いずれも国立 環境研究所または Minnesota 大学の IRB 承認を受けた。T2<sup>†</sup>の測定には MASE (multi-echo adiabatic spin echo)法を用いた[2]。MASE 測定の 180°パルスには 7ms の hyperbolic secant 型パルスを 2 個用いて偶数番目のエコーのみを収集し、1 回の励起で6 エコー (7T のみ4) を測定した。パルス繰り返し時間は 4 秒 (7T のみ5 秒)、最小の echo spacing は 13ms、エ コータイム (TE) は 26~156ms である。 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ は前頭皮質、尾状核、被殻、視床、淡蒼球、前頭白質の 6 部位で実測した R2<sup>†</sup>を同部位の[Fe]、fMを用いて重回帰分析を行って得た。

【結果と考察】図1に1.5T、1.9T、3T、4.7T、7Tで得たヒト脳のT<sub>2</sub>†マップを示す。T<sub>2</sub>†が 磁場依存変化を示すことが明らかである。図1のT<sub>2</sub>†マップ上で前述の6部位R<sub>2</sub>†を実測し、



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

キーワード:ヒト脳、横緩和、鉄

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

式(1)を用いて重回帰分析を行うと、いずれ の磁場強度(B<sub>0</sub>)においても観測された  $R_2$ <sup>†</sup>は[Fe]と f<sub>M</sub>の線形結合で良く説明され ることがわかった。実測および式(1)で計算 された R<sub>2</sub><sup>†</sup>を[Fe]に対してプロットした結 果を図2に示す。また、ここで得られたそ れぞれの B<sub>0</sub>における相関式のα、β、γはそ れぞれ異なる形の Bo 依存性を示すことが わかった。すなわち、αは B<sub>0</sub>に比例して増 大(図3)、βは B<sub>0</sub>の自乗に比例(図4)、 yは Boによらずほとんど一定である。 αの Bo依存性は、フェリチン水溶液やフェリチ ンをドープしたゲル試料中の水プロトン R<sub>2</sub>の B<sub>0</sub>依存性と完全に一致し[3]、脳内に おいても水溶液と同じ緩和機構が働いて いることを示す。一方、高分子量分画の寄 与を示すβの挙動は、拡散や化学交換に由 来する dynamic dephasing による緩和と 一致する。また、[Fe]にも fm にも依存しな い 定 数 項 y は 大 部 分 が 古 典 的 な dipole-dipole 相互作用によるものである ことを示している。

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

【参考文献】

Mitsumori F, Watanabe H, Takaya N, Magn. Reson. Med., 62, 1326 (2009).
 Mitsumori F, Watanabe H, Takaya N, Garwood M, Magn. Reson. Med., 58, 1054 (2007).

[3] Gossuin Y, Roch A, Muller RN, GillisP, Bue FL, Magn. Reson. Med., 58, 1054 (2007).48, 959 (2002)



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



Fig. 3.  $B_0$  dependence of  $\alpha$ 



Fig. 4.  $B_0$  dependence of  $\beta$ 

### 衣食住へのバイオマス活用促進に向けた異種相関解析技術の構築

菊地淳<sup>1,2,3,4</sup>、伊達康博<sup>1,3</sup>、坂田研二<sup>3</sup>、福田真嗣<sup>3,5</sup>、近山英輔<sup>1,3</sup> <sup>1</sup> 理研 PSC,<sup>2</sup> 理研 BMEP、<sup>3</sup> 横市院生命、<sup>4</sup> 名大院生命農、<sup>5</sup> 理研 RCAI

Application of hetero-correlation methods toward promotion of effective use of plant biomass Jun Kikuchi<sup>1,2,3,4</sup>, Yasuhiro Date<sup>1,3</sup>, Kenji Sakata<sup>3</sup>, Shinji Fukuda<sup>3,5</sup>, Eisuke Chikayama<sup>1,3</sup> <sup>1</sup>*RIKEN PSC*, <sup>2</sup>*RIKEN BMEP*, <sup>3</sup>*Yokohama City Univ.*, <sup>4</sup>*Nagoya Univ.*, <sup>5</sup>*RIKEN RCAI* 

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

<緒言> 地球の物質循環には生態系が深 く関与し、植物のバイオマス生産、動物摂 食による有機物変換と地理的分散、そして 微生物叢分解へと有機的に連環する。この 物質循環は生命38億年の進化史でゲノム情 報に刻まれてきた自然の理であり、短い人 類史を省みても農林水産業・水確保といっ た生態系サービスを受益し続けてきている <sup>1)</sup>。この生態系サービスからの主な受益物質 は複雑な高分子・低分子混合物であるバイ オマスで、産業革命以前は地産地消で5F カスケード利用(食料・繊維・飼料・肥料・



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

燃料)されてきた。一方でこの分子複合系というバイオマスの特性故に、要素分解的に研 究と実用化を進める先端科学研究からは置き去りにされてきた。しかし高分子・低分子の 分子複合系を対象とするアプローチがブレークスルーとなり得る一例が食品研究で、加工 性・食感・腹持ち等々、多糖類・蛋白質・脂質・塩・水分の混合物が絶妙に連環した複雑 系の未開拓分野である。本要旨ではまず、我々の目指す衣食住へのバイオマス活用 20 うち 特に "食"を意識したアプローチについて、難分解性多糖類の腸内細菌叢分解から述べる。

植物バイオマス、生態系サービス、異種相関 〇きくちじゅん、だてやすひろ、さかたけんじ、ふくだしんじ、ちかやまえいすけ

#### <腸内細菌複合叢を例題とした多糖類分解・代謝因子解析技術の構築>

冒頭で述べた生命38億年の進化 史でも藍藻が酸素発生を行う前の 地球では、嫌気性細菌叢が有機物 を CO<sub>2</sub>や CH<sub>4</sub>へと代謝する環境にあ り、ヒトや動物の腸内細菌叢にも 類似のガス代謝能がメタゲノム情 報に刻まれている。しかし原始地 球の嫌気性微生物叢との大きな違 いは栄養源にあり、難分解性多糖 類が大量に入力される。こうした バイオマスの摂食に相関して増殖 し、なおかつ宿主の自己免疫力向 上に関わる有用細菌は演者らも関



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

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

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

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

#### <参考文献>

- 1) Schindler et al. (2010) Nature 465, 609-612.
- Sci&Tech.出版.
- 3) Sekiyama et al. (submitted) Anal. Chem.
- 4) Morita et al. (2008) DNA Res. 15, 151-161.
- 5) Fukuda et al. (2009) PLoS ONE 4, e4893; Nakanishi et al. (submitted) J. Proteome Res.
- 6) Fukuda et al. (submitted) Nature.
- 7) Date et al. (2010) J. Biosci. Bioeng. 110, 87-93.
- Kikuchi et al. (2004) Plant Cell Physiol. 45, 1099-1104; Kikuchi et al. (2007) Method Mol Biol. 358, 273-286; Sekiyama et al. (2007) Photochemistry 68, 2320-2329; Tian et al. (2007) J. Biol. Chem. 282, 18532-18541; Ohyama et al. (2009) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106, 725-730.
- 9) Mochida et al. (2009) BMC Genomics10, e563.
- 10) Chikayama et al. (2008) PLoS ONE 3, e3805; Akiyama et al. (2008) In Silico Biol. 8, e27; Sekiyama *et al.* (2010) *Anal. Chem.* **82**, 1643–1652; Chikayama *et al.* (2010) *Anal. Chem.* **82**, 1653-1658. 《阿弥宇ら, 第 49 回 NMR 討論会要旨集 YP9; 森哲哉ら, 第 49 回 NMR 討論会要旨集 P78.
- 11)篠阿弥宇ら,
- 12)飯倉智弘ら, 第 49回 NMR 討論会要旨集 YP8; 小倉立己ら, 第 49回 NMR 討論会要旨集 P6.

### L28

### 固体<sup>15</sup>NNMR法を用いたカーボンアロイ触媒の酸素還元 活性の研究 ○黒木重樹

東京工業大学・院・理工・有機・高分子物質専攻

Oxygen Reduction Activity of Pyrolyzed Polypyrroles studied by <sup>15</sup>N Solid-State NMR

### OShigeki Kuroki

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

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

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

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

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

○くろきしげき

ンアロイ触媒と命名)が高い ORR 活性を示すことを報告した<sup>23</sup>。その酸素還元活性 点に関し、様々なモデル<sup>4,5</sup>が提案されているが、まだ結論には達していない。そこで、 我々は窒素含有高分子の熱処理物の化学構造、特に窒素原子周りの構造が酸素還元活 性にどのような寄与をおよぼしているかを XPS と固体 NMR を組み合わせて考察を試 みた。

[試料] Zelenay らの化学的に調製された Co-Polypyrrole-Carbon composite (Co-PPy-C) が熱処理することなしに、高い ORR 活性を示すことを踏まえ、試料には、ポリピロ ール (PPy)を選んだ。<sup>15</sup>NNMR 測定のため、<sup>15</sup>N ラベルピロールをモノマーに用い、 2 つの酸化剤 FeCl<sub>3</sub> またはペルオキソニ硫酸アンモニウム (APS)を用い、ポリピロー ル (各々PPyFe および PPyA と今後呼ぶ)を合成した。このようにして合成された PPy を赤外線加熱炉中で窒素雰囲気、1 時間 700℃~900℃で熱処理することにより、試料 を得た。試料はその熱処理温度を踏まえ、

例えば PPyFe の 700℃処理の場合は、 PPyFe700と呼ぶ。

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



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

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

Table 1  $E_{onset}$  and current density at 0.5 V of pyrolyzed PPys

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

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

15 5	1					
Sample	С	Н	Ν	H/C (atomic ratio)	N/C (atomic ratio)	
PPyFe700	80.32	1.49	15.97	0.22	0.17	
PPyFe800	72.27	1.10	12.34	0.18	0.15	
PPyFe900	76.95	0.85	10.29	0.13	0.11	
PPyA700	64.61	1.28	11.92	0.24	0.16	
PPyA900	75.91	0.85	10.28	0.13	0.12	

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

これらの試料の TEM 像から、PPyA700 はアモル ファス炭素であり、グラファイト層の規則的積層構 造は全く見られない一方、PPvFe700 はやはり多く がアモルファス炭素であるが、いくらかの規則的グ ラファイト層の積層構造が見られた。また、メタル 状態の鉄粒子の存在も確認できた。PPyA900 および PPyFe900 はかなり規則的なグラファイト層の積層

構造の存在が増え、そのサイズはグラファイト1面 の大きさで 5nm 程度、積層数は 10 枚以下であった。 PPyFe900 ではメタル状態の鉄粒子を確認できなか った。

熱分解 PPy 試料の ESR 測定より、全ての試料で 3409Gに g=2.00 に対応する信号が観測され、これは 典型的な炭素材料に見られる信号である。これ以外 に、PPvFe には信号強度は弱いが、かなりブロード なメタル状態の鉄に帰属される信号と、1500G に g =4.28 に対応する鋭い信号が観測されている。これ



pyrolysed PPy samples with contact times of 5 ms.

はFe<sup>3+</sup>に帰属され、いずれにせよ PPyFe は微量の鉄種を含有していることがわかった。 図2に熱分解PPv 試料のN1sXPS スペクトルを示す。窒素含有炭素中のピリジン型 (398eV)、ピロール型(400eV)、4 級窒素(401eV)の存在が確認された。各々、線 形はかなり類似しているが、最も ORR 活性の高い PPyFe900 はほとんどピロール型に 帰属される 400eV の信号は消滅していることがわかる。

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

さて、ORR 活性と相関がある窒素種を特定するため、多変量解析としてよく知ら れる主成分分析 (PCA)を XPS スペクトルと SSNMR スペクトルに適用した。ここで

は紙面の都合上 PCA の詳細は述べず、その 結果のみを図4および5に示す。

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



PPyFe and PPyA samples. Corresponding loading column plots for (b) PC1 and (c) PC2, which show the contribution of integral regions of the XPS spectrum to the separation.



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

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

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

[結論]XPS および SSNMR の PCA の結果、熱 分解 PPy の系では、残存窒素のうち、75%以 上の窒素が ORR 活性と相関がなく、ある特別 な種類のピリジン型窒素の増加、それに伴う ピロール型+ピリジニウム型窒素の減少が





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



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

ORR 活性の向上に寄与していることがわかった。それでは、ある特別な種類のピリ ジン型窒素とはどのような窒素だろうか?Dodelet らによって示された図7の金属配 位ピリジン (FeN<sub>2</sub>/C)(a)モデル<sup>4</sup>は、ある特別な種類のピリジン型窒素が ORR 活性に 有効であり、ピリジニウム型窒素の生成を抑えると我々の実験結果をよく説明する。

0.0

本研究は NED0 プロジェクト 「固体高分子形燃料電池実用化戦略的技術開発/要素技術 開発/カーボンアロイ触媒」の委託を受けて行った。

文献

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

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

○高橋利和<sup>1</sup>,岩浪克之<sup>1</sup>,林 繁信<sup>2</sup>,坂倉俊康<sup>1</sup>,安田弘之<sup>1</sup> <sup>1</sup>産総研・環境化学技術研究部門 <sup>2</sup>産総研・計測フロンティア研究部門

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

 $\bigcirc Toshikazu Takahashi^1$ , Katsuyuki Iwanami^1, Shigenobu Hayashi^2, Toshiyasu Sakakura^1, and Hiroyuki Yasuda^1

<sup>1</sup>Research Institute for Innovation in Sustainable Chemistry, AIST, Ibaraki, Japan. <sup>2</sup>Research Institute for Instrumentation Frontier, AIST, Ibaraki, Japan.

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

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

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

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

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

【実験と結果】Al-MCM-41 (Si/Al = 20) は既報に従って 調製した<sup>[1]</sup>。H-YゼオライトはTosoh HSZ-320NAA (Si/Al = 2.3, Na+型)を 1 M NH4Cl aq. によって処理した後、 550 ℃ / 12 h 焼成した。固体 NMR は AVANCE 400 WB、 4 mm <sup>1</sup>H-X BB MAS プローブを用いた。測定に先だち、

サンプルは湿度 50%の室内に 1 日放置して水和させた。 MQ-MAS は 3 パルスの z-filter 付きシーケンスを用い、



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

待ち時間 50 ms で積算して得られた F2 軸上の FID128 枚をローター半回転周期にシンクロしつ つ States 法にて取得し、Shearing 変換によって 2D スペクトラムを得た。

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



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

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

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

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

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

Ta	ble	1.	Summary	of NMR	Parameters o	btained	from	Fig.	1
----	-----	----	---------	--------	--------------	---------	------	------	---

		Al <sup>[IV]</sup> a	$Al^{[IV]}{}_{b}$	Al <sup>[VI]</sup> a	$Al^{\left[ VI \right]}{}_{b}$
Al-MCM-41	$\delta_{ m iso}~( m ppm)$	58.4	68.6	-	2.8
	P <sub>Q</sub> (MHz)	3.6	6.8	-	8.2
H-Y	$\delta_{ m iso}$ (ppm)	64.0	4.3	7.2	1.2
	P <sub>Q</sub> (MHz)	72.8	8.6	5.3	6.2

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

### 若手ポスター賞発表要旨

Abstracts of Young Scientists Awards

### **YP1** 42 残基のアミロイドβ(Aβ42)凝集体におけるクルクミンの 相互作用部位の固体 NMR による解析 ○増田裕一<sup>1</sup>,福地将志<sup>1</sup>,谷田川達也<sup>1</sup>,武田和行<sup>1</sup>,入江一浩<sup>2</sup>, 竹腰清乃理<sup>1</sup> <sup>1</sup>京都大学大学院・理学研究科,<sup>2</sup>京都大学大学院・農学研究科

### Analysis of interaction sites of curcumin with the fibrils of 42-residue amyloid $\beta$ -protein (A $\beta$ 42) using solid-state NMR

○Yuichi Masuda<sup>1</sup>, Masashi Fukuchi<sup>1</sup>, Tatsuya Yatagawa<sup>1</sup>, Kazuyuki Takeda<sup>1</sup>, Kazuhiro Irie<sup>2</sup>, and K. Takegoshi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Graduate School of Science, Kyoto University, Japan. <sup>2</sup>Graduate School of Agriculture, Kyoto University, Japan.

Aggregation of 42-residue amyloid- $\beta$  protein (A $\beta$ 42) plays a crucial role in the pathogenesis of Alzheimer's disease. Since curcumin, the yellow pigment in the rhizome of turmeric, interacts with the aggregates (fibrils) of A $\beta$ 42 and dissolve them, interaction sites of curcumin in the A $\beta$ 42 fibrils were analyzed by solid-state NMR using dipolar-assisted rotational resonance (DARR). To improve the quality of 2D spectrum, covariance processing was applied to the 2D data. Our present data indicated that curcumin has a greater tendency to interact with  $\beta$ -sheet at positions 17-21 of the A $\beta$ 42 fibrils than random coil at N-terminus. Moreover, the importance of methoxy and hydroxyl groups of curcumin for its interaction with the A $\beta$ 42 fibrils was also suggested.

### 1. 序論

アルツハイマー病は、42 残基のアミロイドβタンパク (Aβ42) が脳内で凝集するこ とにより引き起こされる。ウコンに含まれる黄色色素であるクルクミンは、Aβ42 の 凝集を阻害するだけでなく、凝集体の脱会合を促進することから、アルツハイマー病 の予防因子として注目されている<sup>1)</sup>。本研究では、Aβ42 凝集体におけるクルクミン の相互作用部位を、固体 NMR を用いて明らかにすることを目的とした。

### 2.<sup>13</sup>C標識した Aβ42 凝集体とクルクミンの混合試料の調製

本発表者らはこれまで、系統的プロリン置換や固体 NMR を用いた研究から、4 本の β-シートを特徴とする Aβ42 の凝集モデルを提示している (Fig. 1)<sup>2)</sup>。クルクミ ンはその平面的な構造から、凝集体の分子間 β-シートと 相互作用するものと予想される。そこで、β-シート構造 をとる Leu-17 ~ Ala-21 の炭素原子を<sup>13</sup>Cで標識した Aβ42 凝集体に、<sup>13</sup>C で標識したクルクミンを混合し、これら



Fig. 1. The aggregation model of  $A\beta 42.^{2}$  Dotted lines show intermolecular  $\beta$ -sheet.

キーワード: アミロイドβタンパク, クルクミン, DARR

○ますだゆういち,ふくちまさし,やたがわたつや,たけだかずゆき,いりえかずひろ,たけごしきよのり



Fig. 2. Selective labeling of A $\beta$ 42 and curcumin with <sup>13</sup>C. Labeling scheme in the A $\beta$ 42 sequence: bold letter, uniformly labeled with <sup>13</sup>C; underlined letter, only C<sub> $\beta$ </sub> is labeled with <sup>13</sup>C. Curcumin was labeled at its aromatic carbons with <sup>13</sup>C.

の分子間における双極子-双極子相互作用を固体 NMR により解析した。対照として、 ランダム構造をとる N 末端領域の炭素原子を<sup>13</sup>C 標識した Aβ42 凝集体とクルクミン の混合試料も同様に調製して解析した。クルクミンと Aβ の化学シフトが重なると解 析が困難になるので、クルクミンは芳香環のみを標識し、Aβ42 は芳香環以外の炭素 を標識した (Fig. 2)。

<sup>13</sup>C標識した Aβ42 をリン酸緩衝液中 37°C で 48 h インキュベーションすることによ り凝集体 (フィブリル) を調製した。そこへ<sup>13</sup>C標識したクルクミンを5等量添加し、 さらに1hインキュベーションした。橙色に染色された凝集体を遠心分離して回収し、 減圧下で乾燥した。

### 3. 固体 NMR による立体構造解析

ー次元の CP/MAS スペクトルを測定したところ、100~150 ppm 付近にクルクミン の<sup>13</sup>C シグナルを確認することができた (Fig. 3)。全ての<sup>13</sup>C スピンに対する CP 効率 が等しいと仮定すると、ピーク強度比から Aβ42 凝集体へのクルクミンの結合量は 0.25 等量程度と推定された。これは、クルクミン添加量 (5 等量) に比べてかなり少 ない。

分子間の<sup>13</sup>C-<sup>13</sup>C 双極子-双極子相互作用を観測する目的で、<sup>13</sup>C-<sup>1</sup>H dipolar-assisted rotational resonance (DARR)<sup>3)</sup> 実験を行った。DARR は Fig. 4 に示すように、MAS 周波





数に等しい強度のラジオ波を<sup>1</sup>Hに照射す ることにより、 ${}^{13}C - {}^{13}C$ の双極子-双極子相 互作用を広範囲に復活させる方法である。 Mixing time 500 ms の二次元 DARR 実験を 行ったが、二次元フーリエ変換 (2D FT) スペクトルでは A $\beta$ 42 とクルクミンの分子 間のクロスピークは観測されなかった (Fig. 5)。これは、クルクミンの  ${}^{13}C$  と A $\beta$ 42



Fig. 4. Pulse sequence of 2D DARR experiments.<sup>3)</sup>

の<sup>13</sup>C 磁化交換が起こっていないか、あるいは磁化交換に関わっている分子数が 2D FT スペクトルに反映されないほど少ないことを意味している。

そこで、磁化交換の様子をより高感度で捉えることができる共分散 (covariance)<sup>4,5)</sup> を用いて、同じ DARR 実験のデータを処理することを試みた。共分散行列 C は、  $C = (F^{T} \cdot F)^{1/2}$ の式より求めた。ここで、F は t<sub>2</sub>に関してフーリエ変換をほどこした 1D スペクトルの列、 $F^{T}$ は F の転置行列で、平方根は行列に対して計算したものである。 共分散処理を行った結果、クルクミンと Aβ42 凝集体の Leu-17 ~ Ala-21 の炭素との間 にクロスピークが多数観測された (Fig. 6A)。これらのクロスピークは mixing time と ともに大きくなっていたことから、DARR により復活した双極子-双極子相互作用に 由来するものであると考えられる。一方、クルクミンと N 末端領域の炭素の <sup>13</sup>C 間の クロスピーク強度は比較的小さかった (Fig. 6B)。本結果は、クルクミンが N 末端の ランダム構造よりも Leu-17 ~ Ala-21 の β-シートと相互作用しやすいことを示唆して いる。

クルクミンの芳香環の<sup>13</sup>Cの中でも、7,7'および8,8'位の<sup>13</sup>Cはそれ以外の<sup>13</sup>Cに 比べて Aβ42 凝集体の炭素との間に強いクロスピークが観測された (Fig. 6C, D)。これ までの構造活性研究から、クルクミンのヒドロキシル基をメチル化すると Aβの凝集 阻害能が著しく低下することが報告されている<sup>6</sup>。7,7'および8,8'位の炭素が Aβに より近いという今回の結果は、その隣にあるメトキシ基やヒドロキシル基が、Aβと の相互作用において重要であることを支持している。



**Fig. 5.** 2D FT DARR spectra of the curcumin ( ${}^{13}C_6$ -ring)-bound A $\beta$ 42 (17-21 label) fibrils. (A) and (B) are the same spectra, but the lower limit of the shown spectra are 3% (A) and 1% (B) of the highest peak.



Fig. 6. 2D covariance-processed DARR spectra of the curcumin (<sup>13</sup>C<sub>6</sub>-ring)-bound Aβ42 (17-21 label) fibrils (A and C) and the curcumin (<sup>13</sup>C<sub>6</sub>-ring)-bound Aβ42 (N-terminal label) fibrils (B and D). Spectra C and D are enlarged displays of the spectra framed by dotted line in spectra A and B, respectively.

### 4. まとめ

- ・二次元データの共分散処理により、通常の二次元フーリエ変換では捉えることができない<sup>13</sup>C-<sup>13</sup>C クロスピークをはっきりと観測することができた。
- ・クルクミンが Aβ42 凝集体の N 末端のランダムコイルよりも Leu-17~Ala-21 の β-シートと相互作用しやすいことが示唆された。
- ・クルクミンのメトキシ基及びヒドロキシル基が、Aβ42 凝集体との相互作用に深く 関わっていることが示唆された。

### [引用文献]

Ono, K. *et al.*, J. Neurosci. Res., 2004, 75, 742-750, 2) Morimoto, A. *et al.*, J. Biol. Chem., 2004, 279, 52781
 -52788, 3) Takegoshi, K. *et al.*, J. Chem. Phys., 2003, 118, 2325-2341, 4) Brüschweiler, R. *et al.*, J. Chem. Phys., 2004, 120, 5253-5260, 5) Hu, B. *et al.*, J. Chem. Phys., 2008, 128, 134502, 6) Reinke, A. A. *et al.*, Chem. Biol. Drug Des., 2007, 70, 206-215.

### 固体NMRによる脂質膜表面において誘起されるSWAP-70 PHドメインの構造変化および機能の解析

○徳田尚美<sup>1</sup>、川合克久<sup>1</sup>、八木澤 仁<sup>1</sup>、福井泰久<sup>2</sup>、辻 暁<sup>1</sup> <sup>1</sup>兵庫県立大学大学院 生命理学研究科、<sup>2</sup>Natl. Hlth. Res. Inst., Taiwan

### A Solid-state NMR study of structural alteration and function of the PH domain induced at the membrane surface

•Naomi Tokuda<sup>1</sup>, Katsuhisa Kawai<sup>1</sup>, Hitoshi Yagisawa<sup>1</sup>, Yasuhisa Fukui<sup>2</sup>, Satoru Tuzi<sup>1</sup> <sup>1</sup>Grad. Schl. Life Sci., Univ. Hyogo, <sup>2</sup>Natl. Hlth. Res. Inst., Taiwan

SWAP-70 acts as GEF in the signal transduction pathway at the plasma membrane surface and as a component of Ig class switching complex in the nucleus. The localizations of SWAP-70 to the plasma membrane and the nucleus are dominated by PI(3,4,5)P<sub>3</sub> specific binding site and a nuclear localization signal sequence, respectively, both of witch are located in the PH domain. In this study, we investigated a structural alteration of SWAP-70 PH domain induced at the membrane surface by using solid-state NMR. The <sup>13</sup>C NMR spectra of the membrane associated SWAP-70 PH domain revealed that a conformational transition of the C-terminal  $\alpha$ -helix to a random coil like structure and a structural alteration would expose NLS involved in the C-terminal  $\alpha$ -helix to water and facilitate recognition by Importin- $\alpha$ .

1. はじめに

Switch associated protein-70(SWAP-70)は分子量70 kDaの水溶性蛋白質であり、 細胞膜の表面において、グアニンヌクレオチド交換因子(GEF)として細胞内情報伝達 に関与するとともに、核内においてBリンパ球の免疫グロブリン重鎖のクラススイッ チに関与することが知られている。一次配列の中央に位置するPleckstrin homology (PH)ドメインは、イノシトールリン脂質であるPI(3,4,5)P<sub>3</sub>との選択的な結合を介し て、SWAP-70の細胞質から細胞膜への局在を制御するとともに、SWAP-70の核移行を 制御するシグナル配列(NLS)を含むことが報告されている。Fig. 1Aに溶液中におけ るSWAP-70 PHドメインの立体構造モデルを示した。SWAP-70 PHドメインの立体構造 は、C末端αヘリックスと疎水性コアを形成するβサンドイッチ構造からなる、PHド メインスーパーファミリーに共通の立体構造を示す。本研究では、固体NMR分光法を 用いて、脂質膜上に結合した際のSWAP-70 PHドメインの動的構造を直接観測し、水 溶液中における立体構造との違いを解析するとともに、細胞膜から核への移行の制 御に関わる機構を検討した。

\_\_\_\_\_ キーワード: PHドメイン, 脂質二重膜, SWAP-70

○とくだ なおみ, かわい かつひさ, やぎさわ ひとし, ふくい やすひさ, つじ さとる





**Fig. 1. The three-dimensional model structure** (PDB# 2DN6) **(A) and the primary and the secondary structures (B) of SWAP-70 PH domain in solution.** Positions of Ala and Val residues are shown in (B).

2. 実験方法

大腸菌大量発現系を用いて、[3-<sup>13</sup>C]Alaおよび[1-<sup>13</sup>C]Valを導入したGST融合 SWAP-70 PHドメインの発現を行った。GST融合蛋白質をアフィニティーレジンと結合 した後、thrombin切断によりPHドメインを回収し、イオン交換カラムを用いて単離 精製した。得られたSWAP-70 PHドメインを、PI(3,4,5)P <sup>3</sup>を含む脂質二重膜懸濁液と 混合した後、遠心濃縮により脂質膜に結合したPHドメインを回収した。得られた試 料は、懸濁液の状態で固体NMR測定用サンプル管に密封し、<sup>13</sup>C NMR測定に用いた。測 定は、Chemagnetics CMX Infinity-400(<sup>13</sup>C: 100.6 MHz)を用いて、25 °Cで、DD-MAS 法およびCP-MAS法により行った。

3. 結果と考察

[3-<sup>13</sup>C]Alaおよび[1-<sup>13</sup>C]Val標識SWAP-70 PHドメインの<sup>13</sup>C NMRスペクトルを、各信 号の残基への帰属とともに、Fig. 2および3に示した。モデル構造中において、 Ala300はC末端αヘリックス、Val233, 262, 277 および Ala288はβサンドイッチ構 造、Val243はPI(3,4,5)P3結合サイトに位置する。

水溶液中におけるSWAP-70 PHドメインの立体構造

Fig. 2A, 3Aに示す様に、基質非結合状態において2つのAla残基(Ala288, 300)に由 来する2本の先鋭な信号(18.6, 15.9 ppm)および、5つのVal残基(Val211, 233, 243, 262, 277)に対応する5本の分離した先鋭な信号(174.1, 172.2, 173.8, 171.5, 171.6 ppm)がそれぞれ観測された。これは、水溶液中においてPHドメインがFig. 1A の立体構造モデルに対応する単一の立体構造を形成していることを示している。 Fig. 2B, 3Bに、PHドメインのPI(3, 4, 5)P3結合部位に、PI(3, 4, 5)P3頭部の水溶性アナ ログであるIns(1, 3, 4, 5)P4が結合した状態の<sup>13</sup>C NMRスペクトルを示した。Ins (1, 3, 4, 5)P4の結合により、基質結合サイトに位置するVal243由来の信号に、173.8 ppmから173.6 ppmへの高磁場シフトが観測された。 $\beta$ サンドイッチ構造に含まれる Val233, 262, 277およびAla288由来の信号には大きな変化は見られず、基質結合部 位を除く $\beta$ サンドイッチ構造はIns(1, 3, 4, 5)P4の結合により変化しないことがわか る。また、C末端αヘリックスの中央に位置するAla300の信号も、基質非結合状態と 同じ15.9 ppmに観測されており、C末端αヘリックス構造にも変化は見られない。 脂質膜結合によるSWAP-70 PHドメインの立体構造変化

水溶液中の構造と比較し、固体<sup>13</sup>C NMRにより観測されるSWAP-70 PHドメインの骨 格構造は、脂質膜表面への結合により大きく変化することが見出された。Fig. 2C, 3Cに、脂質膜に結合した状態の[3-<sup>13</sup>C]Alaおよび[1-<sup>13</sup>C]Val標識SWAP-70 PHドメイン のDD-MASスペクトルを示す。Fig. 2Cにおいて、溶液中の立体構造に対応する15.9 ppmの信号に加えて、16.7-16.9 ppmおよび21.2 ppmに新たな信号が観測された。こ れらの信号のうち、16.7-16.9 ppmに観測される信号は、CP-MASスペクトル(Fig. 2D)中において相対強度が大きく減少することから、運動性が高く、二面角のゆらぎ が大きいランダムコイル様構造を反映していると考えられ、C末端に近いAla300に帰 属される。これとは対照的に、21.2 ppmに観測される信号は、CP-MASスペクトル中 (Fig. 2D)において相対強度が大きく、化学シフトの値が低磁場側にシフトしている ことから、運動が制限された  $\beta$ シート構造を示している。この信号は、 $\beta$ 7ストラン ドC末端に位置するAla288の構造変化に由来すると考えられる。16.7-16.9 ppmに観 測されるランダムコイル様構造の信号は、SWAP-70 PHドメインのC末端部が脂質膜へ



の結合によりαヘリックス構造からランダムコイル様構造へと転移することを示している。一方、Fig. 3Cにおいて、βサンドイッチ構造に含まれるVal233,262および277に由来する信号は、脂質膜への結合により、溶液中の172.2,171.6および171.5 ppm(Fig. 3A)から低磁場側に大きくシフトし、170-176 ppmに複数の信号が重なり合った幅の広いスペクトルを与えた。このことから、モデル構造中のβサンドイッチ構造は、脂質膜結合時に大きく構造変化することがわかる。また、構造変化後のVal残基の信号はCP-MASスペクトル(Fig. 3D)中では観測されず、ゆらぎが大きくCP効率が低い構造であると考えられる。

### 脂質膜に結合したPHドメインに対するMgCl2の効果

脂質膜上におけるPHドメインの構造変化に対する 静電相互作用の寄与を評価するため、MgCl2共存下で 脂質膜結合状態の[3-13C]Alaおよび[1-13C]Val標識 SWAP-70 PHドメインの固体 <sup>13</sup>C NMR測定を行った。 MgCl2濃度を0, 5, 10 mMと変化させて測定を行った ところ、PHドメインの構造変化がMgCl2濃度の増加に 伴って抑制され、10 mM MgCl 2存在下では溶液中 (Fig. 2A, 3A)と同じ化学シフトを示した(Fig. 4)。 このことから、脂質二重膜-PHドメイン間の相互作用 による構造変化が、脂質膜表面とPHドメイン間の静 電相互作用によって誘起されることが示唆された。



Fig. 4. Effect of MgCl<sub>2</sub> on the solid-state  ${}^{13}C$ NMR spectra of the [3- ${}^{13}C$ ]Ala-labeled and [1- ${}^{13}C$ ]Val-labeled SWAP-70 PH domain bound to PI(3,4,5)P<sub>3</sub> in vesicles.

脂質膜上で観測されるようなPHドメインの大きな構造変化は、脂質結合サイトへのリガンド結合だけでは誘起されない。このことから、骨格構造の大きな変化には、PHドメインと脂質膜平面との静電相互作用が不可欠であるといえる。SWAP-70PHドメインは、C末端αヘリックス中に核移行シグナル配列(NLS)を有している(Fig. 1)。脂質膜上におけるC末端αヘリックスのランダムコイル様構造への転移は、輸送蛋白質(Importin-α)によるNLSの認識を促進し、SWAP-70の核移行を制御するスイッチとして働くと考えられる。この知見は、Bリンパ球において見出されているSWAP-70の細胞膜への局在に続く核への移行の挙動(Masat, L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2000) 97 2180-4)と一致している。また、Importin-αとNLSの結合モデルにおいてはNLSは伸びた構造でImportin-αに結合する(Fontes, M. R. et al., J. Mol. Biol. (2000) 297 1183-94)ことが示されており、本研究で見出されるC末端αヘリックスの構造変化が、NLSのImportin-αへの結合を促進することを支持している。骨格構造の大きな変化は、隣接ドメインとのドメイン間相互作用にも影響を及ぼすと考えられる。SWAP-70は細胞膜上でGEFとして機能することから、ここで観測された構造変化が、一次配列上で隣り合う触媒ドメインの活性化にも寄与している可能性がある。

**YP3** 固体 NMR 法 および gauge-including projector augmented-wave (GIPAW)法による有機凝集構造の解析と構造精密化 〇鈴木不律, 梶 弘典 京都大学化学研究所

# Structural analysis and refinement of aggregation structure in organic molecules by the combined use of solid-state NMR spectroscopy and gauge-including projector augmented-wave (GIPAW) calculations

OFuritsu Suzuki and Hironori Kaji

Institute for Chemical Research, Kyoto University, Uji, Japan.

The structure refinement for the crystals of tris(8-hydroxyquinoline) aluminum(III) in the  $\delta$  form ( $\delta$ -Alq<sub>3</sub>) was carried out through the combined use of solid-state NMR spectroscopy and the gauge-including projector augmented-wave (GIPAW) method. Although it was difficult to distinguish two previously proposed structures by X-ray powder diffraction measurements, they were clearly distinguished by the isotropic chemical shifts calculated by GIPAW method. However, neither structure could reproduce the experimental chemical shifts. Therefore, we carried out geometry optimization under the periodic boundary condition for all the atoms of the crystal structure proposed by X-ray diffraction experiments, and calculated chemical shifts for the optimized structure. The calculated chemical shifts well reproduced the experimental result. From the study, we found that the combined use of these methods can be a powerful method for the structure refinement of organic aggregates, which cannot be accessed by the conventional X-ray diffraction analysis.

<緒言>

我々は、現在、有機デバイス材料に関する研究を進めている。有機材料の電荷輸送 特性を分子レベルで解明すること、すなわち、どのような分子をどのような凝集状態 で用いれば優れた電荷輸送特性が得られるのかを明らかにすることは、優れた有機デ バイス開発の観点のみでなく、基礎科学の観点からも重要である。しかしながら、結 晶化をできるだけ抑制することが求められる有機ELデバイス材料においては、非晶状 態はもちろんのこと、結晶状態であっても乱れを有していることが多く、その構造解 析 は X 線 回 折 法 で は 困 難 な 場 合 が 多 い。例 え ば、電子輸送材料 で ある tris(8-hydroxyquinoline) aluminum(III) (Alq<sub>3</sub>)にはα、β、γ、δ、ε型の5つの結晶形が存在 することが明らかにされているが、その結晶構造については別々のグループから異な る提案がなされており、確定していない[1-6]。このような状況の下、本研究では、周 期境界条件下の化学シフト計算が可能なGIPAW法[7]を用い、2種の構造が提案されて いるδ-Alq<sub>3</sub>結晶に対してNMR等方化学シフト値を求め、δ-Alq<sub>3</sub>のCP/MAS<sup>13</sup>C NMRス

GIPAW法, 固体NMR法, 化学シフト

○すずきふりつ,かじひろのり

### <実験>

Cölleら[2]、および、Rajeswaranら[3]によりそれぞれ報告された2種のδ-Alq<sub>3</sub>結晶構 造について、セルパラメータおよびAl、C、O、N各原子の座標を各々の文献で報告さ れている値に固定し、周期境界条件の下でH原子の座標のみについて構造最適化を行 った。また、Cölleらの提案した結晶構造については、結晶中の全原子に対する構造最 適化計算も行った。この構造最適化には、平面波基底を用いたDFTに基づき、交換相 関ポテンシャルに一般化密度近似(GGA)を用いた。GGA汎関数としては Perdew-Burke-Ernzerhof (PBE)交換相関汎関数を用いた。平面波エネルギーカットオ フは27.9 Ry(380 eV)とした。

Cölleら、および、Rajeswaranらにより報告された構造および、上述の最適化計算に よって得られた構造について、GIPAW法に基づきNMR化学シフト計算を行った。交 換相関ポテンシャルにGGAを用い、GGA汎関数としてはPBE交換相関汎関数を用いた。 平面波エネルギーカットオフは80 Ry (1088 eV)とした。なお、構造最適化計算には CASTEP、GIPAW法に基づく化学シフト計算にはQuantum-Espressoを用いた。粉末X 線回折プロファイルの計算にはMercuryを用いた。

<結果・考察>

Fig. 1に、facial体のAlq<sub>3</sub>の分子構造を示す。Fig. 2(a)にはCölleら、Fig. 2(b)には Rajeswaranらによってそれぞれ報告されたδ-Alq<sub>3</sub>の結晶構造(いずれにおいても分子

はfacial体からなる)から求めた粉末X線 プロファイルを示す。両構造から計算さ れる粉末X線プロファイルはほぼ一致し ており、X線回折測定によって両構造の 区別や比較検討を行うことは困難である。

Fig. 3(a)およびFig. 3(b)には、それぞれ γ-およびδ-Alq<sub>3</sub>の実測CP/MAS<sup>13</sup>C NMR スペクトル[5]を示す(いずれも結晶中の 分子はfacial体からなる)。Fig. 3(a)と異な り、Fig. 3(b)では各炭素種に対する共鳴線 に分裂が見られる。例えば、C2共鳴線は 3本に明瞭に分裂しているが、このような 共鳴線の分裂は、一分子のfacial体のAlq<sub>3</sub> では見られない特徴であり、分子間相互 作用の影響が示唆される[5]。

Rajeswaran らによって報告された  $\delta$ -Alq<sub>3</sub>の結晶構造に基づきNMR等方化学 シフト値を計算したところ、構造最適化 を全く行わない場合には、計算値が実測 値と全く一致しなかった。また、Cölle ら の提案した構造にはH原子が含まれてい



Fig. 1. The structure of *facial*-Alq<sub>3</sub>.



Fig. 2. Calculated X-ray profiles for crystal structures of  $\delta$ -Alq<sub>3</sub>; (a) proposed by Cölle et al., (b) proposed by Rajeswaran, et al., and (c) after the optimization of all the atomic coordinates for the Cölle's structure.

ない。そこで以降、H原子を適切に付加 し、H原子について構造最適化した構造 を両者の提案した構造として扱う。Fig. 4(a)には、Cölleらのモデルに対してH原 子を最適化した構造に基づいて計算し たNMR等方化学シフト値を示す。Fig. 4(a)の全体的な化学シフトの広がりは、 Fig. 3(b)の化学シフトの広がりと同程 度であり、実測をよく再現している。 Fig. 4(b)には、Rajeswaranらのモデルに 対してH原子を最適化した構造から求 めた等方化学シフト値を示す。この構 造に対しては全体的な化学シフトの広 がりが実測値に比べ大きく広がってお り、実測スペクトルを再現していない。 また、各炭素のシグナルの分裂は実測 に比べかなり大きくなっていることが わかる。このように、X線回折測定のみ では困難であった両者の区別が、本手 法により可能となることが明確である。 また、Fig. 4(a)が、Fig. 4(b)よりも実測 (Fig. 3(b))に近いこともわかる。ただし、 Fig. 4(a)も、実測と完全に一致している わけではない。例えば、C2共鳴線の分 裂はFig. 4(a)においても見られるが、3 本が等間隔に分裂する実測とは一致し ていない。そこで、Cölleらの提案した



Fig. 3. Experimental CP/MAS <sup>13</sup>C NMR spectra of (a)  $\gamma$ -Alq<sub>3</sub> and (b)  $\delta$ -Alq<sub>3</sub>. See Fig. 1 for the assignments of resonance lines.



Fig. 4. NMR isotropic chemical shifts calculated from the crystal structures of (a)  $\delta$ -Alq<sub>3</sub> proposed by Cölle et al., (b) that by Rajeswaran et al., and (c) that after the optimization of all the atomic coordinates for the Cölle's structure.

構造を基に、周期境界条件下での全原子の構造最適化計算を行い、さらなる構造解析 の精密化を試みた。計算結果をFig. 4(c)に示す。Fig. 4(a)、(b)と比較して、全体的な共 鳴線の広がりや各共鳴線の位置が良く再現されていることがわかる。特に、H原子の みを最適化した構造では得られなかった、ほぼ等間隔に分裂した3本のC2共鳴線や、 C3の1本の共鳴線が実測とよく一致している。

Fig. 5には、これらの化学シフトの計算値を縦軸に、実測値を横軸にとった比較図 を示す。これらの図からも、Cölleら、および、Rajeswaranらの構造に比べ、我々の構 造に基づく計算値が、実測値とよい一致を示していることが明確である。

全原子の最適化計算前後の結晶構造変化をFig. 6に示す。最適化前後での炭素原子の変位は最大で0.15 Åであった。この構造最適化を行った結晶構造から求めたX線回 折プロファイルをFig. 2(c)に示す。Fig. 2(c)もFig. 2(a)、(b)とほぼ一致しており、構造 最適化によるX線回折プロファイルの明確な変化は認められない。この結果から、少 なくとも今回のδ-Alq<sub>3</sub>結晶に対しては、X線回折法に比べ、固体NMRの方が構造を精 密に決定できる、すなわち、構造精密化に有用であることが明らかである。

有機材料における電荷輸送は、分子間での電荷のホッピング伝導によって起こる。



Fig. 5. Comparison of experimental and calculated isotropic chemical shifts of  $\delta$ -Alq<sub>3</sub> crystals. For the chemical shift calculations, the structures proposed by Cölle et al. and by Rajeswaran et al. are used in (a) and (b), respectively. In (c), all the atomic coordinates are optimized for the Cölle's structure. Error bars indicate the line widths of respective experimental resonance lines.

そのため、分子間の波動関数の重なり(電荷移動積分)が電荷輸送特性を決める重要 な因子の一つとなる。我々はすでに、分子間距離が0.1 - 0.2 Å変化するだけでも電荷 移動積分が大きく変わることを明らかにしている[8]。そのため、有機材料の電荷輸送

特性を分子レベルで明らかにするという 我々の目的に対しては、X線回折法で得られ る精度では十分でなく、本研究での精度が必 須となる。

現在、δ-Alq<sub>3</sub>における共鳴線分裂の起源に 関し、分子内、および、分子間の相互作用の 寄与に着目してその明確化に取り組んでい る。詳細については当日報告する予定である。

### <謝辞>

本研究は、日本学術振興会の最先端研究開 発支援プログラムにより、助成を受けたもの である。また、一部は京都大学スーパーコン ピュータ共同研究制度(若手奨励枠)による。

<文献>

- [1] Brinkmann, M. et al. J. Am. Chem. Soc. 2000, 122, 5147.
- [2] Cölle, M. et al. Chem. Commun. 2003, 23, 2908.
- [3] Rajeswaran, et al. Zeitschrift Fur Kristallogr. NCS. 2003, 218, 439.
- [4] Muccini, M. et al. Adv. Mater. 2004, 16, 861.
- [5] Kaji, H. et al. J. Am. Chem. Soc. 2006, 128, 4292.
- [6] Rajeswaran, M. et al. J. Chem. Crystallogr. 2010, 40, 195.
- [7] Pickard, C. J.; Mauri, F. Phys. Rev. B. 2001, 63, 245101.
- [8] Yamada, T. et al. Org. Electron. 2010, 11, 255; Yamada, T. et al. submitted.



Fig. 6. Crystal structures of  $\delta$ -Alq<sub>3</sub>. Grey lines show the structure proposed by Cölle et al. Black lines show the structure after the optimization of all the atomic coordinates for the Cölle's structure. 光照射固体NMRによる光受容膜タンパク質ppR-pHtrll 複合体の負の走光性発現に関わるTyr174の局所構造変化 の解析 〇日高徹郎<sup>1</sup>,友永雄也<sup>1</sup>,川村出<sup>1</sup>,和田昭盛<sup>2</sup>,須藤雄気<sup>3</sup>,加茂直樹<sup>4</sup>, 内藤晶<sup>1</sup> <sup>1</sup>横国大院・工学府,<sup>2</sup>神戸薬科大・薬学部,<sup>3</sup>名大院・理学研究科, <sup>4</sup>松山大・薬学部

## Analysis of local dynamical and structural change at Tyr174 of photoreceptor protein *ppR-pHtrII* complex in relation to the negative phototaxis by *in situ* photo-irradiated solid-state NMR

⊙Tetsurou Hidaka<sup>1</sup>, Yuya Tomonaga<sup>1</sup>, Izuru Kawamura<sup>1</sup>, Akimori Wada<sup>2</sup>, Yuki Sudo<sup>3</sup>, Naoki Kamo<sup>4</sup>, Akira Naito<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Graduate School of Engineering, Yokohama National University, Yokohama, Japan.* 

<sup>2</sup>College of Pharmaceutical Sciences, Kobe Pharmaceutical University, Hyogo, Japan.

<sup>3</sup>Division of Biological Science, Graduate School of Science, Nagoya University, Nagoya, Japan. <sup>4</sup>College of Pharmaceutical Sciences, Matsuyama University, Matsuyama, Japan.

*Pharaonis* phoborhodopsin (*p*pR) functions as a negative phototaxis receptor in *N.pharaonis*. *p*pR forms a complex with *p*HtrII, and this complex transmits the photosignal into cytoplasm. However, initial step of the signal transduction mechanism induced by the retinal photoisomerization of *p*pR, has not yet well understood. In this study, we focused on the property at Tyr174 of F-helix in *p*pR and investigated dynamic structure of  $[1-^{13}C]$ Tyr-,  $[^{15}N]$ Pro-*p*pR and *p*pR/*p*HtrII complex in the dark and light states by means of *in situ* photo-irradiated solid state NMR. We observed that dynamics and/or conformation of Tyr174 moiety significantly changed to a more flexible state when *p*pR changed to the M intermediate. Furthermore, it was observed that a local rather than overall structure of *p*pR was changed in the M intermediate.

【序論】

固体NMR測定中に測定試料に対して光照射を行うことが可能な"In situ光照射固体 NMR測定法"を開発し、これを用いて特定の光に応答するレチナールタンパク質の一 種であるpharaonis phoborhodopsin (ppR or SRII: Sensory Rhodopsin II)の光励起状態を 捕捉して、レチナール光異性化による光活性中間体およびそのタンパク質の動的構造 変化を観測することに成功したのでその結果を報告する。

*pp*Rは*N.pharaonis*由来の光受容膜タンパク質であり、レチナールを発色団とする7本膜貫通αヘリックスからなる。*pp*Rは生体膜中では*pHtrII (pharaonis* Halobacterial

in situ光照射-固体NMR, レチナールタンパク質, 光活性中間体

○ひだかてつろう,ともながゆうや、かわむらいずる、わだあきもり、すどうゆうき、 かもなおき、ないとうあきら
transducer II) と2:2の複合体を形成する。この複合体は、細菌がDNA傷害を防ぐため に青緑色の光から逃避する負の走光性を発現する光センサーとして機能する。これは レチナールの光異性化をトリガーとしてppRからトランスデューサータンパク質であ るpHtrII、下流のリン酸化カスケードへと信号が伝わって鞭毛の動きを制御している。 信号伝達の初期過程において細胞膜中で起きるレチナール光異性化に伴うppRの構造 変化が機能に関わっており、特にppRのFhelixの動的構造変化が重要とされている。

光活性状態の構造情報の詳細を観測する際に、他の分光法に比べて格段に高い原子 分解能をもつ固体NMR分光法に"*In situ*光照射"が可能になれば局所動的構造変化の 観測が可能になるため、*in situ*光照射固体NMR測定は機能解明に非常に重要である。

本研究では、負の走光性機能が失活したT204A変異体ppR<sup>[1,2]</sup>と野生型ppRの比較から信号伝達機構の初期過程におけるF-helixの動的・構造変化を観測し、*in situ*光照射固体NMR測定法を用いて負の走光性に必須なアミノ酸残基Tyr174近傍の基底状態と光活性化状態であるM中間体の動的・構造変化の解析を行い、ppRの信号伝達メカニズムを明らかにすることを目的としている。

#### 【実験】試料調製

ppR -His tagプラスミド、pHtrII-His tagプラスミドを形質転換により大腸菌に導入した。M9培地を用いて大腸菌BL21(DE3)を培養し、[15, 20-<sup>13</sup>C]retinal、[1-<sup>13</sup>C]Tyr、[<sup>15</sup>N]Pro を添加して、IPTGにより発現誘導を行うことでアミノ酸選択的に安定同位体標識した ppRの発現を行った。pHtrIIはLB培地を用いて上記と同様の手順で非標識の試料を得 た。タンパク質が発現した大腸菌を集菌、破砕、膜画分の可溶化、Ni<sup>2+</sup>-Agaroseによ る精製を行い、[15, 20-<sup>13</sup>C]retinal、[1-<sup>13</sup>C]Tyr、[<sup>15</sup>N]Pro-*p*pRおよびnon-label *p*HtrIIを得 た。[1-<sup>13</sup>C]Tyr、[<sup>15</sup>N]Pro-T204A<sup>ppR</sup>についても上記と同様の操作で得た。

次にppR/pHtrII complexの脂質二重膜への再構成を行い、固体NMR測定試料とした。 膜はEggPCを用いてppR:EggPC=1:30(モル比)の割合で再構成し、測定用Buffer(pH7.0, HEPES 5 mM, NaCl 10 mM)で懸濁し、遠心分離により得られたペレットを試料管に封 入した。[15, 20-<sup>13</sup>C]retinal、[1-<sup>13</sup>C]Tyr、[<sup>15</sup>N]Pro-ppR/pHtrIIについて<sup>13</sup>C,<sup>15</sup>N REDOR (Rotational Echo DOuble Resonance) filter<sup>[3]</sup>、*in situ*光照射<sup>13</sup>Cおよび<sup>15</sup>N CP-MAS NMR測 定を行った。ppRの光励起には532 nm、5 mWのグリーンレーザー光を使用し、レチナ ールの信号変化からM中間体の生成を確認した。

#### In situ光照射固体NMR測定法の開発

グリーンレーザー光を固体NMR測定中の試料 へ照射するために、まず磁場の外側からプローブ の中へプラスティックファイバーを通した。さら にそのファイバーの照射角度をrotorの傾斜角であ るMagic Angle 54.7°に固定した。rotorのキャップ にはガラス棒を用い、Fig. 1のようにガラスキャッ プの先端を工夫することでグリーンレーザー光が rotor内で散乱し、測定試料に垂直に光が十分照射 されるように施した。



Fig. 1 The schematic of *in situ* photoirradiated solid-state NMR.

元来、固体NMRを用いた光中間体捕捉はマグネットの外で測定試料に光照射して測

定を行っていたが、*in situ*光照射固体NMR測定法はマグネットの中で温度、波長、光 強度などを選択的に設定できるため、光活性中間体を効果的に捕捉し、その動的構造 情報を獲得することができる手法である。

【結果と考察】

REDOR filterを用いたppRとT204Aの[1-<sup>13</sup>C]Tyr174と[<sup>15</sup>N]Pro175の帰属



Fig. 2 REDOR filtered <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N NMR spectra of [1-<sup>13</sup>C]Tyr, [<sup>15</sup>N]Pro-*p*pR and *p*pR/*p*HtrII. Top, middle and bottom spectra are UNREDOR, REDOR and UNREDOR minus REDOR, respectively. (a), (b): *p*pR monomer. (c), (d) : *p*pR/*p*HtrII complex.

Fig. 2 (a), (b)に [1-<sup>13</sup>C]Tyr, [<sup>15</sup>N]Pro-*pp*R、Fig. 2 (c), (d)に[1-<sup>13</sup>C]Tyr, [<sup>15</sup>N]Pro-*pp*R/*p*HtrII complexの基底状態の<sup>13</sup>C REDOR filter測定の結果を示す。Fig. 2に示すように、*pp*R monomerではTyr174は175.5 ppm、Pro175は113.8 ppmで、*p*HtrIIと複合体形成によりその化学シフト値はわずかに変化した。さらに、負の走光性が失活しているT204A変異体の[1-<sup>13</sup>C] Tyr174のREDOR filterを行い、174.7 ppmの信号をT204A monomerの[1-<sup>13</sup>C] Tyr174の信号に帰属し、T204A monomerは*p*R monomerと比較して約1 ppm高磁場シフトしていることがわかった。このことからそれぞれの基底状態ではレチナール近傍の環境およびF helixの構造が異なっているため、T204A monomerにおける基底状態は運動性の高い状態であり、これは光励起状態になっても信号伝達活性のない状態にあると示唆される。

#### In situ 光照射固体 NMR 測定によるレチナール光異性化とタンパク質構造変化の解析

*in situ* 光照射固体 NMR を用いて *p*PR の信号伝達に重要な F helix の Tyr174 の動的 構造変化を基底状態と M 中間体状態で比較することが可能となった。Fig. 3 に[15, 20-<sup>13</sup>C]retinal-*p*PR monomer および *p*PR/*p*HtrII complex におけるレチナールの  $C_{20}$ の<sup>13</sup>C CP-MAS 固体 NMR スペクトルを示した。光照射中では、基底状態で 13.5 ppm にあっ た  $C_{20}$ の信号が All-*trans* 型から 13-*cis*、15-*anti* 型へ光異性化により転移し、22~24 ppm 付近に新たにピークが現れた。これより固体 NMR 測定中に M 中間体が捕捉されたこ とを確認した。またピークが複数もしくは広幅化していることから M 中間体ではひ とつの状態ではなく、タンパクの構造を含めて少なくとも 2 つ以上の状態が共存する ことが *in situ* 光照射固体 NMR 測定の結果から示唆された。

次にレチナールの光異性化に伴うタンパクの光活性状態を観察するために、[1-<sup>13</sup>C]

Tyr, [<sup>15</sup>N]Pro-ppR および[1-<sup>13</sup>C]Tyr, [<sup>15</sup>N]Pro-ppR/pHtrIIの in situ 光照射 <sup>13</sup>C DD、CP MAS

NMR 測定を行った。Fig. 4 にその結果を 示す。ppR monomer の Tyr174 の信号は 175.5 ppm であり、Fig. 4 (a)の DD MAS では175.6 ppm のピークが増大し、(b)の CP MAS では 175.2 ppm のピークが減少 している。つまり ppR は monomer 状態で は光照射時に Tyr174 を含む F helix の運 動性が上昇していることを示唆する。ま た(c)と(d)に示す ppR/pHtrII complex の [1-<sup>13</sup>C]Tyr174 の 175.1 ppm のピークと [<sup>15</sup>N]Pro175の114.1 ppm 付近のピークが 共に減少し、同時にそれぞれ 175.7 ppm、 112.4 ppm にシフトしていることから動 的構造変化が起こると考えられる。これ より信号伝達状態時に Tyr174 近傍が起 点となる F helix の pHtrII 側への tilt が生 じることと相関があることが示唆された。



Fig. 3 *In situ* photo-irradiated <sup>13</sup>C CP MAS NMR spectra of [15, 20-<sup>13</sup>C] retinal-*p*pR (left), *p*pR/*p*HtrII complex (right) at 253 K. Gray and black lines are ground states and M intermediate. The bottom spectra are difference spectra of ground state minus M intermediate.



Fig. 4 *In situ* photo-irradiated <sup>13</sup>C CP, DD MAS spectra of [1-<sup>13</sup>C]Tyr, [<sup>15</sup>N]Pro-*p*pR monomer and *p*pR/*p*HtrII complex. (a) and (b) are DD and CP MAS spectra of *p*pR monomer, respectively. (c) and (d) are <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N CP MAS NMR spectra of *p*pR/*p*HtrII, respectively. The bottom spectra are difference spectra of ground state minus M intermediate.

【結論】

*in situ* 光照射固体 NMR 測定法を開発し、これを利用して NMR のマグネットの中で 光受容膜タンパク質 *p*pR の光活性状態の捕捉に成功した。さらに M 中間体において レチナールが 2 つ以上の状態を持つことが共存することが示唆された。また *in situ* 光 照射固体 NMR 測定の結果から得られた F helix の運動性の上昇は *p*pR の信号伝達状態 では F ヘリックスの *p*HtrII 側へ起こる tilt と相関があることが示唆された。

#### [REFERENCES]

- [1] Y. Sudo et al. (2006) J. Biol. Chem 281, 34239-34245
- [2] Y. Sudo and J. L. Spudich (2006) PNAS 103, 16129-16134
- [3] I. Kawamura et al. (2007) J. Am. Chem. Soc. 129, 1016-1017

<sup>6</sup>Li MAS NMRIこよるLiCoO<sub>2</sub>の微視的機構の解析: イオン拡散とスピン拡散 〇野田 泰斗<sup>1</sup>、水野 敬<sup>2</sup>、竹腰 清乃理<sup>1</sup> <sup>1</sup>京大・理 <sup>2</sup>日本電子(株)

#### <sup>6</sup>Li MAS NMR of LiCoO<sub>2</sub> from a microscopic viewpoint: ion diffusion and spin diffusion

○Yasuto Noda<sup>1</sup>, Takashi Mizuno<sup>2</sup>, and K. Takegoshi<sup>1</sup> <sup>1</sup>Graduate School of Science, Kyoto University, Kyoto, Japan. <sup>2</sup>JEOL ltd., Japan.

Lithium ion diffusion in cathode materials of lithium-ion batteries plays important roles in properties such as high-rate and high-energy density. Lithium cobaltate containing excess lithium ions,  $Li_xCoO_2$  (x>1), is widely used as a cathode material in commercial lithium-ion batteries. However the local structure and ion diffusion mechanism are under discussions. In this presentation, we report ion diffusion and spin diffusion investigated with exchange NMR measured by Cryocoil MAS NMR probe, which was recently developed to enhance the S/N about 4 times, and variable temperature MAS NMR.

#### 【背景と目的】

層状酸化物の LiCoO<sub>2</sub> は商用リチウムイオン電池の正極として幅広く使用されている。その構造とイオン拡散機構をミクロな視点から理解することは、高エネルギー密度、長寿命で高速充放電可能な電池の開発において重要である。<sup>7</sup>Li MAS NMR はリチウムを微視的に高感度で測定できるが、化学シフト幅が小さく四極子相互作用のために線幅が広がり解析が難しい。<sup>6</sup>Li は天然存在比が 7.59%かつ低ガンマ核であるため感度が悪いが、四極子相互作用が <sup>7</sup>Li に比べて小さく分解能がよい。そこで <sup>6</sup>Li をエンリッチした LiCoO<sub>2</sub> を作製し、さらに最近開発された S/N を 4 倍向上させるクライオコイル MAS プローブ[1]を用いて二次元交換 NMR を室温で測定した。また通常のプローブにより温度変化 MAS NMR を測定した。本研究の目的はリチウムイオン拡散とスピン拡散を解析し欠陥部位の局所構造との関係を考察することである。

#### 【実験方法】

共沈法を用いて<sup>6</sup>Li 95%標識した LiCoO<sub>2</sub>を作製した[2]。水酸化リチウム水溶液と酢酸リ チウム水溶液を撹拌した後に蒸発させ前駆体を得た。前駆体を 400℃で 1 時間煆焼した後 に粉砕して 4 つに分割し、それぞれ 600℃、700℃、800℃、900℃で 10 時間本焼した。

<sup>6</sup>Li 二次元交換 MAS NMR と温度可変 MAS NMR はいずれも7 T の磁場中で周波数 44.35 MHz で測定した。基準物質には 1M LiCl 水溶液を用いた。二次元交換 MAS NMR はクライオコイル MAS NMR プローブを用いた。MAS 回転速度は 5 kHz、90 度パルス長は 4.5 µs、ミキシング時間は 500 ms である。温度変化 MAS NMR はバリアン 5 mm プローブを 用いて MAS 回転速度を 10 kHz で測定した。パルスシーケンスは低ガンマ核で問題となる リンギングを抑制する位相回しを行うエコー[3]を用いた。90 度パルス長は 3.5 µs である。試 料温度は硝酸鉛のピーク位置から文献[4]の値より外部較正した。

コバルト酸リチウム、拡散、交換 NMR

のだ やすと、みずの たかし、たけごし きよのり

#### 【結果と考察】

Fig. 1 に 900℃で本焼した試料の交換 NMR の結果を示す。0 ppm に LiCoO<sub>2</sub> によるメイ ンピークの他に 4, -5, -17 ppm にマイナーピークが観測された。これらのマイナーピークは 作製した LiCoO<sub>2</sub> がリチウム過剰であることを示している。メインピークと4 ppm、-5 ppm のマ イナーピークとの間にそれぞれクロスピークが観測され、マイナーピーク間では観測されな かった。これらのクロスピークがスピン拡散によるものかリチウムイオン拡散によるものか調 べるために、温度を変えて MAS NMR を測定した。Fig. 2 にその結果を示す。二次元交換 NMR で観測されたマイナーピークは全て温度上昇と共に 0 ppm ヘシフトするが、幅広化や メインピークと一体化することはなかった。繰り返し時間を短くして積算を増やすと、さらに 180 ppm 付近と 1100 ppm 付近にマイナーピークが観測され、これらのピークも温度上昇と 共に 0 ppm ヘシフトした。

マイナーピークの化学シフト値と温度の逆数をプロットすると直線となった。これによりマイ ナーピークは常磁性シフトによるものと帰属した。これは一部のコバルトが常磁性イオンとな っていることを示している。LiCoO2 中のリチウムイオンの拡散係数は 100℃上昇すると二桁 以上大きくなり 400K で 10<sup>-11</sup> 台になるという報告がある[5]。これは温度変化 NMR でメイン ピークとマイナーピークが一体化するに十分である。しかし幅広化も一体化もしなかったこ とから二次元交換 NMR で見られたクロスピークはスピン拡散によるものであり、マイナーピ ークとメインピークの空間距離が近いことを示唆している。講演では得られた知見ともとに局 所構造モデルを議論する。







Fig. 2 Spectra of variable temperature MAS NMR measured with echo sequence from 50 ℃ to 120 ℃.

#### 【謝辞】

本研究は JST の CREST の支援をうけて行われた。 【参考文献】

- [1] T. Mizuno, K. Hioka, K. Fujioka, K. Takegoshi, Rev. Sci. Instrum. 79, 044706 (2008).
- [2] H. W. Chan, J. G. Duh, S. R. Sheen, J. Power Sources 115, 110 (2003).
- [3] A. C. Kunwar, G. L. Turner, E. Oldfield, J. Magn. Reson. 69, 124 (1986).
- [4] A. Bielecki and D. P. Burum, J. Magn. Reson. A 116, 215 (1995).
- [5] A. Van der Ven and G. Ceder, Electrochem. Solid-State Lett. 3, 301 (2000).

#### 地磁気NMRを用いたボトル内液体物の検査

○渡邉翔大,赤羽英夫,糸崎秀夫 大阪大学大学院基礎工学研究科

#### Screening bottled liquids using Earth's Field NMR

○Shota Watanabe, Hideo Sato-Akaba, and Hideo Itozaki Graduate School of Engineering Science, Osaka University.

It is possible to screen liquids by measuring relaxation times, because they are unique to the material. In low magnetic field NMR the differences are more distinct, as the relaxation time is influenced by molecular movement. We developed an Earth's Field NMR device which uses a pre-polarization field. We measured the relaxation times both during and after the pre-polarization pulse. In the case of some liquids these relaxation times differ. By measuring these two relaxation times the screening of bottled liquids should be possible.

#### 【研究の背景】

近年、テロ未遂事件によりボトル内液体物の飛行機への持ち込みが規制されている。 そのため、航空業界からは規制緩和のために液体物の検査装置の開発が求められてい る。洋酒類の容器は様々な形状・材質の物が存在しており、全てに対応できる検査装 置は開発されていない。我々のグループでは、液体物検査を目的とした地磁気NMR装 置の開発を行っている。NMRを用いた液体物検査の研究は、液体の拡散係数や高磁場 での緩和時間を用いて行われている<sup>1,2,3</sup>。しかし、拡散係数に関してはサンプル体積 が大きいため液体の対流が支配的となるため、応用は難しい。また、一般的に液体物 による緩和時間の差は高磁場より低磁場で強調される。それは、縦緩和時間が分子運 動により影響されるからである。そこで、我々は地磁気NMRに着目した。地磁気NMR は高磁場NMRに比べ、様々な液体物で縦緩和時間の違いが大きく強調される。水のよ うに相関時間の短い物質は、高磁場でのみ周波数依存性を持ち、相関時間の長い物質 では、低磁場においても周波数依存性を持つ。分子内の双極子-双極子緩和による縦 緩和時間は次式によって表される<sup>4</sup>。

$$\frac{1}{T_1} = 2a \frac{\gamma^4}{r^6} \left( \frac{\tau_c}{1 + \omega^2 \tau_c^2} + \frac{4\tau_c}{1 + 4\omega^2 \tau_c^2} \right)$$
(1)

ここで、 $a = 3\mu_0^2 \hbar^2/320\pi^2$ 、 $\mu_0$ は真空の透磁率、 $\gamma$ は核磁気回転比、 $\tau_C$ は相関時間、r は核同士の距離である。

本研究では、地磁気NMR装置を開発し縦緩和時間の測定を可能にした。地磁気NMR は、均質な磁場である地磁気を用いているため、比較的大きな試料空間を確保するこ

液体物検查,地磁気NMR,緩和時間

○ わたなべしょうた,あかばひでお,いとざきひでお

とができる。しかし、低磁場では分極される磁化が微小であるために信号強度が弱く なる。さらに、低周波であるために検出感度が低い。そこで、地磁気下のNMR測定に おいて高い感度を得るために、地磁気に対して約1000倍の分極磁場をNMR検出前に照 射して分極される磁化を増大させる。信号の読み取りには均質な地磁気を利用するた め、分極磁場は均質である必要がない。そのため、分極コイルの製作が容易であり小 型化できる。開発した装置では、分極磁場下において磁化が増大する過程と地磁気下 において磁化が減少する過程の2つの縦緩和時間を測定できる。

分極磁場下と地磁気下での縦緩和時間に差がある液体物が存在する。この縦緩和時間の差に着目し、分極磁場下での緩和時間・地磁気下での縦緩和時間の検査を行った。

#### 【地磁気NMR装置の概要】

開発したボトル内液体物検査を行う地磁気NMR装置の概要を**Fig.1**に示す<sup>5</sup>。本装置 は、主に分極コイル(内径×長さ:165×210)・RFコイル(76×140)・送受信切り替え回 路・プリアンプ・分極コイル制御用回路から成り立っている。AD/DAボード(USB-6251, National Instrument, Ausitin, TX)をPCで制御し、信号の送受信や分極磁場の制御を行う。 本研究では、特別な磁気シールドルームは使用していない。



Fig.1 Schematic diagram of Earth's Field NMR Spectrometer. A TTL output from a multifunction data-acquisition (DAQ) board was used to control the pre-polarization coil. An analog voltage signal (DC source) from the DAQ was connected to a tank circuit via a buffer amplifier. A TTL output was used to control a mechanical relay (SIL05-1A72-71D, MEDER electronic AG) for disconnecting the DC source from the tank circuit. Data acquisition is also started at this point. FID signals detected in the resonator coil were amplified and led to the DAQ board.

#### 【測定原理・方法】

分極磁場を用いた地磁気NMRの原 理をFig.2に示す。液体中のプロトン は地磁気下では磁化が微弱であるた め、分極磁場下で磁化を増大させ、均 質な地磁気下でNMRの検出を行う。 磁化の検出には、90°パルスを用いて FID信号を取得する。Fig.2の破線は磁 化の変化を示す。分極磁場下では縦緩 和時間T<sub>1P</sub>で磁化が増大し、分極磁場 照射終了後に磁化が地磁気下では縦 緩和時間T<sub>1E</sub>で熱平衡状態へと減少し ていく。

 $T_1$ 計測のシーケンスを**Fig.3**に示す。 分極磁場下における縦緩和時間 $T_1$ の 測定は、 $\tau_E$ を一定とし $\tau_P$ を変化させた 場合のFID信号の増減から推定する。  $\tau_P$ の長さにより、プロトンの磁化の大 きさが変化するため、FID信号のピー ク強度が変化する。ピーク強度を $\tau_P$ の関数でプロットすることにより分 極磁場下における $T_{1P}$ を推定すること ができる。地磁気下における縦緩和時



Fig.2 magnetization process during and after the pre-polarization pulse.



Fig.3 Pulse sequence for measuring  $T_1$ 

間 $T_{1E}$ の測定は、 $\tau_P$ を一定とし $\tau_E$ を変化させた場合のFID信号の増減から推定を行う。 今回用いた分極磁場は35.2mT、また実験室内の地磁気は31.7 $\mu$ Tであった。

#### 【結果・考察】

上記の方法により、分極磁場下・地磁気下における縦緩和時間T<sub>1</sub>の測定を行った。 ワインとエタノールおよび水の緩和曲線をFig.4に示す。Fig.4 (a)では、分極磁場下に おいて熱平衡状態へ達する過程を観測でき、その縦緩和時間は水の2.44sに対しワイ ンでは1.13sであり、エタノールでは1.38sであった。Fig.4 (b)では、地磁気下において 熱平衡状態へ達する過程が観測でき、その縦緩和時間は水の2.61sに対しワインでは 0.76sであり、エタノールでは1.33sとであった。Fig.5に上記の結果を含め9種類の液体 物のT<sub>IP</sub>, T<sub>IE</sub>を示す。

数十mTの分極磁場と均質な地磁気によりNMR信号を計測する簡易なNMR装置を試作し、 $T_1$ での液体物検査を行った。結果、分極磁場下及び地磁気下それぞれの $T_1$ である $T_{1P}$ , $T_{1E}$ を用いることにより、種々の液体物を検査することがわかった。今後、空港等における液体物検査に応用されることが期待できる。



Fig.4 T<sub>1</sub> curve of NMR signal for Wine, Ethanol(95%) and Water during Pre-polarization pulse (35.2mT) (a), and in Earth's Field (31.7  $\mu$  T) (b).The lines represent the fitted results.



Fig.5 Relationship between  $T_{1P}$  and  $T_{1E}$  for various samples.

a. Samples in unopened bottles.

b. without degassing dissolved oxygen.

c. concentration for CuSO<sub>4</sub>  $\cdot$  5H<sub>2</sub>O aqueous solution : 2.0µM

d. concentration for glucose aquenous solution : 1.7M

#### 【参考文献】

- 1. S. Kumar; Appl. Magn. Reson. 25, 585-597, (2004)
- J.Mauler, E.Danieli, F.Casanova, and B.Blumich; in "EXPLOSIVES DETECTION USING MAGNETIC AND NUCLEAR RESONANCE TECHNIQUES" 193-203, (2009)
- 3. A.Gradisek and T.Apih; Appl. Magn. Reson. 38, 485-493, (2010)
- 4. J.W.Akitt; NMR入門, 東京化学同人
- 5. 第48回 NMR討論会講演要旨集, 福岡, YP11, 128-129, (2009)

NQR リモートセンシングの電磁界シミュレーション

○中原優<sup>1</sup>、篠原淳一郎<sup>1</sup>、糸崎秀夫<sup>1</sup>、赤羽英夫<sup>1</sup>
 <sup>1</sup>大阪大学大学院基礎工学研究科

#### Electromagnetic simulation of NQR remote detection

•Yu Nakahara<sup>1</sup>, Junichiro Shinohara<sup>1</sup>, Hideo Itozaki<sup>1</sup> and Hideo Akaba<sup>1</sup> <sup>1</sup>Graduate School of Science Engineering, Osaka University

Abstract

Nuclear quadrupole resonance (NQR) spectroscopy can be applied to the detection of illicit substances. In this paper we developed a simulator to estimate the sensitivity of NQR remote detection. We first obtain the distribution of the transmission field using Biot-Savart's law. The NQR signal strength is then calculated by assuming radiation to be created by ideal dipoles throughout the sample. The magnitude and orientation of these dipoles are calculated from the transmission field. By shifting the position of the virtual sample, the NQR signal strength distribution can be obtained. We compare the simulation results with the results of an experiment measuring the free induction decay (FID) signal of 100g of HMT. Both the simulation and experiment produced similar NQR signal strength distributions.

NQR (核四極子共鳴)は、化学物質を非接触で検知できる技術であり、多くの爆発物 や不正薬品には、NQR 反応を起こす<sup>14</sup>N を持つことから、その技術を応用したセキュ リティー分野での応用が期待されている。

現在、多くの不正薬品が国内に持ち込まれている。このように海外から持ち込まれる不正物質に対し、NQR を用いてこれらの物質を検知するためには、アンテナの感度分布を測定し、構造を最適化する必要がある。

そこで、本研究ではアンテナの感度分布を電磁界理論、NQR 物性を用いた C 言語の自作シミュレーションを用いて計算し、実際に計測した結果と比較し検討を行った。

#### アンテナ構造

現在、NQR計測には二つのソレノイドコイルを照射磁場が反対方向を向くように接続し、遠方から一様に入ってくるノイズに対して差分型となり耐ノイズ性の高いグラジオメータを送受信アンテナとして用いている。アンテナの回路図をFig.1 (a)、アンテナの配置方法をFig.1 (b)に示す。アンテナのリングの直径は12.5cmである。

この構造のアンテナについてシミュレーションにより、送信磁場分布、NQR信号受 信感度分布を検討した。

キーワード: NQR、シミュレーション、NQR核磁気モーメント

oなかはらゆう、しのはらじゅんいちろう、いとざきひでお、あかばひでお







(b) Gradiometer

Fig.1 Structure of antenna

シミュレーション方法

#### (1)送信磁場

ビオ・サバールの法則を用いて一つのソレノイドコイルの送信磁場分布を計算する。 計算に用いる座標系をFig.2に示す。グラジオメータの送信磁場は、反転し隣り合って 接続された二つのソレノイドコイとして計算する。ソレノイドコイルが作る送信磁場 は式 (1)~(3)のように示される。ここで、µ0は透磁率、Iは電流である。





Fig.2 Simulation coordinate system

(2)受信磁場

NQR試料中のスピンが輻射する磁場を核磁気ダイポールとみなすことができるので、送信磁場と反対方向でその強度によって大きさを変えるダイポールの作る磁場が送受信アンテナに励起する電圧を計算することで受信磁場分布を計算する。受信磁場は式 (4)のように示され、ダイポールが作る磁場の座標系をFig.3に示す。

$$B(m,r) = \frac{\mu_0}{4\pi r^3} (3(m \cdot \hat{r})\hat{r} - m)$$



Fig.3 Dipole coordinate system

(3)磁気ダイポール

NQR 計測では、多結晶のサンプルを用いるのでスピンの主軸方向があらゆる方向 へ一様に分散しているとみなせる。一般的に単結晶では、磁化ベクトルを直交座標で 式 (5)のように示されるので、多結晶ではこのベクトルを全方向について積算するこ とで磁気ダイポールの磁化ベクトルを計算することができる。積算した結果を式 (6) に示す<sup>[1]</sup>。



このように、多結晶ではスピンがあらゆる方向を向いているが、信号を返すのは励 起磁場と反対方向だけである。よって、多結晶の NQR 信号は、大きさが励起磁場と パルス幅の積(Bt)に依存し励起磁場方向と逆方向を向いたダイポールとみなすこと ができる。

実際にサンプルに一様な磁場を照射し、Table.1のパラメータを用いてパルス幅依存 性を測定した結果を Fig.5 に示す。測定は、温度を 20℃に保ちながらパルス幅を 1µs ずつ変化させ free induction decay (FID)を用いて測定している。また、測定結果は式 (7) で Table.2 を用いてフィッティングした。



Table.1 Experimental parameters

Frequency	3.3075	[MHz]
Accumulation	300	
Power	400	[W]
Repitation delay	5	[ms]
Sample	HMT (20g)	
Tempareture	293	[K]

Fig.5 Pulse width dependence of NQR signal intensity

$$C_1 \left| \frac{1}{\sqrt{x}} Bessel(\frac{3}{2}, \frac{x}{C_2}) \right|$$
(7)

	Table.2 Fitting parameters
	Confidence interval[95%]
1	

	0	onnuence i	
C1	[	334208.7	34955.65 ]
C2	[	38.7245	39.2449 ]

このように、磁化ベクトルを式 (5)で計算した3/2次のベッセル関数で近似できる。 シミュレーションでは、このパルス幅の変化を送信磁場の強度の変化として取り入れた。90°パルスとなる磁場強度を決め、その値からの送信磁場の変化によって磁気ダ イポールの大きさがベッセル関数にしたがって変化する計算となる。

#### 実験結果

ピックアップコイル用いてアンテナの送信磁場分布を測定し、HMT (100g:5×5× 5cm<sup>3</sup>)をアンテナ表面から5mmでx-y平面について移動させてFIDを用いて受信感度分 布を測定した。この結果をFig.6でシミュレーション結果と比較した。測定パラメータ をTable.3に示す。計算時間はCPU 2GHz、メモリ2GBのPCで10分11秒である。



Fig.6 Comparison of simulation and experiment

送信磁場については、グラジオメー タのリングの交点に磁束が集中するた め送信磁場強度が強くなっている。交 点以外の場所ではほぼ一様となり、ア ンテナ外では磁場が急激に弱くなって

Frequency	3.306	[MHz]
Accumulation	300	
Power	400	[W]
Repitation delay	5	[ms]
Sample	HMT (100g, 5	×5×5cm)

Table.3 Experimental parameters

いることが分かる。受信信号については、送信が最大となるところで受信信号も最大 となり、サンプルに大きさがあるため送信に比べ緩やかな分布を持つことが分かる。 送受信ともにシミュレーションと実験結果がほぼ一致している。

ビオ・サバールで送信強度を計算し、その地点から放射されるNQR信号をダイポー ル輻射と考えて、その磁場がアンテナに励起する電圧を求めて、実験結果と比べるこ とによりシミュレーションの有効性を示すことができた。このシミュレーションは、 アンテナの形状最適化などのアンテナ開発ツールとして有効である。

#### 参考文献

[1] G.Ota, H.Itozaki, Solid State Nuclear Magnetic Resonance 33 (2008) 36-40

[2] Y.Nakahara, H.Itozaki, Nuclear Magnetic Resonance Society 48 (2009) 119

### YP8

廃水・廃棄物処理系バイオプロセスにおける<sup>13</sup>C結晶セルロー ス分解過程の固・液時系列変動データマイニング ○飯倉 智弘<sup>1,2</sup>、伊達 康博<sup>1,2</sup>、山澤 哲<sup>3</sup>、菊地 淳<sup>1,2,4,5</sup> <sup>1</sup>横市院生命、<sup>2</sup>理研PSC、<sup>3</sup>鹿島技研、<sup>4</sup>理研BMEP、<sup>5</sup>名大院生命農

## Data mining of solid to solution dynamics during <sup>13</sup>C crystal cellulose degradation in the waste disposal bioprocess

○Tomohiro Iikura<sup>1,2</sup>, Yasuhiro Date<sup>1,2</sup>, Akira Yamazawa<sup>3</sup>, Jun Kikuchi<sup>1,2,4,5</sup> <sup>1</sup>Grad. Sch. NanobioSci., Yokohama City Univ., <sup>2</sup>RIKEN PSC, <sup>3</sup>Kajima Corp., <sup>4</sup>RIKEN BMEP, <sup>5</sup>Grad. Sch. Bioagr. Sci., Nagoya Univ.

Degradation processes of chemical compounds in various microbial ecosystems are influenced by the variations of types, qualities and quantities of the chemical components. However, the metabolic dynamics with the biomass degradation has remained unclear. Therefore, we added <sup>13</sup>C cellulose as a substrate into high temperature methane fermentation sludge used for residual food processing, and measured the sludge by solid NMR (<sup>13</sup>C-CP/MAS and <sup>13</sup>C-<sup>1</sup>H HETCOR) and by solution NMR (<sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C) to track the variations of biomass degradation and metabolic dynamics in the solid/solution state. Furthermore, we processed the data of NMR spectra to a data matrix, and investigated the data mining method to understand the comprehensive process.

【緒言】便利で大量生産・消費が可能な石油化学工業と比べて、バイオリファイナリーはカスケード的な資源循環型利用が可能な点に特徴がある。そのカスケード最下段で主要なメタン発酵は、廃水・廃棄物処理系バイオプロセスとして、さらには地下油層での原油生分解<sup>1)</sup>、地球史をかけて発酵蓄積した永久凍土層からのメタンガス放出等<sup>2)</sup>、その複雑な代謝反応解析が実学から地球科学にわたる広領域での重要課題であ

る。そこで本研究ではメタン発酵におけ るバイオマス分解過程の固・液状態を解 析するため、分解対象物および代謝物変 動を固体 NMR および溶液 NMR を用い て時系列で計測することに着目した。特 に我々は、複雑な代謝反応に関わる物質 と微生物を相関付けるために、種々のデ ータマイニング手法を開発してきた<sup>3-6)</sup>。 ここでは、バイオマスとして<sup>13</sup>C 標識セ ルロースを用いることで、種々の固体 NMR や、分解代謝物の<sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C アイソト ポマーの動的な挙動を俯瞰する、データ マイニング方法を検討した(Fig.1)。



Fig.1 Strategy of data mining for biomass degradation in waste disposal bioprocess.

セルロース、アイトソポマー、固体NMR

○いいくらともひろ,だてやすひろ、やまざわあきら、きくちじゅん

【方法】セルロース分解が速い食品残渣処理系高温メタン発酵汚泥を解析対象として 用いた。基質として酢酸菌で生産した<sup>13</sup>C標識セルロースを添加し、55<sup>°</sup>Cの恒温槽内 で緩やかに攪拌しながら培養後120時間まで時系列にサンプリングした。そして、発 酵液内の基質であるセルロースを固体NMR(<sup>13</sup>C-CP/MAS, CT = 1 msおよび<sup>13</sup>C-<sup>1</sup>H HETCOR, CT = 50  $\mu$ s)、分解代謝混合物を溶液NMR(<sup>1</sup>H-watergateおよび<sup>13</sup>C)で計測 した。

【結果および考察】得られた固体および溶液NMRデータはbin化処理によりマトリクス化することで、主成分分析、また共分散分析といったデータマイニングが可能となった<sup>7)</sup>。例えば固体NMRの時系列データの主成分分析の結果では、結晶および非晶性セルロースの分解活性の違いを見出す結果が得られた。加えて時系列で変動するマトリクス化データ間での相関解析を行い、固体-溶液NMRデータ間で相関ヒートマップを作成し、固体バイオマス分解とそれに伴う溶液中の分解代謝物との時系列変動を関係づけることに成功した。特に<sup>13</sup>Cセルロースが菌体に代謝されたことによる<sup>13</sup>C-<sup>13</sup>C, <sup>13</sup>C-<sup>12</sup>Cアイソトポマーと固体NMRシグナルの協同的な変動が見られた。このことにより、安定同位体セルロース由来の代謝物を追跡することが可能になった(Fig.2)。

このように本研究では、廃水・廃棄物処理系バイオプロセスにおけるバイオマス分 解と代謝物変動を固体および溶液 1D, 2D-NMR で測定し、系内の物質変動を包括的に 理解するデータマイニング方法を検討した。その中で、セルロースの分解特性および それに伴う微生物叢の代謝動態を特徴づけることができた。

【展望】固体 2DNMR (HETCOR)デ ータもマトリクス化することにより、 構造情報の主成分分析も可能となっ た。その結果、セルロース分解過程の 時系列変動を特徴づける化学シフト 値が得られたため、この量子化学計算 導入による構造・化学シフト相関を検 討している。また本研究で解析した物 質変動の情報と汚泥由来微生物叢の 遺伝子情報を組み合わせるデータマ イニング方法を構築し、バイオマス分 解プロセスにおける微生物間の代謝 ネットワークを網羅的に解明するこ とを目指している。

#### 【参考文献】

- 1) Jones et al. (2008) Nature 451, pp176.
- 2) Shakhova et al. (2010) Science 327, pp1246.
- 3) Sekiyama et al. (2010) Anal. Chem., <u>82</u>, pp1643.
- 4) Chikayama et al. (2010) Anal. Chem., 82, pp1653.
- 5) Fukuda et al. (2009) PLoS ONE, 4, e4893.
- 6) Date et al. (2010) J. Biosci. Bioeng, <u>110</u>, pp87.
- 7) Mochida et al (2009) BMC Genomics, 10, e563.



Fig.2 Covariant analysis between solid <sup>13</sup>C CP/MAS (vertical) and solution <sup>1</sup>H (horizontal) data matrices during dynamic changes of biomass degradation in waste disposal bioprocess.

#### バイオマス・プロファイリングの実用に向けたサンプル条件 の縦横的探索

○篠 阿弥宇<sup>1</sup>, 坪井 裕理<sup>2</sup>, 林 裕志<sup>3</sup>, 菊地 淳<sup>1,3,4,5</sup> <sup>1</sup>理研PSC, <sup>2</sup>理研ASI, <sup>3</sup>横市大院生命, <sup>4</sup>名大院生命農, <sup>5</sup>理研BMEP

## Correlation exploration of pretreatment conditions for application of biomass profiling.

○Amiu Shino<sup>1</sup>, Yuuri Tsuboi<sup>2</sup>, Hiroshi Hayashi<sup>3</sup>, Jun Kikuchi<sup>1, 3, 4, 5</sup> <sup>1</sup> RIKEN PSC, <sup>2</sup> RIKEN ASI, <sup>3</sup> Grad. Sch. NanoBio., Yokohama City Univ., <sup>4</sup> Grad. Sch. Bioagri., Nagoya Univ., <sup>5</sup> RIKEN BMEP

Understanding chemical compositions and structures of lignocellulose could be contributed for effective use of plant biomass. We are exploring a new technique to calculate correlation between chemical composition of plant biomass mixture and their physicochemical characters. In the present study, we pretreated Napiergrass and Guineagrass (2 type) with a variety of mechanical and chemical conditions for dissolution, and then measured <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC spectra. 2D-NMR signals were transformed into numerical value matrices, and they were calculated principal component analysis for correlation exploration between chemical composition changes and pretreatment conditions.

#### 【序論】

再生可能なバイオマス資源は古くから地産 地消型で活用されてきたが,得体の知れない リグノセルロースを主成分とする混合物・不均 一系であるため,工業的利用には限界がある と考えられてきた.しかし近年,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 するバイオリファリナリーの導入により,循環 型社会の形成が模索されている<sup>1,2)</sup>.我々は 植物バイオマスを混合物のまま化学組成解 析し,無機物や石油由来の素材にはない.



Fig. 1 Scheme of our biomass profiling strategy.

バイオマスの優れた特性と相関付ける新規手法開発を模索している<sup>3,4)</sup>. 今回は, 植物種と 物理化学的な前処理条件を縦横的に探索し, 1D, 2D-NMR シグナルを数値マトリックス化<sup>5)</sup> することで, 多変量解析等からリグノセルロースの NMR シグナル摂動と化学組成の変動の 相関解析を試みることとした.

バイオマス前処理, リグノセルロース可溶化, 多変量解析

○しの あみう, つぼい ゆうり, はやし ひろし, きくち じゅん

#### 【方法】

バイオマス原料となる植物体を凍結乾燥し、ミキサーとオートミルにより粗粉砕後、ボール ミル微粉化等の物理的および、酸・アルカリ等による化学的な前処理を行った.さらに処理 後バイオマスサンプルの低分子群を抽出除去し、残渣である難溶性バイオマスを DMSO-Pyridine 混合液に可溶化させ、<sup>1</sup>H NMR および<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC スペクトルを測定した. 特に、2D-NMR データはプログラム rNMR<sup>6</sup>を用いてマトリックス化し、主成分分析 (Principal Components Analysis; PCA) による多変量解析を行った.

#### 【結果および考察】

収穫ネピアグラス [△], 収穫ギニアグラス [◇], 立枯れギニアグラス [○] の 3 植物サン プルについて、9 条件の前処理を行い、rNMR により 164 個の HSQC シグナルを ROI (Region Of Interest) として得た. これらの 3 種×9 条件×164ROI をデータマトリックス化し、 PCA 解析を行った (Fig. 2). PCA のローディングプロットから、リグニン [L] は PC1 方向に、 多糖類 [S] は PC2 方向に変動する傾向が認められた. スコアプロットとの比較から、ボール ミルによる微粉化がリグニンの可溶性を高め、変動をもたらしていると考えられた. また、酸処 理をはじめとする化学的処理では PC2 方向にスコア変動が見られることから、化学的処理に よる多糖類の分解や溶出による減少を反映していると考えられた.

今回行った前処理条件において,リグニンと多糖類それぞれに変動を示すシグナルが存

在することが認められた.このことから,バイオマス前 処理とリグノセルロース可溶化の相関解析における マーカー因子の決定が可能と期待できる.シグナル の変動は各サンプルの HSQC スペクトルからも捉え られるが,多変量解析を行うことで組成変化に加え, 変化量の情報も得ることができる.従って植物種ごと のリグノセルロース組成・量と,前処理によるそれらへ の影響を解析する有用な手法と考えられる.今後は 植物種や前処理条件をさらに探索し,バイオマスの 優れた特性とシグナルとの相関付けを目指す.

【参考文献】

- 1) E. M. Rubin, Nature, 454, 841-845 (2008).
- (1) 菊地淳ら, 未利用バイオマスの活用技術と事業性評価, Sci&Tech.出版 (in press).
- 3) 菊地淳ら, ブレインテクノニュース, 124, 16-21 (2007).
- 4) 菊地淳, 植物の生長調節, 43, 144-155 (2008).
- 5) Y. Sekiyama, et al., Anal. Chem., 82, 1643–1652 (2010).
- 6) I. A. Lewis, et al., Magn. Reson. Chem., 47, s123-s126 (2009).

【謝辞】本研究の一部は NEDO ならびに挑戦的萌芽研究の支援を受けて行われた.



Fig. 2 PCA of 2D HSQC-derived 27 data matrices for pretreated plant biomass. A: Score plot.

B: Loading plot. (S:Saccharide, L:Lignin, U:Unknown)

### **YP10**

N…H…O水素結合におけるプロトン移動ポテンシャル解明への核磁気緩和の適用

○仲野朋子<sup>1</sup>, 益田祐一<sup>1</sup> <sup>1</sup>お茶大院・理

## Application of nuclear magnetic relaxation to elucidation of proton transfer potential of N…H…O type hydrogen bond

OTomoko Nakano<sup>1</sup>, and Yuichi Masuda<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Chemistry, Faculty of Science, Ochanomizu University, Tokyo, Japan.

Intramolecular proton transfer (PT) along hydrogen bond has played an important role in wide variety of chemical and biological reaction systems. The purpose of this study is to establish an experimental procedure for elucidation of PT potentials of N···H···O type hydrogen bond systems by a combination of multiple NMR measurements. The method is applied to Schiff bases with asymmetric double-well PT potentials. The PT rates were evaluated, considering the <sup>15</sup>N-<sup>1</sup>H magnetic dipolar couplings. The substituent exerts a few orders difference in the obtained PT rates. The proposed PT potential surfaces sensitively respond to distortion of the hydrogen bond to size of the conjugate system.

#### 【背景・目的】

水素結合が関与するプロトン移動(PT)は、酸-塩基反応の素過程として、化学反応や 生命科学反応において普遍的な過程である。通常、電子的基底状態間でのPT過程の反 応障壁は、反応系と溶媒の再配列エネルギー程度であるため、溶媒の効果が反応を支 配する大きな要因となる。このため、PT反応ダイナミックスに対する、反応ポテンシ ャル、あるいは、トンネル相互作用の、溶媒に起因したゆらぎの効果に関しては、種々 のモデルが提唱されるとともに、多くの計算機シミュレーションがおこなわれてきた <sup>1)</sup>。一方、これらに対する実験的検証は、光励起状態を介したUV過渡吸収を用いた研 究<sup>2)</sup>によるものに限られている。しかしながら、このような系では多くの場合、2つの 異性体間で大きなdriving force(ΔG)が存在することから、振動励起状態の関与、あるい は溶媒の非線形的応答が起こり、反応が平衡状態にある電子的基底状態間のPTとは質 的に異なると考えられる。そのため、溶液反応場・生体内で一般的である熱的平衡状 態にある電子的基底状態間のPTに対して、定量的・直接的な実験的アプローチをする ことは必須であると言える。

Schemelに示すような−N<sup>+</sup>-H···O<sup>-</sup> = −N···H·O − の互変異性平衡を示す水素 結合系は、核酸やタンパク質の水素結合構造モデルとして多くの研究が行われている 一方で、その大部分が互変異性平衡や異性体間の構造の置換基・溶媒効果に関わるも のであり、PT反応ポテンシャルについて実験的なアプローチをおこなったものはH/D 同位体効果を利用したものに限られ<sup>3)</sup>、実験的にポテンシャルの形状に関する直接的情

#### Relaxation time, intramolecular hydrogen bond, Proton Transfer

○なかのともこ,ますだゆういち

報を得られた例や、PT速度に言及しているものは見当たらない。本研究では、シッフ 塩基を対象物質として、核磁気緩和を適用し、いくつかの核のスピン-格子緩和時間, *T*<sub>1</sub> の測定を組み合わせることにより、N・・・H・・・O系における水素結合の構造、プロトン ダイナミックス、およびPTポテンシャルを検討し、それらを実験的に評価する方法を 確立することを目的とした。



Scheme1 : Tautomeric equilibrium of Schiff bases

【方法】

観測核と近接プロトンとの空間的配置が変化することにより生じた磁気双極子-双 極子相互作用の揺らぎは、縦磁気緩和(*T*<sub>1</sub>)によりモニターすることができる。この揺 らぎは多くの場合、分子回転や拡散運動によってもたらされるが、回転運動に匹敵す るような速い PT 過程が存在する場合、そのダイナミックスも緩和に寄与する。PT と 回転運動の間に相関がないとすると、ある時間*t*におけるプロトンによる局所磁場 H(t)の相関関数は、次のように記述できる。

 $\langle H(0)H(t)\rangle = \langle h(0)y(0)h(t)y(t)\rangle = \langle h(0)h(t)y(0)y(t)\rangle$ 

ここで、h(t)は PT による r<sub>NH</sub> の変化に伴って起こる局所磁化強度の変動、y(t)は双極 子ベクトルの回転運動に伴って起こる局所磁場の変動による寄与を表す。これらの相 関関数に対して指数関数的減衰を仮定し、それぞれの緩和時間を τ<sub>PT</sub>, τ<sub>R</sub> とすると、T<sub>1</sub> は構造的因子である r(磁気双極子-双極子相互作用している2つの核スピンの距離)と、 動的因子である τ<sub>R</sub>, τ<sub>PT</sub> によって書き表すことができる。

本研究では、溶媒の極性等の環境的要因によってその PT ポテンシャルの形状が容易に変化し、また、Double well の非対称 PT ポテンシャルを持つと予測される<sup>4)</sup>下記 (Scheme 2)の3 種類の<sup>15</sup>N をラベルしたシッフ塩基を対象とした。そして、 $T_1$ の測定 から<sup>15</sup>N-<sup>1</sup>H 磁気双極子-双極子相互作用による緩和時間,  $T_1^{dd}$ (NH)を求めることにより、溶液中における置換基や溶媒の違いが PT ポテンシャルに及ぼす影響を、実験から得 られる水素結合構造や PT 速度から調べた。



- 1 <sup>15</sup>N-(4,6-dimethoxysalicylidene)-methylamine
- 2 <sup>15</sup>N-(1-methylnitrilomethy-lidyne)-2-naphthalenol
- **3** <sup>15</sup>N-(3,5-dibromosalicyliden)-methylamine

Scheme 2 : Structures of the studied compounds

<sup>1</sup>H との磁気双極子-双極子相互作用による <sup>15</sup>N の  $T_1(T_1^{dd}(NH))$ は、プロトンによる局所磁場( $r_{NH}^{-3}$ に比例)とそのゆらぎの相関時間(すなわち、 $\tau_R$ )に依存する。 $\tau_R$  (ここでは

N-H ベクトルについての回転相関時間)が  $\tau_{PT}$ に比べて十分速いとき( $\tau_{R} \ll \tau_{PT}$ )、および その逆( $\tau_{PT} \ll \tau_{R}$ )の極限の場合の  $T_{1}^{dd}$ (NH)は、極度尖鋭化の条件下でそれぞれ eq 1 およ び eq 2 で表すことができる。ただし、 $\tau_{R}' = P_{NH-form}\tau_{R(NH)} + P_{OH-form}\tau_{R(N...H)}$ とする。

$$T_{1}^{dd} (\mathrm{NH})^{-1} = \left(\frac{\mu_{0}}{4\pi}\right)^{2} \gamma_{\mathrm{H}}^{2} \gamma_{\mathrm{N}}^{2} \hbar^{2} \tau_{\mathrm{R}}' (P_{\mathrm{NH-form}} r_{\mathrm{NH}}^{-6} + P_{\mathrm{OH-form}} r_{\mathrm{N...H}}^{-6})$$
[1]  
$$T_{1}^{dd} (\mathrm{NH})^{-1} = \left(\frac{\mu_{0}}{4\pi}\right)^{2} \gamma_{\mathrm{H}}^{2} \gamma_{\mathrm{N}}^{2} \hbar^{2} \tau_{\mathrm{R}}' (P_{\mathrm{NH-form}} r_{\mathrm{NH}}^{-3} + P_{\mathrm{OH-form}} r_{\mathrm{N...H}}^{-3})^{2}$$
[2]

#### 【結果・考察】

CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, CD<sub>3</sub>CN 中で<sup>1</sup>H,<sup>13</sup>C,<sup>15</sup>N 核の NMR を測定した。実測値  $T_1^{dd}$ (NH)は、<sup>15</sup>N 濃縮 した試料およびその<sup>2</sup>D 置換体の<sup>15</sup>N 核の  $T_1$ の測定値から求めた。一方、NH-form と OH-form それぞれの N-H ベクトルの回転相関時間  $\tau_{R(NH,N...H)}$ は、<sup>13</sup>C 核の  $T_1$ と核オー バーハウザー効果の測定値から分子の回転の異方性を考慮して、N-H 距離  $r_{NH}$ 、 $r_{N...H}$ は、分子軌道計算(MP2/6-311G(d,p))から vibrational averaging の効果<sup>5)</sup>を考慮して決定 した。また、NH-form と OH-form のモル分率  $P_{NH}$ ,  $P_{OH}$ は、観測された  $J_{NH}$  値から、 NH-form と OH-form 固有の  $J_{NH}$  値をそれぞれ-90 Hz, 0 Hz として求めた<sup>6)</sup>。これらの 値を用い、eq 1, 2 の極限式から予測される  $T_1^{dd}$ (NH)値と、実測値とを比較することで、 1 - 3の溶液中における PT ポテンシャル、あるいは PT 速度に対する置換基や溶媒 の効果について検討した。主要なデータを Table 1 にまとめた。

Comopund	1		2	3
solvent	$CD_2Cl_2$	CD <sub>3</sub> CN	$CD_2Cl_2$	$CD_2Cl_2$
$^{1}J_{\rm NH}$ (Hz)	-49.8	-46.4	-60.6	-14.4
$P_{ m NH}$	0.55	0.51	0.67	0.16
$r_{\rm NH} \overset{**a}{(A)}$	1.068	1.068	1.046	1.085
$r_{\mathrm{NH}} \ ^{*a}(\mathrm{\AA})$	1.689	1.689	1.655	1.698
$\tau_{\rm R(NH)}(s)$	1.43E-11	1.23E-11	1.23E-11	9.19E-12
$\tau_{R(NH)}(s)$	1.45E-11	1.24E-11	1.25E-11	8.96E-12
Observed values of $T_1^{dd}(NH)$ (s)	32.6	43.2	42.0	107
Expected values of $T_1^{dd}(NH) \overset{\text{\tiny{(NH)}}}{\to} c(s)[\tau_R \ll \tau_{PT}]$	35.8	44.2	31.0	151
Expected values of $T_1^{dd}(NH) \stackrel{\text{\tiny{(NH)}}}{\to} c(s)[\tau_R] \tau_{PT}]$	44.7	56.3	36.4	206

Table 1 : Summary of data

<sup>\*\*a</sup> obtained by ab initio MO calculations : MP2(6-311++G(d,p)).

<sup>\*\*b</sup> calculated with  $r_{\rm NH}$  and  $\tau_{\rm R}$  according to equation [1] or [2].

\*\* corrected by considering the vibrational averaging effect on the magnetic dipolar coupling.

 $CD_2Cl_2$ 中において、**1**は NH-form と OH-form の driving force( $\Delta G$ )がほぼゼロであり 大きなトンネル効果が期待されるにもかかわらず、実測値 32.6 は  $\tau_R \ll \tau_{PT}$ という条件 下での予測値 35.8 より小さく、PT に比べて分子の回転運動の方が速い、すなわち **\tau\_{PT}**》1.43×10<sup>-11</sup> s であることがわかった。一方、**2**は 2~3 kJ/mol の  $\Delta G$  をもつが、実 測値 42.0 は  $\tau_R \gg \tau_{PT}$  という条件下での予測値 36.4 よりも大きく、分子の回転運動に比 ベ PT の方が速い。さらに、 $\tau_{R(NH)}$ は**1** で 1.43×10<sup>-11</sup> s、**2** で 1.23×10<sup>-11</sup> s であり、同程 度であることから、**2**の方がより PT 速度が速いと言える。このことは、**1**の PT ポ テンシャル障壁が比較的高く明確な double well 型の PT ポテンシャルをもつことを、 **2**は小さな PT 障壁をもち、2 つの互変異性体間で極めて速い PT が起こっているか、 プロトンの非局在化が生じていることを示している。これは**2**における、resonance assist の効果による電子の非局在化に起因するものであると考えられる。一方、**3** で は、 $T_1^{dd}$ (NH)の観測値は、 $\tau_R \ll \tau_{PT}$ の条件下で予測される値よりも著しく小さいという 結果を得た。これは、NH-form から OH-form へのポテンシャル障壁が N-H 振動のゼ ロ点エネルギーよりもはるかに小さく、NH-form 側のポテンシャル曲線に大きな非調 和性があることに起因して、NH-form におけるプロトンの存在位置に広い分布が生じ ているためであると考えられる。このことは分子軌道計算の結果にも反映されている。 以上の結果から予測される各化合物の PT ポテンシャルの形状を、Figure 1 に示した。





1については CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>に加え、誘電率の異なる CD<sub>3</sub>CN 中でも測定を行った。一般的 に、極性溶媒は形式電荷を有する NH-form をより安定化すると考えられるが、本研究 において、溶媒による顕著な効果は見られなかった。これは、シッフ塩基では、互変 異性体間の双極子モーメントや電荷分布の違いが小さく、PT 過程における溶媒の再 配列エネルギーへの寄与が比較的小さいこと、および、溶媒分子と NHO 系水素結合、 あるいはπ電子系との局所的な相互作用の寄与を示唆していると考えられる。

本研究により、異なる原子間で PT が起こる heteronuclear 水素結合に対して、溶液 中での水素結合構造や電子的基底状態間の PT ダイナミックスに関する情報を実験的 に得ることができた。分子の回転運動の速さとの相対的な関係から PT 速度を直接的 に観測、さらに置換基の変化によってその値が 1,2 桁のオーダーで変化することを明 らかにした。これらの結果は、置換基の立体反発や共役系の長さなどの化合物の構造 のわずかな変化が、PT 速度や PT ポテンシャルの形状に大きな影響を与えていること を示している。

#### **Reference**

- 1) D.Brogis and J.T.Hynes, J.Phys.Chem. 1996, 100, 1118
- 2) Kevin S.Peters, Acc. Chem. Res., 2009, 42, 89
- 3) T.Dziembowska et al., Magn.Reson.Chem. 2001, 39, S67
- 4) T.Dziembowska et al., Current Organic Chemistry 2001, 5, 289-313
- 5) E.R.Henry, and A.Szabo, J.Chem. Phys. 1985, 82, 4753-4761
- 6) P.E.Hansen et al., Ber Bunsenges. Phys. Chem. 1998, 102, 410-413

### YP11 <sup>13</sup>Cメチル基をプローブとして用いる リジン側鎖を介した塩橋の解析法の開発 ○服部良一<sup>1,2</sup>、大木出<sup>2</sup>、古板恭子<sup>1</sup>、池上貴久<sup>1</sup>、深田はるみ<sup>3</sup>、 白川昌宏<sup>4</sup>、藤原敏道<sup>1</sup>、児嶋長次郎<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>阪大・蛋白研、<sup>2</sup>奈良先端大・バイオ、<sup>3</sup>阪府大・生命環境、 <sup>4</sup>京大・工

## A method developed for analysis of salt bridges mediated by lysine side chains using <sup>13</sup>C-methyl groups as probes

○Yoshikazu Hattori<sup>1,2</sup>, Izuru Ohki<sup>2</sup>, Kyoko Furuita<sup>1</sup>, Takahisa Ikegami<sup>1</sup>, Harumi Fukada<sup>3</sup>, Masahiro Shirakawa<sup>4</sup>, Toshimichi Fujiwara<sup>1</sup>, Chojiro Kojima<sup>1,2</sup> <sup>1</sup>Insititute for Protein Research, Osaka University, <sup>2</sup>Graduate School of Biological Sciences, Nara Institute of Science and Technology, <sup>3</sup>Graduate School of Life and Environmental Sciences, Osaka Prefecture University, <sup>4</sup> Graduate School of Engineering, Kyoto University.

<sup>13</sup>C-methylation of lysines is known as an effective chemical modification for introduction of <sup>13</sup>C-methyl groups into proteins. Methylated lysines are protonated at neutral pH such as unmodified lysines and significant structural changes are hardly induced by methylation. Therefore <sup>13</sup>C-methyl groups can be used as probes to study electrostatic interactions of lysines. Here we show the correlation between the chemical shift values of <sup>13</sup>C-methyl groups and the distance to the pair of lysines in the crystal structures. In addition, pH titration of methylated ubiquitin reveals that methylated K11, which is close to carboxylate in the case of the natural structure, also involves in the salt bridge interaction. These results indicate that the methylated lysines with up-field chemical shift values form strong salt bridges.

[背景] リジンの<sup>13</sup>Cメチル化は、化学修飾 によりリジン側鎖に二つの<sup>13</sup>Cメチル基を 付加する反応である(Figure 1)。メチル 化されたリジンは非修飾のリジンと同じ く中性pHではプロトン化されている。また、 メチル化による蛋白質の構造変化も小さ いことが、結晶構造解析から示されている [1]。このため、<sup>13</sup>Cメチル基をプローブとし



Figure 1. Methylation of lysine side chain

て、リジンを介した静電的相互作用を間接的に検出することが可能である。過去の研究では、pHタイトレーションにより種々のメチル化蛋白質リジンのpKaが求められた [2,3]ほか、最近ではGPCRのリガンド依存的なコンホメーション変化が解析された[4]。 しかし、メチル化蛋白質のNMRスペクトルとリジンの化学環境、特に塩橋との対応は 明らかになっておらず、スペクトルのピーク分布から構造情報について議論すること は難しい。

リジン、塩橋、化学修飾

○はっとりよしかず、おおきいずる、ふるいたきょうこ、いけがみたかひさ、ふかだ はるみ、しらかわまさひろ、ふじわらとしみち、こじまちょうじろう 本研究では、メチル化蛋白質のNMRデータと、既知の立体構造および蛋白質間相互 作用を比較し、一般性を見出すことを目的とした。これまでに、モデル蛋白質として Ubiquitin (Ub)をメチル化し、<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQCスペクトルの帰属、およびYUHのタイト レーション実験を行った。本発表では、その他の相互作用解析およびメチル化が蛋白 質問相互作用に与える影響、メチル化の反応率とリジンの化学環境、そして化学シフ ト値と塩橋の相関について報告する。

**[方法]** Ub (野生型およびKR変異体7種) とFKBP12 (野生型およびKR変異体8種)の <sup>15</sup>N標識体、YUH, Dsk2p<sub>UBA</sub>およびp62<sub>UBA</sub>の非標識体を大腸菌の発現系で調製した。<sup>13</sup>C メチル化反応には、[<sup>13</sup>C]-formaldehydeとborane dimethylamine complexを用いた。反応 後のサンプルは限外濾過および透析で精製し、<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQCスペクトルを測定した。 リジンのピークの帰属は各KR変異体をメチル化することにより逆標識して行った。 NMR測定はBruker 400および500 MHzを用いた。ITC測定はMicrocal Omegaを用いた。

#### [結果と考察]

#### メチル化Ubを用いた蛋白質間相互作用解析

メチル化後のUbに対して、相互作用因子であるYUH, Dsk2p<sub>UBA</sub>およびp62<sub>UBA</sub>のNMR タイトレーションを行った。その結果、複合体構造の会合面に位置するリジンの<sup>1</sup>H化 学シフトが有意に(> 0.01 ppm)変化した(**Figure 2**)。またYUHおよびDsk2p<sub>UBA</sub>の タイトレーションで最も大きく化学シフトが変化したK11およびK6は蛋白質間で塩 橋を形成するリジンであった。



さらにYUHについては、メチル化前後のUbに対する結合様式を、ITCおよびNMR を用いて比較した。その結果、ITCでの相互作用にともなう熱量変化は同程度であり (Table 1)、NMRでの主鎖NHの化学シフト変化においてもよい相関が得られた

(Figure 3)。これらの結果から、メチ ル化蛋白質を用いたNMRタイトレーシ ョンによって相互作用部位の同定が可 能であり、非修飾状態の相互作用に対応 することが示された。

**Table 1.** Thermodynamic parameters of the interactio

 between YUH and Ub or methylated Ub obtained from

 ITC

	Ub	methylated Ub
Ν	$0.85\pm0.05$	$0.90 \pm 0.07$
<i>K</i> <sub>d</sub> /μM	$9.4 \pm 0.3$	$5.7 \pm 0.1$
∆H/kcal mol <sup>-1</sup>	$-4.0 \pm 0.3$	$-4.0 \pm 0.3$
∆5/cal K <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup>	9.5	10.5



**Figure 3.** Correlation plots of chemical shift changes of backbone NH of Ub and methylated Ub caused by the presence of YUH

#### メチル化の反応率とリジンの化学環境

Ubのメチル化において、反応に用いる[<sup>13</sup>C]-formaldehydeの量を変化させたところ、 残基ごとのピーク強度の変化に違いが見られた。部分的にメチル化したサンプルの <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQCスペクトルのピーク強度から、各リジンの被修飾率を算出したところ、 リジンの溶媒露出度が高いほど、またpK<sub>a</sub>が低いほど、メチル化されやすいことが示 された(Figure 4)。これは一般的な化学反応における立体障害と、メチル化反応が 脱プロトン化したリジンと反応する反応機構によって、矛盾なく説明できる。



Figure 4. Correlation plots between reactivity of methylation and solvent accessibility (A) or pKa values of methylated lysines (B)

#### 化学シフト値と塩橋の相関

Ubに加えてFKBP12についても<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQCスペクトルの帰属が完了した(Figure 5)。FKBP12の<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQCスペクトルもUbとほぼ同程度の範囲に分散していた。両者の<sup>1</sup>H化学シフトの分布と結晶構造情報の相関について解析したところ、リジンの近

傍(<6 Å)にカルボキシル基が存在する場合、その塩橋の距離(COO<sup>-</sup>…NH<sub>3</sub><sup>+</sup>)に依存して、<sup>1</sup>H化学シフトが高磁場側にシフトしていた。静電場が化学シフトに与える影響は距離の二乗に反比例すると考えられるため、そのプロットをとったところ、よい相関が得られた。さらに塩橋がより近い距離(<4 Å)で形成される場合では、二つのメチル基の交換が抑えられ、いくつかのリジンでピークの分裂が見られた。

UbについてpHタイトレーションを行ったところ、中性条件で分裂していたK11のピークは、酸性条件 (pH < 3) または塩基性条件 (pH > 8) では分裂がなくなった (Figure 6A) 。これは、塩橋による静電的相互作用が弱まることにより、メチル基の交換が速くなることを示唆する。さらに酸性側へのpHタイトレーションにおいてK11のピークは、K11と近接するE34のカルボキシル基のpK<sub>a</sub> 4.5[5]付近のpHで有意な変化を示した(Figure 6B) 。このことからメチル化後も本来の塩橋が保たれていると考えられる。



Figure 5. <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC spectra of methylated Ub and methylated FKBP12 (500 MHz, 303 K, pH 6.8)



Figure 6. <sup>13</sup>C (A) and <sup>1</sup>H (B) chemical shift changes of methylated K11 of Ub induced by pH changes

#### [参考文献]

Kim, et al. (2008) Nat. Methods 5, 853. [2] Zhang, et al. (1992) J. Biol. Chem. 268, 22420.
 Sparks, et al. (1992) J. Biol. Chem. 267, 25830. [4] Bokoch, et al. (2010) Nature 463, 108.
 Sundd, et al. (2002) Biochemistry 41, 7586

#### **YP12** ホストーゲスト化学による磁場配向誘起を用いた RDC構造解析

○諸原理<sup>1</sup>,藤田大士<sup>1</sup>,佐藤宗太<sup>1</sup>,山口芳樹<sup>2</sup>,加藤晃一<sup>3,4,5</sup>,藤田誠<sup>1,5</sup> 1東大院工 2理研 3名市大院薬 4岡崎統合バイオ <sup>5</sup>CREST

#### Structural Analysis with RDC induced by Host-Guest Chemistry

Osamu Morohara<sup>1</sup>, Daishi Fujita<sup>1</sup>, Sota Sato<sup>1</sup>, Yoshiki Yamaguchi<sup>2</sup>, Koichi Kato<sup>3,4,5</sup>, and Makoto Fujita<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup>Department of Engineering, The University of Tokyo, Tokyo, Japan. <sup>2</sup>Riken, Saitama, Japan. <sup>3</sup>Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagova Citv University, Aichi, Japan. <sup>4</sup>Okazaki Institute for Integrative Bioscience, Aichi, Japan. <sup>5</sup>CREST

Residual dipolar coupling (RDC) can be observed by NMR when molecules are anisotropically oriented in magnetic field and provides useful information for structural analysis. However, conventional polymeric alignment media such as liquid crystals are seldom applied to small molecules due to small interaction. We report that discrete host with aromatic panels were diamagnetically oriented in magnetic field and showed RDC. We also confirmed encapsulation of small molecules into the magnetically oriented host complexes induced guest orientation and detectable RDC.

残余双極子相互作用(Residual Dipolar Coupling; RDC)は磁場により誘起された双 極子相互作用であり、分子が溶液中で磁場配向する場合のみNMR測定において観測さ れる。RDCの値は双極子結合している2つの核間ベクトルと磁場ベクトルの角度に応じ て変化するので、分子の3次元構造情報を含むために、これまでに生体分子の構造決 定等に利用されてきている。既往の知見として液晶、バイセルといった生体分子に磁 場配向を誘起する磁場配向材料が報告されているが、相互作用が小さいために有機小 分子には適さない。我々は芳香族分子が示す反磁性磁場配向(Fig.1)に注目し、精密 な分子設計に基づきπ-共役平面を並列に集積した磁場配向性ホスト分子を構築した。 また目的分子をゲストとしてホスト内部に包接することで、ゲスト分子がホスト分子 と一体化して磁場配向するために、RDCが誘起されるではないかと考えた(Fig.2)。



Fig. 1 Energy difference of aromatic molecule in a magnetic field.

Fig. 2 Concept of the research.

RDCは、300から920 MHzまでのNMR装置を使用し、<sup>13</sup>C-coupled <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQCまたは <sup>1</sup>H-coupled <sup>13</sup>C-<sup>1</sup>H HETCOR測定により<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C間の結合を異なる磁場強度で測定すること で観測した。この測定で観測される結合の値は、磁場強度に依存しない定数('」」と、 磁場強度に依存するRDC値( $^{1}D_{cu}$ )との和である。 $^{1}D_{cu}$ は磁場強度BO2乗に比例すること が知られており、観測された結合の値がBに応じて変化すれば磁場配向したといえる。 2枚の大きなπ-共役分子を持つホスト錯体1(Fig. 3)は、π-共役平面が並列に集積された効果により磁場配向することが期待される。*a*-*c*で示した3つの<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>Cについて得られた<sup>1</sup>D<sub>CH</sub>と*B*との間には良い直線関係が得られ、ホスト錯体1が磁場配向していることがわかった(Fig. 4)。次にゲスト分子の磁場配向誘起を検討した。有機溶媒中の3単独の場合には、ほとんどRDCは観測されなかったのに対し、3を磁場配向性ホスト錯体1に包接した場合にはRDCが観測された。さらにπ-共役平面の集積数がより多い2•(3)4ではより大きなRDCを示した(Fig. 5)。このように磁場配向性ホスト錯体内部への包接により、ゲストに磁場配向およびRDCを誘起できることがわかった。



本手法を用いて、従来法ではRDC構造解析が困難であった柔軟な小分子への応用を 試みた。柔軟な小分子は多数のコンフォメーションが平均化して観測されるため、RDC 構造解析は非常に困難である。一方ホストーゲスト化学の知見からは、柔軟な小分子 であってもゲストとしてホストに包接することで、剛直なコンフォメーションを誘起 できると期待できる。柔軟な小分子としてトリペプチド(Ac-Tyr-Tyr-Ala-NH<sub>2</sub>)4を選 び、ホスト錯体5(Fig. 6)に包接したところ、'H NMRにおいてホスト5の非対称化を示 すシグナルの分裂と、ゲスト4に由来する高磁場シフトしたシグナルが観測され、ゲ スト4が5の内部で単一の剛直なコンフォメーションを取っていることが示された。さ らにホスト錯体5は、大きな芳香環であるポルフィリン環を三方プリズム状に揃えて おり、単独で磁場配向性を持つことがわかった。そこで5に包接されたトリペプチド4 のRDC測定を行ったところ、(<sup>1</sup>J<sub>CH</sub>+<sup>1</sup>D<sub>CH</sub>)とB<sup>C</sup>に良い直線関係が得られた(Fig. 7)。すな わち磁場配向性ホスト錯体内部への包接によりゲストに剛直な単一のコンフォメー ションが誘起され、RDCが観測されることがわかった。このように、ホストーゲスト化 学を利用したこれまでにない磁場配向手法により、柔軟な小分子の磁場配向及びRDC 構造解析が可能になることを見出した。



RDC, ホスト-ゲスト化学

○もろはらおさむ, ふじただいし, さとうそうた, やまぐちよしき, かとうこういち, ふじたまこと

# **YP13** Nonlinear samplingと3D MaxEntを用いた迅速な4D NOESY 測定の有用性の検証

○重光 佳基<sup>1</sup>, 池谷 鉄兵<sup>1,2</sup>, 土江 祐介<sup>1</sup>, 三島 正規<sup>1</sup>,
Daniel Nietlispach<sup>3</sup>, Markus Waelchli<sup>4</sup>, Peter Guentert<sup>2</sup>,
Brian O. Smith<sup>5</sup> and 伊藤 隆<sup>1</sup>
<sup>1</sup>首都大学東京(東京都立大), <sup>2</sup>Institute of Biophysical Chemistry, J. W.
Goethe-University Frankfurt, <sup>3</sup>Department of Biochemistry, University

of Cambridge, <sup>4</sup> ブルカーバイオスピン, <sup>5</sup>Division of Biochemistry and Molecular Biology, University of Glasgow

#### Application of nonlinear sampling and 3D MaxEnt processing to 4D NOESY experiments

Yoshiki Shigemitsu<sup>1</sup>, Yuusuke Tsuchie<sup>1</sup>, Teppei Ikeya<sup>1, 2</sup>, Masaki Mishima<sup>1</sup>, Daniel Nietlispach<sup>3</sup>, Markus Waelchli<sup>4</sup>, Peter Guentert<sup>2</sup>, Brian O. Smith<sup>5</sup> and Yutaka Ito<sup>1</sup> <sup>1</sup>Department of Chemistry, Tokyo Metropolitan University; <sup>2</sup>Institute of Biophysical Chemistry, J. W. Goethe-University Frankfurt; <sup>3</sup>Department of Biochemistry, University of Cambridge; <sup>4</sup>Bruker BioSpin; <sup>5</sup>Division of Biochemistry and Molecular Biology, University of Glasgow

Despite its potential advantages in analysis, 4D NMR experiments are infrequently used as a routine tool in protein NMR projects due to long duration of measurement and limited digital resolution in indirectly observed dimensions. Applications of recently proposed new acquisition techniques for speeding up multidimensional NMR experiments are therefore expected to be extremely beneficial for 4D experiments. Nonlinear sampling (NLS) for indirectly acquired dimensions in combination with maximum entropy (MaxEnt) processing has been shown to provide significant time savings in the measurement of multidimensional NMR experiments. We applied various nonlinear sampling schedules and 3D MaxEnt processing to 4D <sup>13</sup>C/<sup>15</sup>N-separated NOESY, and then evaluated the expected artifacts in 4D spectra, such as the mis-calibration of intensities and the emergence or disappearance of cross peaks, by calculating protein structures on the basis of NOE-derived distance restrains.

[序]

3 重共鳴4次元 NMR 法は,曖昧さの少ない解析が可能であるなどの長所が知られているが,新し

#### キーワード: 4D NMR, 非線形サンプリング, 最大エントロピー法

著者ふりがな: Oしげみつ よしき, いけや てっぺい, つちえ ゆうすけ, みしま まさき, だにえる にーと りすぱっは, まるくす ゔぇるひり, ぺーたー ぎゅんたーと, ぶらいあん おー すみす, いとう ゆたか い間接観測軸の導入による感度の低下,間接観測軸のデータポイントの不足に起因するスペクトル 分解能の不足,そして測定時間が長時間に及ぶ事,などの問題などから,蛋白質の解析に日常的 に用いられる事は多くなかった.今回我々は,近年注目を集めている迅速に異種核多次元 NMR ス ペクトルを測定できる手法の一つである非線形サンプリング法(nonlinear sampling)と3次元最大エン トロピー法(3D MaxEnt)によるデータ処理法を,3重共鳴4次元 NOESY 測定に適用する事を試みた. MaxEnt によるデータ処理では,シグナル強度の増減・贋のピークの出現といったアーティファクトが 懸念されている.本発表では,NOESY の測定を行なうのみならず実際に構造計算を行うことにより 先述したアーティファクトが最終的な構造にどのような影響を与えるか検証を行ったので併せて報告 する.

#### [実験]

NMR 測定には、均一に<sup>13</sup>C/<sup>15</sup>N 標識された高度好熱菌由来 TTHA1718 遺伝子産物(66 残基)を 試料に用い、37℃で測定を行った. 4D<sup>13</sup>C/<sup>15</sup>N separated NOESY 測定は、従来法 512\*(<sup>1</sup>H<sup>N</sup>) x 32\*(<sup>1</sup>H) x 24\*(<sup>13</sup>C) x 8\*(<sup>15</sup>N)の測定を行い(データ①)、このデータポイントから nonlinear sampling の シミュレーションのデータを作成し解析を行った. 作成したシミュレーションのデータは、512\*(<sup>1</sup>H<sup>N</sup>) x



Figure 1: Contour plots of  ${}^{1}\text{H}/{}^{13}\text{C}$  slices ( ${}^{1}\text{H}^{N}$  chemical shift: 7.678 ppm,  ${}^{15}\text{N}$  chemical shift: 121.16 ppm) from seven 4D  ${}^{13}\text{C}/{}^{15}\text{N}$  separated NOESY spectra processed with 3D MaxEnt from full (reference) data (**a**), simulated data with 1/4 (**b**), 1/16 (**c**), 1/64 (**d**) *nonlinearly* sampling points and simulated data with 1/4 (**e**), 1/16(**f**) and 1/64 (**g**) *linearly* sampling points.

3072 random sampling complex points (データ②, 1/4), 512\*(<sup>1</sup>H<sup>N</sup>) x 768 random sampling complex points(データ③, 1/16), 512\*(<sup>1</sup>H<sup>N</sup>) x 192 random sampling complex points(データ④, 1/64)の 3 種類 である.

また比較のため、データ①から linear sampling のシミュレーションのデータを同様に作成し、解析 を行った.作成したシミュレーションのデータは 512\*(<sup>1</sup>H<sup>N</sup>) x 21\*(<sup>1</sup>H) x 15\*(<sup>13</sup>C) x 5\*(<sup>15</sup>N)(データ⑤, 1/4), 512\*(<sup>1</sup>H<sup>N</sup>) x 13\*(<sup>1</sup>H) x 10\*(<sup>13</sup>C) x 3\*(<sup>15</sup>N)(データ⑥, 1/16), 512\*(<sup>1</sup>H<sup>N</sup>) x 8\*(<sup>1</sup>H) x 6\*(<sup>13</sup>C) x 2\*(<sup>15</sup>N)(データ⑦, 1/64)の3種類である.帰属のついたこれらシミュレーションデータのシグナルの強 度をプロットし、データ①のシグナル強度との比較を行った.また、帰属のついた NOE と主鎖二面角 の角度情報から CYANA プログラムを用いてそれぞれ構造計算を行い、既に PDB に登録されている TTHA1718 の *in vitro* の構造との比較を行った.



Figure 2: NOE cross peak intensities in various 4D  ${}^{13}C/{}^{15}N$  separated NOESY spectra. **a.** Comparison of NOE cross peak intensities between reference (data 1) and various *nonlinearly* sampled data sets. **b.** Comparison of NOE cross peak intensities between reference (data 1) and valious *linearly* sampled data sets. The horizontal axis represents cross peak intensities in the reference spectrum and the vertical axis indicates intensities of corresponding cross peaks in various spectra with nonlinearly or linearly reduced sampling points. Open circles, open quadrangles, open diamond and open triangles indicate intensity of the reference spectrum, spectra with 1/4 sampling points, spectra with 1/16 sampling points and spectra with 1/64 sampling points, respectively.

[結果·考察]

Figure 1a~1gは上記<sup>13</sup>C/<sup>15</sup>N separated NOESY 測定のうちそれぞれ①~⑦のデータについて 3D MaxEnt で処理したものから,<sup>1</sup>H<sup>N</sup>: 7.678 ppm,<sup>15</sup>N: 121.16 ppm の化学シフトに相当する 2D<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C 平面を切り出したものである. linear sampling のシミュレーションの結果(1e, 1f, 1g)と比較すると nonlinear sampling のシミュレーションの結果(1b, 1c, 1d)は,高分解能で良好なスペクトルを得ること ができた. しかしクロスピークによっては,データポイントが少なくなるにつれて感度の低下あるいはピ ークの消失が観測される事が分かった(Figure 1 内の丸印). 次に帰属が完了した従来法及びシミュ レーションの結果を用いてそれぞれのピーク強度の比較を行った結果、従来法のピーク強度と比較

し、測定データポイントが少なくなるにつれて、従来法でのピーク強度が低いものほど、ピーク強度が より低く見積もられる傾向が見られた(Figure 2a, 2b). この事は、データポイントを削減する事により低 強度の NOE が観測されにくくなる事を示唆している. この傾向は linear sampling を用いたシミュレー ションでより顕著に表れた. サンプリング空間の大きさそのものは変わらずともその中のデータポイン トを減少させる nonlinear sampling とサンプリング空間そのものが縮小していく linear sampling の違い が、linear sampling でより顕著に上記の傾向が見られる原因だと考えている. さらに構造計算を行っ た結果、nonlinear samplingを用いたシミュレーションは、先に述べた低強度の NOE が見えにくくなる 傾向により精密性が低下していくものの、測定時間にして約 7.5 時間に相当する 1/16 にまでデータ ポイントを削減しても、主鎖の RMSD が 1.5 Å 以内に収まる良好な結果が得られた. 一方、linear sampling を用いて 1/16 にデータポイントを削減したシミュレーションの構造計算の結果は、主鎖の RMSD が 5 Åを超えるものとなった. これは先に述べた nonlinear sampling のシミュレーションよりも 低強度の NOE がより見えにくくなる傾向により、2 次構造間の構造を規定するのに重要な遠距離の NOE が少なくなってしまったためであると考えている. 以上の結果から、NLS を用いた NOESY 測定 と MaxEnt によるデータ処理を応用する事で、構造未知の蛋白質の立体構造を決定する際に短時 間で重要な手掛かりを得られる事が期待できる.



Figure 3: Superposition of 20 final structures calculated based on the NOE-derived distance restraints from seven 4D  $^{13}$ C/ $^{15}$ N separated NOESY spectra processed with 3D MaxEnt from full (reference) data (**a**), simulated data with 1/4 (**b**), 1/16 (**c**), 1/64 (**d**) *nonlinear* sampling points and simulated data with 1/4 (**e**), 1/16(**f**) and 1/64 (**g**) *linear* sampling points. Thick lines represent the solution structure of TTHA1718 *in vitro* (PDB ID: 2roe).

#### **YP14** イノシトールリン脂質を組み込んだナノディスクの調製 とタンパク質–膜相互作用解析への応用

○吉田直樹<sup>1</sup>,小橋川敬博<sup>2</sup>,原田幸祐<sup>1</sup>,小椋賢治<sup>2</sup>,横川真梨子<sup>2</sup>, 稲垣冬彦<sup>2</sup> <sup>1</sup>北大・生命科学院 <sup>2</sup>北大・先端生命

#### Phosphoinositide-incorporated Nanodisc: A tool for studying proteinmembrane interactions

oNaoki Yoshida<sup>1</sup>, Yoshihiro Kobashigawa<sup>2</sup>, Kohsuke Harada<sup>1</sup>, Kenji Ogura<sup>2</sup>,

Mariko Yokogawa<sup>2</sup>, and Fuyuhiko Inagaki<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Lab. Struct. Biol. Grad. Sch. Life Sci. Hokkaido Univ.

<sup>2</sup> Lab. Advanced Life Sci. Hokkaido Univ.

Protein-lipid interactions have been studied using lipid bilayer mimetics; micelles, bicelles and liposomes. Micelles and bicelles contain detergents which denature the target proteins, while liposomes are insoluble to the aqueous solution which limits applications of analytical methods. Here we used a discoidal lipid bilayer model, Nanodisc for studying proteinphosphoinositedes (PIs) interactions. We established the protocol for incorporating phosphoinositides (PIs) into Nanodisc. PI-incorporated Nanodisc was applied to pull down binding assay, fluorescence polarization and solution NMR studies, thereby affording fast, quantitative and residue-specific evaluation of the protein-PI interactions, respectively. The PI-incorporated Nanodisc could be used as a versatile tool for studying the protein-lipid interactions by various biochemical and biophysical techniques.



Key word: phox, PX dmain, Nanodisc

Oよしだなおき、こばしがわよしひろ、はらだこうすけ、おぐらけんじ、よこがわまりこ、 いながきふゆひこ

ク質が限られていた。また、リポソームは水に溶けず粒子径も大きいため利用でき る分析法が限られていた。近年、ナノディスクと呼ばれる脂質二重膜モデルが開発 された。ナノディスクはバイセルと同様にディスク状の脂質二重膜を形成し、その 表面は平坦であるが、側面はバイセルとは異なり、界面活性剤ではなく MSP (Membrane Scaffold Protein) と呼ばれるタンパク質により覆われている。そのた め、ナノディスクは界面活性剤を含まずタンパク質を変性させることが無い。また、 水溶性であり、かつ粒子径が均一であるため、様々な分析に利用可能である。現在 までにナノディスクには様々な膜タンパク質の埋め込みが可能であることが示され ている。しかしながら、タンパク質-脂質相互作用解析のために脂質を埋め込んだ例 はない。我々はナノディスクにイノシトールリン脂質 (PIs)を埋め込むことにより タンパク質-脂質相互作用解析を行う手法を考案した。PIs はイノシトール環の 3 位、 4 位及び 5 位の 0H 基がリン酸化、又は脱リン酸化されることにより生成する。細胞 内シグナル伝達におけるセカンドメッセンジャーとして機能し、生体内には PI(3)P, PI(4)P, PI(5)P, PI(3,4)P<sub>2</sub>, PI(3,5)P<sub>2</sub>, PI(4,5)P<sub>2</sub>, PI(3,4,5)P<sub>3</sub>の計7種類が存在 する。また、それぞれの PI が時空間的なシグナル制御に関わるため、PI 結合タンパ ク質の PI 認識特異性に関する知見は細胞内シグナル伝達機構を解明する上で有用な 情報を与える。本研究では、PIsのナノディスクへの組み込み手法を確立し、p47 <sup>*phox*</sup> PX ドメインをモデルとして PI ナノディスクを用いたプルダウンアッセイ、蛍光 偏光解消法、NMR 実験を行うことで、定性的、及び定量的な結合特異性の評価、残基 レベルでの脂質認識特異性の評価を行うことが可能であることを確認した。

#### PI ナノディスクの作製

有機溶媒に可溶化された PI と PC を 1:80 のモル比で混合し、溶媒を揮発させて脂 質をフィルム化した。次に、界面活性剤を含む水溶液を加えて脂質を可溶化し、MSP を加え、室温で 1 時間放置したのちに Bio-Beads (Biorad) により界面活性剤を除去す ることでナノディスクを作製した。最後にゲルろ過により精製を行うことで均質な ナノディスクを得た。Fig2. (2) は実際に PI (4) P を組み込んだナノディスクの<sup>31</sup> P NMR スペクトルである。これより PI (4) P の組み込みおよび積分強度比より目的とす る割合で PI (4) P が組み込まれていることが確認された。



Fig2. (1) Schematic representation of preparation of PI-incorporated Nanodisc. (2) <sup>31</sup>P NMR spectrum of PI(4)P-incorporated Nanodisc.

#### プルダウンアッセイ

6xHis タグを付加した MSP を用いた PI ナノディスクを作成し、GST タグを付加した p47<sup>phox</sup> PX ドメインとのプルダウンアッセイを行った。GS4B(GE Healthcare)、PI ナ ノディスク、GST 融合 PX ドメインの 3 者を混合し、GS4B に GST を吸着させた後に洗 浄、溶出を行い、その画分を polyHis 抗体を用いたウェスタンブロットにより検出 することで、PI ナノディスクと PX ドメインの結合を検出した。PI(3)P, PI(4)P, PI(5)P, PI(3,4)P<sub>2</sub>, PI(3,5)P<sub>2</sub>, PI(4,5)P<sub>2</sub>, PI(3,4,5)P<sub>3</sub> の計 7 種類の PI を組み込 んだ PI ナノディスクと PI を含まないナノディスクの合計 8 種類を用いて p47<sup>phos</sup>PX ドメインとプルダウンアッセイを行った。その結果、p47<sup>phos</sup>PX ドメインは PI(3) P, PI(3,4)P<sub>2</sub>, PI(3,5)P<sub>2</sub>, PI(3,4,5)P<sub>3</sub> の4 種類の PIs に特異的に結合することが明ら かになった。この中でも特に PI(3,4)P<sub>2</sub>に対して最も高い親和性を有することが確認 された。この結果はリポソームアッセイ、表面プラズモン共鳴、及び PIP ストリッ プで示されていた結果と一致していた。



Western blotting (anti-polyHis)

Fig3.

(1) Schematic representation of the pull down binding assay using PIs-incorporated Nanodisc (2) P line is a straight part of the pull down binding assay using PIs-incorporated Nanodisc (2) P line is a straight part of the pull down binding assay using PIs-incorporated Nanodisc (2) P line is a straight part of the pull down binding assay using PIs-incorporated Nanodisc (2) P line is a straight part of the pull down binding assay using PIs-incorporated Nanodisc (2) P line is a straight part of the pull down binding assay using PIs-incorporated Nanodisc (2) P line is a straight part of the pull down binding assay using PIs-incorporated Nanodisc (2) P line is a straight part of the pull down binding assay using PIs-incorporated Nanodisc (2) P line is a straight part of the pull down binding assay using PIs-incorporated Nanodisc (2) P line is a straight part of the pull down binding assay using PIs-incorporated Nanodisc (2) P line is a straight part of the pull down binding assay using PIs-incorporated Nanodisc (2) P line is a straight part of the pull down binding assay using PIs-incorporated Nanodisc (2) P line is a straight part of the pull down binding assay using PIs-incorporated Nanodisc (2) P line is a straight part of the pull down binding assay using PIs-incorporated Nanodisc (2) P line is a straight part of the pull down binding assay using PIs-incorporated Nanodisc (2) P line is a straight part of the pull down binding assay using PIs-incorporated Nanodisc (2) P line is a straight part of the pull down binding assay using PIs-incorporated Nanodisc (2) P line is a straight part of the pull down binding assay using PIs-incorporated Nanodisc (2) P line is a straight part of the pull down binding assay using PIs-incorporated Nanodisc (2) P line is a straight part of the pull down binding assay using PIs-incorporated Nanodisc (2) P line is a straight part of the pull down binding assay using PIs-incorporated Nanodisc (2) P line is a straight part of the pull down binc

(2) Pull down binding assay of  $p47^{phox}$  PX domain.

#### 蛍光偏光解消法

蛍光偏光解消法により PI ナノディスクと p47<sup>phox</sup> PX ドメインとの結合の定量評価 を試みた。PX ドメイン(S36C 変異体)に Alexa488-maleimide を反応させることで C36 に部位特異的蛍光ラベルを付加した PX ドメインを得た。それに対して、PI ナノ ディスクを滴定し、それに伴う蛍光偏光度の変化を求めた。滴定曲線より見かけ上 の解離定数を算出した。PI (3, 4) P<sub>2</sub> ナノディスク、PI (3) P ナノディスク、PI を含ま ないナノディスクについてそれぞれ滴定曲線を得た。算出した解離定数は、 PI (3, 4) P<sub>2</sub> ナノディスク、及び PI (3) P ナノディスクについてそれぞれ Kd=20 nM 、及 び Kd=6 uM であった。また PI を含まないナノディスクは結合しないという結果にな り、プルダウンアッセイの結果に一致した。現在、他の PI ナノディスクに対しても 同様の実験を進めている。

#### 溶液 NMR への応用

<sup>15</sup>N で標識した p47<sup>phox</sup> PX ドメインに PI(3,4)P<sub>2</sub>ナノディスクと PI を含まないナノ ディスクをそれぞれ滴定し、<sup>1</sup>H<sup>-15</sup>N HSQC スペクトルを測定した。その結果、PI を 含まないナノディスクの滴定ではほとんどピーク強度が変化しなかったが、 PI(3,4)P<sub>2</sub> ナノディスクの滴定では大きくピーク強度が減少した。減少したシグナ ルに対応するアミノ酸残基を立体構造にマッピングすると、Fig4. (2)に示された立 体構造において黒で示した部位に集中していた。この領域はこれまでに報告されて いた PIs 結合部位及び PS 結合部位と一致しており、本実験手法の妥当性が確認さ れた。現在、スピンラベル化された脂質を埋め込んだナノディスクを用いて、深さ に関する情報の取得すること及び、TCS を用いたより詳細な相互作用部位に関する 情報の取得を進めている。



#### Fig4.

(1) Fluorescence polarization measurement of Alexa488 labeled  $p47^{phox}$  PX domain (2)<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC-based-NMR titration experiment. The residues whose signal intensity was reduced upon the addition of PI(3,4)P<sub>2</sub> Nanodisc were mapped on the structure of  $p47^{phox}$  PX domain(black). (PDB ID:1KQ6)

これまで、タンパク質-脂質間相互作用解析にはミセル、バイセル、リポソームが 用いられていたが、測定手法や目的によりこれらを使い分ける必要があった。しか しながら、PI ナノディスクを用いることで迅速、定量、残基レベルでの一連の解析 が可能であることが示された。今後、本手法は PI 結合タンパク質の特異性の網羅的 解析への応用も可能であると考えられ、細胞内シグナル伝達機構の解明に大きく寄 与するであろう。また、ナノディスクは脂質-タンパク質相互作用解析だけではなく、 膜タンパク質、糖脂質、脂質修飾タンパク質等を埋め込むことでより広範な相互作 用解析への応用が期待される。

### **YP15**

#### カルモジュリンC末端残基の構造と機能における役割

○黄多率<sup>1</sup>,北川千尋<sup>2</sup>,中冨晶子<sup>2</sup>,大木進野<sup>1</sup> <sup>1</sup>北陸先端大学院大・マテリアルサイエンス、<sup>2</sup>北大・院・理

#### The Role of C-terminal Residues of Calmodulin on Its Structure and Function

ODasol Hwang<sup>1</sup>, Chihiro Kitagawa<sup>2</sup>, Akiko Nakatomi<sup>2</sup>, and S. Ohki<sup>1</sup> <sup>1</sup>Japan Advanced Institute of Science and Technology (JAIST), <sup>2</sup>Hokkaido University

Calmodulin (CaM) is a  $Ca^{2+}$ -binding protein to regulate various enzymes. Normally, one CaM molecule binds four  $Ca^{2+}$  ions with increasing  $Ca^{2+}$  concentration in cells. However, Saccharomyces cerevisiae (yCaM) binds only three Ca<sup>2+</sup> ions due to lacking two residues in EF4 at C-terminus. Nevertheless, yCaM has the ability to interact with target proteins, and F-helix of EF4 in yCaM is essential for target activation. To clarify biophysical role of the C-terminal residues of CaM, we prepared a series of deletion mutants of chicken CaM (CCM0), and characterized their structural and functional properties. Here we present the results of their <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC, <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC, and <sup>113</sup>Cd-NMR.

【背景】カルモジュリン

(CaM) は真核生物細胞に普 CCM0 逼的に存在するCa<sup>2+</sup>結合タン パク質である。Ca<sup>2+</sup>を結合し たCaMが多様な標的酵素を活 CCMA 性化することにより様々な 生理現象を調節する。CaMは EFハンド型のCa<sup>2+</sup>結合ドメイ ンを4つ持つが、出芽酵母CaM (yCaM)の最もC末端側のEF4

	120	130	140	148
CCM0	EEVDEMI	READIDGDGC	VNYEEFVQN	IMTAK
CCMA4	EEVDEMI	READIDGDGQ	<b>VNYEEFVQN</b>	1
CCMA5	EEVDEMI	READIDGDGQ	VNYEEFVQ	
CCM <sub>Δ6</sub>	EEVDEMI	READIDGDGQ	VNYEEFV	
CCM <sub>Δ7</sub>	EEVDEMI	READIDGDGC	VNYEEF	
CCM <sub>Δ8</sub>	EEVDEMI	READIDGDGC	VNYEE	

Fig. 1. Amino acid sequences of CaM and its variants employed in this study. Only EF4 is summarized in this figure. Boxes indicate Ca<sup>2+</sup>-binding loop.

は変異によりCa<sup>2+</sup>結合能を欠いている。それにも関わらず、yCaMのEF4のFへリックス は標的酵素の活性化に必須である。そこで本研究ではCaMのC末端残基に注目し、それ らが担う役割を調べることにした。まず欠損変異体 (Fig. 1)を作製し、それらのCa<sup>2+</sup> 結合能と標的酵素活性化能を測定した。その結果、C末端から6残基以上を欠損させた 場合に顕著な機能低下が見られた。今回この結果を受けて、4と5残基欠損の2種類の 変異体を用いた各種NMR測定を行い、それら変異体の構造とCa<sup>2+</sup>結合、標的ペプチドの 結合と複合体構造についての知見を得た。

【実験】全長のCaMおよびその変異体は、大腸菌の発現系用いて作製した。精製には 各種クロマトグラフィを用いた。標的ペプチドは受託合成品を用いた。NMRの測定に

カルモジュリン,カドミウム,メチオニン選択標識

○ ふぁん だそる, きたがわ ちひろ, なかとみ あきこ, おおき しんや
はBruker AVANCE III 500, AVANCE III 800, Varian INOVA750を用い、298Kで行った。構造情報を得るために、均一<sup>15</sup>N標識試料の<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQCと[<sup>13</sup>C-methy1 Met] 選択標識試料の <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQCを測定した。また、EFハンド型タンパク質のNMR研究でしばしばCa<sup>2+</sup>の代わりに使われている<sup>113</sup>Cdを用いて1次元NMR測定を行った。測定データの処理には、 NMRpipeを、スペクトル解析にはSparkyを用いた。

【結果・考察】CCM  $\Delta$  4 と CCM  $\Delta$  5 が結合する Ca<sup>2+</sup>の数を透析平衡法で調べたところ、3個 か4個かを確定する明瞭な結果が得られなか った。しかし、CCM  $\Delta$  4 と CCM  $\Delta$  5 は 2 長 CaM と 同程度の標的酵素活性化能力を示した。そこ で我々は<sup>113</sup>Cd-NMR実験を行い、これを詳細に 調べた(Fig. 2)。

Fig. 2の左側と右側はそれぞれ標的ペプ チド非存在下と存在下のスペクトルである。 全長CaMは4個の<sup>113</sup>Cdを結合するが、標的ペプ チド非存在下の<sup>113</sup>Cd-NMRスペクトルではCa<sup>2+</sup> 高親和性のEF3とEF4に結合したCd<sup>2+</sup>からの 信号のみが観測される(Fig. 2 a)。全長CaM と標的ペプチドとの複合体では見かけの Ca<sup>2+</sup>結合能が高くなるので、4本の信号が観 測される(Fig. 2 d)。

CCM Δ 4のスペクトル (Fig. 2 b, e) が全 長CaMのスペクトル (Fig. 2 a, d) とほぼ一 致することから、CCM Δ 4は4個のCa<sup>2+</sup>を結合 すること、標的ペプチドを結合した構造は全 長CaMの複合体構造に近いことが明らかにな った。一方、CCM Δ 5のスペクトル (Fig2 c, f) は全長CaMやCCM Δ 4のスペクトルとは大きく 異なることが明らかになった。この結果は、 C末端側から5番目の残基 (Met144) がCa<sup>2+</sup>結 合や標的酵素との結合にとって重要である ことを示唆している。



Fig. 2. <sup>113</sup>Cd-NMR spectra of CaM and its variants. Left (a, b, and c) and right (d, e, and f) indicate CaM (or variant) without and with skMLCK peptide, respectively. CCM0 (a and d), CCM  $\Delta$  4 (b and e), and CCM  $\Delta$  5 (c and f).

発表では、均一 $^{15}$ N標識試料の $^{1}H-^{15}N$  HSQCと[ $^{13}C-methyl$  Met]選択標識試料の $^{1}H-^{13}C$  HSQCのデータも合わせて、C末端側残基が担う役割について議論する。

#### 【参考論文】

[1] Luan, Y., Matsuura, I., Yazawa, M., Nakamura, T. & Yagi, K. (1987) J.Biochem. 102, 1531-1537.

- [2] Yazawa, M., Nakashima, K. & Yagi, K. (1999) Mol. Cell. Biochem. 190, 47-54.
- [3] Forsén, S., Thulin, E., Drakenberg, T., Krebs, J. & Seamon, K. (1980) FEBS Lett. 117, 189-194.

#### YP16 放線菌由来カリウムチャネルKcsAのゲーティング機構の構造生物学的解析 ○今井駿輔<sup>1</sup>,大澤匡範<sup>1</sup>,竹内恒<sup>2</sup>,嶋田一夫<sup>1,2</sup> <sup>1</sup>東大薬 <sup>2</sup>BIRC/AIST

#### Structural basis underlying the dual gate properties of KcsA

OShunsuke Imai<sup>1</sup>, Masanori Osawa<sup>1</sup>, Koh Takeuchi<sup>2</sup>, and Ichio Shimada<sup>1,2</sup> <sup>1</sup> Grad. Sch. Pharm., The Univ. of Tokyo <sup>2</sup> BIRC/AIST

KcsA is a prokaryotic pH-dependent potassium ( $K^+$ ) channel. Its activation, by a decrease in the intracellular pH, is coupled with its subsequent inactivation, but the underlying mechanisms remain elusive. We investigated the conformational changes and equilibrium of KcsA. Controlling the temperature and pH produced three distinct methyl-TROSY spectra of KcsA, corresponding to the closed, activated, and inactivated states. The pH-dependence of the signals from the extracellular side was affected by the mutation of H25 on the intracellular side, indicating the coupled conformational changes of the extra- and intra- cellular gates. K<sup>+</sup> titration experiment revealed that the activated and inactivated states correspond to the K<sup>+</sup>-bound and unbound states. Furthermore, an NOE to water was observed for V76 only in the inactivated state, suggesting the importance of bound water in the inactivated state.

#### 「序】

放線菌由来のカリウムチャネルKcsAは 細胞内 pH に応答して開閉する。中性で は巨視的電流が観測されない閉状態を 取るが、pH 5 以下の酸性刺激を与えると、 一過性のピーク電流の後 1~3 秒にて減 衰し、ピーク電流の 15%程度の電流を流 す開状態に達する。この KcsA の巨視的 電流の特徴は真核生物の電位依存性カ リウムチャネル(Kv)にも共通して見られ、 膜電位の制御に関わる重要な性質であ る。

閉状態を取る中性でのKcsAの結晶構 造および変異体を用いた電気生理解析 から、膜貫通領域に形成されるK<sup>+</sup>透過路 上にK<sup>+</sup>の透過を阻むhelix bundle



Fig.1 Structural model of KcsA For clarity, only two subunits of a tetramer are shown. Gray balls are carbon atoms of Ile, Leu, Val methyl groups.

#### 膜タンパク質、カリウムチャネル、メチルTROSY

○ いまいしゅんすけ、おおさわまさのり、たけうちこう、しまだいちお

crossing とその選択性を担うselectivity filterの2つのイオンゲートが存在することが示されている (Fig.1)。開状態では、酸性刺激に応答してhelix bundle crossingが開き、K<sup>+</sup>を透過する活性化状態と透過しない不活性化状態の間の平衡にあることが示唆されている。刺激によるピーク電流は、活性化状態と不活性化状態の間の平衡が、刺激直後に活性化状態から開始するためであると想定されているが、その機構は未だ不明である。

そこで本研究では、高分子量タンパク質でも高感度かつ高分解な NMR スペクトルが観測 可能なメチル TROSY 法を用いて、(1) 活性化状態と不活性化状態を区別する構造的要因 は何か、(2) 刺激直後にピーク電流が流れる分子機構は何か、すなわちなぜ活性化状態と 不活性化状態の間の平衡が活性化状態から開始するのか、というカリウムチャネルの動作 機構を理解する上で重要な 2 つの問題を解明することを目的とした。(ref.1)

#### 【結果】

1. KcsAのメチルTROSYスペクトル測定とシグナルの帰属

本研究では、dodecyl maltoside (DDM)ミセルに再構成した KcsA のメチル基の直接 NMR 観測を行った。閉状態に対応する pH 6.7、および開状態に対応する pH 3.2、45°C の条件

下にて測定した KcsA の メチル TROSY スペクトル を Fig.2 に示す。観測対 象となる Leu, Val, Ile の メチル基(計83個)のうち、 変異導入などにより、pH 6.7 では 61 個、pH 3.2 で は 66 個のシグナルを帰 属した。開状態に対応す る pH 3.2 においては、強 弱2つのシグナルを与え るメチル基が観測され、 この事実より、KcsA は開 状態にて少なくとも 2 種 以上の構造をとっている ことが明らかとなった (Fig.2B, inset)



Fig.2 Methyl-TROSY spectra of KcsA Methyl-TROSY spectra acquired at pH 6.7 (A) and 3.2 (B) at 45°C in the presence of 120 mM K<sup>+</sup> are shown. At acidic pH, some methyl groups exhibited two signals, indicating conformational equilibrium under the acidic condition (B, inset).

#### 2. 開状態における構造平衡

開状態にて平衡にある2種の状態の実体を明らかとするため、酸性で活性化状態のみを とるE71A変異体、野生型よりも不活性化状態の割合が大きいY82A変異体のメチルTROSY スペクトルを野生型と比較した。測定条件を電気生理解析の条件と合わせるために、まず野 生型のスペクトルの温度依存性を調べた(Fig.3A)。pH 3.2にて温度を45°Cから5°C刻みで低 下させたところ、45°Cにて観測された弱いシグナルの強度は温度低下に伴って増大し、強 いシグナルの強度は減少した。両者は30°Cでほぼ一致し、25°Cでは逆転した。そこで、電 気生理解析が行われる条件に近い 25°Cにて、野生型とE71A変異体、 Y82A変異体のシグナル強度を比較 した。その結果、selectivity filterに 存在するV76のメチル基の2つのシ グナルのうち<sup>1</sup>H: -0.13 ppm, <sup>13</sup>C: 17.7 ppmに観測されるものの相対強 度が、E71A変異体で1.0、野生型で 0.31, Y82A変異体で0.17であり、電 気生理解析における活性化状態の 割合とそれぞれよく一致した (Fig.3B)。これらの結果から、開状態 で観測される2つのシグナルはそれ ぞれ活性化状態と不活性化状態由 来のものであることが示された。また、 上記の温度依存性を利用して、pH 3.2, K<sup>+</sup>濃度120 mMの条件下では 45°Cで活性化状態が、25°Cで不活 性化状態がそれぞれ選択的に観測 されることが判明した。



Fig.3 Conformational equilibrium under the acidic condition.

(A) Temperature dependence of methyl TROSY spectra at pH 3.2 and in the presence of 120 mM  $K^+$ .

(B) Comparison of the spectra with the mutants at pH 3.2 and 25°C, in the presence of 120 mM  $K^+$ . Numbers in the parenthesis exhibit the population of each conformation.

#### 3. Selectivity filterとK<sup>+</sup>,H<sub>2</sub>Oとの相互作用解析

次に、閉状態と開状態における selectivity filter と K<sup>+</sup>との相互作用を解析するため、K<sup>+</sup> 滴定実験を 行った。その結果、開状態における K<sup>+</sup>との相互作 用に伴うスペクトル変化が、不活性化状態から活 性化状態への移行に伴うスペクトル変化と一致す ることが明らかとなった。この結果は、活性化状態 が K<sup>+</sup>結合型、不活性化状態が K<sup>+</sup>非結合型にそれ ぞれ対応することを示している。また、V76 y1 のシ グナル強度の K\*濃度依存性から、45°C における selectivity filterとK<sup>+</sup>との相互作用の解離定数が閉 状態において6mM, 開状態において50mM であ り、開状態においては閉状態と比較して親和性が 8 倍程度減少することが明らかとなった。さらに、 120 mM K<sup>+</sup>の存在下、溶媒を 100% D<sub>2</sub>O から 10% D<sub>0</sub>O / 90 % H<sub>0</sub>O に変更して NOESY 解析を行った 結果、負の NOE シグナルが観測されたことから、 不活性化状態においてのみ、V76 y1 の近傍5 Å以 内に 300 ps 以上とどまる水分子が結合することが 明らかとなった(ref.2)(Fig.4)。



Fig.4 NOE strips from V76  $\gamma$ 1 NOE strips from V76  $\gamma$ 1 in the closed, activated, and inactivated states in the presence of 120 mM K<sup>+</sup> and 90% H<sub>2</sub>O are shown.

#### 4. Selectivity filterの構造変化に寄与するプロトン化部位の同定

化学シフト変化および NOE パターンの変化から、閉状態から開状態への移行時に selectivity filter の構造が変化することが示された。V76 のシグナル強度変化の pH 依存性 から、その構造変化の引き金となるプロトン化部位が Glu, Asp, His 残基であることが示唆さ れたため、膜貫通領域の Glu, Asp, His 残基を1 つずつ Ala に置換した各種変異体のメチ ル TROSY スペクトルを解析した。その結果、helix bundle crossing 周辺の H25 を Ala に置換 した変異体 H25A において、selectivity filter 近傍のシグナルの pH 感受性が低下すること が明らかとなった。H25 のプロトン化が helix bundle crossing の構造変化の引き金となるという 当研究室の先行報告(ref.3)と合わせると、この結果は、helix bundle crossing の開閉が selectivity filter の構造変化と共役していることを示している。

#### 【考察】

本研究の成果を元に、【序】に記した2つの問題について考察する。

(1) については、活性化状態と不活性化状態の違いが selectivity filter の K<sup>+</sup> および水分 子との結合様式にあり、酸性条件下において selectivity filter に K<sup>+</sup> が結合した状態が活性 化状態、K<sup>+</sup> が解離し水分子が強く結合した状態が不活性化状態に対応することが明らかと なった。

(2)のピーク電流の機構に関しては、閉状態と開状態における selectivity filter の K<sup>+</sup> 親和 性の違いから、以下の機構を明らかにした。閉状態では selectivity filter の K<sup>+</sup> 親和性が高く、 K<sup>+</sup> 濃度が数 mMと低い細胞外側から K<sup>+</sup> を捕捉できるため、生理的な条件下においては通 常 selectivity filter に K<sup>+</sup>が結合している。酸性刺激によって helix bundle crossing が開くと、 これと共役した selectivity filter の構造変化に伴って K<sup>+</sup> 親和性が低下し、活性化状態と不 活性化状態の平衡が開始する。このとき selectivity filter が K<sup>+</sup> 結合状態にあるために、この 平衡は K<sup>+</sup> 結合状態である活性化状態から開始する。これがピーク電流が観測される機構 である。また、その後の減衰についても、活性化状態から開始したこの平衡が、次第に不活 性化状態の割合が大きい定常状態に達するために起こることが明らかとなった。

感受する刺激こそ異なるものの、KcsA の電気生理学的性質および selectivity filter の配 列と構造は Kv チャネルとよく類似しており、以上の知見はこれらのチャネルにも適用できる と期待される。

【参考文献】

1) <u>Imai S</u> et al. (2010) *Proc Natl Acad Sci USA* 107:6216–6221

- 2) Clore GM et al. (1994) Structure 2: 89-94
- 3) Takeuchi et al. (2007) J Biol Chem 282: 15179-15186

# YP17 NMRスピンラベル法を用いた酵母ミトコンドリア酸化還 元トランスロケータTim40とFAD結合型酸化酵素Erv1の相 互作用解析 〇安西高廣<sup>1</sup>、河野慎<sup>1</sup>、寺尾佳代子<sup>1</sup>、遠藤斗志也<sup>1</sup> <sup>1</sup>名大・院理・物質理学

## NMR spin-label analysis on the interactions between an oxidative translocator Tim40 and a FAD-linked sulfhydryl oxidase Erv1 in yeast mitochondria

<sup>O</sup>Takahro Anzai<sup>1</sup>, Shin Kawano<sup>1</sup>, Kayoko Terao<sup>1</sup> and Toshiya Endo<sup>1</sup> <sup>1</sup>Department of Chemistry, Graduate School of Science, Nagoya University, Aichi, Japan.

Mitochondria has outer and inner membranes. The compartment between them, the intermembrane space (IMS), has many proteins that contain disulfide bond. Recently, a disulfide relay system in the IMS has been identified which consists of two essential proteins, the redox-regulated translocator Tim40 and the flavin adenine dinucleotide (FAD)-linked sulfhydryl oxidase Erv1. The disulfide relay system drives the import of these cysteine-containing proteins into the IMS by the folding trap mechanism. In order to reveal structural basis of the disulfide relay system in mitochondria, we determined the X-ray structures of Tim40 and Erv1. Furthermore, we performed NMR spin-label experiments to analyze the interaction between Tim40, its substrate and Erv1.

ミトコンドリア膜間部のタンパク質の多くは、酸化還元トランスロケータ Tim40/Mia40とFAD結合型酸化酵素Erv1により、ジスルフィド結合を導入されつつ外 膜を通過する。Tim40は基質タンパク質の認識と酸化を、Erv1はTim40の再酸化を担う と考えられている。当研究室ではTim40とErv1の機能の構造基盤を確立するため、 Tim40およびErv1の立体構造をX線結晶構造解析により決定した。しかし、両タンパ ク質の相互作用部位や認識機構については不明である。本研究では、Erv1によるTim40 認識機構の解明を目指し、NMRスピンラベル法を用いて相互作用領域の同定を試みた。

Erv1のC30、C33はジスルフィド結合を形成し、このジスルフィド結合がTim40から 電子を受け取り、FADへ受け渡すというモデルが提唱されている。今回、Erv1がTim40 を認識する機構を明らかにするため、C30をセリンに置換することで活性中心に1つの チオール基のみが存在するようにし、さらにそのC33のチオール基に、スピンラベル 剤MTSL((S-(2,2,5,5-tetramethyl-2,5-dihydro-1H-pyrrol-3-yl)methyl methanesulfonothioate)) を導入した。スピンラベル剤のラジカル分子は、近接する核スピンの緩和を促進し、 約20Å以内に位置する核スピンのNMRシグナルの強度を減少させるので、NMRシグ ナルの強度変化から、スピンラベル近傍の残基を推定できる。

まず、<sup>15</sup>N標識したTim40のコアドメイン284-353のC296とC298をセリンに置換した

Mitochondria, Disulfide bond, NMR spin-label

○あんざいたかひろ,かわのしん,てらおかよこ,えんどうとしや

変異体(以下Tim40CoreC296/298S)にスピンラベルを導入したErv1を加えたが、特異的なシグナル強度減少は観測されなかった。一方、Tim40の基質であるTim9の認識配列ペプチドMSP1(NLVERCEF)をN末端側に融合させたMSP1-Tim40CoreC296Sを用い

て 同様の NMR 実 験を行ったとこ ろ、MSP1および Tim40の立体構 造上で基質の近 傍に位置する残 基で特異的なシ グナル強度減少 が観測された。 これらのことか ら、Erv1はTim40 単独を認識する のではなく Tim40と基質と の複合体を認識 すること、およ びErv1とTim40 の相互作用部位 は結合した基質 およびその近傍 に位置しており、 Tim40- 基 質 -Ervlの三者複 合体を形成する 可能性が示唆さ れた。

Substrate

Tim40 / Mia40



Fig. 2 Ternary complex model of Tim40, substrate and Erv1

Erv1

#### YP18 マウスフェロモンESP1-受容体間相互作用の 構造生物学的研究 ○平金 真<sup>1</sup>, 吉永 壮佐<sup>1</sup>, 佐藤 徹<sup>2</sup>, はが 紗智子<sup>2</sup>, 嶋田 一夫<sup>3</sup>, 東原 和成<sup>2</sup>, 寺沢 宏明<sup>1</sup>

<sup>1</sup>熊本大学 大学院 生命科学研究部, <sup>2</sup>東京大学 大学院 農学生命科学研究科, <sup>3</sup>東京大学 大学院 薬学系研究科

### Structural study of interactions between mouse pheromone ESP1 and ESP1 receptor

 Makoto Hirakane<sup>1</sup>, Sosuke Yoshinaga<sup>1</sup>, Toru Sato<sup>2</sup>, Sachiko Haga<sup>2</sup>, Ichio Shimada<sup>3</sup>, Kazushige Touhara<sup>2</sup>, Hiroaki Terasawa<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Life Sciences, Kumamoto University,

<sup>2</sup>Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo,

<sup>3</sup>Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo

Pheromones are species-specific chemical signals that regulate a wide range of social and sexual behaviours in many animals. The vomeronasal organ (VNO) mediates the pheromonal information via vomeronasal sensory neurons (VSNs) in mice. We identified a male-specific peptide ESP1 (<u>exocrine-gland-secreting peptide 1</u>) secreted into tear fluids that stimulates female's VSNs. In addition, ESP1 turns out to be a member of a multigene family (ESP family). The aim of this study is the elucidation of the mechanism to discriminate among individuals via the pheromone reception system. We report here a three-dimensional structure of ESP1 with solution NMR analyses. The structure-activity relationship of ESP1 based on the structural data and the mutational effects on the VSN-stimulating activity will be discussed.

【背景・目的】

フェロモンは、ある個体が発し、同種の別個体に受け取られて特定の行動や生理的 変化を促す物質である。齧歯類において、鼻腔から取り込まれたフェロモンは鋤鼻器 官の受容体に結合し、そのシグナルは副嗅球を介して脳へと伝えられる。既知のフェ ロモンのほとんどは、尿や汗に含まれる揮発性の低分子であるが、東原らは、オスマ ウスの涙よりメスマウスの鋤鼻神経系を活性化する新規の不揮発性ペプチドを同定 し、ESP1と命名した<sup>1)</sup>。ESP1をコードする遺伝子は、マウスでは38種類、ラット では10種類からなる新規の多重遺伝子ファミリーを形成していた<sup>2)</sup>。また、東原ら は、ESP1受容体が G タンパク質共役受容体 V2Rp5 (vomeronasal type <u>2</u> receptor <u>p5</u>) であることを明らかにした<sup>3)</sup>。

キーワード:マウスフェロモン、ESP1、ESP1 受容体

○ひらかね まこと、よしなが そうすけ、さとう とおる、はが さちこ、 しまだ いちお、とうはら かずしげ、てらさわ ひろあき フェロモンが引き起こす行動に、交尾の際にメスがオスを受け入れる体勢をとるロードシスがある。ESP1 はロードシスを促す働きがあることを、最近、我々は明らかにした<sup>4)</sup>。ESP1 はリガンドと受容体、そして機能までが明らかになっている哺乳類における初めてのペプチド性フェロモンである。

本研究は、ESP1-V2Rp5 間の結合様式を構造生物学的手法を用いて解明することで、ESP1 の受容体認識機構を明らかにし、フェロモンが媒介する個体間コミュニケーションの構造学的基盤を確立することを目的とする。

【方法】

大腸菌の大量発現系において、安定同位体標識タンパク質を取得するため、M9 培地により大量培養を行った。発現させた ESP1 タンパク質をニッケルアフィニティークロマトグラフィーにて粗精製した後、トロンビンを用いてヒスチジンタグを切断した。その後、陰イオン交換、ゲルろ過、逆相の各種クロマトグラフィーを行い、ESP1の精製品を得た。精製した試料について各種の多核多次元 NMR 測定を行った。NMR スペクトルの解析には Olivia、ESP1 の立体構造解析には CYANA を用いた。また、MOE を用いて、V2Rp5 のモデリングを行った。ESP1 の鋤鼻神経系刺激活性化能の測定は、神経細胞の c-Fos タンパク質の発現誘導を指標にした。

【結果と考察】

<sup>15</sup>N および <sup>13</sup>C<sup>15</sup>N 標識 ESP1 を用いて各種の三次元測定および解析を行い、NMR シグナルの帰属を完了した。また、NOESY スペクトルより得られる <sup>1</sup>H 間の距離情 報と、HNHA スペクトルおよび化学シフト値から得られる主鎖二面角の情報をもと に ESP1 の立体構造決定を行ない、3本のヘリックスを含むことを明らかにした。

ESP1 の立体構造から、分子表面における電荷分布に着目したところ、特徴的な電 荷分布がみられた。これらの残基に変異を導入した ESP1 変異体を調製し、マウスを 用いた *in vivo* 実験で鋤鼻神経系刺激活性化の指標となる c-Fos の発現が完全に消 失したことから、ESP1 の鋤鼻神経系刺激活性に必要な残基や領域が推測された。 V2Rp5 と同じ GPCR クラス C に属する代謝型グルタミン酸受容体の細胞外領域の 結晶構造を鋳型にして V2Rp5 の立体構造をモデリングした。ESP1 の変異体解析で 推測された鋤鼻神経系刺激活性に必要な荷電性残基と V2Rp5 モデルの表面電荷分 布を対応させ、ESP1--V2Rp5 複合体モデルを作成した。

溶液 NMR 解析、変異体解析の結果、また、ESP1-V2Rp5 複合体モデルより、ESP1の構造活性相関について議論する。

【展望】

ESP1 受容体 V2Rp5 の調製を行い、溶液 NMR 法を用いて、ESP1 の相互作用部 位を特定する。ESP1 と V2Rp5 の相互作用機構を原子レベルで解明し、構造情報を もとにしたアゴニストやアンタゴニストの開発に応用・展開していく。

#### 【参考文献】

1) Kimoto H. et al., Nature, 437, 898-901 (2005)

2) Kimoto H. et al., Current Biology, 17, 1879-1884 (2007)

3) Haga S. et al., Pure and Applied Chemistry, 79, 775-783 (2007)

4) Haga S. et al., Nature, 466, 118-122 (2010)

#### **YP19** 転写抑制コファクターSHARP/SMRT複合体の試料調製及び 構造解析 ○三神 すずか,伊藤 隆,三島 正規 首都大・有機構造生物化学

### Structural studies on the transcriptional corepressor complex SHARP/SMRT and its preparation

Suzuka Mikami, Yutaka Ito, Masaki Mishima
 Graduate school of science and engineering, Tokyo Metropolitan University

SHARP is known as a component of transcriptional repressor complexes functions in nuclear receptor and Notch signaling pathways. SPOC domain of SHARP binds to the C terminus of corepressor SMRT. SPR, ITC and NMR experiments clearly showed that phosphorylated SMRT peptide (2492-2517) tightly bound to SPOC domain of SHARP. In contrast, the affinity was decreased with 1000 fold without phosphorylations. We introduced <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N labeled amino acids into SMRT peptide and solved ambiguities for the resonance assignments. The determined complex structure provided structural basis for the SHARP-SMRT interaction. Sample preparation of recombinant SMRT as chimera protein with CKII kinase domain will be also discussed in the conference.

#### 【研究背景・目的】

SHARP はステロイドホルモンの 17β-エストラジオールのシグナル経路や Notch シ グナル伝達系における転写抑制因子複合体の構成要素である。SHARP の C 末端に存 在する SPOC ドメイン(アミノ酸残基 3496~3664)は転写抑制補因子である SMRT の C 末端(アミノ酸残基 2492-2517)と結合することが知られ、SMRT はヒストン脱アセチ ル化酵素の HDAC と複合体を形成することから、SHARP と SMRT が結合すること によってクロマチン構造レベルでの転写抑制が行われていると考えられている。本研 究では SPOC/SMRT 複合体の分子構造に基づいてその機能を理解すること目的に、生 体高分子複合体に関して様々な情報が得られる NMR 法を用いて SPOC/SMRT の立体 構造を決定した。構造解析の際に SMRT のリン酸化がその相互作用に重要であるこ とを見出した。また、<sup>13</sup>C,<sup>15</sup>N 標識した化学合成 SMRT ペプチドを用いた測定が、解 析の不確実さを改善するのに有効であったが、化学合成では一部のアミノ酸にしか標 識をすることができないため、均一に同位体標識できるよう SMRT の発現系の作成 に取り組んだ。今回、同時にリン酸化修飾を行える発現系として SMRT とキナーゼ のキメラタンパク質のデザイン・サンプル調製にも取り組んだので報告する。

【研究方法】

■SPOC と SMRT ペプチドの結合実験

pGEX 6P-3 ベクター、大腸菌 BL21 Rosetta を用いて SPOC ドメインの発現系を作 製し 20 ℃ で一晩発現誘導をかけ <sup>13</sup>C,<sup>15</sup>N 標識した SPOC を大量発現させた。DEAE sepharose、GSH アフィニティーカラムに通し、ゲル濾過カラムクロマトグラフィー により精製を行った。得られたサンプルと化学合成した SMRT ペプチド(2492-2517) を用いて NMR 法により結合実験を行った。また、両者間の解離定数を調べるため表 面プラズモン法(SPR)や等温滴定型熱量計(ITC)用いた結合実験を行った。

■SPOC/SMRT 複合体の立体構造決定

SPOC/SMRT 複合体には、SMRT の S2514、S2516 にリン酸化修飾を施した SMRT 合成ペプチド(以降 pSMRT と記述)を用いた。各種多次元 NMR 実験 HNCACB、 CBCA(CO)NH、HN(CA)CO、HNCO、C(CO)NH、H(CCO)NH、4D HC(CO)NH、 HCCH-TOCSY、<sup>13</sup>C-CT-HSQC (for 15% <sup>13</sup>C labeled sample)、<sup>13</sup>C separated NOESY、<sup>15</sup>N separeted NOESY、ω2-2D <sup>13</sup>C,<sup>15</sup>N filtered NOESY & TOCSY、<sup>1</sup>H-<sup>31</sup>P HSQC、HNHB、 HN(CO)HBを行い SPOC/SMRT 複合体の立体構造を決定した。構造計算はCYANA ver. 3.0を用いた。この際のリン酸化セリンの library file は Legge G.B. (*J. Bio. NMR* 2005, 33, 15-24)らによるものを用いた。

■キメラタンパク質のデザイン・作製・調製

D-TOPO クローニングキット(Invitrogen 社)を用いてキメラタンパク質の DNA 配 列を pET151/D-TOPO に組み込んだ。発現ベクターは BL21 Rosetta(DE3)に形質転換し た。IPTG により 20 °C で一晩発現誘導をかけた。菌体を破砕後、DEAE sepharose、 Ni-NTA sepharose に通したあとゲル濾過カラムクロマトグラフィーにより精製を行 った。

#### 【結果・考察】

■SPOC と SMRT ペプチドの結合実験

当初、NMR 法を用いて(<sup>13</sup>C,<sup>15</sup>N)標識した SPOC と化学合成した SMRT ペプチド (2492-2517)の結合実験を行ったが、期待される強い結合を示すスペクトル変化は見ら れなかった。そこで相互作用を定量的に解析するため SPR 法により解離定数を求め たところ、結果は 10<sup>4</sup> M であり決して強い結合をしているとはいえない値であった。 再度アミノ酸配列を調べたところ SMRT の S2514 及び S2516 がそれぞれ Caseine kinase II (CK II)、Caseine kinase I (CK I)によってリン酸化修飾を受ける可能性が高

いことがわかった。 そこで、これらの残基に リン酸化修飾を施した SMRT 合成ペプチドを 用い SPOC との解離定数を SPR 法により求め た結果、S2514 のリン酸化により約 100 倍、 S2514、S2516 のリン酸化で約 1000 倍、相互作 用が強くなることが分かった(Table 1)。また、

Table 1 Summary of SPR analysis

Phosphorylation site	K <sub>p</sub> (M)	
_	2.4 × 10 <sup>-4</sup>	
S2514	5.9 × 10 <sup>-6</sup>	
S2516	2.9 × 10 <sup>-5</sup>	
S2514,S2516	4.0 × 10-7	

ITC 測定でもリン酸化なしのペプチドでは結合がほ とんど観測されなかったのに対し、pSMRT では  $10^{-7}$ M であり SPR と同様の値を得た(Fig. 1)。NMR 法を用 いた結合実験からもリン酸化のない SMRT ではピー クシフトが fast exchange であるのに対し、pSMRT で は slow exchange であった。

#### ■SPOC/pSMRT 複合体の構造決定・分子認識機構

SPOC 単独、及び化学合成した pSMRT ペプチドと 複合体状態のそれぞれについて行った主鎖の帰属か ら SPOC における複合体形成に重要なアミノ酸残基 を推定したところ、特に R3552 とその周辺に化学シ フト変化が観測された。R3552、R3554 は複合体形成 により<sup>1</sup>H 軸に関して大きく低磁場へのシフトしてお り、複合体形成時に主鎖による水素結合の形成が予想 された。





**Fig. 1 ITC measurement** Raw ITC data and binding isotherms for titration of SPOC with pSMRT.

Fig.2 Structure of the SPOC/pSMRT complex (A) Ensemble of 20

lowest energy structure (B) Close up view for the pSMRT recognition by SPOC

構造決定は、各種多次元 NMR 実験から収集した 3500 以上の距離情報を用いて行った(Fig. 2)。SMRT の Y2510 の芳香環は SPOC の M3553、I3611 間と疎水的な相互作用を形成していた。また、SMRT の L2513 は SPOC の Y3515、I3549、Y3602 の三残基によって形成される疎水性ポケットの中に入りこむかたちで位置していた。SMRT の E2511 側鎖は SPOC の R3552、R3554 と、また pS2514 のリン酸基は SPOC の R3552 の側鎖と水素結合を形成する位置にあった(Fig. 2)。化学シフト変化から推定された R3552 の水素結合は実際に決定した複合体の構造中でも見られた。

#### ■キメラタンパク質のデザイン・作製・調製

化学合成した pSMRT のプロトンのみの情報だけでは構造解析に十分な情報が得られなかった。そこで、入手可能な<sup>13</sup>C,<sup>15</sup>N 標識アミノ酸を用いて部分的に標識を施した pSMRT 合成ペプチド(2510-2517)を用いて測定を行ったところ有用な情報を得ることができ(Fig. 3)、構造解析の曖昧さを改善することができた。

pSMRTの分子認識様式を決定する上で、同位体標 識された pSMRT ペプチドの必要性を感じたため、 SMRT 発現系の作成に取り組んだが、SMRT 単独で の発現を確認することはできなかった。原因として は対象とした領域が 25 残基と短く、発現しても分 解されてしまう可能性が考えられた。そこで、 SMRT に対して同位体標識とリン酸化修飾を効率 よく行う手法としてキメラタンパク質の発現に取 り組んだ。

キメラタンパク質はN末端側よりHis-tag、CKII、 GSリンカー、TEV認識部位、SMRT(2492-2516)の 順にタンデムに連結させたものをデザインし(Fig. 4)、その発現を確認することができた。

このキメラタンパク質を用いて SPOC との結合 実験を行った。<sup>15</sup>N 標識した SPOC 試料に等量のキ メラタンパク質を加え、その後 TEV によりキメラ タンパク質からキナーゼを切断し、そのスペクトル の変化を追った。SPOC に等量のキメラタンパク質



Fig. 3 <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC spectrum of pSMRT in complex with SPOC



Fig. 4 Schematic drawing of the chimera protein

を加えたところシグナルが消失した。これは SPOC と分子量 45 KDa のキメラタンパ ク質が結合したことでピークの線幅がブロードニングしたことによると考えられる。 実際、TEV を加えてキナーゼドメインを取り除くとブロードニングしていたシグナル が復活し、さらにピークが複合体型スペクトルに変化した(Fig. 5)。



**Fig. 5 Binding analysis of SPOC and chimera** (A)SPOC (B)SPOC:chimera=1:1 (C)overlay of SPOC/digested chimera complex with free SPOC. (black : free、gray : complex)

#### 【今後の予定】

今後、複合体の動的な性質を調べるため緩和測定を行う。そのために均一に標識され たリン酸化 SMRT が必要であり、発現系の確立が急務である。現在、もう一つのリン 酸化酵素 CK I の発現系作製を試みておりキメラタンパク質・共発現系を用いた pSMRT 試料調製法の確立に取り組んでいく予定である。

### ポスター発表要旨

### **Poster Abstracts**

**P1** 

固液界面における蛋白質間相互作用解析に向けた、 転移交差飽和法へのマジック角回転の適用 ○豊永翔<sup>1</sup>、大澤匡範<sup>1</sup>、横川真梨子<sup>1</sup>、嶋田一夫<sup>1,2</sup> <sup>1</sup>東大・院薬系、<sup>2</sup>産総研・バイオメディシナル情報研究センター

#### Transferred Cross-Saturation Method under Magic Angle Spinning for Structural Analysis of Protein – Protein Interaction at the Solid – Liquid Interface

Shou Toyonaga<sup>1</sup>, Masanori Osawa<sup>1</sup>, Mariko Yokogawa<sup>1</sup> & Ichio Shimada<sup>1,2</sup> <sup>1</sup> Grad. Sch. Pharm. Sci., The Univ. of Tokyo, <sup>2</sup> BIRC, AIST

Bead-linked proteoliposomes (BPLs), where membrane proteins are stabilized in the lipid bilayers at high concentration, can be used as the cross-saturation (CS) donor in the transferred cross-saturation (TCS) analyses. However, solid beads disturb the local magnetic homogeneity, causing the signal broadening of the CS-acceptor. Furthermore, the decreased mobility of the bead-linked protein enhances the dipolar-dipolar (DD) interactions, which might preclude the precise identification of the binding interface by TCS. In order to overcome these problems, we applied magic angle spinning (MAS) to TCS, where a bead-linked protein and its binding protein in solution were used as the CS-donor and acceptor, respectively. MAS-TCS successfully identified the interacting residues at the solid – liquid interface. The effect of MAS rate on the TCS results will be discussed.

【背景・目的】従来の構造生物学的手法では、膜蛋白質は界面活性剤により可溶 化された状態で解析されてきた。しかし、膜蛋白質は界面活性剤ミセル中でしばしば その高次構造が不安定化することが知られており、脂質二重膜中にて活性を保持した 状態での試料調製法が必要とされる。

これまでに我々は、膜蛋白質をビーズに固定化した状態で脂質二重膜中に再構成す る"bead-linked proteoliposome (BPL)"を開発し、NMR を用いた相互作用解析法である 転位交差飽和(TCS)法の適用により、カリウムチャネルとその阻害毒素の複合体解析 に成功した(Yokogawa M. et al. 2005)。しかし、ビーズの混在により局所磁場が不均一 となり、NMR シグナルが大きく広幅化するため、観測対象は40 残基程度までの蛋白 質に制限されていた。また、脂質二重膜中の膜蛋白質のように運動性の低下した分子 においては双極子-双極子 (DD) 相互作用が亢進しており、TCS 法において交差飽和 が結合界面に限局されず、結合界面が明確に同定できない可能性が懸念されていた。

#### 転移交差飽和法、MAS、相互作用解析

○とよなが しょう、おおさわ まさのり、よこがわ まりこ、しまだ いちお

これらの問題に対し、局所磁場の不均一性を解消しDD相互作用を減弱することが知られているマジック角回転 (MAS)の適用により、スペクトルを高分解能・高感度化すると同時に、遠位の交差飽和の抑制による明確な結合界面の同定が可能になると考えた。

そこで本研究では、MAS 条件下においてビーズに 固定化した蛋白質と溶液中の蛋白質の間(固液界面)に おける相互作用解析を可能とする NMR 手法を確立す ることを目的とし、試料調製法の開発および TCS 法に 対する MAS の効果の評価を行なった。(Fig. 1)

【方法】解離定数(18 µM)および複合体の立体構造が 明らかとなっている yeast ubiquitin (Ub: 8.6 kDa)と



Fig. 1 MAS(左)および MAS 条件下における試料内部の模 式図(右)

yeast ubiquitin hydrolase 1(YUH1: 26 kDa)の相互作用系を用いた。

#### (1) 固定化担体・固定化方法の検討

固定化担体としてカルボキシメチル (CM) 基にて修飾された多孔性シリカビーズ を用い、ビーズにアミノ基を介して共有結合させた YUH1のUb 結合活性を解析した。 (2) MAS による高感度・高分解能化の評価

ビーズ混在時のUbの<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC スペクトルを MAS 適用時・非適用時に観測し、 Ub 溶液単独の<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC スペクトルとの比較により、感度・分解能を評価した。 (3) 複数の回転速度における TCS 実験の結果の比較

2 mM 均一<sup>2</sup>H,<sup>15</sup>N 標識 Ub 溶液(50 mM NaCl, 50 mM NaPi, pH5.0, 80% D<sub>2</sub>O)にて YUH1 固定化ビーズを平衡化し、NMR 試料とした。25℃ において複数の回転速度に て TCS 実験を行ない、結果を比較した。

【結果】(1) 多孔性 CM シリカビーズに固定化した YUH1 の 90%以上は Ub 結合 活性を保持していることを明らかとした。

(2) MAS の適用により、ビーズ混在試料の感度・分解能が5倍向上した。

ビーズ混在下での Ub の<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC スペクトルの線幅は、MAS により 1/5 に先 鋭化し、縮重していた Ub のシグナルをほぼすべて分離して観測することに成功した。 (3) MAS 条件下の TCS 実験において、Ub の YUH1 結合界面を明確に同定できた。

7.0 kHz および 14.5 kHz の MAS 回転速度において TCS (MAS-TCS) 実験を行った ところ、ともに Ub 上の YUH1 結合界面に交差飽和が観測された。7.0 kHz では結合 界面だけでなくその周辺残基にも交差飽和が観測されたことから、より高速の MAS により DD 相互作用が抑制されることが示唆された。

【考察】本研究にて得られた結果は、MAS により局所磁場の不均一性が解消され るとともに、ビーズへの固定化により亢進した DD 相互作用が減弱されたことを示し ている。BPL は膜蛋白質を高濃度で安定に脂質二重膜中に存在させることができる ため、今回開発した MAS-TCS 法を適用することにより、脂質二重膜中の膜蛋白質の 高感度・高分解能な相互作用解析が可能となった。

#### 新しい NMR 差スペクトル法

### O<<br/>鵜澤 洵<sup>1,4</sup>、久保田由美子<sup>2</sup>、堀 浩<sup>3</sup>、関 宏子<sup>4</sup>、丑田公規<sup>1</sup><br/>理研基幹研<sup>1</sup>、微化研<sup>2</sup>、玉川大生命科学部<sup>3</sup>、千葉大分析センター<sup>4</sup>

#### **New NMR Difference Spectroscopy**

Jun Uzawa<sup>1,4</sup>, Yumiko Kubota<sup>2</sup>, Hiroshi Hori<sup>3</sup>, Hiroko Seki<sup>4</sup> and Kiminori Ushida<sup>1</sup> <sup>1</sup>RIKEN, Advanced Research Institute, <sup>2</sup>Institute of Microbial Chemistry, Tokyo, <sup>3</sup>Dept. Life Science, Tamagawa University, <sup>4</sup>Chemical Analysis Center, Chiba University

#### Abstract

Difference spectroscopy is a powerful method for the selective observation of small changes against dominant but unchanging background. In this presentation, we will cover some difference spectroscopy technique, such as <sup>1</sup>H {<sup>31</sup>P selective} difference, DPFGSE-SPT-difference, DPFGSE-NOE/ROE-SPT-difference spectroscopy methods.

For Q-mucin, we applied <sup>1</sup>H {<sup>31</sup>P sel.} diff. technique , and obtained the information of coupling constants implying the AEP substituted GalNAc at 2 or 3 positions. Also, we applied DPFGSE-ROE-SPT-diff. technique to analyze a branched mannopentose as model of high mannose type N-glycan.

#### 序論

構造解析の主流である X 線回折装置、質量分析装置、NMR 装置の進歩は目覚まし いものがある。これらを比較すると、結晶なら Spring8 を含む X 線結晶回折、微量な らば質量分析となり、NMR の出番はこれらに挟まって減って来ており、高価な装置 を有効に使いきって無い面も見受ける。一方で、結晶化が困難なもの、単離の困難 なもので、生物活性や薬効等で興味深いものでも構造解析が棚上げされているものも 多い。 NMR は他に比べて混合物の解析が詳細にできる特徴を持っている。スペクト ルが重なり合って解析が困難なものについては一次元の差スペクトル法が古くから 使われてきたが、多次元 NMR の発展で影を潜めていた。一次元測定には、測定時間 の短縮と一番知りたいことに焦点を絞れるというメリットがある。

近年、糖鎖および糖タンパク質類の研究はポストゲノム時代を迎えて重要性を増している。とりわけ、リン酸の結合した糖鎖類は生命科学的にも重要であるが、その詳細な構造解析には困難が伴っている。演者らはくらげから抽出したムチン(Q-mucin)の構造研究を行っている。Q-mucin は8個のアミノ酸からなるププチド (-Val-Val-Glu-Thr-Thr-Ala-Ala-Pro-)が数十個タンデムに連なって構成された糖タンパク質である。このペプチド鎖のThr に結合した GalNAc の6位に Amino- Ethyl-Phosphonate(AEP)が結合している化合物が多く存在することがわかった。<sup>1,2)</sup>

キーワード: 差スペクトル、糖鎖、ムチン

うざわ じゅん、くぼた ゆみこ、ほり ひろし、せき ひろこ、うしだ きみのり

本発表では、<sup>31</sup>P デカップリング差スペクトル法や Selective Population Transfer (SPT) 法を捉え直して、ポストゲノムのテーマの一つである糖鎖ならびに糖タンパク 質の構造解析に応用できるような測定法についてまとめたので報告する。差スペクト ル法には宿命的に Bloch-Siegert シフト (BS シフト)があり、これが最も利用価値の 高かった<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H 間の差スペクトル法の普及を妨げたが、<sup>31</sup>P を照射する場合は共鳴周 波数が全く違うので BS シフトが無く、SPT では観測時にデカップリングをしてない ので問題にならない。

本発表では、市販のリン酸が結合した糖および Q-mucin ならびにアスパラギン型糖 鎖の基本的なマンノオリゴ糖を例に、これらの応用例について述べる。

#### 結果と考察

1 BS シフト

NMR の分野における BS シフトは下記の式であらわされる。<sup>3)</sup>

 $\Delta = v_n - v_0 = K / v_{irr} - v_0$ 

ここで、 $\Delta$ は BS シフトの周波数、 $v_n$  は二重共鳴による新しい周波数、 $v_0$  はオリジ ナル共鳴周波数、K は照射周波数強度で( $\gamma B_2/2\pi$ )<sup>2</sup>/2、 $v_{irr}$ は二重共鳴の照射周波数であ る。[1]式によれば、照射周波数が離れていれば BS シフト小さくなり、照射強度が 小さければ BS シフトは小さくなる。最近流行の STD (Saturation Transfer Difference) 法では照射領域をアロマティック領域として BS シフトを避けている。

[1]

2<sup>31</sup>P デカップリング差スペクトロスコピー

今回、<sup>31</sup>P を選択的にデカップリングしてオフレゾナンス部分をデカップリングしたスペクトルとの差をとることにより、複雑に重なり合ったスペクトルからリン酸基の結合した部分のみを特異的に観測する方法を検討した。<sup>31</sup>P のデカップリング差スペクトルでは照射周波数が大きく離れているので BS シフトは問題にならない。



Fig. 1 <sup>1</sup>H {<sup>31</sup>P sel.} diff. spectra of Q-mucin in D<sub>2</sub>O. (1) Original 1D (pre-saturation for HDO).
(2) <sup>31</sup>P irradiation at 22.1ppm. (3) <sup>31</sup>P irradiation at 21.7ppm.

まず市販のリン酸化糖について検討を行い、グルコース1リン酸と6リン酸、マン ノース6リン酸についてはαとβについて個別にデカップリングして6位プロトンの 詳細なスピン結合定数を求めることができた。

Q-mucin について測定した結果を Fig.1 に示す。<sup>31</sup>P の 22.1ppm は Q-mucin の主成分 であり、<sup>1</sup>H の 4.0ppm は GalNAc の 6 位メチレン、3.15ppm と 2.0ppm は AEP のメチ レンである。<sup>31</sup>P の 21.7ppm と結合している <sup>1</sup>H の 4.4ppm は差スペクトルのシフトと パターンから結合部位は 6 位でなく、両サイドのプロトンと trans 結合している位置 に AEP が結合しているのではないかと考えている。

3 DPFGSE SPT 差スペクトロスコピー

SPT 法には、スピン結合により分裂した1本のピークを照射するための照射パワーが非常に弱く選択性が良いことと BS シフトが無いという利点を持っている。<sup>4)</sup>

2004 年に発表された SPT 法 <sup>5)</sup> を基本に、スピン結合で分裂した複数のピークを照 射して差をとる方式に変え、位相回しを再検討することにより 2 倍程度感度を向上さ せることができた。複雑に分裂したピークにこれを適用する場合は注意を要する。 4 DPFGSE NOE/ROE SPT 差スペクトロスコピー

一次元の DPFGSE-NOE/ROE 法は二次元全盛の今日でも小さな NOE/ROE をみるこ とができるので構造解析の分野で定着している。この情報をさらに発展させる目的で、 NOE/ROE により出てきた信号を SPT により、これとスピン結合した相手に伝えるシ ーケンスを考案した。これを Cellobiose-80Ac を例に Fig.2 で説明する。

1-4 結合の糖では1位を照射したときは結合した相手の4位に NOE が(1)のように見られる。この時4位を SPT 照射すると(2)のようにスピン結合した相手の 3位と5位に SPT 信号が見られる。3で述べた Diff-SPT 差スペクトル法では(3) に示すように、SPT のみ感度良く測定できる。1-4 結合ばかりでなく、1-3 結合の糖で も全く同様の考え方で進めることができる。この測定法は NOE/ROE 信号が複数出て、 しかも重なって出た場合にも判別できる。また、アスパラギン型糖鎖の基本骨格を構成する mannose 5 個のオリゴ糖の1-6 結合した部位に関する6位の配座解析に必要な 情報を ROE-SPT 差スペクトルにより、より正確に決めることができた。

ただし、スピン結合定数が大きく化学シフトが近接している場合は解析に困難が伴う。



Structure of Cellobiose-80Ac



Fig. 2 NOE, NOE-SPT-diff, Diff-SPT spectra of Cellobiose-OAc in CDCl<sub>3</sub>.
(1) NOE irr. at 4.50ppm. (2) NOE-SPT-diff; NOE irr. at 4.50ppm and SPT irr. at 3.75 and 3.78ppm. (3) Diff-SPT spectra; SPT irr. at 3.75 and 3.78ppm. (4) Original 1D.

#### 結びにかえて

1 <sup>1</sup>H {<sup>31</sup>P selective} 差スペクトル法ではリン酸結合部位の情報を二次元法に比べて 短時間で得られた。注意深く測定することによりスペクトルパターンから、化学シフ トばかりでなく、糖との結合部位のカップリング情報が得られるという利点がある。 これによって、文献2において帰属不可能であった糖の部分について知見を得た。

2 本発表の DPFGSE\_SPT 差スペクトル法は、オフレゾナンス周波数を照射するのでなく、 もう1本のピークを照射して差をとる方式とし、位相回しを Cyclope 式にして、従来のほぼ2倍 の感度で測定できた。

3 COSY/TOCSY 信号を NOE/ROE に展開して、より詳細な情報を得るための測定法 は開発されてきたが<sup>6,7)</sup>、逆に NOE/ROE 信号を COSY/TOCSY に展開することは、 NOE/ROE 照射のプロトンからの COSY/TOCSY 信号が圧倒的に強く出るため実用的 ではない。今回、NOE/ROE 信号を SPT に展開することで、糖鎖間の結合情報などを 得る測定法として提起したい。

#### References

J.Uzawa, M.Urai, T.Baba, H.Seki, K.Taniguchi and K.Ushida, *J. Nat. Prod.*, **72**, 818 (2009).
 M.Urai, T.Nakamura, J.Uzawa, T.Baba, K.Taniguchi, H.Seki and K.Ushida, *Carbohyd.Res.*, **344**, 2182 (2009).

3 J.D. Mersh and J.K.M. Sanderes, J.Magn.Reson., 50, 289(1982).

4 J.K.M.Sanders and B.K.Hunter, Modern NMR spectroscopy, P-143, Oxford-Univ. Press, 1987.

5 J. Uzawa and S. Yoshida, Magn. Reson. Chem., 42, 1046(2004).

6 M.J.Grandwell, H.Kogelberg and T.A.Frenkiel, J.Magn.Reson., 124, 267(1997).

7 H.Dvorakova, R.Hrabal and L.Knienzo, Magn.Reson.Chem., 38, 738(2000).

低分子リガンド-標的タンパク質の新規エピトープマッ ピング法 〇水越 弓子<sup>1,2</sup>、阿部 綾<sup>1,2</sup>、竹内 恒<sup>2</sup>、嶋田 一夫<sup>2,3</sup>、高橋 栄 夫<sup>2,4</sup> <sup>1</sup>(社)バイオ産業情報化コンソーシアム,<sup>2</sup>(独)産総研・バイオメディ シナル情報研究センター,<sup>3</sup> 東大薬,<sup>4</sup>横浜市大院・生命ナノ

#### A novel epitope-mapping method by NMR

 OYumiko Mizukoshi<sup>1,2</sup>, Aya Abe<sup>1,2</sup>, Koh Takeuchi<sup>2</sup>, Ichio Shimada<sup>2,3</sup>, Hideo Takahashi<sup>2,4</sup>
 <sup>1</sup> Japan Biological Informatics Consortium (JBIC), Tokyo, Japan. <sup>2</sup> Biomedicinal Information Research Center (BIRC), National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Tokyo, Japan. <sup>3</sup> Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo, Tokyo, Japan. <sup>4</sup>Department of Supramolecular Biology, Graduate School of Nanobioscience, Yokohama City University, Yokohama, Japan.

NMR spectroscopy has become an indispensable tool in chemical biology, drug discovery, and structural genomics. To date, a broad range of experiments is available to screen for or to analyze protein-ligand interactions. Among them, the saturation transfer difference (STD) experiment is most widely used for the investigation of protein–ligand interactions. However, there exists a potential problem of STD method that the longitudinal relaxation of ligand protons severely interferes with the derived epitope mapping. In this paper, we propose an alternative and simple approach for epitope mapping, which utilizes the difference between the longitudinal relaxation rates of ligand protons with and without irradiation of target protein protons. We applied this method to some ligand/protein interactions and obtained qualitatively consistent results with the estimated proton density around each ligand proton.

溶液NMR法において、リガンド創薬デザインに供するような構造情報を得る手法としては、これまでSTD(saturation transfer difference)法を活用した、簡便で感度の高いエピトープ解析法が提案されている。しかしながら、薬物分子のような多種の官能基を持つ低分子ではそのプロトン毎の縦緩和時間(T<sub>1</sub>)の差が大きく影響を与えるため、得られたデータの定量性が失われることが問題視されてきた(*J. Magn. Reson*, 2003, 163, 270-276.)。



Figure 1. A schematic representation of longitudinal relaxation of ligand proton (I) in the bound state. Epitope mapping, STD, longitudinal relaxation rates

○みずこし ゆみこ、あべ あや、たけうち こう、しまだ いちお、たかはし ひ でお Fig.1 に模式図で示すように、タンパク質を照射したことによる飽和の影響は、リガンドのプロトンとタンパク質のプロトン間の距離によって変わるとともに、リガンドの各プロトンのT<sub>1</sub>にも影響されるため、T<sub>1</sub>がそれぞれのプロトンで異なるときにはSTDの定量性が著しく損なわれる。このT<sub>1</sub>の影響を排除することができれば、精度の高いエピトープマッピングが可能となり、リガンドベース創薬開発に活用可能な情報が得られることになると考えられる。図1中リガンドプロトンIの緩和機構を式で表すと、

$$\frac{dI_z}{dt} = -R_I I_z - \sum_{S} \sigma_{IS} S_z - \sum_{X} \sigma_{IX} X_z$$

となる。*I<sub>z</sub>、S<sub>z</sub>、X<sub>z</sub>*は、それぞれ核I,S(リガンド内の他のプロトン),X(標的タンパク質のプロトン)の平衡磁化の影響を消去した後のZ磁化である。ここで、*dI<sub>z</sub>/dt*は*I<sub>z</sub>*の時間当たりの変化、右辺第1項はプロトンI本来の縦緩和、第2項はリガンド内の他のプロトンとの交差緩和の総和、第3項は標的タンパク質との分子間交差緩和の総和によるものである。タンパク質の照射時・非照射時の緩和速度の差は、右辺の第3項の分子間の交差緩和の寄与が主となるため、各プロトン固有のT<sub>1</sub>の影響は排除できる。この原理に基づき、複数のリガンド-タンパク質を用いてエピトープマッピングを行った。

標的タンパク質MAPK p38a、およびその低分子リガンドSB203580(MAPK 阻害剤) (Fig. 2a)を用いたエピトープマッピングの結果をFig. 2b に示した。非照射時と照射 時の縦緩和速度の差はH1, H4/5, H6に比べてH2, H3, Meで小さかった。この結果の妥当 性を調べるため、SB203580とMAPK p38の複合体のX線結晶解析座標(PDB code: 2ewa) をもとに、分子間プロトン距離の6乗分の1の総和*Σ(1/r<sup>6</sup>)*を計算した。この*Σ(1/r<sup>6</sup>)*はリ ガンドがタンパク質から受ける交差緩和の影響と比例すると期待される。Fig. 2cに示 す様に、それぞれのプロトンがタンパク質から受ける交差緩和の影響の大小は、NMR による新規エピトープマッピングによる結果から得られたものと良く一致していた。



Figure 2. a; p38 MAPK inhibitor SB203580, b;the experimental result of a novel epitope mapping, c;predicted proton density around inhibitor proton (<10 Å) from PDB code: 2ewa.

事実、複合体の結晶解析から、H1,4,5,6のある二つの芳香環は結合ポケットの奥深 くに入り、H2,3の芳香環はポケット入り口付近に存在していることが明らかとなって いる。本研究で開発した手法によって定量性に優れたエピトープマッピングが可能に なったことで、結合に重要な官能基をより正確かつ簡便に求めることができると期待 される。 常磁性ランタニドプローブ法を用いた薬剤探索

○斉尾智英<sup>1</sup>、小椋賢治<sup>2</sup>、小橋川敬博<sup>2</sup>、横地政志<sup>2</sup>、稲垣冬彦<sup>2</sup> <sup>1</sup>北大生命科学、<sup>2</sup>北大先端生命

#### Paramagnetic lanthanide probe as a tool for drug discovery

 $\circ$ Tomohide Saio<sup>1</sup>, Kenji Ogura², Yoshihiro Kobashigawa², Masashi Yokochi²

and Fuyuhiko Inagaki<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Graduate School of Life Science, Hokkaido University, and <sup>2</sup>Faculty of Advanced Life Science, Hokkaido University

We are developing an NMR ligand screening method, which can rapidly determine the structure of the ligand-protein complex as well as identify the ligand from the compound library. This method exploits the paramagnetic lanthanide probe. The paramagnetic lanthanide ion is attached to the target protein *via* the two-point anchored lanthanide-binding peptide tag. By observing the paramagnetic effects from the <sup>1</sup>H NMR spectrum of the ligand, the ligand that binds to the target protein can be identified. Furthermore, the structure of the ligand-protein complex can be determined by the quantitative analysis of the paramagnetic effects. This method is demonstrated using the Grb2 SH2 domain and its inhibitors, as an example.

【序論】薬剤探索手法の一つである FBDD (Fragment Based Drug Discovery) は、比較 的小さな化合物 (フラグメント) に対するスクリーニングによって結合活性のあるフ ラグメントを探索し、それらを連結 (リンキング) または拡張 (グローイング) する ことでより高活性な化合物を作り出す手法である。NMR は FBDD 初期のフラグメン トスクリーニングで用いられることが多いが、NMR を用いたスクリーニング手法に は、タンパク質側の NMR 信号を観測するものとリガンド側の信号を観測するものの 2 種がある。タンパク質信号を観測する場合、<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC スペクトルなどを用いて リガンド結合に伴うタンパク質信号の化学シフト摂動を評価する。この手法はリガン ドの結合部位に関する立体構造情報を取得できるという利点があるが、一方で安定同 位体標識したタンパク質試料が多く必要であることや NMR 測定時間が長いためにス ループット性が低いという欠点も存在する。リガンドベースの手法では、主にリガン

key words: 常磁性ランタニド, ランタニド結合タグ, リガンドスクリーニング oさいお ともひで、おぐら けんじ、こばしがわ よしひろ、よこち まさし、 いながき ふゆひこ ドの<sup>1</sup>H1次元 NMR 測定を主体とするため比較的高スループットであるが、タンパク 質に対する結合部位の情報を得るのが困難であるという短所もある。そこで我々は、 常磁性ランタニドプローブ法を応用し、スループット性が高く、かつリガンド-タン パク質間の立体構造情報が取得可能なスクリーニング手法の開発に着手した。

【実験・結果】我々は常磁性ランタニドプローブを応用し、ヒット化合物を同定する とともに複合体構造を迅速に決定する次のような NMR スクリーニング手法を考案し

た (Fig. 1)。 ①対象タンパク質にランタ ニド結合タグ (LBT) を導入し、ランタ ニドイオンを固定する。タンパク質の NMR 信号から pseudo-contact shift (PCS) を観測し、磁化率テンソルを決定する。 ②化合物溶液に対象タンパク質を加え、 NMR スペクトルを取得する。 ③ランタ ニドイオンを加え、NMR スペクトルを 取得する。④差スペクトル (②-③) をと ることでヒット化合物由来の NMR 信号 を抽出する。このとき、正符号の信号を 解析することでヒット化合物を同定し、 正負の信号の化学シフト差から PCS の 値を得る。 ⑤PCS に基づいてドッキン グ計算を行うことで、ヒット化合物-タン パク質の複合体構造を決定する。

複合体の立体構造が既知である Grb2 SH2ドメインとその阻害剤をモデルとし、 手法の検証を行った。まず Grb2 に LBT を導入してランタニドイオンを固定し、 Grb2 の PCS に基づいて磁化率テンソル を決定した。次に Tm<sup>3+</sup>、Tb<sup>3+</sup>の 2 種のラ ンタニドイオンを用いて阻害剤の PCS を計 39 個取得し、それらに基づいて構造 計算を行った。その結果、NOE に基づい て構造決定した場合 (1X0N.pdb) と同様 の複合体構造を得た (Fig. 2)。現在は、よ り実際のスクリーニングを近似した系と して、より親和性の低い化合物を用いた 解析を行っている。



Fig. 1 Schematic overview of the lanthanide probe-based ligand screening method



Fig. 2 Structure of Grb2 SH2-inhibitor complex, determined based on PCS (A), and NOE (B).

#### 950 MHz NMRによる蛋白質の<sup>13</sup>C直接観測

○古板 恭子<sup>1</sup>、池上 貴久<sup>1</sup>、藤原 敏道<sup>1</sup>、児嶋 長次郎<sup>1,2</sup> <sup>1</sup>阪大・蛋白研、<sup>2</sup>奈良先端大・バイオ

#### <sup>13</sup>C-direct detection of protein using 950 MHz NMR

OKyoko Furuita<sup>1</sup>, Takahisa Ikegami<sup>1</sup>, Toshimichi Fujiwara<sup>1</sup> and Chojiro Kojima<sup>1,2</sup> <sup>1</sup>Insititute for Protein Research, Osaka University, Osaka, Japan., <sup>2</sup>Graduate School of Biological Sciences, Nara Institute of Science and Technology, Nara, Japan.

<sup>13</sup>C-direct detection NMR experiments are now becoming routinely available for protein researches in solution, thanks to increased sensitivity of NMR due to developments of high-field magnets and cryogenic probes. Here, we measured various <sup>13</sup>C-detected 2D NMR spectra using 950 MHz NMR. A high-quality <sup>13</sup>C-detected 2D NMR spectrum was successfully measured in about five minutes with a 1 mM protein sample. Comparison of the measured <sup>13</sup>C-detected 2D NMR spectra showed that long  $T_1$  and short  $T_2$  period characteristic of high magnetic field clearly affect qualities of spectra.

#### [導入]

超高磁場化や極低温プローブなどによる溶液NMR装置の高感度化に伴い、タンパク 質の<sup>13</sup>C核直接測定が現実的なものとなりつつある。大多数のNMR測定では、<sup>1</sup>H核が その感度の良さから直接観測核として用いられる。しかしながら、<sup>1</sup>H核に高感度をも たらすその γ 値の高さは同時に核スピン緩和を促進するため、高分子量のタンパク質 や、常磁性金属を含むタンパク質では、<sup>1</sup>H核検出は困難となる。<sup>13</sup>C核直接測定は<sup>1</sup>H 核検出が困難な系において、タンパク質の情報を得るための有力な手段となり得る。 本研究では、<sup>13</sup>C核直接観測の実用性を検討するため、950 MHz超高磁場溶液NMR装 置を用いて各種<sup>13</sup>C核直接観測二次元スペクトルを測定し、それらの感度を比較した。 [方法]

すべての測定は、極低温プローブを備えた AVANCEIII 950 MHz NMR装置 (Bruker) を用い、303 Kで行った。サンプルには1 mM <sup>13</sup>C,<sup>15</sup>N標識ユビキチンを用いた。パルス プログラムはBruker標準のものを用いた。シグナル/ノイズ (S/N) 比は、TOPSPIN 2.1 (Bruker)を用いてプロセシングした各スペクトルから、単離した 2 つのピークを選び、 それぞれのS/N比をTOPSPINのSINOコマンドにより求め、それらの平均をとることで 決定した。スペクトル間のS/N比の比較に用いた測定は、積算回数4 (ただし、in-phase antiphase (IPAP)もしくはspin-state-selective excitation (S<sup>3</sup>E) virtual decouplingを含む測定 に関しては2、double IPAP (DIPAP) virtual decouplingを含む測定に関しては1)、パル ス繰り返し時間は1秒で行った。パルス繰り返し時間のS/N比への影響を調べるため の 測 定 は、 IPAP virtual decoupling を 含 む Single Quantum Constant Time evolution(SQCT)-CACOパルス系列を用い、積算回数1で行った。全ての測定において レシーバーゲインの値は統一した。

超高磁場、溶液、<sup>13</sup>C 直接測定

○ふるいた きょうこ、いけがみ たかひさ、ふじわら としみち、こじま ちょう じろう Table 1. S/N ratios of various<sup>13</sup>C-detected spectra.

CACO sequence	S/N
MQ	13.0
SQCT	13.0
SQCT-IPAP	14.3
SQCT-S3E	16.8
COCA sequence	
SQCT	12.1
SQCT-DIPAP	8.9
CON sequence	
MQ	4.2
SQCT	4.4
MQ-IPAP	5.0
SQCT-IPAP	5.0

Table2.S/Nratiosofspectrameasuredwithdifferent repetition delays.

repetition delay S/N	
1 sec.	8.1
3sec.	16.0
5sec.	20.4



Figure 1. <sup>13</sup>C-direct detected SQCT-CACO spectrum with IPAP virtual decoupling of 1 mM ubiquitin measured in about 5 minutes. 1D slice corresponding dotted line in the spectrum is shown at the bottom of the spectrum.

#### [結果と考察]

<sup>13</sup>C核直接観測スペクトルの感度を調べるため、CACO系列(直接観測:C'、間接観 測:  $C^{\alpha}$ ) のMultiple Quantum (MQ)-CACO、SOCT-CACO with or without IPAP or S<sup>3</sup>E virtual decoupling、COCA系列(直接観測: C $\alpha$ 、間接観測: C') のSQCT-COCA with or without DIPAP virtual decoupling、CON系列(直接観測: C'、間接観測: N)の MQ-CON with or without IPAP virtual decoupling, SQCT-CON with or without IPAP virtual decouplingスペクトルを測定した。これらのS/N比をTable 1に示す。CONスペクトルは  $C'-C^{\alpha}$ 相関スペクトルよりも感度が劣っていた。これは、 ${}^{1}J_{C'N}$ は15 Hz、 ${}^{1}J_{C'C_{\alpha}}$ は55 Hz であること、及び<sup>15</sup>N核の v 値が<sup>13</sup>C核より小さいことから、CON系列はC'-C<sup>"</sup>相関系 列よりも磁化移動のための時間が長いからだと考えられる。CACO及びCON系列では、 virtual decouplingを用いることでS/N比が向上した。IPAPより、S<sup>3</sup>Eを用いる方がS/N比 が良かった。これはS<sup>3</sup>Eの方が短時間だからだと考えられる。COCA系列では、直接観 測軸( $C^{\alpha}$ )にC'及びC<sup>β</sup>の2つの核とのカップリングの影響がでるため、virtual decouplingにDIPAP法を用いる必要があるが、これを用いたスペクトルは、用いない ものよりもS/N比が低下していた。これは、DIPAP法が複雑であることと、acquisition までに通常のCTSO-COCAパルス系列に余分の時間が追加されていることが関与して いると考えられる。比較したスペクトルのうち、比較的感度の良かったCTSQ-CACO with IPAP virtual decouplingスペクトルの積算回数を1として測定したところ、およそ 5分間で良好なスペクトルが得られた(Figure 1)。

次にパルス繰り返し時間の S/N 比への影響を検討した。1、3及び5秒に設定し測定 をしたところ、パルス繰り返し時間の増加に伴い S/N 比の向上が見られた(Table 2)。

950 MHz NMR装置で測定した各種<sup>13</sup>C核直接観測スペクトルには、高磁場条件下における長いT<sub>1</sub>と短いT<sub>2</sub>の影響が明らかに現れていた。そのため、従来の<sup>13</sup>C核直接測定パルス系列では高磁場化による感度上昇のメリットが生かしきれないと考えられた。そこで、我々は高磁場条件下における緩和特性に適した高感度化高速化を可能にする新規<sup>13</sup>C核直接観測パルス系列を開発中である。発表では、この新規パルス系列の詳細とタンパク質への応用についてもふれたい。

#### バイオマスの特性とその分解に関わる微生物叢の共相関 解析の試み

○小倉 立己<sup>1</sup>, 伊達 康博<sup>1,2</sup>, 菊地 淳<sup>1,2,3,4</sup> <sup>1</sup>横市大院生命, <sup>2</sup>理研PSC, <sup>3</sup>名大院生命農, <sup>4</sup>理研BMEP

### Correlation analysis of the microbiota responsible for a variety of biomass characters

O Tatsuki Ogura<sup>1</sup>, Yasuhiro Date<sup>1,2</sup>, Jun Kikuchi<sup>1,2,3,4</sup>

<sup>1</sup>Grad. Sch. NanoBio., Yokohama City Univ., <sup>2</sup>RIKEN PSC, <sup>3</sup>Grad. Sch. Bioagri., Nagoya Univ., <sup>4</sup>RIKEN BMEP.

Understanding degradation process of lignocelluloses based on their chemical compositions and structures in soil microbial ecosystems could be contributed for effective use of plant biomass and searching useful bacteria and degradation enzymes. We are attempting an elucidation of the microbial activity of biomass degradation process in soil ecosystems by using the meta correlation analysis based on various factors such as soil types, microbial community, and structures of lignocelluloses. In this study, we focused on analysis of biomass degradation activity in rice paddy soil from rice straw samples pretreated different higher-order structure of lignocelluloses. Obtained time-course NMR data were calculated as principal component analysis for monitoring the metabolic dynamics of microbial ecosystems in soil during its biomass degradation process.

【序論】土壌環境に棲息する多種 多様な微生物は、様々な分解反応 場を形成し、地球科学的に極めて 重要な各種元素の物質循環を担っ ている<sup>1)</sup>。これら土壌微生物叢に よるバイオマスの分解特性に言及 すると、既往研究では不明な点が 多い。一方、植物バイオマスの主 成分で難分解性物質であるリグノ セルロースは、再生可能な有機資 源として現在注目されており<sup>2)</sup>、 リグノセルロースの構造情報に



Fig.1 Illustration of our meta correlation analysis system between biomass characters and their degrading microbiota.

基づいた土壌中微生物分解特性を評価することは、自然環境中におけるバイオマス分 解特性の理解と工学的な応用の両面において重要である。そこで我々は、入力する植 物バイオマス種や高次構造の相違、反応場としての種々の土壌等、多様な因子におけ るメタ相関解析を試みており、その一端として本会では、収穫後に水田環境中で放置 され分解されるイネワラに着目し、物理的破砕条件の違いに基づく水田土壌生態系の バイオマス分解特性の評価を試みた。

微生物叢、バイオマス分解、メタ相関解析 ○ おぐら たつき、だて やすひろ、きくち じゅん 【方法】本研究では物理的破砕条件の違いに基づく水田土壌生態系のバイオマス分 解特性を明らかにするため、バイオマス原料としてイネワラを凍結乾燥し、ミキサー を用いて粗粉砕した。得られたバイオマス粉末は、オートミルやボールミル等を用い て微粉砕処理を施すことにより、バイオマスの立体構造が異なるサンプルを用意した。 これら各々を水田土壌とともに振とう培養を行うことで、水田土壌生態系におけるバ イオマス分解特性を評価した。サンプリングは、時系列的に毎日行い、固体中および 溶液中の微生物叢およびその代謝産物の時系列変化をNMRや分子生態学的解析手法 を用いて計測した。

#### 【結果および考察】

水田土壌微生物叢によって 代謝された溶液中の代謝産物 をNMRにより計測し、得られ たデータをbin化処理により数 値マトリクス化し、PCAを行 った(Fig.2)。スコアプロットの 結果から、代謝産物は時間依存 的に変化していた。またPCAの ローディングプロットから、ボ ールミルにより微粉化された バイオマスを添加した実験系 においては、酢酸、プロピオン 酸がPC1方向に、酪酸がPC2方向 に大きく寄与していた。一方、 微粉砕処理を施していないバイ





**Fig.2**, PCA of 1D-NMR data matrices for degradations of rice straw biomass. (a): Score plot of ball-milling rice. (b): Loading plot of (a). (c): Score plot of blender-cutting rice. (d): Loading plot of (d).

オマスを添加した実験系においては、酢酸がPC1方向に、プロピオン酸がPC2方向に 大きく寄与していた。これらの結果を総合すると、物理的破砕条件の違いによって、 産生される代謝産物に違いが認められた。すなわち、水田土壌中に存在する微生物叢 は、物理的破砕条件の違いに起因して異なる反応場を形成し、異なるバイオマス分解 活性を示すことが明らかとなった。このことは、微粉砕処理を施すことによりバイオ マスの高次構造が壊れ、土壌微生物が利用しやすい状態となったために異なる代謝活 性を示す結果になったと考えられる。

【展望】今回の解析結果から、物理的破砕条件の違いは土壌中微生物叢の分解反応に 影響することが示された。本会ではさらに、高次構造が破壊されたリグノセルロース の分解に関わる有用微生物叢についても解析を行い、今回得られた代謝動態との共相 関性についても議論したい。また、このような微生物叢の解析を行うことで、様々な 既往研究で蓄積された土壌微生物叢に関する知見との統合が図れると期待している。

【参考文献】

- 1) Dorrepaal et al. (2009) Nature 460, 616-619; Taylor et al. (2010) Nature 464, 1178-1181.
- 2) 菊地淳, 植物の生長調節, **43**, 144-155 (2008). 菊地淳ら, *未利用バイオマスの活用技 術と事業性評価*, Sci&Tech.出版 (in press).

### **P7**

### The Orange Domain of Basic-Helix-Loop-Helix Transcription Factor SHARP2 binds to class B E-box sequence

### OMohammed S. Mustak<sup>1</sup>, Riyo Yoshikawa<sup>1</sup>, Kazuya Takahashi<sup>1</sup>, Ojeiru F. Ezomo<sup>1</sup>, Yuta Nakamura<sup>1</sup>, Kazuya Yamada<sup>2</sup>, Shunsuke Meshitsuka<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Regenerative Medicine and Biofunction, Graduate School of Medical Science, Tottori University, 86 Nishi-machi, Yonago 683-8503, Japan. <sup>2</sup>Department of Health and Nutritional Science, Faculty of Human Health Science, Matsumoto University, 2095-1 Niimura, Matsumoto, Nagano 390-1295 Japan

The basic helix-loop-helix (bHLH) proteins that belong to a super-family of DNA binding transcription factors play an important role in development and differentiation of the eukaryotic cells. The SHARP2 belong to the bHLH superfamily of proteins and consists of 411 amino acids with bHLH motif (residues 53-109 amino acids) in the N terminal region, an orange domain (residues 140-184 amino acids) in the central region and a proline rich domain (residues 310-385 amino acids) in the Cterminal region. The E-box sequence (5`-CANNTG-3`) has been identified in promoter and enhancer elements of a number of cell type-specific genes and controls the transcription of these genes in important developmental processes. The basic region, HLH domain and C-terminal of bHLH proteins are known for their DNA binding, dimerization and repression function respectively. However, the function of Orange domain is still unclear. Therefore, the present study was aimed to explore function and structure of the Orange domain of SHARP2. Interestingly, the present NMR, Surface Plasmon Resonance and Gel shift assay results showed that the Orange domain has ability to interact with E-box DNA.

The Orange domain of SHARP2 have sub-cloned into pGEX-2T vector and expressed in BL21 (DE3) bacterial system. The purified proteins were subjected to the NMR spectroscopy and measured the <sup>15</sup>N HSQC to study the binding site of the Orange domain to E-box. The NMR measurements were performed on varion Unity Inova (500 MHz) spectrometer equipped with a triple resonance probe and z-axis pulsed. The side chain and backbone <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N, <sup>15</sup>N, <sup>13</sup>C $\alpha/\beta$  resonances were assigned using a combination of HSQC, TOCSY-<sup>15</sup>N HSQC, HNCACB, CBCA(CO)NH and HNCA, HN (CO)CA experiments.

Orange domain, bHLH transcription factor, E-box binding

To examine the binding site of Orange/E-box DNA sequences, the <sup>15</sup>N HSQC spectrum of <sup>13</sup>C<sup>15</sup>N- Orange domain with and without E-box DNA sequences were measured. The spectra of <sup>15</sup>N-HSQC of Orange domain were compared with E-box orange domain spectra. The few signals appeared and also the enhancement of the peak intensity of <sup>15</sup>N-HSQC spectrum of <sup>13</sup>C<sup>15</sup>N-Orange domain was observed in the presence of E-box DNA (Figure 1). This result indicates that the structure of Orange domain is affected by the binding of E-box DNA and showed the amino acid residues interacting with DNA. The heteronuclear 3D triple resonance NMR experiments were done with <sup>13</sup>C<sup>15</sup>N double-labeled protein to determine the assignments of backbone resonance. The backbone signals  $C_{\alpha}$ ,  $C_{\beta}$ , N and NH of 45 amino acid residues of Orange domain were assigned sequentially using a combination of connection of HNCACB and CBCACONH spectra. The overlaid <sup>15</sup>N-HSQC spectrum of Orange domain with E-box DNA and Orange clearly showed the differences in chemical shift are seen particularly in five amino acids (F3, E22, D26, L32 and V40). This suggests that these residues play important roles in the interaction between Orange domain and E-box DNA. We also observed that orange domain attain stable structure with E-box DNA compared to its native form. Our present results suggest that Sharp2-Orange domain might function as DNA recognition domain in monomeric form and mediate the transcriptional activities.



Fig 1. Conformational effects of E-box DNA binding. (A) <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC spectra of the Orange domain alone and (B) <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC spectra of the <sup>13</sup>C<sup>15</sup>N Orange/E-box DNA (0.8mM) complex at 500 MHz. Conditions: 0.35mM <sup>15</sup>N Orange in 66mM phosphate buffer (pH7.0), 50 mM KCl, 10mM DTT at 25oC. ni =512, nt=32.

### プリオンタンパク質への結合様式による抗プリオン化合物の分類と作用機構の解明

 ○鎌足 雄司<sup>1</sup>、早野 陽介<sup>1</sup>、山口 圭一<sup>1</sup>、武藤(細川) 淳二<sup>1</sup>、 桑田 一夫<sup>1</sup>
 <sup>1</sup>岐阜大学・人獣感染防御研究センター

#### Classification of anti-prion compounds based on the binding properties of prion proteins

 $\bigcirc$ Yuji O. Kamatari<sup>1</sup>, Yosuke Hayano<sup>1</sup>, Kei-ichi Yamaguchi<sup>1</sup>, Junji Hosokawa-Muto<sup>1</sup>, and Kazuo Kuwata<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Center for Emerging Infectious Diseases, Gifu Univ..

To date, a variety of anti-prion compounds have been reported that are effective in *ex vivo* and *in vivo* experiments. However, the molecular mechanisms of most of these compounds are unknown. To understand those mechanisms, we have classified representative anti-prion compounds into several classes according to their binding properties for PrP<sup>C</sup>. Surface plasmon resonance and NMR spectroscopy were used to determine the binding affinities and the binding sites of the compounds, respectively. Generally, compounds were classified into one of three classes. Compounds in the first class, including GN8 and GJP49, bound to the native structure and acted as 'medicinal chaperones' to stabilize the native conformation and prohibit its pathogenic conversion. The second class of compounds, including Congo red, directly bound to PrP<sup>C</sup> and promoted aggregation of the protein, which prevents further conformational change of prion. The third class of compounds did not bind to PrP<sup>C</sup> but may interact with PrP<sup>Sc</sup> or other relevant proteins. The proposed categorization of diverse anti-prion compounds would be useful for understanding the mechanisms of anti-prion compounds as well as facilitating further anti-prion drug discovery.

これまでにex vivoやin vivoの試験により数多くの抗プリオン化合物が報告されて いるが、いまだ確立した治療法は見つかっていない。さらにそれらの作用機構もほと んどのものが不明である。そこで、抗プリオン化合物の作用機構を理解し、新たな治 療薬・治療法を開発するために、我々は正常型プリオンタンパク質(PrP<sup>6</sup>)への抗プリ オン化合物の結合能を調べることにより、これらの化合物の作用機構を明らかにし分 類した。タンパク質と化合物の親和性を求めるために表面プラズモンレゾナンス (SPR)法を、また、結合部位を明らかにするためにNMR法を用いた。一般的に、これら の化合物は3つのタイプに分けられることが分かった(Fig. 1)。一つ目のクラスは、 我々の開発したGN8やGJP49を含む化合物群で、これらはPrP<sup>6</sup>に結合し、天然構造を安 定化する、または、異常構造との相互作用をブロックすることにより、抗プリオン機 構を発揮すると考えられる化合物群(Fig. 2)であり、我々はこれらの化合物を

Prion disease, Prion protein, Anti-prion compounds, Binding site

○ かまたり ゆうじ、はやの ようすけ、やまぐち けいいち、むとう(ほそかわ) じゅんじ、くわた かずお "medicinal chaperones"と呼んでいる。二つ目は、Congo redなどの化合物を含む化合物群で、これらは天然構造と結合し凝集を引き起こすことにより、異常構造 へ変換される前の天然構造のポピュレーションを減らし、抗プリオン機構を発揮す ると考えられる。3つ目は、天然状態とは相互作用しない化合物群で、これらは、 異常構造または、プリオンタンパク質以外のタンパク質と相互作用をすることによ り、抗プリオン作用を示すと考えられる。この抗プリオン化合物の分類は、プリオ ン病の伝播機構の解明や抗プリオン化合物の改良にも役に立つ。



Fig. 1. Working mechanism of anti-prion compounds



Fig. 2. A model of inhibitory mechanism of anti-prion compounds GN8 derivatives.

Musashi1タンパク質-標的RNA複合体に含まれる新た な核酸塩基認識機構 〇大山 貴子<sup>1</sup>、永田 崇<sup>2</sup>、今井 貴雄<sup>3</sup>、岡野 栄之<sup>3</sup>、山崎 俊夫<sup>1</sup>、片 平 正人<sup>4</sup> <sup>1</sup>理研・生命分子システム <sup>2</sup>横市大院・生命ナノシステム <sup>3</sup>慶大・医

⁴京大・エネルギー理工学研究所

### NMR Study of Musashi1 in Complex with Target RNA: The Role of Aromatic Stacking for Specific RNA Recognition

○Takako Ohyama<sup>1</sup>, Takashi Nagata<sup>2</sup>, Takao Imai<sup>3</sup>, Hideyuki Okano<sup>3</sup>, Toshio Yamazaki<sup>1</sup>, Masato Katahira<sup>4</sup>
 <sup>1</sup>SSBC, RIKEN
 <sup>2</sup>Grad. Sch. Nanobiosci., Yokohama City Univ.
 <sup>3</sup>Keio Univ. Sch. Med.
 <sup>4</sup>Inst. Adv. Energy, Kyoto Univ.

Musashi1(Msi1) is strongly expressed in neural stem cells (NSCs) and is concerned to controlling of self renewal and differentiation of the NSCs. Msi1 has two RNA Binding domains (RBD). These two RBDs are prohibiting a translation of Numb protein by binding to 3'-UTR of the *numb* mRNA, then "turn-off" the Notch signaling, which promotes differentiation of NSCs. To search the target sequences of each individual RBD of Msi1, we prepared systematically fragmented RNAs of *numb* mRNA 3'-UTR, and performed titration experiment. We identified target sequences of each RBD. Also we determined the RBD1-r(GUAGU) complex structure by NMR. The complex is stabilized by pi-stacking interactions involving case that two phenylalanine rings sandwich an adenosine ring, and some specific hydrogen bondings between protein and RNA.

Musashi1 タンパク質(Msi1)は神経幹細 胞に強く発現し、神経幹細胞の自己再生 と分化の制御に携わっている。マウス Msi1 は、362a.a.からなる RNA 結合タン パク質で、N 末端側に2つの RNA 結合ド メイン(RBD)を持つ(Fig. 1)。SELEX 法を 用いた標的 RNA 配列の探索から、マウス



Figure 1 Schematic drawing of Msi1 and target RNA sequence.

Musashi, RNA, <sup>13</sup>C- <sup>15</sup>N- filter

○おおやまたかこ、ながたたかし、いまいたかお、おかのひでゆき、やまざきとしお、 かたひらまさと Msi1 は、(G/A)UnAGU (n = 1 to 3)配列に結合することが報告されている(Imai *et al.*)。 マウス *numb* mRNA 3' UTR には、UAGGUAGUAGUUUUA 配列が存在し、この部位が マウス Msi1 の標的部位と考えられている。我々は、この 15mer の RNA を系統的に 6mer RNA に断片化し、RBD1, RBD2 それぞれ単独ドメインにこれらの 6merRNA を添 加する NMR 滴定実験を行った。その結果、r(GUAGU) (numb5)が RBD1 のコンセンサ ス配列であることがわかった。そこで、numb5 と RBD1 との複合体の立体構造解析を NMR を用いて行った。得られた立体構造を Fig. 2A に示す。RBD1 は Gua1, Ura2, Ade3, Gua4 の 4 つの塩基を特異に認識していることがわかった。

Gual は Ser28 側から Trp29 のインドール環にスタッキングし、さらに Trp29 の反 対側から Lys88 の側鎖が Gual のプリン環に近づく構造が得られた(Fig. 2B)。Gual N7 が Trp29 主鎖 NH に接近し、水素結合を形成可能な距離と角度になる。numb5 の添加 に伴い Trp29 主鎖 HN が低磁場シフトを示したことは、Gual N7-Trp29 HN 間の水素結 合形成を支持している。Ade3 は Phe23 と Phe96 にサンドイッチされた構造が得られ た(Fig. 2C)。Phe96 主鎖 HN と Ade3 N1 は立体構造上水素結合可能な位置にあり、ま た、Phe96 主鎖 HN が numb5 の添加に伴い大きな低磁場シフトを示したことから、 Phe96 主鎖 HN と Ade3 N1 間に水素結合が形成されていることが示唆される。この、 2 つの Phe が核酸塩基をサンドイッチする結合様式はマウス Msil の RBD1 の特徴的 な部分であると言えるだろう。Gua4 は Phe65 のベンゼン環とスタッキングし、さら に、Lys21の側鎖末端のアミノ基が Gua4 O4、あるいはN7に近づく構造が得られた(Fig. 2C)。

また、得られた立体構造から、タンパク質主鎖と核酸塩基以外との相互作用として、 Arg61 側鎖末端のグアニジノ基が Ade3 あるいは Gua4 のリン酸骨格と静電相互作用可 能な距離にあることがわかった。

近年、Msil の標的は numb 以外も複数が報告されており、本研究は、Msil が標的とする RNA を認識する機構を理解する上で重要な知見となるであろう。



Figure 2 NMR structure of Msi1 RBD1-numb5 complex. NMR 20 structure ensemble of Msi1 RBD1 - numb5 complex, A. Close-up view of Gua1-Trp29 purine - indole stacking and Gua1-Lys88 interaction, i. Close-up view of Ura2-Ade3-Gua4 and RBD1 binding interface, ii.

乾燥・高塩およびジャスモン酸によって誘導されるイネ根特異 的タンパク質 RSOsPR10の構造機能解析 〇鈴木倫太郎,藤本瑞,土屋渉,山崎俊正 農業生物資源研究所

### Structure and function relationships of rice protein RSOsPR10, which is specifically induced in roots by drought, salt and jasmonic acid

ORintaro Suzuki, Zui Fujimoto, Wataru Tsuchiya, and Toshimasa Yamazaki *National Institute of Agrobiological Sciences, Tsukuba, Japan.* 

Root Specific Oryza sativa Pathogenesis Related 10 (RSOsPR10) is a rice protein which is induced specifically in roots by salt and drought stress. mRNA of RSOsPR10 accumulated upon drought, NaCl, and jasmonic acid, but not by abscisic acid or salicylic acid. We determined the 3D structure of RSOsPR10 both in solution and crystal. The structure of RSOsPR10 resembled other PR10 family proteins and consisted a long C-terminal  $\alpha$ -helix surrounded by a seven-stranded antiparallel  $\beta$ -sheet and two N-terminal short  $\alpha$ -helices between  $\beta$ 1 and  $\beta$ 2 strands. A large hydrophobic pocket was found in the center of the protein. The binding assay against several plant hormones and anti-auxins are also examined.

[序論]

Root Specific Oryza sativa Pathogenesis-Related 10 (RSOsPR10)は、乾燥、塩ストレス、いもち病菌の感染によりイネ根特異的に発現するタンパク質である[1]。RSOsPR10のmRNA は乾燥、NaCl、ジャスモン酸(JA)処理によっても誘導されるが、アブシジン酸(ABA)、サリチル酸によっては誘導されず、ジャスモン酸シグナル伝達経路によって制御されると考えられる。RSOsPR10を過剰発現させることにより、イネでは乾燥耐性が、シバでは塩耐性と乾燥耐性が強くなることが知られているため、ストレス耐性作物の育種への応用が期待されている。しかし、本タンパク質の機能はわかっていない。我々はRSOsPR10の機能解明のため、立体構造とリガンド結合能の解析を行った。

[方法]

RSOsPR10 遺伝子を pET-16b に組み込んだベクターは首都大学東京の小柴恭一教授 より提供を受けた。これを大腸菌株 Rosetta 2(DE3)に形質転換・発現し、菌体破砕後 Ni ア フィニティークロマトグラフィーにより精製、タグを切断・除去の後ゲルろ過を用いて最終精製 とした。NMR 測定は Bruker DMX750 で 30°C、50 mM リン酸ナトリウム緩衝液、pH6、1 00 mM NaCl、5 mM DTT の条件で行った。データプロセス、化学シフト帰属および構造決 定には NMRPipe、Sparky3 および Cyana2.1を用いた。また、RSOsPR10 のリガンド複合 体の X 線結晶構造解析を行った。

イネ、ジャスモン酸、ストレス耐性

○すずきりんたろう, ふじもとずい, つちやわたる, やまざきとしまさ
[結果]

RSOsPR10 は、C 末端のα 3ヘリックスとそれを包む 7 本のβ ストランドからなる逆平行 βシート、および N 末端の短い二つのα1、α2ヘリックスからなる球状タンパク質であり、分 子中央に大きな疎水性ポケットを持っていた。この立体構造は既に構造が報告されている他 の PR10 タンパク質とよく類似していた。また、これらの PR10 タンパク質の立体構造は近年 報告された ABA 受容体と類似している[2]。ただし PR10 ファミリーと ABA 受容体のアミノ 酸配列の相同性は 20~30%と低い。

RSOsPR10 はジャスモン酸シグナル伝達経路により発現が制御されているが、同時に植物ホルモンをリガンドとする可能性があると考え、植物ホルモンおよび抗オーキシンとの結合 試験を NMR により行った。リガンド候補としては JA、ABA、ジベレリン(GA3)、オーキシン (IAA)、ナフタレン酢酸(NAA)、2,4-Dを用いた。リガンド候補の添加による<sup>15</sup>N-HSQCスペ クトルの化学シフト変化は、JA、ABA、NAA、2,4-D で顕著に見られ、分子内部の大きなポケ ットに結合することが示唆された。一方、GA3 ではわずかな変化しか見られず、IAA ではほ ぼ変化しなかった。オーキシン活性を持つ NAA や 2,4-Dに結合するにもかかわらず、IAA に 結合しないことは興味深いが、その生理的な意義は今後の課題である。

RSOsPR10単体では、<sup>15</sup>N-HSQC スペクトルにおいて F23 残基のシグナルが 2 つ観察 されたが、添加による化学シフト変化が顕著であった 4 種の化合物では、F23 のシグナルは 単体におけるマイナーピークに相当する 1 つだけが観察された。F23 は α 1 ヘリックス上にあ り、ポケットの底に位置する。GA3 および IAA では、F23 のシグナルは単体と同様に 2 つ見 られた。以上の結果は JA、ABA、NAA、2,4-D の結合により、F23 のコンフォメーションが固 定されることを示唆している。

さらに、我々はJAとRSOsPR10の複合体の構造を明らかにするために、X線結晶構造解 析を行い、1.6Åの分解能の立体構造を得ることができた。全体の構造は溶液構造および他 のPR10タンパク質とほぼ同様であった。複合体に結合したJAはポケットの底でF23残基 と近接しており、NMRによる結合試験の結果と一致した。

ABA 受容体-ABA 複合体の立体構造では、ABA はα1 ヘリックスとは反対側の、ポケットの入り口付近に結合している。したがって、RSOsPR10 は ABA 受容体とは結合様式が異なることが明らかになった。ABA と RSOsPR10 の複合体の構造は明らかではないが、F23 の挙動から、JA と同様に ABA もまたポケットの底に結合するものと考えられる。

#### [結論]

これまでに様々な植物由来の PR10 たんぱく質についてリボヌクレアーゼ活性、サイトカイ ニンやブラシノステロイドをはじめとする多様なリガンドに対する結合活性、二次代謝酵素活 性などが報告されており、生理機能としても抗菌活性、ストレス耐性が知られている[3]。一部 の PR10 については植物ホルモンシグナル伝達に関与する可能性も指摘されているが、JA、 ABA と相互作用する PR10 の例は本報告が初めてである。RSOsPR10 は根の JA および ABA シグナル伝達において重要な役割を果たしている可能性が高いと考えられる。

#### [引用文献]

- 1. Hashimoto, M. et al. Plant Cell Physiol. 45, 550-559 (2004).
- 2. Miyazono, K. et al. Nature 462, 609-614 (2009).
- 3. Liu, J.-J. & Ekramoddoullah, A.K.M. Physiol. Mol. Plant Pathol. 68, 3-13 (2006).

## IgA1 ヒンジ領域の Pro 残基シス/トランス異性化平衡 への糖鎖付加の影響とその構造的要因

○山崎和彦<sup>1</sup>、成松由規<sup>2</sup>、古川早苗<sup>2</sup>、森井尚之<sup>1</sup>、成松久<sup>2</sup>、 久保田智巳<sup>2</sup>

<sup>1</sup>産総研・バイオメディカル研究部門、<sup>2</sup>産総研・糖鎖医工学研究センター

# Structural basis for the effect of glycosylation on *cis/trans* isomerization of prolines in IgA1-hinge peptide

○Kazuhiko Yamasaki<sup>1</sup>, Yoshiki Narimatsu<sup>2</sup>, Sanae Furukawa<sup>2</sup>, Hisayuki Morii<sup>1</sup>, Hisashi Narimatsu<sup>2</sup>, and Tomomi Kubota<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Biomed. Res. Inst., <sup>2</sup>Res. Cen. Med. Glycosci., AIST, Tsukuba, Japan

Human immunoglobulin A1 (IgA1) possesses a hinge region, connecting the Fab and Fc domains, mostly composed of Ser, Thr, and Pro (VPSTPPTPSPSTPPTPSPS; hinge peptide). Five of the Ser/Thr residues in this region are known to be naturally *o*-glycosylated. Here we investigated the structural changes in the hinge peptide upon *o*-glycosylation by N-acetylgalactosamine (GalNAc), especially focusing on the *cis/trans* isomerization of Pro residues. *Cis/trans* ratios of the Pro residues at the C-terminal side of the glycosylated Ser/Thr were reduced from  $9\sim13\%$  to  $2\sim3\%$  by enzymatic glycosylation, as observed in <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC spectra. Thermodynamic parameters indicated that this decrease is enthalpy-driven. Consistently, hydrogen bonds between the amide group of GalNAc and carbonyl oxygen of the peptide backbone were formed in the *trans* conformers, as revealed by further NMR analyses.

【目的】タンパク質への糖鎖付加については、その機能への影響とは対照的に、構造 への影響は軽微と考えられがちである。実際に、X線結晶解析においては、付加され た糖鎖を酵素切断してから結晶化を行うことが一般的である。本研究で対象とする免 疫グロブリン A1 (IgA1)分子の Fab および Fc の 2 つのドメインをつなぐヒンジ領域 部には約 20残基の Ser、Thr、Pro で構成される特徴的なペプチド配列 (VPSTPPTPSPSTPPTPSPS:ヒンジペプチド)が存在し、Ser および Thr に糖鎖 (GalNAc

がタンパク質と直接結合する)が付加される(Figure 1)。本研究では、本来運動性が

糖鎖、異性化平衡、免疫グロブリン

○やまさきかずひこ、なりまつよしき、ふるかわさなえ、もりいひさゆき、 なりまつひさし、くぼたともみ 高いと考えられるこの領域におい て、糖鎖の付加による構造変化があ るかどうかを調べ、その要因を解明 することを目的とし、特に Pro 残基 の *cis/trans* 異性化に着目した解析を 行った。この領域は Fab と Fc のド メインをつなぐことから、特に主鎖 構造の変化はドメイン間の位置関 係、すなわち分子全体の構造に大き な影響を与えると考えられる。

【方法】非標識もしくは 5、8、10、 13、16 番目の Pro 残基をそれぞれ  $^{13}$ C, $^{15}$ N 標識した IgA1 ヒンジペプチ ドを Fmoc 法による固相合成で調製 した。糖転移酵素 pp-GalNAc-T2 も しくは pp-GalNAc-T10 により GalNAc の付加を行い、逆相 HPLC により 糖ペプチドを精製した。 DMX-500 (Bruker)の装置を用い、



Figure 1: Domains in IgA1 molecule. The hinge region connecting the Fab and Fc domains is mostly composed of Ser, Thr, and Pro. Arrows indicate the naturally occurring *o*-glycosylation sites.

NOESY、TOCSY、ROESY 等の<sup>1</sup>H-NMR スペクトルや<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC、<sup>13</sup>C-filtered ROESY の異種核スペクトル測定を行った。278K~323K の温度で測定した<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC スペクトル上で *cis/trans* 比率を解析した。温度依存性について van't Hoff 解析を行い、比率の 変化に関する熱力学的パラメータを決定した。さらに、重水素交換実験や CNS を用いた立体構造計算により、水素結合形成についての解析を行った。

【結果・考察】<sup>13</sup>C,<sup>15</sup>N標識を行ったPro残基を持つヒンジペプチドの<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQCにお いて、majorコンフォマーとminorコンフォマーを観察した (Figure 2)。TOCSYやROESY スペクトルの解析により、前者をtrans型、後者をcis型と帰属し、HSQCクロスピーク強 度から、両者の存在比率を定量した。糖鎖 (GalNAc)の付加を行ったところ、特に糖 鎖が付加される残基のC末端側に隣接するProにおいて、cis型/trans型の比率が9~13% から2~3%へと大きく減少し、従って、主鎖構造が大きく影響を受けることが明らかに なった (Figure 2, Table 1)。

この比率の温度依存性の解析から熱力学的パラメータを計算した結果、自由エネル ギー変化に対する糖鎖付加の影響( $\Delta\Delta G$ )においては、エンタルピーの寄与( $\Delta\Delta H$ )



Figure 2: (a) *Cis/trans* isomerization regarding the Thr/Ser-Pro peptide bond. (b)  ${}^{1}\text{H}{}^{-13}\text{C}$  HSQC spectra for IgA1 hinge peptide containing a [ ${}^{13}\text{C}$ ,  ${}^{15}\text{N}$ ]Pro residue, with (right) or without (left) enzymatic *o*-glycosylation on Ser/Thr residues. The glycosylation significantly shifts the equilibrium, reducing the *cis* conformers.

Table 1: *Cis/trans* ratio for Pro residues in IgA1 hinge peptides and relevant thermodynamic parameters. HP and glyco-HP stand for hinge peptides without and with GalNAc-glycosylation, respectively. Signs for the thermodynamic parameters are defined for the *trans* to *cis* transition. Ser/Thr residues at the N-terminal sides of Pro5, Pro8, Pro10, and Pro16 are glycosylated in glyco-HP.

		Pro5	Pro8	Pro10	Pro13	Pro16
	HP	0.126	0.092	0.088	0.115	0.095
ratio	glyco-HP	0.022	0.027	0.015	0.051	0.033
	fold decrease	5.7	3.5	6.0	2.3	2.9
∆ <i>G</i> (kJmol <sup>-1</sup> )	HP	4.9	5.9	5.9	5.3	5.8
	glyco-HP	9.7	9.8	10.4	7.7	9.1
	$\Delta \Delta G$	4.8	3.9	4.5	2.4	3.3
∆ <i>H</i> (kJmol <sup>-1</sup> )	HP	2.3	7.3	4.5	3.1	6.3
	glyco-HP	16.7	22.2	18.8	10.8	18.9
	$\Delta \Delta H$	14.5	14.9	14.3	7.7	12.5
∆ <i>S</i> (kJmol⁻¹)	HP	-0.009	0.006	-0.004	-0.007	0.003
	glyco-HP	0.027	0.046	0.031	0.013	0.037
	$\Delta \Delta S$	0.036	0.041	0.036	0.02	0.034

は同符号でより大きいのに対し、エントロピーの寄与(-TAAS)は逆符号でより小さい こと、すなわち糖鎖付加による効果はエンタルピー駆動であることが判った(Table 1)。 これは、*trans*型コンフォマーにおいてのみ新たな水素結合が形成されることで説明で きる。実際に、重水交換実験を行ったところ、*trans*型コンフォマーのGalNAcThrの糖ア ミド基の交換速度が単糖のGalNAcやbenzylGalNAcに比べて1/20程度に減少し、水素結 合形成が示された。さらに、糖ペプチド(*trans*型)のNOEに基づく立体構造解析を行 ったところ、GalNAc-Thr残基においてGalNAcのアミド基とペプチド主鎖のカルボニル 酸素の間に水素結合が形成されうることが示された(Figure 3)。



Figure 3: A hydrogen bond between GalNAc amide proton and peptide backbone oxygen of a GalNAc-Thr residue observed for the *trans* conformer, as revealed by the NMR structure analysis. This restricts  $\psi$  angle and causes steric hindrance in the presumable *cis* conformer.

この水素結合は、GalNAc-Thrのペプチド主鎖のψ角をほぼ固定する。その結果、単純に*cis*型にすると強い立体障害が生じることが、モデル解析によって明らかになった。 すなわち、*trans*型においてのみこの水素結合が形成される。これが、*trans*型を相対的 に安定化させ、*cis*型を減少させる主因となっていると考えられる。

本研究では、IgA1ヒンジペプチドにおいて、糖鎖付加により、Pro残基のcis/trans異 性化平衡が大きくtrans型にシフトすることを明らかにした。これにより、主鎖構造の バリエーションが顕著に減少することとなる。さらに、水素結合形成により、 GalNAc-Thrのψ角も制限を受ける。これらの結果、糖鎖が主鎖構造の自由度を減らし、 ひいてはFabドメインとFcドメインの相対位置に関する自由度も減らすことにより、分 子の全体構造へ影響を及ぼすと結論できる。

【参考文献】

Narimatsu, Y., Kubota, T., Furukawa, S., Morii, H., Narimatsu, H., and Yamasaki, K. (2010) J. Am. Chem. Soc. 132, 5548-5549. "Effect of glycosylation on cis/trans isomerization of prolines in IgA1-hinge peptide"

## Mapping the Interactions of the Intrinsically Disordered p53 Transactivation Subdomains with the TAZ2 Domain of CBP by NMR

○新井宗仁<sup>1,2</sup>, Josephine C. Ferreon<sup>1</sup>, H. Jane Dyson<sup>1</sup>, Peter E. Wright<sup>1</sup> <sup>1</sup>The Scripps Research Institute <sup>2</sup>東大・総文・生命環境

## Mapping the Interactions of the Intrinsically Disordered p53 Transactivation Subdomains with the TAZ2 Domain of CBP by NMR OMunehito Arai<sup>1,2</sup>, Josephine C. Ferreon<sup>1</sup>, H. Jane Dyson<sup>1</sup>, and Peter E. Wright<sup>1</sup> Dept of Molecular Biology, The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA.

<sup>2</sup>Dept of Life Sciences, Grad. Sch. Art. Sci., University of Tokyo, Tokyo, Japan.

Using NMR chemical shift perturbations we show that the isolated AD1 and AD2 binding motifs, derived from the intrinsically disordered N-terminal transactivation domain of the tumor suppressor p53, both interact with the TAZ2 domain of the transcriptional coactivator CBP at two binding sites. Unexpectedly, the site of binding of AD2 on the hydrophobic surface of TAZ2 overlaps with the binding site for AD1, but AD2 binds TAZ2 more tightly. The results highlight the complexity of interactions between intrinsically disordered proteins and their targets. Furthermore, the association rate of AD2 to TAZ2 is estimated to be greater than  $3 \times 10^{10}$  M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>, approaching the diffusion-controlled limit and indicating that intrinsic disorder plus complementary electrostatics can significantly accelerate protein binding interactions.

癌抑制因子p53は細胞周期やアポトーシス誘導を制御しており、ゲノムの守護神と 呼ばれている。p53の転写活性化ドメイン(N末端側の61残基)は天然変性領域であり、 単独では特定の構造を形成していない。この中には2つの活性化ドメイン(AD1と AD2)が存在しており、これらが転写コアクチベータCBPのTAZ2ドメイン等と相互作 用することによって、p53は活性化されることが知られている(文献1-3)。しかし、 p53とTAZ2との相互作用の詳細は未解明であった。そこで本研究では、TAZ2上のど の領域がp53のAD1およびAD2と相互作用するのかを明らかにすることを目的として、 NMR滴定法(化学シフト摂動法)による実験を行った。

TAZ2を<sup>15</sup>Nラベルし、p53 AD1を少量ずつ滴定していき、二次元<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQCスペク トルの変化を測定した結果、fast exchangeでピーク位置がシフトしていく様子が観測 された。しかしピークシフトは直線的ではなく、曲線的であった。特異値分解法で解 析した結果、結合部位が2つ存在するモデルが妥当であることがわかった。そこで、 2サイト結合モデルの滴定曲線へのフィッティング・プログラムを自作して解析した 結果、TAZ2上には2つのAD1結合部位が存在し、解離定数はそれぞれ24 μM と 164 μM であることがわかった。同様に、TAZ2へのp53 AD2滴定実験から、TAZ2上には 2つのAD2結合部位が存在し、解離定数はそれぞれ32 nMと10 μM であることが示さ れた。驚くべきことに、AD1とAD2結合部位は同じサイトであった。このことは、天 然変性蛋白質が関与する相互作用の複雑さを表している。

1サイト結合モデルの場合には、蛋白質濃度よりも極めて小さな解離定数を求める ことは困難である。しかし、様々なシミュレーションを行った結果、2サイト結合モ デルの場合には、10 nM 程度の小さな解離定数であっても、NMR滴定実験でfast exchange を示しうること、および、滴定曲線のフィッティングから正確な解離定数を 求められることが明らかになった。したがって、上記のTAZ2-AD2結合の解離定数は 信頼できる値である。

面白いことに、TAZ2-AD2間相互作用においては、解離定数32 nM という強い結合 であるにも関わらず、fast exchangeによるピークシフトが観測された。線形のシミュレーションから、TAZ2-AD2結合がfast exchange になるための条件は解離速度  $k_{off} > 1000 \text{ s}^{-1}$ であった。このことから、結合速度は  $k_{on} > 3 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ となり、拡散律速 限界に近い値と見積もられた。この値は、これまでに知られている結合速度のうち最 速である。TAZ2は+14の電荷を持つのに対し、p53 AD2は-8の電荷を持っており、非常に強い静電相互作用によって、極めて速い結合反応が実現されたと考えられる。このように素速い結合反応は、天然変性蛋白質の特性の一つかもしれない。

#### 参照文献

- 1. Lee, C.W., Ferreon, J.C., Ferreon, A.C.M., Arai, M., & Wright, P.E. (2010) Graded enhancement of p53 binding to CBP by multisite phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* in press.
- Ferreon, J.C., Lee, C.W., Arai, M., Martinez-Yamout, M.A., Dyson, H.J. & Wright, P.E. (2009) Cooperative regulation of p53 by modulation of ternary complex formation with CBP/p300 and HDM2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106(16): 6591-6596.
- Lee, C.W., Arai, M., Martinez-Yamout, M.A., Dyson, H.J. & Wright, P.E. (2009) Mapping the interactions of the p53 transactivation domain with the KIX domain of CBP. *Biochemistry* 48(10): 2115-2124.

天然変性タンパク質, NMR滴定法, 転写コアクチベータ

○あらいむねひと、じょせふぃんふぇれおん、じぇいんだいそん、ぴーたーらいと

 Major facilitator superfamily トランスポーターLacYの輸送機構の解明

 〇古川 大祐<sup>1</sup>、吉浦 知絵<sup>1</sup>、町山 麻子<sup>1</sup>、湊 雄一<sup>1</sup>、上田 卓見<sup>1</sup>、嶋田 一夫<sup>1,2</sup>

 <sup>1</sup>東大・院薬系

 <sup>2</sup>産総研・バイオメディシナル情報研究センター

## Elucidation of the transport mechanism of the major facilitator superfamily transporter LacY

ODaisuke Furukawa<sup>1</sup>, Chie Yoshiura<sup>1</sup>, Asako Machiyama<sup>1</sup>, Yuichi Minato<sup>1</sup>, Takumi Ueda<sup>1</sup>, and Ichio Shimada<sup>1, 2</sup> <sup>1</sup>Grad. Sch. of Pharm. Sci., the Univ. of Tokyo <sup>2</sup>BIRC, AIST

The major facilitator superfamily (MFS) transporters transport their ligands by alternatively assuming their inward-facing and outward-facing conformations. However, the structure of the outward-facing MFS transporters has not been solved, because of their instability. The outward-facing conformation of lactose permerase (LacY), which belongs to MFS, is stabilized by its binding with Enzyme IIA<sup>Glc</sup> (EIIA). Here, we show that the LacY-binding site on EIIA is the hydrophobic cavity that involves His90, by transferred cross-saturation experiment using LacY reconstituted in rHDL. The loop that connects the N- and C- terminal domains of LacY are also hydrophobic, thus EIIA may bind to this loop and fix the outward-facing conformation of LacY.

【目的】 Major facilitator superfamily (MFS) は、12 もしくは 14 個の膜貫通へリックスを持つ膜ト ランスポーター群であり、腎臓での有 害物質の排出等の重要な役割を担う。 MFS は、リガンド結合部位が細胞外を 向いた状態と細胞内を向いた状態を 交換して、リガンドを輸送すると考え られている。しかし、細胞外を向いた MFS は不安定であり、その構造は解か



れていないため、輸送機構の多くは不明である。ラクトースを輸送する MFS である Lactose permease (LacY) は、細胞外を向いた状態で、蛋白質 Enzyme IIA<sup>GLe</sup> (EIIA) と複合体を形成する (Fig. 1)。したがって、LacY では、EIIA との結合により、細胞

トランスポーター、膜蛋白質、transferred cross-saturation

oふるかわだいすけ、よしうらちえ、まちやまあさこ、みなとゆういち、うえだたく み、しまだいちお 外を向いた状態が安定化されると考えた。そこで本研究では、LacY と EIIA の結合様 式を解明することにより、MFS の輸送機構を明らかにすることを目的とした。

【方法】大腸菌由来 LacY を、大腸菌にて大量発現し、膜画分を抽出した上で、2%DDM で可溶化して、C 末端に付加した His タグを用いて精製した。精製した LacY を、*E. coli* polar lipid と MSP1E3 を用いて、rHDL へ再構成した (LacY-rHDL)。Native-PAGE およ び抗 His-tag 抗体を用いた western blotting により、LacY が rHDL に再構成されたか どうかを調べた。加えて、蛍光リガンドである 4-nitrophenyl-α-D-galactopyranoside (NPG) との結合を競合阻害した際の、蛍光強度の変化を用いて、調製した LacY-rHDL のリガンド結合活性を調べた。

大腸菌由来 EIIA を、大腸菌にて大量発現し、陰イオン交換カラム、ゲルろ過カラ ムを用いて精製した。ITC を用いて、得られた EIIA と LacY-rHDL との解離定数を算出 した。さらに、EIIA の LacY 結合界面を同定するために、EIIA と LacY-rHDL の間の transferred cross-saturation (TCS) 実験を行った。

【結果および考察】発現条件や rHDL 再構成の条件を 最適化した結果、最終的に、1 L の培地から、4.5 nmol の LacY-rHDL が得られた。調製した LacY-rHDL を native-PAGE および western blotting により解析し た結果、空の rHDL と同等の泳動度を持ち、LacY を 含むバンドが観測された。したがって、LacY が rHDL 内に組み込まれたことが示された。また、NPG との 結合を競合阻害した際に蛍光強度が上昇したので、 調製した LacY-rHDL はリガンド結合活性を保持して いることが示された(Fig. 2)。

ITC 実験により、LacY-rHDL と EIIA の結合に伴う 吸熱が観測され、両者の解離定数が 170 nM である ことが示された。

TCS 実験を行った結果、F41、F77、F88、H90 など、 疎水性に富む H90 近傍溝に位置する、立体構造上連



Fig. 2 Ligand binding activity of LacY-rHDL. Solid and dashed lines show the emission spectra of the fluorescence ligand NPG before and after adding the competitive ligand (TDG), respectively.

続する残基に有意な強度減少が観測され、LacY 結合界面であることが示された(Fig. 3)。LacY のN末端とC末端の両ドメイン間をつなぐループにも疎水性残基に富む領域が存在することから、EIIA は、このドメイン間ループと結合することにより、LacY



を外向きの構造に安定化する のではないかと考えた。現在、 アミノ酸選択的 TCS および PRE 実験による、LacY 側の結 合部位の同定を試みている。

Fig. 3 Determination of the LacY-binding site on EIIA by TCS. The residues with intensity ratio > 0.2 and >0.15 are shown in black and gray, respectively.

## 細胞質ダイニンの微小管親和性制御機構の解明

○宝田 理<sup>1</sup>、西田 紀貴<sup>1</sup>、梅本 良<sup>1</sup>、吉川 雅英<sup>2</sup>、嶋田 一夫<sup>1,3</sup>
 <sup>1</sup>東大・院薬系、<sup>2</sup>東大・院医系、
 <sup>3</sup>産総研・BIRC

### Structural Mechanism for the Affinity Regulation of Cytoplasmic Dynein

 $\bigcirc$ Osamu Takarada<sup>1</sup>, Noritaka Nishida<sup>1</sup>, Ryo Umemoto<sup>1</sup>, Masahide Kikkawa<sup>2</sup>, Ichio Shimada<sup>1, 3</sup>

<sup>1</sup>Grad. Sch. Pharm. Sci., The Univ. of Tokyo, Tokyo, Japan. <sup>2</sup>Grad. Sch. Med., The Univ. of Tokyo, Tokyo, Japan. <sup>3</sup>BIRC, AIST

Cytoplasmic dynein is a motor protein that uses ATP to power the movement toward the minus end of microtubules (MTs). It has been considered that the microtubule-binding domain (MTBD) of dynein changes its affinity for MT by altering the association mode of the neighboring coiled-coil helices. However, the structural mechanism of the affinity regulation of MTBD remains elusive. Here, we analyzed conformational changes of MTBD, using mutants where disulfide bonds introduced in MTBD are utilized for locking the association mode of the coiled-coil. We made two mutants, termed MTBD-High and MTBD-Low, which showed high and low the affinity for MT, respectively. We examined the difference in the conformation and identified the MT-binding site of MTBD-High and MTBD-Low by NMR. Based on these results, the mechanism for the affinity regulation of the MTBD is discussed.

【背景・目的】

細胞質ダイニンはATP加水分解のエネルギーを利用して微小管上を細胞膜側の+端 から中心体方向の一端に向かって運動するモータータンパク質である。細胞質ダイニ ンの微小管結合ドメイン(MTBD)は逆平行のコイルドコイル鎖を介してATPaseドメイ ンと連結されており、ATPの結合および解離と連動してMTBDの微小管親和性が変化す ることで、微小管上の連続的な運動が達成される。これまでの研究から、MTBDの微小 管親和性はコイルドコイル鎖の会合状態の変化によって制御されると考えられてい る。例えば、異なる長さのコイルドコイル鎖を含むMTBDをSRS (Seryl tRNA Synthetase) のコイルドコイル鎖に融合することで、MTBDの微小管親和性を高親和性および低親和 性状態に制御できることが示されており、また低親和性状態を反映するSRS融合MTBD の結晶構造が明らかとなっている。しかし、高親和性状態の構造はいまだ不明であり、 コイルドコイル鎖の会合状態の変化がどのような構造変化をMTBDに誘起するのかは 解明されていない。本研究では、コイルドコイル鎖間にS-S結合を導入して親和性を 制御したMTBDを作製し、それらの構造をNMR法を用いて解析することにより、MTBDの 親和性制御機構を解明することを目的とした。

細胞質ダイニン、親和性制御、TCS実験

○たからだ おさむ, にしだ のりたか, うめもと りょう, きっかわ まさひで, しまだ いちお

#### 【材料と方法】

本研究では酵母由来細胞質ダイニンの MTBD とコイルドコイル鎖の一部を含む 137 残基の領域(MTBD137)を大腸菌により発現し解析に用いた。SRS 融合 MTBD の結晶構造 を参考に、MTBD137 のコイルドコイル鎖間で近接する疎水性残基対に Cys 変異を導入 した変異体を複数作製した。コイルドコイル鎖間の S-S 結合形成は SDS-PAGE により 確認した。得られた変異体の微小管親和性は、超遠心を利用した微小管共沈実験によ り算出した。NMR による構造解析では、三重共鳴法により主鎖連鎖帰属を行い、変異 体間で<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC スペクトルの比較を行った。また、各変異体の微小管結合部位を、 当研究室が開発した転移交差飽和(TCS)法を用いて解析した。

#### 【結果と考察】

コイルドコイル鎖間にS-S結合の形成が確認されたMTBD変異体の微小管との親和性 を測定したところ、MTBD137と同程度の高い親和性(Kd≒10 uM)を示す変異体と、親和 性が大きく低下した(Kd>100 uM)変異体が得られた。これらの変異体をMTBD-High, MTBD-Lowと呼び、以後の解析に用いた(Fig. 1(a))。

まず転移交差飽和(TCS)法を用いて、各変異体の微小管結合界面を同定した。その 結果、MTBDを構成する6つのヘリックス(H1~H6)のうち、H1は両方の変異体で結合界 面として検出され、H3はMTBD-Highでのみ界面として検出された(Fig. 1(b, c))。次 にMTBD-HighとMTBD-Low間の立体構造の違いを<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQCの化学シフト差に基づいて 解析した。その結果、S-S結合を導入したコイルドコイル鎖(CC1, CC2)近傍のみなら ず、MTBD全体にも化学シフト差が観測された。特にTCS実験で微小管との相互作用す ることが示されたH1とH3に着目すると、両者に共通する界面であるH1に大きな化学シ フト差を示す残基が観測された(Fig. 1(d))。

以上の結果から、コイルドコイル鎖の会合状態の変化によってMTBDのH1の構造変化 が誘起され、H3を含めた新たな微小管結合面を形成することで、低親和性状態から高 親和性状態に移行する仮説が示された。現在、より詳細な微小管親和性制御機構を解 明するために、MTBD-HighとMTBD-Lowの立体構造決定が進行中である。



Fig. 1 NMR analysis of the MTBD constructs with high and low affinity for MT

(a) A ribbon diagram of the model structure of MTBD137 based on the crystal structure of the mouse SRS-MTBD. The position of S-S bonds of MTBD-Low and MTBD-High are indicated. (b, c) Plots of signal intensity ratio of TCS experiments (b) MTBD-High and (c) MTBD-Low. (d) A plot of the chemical shift difference  $(\Delta)$  between MTBD-High and Low.  $\Delta = (\delta H^2 + (\delta N/6.5)^2)^{1/2}$ 



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

○花島 知美<sup>1</sup>, 浜津 順平<sup>1</sup>, 池谷 鉄平<sup>1</sup>, 三島 正規<sup>1</sup>,
 Peter Güntert<sup>2</sup>, 白川 昌宏<sup>3</sup>, 伊藤 隆<sup>1</sup>
 (<sup>1</sup>首都大院・理工, <sup>2</sup>Frankfurt大, <sup>3</sup>京大院・工)

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

○Tomomi Hanashima<sup>1</sup>, Junpei Hamatsu<sup>1</sup>, Teppei Ikeya<sup>1</sup>, Masaki Mishima<sup>1</sup>, Peter Güntert<sup>2</sup>, Masahiro Shirakawa<sup>3</sup> and Yutaka Ito<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Dept. of Chem., Tokyo Metropolitan Univ., <sup>2</sup> Inst. of Biophysical Chemistry and Center for Biomolecular Magnetic Resonance, J. W. Goethe-Univ. Frankfurt, <sup>3</sup>Dept. of Eng., Univ. of Kyoto)

Recent developments in NMR hardware and methodology have enabled the measurement of high-resolution heteronuclear multi-dimensional NMR spectra of macromolecules in living cells (in-cell NMR). With this method, we recently reported the world's first 3D protein structure calculated exclusively on the basis of information obtained in living cells.

In this presentation, as an another demonstration of our strategy for protein structural analyses *in vivo*, we report in-cell NMR studies of *Streptococcus* protein G B1 domain (GB1) overexpressed in *E. coli* cells. While backbone resonances were completely assigned, side-chain assignment suffers from low sensitivity of triple-resonance NMR spectra, thus requires additional experiments, which presumably due to lower expression level of GB1 in *E. coli*. Methyl-selectively protonated samples as well as  ${}^{13}C/{}^{15}N$ -labelled samples were used for the collection of NOE-derived distance restraints. Structure calculations are in progress.

「序】

細胞内の蛋白質の構造やダイナミクスを高分解能で測定することが可能な in-cell NMR という手法が注目されている. わたしたちは既に in-cell NMR を用いて生細胞内蛋白質の 世界初の高次構造解析を試み,大腸菌内で発現させた高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 由来蛋白質 TTHA1718(66 a.a.)の高分解能構造を得た [Sakakibara *et al. Nature* (2009) and Ikeya *et al. Nat. Protoc.* (2010)]. 本研究では, わたしたちの手法の次なる応用例として, *Streptococcus* protein G B1ドメイン(57 a.a., 以 下 GB1 と略)をターゲット試料とし in-cell NMR による構造解析を試みた.

キーワード: In-cell NMR, 異種核多次元NMR, 立体構造

○はなしま ともみ, はまつ じゅんぺい, いけや てっぺい, みしま まさき, ペーたー ぎゅんたーと, しらかわ まさひろ, いとう ゆたか 【実験,結果および今後の展望】

GB1 の大腸菌内大量発現系を用いて細胞内試料を調製し,測定を行った.前例の TTHA1718 細胞内試料の試料管内蛋白質濃度(3-4 mMと推定)と比較してGB1の発現 量は少なく,細胞内試料の試料管内蛋白質濃度は 1 mMを下回ると推定される.

主鎖及び側鎖 NMR シグナルの帰属のため、<sup>13</sup>C/<sup>15</sup>N 均一標識した細胞内試料につい て、TTHA1718 の際と同様の 9 種の 3 重共鳴 3 次元 NMR 測定を非線形サンプリング法 を用いて行い、2D 最大エントロピー法で処理することによってスペクトルを得た.全ての主 鎖シグナルの帰属が完了したが(Figure 1)、(TTHA1718 と比べて低い蛋白質濃度が原 因と考えられるが)側鎖シグナルの解析は困難であった.現在さらに追加の 3 重共鳴 3 次元 NMR 測定と解析を行っており、可能な限り多数の側鎖シグナルの帰属を目指している.

NOE 由来の距離情報の収集については、まず<sup>13</sup>C/<sup>15</sup>N 標識細胞内試料について 3D <sup>13</sup>C or <sup>15</sup>N-separated NOESY スペクトルの測定を行った.また、Ala/Ile/Leu/Val 残基のメチル基選択的<sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C 標識を行った細胞内試料を調製し、3D <sup>13</sup>C/<sup>13</sup>C-separated HMQC-NOE-HMQC スペクトルを測定することで、メチル基間の距離構造情報の選択的取得も行った.3D NOESY スペクトルの測定の際にも、非線形サンプリング法を適用することによって、短時間で感度・分解能とも良好なスペクトルの取得に成功した.現在 NOE 情報の解析を進めており、発表では詳細な高次構造決定を報告する予定である.1 mM を下回る濃度での構造解析が可能となれば、in-cell NMR の応用範囲の拡大が期待できる.



Figure 1

**a**. 2D  ${}^{1}\text{H}{}^{15}\text{N}$  HSQC spectrum of the  ${}^{13}\text{C}/{}^{15}\text{N}{}^{16}\text{N}{}^{16}\text{B1}$  in living *E.coli* cells. Cross peaks are labelled with their corresponding backbone assignments.

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

## **転移交差飽和法を用いたインスリンーインスリン受容体** の相互作用解析 〇中村 壮史<sup>1,2,3</sup>、高橋 栄夫<sup>3</sup>、高橋 三雄<sup>1</sup>、榛葉 信久<sup>1,2,3</sup>、 鈴木 榮一郎<sup>1,2</sup>、嶋田 一夫<sup>3,4</sup> <sup>1</sup>味の素ライフ研、<sup>2</sup>バイオ産業情報化コンソーシアム、<sup>3</sup>産総研BIRC、 <sup>4</sup>東大薬

## **Direct Determination of the Insulin-Insulin Receptor Interface Using Transferred Cross-Saturation Experiments**

○Takefumi Nakamura<sup>1, 2, 3</sup>, Hideo Takahashi<sup>3</sup>, Mitsuo Takahashi<sup>1</sup>, Nobuhisa Shimba<sup>1, 2, 3</sup>, Ei-ichiro Suzuki<sup>1, 2</sup>, Ichio Shimada<sup>3, 4</sup> <sup>1</sup>The Institute of Life Sci., Ajinomoto Co. Inc., <sup>2</sup>JBIC, <sup>3</sup>BIRC, AIST, <sup>4</sup>Grad. Sch. of Pharm. Sci., the Univ. of Tokyo

Insulin initiates metabolic control by binding to the insulin receptor (IR) on target cells. Kinetic and mutational analyses have revealed two binding sites on the insulin molecule and the residues that compose them. However, direct determination of the insulin-IR interface is required to distinguish those residues that contribute to receptor binding from those required for structural stability. Here, we successfully characterized one binding site using the NMR transferred cross-saturation (TCS) method, which can directly determine the binding interface of a large protein-protein complex. The results showed that this binding site contained three residues that have not been identified previously by mutational analyses. Based on the structure of the contact site, we also identified a molecule that can displace insulin from the IR.

インスリンは21残基のA鎖と30残基のB鎖からなるペプチドホルモンであり、糖、タンパク質、脂質の代謝に関与している。インスリンは亜鉛を抱合した安定な六量体として膵臓に保存されるが、血中では単量体としてその機能を発現する。一方、インスリン受容体(IR)は細胞外に存在する135 kDaのα鎖2本と膜貫通部位を含む95 kDaのβ鎖2本からなり、α鎖にインスリンが結合すると構造変化を引き起こし、β鎖細胞内のチロシンキナーゼ領域が活性化することによりシグナル伝達を開始する。

インスリンとIRとの相互作用は、糖尿病治療薬創製の対象として、これまでに部位 特異的変異法や化学修飾法、動態解析法などによって研究されてきた。その結果、イ ンスリンはIRに結合した際に構造変化を生じることや、インスリンは2つの結合面に よってIRと相互作用することが明らかとなっている。しかし、インスリンの結合残基 やIRとの相互作用様式については、いくつかの仮説が提唱されてはいるものの、未だ にその詳細は解明されていない。

インスリンとIRとの相互作用解析を困難にしている原因として、インスリンは疎水 性のコアを有する難溶性の球状タンパク質であること、IRは巨大な不溶性の膜タンパ ク質でありインスリンとの複合結晶が得られていないこと、などが挙げられる。本研 究では、これらの課題を克服するため、近年我々が開発したNMR転移交差飽和法(TCS) <sup>(1)</sup>を用いることにした。TCSでは、リガンド分子へ相互作用部位を検出するための部 位特異的変異や化学修飾を導入する必要がないことから、結合に寄与する残基のみを 同定することが可能である。また、解離状態にあるリガンド分子のみを検出すること から、レセプター分子を多量に調製し、複合結晶を得る必要もない。TCSのこれらの 特長は、インスリンとIRとの相互作用を解析するには適した実験方法であるといえる。

我々はインスリン-IRの相互作用をTCSにて解析するにあたり、まず可溶性の試料 を調製した。すなわち、インスリンについては生物活性を保持することが確認されて いる可溶性インスリン<sup>(2)</sup>として調製し、IRについてはインスリンとの相互作用が野 生型とほぼ同等であることが知られているFcキメラ(IRFc)<sup>(3)</sup>を構築した。次に、 TCSについては検出感度を高めるため、側鎖にメチル基または芳香環を含む残基をプ ローブとして検出する方法<sup>(4,5)</sup>を適用した。可溶性インスリンはA鎖とB鎖を合わせ て50残基からなるが、この方法においては最大17残基についての相互作用情報を測定 することができる。実験の結果、可溶性インスリンの5残基がIRFcとの相互作用に関 与していることが明らかとなった。また、このうちの3残基(TyrA14、LeuB6、および ValB18)は、これまでにIRと相互作用することが知られていない残基であることも明 らかとなった。

次に、TCSにて得られた5残基のうち、立体構造上の位置関係をもとに3残基(LeuA13、 TyrA14、およびLeuB17)をファーマコフォアとして設定しデータベース検索を行った ところ、約500種類の化合物を得るに至った。このうちの59種類の化合物についてイ ンスリンのIRFcに対する阻害活性をシンチレーション近接法により評価したところ、 インスリンとIRFcとの相互作用を阻害する化合物を得ることができた。

[参考文献]

- (1) Nakanishi, T. et al. J. Mol. Biol. 2002, 318, 245-249.
- (2) Olsen, H.B. et al. *Biochemistry* 1996, 35, 8836-8845.
- (3) Bass, J. et al. J. Biol. Chem. 1996, 271, 19367-19375.
- (4) Takahashi, H. et al. J. Biomol. NMR 2006, 34, 167-177.
- (5) Nakamura, T. et al. J. Med. Chem 2010, 53, 1917-1922.

相互作用、受容体、インスリン

○なかむら たけふみ、たかはし ひでお、たかはし みつお、しんば のぶひさ、 すずき えいいちろう、しまだ いちお



Figure 1. The side chains with intensity loss in the TCS experiments are shown in red and the other are shown in gray. Underlines represent the three residues that have not been identified previously by mutational analyses.

## 気孔密度を正に制御するストマジェンの構造解析

 ○ 竹内 誠<sup>1</sup>、菅野 茂夫<sup>2</sup>、嶋田 知生<sup>2</sup>、西村 いくこ<sup>2</sup>、 森 正之<sup>3</sup>,<sup>4</sup>、大木 進野<sup>1</sup>,<sup>4</sup>
 <sup>1</sup>北陸先端大学院大,<sup>2</sup>京大理,<sup>3</sup>石川県立大,<sup>4</sup>JST先端計測

## Structural analysis of stomagen: a positive regulator of stomatal density

OMakoto Takeuchi<sup>1</sup>, Shigeo S. Sugano<sup>2</sup>, Shimada Tomoo<sup>2</sup>, Ikuko Hara-Nishimura<sup>2</sup>, Masashi Mori<sup>3</sup>, <sup>4</sup>, Shin-ya Ohki<sup>1</sup>, <sup>4</sup>

<sup>1</sup>Japan Advanced Institute of Science and Technology, Ishikawa, Japan.

<sup>2</sup>Graduate School of Science, Kyoto University, Kyoto, Japan.

<sup>3</sup>*Reserch Institute for Bioresources and Biotechnology, Ishikawa Prefectural University, Ishikawa, Japan.* 

<sup>4</sup>*Japan Science and Technology Agency-SENTAN.* 

Stomata are small pores on the surfaces of leaves and stalks in plants. They exchange gases, such as water vapor and  $CO_2$ , in and out of plants for photosynthesis. No positive regulator of stomatal development had been reported, although several negative regulators are already known. Recent studies have identified a first positive regulator, stomagen (1, 2). Stomagen is a 45-residue peptide containing six Cys residues. To study structure-function relationship of stomagen, we tried NMR experiments. For the NMR study, stable-isotope labeled samples were prepared by using plant cells with inducible virus vector system. In this presentation, we will report the structure of stomagen and discuss the functional mechanism.

【序論】

植物の気孔は光合成のために水蒸気や二酸化炭素を通す働きをする小さな孔である。この気孔の数は光などの環境的な外的要因の他に植物個体の産生する生体物質によっても制御されている。気孔の数を負に調節する(=減らす)因子は数種類知られていたが、正の調節因子は長い間不明であった。ごく最近、気孔の密度を正に調節するペプチドが初めて発見された。このペプチドは6つの Cys を含む計 45 アミノ酸残基からなり、ストマジェンと命名された(1)。ほぼ同時期に、ストマジェン分子内の3組のジスルフィド結合の組合せが決定された(2)。このように気孔の数の制御機構の分子レベルでの研究は、まだ始まったばかりである。

我々はこのストマジェンの構造-機能相関を NMR で研究することにしたが、既存の 大腸菌や酵母の発現系では試料を作製できなかった。そこで、我々が開発した植物培 養細胞とウイルスベクターを用いた試料調製システムを使って安定同位体標識され たストマジェンを調製し、NMR による構造解析を試みた。

### structural analysis, differentiation of stomata, plant cell

○たけうちまこと,すがのしげお,しまだともお,にしむらいくこ,もりまさし,お おきしんや

#### 【実験】

ストマジェンをコードしている遺伝子を組み込んだトマトモザイクウイルス由来 のウイルスベクターをタバコ培養細胞(BY-2)に取り込ませた(1,3)。安定同位体標識 試薬を含む液体培地で培養細胞を増殖させた後、ホルモン添加によってストマジェン を発現誘導した(4)。誘導後3日目の細胞を回収し各種生化学的な手法でストマジェン を精製した。また、受託合成したストマジェンのリフォールディングと精製を行った (1)。これらのサンプルを用いて立体構造解析に必要な各種NMRデータを取得した。NMR 測定にはBruker AVANVE III 800を用いた。得られたデータをNMRPipeで処理し、 NMRViewJで解析した。立体構造計算にはXplor-NIH(ver. 2.21)を使用した。

【結果・考察】

図1に示したようにストマジェンは良好な<sup>15</sup>N-HSQCスペクトルを与えた。主鎖シグナルの帰属の結果をもとにCSIを利用して2次構造を予測したところ、2本のβストランドがあることが推定された。NOEデータからこれら2本のβストランドがシートを形成していることが示された。また、異種核NOE実験の結果より、N末端側には運動性が大きい領域が存在することも明らかになった。現在、立体構造の精密化を行っている。ポスターでは立体構造の詳細と作用機序のモデルを発表する。

【参考文献】

- 1) Sugano, S. S., Shimada, T., Imai, Y., Okawa, K., Tamai, A., Mori, M. and Hara-Nishimura, I. (2010) *Nature* **463**, 241-244.
- 2) Kondo, T., Kajita, R., Miyazaki, A., Hokoyama, M., Nakamura-Miura, T., Mizuno, S., Masuda, Y., Irie, K., Tanaka, Y., Takada, S., Kakimoto, T. and Sakagami, Y. (2010) *Plant Cell Physiol.* 51, 1-8
- Dohi, K., Nishikori, M., Tamai, A., Ishiwaka, M., Meshi, T. and Mori, M. (2006) Arch. Virol. 151, 1075-1084.
- 4) Ohki, S., Dohi, K., Tamai, A., Takeuchi, M. and Mori, M. (2008) *J. Biomol. NMR* **42**, 271-277.



Fig. 1. <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC spectrum of STOMAGEN at 25°C.

### 疎水性コア安定化によるシトクロム c の熱安定性の 増大と機能調節

〇太 虎林、入江清史、長友重紀、山本泰彦 筑波大院数物

## Enhancement of thermostability and control of redox activity of cytochrome *c* through stabilization of its hydrophobic core

OHulin Tai, Kiyofumi Irie, Shigenori Nagatomo, and Yasuhiko Yamamoto Dept. of Chem., Univ. of Tsukuba

Thermophile *H. thermophilus* cytochrome  $c_{552}$  (HT) and mesophile *P. aeruginosa* cytochrome  $c_{551}$  (PA) are small monoheme-containing electron transfer proteins, which exhibit high sequence identity (56 %) to each other, and their main-chain folding is almost identical. But HT is much more stable than PA. A detailed comparison of the protein interior between them highlighted sizable differences in packing among amino acid side chains, and site-directed mutants of PA, for which amino acid substitutions were selected with reference to corresponding residues in HT, exhibited thermostabilities between those of the two proteins. We extended our efforts to stabilize the heme pocket of HT by an amino acid substitution, V28I, in order to design and prepare proteins even more thermostable than HT. The study demonstrated that Ile improved the hydrophobic packing of heme pocket by the additional methyl group, leading to the enhancement of the thermostability of HT.

**【背景・目的】**好熱性水素細菌(Hydrogenobacter thermophilus)シトクロム $c_{552}$ (HT)の変性 温度( $T_m$ )は、酸化型と還元型でそれぞれ109.8、129.7 °C である。一方、HT の相同タンパ ク質である緑膿菌(Pseudomonas aeruginosa)シトクロム $c_{551}$ (PA)の $T_m$ は、酸化型の場合 HT より28 °C も低い。私共は、両者のアミノ酸配列の違いに着目し、PAのアミノ酸をHT での対応するアミノ酸に置換した一連の人工変異体の研究を通して、タンパク質の熱安定性 発現機構と酸化還元電位( $E_m$ )調節機構の解明を行ってきた<sup>[1]</sup>。本研究では、これまでの研

究から得られた知見に基づき、ヘム活性部位周辺 の原子パッキングをより密にすることで、野生型 HT より熱安定性の高いタンパク質の創製を試み た。HT の X 線結晶構造解析により<sup>[2]</sup>、ヘム近傍 の疎水性コアの中心に存在する Val28 の周囲には、 比較的大きな空隙が存在することが示されている ことから (Fig. 1)、この空隙を埋めて疎水性コア を安定化すれば、タンパク質の熱安定性はさらに 増大すると期待される。そこで、Val28 を lle また は Leu に置換した変異体 (V28I, V28L)を調製し、 タンパク質の  $T_m$ や  $E_m$ に及ぼす影響を解析した。



Fig. 1 Void space near Val28 of HT (pdb: 1YNR). Val28, Tyr25, and Val76 are shown as a CPK model and the heme, together with Fe-coordinated His and Met, is drown as a stick model. The void space is schematically illustrated as a gray ellipse.

#### [結果・考察]

## アミノ酸置換がタンパク質の熱安定性に及ぼす影響

酸化型 HT、V28I 及び V28L の<sup>1</sup>H NMR スペクトルを Fig. 2 に示す。ヘムメチル及び軸配 位子 Met 側鎖プロトンシグナルが常磁性シフトにより大きく分離して観測され、これらのシ グナルはヘム近傍の立体構造の変化を鋭敏に反映する。V28I、V28L はいずれも野生型 HT と類似した NMR スペクトルを示したことから、アミノ酸置換はヘム近傍の立体構造には

キーワード:常磁性 NMR、シトクロム c、酸化還元電位 〇たい こりん、いりえ きよふみ、ながとも しげのり、やまもと やすひこ

ほとんど影響を及ぼさないことが確認された。円二色性の温度依存性の解析から、酸化型と 還元型 V28Iの Tmはそれぞれ 113.2、129.9℃ であると求められた (Table 1)。このように V28I は酸化型だけを選択的に安定化することが明らかになり、野生型より熱安定性の高いタンパ ク質の調製に成功した。従って、Ile 側鎖のC<sub>8</sub>H,はヘム近傍の空隙を埋めるのに適切な大き さであり、予想通り疎水性コアが安定化されたと考えられる。一方、V28L では、酸化型と 還元型タンパク質のTmはそれぞれ106.6、124.4℃であると求められ、両者の熱安定性は共

に低下した。従って、Leu 側鎖の2つのC<sub>8</sub>H, はヘム近傍の空隙に対して大きすぎるため、 疎水性コアが逆に不安定化されたと考えら れる。還元型 HT、V28I 及び V28L の HNMR スペクトルを Fig.3 に示す。低磁場領域には、 Val28 と近接し、ヘム 17 プロピン酸と水素結 合を形成している Trp54 側鎖の N<sub>e</sub>H シグナル が観測されており、Val28 周辺の立体構造変 化の指標として用いることができる。Trp54 の N<sub>e</sub>H シグナルは、V28I のアミノ酸置換に よりほとんど影響を受けないのに対して、 V28L では明確な高磁場シフト変化を示した。 V28L のアミノ酸置換による高磁場シフトか らは、Trp54 とヘム 17 プロピン酸の水素結合 が弱くなったと考えられることから、Leu は ヘム近傍の空隙を埋めるのには立体的に大 きすぎることが示された。

#### アミノ酸置換がタンパク質の機能に及ぼす影響

V28I と V28L の  $E_{m}$ は、サイクリックボル タンンメトリーにより、それぞれ199、196mV であると求められ、両者とも野生型(245 mV) より Em は低下した (Table 1)。 V28I における Emの低下は、酸化型が選択的に安定化するこ とにより、酸化型と還元型のエネルギー差が 小さくなってことに起因すると考えられる (Table 1)。一方、V28L では、還元型がより 顕著に不安定化され、酸化型と還元型のエネ ルギー差が小さくなったことに起因すると 考えられる(Table 1)。従って、Val28の周辺 の疎水性コアの安定性の変化は、機能調節に 密接に関与することが明らかになった。



Fig. 2 <sup>1</sup>H NMR spectra of the oxidized HT, V28I, and V28L. The heme methyl and axial Met59 side chain proton signals are resolved in downfield and upfield shifted regions, respectively.

**Table 1** Denaturation temperatures  $(T_m)$  and redox potentials (*E*<sub>m</sub>) of HT, V28I, and V28L.

		<i>E</i> m <sup>b</sup>			
	oxidized	$\Delta T_{\rm m}$	reduced	$\Delta T_{\rm m}$	(mV)
HT	109.8	—	129.7	-	245
V28I	113.2	+3.4	129.9	+0.2	199
V28L	106.6	-3.2	124.4	-5.2	196

<sup>a</sup> Observed at pH7.0. Errors ±0.5 ℃. <sup>b</sup> Observed at 25 °C, pH6.0. Errors ±2 mV.



Fig. 3 <sup>1</sup>H NMR spectra of reduced HT (bottom). Portions, 12.6 - 10.2 ppm of <sup>1</sup>H NMR spectra of reduced HT, V28I, and V28L are illustrated in the upper left corner, and the molecular structure of HT in the upper right corner.

[結論] Val28 周辺の疎水性コアにおける原子パッキングをより密にすることで、野生型より 熱安定性の高いタンパク質を創製することに成功した。また、Val28 周辺の疎水性コアの安 定性は、導入するアミノ酸側鎖のサイズに依存すること、及びタンパク質の熱安定性と機能 調節に密接に関与することが明らかになった。

References: [1] H. Tai et al., Biochemistry, 49, 42-48 (2010); S. Mikami et al., Biochemistry, 48, 8062-8069 (2009); S. J. Takayama et al., J. Biol. Inorg. Chem., 14, 821-828 (2009). [2] C. Travaglini-Allocatelli et al., J. Biol. Chem., 280, 25729-25734 (2005).

ミミズ由来R型レクチンC末端ドメインのラクトースとの 結合状態でのNMR構造

○逸見 光<sup>1</sup>, 久野 敦<sup>2</sup>, 海野幸子<sup>2</sup>, 平林 淳<sup>2</sup>
 <sup>1</sup>農研機構・食総研
 <sup>2</sup>産総研・糖鎖医工学研究センター

## NMR structure of the C-terminal domain of an R-type lectin from earthworm in the lactose-binding state

<sup>O</sup>Hikaru Hemmi<sup>1</sup>, Atsushi Kuno<sup>2</sup>, Sachiko Unno<sup>2</sup>, and Jun Hirabayashi<sup>2</sup> <sup>I</sup>National Food Research Institute, National Agricultural and Food Research Organization (NARO), Tsukuba, Japan. <sup>2</sup>Research Center for Medical Glycoscience, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Tsukuba, Japan.

The C-terminal domain of an R-type 29-kDa lectin (EW29Ch) from the earthworm *Lumbricus terrestris* has two sugar-binding sites ( $\alpha$  and  $\gamma$ ). Our recent paper<sup>1</sup> showed that the Kd value of the  $\alpha$  sugar-binding site were approximated to 0.01-0.07mM for lactose, whereas that of the  $\gamma$  sugar-binding site was 2.66mM for lactose. Although the crystal structure of the complex between EW29Ch and lactose was reported, it is still unclear why the  $\alpha$  sugar-binding site binds to lactose more strongly. In the present study, the high-resolution NMR structure of EW29Ch in the lactose-binding state was characterized by a  $\beta$ -trefoil fold as expected from the crystal structure of lactose-liganded EW29Ch. The NMR relaxation experiments for the backbone of EW29Ch in the sugar-free state and in the lactose-binding state showed that the differences between the two states were particularly observed for the  $\alpha$  sugar-binding site.

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

レクチン,糖,相互作用

○へんみひかる、くのあつし、うんのさちこ、ひらばやしじゅん

今回、我々は、<sup>15</sup>N,<sup>13</sup>Cラベル体EW29Ch/非ラベル体ラクトース=1/8の試料を調 製し、0.7-1mMの濃度とした。Bruker社製Avance600MHzを用いて、25℃でNMR測定 を行った。NOEによる距離情報、二面角情報、さらに水素結合情報により構造計算を 行った後、残余双極子相互作用(RDC)を加えて、より精密なラクトース結合状態に おける立体構造を解析した。さらに、<sup>15</sup>Nラベル体EW29Ch及び<sup>15</sup>Nラベル体EW29Ch /非ラベル体ラクトース=1/8の各試料を用いて、<sup>15</sup>N 核緩和( $R_1$ ,  $R_2$ , 及び {<sup>1</sup>H}-<sup>15</sup>N NOE)の測定を行い、遊離状態とラクトースとの結合状態における分子内運 動性の解析を行ったので、その結果について報告する。

[結果と考察]

今回、我々は、X線結晶構造解析で糖との複合体解析において、2つの糖結合部位( $\alpha$ と $\gamma$ )での糖との相互作用についてほとんど同じ相互作用を示すことが報告されてい るにも関わらず、NMR滴定実験において $\alpha$ 結合部位が $\gamma$ 結合部位に比ベラクトースに 対して約100倍高い結合能を持つことから、 $\alpha$ 結合部位のラクトースとの相互作用を 重点的に解析するため、非ラベル体ラクトースに対して<sup>13</sup>C,<sup>15</sup>Nラベル体EW29Chを糖 /タンパク質比が8になるようにサンプルを調製し、多核多次元NMRの測定を行った。 RDCの測定については、PEG/Hexanol系液晶溶媒を用いて試料を調製し、IPAP-HSQC の測定を行った。それらのNMRデータを用いてラクトース結合状態での立体構造を解 析した結果、予想通り $\beta$ -trefoil構造を形成し、遊離状態でのNMR構造やラクトース との結合状態での結晶構造と大変類似していたが、一部ループ構造や糖結合に関係す る残基において違いが見られた。

遊離状態及びラクトース結合状態におけるそれぞれの分子内運動性を解析するために、 $^{15}N$ 核の緩和測定を行った。その結果、 $\{^{1}H\}$ - $^{15}N$  NOE及びR<sub>1</sub>のデータにおいて、遊離状態及びラクトース結合状態で大きな違いが見られなかった。また、RCI (Random Coil Index)  $^{4}$ から予測されたオーダーパラメーターの比較においても大きな違いが見られなかった。一方、R<sub>2</sub>においては、結合部位、特にα結合部位において、違いが見られた。これらの結果より、遊離状態とラクトース結合状態間での分子内運動性の違いは、Rex (化学交換の速度定数) によるものと示唆された。

今回のラクトースとの結合状態におけるNMR構造及び<sup>15</sup>N核緩和解析より、 EW29Chの糖との結合活性に対する分子内運動性の重要性が推測されたが、さらに、 現在、糖との複合体等についても解析を進めている。

References

- Hemmi, H., Kuno, A., Ito, S., Suzuki, R., Hasegawa, T., and Hirabayashi, J. (2009) FEBS J. 276, 2095-2105.
- 2. Hirabayashi, J., Dutta, S. K., and Kasai, K. (1998) J. Biol. Chem. 273, 14450-14460.
- Suzuki, R., Kuno, A., Hasegawa, T., Hirabayashi, J., Kasai, K., Momma, M., and Fujimoto, Z. (2009) Acta Crystallogr D 65, 49-57.
- 4. Berjanskii, M. V., and Wishart, D. S. (2005) J. Am. Chem. Soc. 127, 14970-14971.

## 巨大タンパク質複合体のモデル構築を目的とした 残基選択的交差飽和法の開発

○小澤 新一郎<sup>1</sup>、五十嵐 俊介<sup>1</sup>、鈴木 勉<sup>2</sup>、甲斐荘 正恒<sup>3, 4</sup> 大澤 匡範<sup>1</sup>、嶋田 一夫<sup>1, 5</sup>

<sup>1</sup>東大・院薬系、<sup>2</sup>東大・院工系、<sup>3</sup>名大・院理、<sup>4</sup>首都大東京・戦略研究センター、<sup>5</sup>産総研・バイオメディシナル情報研究センター

## Development of residue selective cross-saturation (RSCS) method for modeling a large protein-protein complex

○Shin-ichiro Ozawa<sup>1</sup>, Shunsuke Igarashi<sup>1</sup>, Tsutomu Suzuki<sup>2</sup>, Masatsune Kainosho<sup>3, 4</sup>, Masanori Osawa<sup>1</sup>, and Ichio Shimada<sup>1, 5</sup>

<sup>1</sup>Grad. Sch. Pharm. Sci., The Univ. of Tokyo, <sup>2</sup>Grad. Sch. Eng., The Univ. of Tokyo, <sup>3</sup>Grad. Sch. Sci., Nagoya Univ., Center for Priority Areas, Tokyo Metropolitan Univ., <sup>5</sup>BIRC, AIST

Structural analyses of protein-protein complexes provide information about their structural mechanism of the functions. We previously developed NMR techniques, cross-saturation (CS) and amino acid selective CS (ASCS) methods. The ASCS method provides the candidates of the proximal residue pairs between two protein molecules, which enables to build a structural model of the complex with reference to the structural complementarity of the individual structures. In order to identify the proximal residue pairs unambiguously, we propose here a residue selective CS (RSCS) method, which uses a residue selective <sup>1</sup>H-labeled protein as a CS-donor. In this presentation, the selectivity and efficiency of the residue selective <sup>1</sup>H-labeling as well as the application of the RSCS method to a complex of yeast ubiquitin (Ub) and yeast ubiquitin hydrolase 1 (YUH1) will be discussed.

【背景・目的】

タンパク質の機能を解明するためには、タンパク質単体の立体構造に加え、標的分子との特異的な認識機構を解明する必要がある。

これまでに当研究室では、タンパク質複合体の分子認識様式を解明する NMR 手法と して、結合界面残基を同定する交差飽和法(CS 法、[1])および分子間の近接残基対を 同定するアミノ酸選択的 CS 法(ASCS 法、[2])を開発してきた。ASCS 法は CS ドナー分 子をアミノ酸選択的に 'II 標識し、交差飽和源を一種類のアミノ酸に限定する手法であ る。複合体中の個々のタンパク質の立体構造が既知の場合、CS ドナー分子表面の 'I 標識アミノ酸の分布と CS アクセプター分子上の交差飽和を受けたアミドプロトンの 位置関係から、分子間の近接残基対を同定でき、複合体モデルが構築可能となる。

しかしながら、高分子量複合体においては分子表面積の増大とともに CS ドナー分子表面に類似したアミノ酸分布パターンが複数出現し、近接残基対の一義的な決定が 困難となることが問題であった。

タンパク質間相互作用、交差飽和法、無細胞タンパク質合成

Oおざわ しんいちろう、いがらし しゅんすけ、すずき つとむ、 かいのしょう まさつね、おおさわ まさのり、しまだ いちお そこで本研究では、特定の一残基を出 他を<sup>2</sup>H標識して交差飽和源を一残基のみ に限定する「残基選択的CS法(RSCS法)」の 開発を目的とした。RSCS法においては、交 差飽和源となるCSドナー上の残基と交差 飽和を受けたCSアクセプター上の残基が1 対1で対応するため、巨大タンパク質複合 体においても近接残基対の一義的な同定 および複合体モデルの構築が可能となる。

【材料・方法】

複合体の立体構造が既知である酵母ユ ビキチン(Ub)-酵母ユビキチン加水分解酵 素 C90S 変異体(YUH1) 複合体に RSCS 法を適 用することとし、CS ドナーである YUH1 の L165 の一残基選択 <sup>I</sup>II 標識を試みた。



Fig.1 Schematic representation of the ASCS (A) and RSCS (B) methods.

- (A) Multiple candidates are provided by the ASCS method.
- (B) A proximal residue pair can be unambiguously identified by the RSCS method.

はじめに、均一<sup>2</sup>H 標識タンパク質調製を可能とする無細胞発現系を構築した。次に、 amber 変異を導入した YUH1 鋳型プラスミド、amber コドンを認識するサプレッサー tRNA(stRNA)および stRNA にアミノ酸を付加するアミノアシル tRNA 合成酵素を調製し た。stRNA は CCA 付加酵素を添加した転写反応によって高純度に調製し、[<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C]-Leu にてアミノアシル化した。これらを用いて、L165 選択[<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C]標識 YUH1 を調製した。 次に、一残基選択[<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C]標識率を NMR 法によって算出後、L165 選択[<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C]標識 YUH1

をCSドナー、均一[<sup>2</sup>H,<sup>15</sup>N]標識UbをCSアクセプターとしたRSCS実験を行った。

【結果】

L165 選択[<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C]標識 YUH1 の <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC スペクトルから、YUH1 の L165 選択的に [<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C]標識されたことを確認した。また、L165 側鎖の <sup>1</sup>H/<sup>2</sup>H 率は 50%程度と算出した。

そこで、次にこの試料を CS ドナーとした RSCS 実験を行った。その結果、Ub の R74 および G75 において NMR シグナル強度の減少が観測された。したがって、Ub の R74 および G75 が YUH1 の L165 に近接すると結論した。

#### 【考察】

Ub の R74 および G75 と YUH1 の L165 は、結晶構造において 5 Å 以内に近接する残基 対である。したがって、今回の RSCS 実験結果は Ub-YUH1 複合体の残基間距離を反映 する妥当な結果である。一方、YUH1 の L165 周辺には他にも複数の Leu 残基が存在す るため、YUH1 上のすべての Leu が交差飽和源となる ASCS 実験のみでは Ub の R74 およ び G75 が YUH1 の L165 に近接することを一義的には決定できていなかった。

今回、ASCS 実験で得られた近接残基対候補に対して RSCS 実験を適用することによ り、Ub-YUH1 複合体の近接残基対を一義的に同定することができた。同様の方法によ り、従来法では解析が困難であった巨大タンパク質複合体についても近接残基対の一 義的な同定および複合体モデルの構築が可能となると期待される。

[1]Shimada I. et al., Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc. 54, 123-140 (2009)
[2]Igarashi S. et al., J. Am. Chem. Soc. 130, 12168-12176 (2008)

## ウマミオグロビン二量体のNMRによる構造研究

○長尾聡,雨貝真実,宇仁武史,廣田俊 奈良先端大・物質創成

### Studies on the structure of horse myoglobin dimer by NMR spectroscopy

○Satoshi Nagao, Makoto Amagai, Takeshi Uni, and Shun Hirota Graduate School of Materials Science, Nara Institute of Science and Technology, Nara, Japan.

Dimerization of myoglobin (Mb) has been reported, but the structure of dimeric Mb is still unclear. In this study, we investigated the structure of dimeric Mb under various states by NMR spectroscopy. Although most of the signals of the amino acid protons nearby heme were similar between the corresponding  $CN^{-}$ , deoxy, CO-bound forms of monomeric and dimeric Mbs, significant shifts of Trp14 N<sub>e</sub>H and Val17 C<sub>γ</sub>H<sub>3</sub> signals were observed for the CO-bound complex. These results suggest that the A-helix structure of Mb is perturbed by dimerization, whereas the active site structure is similar between monomeric and dimeric Mbs.

### 【緒言】

タンパク質はアミノ酸残基の一次配列に よって特定の立体構造を形成するが、タン パク質が変性し凝集すると、天然状態とは 異なる多量体構造を形成することがある。 ミオグロビン(Mb, Fig.1)は酸素貯蔵を機 能とする単量体のヘムタンパク質であるが、 ウマ骨格筋由来の Mb は凍結乾燥により二 量体を形成する。また、ヘムを取り除いた アポ体の Mb は溶液条件を変えることでア ミロイド線維を形成する。Mb の凝集のメ カニズムは未解明であり、Mb 二量体の構 造や機能についても十分な知見が得られて いない。そこで、本研究では、<sup>1</sup>H NMR 測 定によりウマ Mb の様々な配位状態におけ るウマ Mb 二量体の構造を調べた。



Fig. 1 Structure of horse myoglobin. Heme and amino acid residues (Trp14 and Val17) are represented with stick and space-filling models, respectively.

#### 【実験】

ウマ骨格筋由来 Mb の粉末を 50 mM リン酸カリウム緩衝液(pH 7.0)に溶解し、FPLC

Myoglobin, Hemoprotein, Oligomer

○ながおさとし、あまがいまこと、うにたけし、ひろたしゅん

を用いたゲルろ過カラムクロマトグラフィーを繰り返すことにより Mb 二量体を精製 した。Mb 二量体のメト型、シアノ型、デオキシ型、CO 結合型の試料溶液を調製し、 各配位状態における二量体および単量体の NMR スペクトルを測定した。

【結果と考察】

Mb 二量体は 70℃、5 分間の加熱により単量体に解離したが、室温で数時間静置し てもほとんど解離しなかった。この結果より、Mb 単量体が非共有結合的に会合して 二量体を形成し、室温付近において二量体は安定であることが分かった。

メト型、シアノ型、デオキシ型 Mb の <sup>1</sup>H NMR スペクトルでは、常磁性シフト して観測されたヘム側鎖メチル基やヘ ム近傍に位置するアミノ酸残基由来の シグナルの化学シフト値は、二量体と単 量体で大きな差が見られなかった(Fig. 2)。この結果より、Mb 二量体のヘム近 傍の構造は単量体と類似していること が明らかとなった。

次に、CO 結合型 Mb 二量体の<sup>1</sup>H NMR 測定により、ヘム側鎖メチルやヘム近傍 のアミノ酸残基のシグナルは他の配位 状態と同様に単量体とほぼ一致してい たが、Trp14 N<sub>e</sub>H と Val17 C<sub>v</sub>H<sub>3</sub>のシグナ ルは単量体の同シグナルの位置からシ フトしていた(Fig. 3)。これらのアミノ酸 残基はすべて N 末端に近い A-ヘリック ス上に存在していることから、ウマ Mb は二量化するとヘム近傍の構造よりも A ヘリックスが大きな摂動を受けるこ とが示唆された。

また、すべての配位状態において、 Mb 二量体の<sup>1</sup>H NMR シグナルの線幅は、 単量体よりも大きくブロードニングし て観測された。これは、Mb の二量化に 伴う分子量の増大により、Mb 分子の運 動性が低下したことに由来すると推測 される。



Fig. 2 <sup>1</sup>H NMR spectra of monomeric (broken line) and dimeric (solid line) *met*Mbs.



Fig. 3 <sup>1</sup>H signals of Trp14  $N_{\epsilon}H$  and Val17  $C_{\gamma}H_3$  of monomeric (broken line) and dimeric (solid line) CO-bound Mbs.

○斉藤香織<sup>1</sup>,太虎林<sup>1</sup>,長友重紀<sup>1</sup>,三田肇<sup>2</sup>,山本泰彦<sup>1</sup>,逸見光<sup>3</sup> 1筑波大院数物,2福岡工大工・生命環境,3農研機構・食総研

## Structural characterization of heme-DNA complex possessing CO molecule as an exogenous ligand

OKaori Saito<sup>1</sup>, Hulin Tai<sup>1</sup>, Shigenori Nagatomo<sup>1</sup>, Yasuhiko Yamamoto<sup>1</sup>, and Hikaru Hemmi<sup>2</sup> <sup>1</sup>Dept. of Chem., Univ. of Tsukuba, <sup>2</sup>Dept. of Life, Environ. and Materials Sci., Fukuoka Inst. of Tech., and <sup>3</sup>Natl. Food Res. Inst.

A single repeat sequence of the human telomere, d(TTAGGG), has been shown to form all parallel G-quadruplex DNA in the presence of  $K^+$ . We have previously demonstrated that heme, iron(III)-protoporphyrin IX complex, and G-quadruplex DNA assembled from d(TTAGGG) form a stable complex, "heme-DNA complex". It has been also suggested that, as in the cases of hemoproteins, carbon monoxide (CO) can be bound, as an exogenous ligand, to iron atom of the heme-DNA complex in its reduced state. In this study, we have characterized the solution structure of the CO adduct of the heme-DNA complex using <sup>1</sup>H NMR. Guanine imino protons were ranked as G4 < G5 < G6, in order of increasing shift difference between G-quadruplex DNA and the CO adduct, revealing that heme stacks onto the 3'-terminal G-quartet of G-quadruplex DNA in the CO adduct.

「序論] 四重鎖DNAは、グアニン四量体(G-カルテット)により形成されるDNAの 高次構造の一種である。私共はこれまでの 研究において、ヘム(鉄-ポルフィリンIX 錯体)がDNA塩基配列d(TTAGGG)により 形成される四重鎖に対して特異的に結合 し、ヘム-DNA複合体を形成することを報 告してきた<sup>1,2</sup>。さらに、ヘム-DNA複合体に おける還元型ヘム鉄は周囲の気体分子の 種類に応じた様々な配位構造をとること が示唆されており、一酸化炭素(CO)雰 囲気下ではCO分子がヘムに結合すると考 えられている(Fig. 1)<sup>3</sup>。本研究では、CO 分子を外部配位子としてもつヘム-DNA複 合体の電子構造および立体構造を<sup>1</sup>H NMR により解析した。



Fig. 1. UV-Vis absorption spectra of heme-DNA complexes with (a)  $Fe^{3+}$  (before iron reduction), (b) CO adduct (reduced in CO atmosphere), and (c) Deoxy-form (reduced in N<sub>2</sub> atmosphere).

キーワード:四重鎖DNA、ヘム、二次元NMR

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



**Fig. 2.** <sup>1</sup>H NMR spectra of CO adduct of heme-DNA complex (top) and G-quadruplex DNA (bottom) in 90%H<sub>2</sub>O/10%D<sub>2</sub>O, at 298K. Heme-DNA complex was reduced by Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, and dithiothreitol was added to maintain the CO adduct throughout the measurements. Signal assignments of guanine imino protons are shown with the spectra.

[結果・考察] 通常の四重鎖 DNA において、<sup>1</sup>H NMR のシグナルは 0-12 ppm に観 測される (Fig. 2)。(d(TTAGGG))<sub>4</sub>における DNA 4 分子はすべて等価であり、~10 ppm より低磁場にシフトしたシグナルは、各々の G-カルテット中で水素結合を形成した グアニンのイミノプロトンに由来する。一方、CO 雰囲気下で還元したヘム-DNA 複 合体では、イミノプロトンの一つが~8.5 ppm に高磁場シフトして観測された。CO が 配位したヘムは鉄二価の低スピン状態で反磁性となるため、不対電子による常磁性シ フトは生じない。よってこのシフトは、ヘムのポルフィリン環の環電流効果によるも のであると考えられる。

ヘム-DNA複合体のシグナル帰属は主に NOESYの解析により行った。グアニンのイ ミノプロトン間ではG4-G5-G6のNOE相関が 確認され、さらにA3塩基とG4のNOE相関か ら各イミノプロトンシグナルの帰属を得る ことができた(Fig. 3)。ヘムと結合してい ない(d(TTAGGG))4と比較して最も高磁場シ フトしたイミノプロトンはG6であり、CO結 合型ヘム-DNA複合体において、ヘムがDNA の3'末端側のG-カルテットにスタッキング していることが明らかとなった。また、CO 結合型ヘム-DNA複合体のG6イミノプロト ンシグナルが等強度の2本に分裂して観測さ れることから、ヘムの結合によりシグナルの 縮退が解けることが明らかになった。



Fig. 3. A portion of NOESY spectrum of CO adduct of heme-DNA complex in  $90\%H_2O/10\%D_2O$ , at 298K. A mixing time of 150 ms was used for the measurement.

[結論] CO分子を外部配位子としてもつ還元型ヘム-DNA複合体では、ヘムがDNAの 3'末端側のG-カルテットにスタッキングして結合していることが明らかとなった。

#### References

[1] T. Mikuma *et al.*, *Chem. Commun.*, 2003, 14, 1708-1709.
[2] T. Ohyama *et al.*, *Chem. Lett.*, 2006, 35, 126-127.
[3] K. Saito *et al.*, *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 53, 2009, 241-242.

**P23** 

## NMRを用いた蛋白質の立体構造解析における非線形サンプリングの有用性の検証

○大西香穂里<sup>1</sup>, 重光佳基<sup>1</sup>,土江祐介<sup>1</sup>, Daniel Nietlispach<sup>2</sup>,
 三島 正規<sup>1</sup>, 池谷 鉄兵<sup>1</sup>, 伊藤 隆<sup>1</sup>
 <sup>1</sup>首都大院・理工, <sup>2</sup>ケンブリッジ大

## Applications of nonlinear sampling scheme to 3D <sup>13</sup>C or <sup>15</sup>N-separated NOESY experiments

OKaori Onishi<sup>1</sup>, Yoshiki Shigemitsu<sup>1</sup>, Yuusuke Tsuchie<sup>1</sup>, Daniel Nietlispach<sup>2</sup>, Masaki Mishima<sup>1</sup>, Teppei Ikeya<sup>1</sup> and Yutaka Ito<sup>1</sup>
<sup>1</sup>Department of Chemistry, Tokyo Metropolitan University

<sup>2</sup>Depatment of Biochemistry, University of Cambridge

Nonlinear sampling for indirectly acquired dimensions in combination with maximum entropy (MaxEnt) processing has been shown to provide significant time saving in the measurement of multidimensional NMR experiments. We applied this nonlinear sampling and 2D MaxEnt processing to 3D <sup>13</sup>C or <sup>15</sup>N-separated NOESY experiments of *T.thermophilus* HB8 TTHA1718 and *Sinorhizobium meliloti* FixJ C-terminal domain. The effect of the artefacts arising by employing nonlinear sampling and 2D MaxEnt processing, such as mis-calibration of intensities and the emergence or disappearance of cross peaks, to 3D NOESY-type spectra was evaluated by calculating structures with distance restraints obtained from simulated 3D NOESY spectra with various amounts of nonlinear sampling points.

#### 【序論】

NMRによる蛋白質の立体構造解析の際には、帰属の曖昧さを避けるための多次元化や、 十分な感度を得るために積算回数の増加が必要であり、3D測定に数日要するという制約が あった.従って、安定性の低い蛋白質はNMR測定に適さないと考えられてきた.本研究では、 近年提案されている迅速かつ高分解能な測定を可能にする様々な手法の一つである非線形 サンプリングによる測定と最大エントロピー(MaxEnt)法によるデータ処理に着目し、シグナル 強度から立体構造決定に最も重要な核間距離情報を算出するNOESY測定へ試みること で、蛋白質の立体構造解析におけるこのアプローチの有用性の検証を行った.

MaxEnt法によるデータ処理では、特にピーク強度のダイナミックレンジが大きいスペクト ルにおいて、シグナル強度の変動やシグナルの消失などのアーティファクトが危惧されてい るが、それらが実際の構造計算にどれだけ影響を与えるかの議論はこれまでなされていな かった.本研究では、その有用性の検証を行ったので、報告する.

キーワード: 3次元NOESY, 非線形サンプリング, 最大エントロピー法

○おおにし かおり、しげみつ よしき、 つちえ ゆうすけ、 だにえる にーとりすぱっは、 みしま まさき、 いけや てっぺい、 いとう ゆたか

#### 【実験】

測定試料には、高度好熱菌由来蛋白質 TTHA1718(66 アミノ酸残基, 7 kDa)、根粒菌 FixJ、C 末端ドメイン(79 アミノ酸残基, 8.6 kDa)、の 2 次構造組成の異なる 2 種の蛋白質を 用いた.まず従来法を用いて、3D <sup>13</sup>C-separated NOESY 及び 3D <sup>15</sup>N-separated NOESY を測定した.このデータを用いて、非線形サンプリング法によってデータポイントを 1/2、1/4、1/8、1/16 に削減した再構成データを作製した.実測データおよび再構成データは観測軸に ついてフーリエ変換した後 2D MaxEnt 処理を行うことでスペクトルを得た.これらスペクトルを 解析し、距離情報を収集することによって、構造計算を行った.データ処理には Azara v2.7を、解析には ANSIG-for-OpenGL v1.0.6 を、高次構造計算には CYANA v3.0 を用いた.

#### 【結果・展望】

3D NOESY スペクトルの解析によって得られた距離情報をもとに計算した高次構造は、それぞれのアンサンブルの RMSD,および実測データから計算された高次構造(レファレンス) との RMSD の2 つのパラメータを指標に評価を行った. その結果、①非線形サンプリングを用いてデータポイントを削減すればするほど、アンサンブルの RMSD とレファレンスとの RMSD は増大していく傾向があること、②そうであっても、実測データの 1/8 に削減した再構成データからでも、TTHA1718、FixJC ともに、十分に収束して正確な構造が得られること、が判明した. Figure 1(および Table 1)には、実測データおよび非線形サンプリングを用いて 1/8 にデータポイントを削減した再構成データから得られた構造のうち、最終 20 個の構造の主鎖原子を重ね合わせたものを示した.本研究により、非線形サンプリングを用いることで、短時間の 3D NOESY 測定でも正確な高次構造を導き出しうることを示すことができた.

今後は、さらに分子量の大きい蛋白質についても、この手法が有用であるかを検証していく. また、同程度の分子量であっても、2次構造におけるα-ヘリックスやβ-シートの存在比によって も、収束の具合も異なることが予測されるので、その検証も行っていきたい.



**Figure 1** Superposition of 20 final structures of TTHA1718 from full (reference) data (**a**) and simulated data with 1/8 nonlinear sampling (**b**), respectively. Superposition of 20 final structures of FixJC from full (reference) data (**c**) and simulated data with 1/8 nonlinear sampling (**d**), respectively.

	TTHA1718		FixJC				
	reference	1/8	reference	1/8			
Backbone RMSD	$0.28\pm0.04~\text{\AA}$	$0.45\pm0.11~{\rm \AA}$	$0.33\pm0.07~{\rm \AA}$	$0.62\pm0.14~{\rm \AA}$			
Heavy atom RMSD	$0.78\pm0.05~{\rm \AA}$	$0.96\pm0.09~{\rm \AA}$	$0.75\pm0.04~\text{\AA}$	$1.10\pm0.15~\text{\AA}$			
Backbone RMSD to reference	-	$1.11~{ m \AA}$	-	$1.15~{ m \AA}$			
Heavy atom RMSD to reference	-	$1.30~{ m \AA}$	-	1.53 Å			

#### Table 1 RMSD of ensembles and RMSD to references.

### NMRによるヒストンヌクレオソームコアの構造解析

 ○森脇義仁<sup>1</sup>, 佐藤昌彦<sup>1</sup>, 長土居有隆<sup>1</sup>, 立和名博昭<sup>2</sup>, 胡桃坂 仁志<sup>2</sup>, 西村善文<sup>1</sup>
 <sup>1</sup>横浜市大・生命ナノシステム・生体超分子システム科学
 <sup>2</sup>早稲田大・理工学術院・先進理工学部

## The structural analysis of the nucleosome core by NMR spectroscopy

 $\bigcirc$ Yoshihito Moriwaki<sup>1</sup>, Masahiko Sato<sup>1</sup>, Aritaka Nagadoi<sup>1</sup>, Hiroaki Tachiwana<sup>2</sup>, Hitoshi Kurumizaka<sup>2</sup>, Yoshifumi Nishimura<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Lab. of Struct. Biol., Grad. Sch. of Supermol. Biol, Yokohama City University, Kanagawa, Japan. <sup>2</sup>Grad. Shc. Of Adv. Sci. and Eng./RISE., Waseda Univ.

In eukaryotic cells, DNA is stably stored in a highly ordered structure, chromatin. Its fundamental repeating structural unit is a nucleosome core, which is comprised of 147 bp of DNA and a histone octamer, consisting of two copies of four kinds of histones, H2A, H2B, H3 and H4. Here, we try to clarify the structure of the H2A/H2B complex in solution by NMR; each molecular weight of H2A and H2B is about 14kDa. At first we prepared the recombinant H2A and H2B proteins in *E. coli* by labeling <sup>15</sup>N or <sup>15</sup>N and <sup>13</sup>C, however the backbone assignments of the complex was very difficult. So we prepared the <sup>2</sup>H , <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N-labeled H2A/ <sup>2</sup>H- labeled H2B complex and obtained the good quality spectra with the TROSY technique. Now we are conducting the backbone assignments of H2A in the H2A/H2B complex.

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

X線結晶構造解析によって、ヒストンオクタマーと同じ73塩基対が回文配列の146 または147塩基対からなる二重鎖DNAで構成されたヌクレオソームコアおよび147塩 基対が4回繰り返したオリゴマーのヌクレオソームコアの立体構造は既に解かれてい る。しかし、ヌクレオソームコアの溶液中での詳細構造を解析することは、ヒストン タンパク質の修飾の場所や種類や二重鎖DNAの配列の違いが構造にどのように影響 を与えているかを解析し、遺伝子の発現制御を理解する上で必要である。また、遺伝 子発現が活発な領域ではヌクレオソームコアの解離と再構成が盛んに繰り返されて おり、解離したH2A/H2Bへテロ2量体の挙動を構造的に解析することはクロマチン再

ヒストン, H2A, ヌクレオソームコア, NMR

○もりわきよしひと,さとうまさひこ,ながどいありたか,たちわなひろあき,くる みざかひとし,にしむらよしふみ 構成の観点から不可欠である。よって、我々は先ずH2A/H2Bへテロ2量体の溶液中での構造を決定し、クロマチン再構成の理解へとつなげることを目的とした。

大腸菌発現系では H2A と H2B は沈殿物に回収されたので、可溶化して H2A/H2B ヘテロ 2 量体を作製した。当初、<sup>15</sup>N, <sup>13</sup>C-labeled H2A/nonlabeled H2B を調製し、<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC 測定、3 次元 NMR 測定を行ったが、良好なスペクトルが得られなかった。 H2A/H2B 複合体は H2A、H2B どちらも大きさが約 14kDa であり、複合体では 28kDa になる。そのため <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N ラベル体にて通常の測定を行ったのでは、シグナルのブロ ードニング等が起こってしまう。そこで、<sup>2</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N-labeled H2A/<sup>2</sup>H-labeled H2B を調 製し、TROSY-<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC 測定を行ったところ、スペクトルが改善され、コアドメ インに由来すると思われる分散したシグナルもはっきりと観測できた(Figure 1.)。現在、 TROSY 法を用いた各種多次元 NMR 測定を行い、H2A/H2B ヘテロ 2 量体中の H2A に おける主鎖及び側鎖のシグナル帰属を進めている。また <sup>15</sup>N ラベル化 H2A を含むヌ クレオソームコアを調製し、<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC 測定を行った結果、一部の残基のアミドプ ロトンに由来するシグナルが観測された。このことから、溶液条件等を工夫すること でヌクレオソームコアの溶液 NMR による解析も可能になると考えられる。

今後、H2A/H2B ヘテロ 2 量体の溶液構造の解明を進める一方で、帰属データをもと にし、NAP1 や FACT やヌクレオフォスミン等のヒストンシャペロンと H2A/H2B ヘ テロ 2 量体との相互作用を解析する。また、溶液中でのヌクレオソームコアと H2A/H2B ヘテロ 2 量体の NMR シグナルを比較し、ヌクレオソームコアにおける溶液 中でのヒストンテールの状態の解明を試みる。



Figure 1. <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC spectrum of the <sup>2</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N -labeled H2A/<sup>2</sup>H-labeled H2B complex.

### **P25** 溶液NMRを用いた、人チューブリンチロシン化酵素の構造 解析 ○佐伯邦道<sup>1</sup>, 前崎綾子<sup>2</sup>, 伊藤隆<sup>1</sup>, 三島正規<sup>1</sup> 1首都大院・理工 <sup>2</sup>奈良先端科学技術大学院大学

## Structural analysis of the tyubulin tyrosine ligase from human by solution NMR spectroscopy

OKunimichi Saeki<sup>1</sup>, Ryoko Maesaki<sup>2</sup>, Yutaka Ito<sup>1</sup>, and Masaki Mishima<sup>1</sup> <sup>1</sup> Graduate school of science and engineering, Tokyo Metoropolitan University. <sup>2</sup>Nara Institute Science and Technology.

Tubulin tyrosine ligase (TTL) is the enzyme that adds tyrosine to the C-terminal end of  $\alpha$ -tubulin. It is interesting that CLIP170 protein specifically recognizes tyrosine at the C-terminal end of  $\alpha$ -tubulin and binds to it (Mishima M., et .al. (2007) *P.N.A.S.* 104 10346). CLIP-170 bound to C-terminus of  $\alpha$ -tubulin accumulates on microtubule and promotes its polymerization. Thus, this tyrosination is one of the key modifications to regulate microtube dynamics. In physiological aspect, it is known that this tyrosination involves in organization of neuron.

In this study, our purpose is to elucidate the detail of this tyrosination based on the TTL structure using NMR technique. We will report our progress about binding assay between TTL and  $\alpha$ -tubulin, and the resonance assignments of NMR signals of TTL.

【序論】

Tubulin tyrosine ligase(TTL)は α-tubulin C末端にチロシンを付加す る酵素で、このチロシン化は微小管の 伸長制御に大きく関わる。CLIP170 は α-tubulin C 末端のチロシンを認識し て結合することが知られており (Mishima M., et.al. (2007) P.N.A.S. 104 10346)、結合した CLIP170 が微小。 管のプラス端に集積することで重合 が促進される。その後、α-tubulinは カルボキシペプチダーゼによってC末 端のチロシンが切断され、CLIP170 が Fig.1 Scheme of polymerization of microtubule 外れる。このチロシンが切断された  $\alpha$ -tubulin に、TTL によってチロシン



Key word; tubulin, 酵素

○さえき くにみち、まえさき りょうこ、いとう ゆたか、みしま まさき

が再び付加されることで、tubulinはCLIP170と結合できるようになる(Fig.1)。生理 学的にはα-tubulin C 末端にチロシンを付加する反応が神経細胞の組織化への関与が 明らかになっており、TTL は高等動物にとって極めて重要なタンパク質の一つと考え られている。

本研究では、tubulin tyrosine ligase の立体構造、及び $\alpha$ -tubulin C 末端との相 互作用を研究することで、反応機構の詳細を明らかにすることを目的としている。発 現系を作成し、発現・精製した試料の測定条件を検討した。並行して、 $\alpha$ -tubulin C 末端との結合とチロシン化を NMR によって確認した。本発表では各種 NMR 信号の帰属 や構造解析、測定条件の検討、また、 $\alpha$ -tubulin C 末端との結合実験について議論す る。

[研究方法]

■NMR 測定試料の調製

cDNA mixture(Clonetch)から目的遺伝子を増幅し、pET151/D-TOPO に組み込み TTL 発現プラスミドを作成した。大腸菌 BL21 を用いて発現系を作成し、20℃で一晩発現 誘導をかけ大量発現を行った。この際、シャペロンプラスミド pG-KJE8(TAKARA)と の共発現を行った。次いで DEAE sepharose、Ni アフィニティーカラムに通し、ゲル 濾過からむクロマトグラフィーによる精製を行った。しかし、単離、精製された TTL は凝集を起こしやすく、測定条件の検討が必要であった。

■測定条件の検討

TTL のリガンドとして知られている、Mg<sup>2+</sup>、ATP、Tyr を buffer に加え、buffer の pH と塩濃度を変化させ、TTL の安定性のモニタリングを行った。また、タンパク質の 安定化の効果があると言われているアルギニンを加えた測定も試みた。

■安定性の高い変異体の作成

TTLの分子表面に露出している、電荷を 持った残基が凝集を引き起こす要因の一 つだと考え、変異の導入による改善を試 みた。TTLの構造は未知なため、分子表面 に露出している残基の特定は出来ず、変 異体の有効性の判別には時間がかかる。 そこで、GFPの蛍光をもちいた判別法の作 成に取り組んだ。



GFP と TTL が同一プラスミド上に存在 **Fig.2** GFP+TTL expression plasmid する発現プラスミドを、In-Fusion Advantage PCR Cloning Kit をもちいて作

成し(Fig.2)、大腸菌 BL21 に形質転換を行った。発現時の条件を変え、GFP の蛍光の 強さを比べ TTL の性質を検討した。

■TTL によるα-tubulin C 末端領域へのチロシン付加の観測

pGEX 6P-3 ベクター、大腸菌 BL21 を用いて、<sup>15</sup>N 標識したα-tubulin C 末端領域の 大量発現を行い、GSH アフィニティーカラムに通し、ゲル濾過カラムクロマトグラフ ィーにより精製を行った。得られたサンプルに TTL を加え、NMR によってそのスペク トルの変化を追った。 更に、TTLの活性を調べるために、上記のサンプルに、反応に必要とされる ATP、 Tyr、Mg<sup>2+</sup>、を加えてチロシン化反応を起こし、NMR によって $\alpha$ -tubulin のシグナルの 変化を追った。

[結果 考察]

#### ■NMR 測定試料の調製

TTLの大量発現を行った際、TTLの多くがインクルージョンボディを形成し、不溶性画分に存在していた。そこでシャペロンプラスミドとの共発現を行った。その結果、収量は5倍に改善した。

■測定条件の検討

各種 buffer 条件の結果、リガンドとして Mg2+が存在し、弱酸性、高塩濃度下で安 定に存在することがわかった。しかし、塩濃度が高いことは NMR 測定の障害になる。 よって、NMR 測定条件と、TTL が安定に存在できる条件の最適化を行った。その結果、 分離の良いスペクトルを得ることができた (Fig. 3)。またアルギニンを buffer に加え ることで TTL の安定性の改善は顕著ではなかった。



**Fig.3** TROSY HSQC before optimization (a) and after optimization (b). Observed aggregations of NMR samples before optimization (c) and after optimization (d). Conditions of measurements (e) and (f).

#### ■安定性の高い変異体の作成

測定条件の検討から、TTLの凝集の要因の一つとして、分子間の静電的相互作用が 考えられた。TTLには電荷を持った残基が86存在する。アルギニンがTTLの安定性の 向上に効果があったことから、負電荷をもった残基に変異を行うことが有効であると 考えた。また、Mg<sup>2+</sup>が活性に必要なことや、配列のアライメント、構造予測サーバー

I-TASSAR により信頼度は低いながらも得られたモデル 構造等も参考にアミノ酸置換の候補を選んだ。

また、効率のよい変異体の 判別のためにデザインした GFP 融合プラスミドを LB プ レート上で発現させたとこ ろ、TTL が inclusion body となる 37 度の発現条件では 蛍光を発せず、わずかではあ るが可溶化する 25 度では蛍 光を発することを確認した (Fig. 4)。この手法を用いて、 安定な変異体のスクリーニ ングを行っていく。



Fig.4 Scheme of monitoring system using GFP

GFP gives green fluorescence, if TTL folds into native form. However, it gives no green fluorescence, if TTL forms inclusion body and folds into non native structures.

■TTL によるα-tubulin C 末端領域へのチロシン付加の観測

NMR 測定の結果、TTL とα-tubulin C 末端領域との結合を確認した。TTL による α-tubulin C 末端への Tyr の付加反応を NMR で測定したところ、時間変化におけるス ペクトルの変化が観測できた。



**Fig.5** Observation of tyrosination in NMR tube HSQCs of C-terminus of  $\alpha$ -tubulin at 0 h (a),4 h(b),and 12 h after reaction (c).

[今後の予定]

今回構築した GFP を用いる方法を使って、安定な変異体の作成を行う。得られた変 異体を用いて、NMR 測定を行い立体構造を解析する。また並行して、野生型のものの、 構造解析も進めていく。

## **P26**

## 準安定状態が安定化されたユビキチン変異体

○北沢創一郎<sup>1</sup>、矢木真穂<sup>23</sup>、菅瀬謙治<sup>4</sup>、加藤晃一<sup>23</sup>、北原亮<sup>1</sup> <sup>1</sup>立命大・薬、<sup>2</sup>名市大院・薬、<sup>3</sup>岡崎統合バイオ・分子研、<sup>4</sup>サントリー 生有研

### High-energy state mutant of ubiquitin

Soichiro Kitazawa<sup>1</sup>, Maho Yagi<sup>2,3</sup>, Kenji Sugase<sup>4</sup>, Koichi Kato<sup>2,3</sup>, Ryo Kitahara<sup>1</sup> <sup>1</sup>College of Pharmaceutical Sciences, Ritsumeikan University, Kusatsu, Japan, <sup>2</sup>Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya-City University, Nagoya, Japan, <sup>3</sup>IMS Okazaki National Institute, Okazaki, Japan, <sup>4</sup>Suntry Institute for Bioorganic Research, Osaka, Japan

High pressure NMR studies have revealed that ubiquitin exists in conformational equilibria among the basic folded (N<sub>1</sub>), alternatively folded (N<sub>2</sub>), locally disordered (I) and totally unfolded (U) conformers. Here, we show NMR characterizations of the ubiquitin mutants in which the high-energy states are highly populated. A breaking of hydrogen bond, salt bridge or a replacement of Pro-Pro sequence to Ala-Ala (K11A, E34A, Q41N, Q41A and P37A/P38A) brought about significant changes in chemical shifts, <sup>15</sup>N spin-spin relaxation rates  $R_2$  and amide proton-water exchange rates at many residues in  $\alpha$ -helix and some  $\beta$ -strand regions, indicating a large increase in population of high-energy states in those mutants. In addition, we studied the binding constants of ubiquitin-interacting-motif UIM to ubiquitin and its mutants.

緒言: コンフォメーション平衡の研究に優れた高圧力NMR法により、これまでに ユビキチン及び NEDD8、SUMO2 など複数のユビキチン様蛋白質での比較解析を行 い、E1-E2-E3 カスケードを有するユビキチンホモログ間にのみ保存された高エネル ギー構造(準安定構造 N<sub>2</sub>、局所変性構造 I)の存在を明らかにした。高エネルギー構 造の機能的意義を生化学的に研究するために、高エネルギー構造が多く分布するモデ ル変異体の作成を行った。N<sub>2</sub>構造や I 構造で構造変化が生じる部分の安定性に注目し N<sub>2</sub>、I 構造の安定化デザインを行った。

**実験**: I36C'O と Q41NεH の水素結合、K11 と E34 側鎖間の塩橋に摂動を与えた変 異体(K11A, E34A, Q41A, Q41N)を作成した(Fig. 1)。I 構造中で局所変性する部位

高圧力、ポリユビキチン、構造揺らぎ

○きたはらりょう、やぎ・うつみまほ、すがせけんじ、かとうこういち、きたはらり ょう
に位置する PP 配列を AA に置換した P37A/P38A を作成した。20 °C, pH 7.2 にて WT 及び全ての変異 体について <sup>15</sup>N-HSQC 測定、<sup>15</sup>N-72 緩和測定、 CLEANEX-PM (water-amide proton chemical exchange)測定を行った。ubiquitin-interacting-motif UIM の滴定にともなう化学シフト変化から UIM の 解離定数を見積もった。

結果と議論: K11A, E34A, Q41A, Q41N 変異によ り ヘリックスと $\beta_3$ 及び $\beta_5$ 部分で<sup>15</sup>N, <sup>1</sup>H 化学シフ トに大きな変化が観測された。これらの部分では、  $R_2$ 値の増加(~5 Hz, Fig. 2)が観測された他、主鎖 アミド水素と水の交換が顕著に速まっていることが 分かった。  $\alpha$ ヘリックスと $\beta_3$ 及び $\beta_5$ 部位は、 $N_1 \rightarrow N_2$ 転移で構造変化が大きい部分に対応することから、こ



Fig. 1. NMR structure of ubiquitin-UIM complex (PDB 1Q0W, Swanson et al,). Residues substituted by Ala are represented by sticks.

れらの変異により圧力同様に N<sub>2</sub>構造の分布が増加したと考えられる。K11A, E34A, Q41A, Q41N, P37A/P38A について UIM の解離定数を調べたところ、WT (250±60 uM)のそれと同程度から 2 倍程度大きな値を得た。いずれの変異体でも WT 程度かや や弱く UIM と結合可能であることが分かった。この結果から N<sub>2</sub>構造は、UIM を含 め多くの標的分子の結合部位である疎水パッチの構造には顕著な影響を与えないこ とが分かった。次にヘリックス部分と C 末ストランドに直接結合する E1-E2-E3 カス ケードに注目した。現在、ユビキチン化アッセイによる機能評価実験を行っている。



carried out at <sup>1</sup>H 600 MHz and 20 °C.

# 酵母発現系を用いたタンパク質の安定同位体標識法の開 発-難発現高分子量タンパク質の立体構造解析に向けて

○大浪真由美<sup>1</sup>,杉木俊彦<sup>1</sup>,竹内恒<sup>2</sup>,嶋田一夫<sup>2,3</sup>,高橋栄夫<sup>2,4</sup> <sup>1</sup>バイオ産業情報化コンソーシアム,<sup>2</sup>産総研・バイオメディシナル 情報研究センター,<sup>3</sup>東大院薬,<sup>4</sup>横浜市大院・生命ナノ

# Development of Isotope Labeling Strategy using Yeast Expression System -for a structural analysis of difficult to express large molecular weight proteins-

 $\bigcirc$  Mayumi Ohnami<sup>1</sup>, Toshihiko Sugiki<sup>1</sup>, Koh Takeuchi<sup>2</sup>, Ichio Shimada<sup>2, 3</sup>, and Hideo Takahashi<sup>2, 4</sup>

<sup>1</sup> JBiC, <sup>2</sup> BIRC, AIST, <sup>3</sup> Grad. Sch. Pharm. Sci., The Univ. of Tokyo, <sup>4</sup> Grad. Sch. Nanobiosic., Yokohama City Univ.

In a structural analysis of proteins using NMR spectroscopy, we often experience proteins that are large and derived from eukaryote are difficult to express in *Escherichia coli*. Recently, we established a protein expression system using hemiascomycete yeast *Kluyveromyces lactis* (*K.lactis*), which enable the preparation of labeled proteins using glucose and ammonium chloride as a stable isotope source. The yeast expression system expresses some eukaryotic target proteins in larger quantity than in *E.coli* with a comparable amount of stable isotopes.

In this presentation, we established a method to deuterate proteins in *K.lactis*, which would be beneficial for a structural analysis of large molecular weight proteins. We also examined the selective labeling strategy of methyl groups of the IIe ( $\delta$ 1), Leu, and Val residues using amino-acid precursors under highly deuterated background. These new techniques open up the way for the structural analyses of large and eukaryotic proteins that are important but hard tackle with current prokaryote based-expression systems.

NMRによるタンパク質の構造解析においては安定同位体標識した蛋白質を大量に 得ることが研究を遂行するに当たり必須である。蛋白質の安定同位体標識には通常大 腸菌が用いられるが、真核細胞由来のタンパク質など目的タンパク質の発現が大腸菌 では困難である場合、酵母を用いた発現が有効である。近年、本研究室では酵母株*K. lactis*に注目し、発現系構築の基盤を築いてきた。*K. lactis*はグルコースを用いた恒常 的な分泌発現が可能であり、発現手法としての汎用性が高いことが示されている。本 研究では、*K. lactis*を用いたタンパク質発現系を、より高分子量のタンパク質立体構 造解析に拡張するため、タンパク質の重水素化条件の確立を行った。さらに重水素化 条件下でのIle、LeuおよびValの選択的メチル標識の導入を検討した。

[方法および結果] 重水素化培養法および選択的メチル標識の検討には*K. lactis* において高い発現がみられるmaltose-binding protein (MBP)を用いた。

Yeast Expression System, Isotope Labeling, large molecular weight proteins

○おおなみまゆみ,すぎきとしひこ,たけうちこう,しまだいちお,たかはしひでお

重水培養条件の検討:

まず菌体の重水への順化の第一段階として、軽水富栄養培地で3日間前培養した高濃度のK. lactisの菌体を重水最少培地に培地交換する手法を試みた。軽水高濃度培養から重水最少培地への交換は大腸菌の重水素化の順化第一段階に有効な手法である。しかしながら、K. lactisで通常の密閉容器を用いた振とう培養を実施したところ、重水

最少培地への培地交換後に菌体の増殖が急激 に減少し、MBPの発現も失われることが判明 した。このことから酵母の生育には十分な撹 拌に加えて、高い溶存酸素濃度が重要である ことが推測された。そこで、順化第一段階と して空気を培地中に供給しながら三角フラス コで旋回培養し、順化が進んだ菌体をさらに 重水最少培地に移し替えてファーメンターで 培養した。その結果、MBPの発現を確認する ことができた。精製したMBPの<sup>1</sup>H NMRスペク トルから、側鎖の非交換性プロトンが高度に 重水素化されていることが確認できた(Fig.1)。 また、質量分析を行った結果、重水素化率は92.1% であった。このようにして作製した重水素化タン パク質は高度な重水素化が必要な交差飽和実験に 適用可能であった。

選択的メチル標識の検討:

上記の重水培養法を用いて、重水素化条件下での Ile、LeuおよびValの選択的メチル標識を検討した。 まず、重水培養中に前駆体[methyl-<sup>13</sup>C, 3,3-D<sub>2</sub>] α-Ketobutyrate および [3-methyl-<sup>13</sup>C, 3,4,4,4- D<sub>4</sub>] α-Ketoisovalerateを添加した。その結果、Ileのδ1メ チルが選択的に標識される一方、LeuおよびValの メチルはほとんど標識されない結果となった (Fig.2)。一方、[3-<sup>13</sup>C] Sodium Pyruvateを添加し

たところ、Leu, Val, Ile(γ2), Ala, Metのメチルが標識 されているという大腸菌と同様の結果となった。



Fig. 1 <sup>1</sup>H NMR Spectra of undeuterated and deuterated MBP



Fig. 2<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC Spectrum of MBP

[考察および展望] 真核生物である酵母ではアミノ酸合成が細胞質のみならず、ミト コンドリア内でも行われることが知られている。Ileはミトコンドリア外でも合成され るのに対して、LeuおよびValはミトコンドリア内でのみ合成されることから、今回の 結果は、LeuおよびValの前駆体が効率良くミトコンドリアに取り込まれないことを示 している。一方、ピルビン酸はミトコンドリア内に取り込まれ、LeuおよびValに代謝 されていることから、現在異なる前駆体の検討を行っている。

### References

- 1. Sugiki T, Shimada I and Takahashi H (2008) J Biomol NMR 42, 159-162
- Goto NK, Gardner KH, Mueller GA, Willis RC and Kay LE (1999) J Biomol NMR 13, 369-374

# イネのSUMO転移反応における結合酵素E2の多重結合部 位の役割

〇土屋 渉,神藤平三郎,鈴木倫太郎,藤本 瑞,山崎俊正 農業生物資源研究所・タンパク質機能研究ユニット

# **Roles of Multi-Binding Sites of Conjugating Enzyme E2 in SUMOylation in Rice**

OWataru Tsuchiya, Heisaburo Shindo, Rintaro Suzuki, Zui Fujimoto, and Toshimasa Yamazaki

Protein Research Unit, National Institute of Agrobiological Sciences, Tsukuba, Japan.

Posttranslational modification of target proteins by the small ubiquitin-like modifier (SUMO) regulates many important cellular pathways. SUMOylation of target proteins requires a multistep process mediated by E1 (the activating enzyme), E2 (conjugating enzyme), and E3 (ligase) enzymes similar to those in the ubiquitinylation machinery. In this process, the transfer mechanism of SUMO from E1 to E2 has not been well clarified. In this study, to reveal the functional roles of interaction network among E1, E2 and SUMO, we performed the structure analysis of E2 binding domain (Ubl domain) of E1, E2 and SUMO1 from rice (*Oriza sativa*), and identified the binding sites to each of Ubl and SUMO1 on E2.

【序論】Small ubiquitin-like modifier (SUMO) は、ubiquitinと構造的に類似した翻訳後 修飾に関与するタンパク質であり、真核生物に広く保存されている。多岐にわたる標 的タンパク質のSUMO化は、転写制御、細胞周期、DNA修復およびストレス応答など 様々な細胞機能調節において重要な役割を担っている。SUMO化は3段階反応によっ て起こる。ATP存在下において活性化酵素E1がSUMOのC末端カルボキシル基をE1自 身の活性部位にチオエステル結合させた後、E1から結合酵素E2へのチオエステル転移 反応が起こる。最終段階で、直接あるいはリガーゼE3を介して、SUMOのC末端カル ボキシル基が標的タンパク質中の特定のLys残基のε-アミノ基とイソペプチド結合を 形成する。

E2はSUMO1、E1、E3および標的タンパク質のそれぞれと相互作用しSUMO転移機 構においてSUMO化を仲介する中心的役割を担っているが、現在までにその反応メカ ニズムを解明するための十分な構造生物学的知見は得られていない。よって、E2と各 タンパク質との間の相互作用を明らかすることは、SUMO化の分子メカニズムを理解 する上で重要である。本研究において我々はE1からE2へのSUMO転移機構を明らかに することを目的とし、イネ (*Oriza sativa*)由来E2、E1のE2結合ドメイン (Ublドメイン) およびSUMO1の構造解析ならびに結合部位の同定を行ない、E1-E2-SUMO間の相互作 用ネットワークの機能的役割について検討した。

SUMO化翻訳後修飾, チオエステル転移反応, 多重結合部位

○ つちやわたる、しんどうへいさぶろう、すずきりんたろう、ふじもとずい、やま ざきとしまさ

【結果と考察】<sup>13</sup>C/<sup>15</sup>N標識したイネ由来のE2を用いて多次元NMR法によりスペクト ル帰属を行なった。E2に対するSUMO1の相互作用部位を特定するため、<sup>15</sup>N標識した E2に対するSUMO1滴定による<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQCの化学シフト変化を測定した。その結果、 E2はSUMO1に対して結合能の異なる独立した2つの結合部位を持つことが示された。 いずれの相互作用もfast exchange limitであったが、第1群(第1結合部位)はほぼ2当量 のSUMO1の添加で飽和状態に達するのに対し、第2群(第2結合部位)は2等量を超え てから徐々に変化を示した。E2のN末端付近に存在する第1結合部位においては、 Arg14、Lys15、Arg18、Lys19などの残基が関与する一方で、E2のSUMO活性部位Cys94 近傍に広がる第2結合部位は、Lys75、Ser90、Thr92、Gln131、Tyr135の残基が結合に 寄与している (Fig. 1)。第1結合部位についてはヒトの系において既に報告された結 果<sup>1)</sup>と一致するが、第2結合部位の存在はこれまでに報告は無く、イネ由来E2が新規の 発見である。第1および第2結合部位に対する正確な解離定数を得るため、第2結合部 位の結合能を欠損させたE2 [K75A/S90A/T92A]変異体、および、第1結合部位の結合能 を欠失させたE2 [R18A/K19A]変異体を用いてNMR滴定実験を行った。その結果、第1 および第2結合部位に対する解離定数として、それぞれ $K_{d1} = 2.6 \mu M$ および $K_{d2} = 840$ μMの値が得られた。

E2とUblドメインについても、UblはE2 に対して強い結合を示し、その相互作用 がslow exchange limitであることがNMR によって明らかとなった。相互作用によ る化学シフト変化から、Ubl結合部位は E2におけるSUMO1の第1結合部位と空 間的に重複することが明らかとなった。 事実、E2第1結合部位に変異を導入した、 上記のE2 [R18A/K19A]変異体に対して UblとSUMO1のいずれも結合性を示さな いことがITC測定によって明らかとなり、 さらに、E2とSUMO1複合体にUblを添加 するとSUMO1はUblに置換すること、逆 にE2と結合したUblはSUMO1によって 置き換わらないことも示された。

上記のように、NMR 測定によってイ ネ由来 E2 には 2 つの異なる SUMO1 結



Fig. 1 Mapping of the residues on E2 that showed large chemical shift perturbation upon complex formation with SUMO.

合部位が存在し、高い結合能を示す第1結合部位は触媒活性残基 Cys94 から離れた位置にあること、SUMO1 と Ubl とは第1結合部位において競合し、Ubl の結合が優勢であることが明らかとなった。現在、これらの結果に対し、ITC 測定と X 線結晶構造解析によって更なる検証を進めると同時に、SUMO 転移機構に対する E1-E2-SUMO間の相互作用ネットワーク役割を、イネの in vitro SUMO 化のアッセイ系を構築し検討中である。

文献1) M. H. Tatham et al., Biochemistry, 42, 9959-9969 (2003).

# 細菌の走化性における連鎖的なシグナル伝達機構の構造 生物学的解明

○湊 雄一<sup>1</sup>,町山 麻子<sup>1</sup>,上田 卓見<sup>1</sup>,嶋田 一夫<sup>1,2</sup> <sup>1</sup>東大・院薬系 <sup>2</sup>産総研・バイオメディシナル情報研究センター

# Structural Elucidation of the Sequential Signal Transduction Mechanism in Bacterial Chemotaxis

○Yuichi Minato<sup>1</sup>, Asako Machiyama<sup>1</sup>, Takumi Ueda<sup>1</sup>, and Ichio Shimada<sup>1, 2</sup> <sup>1</sup>Grad. Sch. of Pharm. Sci., the Univ. of Tokyo, Tokyo, Japan. <sup>2</sup>BIRC, AIST, Tokyo, Japan.

The autophosphorylation of the P1 domain by the P4 domain in CheA, and the subsequent phosphotransfer from the P1 domain to CheY bound to CheA on the P2 domain, are important for the rapid signal transduction in bacterial chemotaxis. Here, to clarify the mechanism underlying the rapid sequential signalling, we performed cross-saturation (CS) experiments on the full-length CheA-CheY complex. The resonances from residues located around the catalytic residues of the P1 domain and CheY were significantly affected by the irradiation, in addition to those on the binding surface in the crystal structure of the P2 domain-CheY complex. These results suggest that the P1 domain and CheY interact with each other on their catalytic sites. The intensity reduction of the P1 domain caused by CS was about half of that of the P2 domain, suggesting that the P1 domain is under equilibrium between the CheY-bound state and unbound state, in the full-length CheA-CheY complex. This equilibrium might be important for the P1 domain to interact with both CheY and the P4 domain.

【序】細胞が刺激に対して迅速に応答するためには、多数の分子間で素早く連鎖的 にシグナルを伝達することが重要である。原核生物の走化性では、ATP が結合した

CheA の P4 ドメインが、P1 ドメイン上 の H48 を自己リン酸化する反応、およ び H48 が P2 ドメインに結合した CheY 上の D57 にリン酸基を転移する反応の 両方が、素早く連鎖的に起きることで、 迅速なシグナル伝達を達成している。



Fig.1 Schematic diagram of the domain structure of CheA and its phosphorylation reactions. The P4 domain binds to ATP, and donates an phosphate to H48 in the P1 domain (autophosphorylation). CheY binds to the P2 domain, and accept an phosphate from the phosphorylated P1 domain (phosphotransfer).

two-component system, cross-saturation, segmental isotope labeling

○みなとゆういち,まちやまあさこ,うえだたくみ、しまだいちお

本研究では CheA と CheY の結合様式を機能ドメインが全て正しく揃った状態で明ら かにすることにより、素早く連鎖的なシグナル伝達の機構を解明することを目的とし た。

#### 【方法】

≪試料調製≫大腸菌由来全長 CheA, CheY を大腸菌大量発現系にて発現し、これを硫 安沈殿、ゲル濾過クロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィーにて精製し た。Mn<sup>2+</sup>-phos-tag<sup>TM</sup> SDS-PAGE 解析により、調製した CheA, CheY および ATP の存在 下で、リン酸化 CheY が生成することを確認した。

≪区分標識法≫CheAのP1ドメインのシグナルを選択的に観測するため、[U-<sup>2</sup>H, <sup>15</sup>N] 標識を施したP1ドメインを含むセグメント(a.a. 1-153)および非標識のP2-5ドメイ ンを含むセグメント(a.a. 154-654)の蛋白質ライゲーションを行った。各セグメント を別々に発現させ、各セグメントに付加した chitin binding domain (CBD)を用いたア フィニティー精製、および CBD の切断の後、200 mM 2-mercaptoethanesulfonate (MESNA)存在下にて濃縮し、ライゲーション反応を行った。ただし、P1ドメイン を含むセグメントのC末端、およびP2-5ドメインを含むセグメントのN末端は、そ れぞれQ153G, A154C変異体を用いた。

≪CS 実験≫CheA 観測型 CS 実験は、[U-<sup>2</sup>H, <sup>15</sup>N] CheA 100  $\mu$ M に対し、非標識 CheY 200  $\mu$ M を添加したサンプルにて行った。CheY 観測型 CS 実験は、[U-<sup>2</sup>H, <sup>15</sup>N] CheY 100  $\mu$ M に対し、非標識 CheA 200  $\mu$ M を添加したサンプルにて行った。

【結果】

#### [1] 全長 CheA の NMR スペクトルの取得

CheA 全長の NMR スペクトルを測定したところ、ダイマーで約 14 万の分子量であ るにもかかわらず、約 150 個のシグナルが高感度で観測された。区分標識法と三重共 鳴実験を組み合わせてシグナルを帰属した結果、観測されたシグナルは主に P1, P2 ド メインに由来することが示された。

#### [2] CheA-CheY 間 CS 実験

CheA と CheY の相互作用界面を明らかにするために、全長 CheA, CheY それぞれを 観測対象とする交差飽和実験を両方行った。その結果、P2 ドメイン-CheY 複合体の結 晶構造における結合界面上の残基の強度減少に加えて、その半分程度の大きさの強度 減少が、P1 ドメインの H48 と CheY の D57 近傍の残基にも観測された(Fig.2)。

#### [3] CheA ならびに P1 ドメインに対する CheY 滴定実験

CS 実験で観測された、全長 CheA-CheY 複合体における、P1 ドメインと CheY の結 合様式の詳細を調べるために、全長 CheA ならびに P1 ドメインに対して CheY を滴定 する実験を行った。その結果、P1 ドメインだけでは解離定数が 100 µM を下回る相互 作用は観測されなかった一方、全長 CheA 中の P1 ドメインのシグナルには、解離定 数 1 µM 程度に対応する化学シフト変化が観測された。



Fig. 2 Results of the affected residues in the CS experiments.

(A) Mapping of the affected residues in the CheY-observed CS experiments.

(B)(C) Mapping of the affected residues in the CheA-observed CS experiments. (B) and (C) are the mapping of the P2 and P1 domains, respectively.

The darker color indicates stronger reduction of signal intensity for corresponding residues. The strongly affected residues are labeled.

In (A) and (B), the ribbon diagrams represent CheY and the P2 domain, respectively.

The residues surrounded by the squares (D57 in (A) and H48 in (C)) are the catalytic residues of CheY and the P1 domain, respectively.

【考察】

滴定実験において、P1ドメインと CheY の相互作用が、全長 CheA ではじめて観測 されたことから、本実験で観測された、P1ドメインと CheY の反応部位同士の相互作 用は、P1ドメインと、P2ドメイン上に結合した CheY との間の、複合体内相互作用 であることが示唆された(Fig,3)。このような、ドメイン単独では親和性が不十分で あるが、全長では、複合体内で相互作用することにより、生理的条件下での相互作用 が可能となる、という結合様式は、P1ドメインと CheY が結合・解離を迅速に繰り返 して、その結果素早く次の反応を開始する上で重要であると考えた。

また、CheA-CheY間CS実験において、P1ドメインの強度減少率がP2ドメインの 半分程度であったことから、全長 CheA-CheY 複合体における、P1ドメインと CheY の結合飽和度は50%程度であることが示唆された(Fig.3)。P1ドメインと CheYの結 合が飽和していないことは、P1ドメインが、CheY だけでなく P4ドメインとも反応 を行う上で重要であると考えた。

現在、区分標識法を利用し、CheY と P1 ドメイン、P2 ドメインそれぞれとの相互 作用に由来する CheY 上への強度減少を別々に抽出することを試みている。



Fig.3 Proposed CheA-CheY interaction model. We propose that the P1 domain is under equilibrium between the CheY-bound state and unbound state in the full-length CheA-CheY complex, and about half of the P1 domain is under the CheY-bound state (Keq ~1). 平行型四重鎖DNAで形成されるアデニン四量体 (A-カルテット)の研究 ○中野佑亮,太 虎林、長友重紀、山本泰彦 筑波大院数物

## Structural characterization of A-quartet formed in all-parallel G-quadruplex DNA

○Yusuke Nakano, Hulin Tai, Shigenori Nagatomo, and Yasuhiko Yamamoto Dept. of Chem., Univ. of Tsukuba

A G-quadruplex DNA is composed of stacked G-quartets, each of which involves the planar association of four guanine bases. In the center of each G-quartet, electrostatic repulsions among four closely-spaced carbonyl groups are reduced by a nearby cation. Similarly to the case of G-quartet, four adenine bases have been shown to be associated to form A-quartets in G-quadruplex DNAs. We have characterized the molecular structures of G-quadruplex DNAs formed from various DNA sequences such as d(TTAGGG), d(TTGAGG), and d(TTGAGGT), in order to elucidate the effects of the sequence on the G-quadruplex DNA structure possessing an A-quartet. In addition, NMR chracterization using  $^{15}NH_4^+$  revealed the cation binding sites in the G-quadruplex DNAs.

#### 序論

四重鎖DNAは、グアニンが連続する配列をもつDNAにより形成される特異的構造である。四重鎖DNAでは、グアニン4つがHoogsteen型塩基対により同一平面内で環状に連結したグアニン四量体構造(G-quartet(Fig.1))が形成され、G-quartetが複数存在する場合には、それらのπ平面のスタッキングが四重鎖DNAの立体構造の安定化に寄与している。また、四重鎖DNAの3<sup>3</sup>末端にG-カルテットが存在する場合には、3<sup>3</sup>末端のG-quartet同士のスタッキングにより、四重鎖DNAが二量体を形成することも明らかになっている<sup>1</sup>。さらに、隣接するG-quartet間にはカチオンが存在し、グアニンの酸素原子間の静電的反発を低減することにより四重鎖DNAの安定化に役立っている。本研究では、ヒトテロメアにおける繰り返し配列の基本単位であるd(TTAGGG)をモチーフとして設計した d(TTGAGG)とd(TTGAGGT)により形成される平行型四重鎖DNAで、アデニン四量体構造(A-quartet(Fig.1))が形成することを明らかにすると共に、カチオンとして<sup>15</sup>NH<sub>4</sub>+を用いることで、四重鎖DNAとカチオンの相互作用について解析した。



G-quartet, A-quartet,  $\pi$ - $\pi$  stacking

○なかのゆうすけ、たいこりん、ながともしげのり、やまもとやすひこ

#### 結果・考察

用いたDNA配列の<sup>1</sup>H NMRスペクトルで は、グアニンのNHプロトンに由来するシグナル (G<sub>NH</sub>)3 つが、10 - 12 ppmに観測され(**Fig. 2**)、

いずれのDNAでも対称性の高い平行型四重鎖 D N A  $((d(TTAGGG))_4)$ ,  $(d(TTGAGG))_4)$ , (d(TTGAGGT))<sub>4</sub>)が形成されることが確認され た。また、(d(TTGAGG))<sub>4</sub>と(d(TTGAGGT))<sub>4</sub>のア 12 デニンH2 (A4H2)に由来するシグナルが、この シグナルの通常のシフト値に比べて約 1.2 ppm の低磁場シフトを示した。この結果から、 (d(TTGAGG))<sub>4</sub>と(d(TTGAGGT))<sub>4</sub>のアデニンは、 隣接するG-guartetとのスタッキングにより A-quartetを形成することが示唆された。また、 (d(TTGAGGT))<sub>4</sub>のスペクトルでは、G<sub>NH</sub>シグナ ルとA4H2 シグナルの分裂が観測された。 NOESYによる解析の結果、分裂したそれぞれの GNHシグナルの間で化学交換によるクロスピー クが観測され、対応するA4H2 とNOEが観測さ れたことから、(d(TTGAGGT))4には、相互変換 する二つのコンフォメーションの存在が示され た。また、K+濃度の増大に伴い、相互変換反応 の平衡に変化が生じたことから、これらのコン フォメーションは、K+の結合部位の違いによっ て誘起されたものであることが示唆された。

次に、<sup>15</sup>NH<sub>4</sub>+を用いて各種NMR測定を行い、 四重鎖DNA内部のカチオン結合部位を決定し た。(d(TTGAGG))<sub>4</sub>-<sup>15</sup>NH<sub>4</sub>+の<sup>1</sup>H NMRスペクト ルと、<sup>15</sup>N-filteredスペクトル、NOESY、<sup>15</sup>N-<sup>1</sup>H HSQCによる解析の結果から(**Fig. 3**)、 (d(TTGAGG))<sub>4</sub>のカチオンの結合部位には2組 の異なる様式が存在することが明らかになった (**Fig. 4**)。



Fig. 2. <sup>1</sup>H NMR spectra of G-quadruplex DNAs formed from d(TTAGGG) (top), d(TTGAGG) (middle), and d(TTGAGGT) (bottom) at pH 6.80 and  $25^{\circ}$ C (top and middle), and  $5^{\circ}$ C (bottom), respectively.









**Fig. 4.** Schematic drawings of the G3-G6 region of  $(d(TTGAGG))_4$  and  $NH_4^+$  binding sites. Two different binding patterns were determined.

#### 結論

今研究で用いたDNA塩基配列により生じる平行型四重鎖DNAでは、G-quartet との $\pi$ - $\pi$ スタッキングによりA-quartetが形成することが明らかになった。また、 <sup>15</sup>NH<sub>4</sub>+を用いた解析により、A-quartetをもつ四重鎖DNAのカチオン結合部位を決 定することに成功した。

#### Reference

1. Y. Kato, T. Ohyama, H. Mita, and Y. Yamamoto, J. Am. Chem. Soc., 2005, 127, 9980-9981

# EB1による微小管ダイナミクス制御についての構造研究

○金場哲平<sup>1</sup>、森智行<sup>2</sup>、前崎綾子<sup>2</sup>、伊藤隆<sup>1</sup>、箱嶋敏雄<sup>2</sup>、三島正規<sup>1</sup> <sup>1</sup>首都大、理工 <sup>2</sup>奈良先端大、情報科学

### Structural studies of the regulation of microtubule dynamics by EB1

 $\bigcirc$  Teppei Kanaba<sup>1</sup>, Tomoyuki Mori<sup>2</sup>, Ryoko Maesaki<sup>2</sup>, Yutaka Ito<sup>1</sup>, Toshio Hakoshima<sup>2</sup> and Masaki Mishima<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Science and Engineering, Tokyo Metropolitan University <sup>2</sup>Department of Information Science, Nara Institute of Science and Technology

End-binding 1(EB1) is a key molecule in the regulation of microtubule(MT) dynamics. EB1 binds to MT with its N-terminal CH domain. Further, EB1 is thought to lead MTs to cell peripherals by interactions between its C-terminal domain and other plus-end tracking proteins, APC and CLIPs and cytoskeletal proteins that locate cell membrane.

We have attempted to reveal the molecular basis of MT-regulating mechanisms by EB1 using NMR. Chemical shift perturbation experiments of CH domain with tubulin, we found that CH domain bound to only polymerized tubulin specifically in solution. To identify the binding interface of EB1 CH domain with tubulin, we conducted the transferred-cross saturation measurements. In addition, we performed chemical shift perturbation experiments of EB1 C-terminal domain with APC C-terminal region and identified their binding regions.

【序論】

EB1は微小管集積因子(+TIPs)による微小管ダイナミクスの制御機構において中心 的な役割を果たしている。EB1はN末端のCHドメインにより微小管を特異的に認識し、 結合する。極低温電子顕微鏡による解析から、EB1は微小管の縫い目に当たるA格子 に特異的に結合、安定化することで微小管全体を安定化していると考えられている<sup>(1)</sup>。 また微小管と結合したEB1はそのC末端ドメインによりAPCやCLIPなどの他の+TIPs や細胞表層に位置する細胞骨格蛋白質と結合することにより微小管先端をその伸長 の目的地の一つである細胞膜に導く(アンカリング)。しかしこれらEB1による微小管 の認識機構や、アンカリング機構の詳細な分子機構は未だ明らかとなっていない。

本研究の目的はEB1による微小管ダイナミクスの制御機構の詳細な分子機構を明らかにすることである。EB1による微小管の認識機構について調べるため、化学シフト 摂動法やtransferred-cross saturation法<sup>(2)</sup>によるEB1のCHドメインと微小管を構成する 蛋白質tubulinとの相互作用解析を行った。またEB1による微小管アンカリング機構に ついて調べるため、EB1と結合する+TIPsとして癌抑制遺伝子産物APCに着目し、化 学シフト摂動法による相互作用の解析を行った。

EB1 +TIPs 相互作用解析

○ かなばてっぺい、もりともゆき、まえさきりょうこ、いとうゆたか、 はこしまとしお、みしままさき

#### 【実験】

#### ・EB1のCHドメインとtubulinの相互作用解析

EB1のCHドメイン(1-130)のクローニングを 行い、発現系を作成した。作成した発現系を用 いて大量発現、精製を行いNMRサンプルを調製 した。CHドメインによる微小管認識機構の詳細 を調べるため、tubulin脱重合阻害剤taxolによっ て重合させたtubulinとの結合実験、重合阻害剤 colchicineによって脱重合させたtubulinとの結合 実験を行った。またtransferred-cross saturation法 による結合界面の特定を行った。

#### ·EB1とAPCの相互作用解析

EB1のC末端ドメイン(189-268)とAPCのC末 端領域(2781-2819)について、化学シフト摂動法 による両者の相互作用領域の特定を行った。

【結果·考察】

### ・EB1のCHドメインとtubulinの相互作用解析

CHドメインとtaxolにより重合させたtubulin との結合実験を行ったところ、シグナルの消失 が見られたことから両者の結合を確認した。ま た脱重合させたtubulinとの結合実験では非結 合型のスペクトルが得られた。このことから溶 液状態においてもCHドメインは重合した tubulinに特異的に結合することを、NMRを用い て直接明らかにすることが出来た。



Fig.1 transferred-cross saturation experiment

(top)<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC spectra of CH domain with irradiation (right) and without irradiation (left). (bottom) The plot of signal intensity ratio.

Intensity ratio = I<sub>saturation</sub> / I<sub>reference</sub>



Fig.2 3D structures of CH domain Crystal structure of EB1 CH domain<sup>(3)</sup>. The binding regions are dark.

重水素化したCHドメインのサンプルを用いてtransferred-cross saturation法による tubulinとの結合界面の特定を行った(Fig.1)。その結果をCHドメインの結晶構造にマッ ピングを行った所(Fig.2)、結合界面は分子表面全体に分散していた。過去のmutation 実験においてもCHドメインのtubulinとの結合に重要な残基は分子全体に点在してい た事から<sup>(4)</sup>、CHドメインは分子表面全体を用いて重合したtubulinと結合していると予 想される。

#### ·EB1とAPCの相互作用解析

NMRを用いた結合実験からEB1のC末端ドメインとAPCのC末端領域の結合領域を 特定することができた。またEB1のAPCとの結合領域は、微小管上を移動するモータ 一蛋白質dynactinのサブユニットp150<sup>glued</sup>との結合領域と一致していた。このことから APCとp150<sup>glued</sup>は競合的にEB1と結合している可能性があるといえる。これら相互作用 ついては今後分子生物学的な実験等により明らかにしていく必要があるが、本研究の 結果はdynactinの運動開始のメカニズムについての知見を与える貴重な結果である。

(1)Sandblad, L., et al. (2006). Cell 127, 1415-1424

(2)Takahashi, H., *et al.* (2000). Nat. Struct. Biol. 1,53-58 (3)Hayashi, I. and Ikura, M. (2003). J. Biol. Chem. 278, 36430-36434

(4)Slep, K. C. and Vale, R. D. (2007). Mol. Cell 27, 976-991

# 溶液NMR法によるMBF1/Jun/Fos/DNA転写因子複合体の構 造解析

〇川崎久美子<sup>1</sup>,永井義崇<sup>1</sup>,広瀬進<sup>2</sup>,白川昌宏<sup>3</sup>,伊藤隆<sup>1</sup>,三島正規<sup>1</sup> <sup>1</sup>首都大・理工,<sup>2</sup>国立遺伝研,<sup>3</sup>京大・工

# Structural studies of the MBF1/Jun/Fos/DNA transcription factor complex by solution NMR

 $\bigcirc$ Kumiko Kawasaki<sup>1</sup>,Yoshitaka Nagai<sup>1</sup>, Susumu Hirose<sup>2</sup>, Masahiro Shirakawa<sup>3</sup>, Yutaka Ito<sup>1</sup> and Masaki Mishima<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Graduated School of Science and Engineering, Tokyo Metropolitan University, Hachioji, Japan.

<sup>2</sup>*National Institute of genetics, Mishima, Japan.* 

<sup>3</sup>*Graduated School of Engineering, Kyoto University, Kyoto, Japan.* 

Transcriptional coactivator MBF1 interacts with bZIP-type transcription factor and general transcription factor TBP. From recent studies, it is revealed that mbf1-null *Drosophila* mutants became shorter lifetime under conditions of oxidative stress.

In the present study, we performed structural studies of *Drosophila* MBF1/Jun/Fos/DNA quaternary complex. Our purpose is to reveal how MBF1 protects Jun from oxidation and interacts with Jun/fos/DNA and TBP. At present, we have succeeded to reconstruct the Jun/Fos/DNA complex and obtain its NMR spectra. We will discuss investigation of preparation quaternary complex sample, and MBF1 interaction with Jun/Fos/DNA and with TBP by NMR.

### ◆研究の背景と目的

転写コアクチベーターMBF1は、bZIP型転写因子と相互作用する。最近の研究から MBF1 欠損のショウジョウバエは酸化ストレス環境下で短寿命になることがわかって おり、MBF1 が酸化ストレス防御の役割を持つと示唆されている。Jun, Fos 蛋白質はヘ テロ二量体をとる bZIP型転写因子で、エンハンサー領域である DNA の AP-1site へ結 合し、転写を活性化させるが、Jun の 229 番目のシステインが酸化修飾されると DNA への結合できなくなり、活性を失う。MBF1 の存在下では、MBF1 が 229 番目のシステ インの酸化を防ぎ、Jun の DNA への結合活性を保つという報告がある。

本研究では、MBF1/Jun/Fos/DNA の4者複合体の立体構造解析を行い分子レベルで MBF1 が Jun の酸化を防御する機構を解明することを目的とする。また MBF1 は当初、 基本転写因子 TBP と共精製され、TBP と直接相互作用する因子として発見されており、 TBP との相互作用も興味深い。そこで MBF1 と TBP 相互作用を NMR により観測し、その 詳細に明らかにすることも目的としている。

Transcriptional coactivator, Transcription Factor Complex

○かわさきくみこ,ながいよしたか,ひろせすすむ,しらかわまさひろ,いとうゆた か,みしままさき 現在までに MBF1 単体の立体構造解析と Jun/Fos/DNA の再構成と NMR スペクトル取 得(Fig. 1)に成功している。

◆Jun/Fos/DNA複合体試料の調製

ショウジョウバエ由来のJun/Fos/DNA複 合体試料(Fig. 1)の収量は極めて低く、構 造解析や相互作用を議論できるようなNMR 測定は困難であった。特にFosの分解が問題 であった。そこで、Fosの発現系の再構築に 取り掛かった。チオレドキシンタグとの融 合蛋白質として発現させ、Fosの構造をより 安定化させ分解を防ぐことを試みた。

まず、fos遺伝子をpET-48ベクターへクロ ーニングし、Hisタグ、チオレドキシン融合 蛋白質発現できる発現系を作成した。

その結果、チオレドキシン融合のFosと見ら れるタンパク質が発現しており、可溶性画分に





存在することが確認できた。今後、jun遺伝子が組み込まれたプラスミドをさらに大 腸菌内へ組み込み、Fosとの共発現、DNAとの共精製を行っていく。

#### ◆TBPの試料調製、MBF1との相互作用実験

はじめにショウジョウバエ由来TBPの発 現・精製を行ったところ、TBPの多くが不溶性 画分に存在し、容易に凝集、分解を起こし蛋 白質の回収が極めて困難であった。そこで、 TBPの安定化を図るため、DNAとの共精製を試 みた。TBPを大腸菌内でGSTタグ融合タンパク 質として発現させ、大腸菌を超音波破砕し、 可溶性画分を用いて陰イオン交換クロマトグ ラフィー、アフィニティークロマトグラフィ ーを行った。GSTタグ融合TBPが存在する分画 を回収し、TATAboxの配列を含む短い2本鎖DNA を加えた。DNAはパリンドロミックな配列を用 い、1種類の1本鎖DNA同士で2本鎖を形成させたの ち、NMRの1D測定でイミノ領域のシグナルがでてい ることを先に確認済みである。その後、GSTタグを



Fig. 2  $^{\circ}$  H- $^{\circ}$  N HSQC black:0.025 mM  $^{15}$ N-labeled MBF1. gray:0.025 mM  $^{15}$ N-labeled MBF1 with TBP/DNA (1:1).

切断し、ゲル濾過クロマトグラフィーを行った。DNAを加えない場合では二量体の分子量の分画に存在していたTBPが、DNAとの共精製では、より低分子量の分画に存在し、 TBP/DNA複合体の単量体として回収することに成功した。<sup>15</sup>NラベルMBF1試料、<sup>15</sup>Nラベ ルMBF1とTBP/DNAを1:1の比で調製した試料を準備し、NMRで<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQCを測定した。

MBF1とTBP/DNAが1:1で存在する試料では、スペクトルにシグナル強度変化と化学シフト変化が見られた(Fig. 2)。結果を解析し、MBF1がTBP/DNAと相互作用する部位を調べていく。

# Dynamics Study of Aromatic Rings by the SAIL-NMR Method upon Ligand Binding

○楊淳竣<sup>1</sup>,武田光広<sup>2</sup>, JunGoo Jee<sup>1</sup>,小野明<sup>3</sup>,寺内勉<sup>3</sup>,甲斐荘 正恒<sup>1,2</sup> <sup>1</sup>首都大院・理工 <sup>2</sup>名大院・理 <sup>3</sup>SAILテクノロジーズ (株)

# Dynamics Study of Aromatic Rings by the SAIL-NMR Method upon Ligand Binding

 $\bigcirc$  Chun-Jiun Yang<sup>1</sup>, Mitsuhiro Takeda<sup>2</sup>, JunGoo Jee<sup>1</sup>, Akira Mei Ono<sup>3</sup>, Tsutomu Terauchi<sup>3</sup>, and Masatsune Kainosho<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Graduate School of Science and Engineering, Tokyo Metropolitan University. <sup>2</sup>Graduate School of Science, University of Nagoya. <sup>3</sup>SAIL Technologies.

#### Abstract

SAIL (Stereo-Array Isotope Labeling) provides new opportunities for studies of biomolecules by NMR. For instance, considerable information can be obtained by studying aromatic side-chains. Besides simplifying the signals, SAIL can suppress unwanted tight couplings, which are difficult to avoid with conventional labeling. The resultant superb qualities facilitate the characterization of the ring flipping in Phe and Tyr. Here, we report the application of the SAIL method to study protein-ligand interactions. Using proteins labeled by various SAIL-Phe and SAIL-Tyr residues, we observed the changes of the NMR signals upon ligand binding. The underlying dynamics will also be discussed.

An intimate relationship exists between the dynamics and the biological functions of proteins. NMR is an excellent tool for studying protein dynamics. NMR experiments can detect site-specific motions over a large timescale, ranging from picoseconds to seconds, with the aid of isotope labeling. However, studies of aromatic side-chain dynamics by NMR have been difficult, although non-covalent interactions through aromatic side-chains are crucial for structural stability and protein-ligand recognition. Insufficient chemical shift





dispersion hampers the analysis or even the assignment of chemical shifts with conventional uniformly-labeled samples. The existence of tight couplings further hinders unambiguous interpretation. SAIL (Stereo-Array Isotope Labeling), which is well-known as an optimal isotope labeling strategy for protein structure determination by NMR, provides excellent probes to study protein motion. In the case of aromatic amino acids, the alternative <sup>2</sup>H, <sup>13</sup>C-labeling patterns (Fig. 1) lead to not only NMR signal simplification, but also superb

# Keywords: SAIL, Protein-ligand interaction

○やんちゅんじん,たけだみつひろ,じゅんぐーじー,おのあきら,てらうちつとむ, かいのしょう まさつね spectral qualities, by removing the tight couplings. By taking full advantage of SAIL-Phe and SAIL-Tyr, we have studied aromatic motions upon ligand binding. We analyzed FK506-binding protein 12.6 (FKBP12.6) in this study. FKBP12.6 is a member of the FKBP family, and it also exhibits peptidyl-prolyl isomerase activity. It shares 83% sequence identity to FKBP12, has a nearly identical structure, and binds to the same immunosuppressive drugs (e.g. FK506 and rapamycin) with comparable affinities. Samples labeled with various types of SAIL-Phe or SAIL-Tyr were prepared, and we monitored the signal changes upon binding to two ligands, FK506 and rapamycin. Interestingly, the two ligands caused different changes in the aromatic flipping rates of a Tyr residue, although they showed almost identical binding modes in the crystal structures with FKBP12 (Fig. 2). Even though we observed line broadening in the case of rapamycin, FK506 generated separated peaks in  ${}^{1}H_{\delta}1$ - ${}^{13}C_{\delta}1/{}^{1}H_{\delta}2$ - ${}^{13}C_{\delta}2$  and  ${}^{1}H_{\epsilon}1$ - ${}^{13}C_{\epsilon}1/{}^{1}H_{\epsilon}2$ - ${}^{13}C_{\epsilon}2$  spectra, even at ambient temperature, suggesting a slower flipping rate. On the other hand, both ligands considerably reduced the hydroxyl proton exchange rates in all of the Tyr residues (Fig. 3). The complexes in H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O (1:1) caused splitting in the  ${}^{13}C_{\zeta}$  chemical shifts, originating from the two-bond isotope effect, which was not averaged due to the slow H-D exchange. We will discuss the relationship between the motions of the aromatic side-chains and the ligand binding.



Fig. 3 <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC spectra of FKBP12.6 labeled with  $\zeta$ -SAIL Tyr in an H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O (1:1) solution, at 30 degrees. Cross peaks indicate correlations through long-range coupling between <sup>1</sup>H<sub> $\delta$ </sub> and <sup>13</sup>C<sub> $\zeta$ </sub>. Left and right panels represent free and FK506-complexed FKBP12.6, respectively.

#### References

- 1. Kainosho, M. et al. (2006) Nature, 440, 52-57.
- 2. Takeda, M., Ono, A. M., Terauchi, T. & Kainosho, M. (2009) J Biomol NMR, 46, 45-49.
- 3. Takeda, M., Jee, J., Ono, A. M., Terauchi, T. & Kainosho, M. (2009) J Am Chem Soc, 131, 18556-18562.

# タキプレシンとリポ多糖複合体の構造解析

櫛引崇弘<sup>1</sup>、○神谷昌克<sup>1</sup>、相沢智康<sup>1</sup>、熊木康裕<sup>2</sup>、菊川峰志<sup>1</sup>、出村 誠<sup>1</sup>、川畑俊一郎<sup>3</sup>、 河野敬一<sup>1</sup> <sup>1</sup>北大・院生命 <sup>2</sup>北大・院理 <sup>3</sup>九大・院理

### Structural analysis of Tachyplesin-LPS complex

Takahiro Kushibiki<sup>1</sup>, OMasakatsu Kamiya<sup>1</sup>, Tomoyasu Aizawa<sup>1</sup>, Yasuhiro Kumaki<sup>2</sup>, Takashi Kikukawa<sup>1</sup>, Makoto Demura<sup>1</sup>, Shun-ichiro<sup>3</sup> Kawabata, and Keiichi Kawano<sup>1</sup> <sup>1</sup>Graduate School of Life Science, Hokkaido University, Sapporo, Japan. <sup>2</sup>Graduate School of Science, Hokkaido University, Sapporo, Japan. <sup>3</sup>Graduate School of Science, Kyushu University, Fukuoka, Japan.

Tachyplesin (TP) is an antimicrobial peptide found in hemocytes of the horseshoe crab *Tachypleus tridentatus*. TP is a 17-residue peptide containing six cationic residues and two dislfide bonds, amidated its C termini. It has been reported that TP binds to lipopolysaccharide (LPS), a major component of Gram-negative bacteria. LPS-binding antimicrobial peptides can neutralize LPS-induced toxicity and thus are potentially useful for treatment of septic shock. To gain a better understanding of the LPS recognition of TP, we performed the structural analysis of TP in the presence of LPS.

In this study, we performed CD, fluorescence and NMR spectroscopies for TP with LPS. Based on these results, the model structure of TP-LPS complex was proposed by docking simulation.

【緒言】グラム陰性菌の外膜にはリポ多 糖(LPS)が含まれており、敗血症を引き起 こすことが知られている。敗血症は世界 的に深刻な病気であり、未だ有効な治療 法は確立されていない。そのため、LPS をターゲットとしている抗菌ペプチド の研究は、新たな治療薬の開発に繋がる と期待されている。しかし、抗菌ペプチ



Fig. 1 Primary structure of tachyplesin I

ドの構造と活性の相関およびLPSに対する作用機構の詳細については不明な点が多い。 本研究ではカブトガニ由来の抗菌ペプチドであるタキプレシンI (TP) (Fig. 1)とLPSの 複合体の立体構造解析を行い、抗菌ペプチドの構造と機能の詳細な関係を明らかにし、 細菌に対する抗菌ペプチドの作用機序の一端を明らかにすることを目的とする。

Antimicrobial peptide, LPS, trNOE

○くしびきたかひろ、かみやまさかつ、あいざわともやす、くまきやすひろ、きくか わたかし、でむらまこと、かわばたしゅんいちろう、かわのけいいち 【実験】LPSによるTPの構造変化を調べるために、 紫外波長領域(190-250 nm)のCD測定を行った。次 にTPの内部トリプトファンの蛍光およびアクリ ルアミドによる蛍光の消光を、LPS存在下・非存 在下で測定した。さらにTPにLPSを滴定し、 1D-NMRおよびTr-NOESYの測定も行った。 Tr-NOESYの結果を用いてLPS結合状態でのTPの 立体構造を計算し、ドッキングソフト(AutoDock) によりLPSとTPの複合体構造を求めた。

【結果と考察】TPの紫外部CDスペクトルは逆平 行βシートとターン構造を示す。LPSの添加によ り、スペクトルは変化するが、CDバンドの波長 はおおそよ同様の値を示した。このことはLPS存 在下でTPの構造変化は小さいことを示唆する。次 に蛍光スペクトルを測定した。TPの蛍光スペクト ルはLPSの添加により30 nmほどブルーシフトし た。このことは、TPのトリプトファン残基がLPS との相互作用に関わっていることを示す。また、 アクリルアミドによる蛍光消光実験の結果はTP のトリプトファン残基がアクリルアミドから保 護された状態にあることを示し、LPSミセル内部 にトリプトファン残基が埋もれた状態にあるこ とを示唆した。NMRによるLPSの滴定実験により、 TPのN、C末端領域のアミノ酸残基の原子に帰属 されるピークが選択的に幅広化し、TPの両末端部 分の領域がLPSとの結合部位であることが示唆さ れた。LPS存在下でのtrNOE測定によりLPS結合状 態でのTPの構造計算を行った(Fig. 2)。最終的にこ れらの結果を元にTP-LPS複合体のドッキング計 算を行った。

ドッキング計算で得られた複合体構造からTP の塩基性残基がLPSの糖部分に、Trp2やPhe4が脂 肪鎖に配向することが示唆された(Fig. 3)。



Fig. 2 NOESY spectra for TP and TP-LPS.



Fig. 3 Model structure of TP-LPS complex.

**P35** 

# NMR 解析に基づくマウス外分泌ペプチド ESP4 の立体構造 と受容体特異的認識に関する研究 〇谷口 雅浩<sup>1</sup>、吉永 壮佐<sup>1</sup>、はが 紗智子<sup>2</sup>、東原 和成<sup>2</sup>、 寺沢 宏明<sup>1</sup>

1熊本大学大学院薬学教育部、2東京大学大学院農学生命科学研究科

# Structure and specific ligand-receptor recognition mechanism of mouse peptide ESP4 based on NMR analyses

⊙Masahiro Taniguchi<sup>1</sup>, Sosuke Yoshinaga<sup>1</sup>, Sachiko Haga<sup>2</sup>, Kazushige Touhara<sup>2</sup>, Hiroaki Terasawa<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kumamoto University

<sup>2</sup> Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo

Pheromones are defined as chemical substances that convey information about social and reproductive behaviours in the same species. Recently, we identified a male-specific 7 kDa peptide from the extraorbital lacrimal gland (ELG) and named the peptide <u>exocrine</u> gland-<u>secreting peptide 1 (ESP1)</u>. ESP1 is a member of a new multigene family, which consists of 38 genes<sup>2</sup>). ESP4 is expressed in ELG, Harderian gland and submaxillary gland of both male and female. The aim of this study is to elucidate a ligand-receptor recognition mechanism of the ESP family based on structural analyses. We found that distribution of electrostatic surface potential of ESP4 is quite different from that of ESP1, which is important for the VSNs-stimulating activity of ESP1. We discuss about structure-activity relationship of ESP4 and ESP1 based on NMR analyses.

【序論】

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

東原らは、オスマウスの涙より分泌される新規ペプチドを同定した<sup>1)</sup>。このペプチ ドが外分泌腺に分泌されることから、ESP(<u>exocrine gland-secreting peptide</u>)1と命名 し、38種類からなる新規の多重遺伝子ファミリー(ESP ファミリー)を構成するこ とを明らかにした<sup>2)</sup>。ESP4は、外分泌腺のうち、眼窩外涙腺、顎下腺、ハーダー腺に 分泌されており、ESP1とのアミノ酸配列の相同性が高い。我々は、ESP4が ESP1と 異なる受容体で認識されることを示唆する結果を得ている。

フェロモン、ESPファミリー、特異的認識

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

本研究は、ESP4 の立体構造および受容体認識機構を解明し、構造生物学の観点から、受容体の厳密なリガンド識別機構を明らかにすることを目的とする。

#### 【実験】

<sup>13</sup>C/<sup>15</sup>N 標識した ESP4 を大腸菌の発現系により大量に発現させ、ニッケルアフィニ ティクロマトグラフィーにより粗精製を行い、ゲル濾過クロマトグラフィー、逆相ク ロマトグラフィーにて精製した。精製した試料を用いて、各種の多核多次元 NMR 測 定を行い、信号の帰属を行った。また、詳細な立体構造情報を得るために、遠距離の <sup>1</sup>H 間 NOE 信号を取得することを目的として、α-ケト酸を用いて Ile/Val/Leu のメチル を選択的に標識した試料を調製し 3D-NOESY 測定を行った。NMR 測定は Bruker 社製 クライオプローブ付属 AVANCE600 を用い、スペクトル解析には Olivia を使用した。

【結果と考察】

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

ESP4 単量体の立体構造決定に向けて、<sup>13</sup>C/<sup>15</sup>N 標識した ESP4 を用いて 各種の三次 元測定を行い、NMR シグナルの帰属を完了した。<sup>15</sup>N および<sup>13</sup>C-NOESY スペクトル から得られる<sup>1</sup>H 間の距離情報と、HNHA スペクトルおよび化学シフト値から得られ る主鎖二面角の情報をもとに立体構造解析を行った結果、ESP4 は C 末端領域に ESP1 には見られないヘリックス構造を持つことが示唆された。当研究室で立体構造を決定 した ESP1 と比較すると、ESP4 の表面における電荷分布は、ESP1 の受容体結合面に おける電荷分布と大きく異なることが推察された。ESP4 に特徴的な C 末端領域の ヘリックス構造の存在と、分子表面における電荷分布の違いの関与を明らかにするた めに、ESP4 の立体構造決定に向けて NMR 解析を進めている。

【展望】

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

【参考文献】

<sup>2)</sup> Kimoto H. et al., Current biology, **17**, 1879-1884 (2007)

<sup>3)</sup>Luo M. et al., Current Opinion in Neurobiology, **14**, 428-434 (2004)

<sup>&</sup>lt;sup>1)</sup> Kimoto H. *et al.*, *Nature*, **437**, 898-901 (2005)

ピロ化Aβのオリゴマー形成に関する構造生物学的研究

○岩本 成人<sup>1</sup>、斉藤 貴志<sup>2</sup>、河野 俊之<sup>3</sup>、西道 隆臣<sup>2</sup>、
寺沢 宏明<sup>1</sup>
<sup>1</sup>熊大院・薬、<sup>2</sup>理研・BSI、<sup>3</sup>三菱化学・生命研

Structural study for oligomerization of pyroglutamyl-amyloid beta peptides • Shigeto Iwamoto<sup>1</sup>, Takashi Saito<sup>2</sup>, Toshiyuki Kohno<sup>3</sup>, Takaomi C. Saido<sup>2</sup>, Hiroaki Terasawa<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Facul. of Life Sci., Kumamoto Univ., <sup>2</sup>RIKEN BSI, <sup>3</sup>Mitsubishi Kagaku Inst., Life Sciences

Amyloid beta peptides (A $\beta$ ) are thought to be neurotoxic polypeptide in <u>A</u>lzheimer's <u>disease</u> (AD), one of the most common pathology of late-onset dementia. Previously, it was said that neurotoxicity of AD was caused by amyloid fibrils. However, recent physiological studies indicate that A $\beta$  oligomers, intermediates in the formation of amyloid fibrils, may be potent neurotoxins in AD patients. N-terminal pyroglutamyl-A $\beta$  peptides (A $\beta$  (3pE)) have been reported to be resistant to degradation and prone to aggregation. Moreover, A $\beta$  (3pE) predominantly comprises senile plaques in AD patients. In order to elucidate the role of A $\beta$  (3pE) on the formation of A $\beta$  oligomers, we performed solution NMR analyses of A $\beta$  (3pE) and A $\beta$ . Our results indicate that A $\beta$  (3pE) may play a critical role in the formation of A $\beta$  oligomers by forming a  $\beta$ -sheet at the N-terminal regions.

【背景・目的】

社会の高齢化とともに、認知症の患者数は増加の一途をたどっている。主要な認知 症の一つであるアルツハイマー病 (AD) は、患者数が世界で1800万人に達しており、 早期の診断・予防・治療法の確立が求められている。アミロイドベータペプチド (A  $\beta$ ) は、アルツハイマー病 (AD) 患者に典型的病理として認められる老人斑の構成主 体である。従来、老人斑を形成するアミロイド線維が、ADの神経毒性の原因と考え られてきた。しかし、近年、アミロイド線維を形成する前の中間体であるA $\beta$ オリゴ マーが、より強い毒性を有するということが示されてきた[1]。A $\beta$ は主に、カルボキ シル末端の長さが異なるA $\beta$  (1-40) とA $\beta$  (1-42) からなり、A $\beta$  (1-42) は凝集性が 高いことが知られている。また、A $\beta$ はアミノ末端のピロ化により、さらに毒性が強 まるという報告もある[2]。ピロ化A $\beta$ は、アミノ末端の1,2番目のアミノ酸がアミノ ペプチダーゼによって切断され、3番目に位置するグルタミン酸の側鎖がグルタミル シクラーゼにより環化されることで生じる。さらに、老人斑を構成するA $\beta$ には様々 な分子種が存在するが、ピロ化A $\beta$ は健常者に比べてAD患者に多いことも知られてい る[3]。本研究は、毒性が強いとされるピロ化A $\beta$ についてNMR解析を行い、オリゴマ ー形成におけるピロ化A $\beta$ の果たす役割を明らかにすることを目的とする。

キーワード:アミロイドベータペプチド、アルツハイマー病、NMR

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

#### 【実験】

<sup>15</sup>N 標識、<sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N 標識 A  $\beta$  を遺伝子組換え大腸菌を用いて大量発現させた。ニッケ ルアフィニティークロマトグラフィーによる粗精製の後、YUH(Yeast Ubiquitin Hydrolase)によってタグ部を切断し、逆相クロマトグラフィーを用いて精製を行った。 得られた安定同位体標識 A  $\beta$  を用いて、<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC 測定、各種 3 次元測定を行った。 また、凝集能の高いピロ化 A  $\beta$  についても、同様に精製法を確立した。さらに、安定 同位体標識したピロ化 A  $\beta$  を用いて、<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC 測定、各種 3 次元測定による主鎖 帰属を進めた。NMR 測定は、Bruker 社の 500 MHz, 600 MHz (CRYOPROBE 付)の NMR 装置を用いて行い、スペクトル解析には NMRPipe, Olivia を使用した。

#### 【結果・考察】

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

安定同位体標識 A β を用いた各種多核多次元 NMR 測定の結果、ピロ化 A β のモノ マー状態のコンフォメーションは、その毒性に強く関与しないことが示唆された。さ らに、化学シフト値に基づく二次構造予測を行ったところ、ピロ化 A β では、A β と 比較して、アミノ末端領域が β ストランド傾向に大きく変化していることが分かった。 また、様々な温度条件下で<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC スペクトルを測定したところ、ピロ化 A β で は、A β に比べ、アミノ末端領域のシグナル強度が、温度上昇に伴い著しく減少した。 これらの結果から、ピロ化 A β は、アミノ末端における β シート構造の形成と、アミ ノ末端同士の分子間相互作用によって、低分子オリゴマーを形成しやすくなっている 可能性が示唆された。

さらに、光架橋法である PICUP (Photo-Induced Cross-linking of Unmodified Proteins) [4] を行った結果、A $\beta$  (1-40) では、ピロ化によって低分子オリゴマーの形成が促進 されることが分かった。その一方、A $\beta$  (1-42) では、高分子量のオリゴマー形成が抑 制され、4 量体以下の低分子オリゴマーが増加する可能性が示唆された。また、PICUP によって架橋した A $\beta$  (1-40) オリゴマーについて、逆相クロマトグラフィーを用い ることで、モノマーとダイマー、トライマーを分離することができた。

【展望】

PICUP によって安定化した A $\beta$  オリゴマーについて NMR 測定を行い、A $\beta$  のオリゴ マー化に関与するアミノ酸残基を特定する。また、A $\beta$  とピロ化 A $\beta$ 、および各 A $\beta$  オ リゴマーをラット脳内に投与した後、行動実験と MRI 測定によって、神経毒性を発 現する A $\beta$  分子種を同定する。さらに、神経障害を引き起こす A $\beta$  オリゴマーのサイ ズを同定する。

【参考文献】

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

Mal TIRドメインの溶液構造 狩野裕考<sup>1</sup> 榎園能章<sup>2</sup> ○久米田博之<sup>2</sup> 小椋賢治<sup>2</sup> 瀬谷司<sup>3</sup> 稲垣冬彦<sup>2</sup> <sup>1</sup>北海道大学大学院 生命科学院 構造生物学研究室 <sup>2</sup>北海道大学大学院 先端生命科学研究院 構造生物学研究室 <sup>3</sup>北海道大学大学院 医学研究科免疫学分野

# Solution structure of Mal TIR domain.

Hirotaka Kanou<sup>1</sup>, Yoshiaki Enokizono<sup>2</sup>, ○Hiroyuki Kumeta<sup>2</sup>, Kenji Ogura<sup>2</sup>, Tsukasa Seya<sup>3</sup>, and Fuyuhiko Inagaki<sup>2</sup> <sup>1</sup>Lab. Struct. Biol., Grad. Sch. Life Sci., Hokkaido Univ. <sup>2</sup>Lab. Struct. Biol., Advanced Life Sci., Hokkaido Univ. <sup>3</sup>Dep. Microbiol. Immunol., Grad. Sch. Med.

Toll / interleukin-1 receptor (TIR) domain is a key mediator in the Toll-like receptor (TLR) signaling. The adaptor protein MyD88 adapter-like (Mal) is involved in the MyD88-dependent pathway downstream of TLR2 and TLR4. It acts as a bridging adapter between the receptor and the sorting adapter MyD88. The homo- and hetero-oligomerization of the TIR domains of these receptors and adaptors brings about the activation of NF- $\kappa$ B and IRF-3, which regulate the synthesis of pro-inflammatory cytokines and IFN- $\beta$ , respectively. Here, we solved the solution structure of the homo-oligomerization defective mutant of TIR domain of Mal, and will discuss the TIR-TIR interaction of the TLRs and adaptor proteins.

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

TIRドメインを含む細胞内アダプター分子には、Myeloid differentiation primary response gene88 (MyD88), MyD88 adaptor-like (MalまたはTIRAP), TIR containing adaptor molecule-1 (TICAM-1またはTRIF)および2 (TICAM-2またはTRAM), とsterile α-motif and HEAT/armadillo repeats (SARM)の5種がある. MalはTLR-1/TLR-2または TLR-6/TLR-2ヘテロダイマーおよびTLR4の下流に存在し, MyD88を経由しNF-κBを産 生する. TICAM-1はTLR3またはTLR4の下流に存在し、Mal / MyD88経路とは独立に 機能し、インターフェロンを産生する. TICAM-2はTLR-4からTICAM-1へのシグナル 伝達を仲介する. このように各TIRドメインは、厳密に相互作用相手となる他のTIR ドメインを識別してシグナルを正確に下流へと伝達する.

キーワード: Mal, TIRドメイン

かのう ひろたか, えのきぞの よしあき, ○くめた ひろゆき, おぐら けんじ, せ や つかさ, いながき ふゆひこ これらのアダプターTIR ドメインのうち MyD88 の構造が他のグループから既に報告されており,我々が昨年のNMR 討論会において,TICAM-1 および TICAM-2 について報告した.本発表では,Mal-TIR の構造解析を行い,MyD88 およびレセプターTIR ドメインとの相互作用について考察を行う.また,他のレセプターおよびアダプター TIR ドメインとの構造比較から,TLR 下流における TIR ドメインを介したシグナル伝 達機構全般について考察を行う.

[結果・考察] 野生型ヒト由来MalのTIRドメインは他の多くのTIRドメインと同様に 高い濃度域(µMオーダー)において自己会合性を示すため、構造解析が困難であっ た.我々が以前に作成したTICAM-1-TIRおよびTICAM-2-TIRの自己会合体形成を抑制 するBB-loop上の一アミノ酸変異体をMal-TIRに導入しても、自己会合性を抑制できな かった.そこで、他のアダプターTIRドメインをベースにしたMalの立体構造予測およ びオルソログを用いた変異実験による検討、さらに[<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N] HSQCを用いた溶液条件 の検討を行う事で、高い濃度域においても自己会合を抑制したヒト由来Mal TIRドメ インの変異体を得る事に成功した.この変異体を用いて各種NMR測定による信号帰属 およびCYANAを用いた立体構造決定を行った(下図).



Fig. Solution structures of Mal TIR domain. (A; 20 ensemble, B; ribbon diagram)

得られたMalのTIRドメインの立体構造は、レセプターおよびアダプター由来のTIR ドメイン同様にα/β/αの三層からなるflavodoxin-like foldを有していた.そして静電ポ テンシャルを分子表面にマッピングしたところ、変異箇所周辺は大きく塩基性面を呈 していた.この事からTICAM-1およびTICAM-2とは異なる面で、静電相互作用を介し た自己会合が示唆された.現在、得られた構造を基にレセプターからMyD88へとシグ ナルを伝達する分子機構についてMalの機能解析を行っている.

# In-cell NMR を用いた生細胞内におけるカルモジュリンN末端ドメインの高次構造解析

○細谷沙織<sup>1</sup>,濱津順平<sup>1</sup>,佐々木敦子<sup>1</sup>,榊原大介<sup>1</sup>,三島正規<sup>1</sup>, 吉益雅俊<sup>2</sup>,林 宣宏<sup>3</sup>,伊藤 隆<sup>1</sup> <sup>1</sup>首都大院・理工,<sup>2</sup>理研・生体超分子,<sup>3</sup>東工大院・生命理工

# Structural analysis of Calmodulin N-terminal domain in living cells by in-cell NMR spectroscopy

○Hosoya Saori<sup>1</sup>, Hamatsu Junpei<sup>1</sup>, Atsuko Sasaki<sup>1</sup>, Daisuke Sakakibara<sup>1</sup>, Masaki Mishima<sup>1</sup>, Masatoshi Yoshimasu<sup>2</sup>, Nobuhiro Hayashi<sup>3</sup> and Yutaka Ito<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Chemistry, Tokyo Metropolitan University;

<sup>2</sup>Research Group for Bio-supramolecular structure and function, RIKEN; <sup>3</sup>Department of Life Science, Graduate School of Bioscience and Biotechnology, Tokyo Institute of Technology

Recently we showed the structure of the putative heavy-metal binding protein TTHA1718 from *Thermus thermophilus HB8* overexpressed in *Escherichia coli* cells, which is the world first 3D protein structure calculated exclusively on the basis of information obtained in living cells. In this presentation, as one of the examples of the application of our strategies, we report our recent in-cell NMR studies of the N-terminal domain of rat Calmodulin (CaM-N) overexpressed in *E. coli* cells. Rapid data collection using nonlinear sampling with maximum entropy processing was employed for the measurement of 3D triple-resonance NMR spectra. Approximately 70% of backbone resonances of CaM-N were assigned exclusively from the data obtained in living *E. coli* cells. Side-chain resonance assignment and the analysis of 3D NOESY spectra of CaM-N in *E. coli* cells are in progress.

### 【序】

カルシウム結合蛋白質であるカルモジュリン(以下CaMと略記)は真核細胞内に普遍的に存在しており、既知のカルシウム依存性の細胞機能のほとんどに関与している. CaMのN末端およびC末端はそれぞれ2つのEFハンドを持つ球状ドメインで構成され、これら2つの球状ドメインは中心が折れ曲がりフレキシブルに動くaへリックスによって結ばれている.

CaMについては、Ca<sup>2+</sup>と結合していないapo-form、Ca<sup>2+</sup>と結合したholo-formの双方で構造生物学的研究がなされており、Ca<sup>2+</sup>と結合することによって、EFハンドを構成するヘリックスの配向が変わって疎水部分が外側にむき出しになり、他の蛋白質と相互作用することで活性調節を行うことが明らかになっている。このように、CaMは周囲のCa<sup>2+</sup>の濃度変化に反応して立体

キーワード: In-cell NMR, 異種核多次元NMR, 立体構造

○ほそや さおり, はまつ じゅんぺい, ささき あつこ, さかきばら だいすけ, みしま まさき, よします まさとし, はやし のぶひろ, いとう ゆたか 構造を変化させることで機能を発揮すると考えられることから、細胞内の環境変化に伴うCaMの 実際の挙動を生細胞内において「その場観察」することに対する関心が高まっている.

そこで本研究では、CaMのN末端ドメイン(以下CaM-Nと略記)に着目し、in-cell NMRによ る高次構造解析を試みた. In-cell NMRは生細胞内から蛋白質のNMRシグナルを観測する手 法で、本研究室ではこのin-cell NMRを利用し世界で初めて生細胞内における蛋白質の高次 構造解析に成功している[Sakakibara et al. 2009].

#### 【実験,結果,および今後の展望】

大腸菌内大量発現系を用いて、in-cell NMR 法による細胞内 CaM-N の <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC 測定、および 3D HNCA、HN(CO)CA、HNCO、CBCANH、CBCA(CO)NH の測定を行った. 3D 三重共鳴 NMR の間接観測軸には非線形サンプリング法を用い、短時間で良好なスペクトルを得ることに成功した.スペクトルを解析した結果、主鎖シグナルの約 70%の帰属に成功した (Figure 1a).帰属されなかった約 30%の領域は Ca<sup>2+</sup>結合領域に近接しており、当該領域が Ca<sup>2+</sup>非存在下でフレキシブルな性質を示すことにより、主鎖 NMR シグナルがブロードニングし ている可能性が考えられる.

さらに、NOE 由来の高次構造情報の取得を試みた. 同様に非線形サンプリング法を適用す ることによって、短時間で良好な 3D <sup>15</sup>N-separated NOESY-HSQC スペクトルを得た. シー クエンシャルな H<sup>N</sup>-H<sup>N</sup> NOE (Figure 1b)に加えて long range の NOE も観測されていること から、in-cell NMR を用いた CaM-N の立体構造解析は十分可能であることが示唆される. 現 在、3D 三重共鳴 NMR を用いて蛋白質側鎖 NMR シグナルの帰属を進めるとともに、3D <sup>15</sup>N-separated NOESY-HSQC スペクトルの解析を行っている. さらに、メチル基選択的 <sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C 標識試料を用いた、メチル基間の距離情報の選択的解析も計画しており、生細胞内環 境での立体構造解析を目指す.



**a**. 2D <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC spectrum of the <sup>13</sup>C/<sup>15</sup>N-labelled CaM-N in living *E.coli* cells. Cross peaks are labelled with their corresponding backbone assignments. **b**. <sup>1</sup>H<sup>N-1</sup>H cross-sections of the 3D <sup>15</sup>N-separated NOESY-HSQC spectrum corresponding

**b**. <sup>1</sup>H<sup>N</sup>-<sup>1</sup>H cross-sections of the 3D <sup>13</sup>N-separated NOESY-HSQC spectrum corresponding to the <sup>15</sup>N frequencies of residues from Glu6 to Ile9. Sequential H<sup>N</sup>-H<sup>N</sup> NOEs are represented by lines.

**P39** (発表取消のため欠番)

 <sup>19</sup>F標識タンパク質を用いたヒト細胞における in-cell NMR
〇村山秀平<sup>1</sup>, 猪股晃介<sup>1</sup>, 大野綾子<sup>2</sup>, 大西 秀典<sup>3</sup>, 杤尾豪人<sup>1</sup>, 白川昌宏<sup>1</sup>
<sup>1</sup>京大・工学研究科
<sup>2</sup>徳大・ヘルスバイオサイエンス研究部
<sup>3</sup>岐阜大・医・小児科

# <sup>19</sup>F NMR spectroscopy of proteins in human cells

 $\bigcirc$ Syuhei Murayama<sup>1</sup>, Kohsuke Inomata<sup>1</sup>, Ohno Ayako<sup>2</sup>, , Hidehito Tochio<sup>1</sup>, Masahiro Shirakawa<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Graduate School of Engineering, Kyoto University, Japan.

<sup>2</sup>Graduate School of Nutrition, The University of Tokushima, Tokushima, Japan.

<sup>3</sup> Department of Pediatrics Graduate School of Medicine, Gifu University, Gihu, Japan

In-cell NMR is an isotope-aided NMR technique that enables observations of conformations and functions of proteins in living cells at the atomic level. So far, the method has relied on 2D <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N correlation spectra of uniformly <sup>15</sup>N-labeled proteins in cells. However, by employing site-specifically labeled proteins, in-cell spectra are expected to be greatly simplified, and thus the analysis will be facilitated. Shorter measurement time is also expected as 1D NMR is enough to resolve all NMR signals in such systems. To this end, in this study, we examine in-cell <sup>19</sup>F 1D NMR spectroscopy for proteins that are labeled with <sup>19</sup>F. We employed FKBP12, a target protein of various immunosuppressants, and its in-cell <sup>19</sup>F NMR successfully demonstrated the formation of specific complexes between the protein and extracellularly administered immunosuppressants. Moreover, it was suggested by the in-cell experiments that the FKBP12-rapamycin complex interacted with endogenous proteins, which was not seen for the FKBP12-FK506 complex in the cells.

### 緒言

哺乳動物 in-cell NMR により、生きた細胞内におけるタンパク質の安定性や タンパク質・分子間の相互作用などが解析されてきた[Inomata, K. et al. Nature 458, 106-109 (2009)]。これまでの方法では、<sup>15</sup>N により均一に同位体標識された タンパク質を細胞内に導入し、これを二次元<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N 相関スペクトルにより観察し ていたが、細胞内のタンパク質濃度が低い(10 μM 以下)ため、現状では数時間 の測定を要するという問題があり、測定時間の短縮が求められていた。本研究

in-cell NMR,<sup>19</sup>F標識タンパク質,FKBP12

○むらやましゅうへい,いのまたこうすけ,おおのあやこ,とちおひでひと, しらかわまさひろ では、アミノ酸選択的に<sup>19</sup>F標識したタンパク質を用い、一次元<sup>19</sup>F NMRを適用することにより、in-cellスペクトルの単純化、解析の簡便化を図り、測定時間の 短縮を目指した。

<sup>19</sup>F 核は元来生体内にほとんど存在しないため、生体由来のバックグラウンド シグナルがほとんどなく、in-cell NMR に有利であると考えられる。モデルタン パク質として、FKBP12 を選び、細胞内における免疫抑制剤との相互作用検出を 試みた。

タンパク質の<sup>19</sup>F標識法

タンパク質を発現させる大腸菌の培地に、p-フルオロ-L-フェニルアラニン (p-F-Phe)を加えておくことでタンパク質のフェニルアラニン部位に誘導体で ある p-F-Phe を導入できる。この際、芳香族アミノ酸の生合成阻害剤であるグ リフォサートイソプロピルアミン塩を培地に加えておくことで大腸菌の芳香族 アミノ酸生合成を阻害し、p-F-Phe の取り込み効率が向上する[Schönbrunn E. et al. PNAS February 13, 2001 vol. 98 no. 4 1376-1380]。

#### 実験と結果

観測対象である FKBP12 は、5つのフェニルア ラニン残基を有しており、一次元 NMR 測定により、 これらの残基に由来する5つの NMR シグナルが得ら れた (Fig. 1)。遺伝子工学的手法により、フェニル アラニン(Phe)をチロシンに置換した変異体を作成 し、各シグナルの帰属を行った。なお、これら主た るピーク以外にマイナーコンフォメーションによる ものと思われる Phe36 のシグナルも観測された。

次に、HeLa 細胞へ<sup>19</sup>F-FKBP12 を導入し、in-cell<sup>19</sup>F NMR の測定を行なった。さらに、この細胞に免疫抑



Fig.1. *in vitro* <sup>19</sup>F NMR spectrum of <sup>19</sup>F-labeled FKBP12

制剤(FK506 或いは rapamycin)を投与したところ、細胞内でのFKBP12 とこれらリガンドの 相互作用を検出することができた。興味深いことに、FKBP12-Rapamycin 複合体の in-cell スペクトルと *in vitro* での NMR スペクトルに有意な差異が観察された。これは、 FKBP12-Rapamycin 複合体が HeLa 細胞内在性の他のタンパク質と相互作用している可能性 を示唆している。

#### 結論

In-cell <sup>19</sup>F MR法により、生きたHeLa細胞内におけるタンパク質のMRスペクトルを得ることに成功した。測定時間は、3時間であり、二次元のH-<sup>4</sup>N相関を用いた場合(~6時間)よりも大きく短縮できた。また、タンパク質-リガンド相互作用を検出することにも成功した。今回、FKBP12-rapamycin複合体は、FKBP-Rapamycin binding (FRB) domain と 性が示唆されたが、FKBP12-rapamycin複合体は、FKBP-Rapamycin binding (FRB) domain と 結合することが知られていることから、この結果はFRBとの相互作用を見ていると考えられ る。一般的に、<sup>19</sup>F核は化学シフトの異方性異方性が大きく、環境の変化に非常 に敏感であるため、リガンド結合による構造変化を鋭敏に検出することができ た。一方で、その敏感さのために、複数のンフォメーションの間の交換が存在 する場合には、シグナルが大きくブロードニングしてしまうという欠点もみら れた。 ○上脇隼一<sup>1</sup>, 楯 直子<sup>2</sup>, 楯 真一<sup>1,3</sup>
(<sup>1</sup>広島大院・理, <sup>2</sup>武蔵野大・薬, <sup>3</sup>JST・先端計測)

# Preferential domain orientation of a full length HMGB2 protein and the role of the linker region

Jun-ichi Uewaki<sup>1</sup>, Naoko Utsunomiya-Tate<sup>2</sup>, and Shin-ichi Tate<sup>1, 3</sup>
<sup>1</sup> Dept. Mathematical and Life Sciences, School of Science, Hiroshima University,
<sup>2</sup> Research Institute of Pharmaceutical Sciences, Musashino University,
<sup>3</sup> SENTAN/JST

HMGB2 protein has two DNA binding domains that are connected by a ten-residue-long linker. We found that this short linker specifically interacts with N-terminal HMG-box (A-domain) without any apparent contact to the other HMG-box (B-domain). To analyze the interaction between the linker and the A-domain, with focusing on its functional significance, we made various HMGB2 linker mutants. Among them, only P80G/P81G mutant has shown significant spectral changes relative to the wild-type, and the observed signals were identical to those for the isolated A-domain. Using DIORITE analyses, we also found that the P80G/P81G mutant had different domain orientation from that for the wild-type; the difference was 46 degrees in hinge rotation angle. The present results may suggest the inter-domain linker, particularly the XPP conserved sequence, should have a role to define the relative domain orientation, which presumably facilitates HMGB2 binding to DNA.

タンパク質はドメインの再配向を伴う大きな分子形態変化を伴って機能を発現する 場合が多くある.そのため、タンパク質の機能制御機構の研究にはドメイン相対配向 の定量的解析が必要である.私たちは、DIORITE法を用いたHMGB2タンパク質中の2つ のHMG-boxのドメイン相対配向解析を行い、各HMG-boxが持つDNA結合ループ(binding wedge)は、分子の同じ側に向く性質があることを見つけた.これは、HMGB2には効率 的にDNA結合できるように2つのドメインの向きを規定する性質が備わっていること を示唆していると考える.どのような機構により2つのドメイン配向が規定されてい るかを解析する中で、2つのHMG-boxをつなぐリンカーの役割について着目した.今回 は、リンカー変異体を用いてリンカーのドメイン配向規定に関する役割とその機構解 明を行ったので報告する.

HMGB2は2つのドメイン(N末端側:Aドメイン,C末端側:Bドメイン)の間に,XPP という特徴的な保存配列を含む塩基性に富んだ10残基のリンカーを持つ.これまでの 研究で,このリンカー部がN末端側ドメインにのみ選択的に相互作用していることを

Keyword : NMR, HMG, domain orientation

うえわき じゅんいち、 たて なおこ、 たて しんいち

みいだしている. リンカー配列を持つペプチドを<sup>15</sup>N標識したAドメインに滴定したが, スペクトル変化は観測されなかった. リンカーとAドメインの間には特異的な相互作 用が存在しないことがわかった. さらに解析を進めるためにAドメインに直接リンカ ーをつなげた(A1)フラグメントを作成し, Aドメイン単独の場合とのスペクトルの 相違を解析した. 測定の結果, A1フラグメントのNMRスペクトルはHMGB2全長のAドメ イン領域のスペクトルとよく一致した. このことから, リンカー単独ではAドメイン とは相互作用しないが, Aドメインと直接つながることでHMGB2全長の時と同じ相互作 用が可能になることがわかった. リンカーのAドメインに対する空間的な制約が必要 であるといえる. リンカー内のどのアミノ酸残基がAドメインとの相互作用に重要で あるかを調べるため, リンカー内のアミノ酸を置換した複数の変異体を作成し, その NMRスペクトルの比較を行った.

HMGB2のリンカー変異体は5種類作製した(K86G, K85G, D84G, K82G, P80G/P81G) P80G/P81G変異体のみAドメインに大きな化学シフト変化が見られた.DIORITEにより 野生型HMGB2とP80G/P81G変異体についてドメイン間相対配向解析を行った.野生型で は各ドメインのDNA相互作用部位が同じ方向を向いており,DNA結合を促進する形態を していることを以前見つけている.P80G/P81G変異体は,野生型と比べ,明らかなド メイン相対配向の違いを示した.Bドメインに対するAドメインの配向を比較すると, 46度のヒンジ回転角を持つ違いがあった(Fig. 1).リンカーに含まれるPP配列は種 を超えてHMGタンパク質に保存されている.XPP配列は,コラーゲン中に見られる特徴 的な配列であり,堅い構造ユニットであることが知られている.XPP配列の直前にあ るTyrがN末端リンカー部と疎水性相互作用をする可能性を現在解析しており,この疎 水性相互作用を介したXPP配列のAドメインへの固定化がドメイン相対配向を決定す ると考えている.発表ではこの結果を含めドメイン相対配向を決める構造的要因につ いて議論する.



Fig. 1: Comparison of the domain orientation between the wild-type and P80G/P81G mutant HMGB2s.

謝辞: 本研究で用いたデータの一部は、九州大学・生体防医研・共同利用実験施設の700MHz NMR装置で取得しました.測定にご協力いただいた、神田教授、斎藤博士に感謝致します.

P42

# NMR を用いたフラグメント化および再統合による 低分子阻害剤の構築

o小野 克輝<sup>1,2</sup>、上田 寛<sup>3</sup>、加藤-高垣 こずえ<sup>1,3</sup>、谷村 隆次<sup>3</sup>、
竹内 恒<sup>2</sup>、嶋田 一夫<sup>2,4</sup>、高橋 栄夫<sup>2,5</sup>
<sup>1</sup>JBIC、<sup>2</sup> 産総研・バイオメディシナル情報研究センター、
<sup>3</sup>JBIC・東レ分室、<sup>4</sup> 東大・院薬系、<sup>5</sup> 横浜市大院・生命ナノ

# Development of the low molecular weight inhibitor by NMR-based fragmentation and defragmentation strategy

Katsuki Ono<sup>1,2</sup>, Hiroshi Ueda<sup>3</sup>, Kozue Kato-Takagaki<sup>1,3</sup>, Ryuji Tanimura<sup>3</sup>, Koh Takeuchi<sup>2</sup>, Ichio Shimada<sup>2,4</sup>, and Hideo Takahashi<sup>2,5</sup>
<sup>1</sup>JBIC, <sup>2</sup>Biomedicinal Information Research Center, AIST, <sup>3</sup>Toray Branch Office of JBIC,
<sup>4</sup>Grad. Sch. of Pharm. Sci., The Univ. of Tokyo, and <sup>5</sup>Grad. Sch. of Nanobiosci., Yokohama City Univ.

Development of a novel inhibitor of a protein-protein interaction (PPI) has been challenging in drug discovery. *De novo* design of synthetic molecules that target surface-exposed regions of a protein is currently difficult. Chemical structure libraries of drug-like compounds do not necessarily give high-affinity ligands in a high throughput screening of novel PPI inhibitors with high efficiency. In this study, we propose a novel "fragment-defragment" strategy for a development of PPI inhibitor. In this approach, one performs a rational fragmentation of drug-like compounds or peptide and integrates these fragments into a novel low molecular weight inhibitor in a structure-guided manner. We applied this approach to the GPVI-collagen interaction to improve the affinity of a "coincident" inhibitor, losartan, and successfully improved the affinity by introducing a binding fragment from a peptide inhibitor.

タンパク質-タンパク質相互作用を阻害するリガンドを新たに開発することは、創 薬において重要な課題となっている。しかしながら、タンパク質表面上に露出した部 位の形状から低分子化合物を新たにデザインすることは容易ではなく、また、必ずし も低分子化合物ライブラリーの中からタンパク質間相互作用を阻害する化合物を効 率よく探索できるわけではない。一方、標的タンパク質に結合するペプチドの構造を 基に新たなリガンドをデザインする方法も報告されているが、タンパク質-ペプチド 複合体構造が決定されていることが前提となる等の理由から、汎用的な開発方法とし て確立していない。

一方、様々なスクリーニング法により標的タンパク質に対する低親和性のリガンド やペプチドが同定されることは多い。また NMR 法などを用いればそれらのどの部分 が結合を担っているのかを明らかにすることは比較的容易である。今回我々は、その ような系のモデルとして血栓症に係わる GPVI-collagen 相互作用系を取り上げる。こ れまでに我々は GPVI-collagen 相互作用阻害分子として、アンギオテンシン II 拮抗薬 にも拘わらず、臨床的な知見からその機能が偶然発見された losartan<sup>[1]</sup>、およびファー ジライブラリーより得られた 12 残基からなるペプチド(pep-10L)<sup>[2]</sup>の解析を行ってき

キーワード: INPHARMA、阻害剤構築、GPVI

おの かつき、うえだ ひろし、かとうーたかがき こずえ、たにむら りゅうじ、たけうち こう、 しまだ いちお、たかはし ひでお た。これら 2 つの分子は GPVI に対し弱く相互作用し、競合関 係にある。

Losartan は、GPVI 上の strand C'および E からなる疎水表面に 結合することで血小板凝集を阻 害する。さらに、同分子内のフ ェニル-テトラゾール基は GPVI との結合に重要であるこ とが既に明らかとなっている。 一方、pep-10L は STD 実験や alanine scanning による結合能測 定から、GPVI との結合に必須な 残基が特定されているとともに、 複合体形成時における立体構造 も TrNOE の解析により決定さ れている。そこで我々は、 losartan の GPVI 結合に重要な部 分を残した形で分解し、pep-10L において GPVI との結合に重要 なフラグメントを再導入するこ とで、より高い活性を持った新 たな阻害剤を構築することを試 みた。



**Figure.** Expanded region of the <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H NOESY spectra recorded for a mixture of 1.4 mM losartan and 25  $\mu$ M GPVI-Fc (**A**), 0.9 mM pep-10L and 25  $\mu$ M GPVI-Fc (**B**), and 1.4 mM losartan, 0.9 mM pep-10L, and 25  $\mu$ M GPVI-Fc (**C**). Signals of orthogonally-crossed broken lines in panels **A** and **B** indicate intramolecular TrNOE peaks of losartan and pep-10L, respectively. Signals in boxes in a panel **C** presented interligand TrNOE peaks mediated by the GPVI-Fc protons. NMR data were collected at Avance 800 MHz with a cryogenically-cooled probe head with a mixing time ( $\tau_m$ ) of 200 ms, using buffed solutions with 20 mM NaPi (pH 6.5) in D<sub>2</sub>O.

初めに pep-10L と losartan の INPHARMA 測定を行い、GPVI 上で losartan のフェニ ルーテトラゾール基と pep-10L の Trp6 側鎖が共通した領域に結合していることを明 らかにした(Figure)。次に共通骨格である losartan のフェニルーテトラゾール基を残し (fragmentation)、pep-10L 上にのみ付加的に存在するフェニル基の導入(defragmentation) を行った。新たに得られた化合物は GPVI に対する滴定実験の結果から K<sub>D</sub> 値が  $5.2 \times 10^5$  M であった。このことは、新規低分子化合物が pep-10L と同程度の親和性(K<sub>D</sub> 値:  $8.2 \times 10^5$  M)を持ち、losartan の親和性(K<sub>D</sub> 値:  $1.7 \times 10^4$  M)以上の結合能を得たこと になる。

Losartan のように他の作用機序を持つ薬が、標的以外のタンパク質に対し弱く結合 し機能することは少なくない。しかしその場合、分子全体が受容体との結合に重要で はないと考えられる。本手法は、このような薬の持つ"副作用"をうまく利用し、断 片化により必要な部分だけを残して他のペプチドリガンド等から得られる情報と再 統合することで目的タンパク質に対する特異性を有する新たな低分子化合物を創製 するものである。この手法は既存の薬の薬理活性を再検証しようとする近年の創薬業 界の流れと相まって、創薬基盤技術として有効であると考える。

#### 《参考文献》

- [1] K. Ono et al., J Med Chem 2010, 53, 2087-2093.
- [2] K. Kato-Takagaki et al., J Biol Chem 2009, 284, 10720-10727.

# P43 主鎖 <sup>15</sup>N核の緩和時間測定による脂肪酸結合タンパク質FABP4 の運動性の解析 ○森戸 昭等<sup>1</sup>,猪股 晃介<sup>1</sup>,森川 耿右<sup>2</sup>,杤尾 豪人<sup>1</sup>,白川 昌宏<sup>1</sup> <sup>1</sup>京大院・工

<sup>2</sup>阪大·蛋白研

# Backbone dynamics of free and ligand-bound FABP4 studied by <sup>15</sup>N relaxation

○Akira Morito<sup>1</sup>, Kohsuke Inomata<sup>1</sup>, Kosuke Morikawa<sup>2</sup>, Hidehito Tochio<sup>1</sup> Masahiro Shirakawa<sup>1</sup> <sup>1</sup>Grad. Sch. Eng., Kyoto Univ. <sup>2</sup> Insti. Protein Research. Osaka Univ.

Although there are many studies reported about protein dynamics, almost all of them have been carried out *in vitro*. Thus, little is known about protein dynamics in living cells. Setting our goal as studying their dynamics in living human cell using in-cell NMR spectroscopy, in this study, we have performed <sup>15</sup>N relaxation experiments to characterize the backbone dynamics of free (apo-) and ligand-bound (holo-) human FABP4 (Fatty Acid Binding Protein 4) *in vitro*. <sup>15</sup>N T<sub>1</sub> and T<sub>2</sub> values, and  ${}^{1}H{}^{-15}N$  heteronuclear NOEs of FABP4 were analyzed using model-free approach. As a result, apo FABP4 was found to have a mobile region whose time scale is in microseconds to milliseconds. The mobility was suppressed in the holo FABP4. As the region corresponds to the nuclear localization signal (NLS), binding of fatty acid to FABP4 is thought to induce stabilization of the helical structure of NLS.

#### 緒言

脂肪酸結合タンパク質 4 (Fatty Acid Binding Protein 4 or adipocyte protein 2)は細胞内脂質結合タンパク質フ ァミリーに属するタンパク質で、脂質代謝における正確な 役割は未だ不明ながら、主に脂肪細胞中で発現し、脂肪酸 の結合、運搬を行っていると考えられている。またマウス でFABP4の発現を抑制するとインスリン抵抗性をもつこと が示されており、他にもアテローム性動脈硬化との関連 も指摘されているなど、その機能が注目されている。 こうした理由からFABP4の構造学的研究は盛んに行われ

ているが、その研究の多くは in vitro で行われている。 しかし、タンパク質が本来働く細胞内の環境はタンパク 質や脂質が多数存在する濃密な環境であり、試験管中と



Fig.1 FABP4 (PDB: 2HNX) The helix-loop-helix region is in a gray oval.

比べてタンパク質の性質が異なる可能性がある。例えば、in-cell NMR を用いた実験により、HeLa細胞内では *in vitro* に比べてユビキチンの構造安定性が大きく低下していることが明らかにされている[Inomata, K. *et al.* High-resolution multi-dimensional NMR spectroscopy of proteins in human cells. *Nature* **458**, 107-110(2009)]。細胞内には多種多様な脂質分子が混在することから、試験管内の実験では、FABP4と脂質の本来の相互作用を再現できない可能性があり、細胞内での相互作用解析が重要であると考えられる。

FABP4, 緩和時間測定

○もりと あきら, いのまた こうすけ, もりかわ こうすけ, とちお ひでひと, しらかわ まさひろ
また、様々なタンパク質の機能の発現は、構造ゆらぎと密接に関連しているとされる。よって細胞内でのタンパク質の運動性を解析することは細胞中のタンパク質の性質を調べる上で重要であると考えられる。本研究では細胞内での運動性を調べることを念頭に置き、 *in vitro*においてFABP4の主鎖アミド<sup>15</sup>Nの緩和時間を測定することによって主鎖の運動性 を調べた。

## 実験と結果

基質非結合状態の(apo)FABP4 と 8-anilinonaphthalene-1-sulfonic acid (1,8-ANS)結合 状態(holo)FABP4 について運動性を調べるために <sup>15</sup>N標識したFABP4 を用いて主鎖のアミド <sup>15</sup>N核の T1、T2、{<sup>1</sup>H}-<sup>15</sup>NヘテロNOEを測定し、モデルフリーアプローチによって運動性を表

わす各種のパラメータ(分子の回転相関時間  $\tau_{o}$ 、オーダーパラメータS<sup>2</sup>、分子内部運動の 相関時間 $\tau_{o}$ 、化学交換・構造変換の寄与 $R_{ex}$ など)を求めた。各種NMRの測定は 700 MHz と 600 MHzのNMR装置(Bruker AVANCE series)で それぞれ 2 回行った。

その結果、apo FABP4 はヘリックス-ループ -ヘリックスの領域(Fig. 1)において顕著な  $R_{ex}$ の値を有することが明らかとなった (Fig. 2(a))。 $R_{ex}$ はアミドN-Hベクトルがミリ 秒からマイクロ秒の遅い時間スケールの運 動を行っていることを示しており、apoFABP4 はこの領域において遅い時間スケールの運 動性を有することが分かった。この領域は基 質結合時に核内移行シグナル (Nuclear Localization Signal, NLS)を形成する領域 と合致する。一方holo FABP4 では、この領域 の遅い時間スケールの運動性は大きく低下 した(Fig. 2(b))。



Fig.2 Rex values of (a)apo- and (b)holo- FABP4

#### 考察と今後の展望

apo FABP4 がヘリックス-ループーヘリックスの領域で有意な構造揺らぎを持つことから、 FABP4 は基質非結合状態において基質結合状態の構造をあらかじめ有していることが示唆 される。また、holo FABP4の解析結果で分かったこの領域の運動性の低下は、基質との結 合によってNLSの構造形成が起きたことを示唆する。

今後はFABP4の細胞内への導入条件の検討、細胞中のタンパク質のNMRの測定時間の迅速 化を行う予定である。

## べん毛フック長さ制御タンパク質FliKのNMR構造解析

水野志乃<sup>2</sup>, 〇編田宏一<sup>1</sup>, 小林直宏<sup>3</sup>, 藤原敏道<sup>3</sup>, 相沢慎一<sup>2</sup>, 楯 真一<sup>1</sup> (<sup>1</sup>広島大・院理, <sup>2</sup>県立広島大・生命環境, <sup>3</sup>阪大・蛋白研)

## Structure analysis of the flagellar hook length regulatory factor, FliK, by NMR

Shino Mizuno<sup>2</sup>, OHirokazu Amida<sup>1</sup>, Naohiro Kobayashi<sup>3</sup>, Toshimichi Fuziwara<sup>3</sup>, Shin-ichi Aizawa<sup>2</sup>, and Shin-ichi Tate<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dept. Mathematical and Life Sciences, Hiroshima University. <sup>2</sup>Prefectural University of Hiroshima. <sup>3</sup>Institute for Protein Research, Osaka University.

Many motile bacteria harbor helical flagellar filaments to gain motility. The bacterial flagellum consists of three parts, which include basal body, hook, and filament. The hook functions as a universal joint to link filament to the basal body that functions as motor. It is well known the length of hook is controlled to have a defined value with narrow distribution. In the case of *Salmonella typhimurium*, the length is known to be centered at 55 nm with deviation of 6nm. FliK protein has been evidenced to be involved in the hook length regulation, but its mechanism is not well understood, although several apparently contradictory functional models on FliK have been proposed. To progress our insight into the hook length regulation by FliK, we conducted the structural studies on FliK using NMR. As expected from the sequence characteristics, so called intrinsically disordered properties, of FliK (405 residues), approximately 80% of the residues within were non-structured. The remaining 20% part located in the C-terminal region was found to be structured, of which part we have determined the structure by NMR. The obtained structural features on FliK will be reported on both structured and unstructured parts.

バクテリアの多くはべん毛と呼ばれる運動器官を用いて移動する.べん毛は基部体, フック,べん毛繊維の大きく3つに分けられる.フックは,モーターとして働く基部 体とスクリューとして働くべん毛繊維をつなぐ.Salmonella typhimuriumのフックの 長さは55±6 nmに制御されていることが知られている.これまでの研究により,フッ クの長さ制御はFliKとべん毛タンパク質輸送を担う超分子構造体Cリングが関与して いると考えられている<sup>(1)(2)</sup>.しかし,フック長制御の分子レベルでの機構は明らかに なっていない.

FliKは405残基のアミノ酸から成る可溶性タンパク質である. プロテアーゼ限定分解から, FliKはN末端とC末端の半々に分けられる2つのドメイン構造を持つことが示べん毛, FliK, 天然変性タンパク質

みずのしの, ○あみだひろかず, こばやしなおひろ, ふじわらとしみち, あいざわしんいち, たてしんいち

されている.しかし,N末端ドメインはプロリン, グリシンが多く存在し,プロテアーゼに対する弱 い抵抗性を示すものの単独では安定な立体構造 を持たない天然変性構造を持つことが予測され る.C末端ドメイン側にもQ-rich部位が見つかる など全体的には天然変性構造に富んだ部位であ ることが予測される(Fig. 1).しかし,PONDR の予測からは,C末端部にはやや構造的に安定な 部位が存在することも予測されている この上う



部位が存在することも予測されている.このように天然変性領域に富んだFliKがどの ようにフック長制御に関わるかを解明するために,我々はFliKの構造解析を開始した. 今回の発表では,FliK全長構造についてNMRから明らかにできた性質について報告 するとともに,C末端部に見つかった安定な構造を形成する部分についての立体構造 決定を行ったので報告する.得られたFliKの立体構造情報から考えられるFliKによる べん毛フック構造制御機構についても議論する予定である.

FliKの完全長,N末端部,C末端部の三 種類のNMRスペクトルを比較した.N末端 部,C末端部の重ね合わせとして完全長 のNMRシグナルが説明できたために2つ のドメインは独立な構造単位であるこ とがわかった.また,<sup>1</sup>H<sup>-15</sup>N HSQCスペク トル上でのシグナル分散から,N末端部 は全体的に安定な構造を持たない部分 であることが示唆された.C末端部のス ペクトルからは半分程度は安定な構造 を持たないが,残る半分は安定な構造を 持つことを示すスペクトルの特徴が観



Fig. 2 Comparison of <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N correlation map in presence

#### (A) and absence (B) of <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N NOE

測された.<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>N 異種核NOE測定の結果から、シグナル分散の低いN末,およびC末ド メインでは負あるいは0.2以下のシグナル強度比(I<sub>noe</sub>/I<sub>ref</sub>)を与えたことから安定な 立体構造を持たないことが確認できた(Fig. 2).この結果はPONDRの予測と一致した.

C末端部には上記のごとく安定な立体構造をもつ部分と、天然変性領域としての特徴を持つ部分が共存していることがわかったが、本研究ではこのC末端部ドメイン全長を対象として立体構造解析を進めた.

定法にしたがった立体構造解析から、C末端部の中央部約100残基に安定な立体構造 が存在し、明瞭なNOEシグナルが観測できた。NOEによる<sup>1</sup>H間距離、強度変調法による <sup>3</sup>J<sub>MH</sub>およびTALOSによる主鎖二面角制約、残余双極子効果<sup>1</sup>D<sub>MH</sub>を用いてこの領域の立 体構造決定を行った、構造解析は、Kujira<sup>(3)</sup>/CYANA/X-PLORにより行った.立体構造 の詳細は、ポスターにて示す.

発表では、C末端部に存在する安定な立体構造部の意味を議論すると同時に、FliK に存在する天然変性領域の役割についてもフック長さ制御の観点で議論する. 参考文献

- (1) Makishima, S. et al., Science, 291, 2411-3, (2001)
- (2) Minamino, T. et al., Mol. Microbiol., 56, 303-8, (2005)
- (3) Kobayashi, N. et al., J. Biomol. NMR, 39, 31-52, (2007)

## 高等植物フィトクロム・ヒスチジンキナーゼ様ドメインの ATPase活性と構造解析

○西ヶ谷有輝<sup>1,2</sup>, Jee JunGoo<sup>1,3</sup>, 田中利好<sup>4</sup>, 河野俊之<sup>4</sup>, 倉田理恵<sup>1</sup>, 深尾陽一朗<sup>1</sup>, 加藤悦子<sup>5,6</sup>, 高野誠<sup>5</sup>, 山崎俊正<sup>5</sup>, 児嶋長次郎<sup>1,2</sup> <sup>1</sup>奈良先端大・バイオ,<sup>2</sup>阪大・蛋白研,<sup>3</sup>首都大・戦略研究センター, <sup>4</sup>三菱化学生命科学研,<sup>5</sup>農業生物資源研,<sup>6</sup>名大院・生命農

## ATPase activity and structure analysis for histidine kinase like domain of higher plant phytochrome

○Yuki Nishigaya<sup>1,2</sup>, JunGoo Jee<sup>3</sup>, Rikou Tanaka<sup>4</sup>, Toshiyuki Kohno<sup>4</sup>, Rie Kurata<sup>1</sup>, Yoichiro Fukao<sup>1</sup>, Etsuko Katoh<sup>5, 6</sup>, Makoto Takano<sup>5</sup>, Toshimasa Yamazaki<sup>5</sup> and Chojiro Kojima<sup>1,2</sup> <sup>1</sup> Grad. Sch. Biol. Sci., NAIST, <sup>2</sup>Inst. Prot. Res. Osaka Univ., <sup>3</sup>Center for Priority Areas, Tokyo Metro. Univ. <sup>4</sup>MITILS, <sup>5</sup>NIAS, <sup>6</sup>Grad. Sch. Bioagric. Sci., Nagoya Univ.

Phytochrome is the red/far-red photoreceptor and regulates many aspects of the life cycle in plants. The C-terminal histidine kinase like domain (HKLD) shows sequence homology to histidine kinases, but only Ser/Thr kinase activity is known in higher plant phytochromes. In order to investigate structure and function of the HKLD, the over expression and purification systems of HKLD were established for *Oryza sativa* (rice) phyB. Rice phyB HKLD displayed weak but significant ATPase activity. NMR assignments were performed employing the selective labeling and non-linear sampling methods. Model structure refined by NMR chemical shifts and torsion angle restraints suggested the structural similarity between HKLD and GHKL kinase/ATPase superfamily including histidine kinases.

[序論]

光は植物において発芽から花茎誘導まで多様な反応を制御する環境因子として重 要である。高等植物の赤色・遠赤色光受容体であるフィトクロムは安定な二量体を形 成する約1200アミノ酸残基の可溶性のセリン・スレオニンキナーゼである。しかしな がら、そのキナーゼ活性ドメインは明らかにされていない。フィトクロムの構造は発 色団を共有結合し光受容能を持つN末端ドメインと安定な二量体を形成するC末端ド メインにおおきく分かれる。C末端ドメインに存在する Histidine Kinase Like Domain (HKLD)はヒスチジンキナーゼと相同性を有する。しかし、フィトクロムからヒスチジ ンキナーゼ活性は報告されておらず、キナーゼドメイン候補として有力であるが、そ の機能は未解明な部分が多い。そこで本研究では溶液NMRおよび生化学実験により、 高等植物フィトクロムHKLDの構造と機能の解明を目指した。

## 光受容体,フィトクロム,キナーゼ

○にしがや ゆうき, じー じゅんぐー, たなか りこう, こうの としゆき, くら た りえ, ふかお よういちろう, かとう えつこ, たかの まこと, やまざき としまさ, こじま ちょうじろう [結果と考察]

イネ (Orvza sativa) phyB HKLDはヒスチジンキナーゼとの相同性から2つのサブドメ イン(二量体化ドメイン、ATP結合ドメイン)に分かれるが、本研究ではATP結合ドメ インと考えられる領域を使用した。大腸菌のコールドショック発現系を用い発現・精 製系を確立した。高度に精製されたHKLDは低濃度(17 μM)では良好な<sup>1</sup>Η-<sup>1</sup>δN HSQCス ペクトルを与えたが、それ以上の濃度では会合によりシグナルの増加やブロードニン グが見られた。会合を起こさず高濃度化することはできなかったが、HKLDは溶媒がほ ぼ水の条件でも長期間安定であった。そこで、シグナルの帰属には水で透析したサン プルを用い、またタイトレーション用の溶媒として塩を加えていないTris-HC1緩衝液 を用いることにより、クライオプローブの感度が最大限に発揮できる条件でNMR測定 を行った。これにより、タンパク質濃度10 μMの<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQCがクライオプローブ付800 MHz NMRを使用して1時間程度で測定可能になった(Fig.1)。さらに非線形サンプリ ングおよびアミノ酸選択標識技術を併用し、タンパク質濃度が17 µMという条件で主 鎖帰属に成功した。HKLDのモデル構造を化学シフトおよび二面各情報を元により精密 化したところ、HKLDの構造はヒスチジンキナーゼも含まれるGHKL kinase/ATPase superfamilyに属する事が示唆された。続いてATPアナログのタイトレーション実験を 溶液NMRで行ったところ、GHKL特異的なATP/Mg<sup>+</sup>結合モチーフ(N box, G1 box, F box, G2 box) 近傍に複数の残基がマッピングされ(Fig. 2)、HKLDにATPが結合することが 示唆された。

次にHKLDの活性の検討を行った。フィトクロム全長の基質として報告されている Bovine HistoneH1を基質に、リン酸化タンパク質特異的な蛍光染色剤である ProQ Diamondを用いて検出を試みたがリン酸化は観測されなかった。そこで、ATP加水分解 活性を測定したところ、弱いながらも他のGHKL型ATPaseと同程度の活性が検出された。 これらのことから、イネphyB HKLDはATP加水分解活性をもつGHKL型のドメインである ことが示唆された。



Provide and a second

Fig.1 <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC spectrum (ns=16, 2048x256 pts, 1h18m) of 10 μM phyB HKLD (pH 7.5, 20 mM Tris-HCl, 2 mM DTT) on a Bruker 800 MHz NMR equipped with a cryogenic probe.

Fig.2 Perturbed residues by ATP analog titration mapped on a refined model structure.

## バイセルに結合したマガイニン2の構造解析

○細田 和男<sup>1</sup>、向 瓏<sup>1</sup>、稲岡 斉彦<sup>1</sup>、河野 俊之<sup>2</sup>、若松 馨<sup>1</sup> (<sup>1</sup>群大工、<sup>2</sup>三菱化学生命研)

#### Structural analysis of magainin 2 bound to phospholipid bicelles

oKazuo Hosoda<sup>1</sup>, Long Xiang<sup>1</sup>, Yoshihiko Inaoka<sup>1</sup>, Toshiyuki Kohno<sup>2</sup>, Kaori Wakamatsu<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Grad. Sch. Eng., Gunma Univ., <sup>2</sup>Mitsubishi Kagaku Inst. Life Sci.

Magainin 2, a 23-residu peptide, isolated from skins of frog *Xenopus laevis*, exhibit antimicrobial activity through the perturbation of microbial plasma membranes. Although magainin 2 forms a monomeric  $\alpha$ -helix when bound to phospholipid micelles and in TFE solution, this peptide was shown to form an antiparallel coiled-coid dimer on binding to zwitterionic phospholipid vesicles by our TRNOE measurement. To analyze the membrane-bound structure more directly and in more detail, we started to analyze the structure of isotope-labeled magainin 2 bound to anionic phospholipid bicelles. First, by optimizing the kind of long-chain phospholipid and detergents as well as the peptide/phospholipid ratio, we successfully determined the conditions that give a well-resolved <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC spectrum. Having assigned the backbone and side-chain phospholipid bicelles.

【はじめに】 アフリカツメカエルの皮膚に含まれる抗菌性ペプチド、マガイニン2 はアミノ酸23残基の短いペプチドで、細菌の細胞膜の透過性を高めることによって その抗菌活性を発揮する。膜障害活性のより高いペプチドをデザインするために, 膜に結合した時の構造が解析されてきた。リン脂質のミセルに結合したマガイニン 2はモノマーのαへリックスを形成する事がCDやNMRで示されていたが、酸性の脂 質二重膜に結合した時では、coiled-coilを形成する事がCDによって示唆されてい た。実際に、重水素化したホスファチジルコリンのベシクルの存在下でTRNOEを測 定する事によりマガイニン2が逆平行のcoiled-coilを形成する事を我々は既に示して いる。しかし、より生理的な条件である酸性リン脂質の存在下ではペプチドの解離 が極度に遅くなり、TRNOE測定は行なえなかった。そこで、酸性リン脂質の二重膜 に結合した時の構造を詳細に決定するために、酸性リン脂質を含むバイセルに結合 したマガイニン2の構造を直接解析することにした。

ペプチド、脂質、サンプル調製

○ほそだ かずお、こう りゅう、いなおか よしひこ、こうの としゆき、 わかまつ かおり 【結果】 マガイニン2はユビキチンとの融合タンパク質としても細胞障害活性が あるので、通常の大腸菌の発現系では全く発現しなかったが、発現制御の厳密なホ ストと栄養価の高い培地を使用することにより、実用的に発現量させられるように なった。

バイセルの側面を構成する界面活性化剤としてはCHAPSOとDHPCが頻用され る。DHPCを含むバイセルは低温で凝集する傾向があるので、低温でも安定な CHAPSOでまずバイセルを調製したが、CHAPSOと酸性リン脂質(PS, PG)を含む バイセルは、マガイニン2を加えると不安定になり凝集してしまう事がわかった。そ こで、CHAPSOをDHPCに変更したところ安定なバイセルができ、特にPG存在下で は高分解能のHSQCスペクトル(Fig. 1)を与えた。なお、coiled-coilの形成はCDで 確認してある。

主鎖・側鎖のシグナルはHNCO/HNCOCA/HNCA/HNCACO/CBCACONH/ HNCACB/<sup>15</sup>N-NOESY/<sup>13</sup>C-NOESY測定等による定法にて帰属した。次に<sup>15</sup>N-NOESYのシグナル帰属・解析を行ったが、αへリックス/βシート構造を強く示唆 するような特徴的なパターンは観測されなかった。より詳細な構造の情報を得るた めに、構造計算を開始した。ダイマー形成を示唆するNOEも得られているが、まず は主に残基内および隣接残基間に帰属されるNOEによる距離拘束を用いてモノマー での計算を行った。計算にはTALOSにより得られた主鎖の二面角情報も用い、 XPOLRにて構造を計算した。ペプチド単体の構造である程度の収束がみられたの で、現在、分子間NOEを示唆するシグナルについて、構造計算の結果との整合性の 確認を行いながら同定を行っている。



Fig. 1 <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC spectrum of magainin2 bound to PG/DHPC bicelles.

## Zc3h12a N末端ドメインの溶液構造

○津嶋 崇<sup>1</sup>、榎園 能章<sup>2</sup>、足立 わかな<sup>2</sup>、横地 政志<sup>2</sup>、 竹内 理<sup>3,4</sup>、審良 静男<sup>3,4</sup>、稲垣 冬彦<sup>2</sup> <sup>1</sup>北大院生命科学構造生物、<sup>2</sup>北大先端生命構造生物、<sup>3</sup>阪大微 研自然免疫、<sup>4</sup>阪大免疫学フロンティア研究センター自然免疫

## Solution structure of Zc3h12a N-terminal domain

○Takashi Tsushima<sup>1</sup>, Yoshiaki Enokizono<sup>2</sup>, Wakana Adachi<sup>2</sup>, Masashi Yokochi<sup>2</sup>,
 Osamu Takeuchi<sup>3,4</sup>, Shizuo Akira<sup>3,4</sup>, and Fuyuhiko Inagaki<sup>2</sup>
 <sup>1</sup>Lab. Struct. Biol. Grad. Sch. Life Sci. Hokkaido Univ., <sup>2</sup>Lab. Struct. Biol. Advanced Life Sci. Hokkaido Univ., <sup>3</sup>Dept. Host Defense. Res. Inst. Microbiol. Dis. Osaka Univ., <sup>4</sup>Lab. Host Defense. WPI-IFReC. Osaka Univ.

Zc3h12a is an RNase containing CCCH-type zinc-finger motif whose expression level is stimulated by lipopolysaccharide (LPS). Zc3h12a prevents autoimmune diseases by directly controlling the stability of a set of inflammatory genes: interleukin (IL)-6, IL-12p40.

Zc3h12a is comprised of an N-terminal domain, a PIN domain with RNase activity, a zinc-finger motif and a C-terminal domain. Electrophoretic mobility shift assays (EMSA) suggested that the N-terminal domain inhibits binding affinity between Zc3h12a and RNA. Here, we will show the solution structure of the Zc3h12a N-terminal domain, and discuss auto inhibition mechanism of RNA binding by the N-terminal domain.

【背景】

Toll-like receptor (TLR)は、自然免疫応答において病原体の感染を感知する受容体であり、サイトカイン等の発現を誘導することで炎症反応を引き起こし、病原体を排除する。しかし、TLR により引き起こされる細胞内シグナルにおいて生成されるタンパク質は、炎症性サイトカインのみならず、ケモカインや転写因子など多様であり、炎症反応は厳密に制御されている。近年、この炎症反応を制御する遺伝子の一つとしてZc3h12aが同定された。

Zc3h12a は LPS により転写が活性化されるタンパク質であり、Zc3h12a 欠損マウスにおいて、著明な脾腫、リンパ節腫脹を示し、血清 Ig 増加、自己抗体産生等の自己免

キーワード:自然免疫、RNase

○つしま たかし、えのきぞの よしあき、あだち わかな、よこち まさし、 たけうち おさむ、あきら しずお、いながき ふゆひこ 疫症状が見られた。Zc3h12aはエンドヌクレアーゼ活性を有しており、IL−6等の炎症性 サイトカインの mRNA を特異的に不安定化することで炎症反応を制御すると考えられ ているが、mRNA の特異的な認識機構や、活性の制御機構など未だ不明な点も多く、 詳細な解析が望まれる。

我々は、各種プロテアーゼを用いた限定分解や、バイオインフォマティクスを用いる ことにより、Zc3h12a が N 末端ドメイン、RNase 活性を有する PIN ドメイン、CCCH 型ジ ンクフィンガー、C 末端ドメインから構成されることを見出した。さらにゲルシフトアッセイ により、N 末端ドメインが Zc3h12aとRNAとの結合に対し、抑制的に作用することを明ら かにし、N 末端ドメインが Zc3h12aの RNase 活性を制御するドメインである可能性を示 唆した。

本発表では、Zc3h12a N 末端ドメインの溶液構造、ならびに N 末端ドメインによる RNase 活性制御機構に関する考察について報告する。

#### 【結果】

Zc3h12a N 末端ドメインに対し、 大腸菌による大量発現系、精製 系を確立し、NMR 法による立体構 造解析を行った。スペクトル解析 にはOliviaを使用し、CYANAを用 い立体構造計算を行った。N 末端 ドメインは 3 本のα ヘリックスから



**Fig.1. Solution structure of Zc3h12a N-terminal domain.** Overlay of the ensemble of 20

final energy-minimized CYANA structures.

なるバンドル構造を有していることが明らかとなった(Fig.1)。

さらに N 末端ドメインによる RNase 活性制御機構を解明するために滴定実験を行った。<sup>15</sup>N ラベル N 末端ドメインに対し、0、1.0、2.0、3.0 モル等量となるように RNase 活性 本体である PIN ドメインを加え、[<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N] HSQC を測定した。α1 ヘリックスの C 末端側、 α3 ヘリックス上の残基由来のピークに対し fast exchange での摂動が観測され、N 末



端ドメインと PIN ドメインとの相互作用が 確認された(Fig.2)。より詳細な活性制御 機構に関する考察については、討論会 当日議論する。

## Fig.2. Superimposed [<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N] HSQC spectra of <sup>15</sup>N-labeled Zc3h12a N-terminal domain titrated by Zc3h12a PIN domain.

With 0 (dark gray), 1.0 (light gray), 2.0 (gray), 3.0 (black) eq Zc3h12a PIN domain.

## リポカリン型プロスタグランジンD合成酵素の15d-PGJ<sub>2</sub> 認識機構

○加藤 信幸<sup>1</sup>、島本 茂<sup>1,2</sup>、吉田 卓也<sup>1</sup>、秦 殊斌<sup>1</sup>、 小林 祐次<sup>3</sup>、有竹 浩介<sup>4</sup>、裏出 良博<sup>4</sup>、大久保 忠恭<sup>1</sup> <sup>1</sup>大阪大学大学院薬学研究科、<sup>2</sup>(独)学振特別研究員DC、 <sup>3</sup>大阪薬科大学、<sup>4</sup>大阪バイオサイエンス研究所

# Structural Analysis of 15d-PGJ<sub>2</sub> Recognition by Lipocalin-type Prostaglandin D Synthase

Nobuyuki Kato<sup>1</sup>, Shigeru Shimamoto<sup>1,2</sup>, Takuya Yoshida<sup>1</sup>, Shubin Qin<sup>1</sup>, Yuji Kobayashi<sup>3</sup>,
 Kosuke Aritake<sup>4</sup>, Yoshihiro Urade<sup>4</sup>, Tadayasu Ohkubo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Graduate School of Pharmaceutical Science, Osaka University, <sup>2</sup>JSPS Res. Fellow, <sup>3</sup>Osaka University of Pharmaceutical Science, <sup>4</sup>Department of Molecular Behavioral Biology, Osaka Bioscience Institute

Lipocalin-type prostaglandin (PG) D synthase (L-PGDS) possesses dual functions as a PGD<sub>2</sub>-synthesizing enzyme and a transporter for lipophilic ligands. It catalyzes the isomerization of PGH<sub>2</sub> to produce PGD<sub>2</sub>, an endogenous somnogen, in the brain. L-PGDS also has the ability to bind various lipophilic molecules such as retinoid, bilirubin and biliverdin. 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ<sub>2</sub> (15d-PGJ<sub>2</sub>) is a downstream metabolite of PGD<sub>2</sub> and produced by non-catalytic dehydration of PGD<sub>2</sub>. It is recognized as a potent apoptotic and growth inhibitory factor, and is well known as having a high affinity for PPAR<sub>Y</sub>. In this study, the interactions of L-PGDS and 15d-PGJ<sub>2</sub> have been investigated. The result of NMR titration experiments with 15d-PGJ<sub>2</sub> revealed that 15d-PGJ<sub>2</sub> almost fully occupied the hydrophobic cavity of L-PGDS.

【緒言】

リポカリン型プロスタグランジン(PG)D合成酵素(L-PGDS)は、哺乳類の脳内に豊富 に存在し、PGH<sub>2</sub>から睡眠誘発に関与するPGD<sub>2</sub>を産生する酵素であるとともに、レチ ノイドやビリルビン、ビリベルジンなどの様々な疎水性低分子のスカベンジャーとし ての役割も担う多機能蛋白質である。これまでの溶液NMR法による立体構造解析から、  $\beta$ バレル構造の内部に2つのポケットを含む大きな疎水性cavityを持ち、このことが大 きさも化学構造も異なる多様な疎水性低分子との結合を可能にしていることが明ら かにされている<sup>1)</sup>。さらに、 $\beta$ バレル内の疎水性cavityの上部に位置するEF-loopと H2-helixの立体構造変化がリガンド結合に重要であることが示唆されている。

リポカリン型プロスタグランジン D 合成酵素、15d-PGJ2、溶液 NMR

○かとう のぶゆき、しまもと しげる、よしだ たくや、ちん しゅうびん、こば やし ゆうじ、ありたけ こうすけ、うらで よしひろ、おおくぼ ただやす 生体中ではPGD<sub>2</sub>の脱水反応により自 発的に15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ<sub>2</sub>(15d-PGJ<sub>2</sub>)が 生成する(Fig.1)。 15d-PGJ<sub>2</sub>は核内レセプ ターPPAR $\gamma$ の内因性リガンドであり抗炎 症作用を示すが、過剰量の15d-PGJ<sub>2</sub>は反 応性が高いため、様々な組織障害を引き 起こす。L-PGDSは脳内で睡眠誘発物質 PGD<sub>2</sub>を産生する酵素である一方、反応性 の高い15d-PGJ<sub>2</sub>とは強く結合することで 組織障害を阻止している可能性が示唆さ



れている。そこで本研究では、溶液NMR法を用いてL-PGDSと15d-PGJ2の相互作用様式を解明し、L-PGDS/15d-PGJ2複合体の高次構造解析を行った。

【実験】

大腸菌による大量発現系を用いて、均一<sup>15</sup>N標識または<sup>13</sup>C,<sup>15</sup>N標識したL-PGDSを調 製した。グルタチオンセファロースクロマトグラフィーによる粗精製の後、Thrombin でGSTタグを切断し、ゲル濾過クロマトグラフィーを用いて精製を行った。15d-PGJ<sub>2</sub> はCayman Chemical社から購入した。NMR測定はVarian INOVA 600MHzを用いた。

得られた安定同位体標識L-PGDSを用い、<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQCを用いた15d-PGJ<sub>2</sub>滴下実験を 行って、結合部位を同定した。また、L-PGDSと15D-PGJ<sub>2</sub>の1:1複合体に対して3D HNCO, HNCA, CBCA(CO)NH測定を行い、主鎖由来NMRシグナルの帰属を行った。さらに現 在、3D HBHA(CO)NH, HCCH-TOCSY, CCH-TOCSY測定および<sup>13</sup>C-edited NOESY, <sup>15</sup>N-edited NOESY測定を行い、側鎖由来NMRシグナルの帰属および複合体の立体構造 決定を行っている。

【結果および考察】

L-PGDSの15d-PGJ<sub>2</sub>結合部位を同定するために、<sup>15</sup>N標識L-PGDSに15d-PGJ<sub>2</sub>を滴定し て<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQCスペクトルの測定および解析を行った。NMRシグナルが変化した残基 は、CD-loopに属するS45、H2-helixに属するF55, E57, L62, Y63、EF-loopに属するS109, H111、およびGH-loopに属するD142であり、15d-PGJ<sub>2</sub>はL-PGDSのcavity上部と相互作 用している事が明らかとなった。変化の観測された残基は、基質PGH<sub>2</sub>の安定誘導体 が結合した時に変化した残基とほぼ一致していた。また、L-PGDSと15d-PGJ<sub>2</sub>の結合 はNMRの時間スケールからは遅い交換過程であった。

均一<sup>13</sup>C,<sup>15</sup>N標識L-PGDSに等モル量の非標識15d-PGJ<sub>2</sub>を加えたL-PGDS/15d-PGJ<sub>2</sub>複 合体を調製した。各種三重共鳴NMR測定および解析を行い、主鎖由来NMRシグナル の帰属を行った。その結果、167残基中150残基の主鎖帰属を完了した。現在、側鎖由 来NMR シグナルの帰属を行っており、本討論会では最終的に決定した L-PGDS/15d-PGJ<sub>2</sub>複合体の立体構造についても報告する。

【参考文献】

<sup>1)</sup>Shimamoto S. et al., J.Biol.Chem., 282, 31373-31379 (2007)

溶液NMR法によるマルチドメイン蛋白質の構造決定の試み

○宮崎健介、金場哲平、伊藤隆、三島正規 首都大理工

## Attempt to determine three dimensional structure of an intact multi-domain protein by solution NMR

OKensuke Miyazaki, Teppei Kanaba, Yutaka Ito and Masaki Mishima Dept. of chem., science and technology., Tokyo Metropolitan Univ.

Acquisition of long-range distance information from Paramagnetic Relaxation Enhancement (PRE) using hetero-nuclear NMR has been reported in recent years. In this study, we aim to determine the conformation of domains in full-length multi-domain protein and investigate the regulation mechanism using PRE detected by solution hetero-nuclear NMR.

Our target for this structural analysis is Protein kinase C alpha (PKC $\alpha$ ). PKC $\alpha$  exists at cytoplasm in auto-inhibited state. When PKC $\alpha$  is activated by second messengers, Ca<sup>2+</sup> and diacylglycerol (DAG), it is believed that a large conformation change occurs and localizes at plasma membrane, and thus phosphorylates cognate substrates. We are trying to detect direct interactions between the domains, a nd determine the conformation of domains by acquisition of long-range distance information from PREs.

## [Introduction]

真核生物における高度な生命現象に はマルチドメイン蛋白質が密接に関わ っており、このような生命現象を理解 するためにはそれらの構造および機能 解析が必要不可欠である。しかしなが らマルチドメイン蛋白質の全長の構造 解析は、そのドメイン間の相互作用の 弱さやリンカーの柔軟性などの理由か らいまだ十分でない。本研究では、こ のマルチドメイン蛋白質の一つである



Fig. 1 Regulation mechanism of PKCa

It is believed that PKC $\alpha$  is activated by DAG and Ca<sup>2+</sup> with large conformation change, and thus phosphorylates substrates.

Protein kinase C alpha (PKCa)を標的蛋白質とし、その構造決定を試みている。

PKCαはタンパク質の活性や機能を制御する酵素であり、その働きにより細胞内で シグナル伝達を行う。PKCαは調節領域に存在する偽基質領域による自己阻害作用の ため不活性化状態で細胞質に存在し、セカンドメッセンジャーであるCa<sup>2+</sup>やジアシル グリセロール(DAG)により活性化されると、細胞膜に移行し基質をリン酸化する(Fig. 1)。調節領域には、連続した2つのC1ドメイン、C1AおよびC1B ドメイン(DAG結合ド メイン)とC2ドメイン(Ca<sup>2+</sup>結合ドメイン)が存在する。

マルチドメイン蛋白質、溶液NMR

○みやざきけんすけ、かなばてっぺい、いとうゆたか、みしままさき

## [Strategy]

柔軟なマルチドメイン蛋白質の構造決定を行う為、本研究では次のような手法を取る。

(1)連結酵素Sortase Aを用いた蛋白質ライゲーションによるサンプル再構成

近年、蛋白質どうしを連結させることが可能な酵素Sortase A が報告された<sup>1)</sup>。このSortase Aを用いた蛋白質連結反応によるPKCα全長のサンプルを再構成する。

(2)PRE、SAXS等を併用した分子情報の取得による構造決定

これまでのNMR測定に加え、常磁性緩和効果(PRE)、X線小角散乱(SAXS)等の手法・測定を併用することで、より多量・精密な分子情報を取得し、それによりマル チドメイン蛋白質の構造決定を行う。



#### Fig. 2 Strategy of this study

Full-length structure and domain conformation of most multi-domain proteins have not been reported. However, structure of domains has been often reported. In this study, full-length multi-domain protein is reconstructed from each domain which is expressed respectively, and its structure is determined by acquisition of structural information from PRE, SAXS, and so on.

### [Results and Discussion]

現在までに PKCaにおいて数種のコンストラクトを作製しており、中でも C1B ドメ イン、C1BC2 ドメインにおいては 2D<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC の測定を行った。得られた両者の スペクトルを比較したところ、C1B ドメインに由来する化学シフトが一致しなかった (Fig. 3)。このことから C1B ドメインと C2 ドメインの間に何らかの相互作用が存在す る事が示唆された。



**Fig. 3 2D** <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC spectrum (a)spectra of C1B domain

(region:91-161, length:71 a.a.) (b)spectra of C1BC2 domain (region:93-306, length:236 a.a.)

The chemical shifts of C1B domain in each spectrum were significantly different. This result implied that some interactions present between C1B domain and C2 domain.

#### [Perspectives]

PKCαの他のドメイン(C1A、kinase)の発現系を作製し、Sortase A を用いた全長蛋白 質の再構成を行う。その後、各ドメインの構造決定や PRE 等による分子情報の取得 を行い、PKCα全長におけるドメイン配置、構造を決定する。

1) Kobashigawa, Y., et al., J. Biomol. NMR, 2009

## In-cell NMR による高度好熱菌 TTHA1718蛋白質の生細 胞内動態解析

○濱津 順平<sup>1</sup>, Daniel Nietlispach<sup>2</sup>, 花島 知美<sup>1</sup>, 池谷 鉄兵<sup>1</sup>,
 細谷 沙織<sup>1</sup>, 三島 正規<sup>1</sup>, 白川 昌宏<sup>3</sup>, 伊藤 隆<sup>1</sup>
 <sup>1</sup>首都大・院理工, <sup>2</sup>ケンブリッジ大・生化, <sup>3</sup>京大・院工

# <sup>15</sup>N NMR relaxation studies of TTHA1718 protein in living cells by in-cell NMR spectroscopy

 Jumpei Hamatsu<sup>1</sup>, Daniel Nietlispach<sup>2</sup>, Tomomi Hanashima<sup>1</sup>, Teppei Ikeya<sup>1</sup>, Saori Hosoya<sup>1</sup>, Masaki Mishima<sup>1</sup>, Masahiro Shirakawa<sup>3</sup> and Yutaka Ito<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Chemistry, Tokyo Metropolitan University; <sup>2</sup>Department of Biochemistry, University of Cambridge; <sup>3</sup>Department of Molecular Engineering, Kyoto University

In living cells, proteins function in an environment where they interact specifically with other proteins, nucleic acids, co-factors and ligands and are subject to extreme molecular crowding that makes the cellular environment difficult to replicate *in vitro*. In-cell NMR is the only available method for investigating detailed structure and dynamics of proteins at work inside living cells.

In this presentation, we report our recent <sup>15</sup>N-relaxation studies of *T. thermophilus* HB8 TTHA1718 in *E. coli* cells aiming at identifying protein dynamics in living environment. In-cell <sup>15</sup>N-relaxation data showed twice longer  $T_i$ , much shorter  $T_2$  and thereby approximately 2-3 times larger rotational correlation time comparing to *in vitro* data, which is coincident with ~3 times higher viscosity inside cells. Chemical exchange contribution  $R_{ex}$  observed by TROSY-selected Hahn echo experiments will be also discussed.

## 【序論】

蛋白質の持つ生物活性は,活性に関与する領域の蛋白質主鎖の動的性質と密接に関わっている.したがって,蛋白質の動的性質の解析結果は,当該蛋白質の機能を詳細に理解する上で非常に重要な情報となる.蛋白質主鎖の動的性質を解析する手法としては,蛋白質を<sup>15</sup>N標識し,NMRを用いて<sup>15</sup>N核の磁化の緩和時間を測定する手法が広く用いられている<sup>1</sup>.本研究では生きた細胞内における蛋白質の情報を直接観測するin-cell NMR<sup>2</sup>の手法を用いることで,細胞内における蛋白質主鎖<sup>15</sup>N核の緩和解析を試みた.細胞内においては,いわゆる"Macromolecular crowding"が蛋白質-蛋白質相互作用や蛋白質のフォールディングに大きな影響を与えていることがこれまでに報告されており<sup>3</sup>,本研究によって細胞内環境が蛋白質の動的性質に与える影響について新たな知見が得られる可能性がある.

#### キーワード: In-cell NMR, Relaxation, Protein dynamics

○はまつ じゅんぺい, だにえる にーとりすぱっは, はなしま ともみ, いけや てっぺい, ほそや さおり, みしま まさき, しらかわ まさひろ, いとう ゆたか

#### 【実験・結果および今後の展望】

試料としては、当研究室で生きた細胞内における立体構造の決定に成功した 4 高度好熱 菌 *Thermus thermophilus* HB8 由来の TTHA1718 蛋白質を用い、大腸菌細胞内の試 料と、単離・精製試料の両方について蛋白質主鎖 <sup>15</sup>N 核の緩和解析を行なった.

均一に <sup>15</sup>N 標識を施した試料を調製し、2D <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC 測定法を利用した  $T_1$ ,  $T_2$ 緩 和測定を行った. 単離・精製試料,および大腸菌細胞内試料から得られたデータを比較した結果,  $T_1$ ,  $T_2$ 緩和時間ともに大腸菌細胞内では一様に大きく変動していたことが明らかになった(Figure 1). とりわけ  $T_2$ 緩和時間の減少が著しく,試料の不均一性に加えて化学交換などの  $T_2$ 緩和時間に影響を与える効果の存在が示唆された. この結果をうけ, TROSY を利用した交差相関緩和速度定数の解析 <sup>5,6</sup>により,化学交換による  $T_2$ 緩和時間への寄与を検証した. 本発表ではその結果も合わせて報告する.



Figure 1

Plots of the <sup>15</sup>N  $T_1$  (left) and  $T_2$  (right) relaxation parameters of TTHA1718 in living *E. coli* cells (triangle) and *in vitro* (square) against the amino acid residue number.

#### 【参考文献】

- 1) Fallow N A. et al. *Biochemistry 33*, 5984-6003(1994).
- 2) Serber, Z. et al. J. Am. Chem. Soc. 123, 2446-2447 (2001).
- 3) Ellis, R. J. Trends Biochem. Sci.. 26, 597-604 (2001)
- 4) Sakakibara, D. et al. Nature. 458, 102-105 (2009)
- 5) Wang, C. et al. J. Am. Chem. Soc. 125, 8968 8969 (2003)
- 6) Gautier, A. et al. Nat. Struct. Mol. Biol. 17, 768-774 (2010)

NF-κBシグナリングに関わるユビキチン結合型Zn<sup>2+</sup>フィン ガードメインの構造・機能解析 ○天野剛志<sup>1</sup>,市川大哉<sup>2</sup>,池上貴久<sup>3</sup>,廣明秀一<sup>1</sup> <sup>1</sup>神戸大・院・医 <sup>2</sup>神戸大・医 <sup>3</sup>阪大・蛋白研

# Structural and functional analyses of ubiquitin-binding $Zn^{2+}$ domain in NF- $\kappa$ B signaling pathway

○Takeshi Tenno<sup>1</sup>, Hiroya Ichikawa<sup>1</sup>, Takahisa Ikegami<sup>3</sup>, Hidekazu Hiroaki<sup>1</sup> <sup>1</sup>Graduate School of Medicine, Kobe University, Hyogo, Japan. <sup>2</sup>School of Medicine, Kobe University, Hyogo, Japan. <sup>3</sup>Institute for Protein Research, Osaka University, Osaka, Japan.

NEMO and Optineurin are homologous scaffold proteins of protein-protein interactions and regulate the NF- $\kappa$ B signaling. They have Coiled-coil 1 and 2 (CC1 and CC2), a leucine zipper (LZ), and a C-terminal zinc finger (ZnF) domain. The regions from CC2 to LZ have been shown to interact K63-linked and/or linear polyubiquitin chains and have a critical role in the NF- $\kappa$ B signaling. The role of the C-terminal ZnF domain of Optineurin remains unknown, although the ZnF domain of NEMO has been reported the solution structure and the interaction with ubiquitin.

To elucidate the function of the ZnF domain of Optineurin, we determined the solution structures of NEMO and Optineurin and analyzed the interaction with ubiquitin and the intracellular localization. These data suggest that the ZnF domain of Optineurin has a distinct function from that of NEMO, despite the interaction with ubiquitin chains.

NEMO (NF- $\kappa$ B essential modulator)はNF- $\kappa$ B (nuclear factor  $\kappa$ B)シグナル伝達経路に関 与する必須の調節因子である。転写因子NF- $\kappa$ Bは通常サイトゾルで阻害因子I $\kappa$ B (inhibitor of NF- $\kappa$ B)と複合体を形成し、不活性の状態にある。腫瘍壊死因子(TNF)等に よる細胞外からの刺激が膜受容体・アダプタータンパク質複合体を介してIKK (I $\kappa$ B kinase)複合体 (IKK $\alpha$ , IKK $\beta$ , NEMO) へ伝えられると、活性化したIKK複合体はI $\kappa$ Bを リン酸化する。この過程においてNEMOはK63リンクポリユビキチン鎖に相互作用し キナーゼ活性を調節する足場タンパク質として機能している。ヒトNEMOは約50 kDa からなるタンパク質で、2カ所のコイルドコイル(CC1、CC2)、ロイシンジッパー(LZ)、 ジンクフィンガー (ZnF) の各ドメインをもっている。一方、Optineurinをコードして いる*OPTN*はもともと緑内障の原因遺伝子の一つとして同定され、最近では筋萎縮性 側索硬化症 (ALS) の原因遺伝子としても報告されている。OptineurinはNEMOとアミ ノ酸配列の相同性が高く、同様のドメイン構造を有している。NEMOと同様に OptineurinはK63ポリユビキチン鎖に相互作用するが、IKK $\alpha$ 、IKK $\beta$ には相互作用しな

Zn<sup>2+</sup>フィンガードメイン,ユビキチン,NF-κBシグナリング

○ てんのたけし、いちかわひろや、いけがみたかひさ、 ひろあきひでかず

いため、ポリユビキチン鎖との相互作用においてNEMOと拮抗し、NF-κB活性化を負 に制御していると示唆されている。

NEMOのZnFドメインについては、合成ペプチドを使って溶液構造が決定されており、ユビキチンと相互作用することが報告されている。一方、OptineurinのZnFドメインについては、アミノ酸配列はNEMOとの相同性は高いが、構造および機能は未知である。

本研究では、NEMOおよびOptineurinのZnFドメインの構造を決定し、それらの機能 解析を進めた。安定同位体ラベルを導入したZnFドメインを調製し、NMRを用いてそ れらの構造を解析した。その結果、これらのZnFドメインは2本のβ-ストランド、1本 のα-ヘリックスから構成され、システイン3残基、ヒスチジン1残基で亜鉛原子を配位 する典型的なCCHCタイプのZnFドメインであった。

構造を詳細に見ると、NEMOのZnFドメインでは、Tyr402のフェノール環とHis413 のイミダゾール環がスタックすることでβ-シート構造の安定化に寄与している。一方 で、OptineurinではTyr402に相当する残基がGlu560になっているため、NEMOで見られ たようなスタック構造はなく側鎖が外へ突き出しているため、β-シート構造付近の収 束が悪くなっていた。

亜鉛原子を配位している4残基のうち最後のシステイン残基は、C未端に非常に近い位置にあるため、このシステインに変異が生じれば亜鉛との親和性は著しく低下し、 立体構造を保持できないと予想できる。実際にNEMOのC417F変異体について、野生型のサンプルと同様に調製し<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N相関スペクトルを測定したところ、野生型と全く 異なるスペクトルが得られ、ほとんど立体構造を保持していない結果が得られた。こ の残基の変異はHDE-ID(低汗性外胚葉形成不全を伴う免疫不全症)を引き起こすこ とが知られている。したがって、変異によるZnFドメインの構造異常が病気の原因の 可能性のひとつと考えられる。

また、GST-プルダウン実験およびNMR滴定実験により、OptineurinのZnFドメイン もユビキチンと弱く相互作用することを見いだした。直鎖状ポリユビキチン鎖との相 互作用を解析したところ、ポリユビキチン鎖のサブユニットが多くなればなるほど強 く相互作用することが明らかとなった。したがって、NEMOと同様にOptineurinのZnF ドメインもユビキチン(鎖)と相互作用することが機能の一つであると考えられる。 さらに、培養細胞においてEGFP融合Optineurinを一過的に発現させたところ、ZnFド メインを欠損させた変異体では、野生型と比べて細胞内局在に変化が見られた。 NEMOのZnFドメインにおいては同様の報告はなされておらず、細胞内局在変化は Optineurin独自の機能と考えられる。



Fig. Solution structures of the ZnF domain of NEMO (left) and Optineurin (right)

## 細胞内セラミド輸送タンパク質CERTの小胞体-Golgi体間 局在変化を制御するリン酸化依存的分子内相互作用の構 造生物学的解析

○杉木俊彦<sup>1</sup>,高橋栄夫<sup>2,3</sup>,竹内恒<sup>2</sup>,花田賢太郎<sup>4</sup>,嶋田一夫<sup>2,5</sup> <sup>1</sup>バイオ産業情報化コンソーシアム、<sup>2</sup>産総研・バイオメディシナル 情報研究センター、<sup>3</sup>横浜市大院・生命ナノ、<sup>4</sup>国立感染研・細胞化 学、<sup>5</sup>東大院薬

## Phospholyration-dependent intramolecular interaction revealed by NMR might regulate ER-Golgi shuttling of CERT

 $\bigcirc$ Toshihiko Sugiki<sup>1</sup>, Hideo Takahashi<sup>2, 3</sup>, Koh Takeuchi<sup>2</sup>, Kentaro Hanada<sup>4</sup>, and Ichio Shimada<sup>2, 5</sup>

<sup>1</sup>Japan Biological Informatics Consortium, Tokyo, Japan. <sup>2</sup>BIRC, AIST, Tokyo, Japan. <sup>3</sup>Grad. Sch. Nanobiosci., Yokohama City Univ., Kanagawa, Japan. <sup>4</sup>NIID, Tokyo, Japan. <sup>5</sup>Grad. Sch. Pharm. Sci., The Univ. of Tokyo, Tokyo, Japan.

Intracellular ceramide trafficking protein (CERT) translocates from the endoplasmic reticulum to the Golgi utilizing specific interaction between the CERT PH domain and phosphatidylinositol 4-monophosphate (PtdIns(4)P), a landmark phospholipid in a Golgi apparatus. Recently, it is shown that the phosphorylation of the serine repeat (SR) motif located on the carboxyl terminal side of the CERT PH domain attenuate the CERT PH domain/Golgi interaction.

In this study, we revealed that the phosphorylated CERT SR motif interacts with the PtdIns(4)P-binding site of the CERT PH domain in an intramolecular manner. In addition, the intramolecular interaction competitively reduced the CERT PH domain/PtdIns(4)P binding *in vitro*. Thus, intramolecular interaction mediated by the phosphorylated SR motif might be one of the driving forces to accelerate dissociation of CERT from the Golgi.

細胞内セラミド輸送タンパク質(CERT)は、小胞体膜上で生合成された脂質分子セラ ミドをGolgi体へと輸送する細胞質タンパク質である。CERTは小胞体-Golgi体間を shuttlingして細胞内セラミド輸送を行っていると考えられているが、その具体的な メカニズムについては不明な点が多い。

CERTのN末端に存在するプレクストリン相同(PH) domainは、Golgi体膜上に豊富に 存在している脂質分子phosphatidylinositol 4-monophosphate (PtdIns(4)P)を特異 的に認識する機能ドメインで、CERTを小胞体からGolgi体膜上へと移行させる。最近、 CERT PH domainのC末側に存在する36アミノ酸残基からなるserine repeat (SR) motif に存在する10ヶ所のセリンおよびスレオニン残基がGolgi体膜上でリン酸化修飾を受 け、これによってCERT PH domainのGolgi体への局在が解消されるとの報告がなされ た。CERTがセラミド輸送を終えた後、Golgi体から解離して小胞体に向かう必要があ セラミド輸送タンパク質、リン酸化、分子内相互作用

○すぎき としひこ, たかはし ひでお, たけうち こう, はなだ けんたろう, しまだ いちお るが、そのステップがSR motifのリン酸化によって制御されている可能性がある。そ こで我々は、その仮説を検証することでCERTのセラミド輸送活性の制御機構を解明す ることを目的として、CERT PH domain-Golgi体間相互作用に対するSR motifのリン酸 化の影響について構造生物学的解析を行った。

【方法】CERT PH domain(PH(wt))、CERT PH domain + SR motif(PHSR(wt))、およびSR motifの10ヶ所のリン酸化部位の 残基をGluに置換してリン酸化状態を模倣したCERT PH domain + SR motif(PHSR(10E))の計3種のコンストラクト(Fig. 1)につ いて、大腸菌発現系にて均一<sup>15</sup>N標識体を調製した。それぞれ の<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQCスペクトルを測定、比較するとともに、 PtdIns(4)P添加に伴う化学シフト値の変化を比較し た。

【結果】3種のタンパク質の<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQCスペクトルを 比較した結果、SR motifのリン酸化状態を模倣した PHSR(10E)においてのみ顕著に化学シフト値が変化す る残基が存在した(Fig. 2 A, B)。それらの残基をCERT PH domainの立体構造上にマッピングすると、 PtdIns(4)P結合部位に存在する残基であることがわ かった(Fig. 2 C)。このことは、リン酸化されたSR motifがCERT PH domain上のPtdIns(4)P結合部位と分 子内相互作用する可能性を示唆する。

次に、上記3種のタンパク質についてPtdIns(4)P滴 定実験を行い、PtdIns(4)Pとの相互作用に伴う化学シ フト値の変化を調べた。その結果、PH(wt)および PHSR(wt)に比べて化学シフト値の変化量が小さく、 PtdIns(4)P-bound stateに達しないシグナルが PHSR(10E)のスペクトル中に存在した(Fig. 3, G39な ど)。すなわちこの結果は、リン酸化SR motifがCERT PH domain-PtdIns(4)P間の結合を減弱させている可能性 を示唆する。

【考察】以上の溶液NMR実験から、SR motifがリン酸 化されると、CERT PH domainのPtdIns(4)P結合サイト に SR motif が 分子内相互作用して、CERT PH domain-PtdIns(4)P間結合を競合的に減弱する ことで、CERTのGolgi体からの解離が促進される 可能性が考えられる(Fig.4)。現在、より詳細な 解析を行うため、上記3種のタンパク質のGolgi 体模倣リポソームに対する結合活性の測定およ

びPHSR(10E)の立体構造解析を進めている。





Fig. 2 (A) <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC spectra. (B) Overlaid <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC spectra. (C) Mapping of the residues which shows significant chemical shift changes in the PHSR(10E).



Fig. 3 (A) <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC spectra. The chemical shift changes were observed when PtdIns(4)P was added (as denoted by arrows). (B) Overlaid <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC spectra.



Fig. 4 Functional model of CERT. Sufficient dissociation of the CERT from the Golgi could be regulated by the competing interaction between the CERT PH domain and the phosphorylated SR motif.

## ループ変異による蛋白質ダイナミクスの変化 - 高圧 NMR 法を用いた E. coliDHFR の研究

○Sunilkumar N. Puthenpurackal<sup>1,2</sup>、前野 覚大<sup>1,2</sup>、和田 侑士<sup>3</sup>、楯 真一<sup>3</sup>、赤坂一之<sup>2</sup> 1近大生物理工,2近大高圧蛋白研センター,3広大理

## Effect of loop mutation on protein dynamics - A high pressure NMR study of E.coli DHFR

•P.N. Sunikumar<sup>1,2</sup>, Akihiro Maeno<sup>1,2</sup>, Yuji Wada<sup>3</sup>, Shin-ichi Tate<sup>3</sup> and Kazuyuki Akasaka<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Grad. Sch. Biol and Sci, Kinki Univ., <sup>2</sup>HPPRC, Kinki Univ., <sup>3</sup>Grad. Sch. Sci, Hiroshima Univ.

The presence of a less populated (~10%) hidden equilibrium open conformation of folate bound E.coli DHFR, in addition to the basic folded occluded conformer, has been reported using variable pressure NMR technique (1). This open conformer is very crucial for the catalytic activity of DHFR. The purpose of this study is to find out how a single mutation at a site (Gly67) remote from the functional site affects the conformational fluctuations at the functional site of E.coli dihydrofolate reductase (DHFR). We have applied the variable pressure <sup>1</sup>H/<sup>15</sup>N HSQC NMR technique (from 30 to 2000bar) to the Gly67Val mutant of E.coli DHFR. Here we report the changes in the conformational fluctuations at the NADPH binding site of folate bound E.coli DHFR and also the shift in the equilibrium between the basic folded occluded conformer and the open functional conformer by Gly67Val mutation.

## **Introduction**

Dihydrofolate reductase (DHFR) catalyses the reduction of 7,8-dihydrofolate (DHF) to 5,6,7,8tetrahydrofolate (THF) by hydride transfer from the NADPH cofactor, which is essential for purine and thymidylate synthesis and hence for cell growth and proliferation (1). Gly67 residue is evolutionarily conserved in DHFR and occupies on a loop (residues 64-72) that is oriented away from the functional site. It has been reported that mutations at Gly67slightly changed the stability and function despite that the  $\alpha$ -carbon at this site is 29.3 Å apart from catalytic residue Asp27 (2). The presence of a less populated  $(\sim 10\%)$  hidden equilibrium open conformation of folate bound E.coli DHFR, in addition to the basic folded occluded conformer, has been reported using variable pressure NMR technique (1). This open conformer is very crucial for the catalytic activity of DHFR. This open functional conformer differs in the orientation of M20 loop and C & F helices from that of the occluded basic folded conformer (Figure 1).

In this study we have applied the variable pressure NMR technique (from 30 to 2000bar) to the Gly67Val mutant of E.coli DHFR in order to understand how a single mutation at a site remote

キーワード: DHFR, 可変圧力 NMR 法, loop mutation

ふりがな: 〇すにるくまーる ぷっつぇんぷらっかる、まえの あきひろ、わだ ゆうじ、 たて しんいち、あかさか かずゆき

from the functional site affects the conformational fluctuations at the functional site and also the nature and population of the open conformer of DHFR.



Figure 1: Equilibrium between the open and occluded conformers of folate bound DHFR

## Materials and methods

Uniformly <sup>15</sup>N-labeled DHFR Gly67Val mutant was obtained from the laboratory of Prof. Shinichi Tate, Department of Mathematical and Life Sciences, Hiroshima University. The sample was prepared in 20 mM Tris buffer (pH 7.0) with a protein concentration of 1.2 mM and a folate concentration of 4.5 mM. Variable pressure <sup>15</sup>N/<sup>1</sup>HHSQC spectra were recorded at pressures between 30 and 2000 bar using a standard HSQC sequence with sensitivity improvement on a 600 MHz Bruker AVANCE spectrometer. All the variable pressure spectra were recorded at 15°C. The temperature dependent spectra were recorded at temperatures from 15 to 35°C at an interval of 5. The <sup>15</sup>N dimension was acquired with 128 increments and for the proton dimension 2048 complex data points were collected. Data were processed using NMRPipe program and analyzed using CCPNMR program.

The thermodynamic parameter changes between the two conformers,  $\Delta G$ ,  $\Delta V$ ,  $\Delta H$  and  $\Delta S$ , were obtained by fitting the following equations to the peak intensity change as a function of pressure and/or temperature.

 $\Delta G = - RT \ln K = \Delta H - T\Delta S \dots (2)$ 

## <u>Results</u>

In this study, the cross-peaks corresponding to the residues Val13, Trp22 (both main chain and side-chain) Gly51 and Gly95 showed splitting with pressure (**Figure 2**). The intensity of the second peak was found to be increasing with pressure and that of the original peak decreasing (**Figure 3**). This intensity change showed the population change between the basic folded

occluded conformer and the open conformer.



**Figure 2**: <sup>15</sup>N/<sup>1</sup>H spectra of folate bound DHFR at 30 bar (blue) and 2000bar (red). The cross peaks that split into two at high pressure are encircled.

The residues Val13 and Trp22 are located at both ends of the M20 loop and the residues Gly51 and Gly95 are near the ends of C and F helices. Results showed that the open functional conformer of Gly67Val mutant differs in the orientation of M20 loop and C & F helices from that of the occluded basic folded conformer as in the case of WT DHFR. The determination of  $\Delta G^{\circ}$  and  $\Delta V$  values between the two conformers showed that the population and hydration of the second open conformer, at 1 bar, were slightly changed by mutation when compared to that of the WT. From the variable temperature HSQC spectra, at 2000 bar, we could estimate the  $\Delta H$  and  $\Delta S$  values between the two conformers. The  $\Delta H$  and  $\Delta S$  values also supported the above observation. It has been reported that mutations at Gly67site slightly changed the stability and function despite that the  $\alpha$ -carbon at this site is 29.3 Å apart from the catalytic residue Asp27 (2). This slight difference, between the open conformers of the wild-type and mutant DHFRs, may be responsible for the slight change in function by mutation at Gly67 site.

The analysis of the pressure dependent chemical shift and peak intensity changes was also done to obtain the difference in the site-specific conformational fluctuations between WT and G67V mutant DHFR.



Figure 3: Change in intensities of the peaks corresponding to the occluded and open conformers of folate bound E.coli DHFR

### References

- 1. Ryo Kitahara, Sina Sareth, Hiroaki Yamada, Eiji Ohmae, Kunihiko Gekko and Kazuyuki Akasaka (2000), Biochemistry, 39,12789-12795.
- 2. Eiji Ohmae, Koji Iriyama, Shigeyuki Ichihara and Kunihiko Gekko (1996), J. Biochem., 119, 703-710.

## アメロジェニンの自己集合の性質

○熊木康裕<sup>1</sup>、相沢智康<sup>2</sup>、神谷昌克<sup>2</sup>、出村誠<sup>2</sup>、河野敬一<sup>1,2</sup> <sup>1</sup>北大・理、<sup>2</sup>北大・先端生命

#### Self-assembly properties of amelogenin

○Yasuhiro Kumaki<sup>1</sup>, Tomoyasu Aizawa<sup>2</sup>, Masakatsu Kamiya<sup>2</sup>, Makoto Demura<sup>2</sup> and Keiichi Kawano<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>Graduate School of Science, Hokkaido University, <sup>2</sup>Graduate School of Life Science, Hokkaido University)

Amelogenin is a major component of enamel matrix proteins. The self-assembly of the amelogenin is believed to play an essential role in regulating the growth and organization of enamel crystals during enamel formation. Recently, it was reported that the self-assembly of the amelogenin is sensitive to the temperature and pH. The elucidation of the amelogenin assembly process is indispensable for the understanding of the mechanisms of enamel formation. Assemblies of the amelogenin in themselves are not suitable for NMR measurement because of their apparent molecular size and pure solubility in water. Therefore, in order to obtain the structural information at the residue level, DMSO-quenched H/D exchange experiments were performed.

アメロジェニンはエナメルマトリクス蛋白質の主要な成分である。この蛋白質は pH や温度に 依存して自己集合する<sup>[1],[2]</sup>。このようなアメロジェニンの自己集合は、エナメル組織の形成に おいて重要な役割を果たしていることが知られている。この自己集合過程を解明することは エナメル組織の形成メカニズムを理解する上で不可欠である。

これまでアメロジェニンの単量体については、NMR 解析の結果から、伸びきった構造をと ることが既に報告されている<sup>[3]</sup>。一方、自己集合体についての NMR 解析の報告例は未だな い。自己集合体自身を直接 NMR で解析することは、分子サイズや水への溶解度の問題か ら極めて困難であるためであると考えられる。そこで本研究では、H/D 交換によって重水素 ラベルされたアメロジェニンの自己集合体を DMSO 中で測定することで<sup>[4]</sup>、

キーワード: アメロジェニン、自己集合、 重水素交換

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

自己集合体の残基レベルでの構造情報を求めた。DMSO 中における<sup>1</sup>H 及び<sup>15</sup>N の化学シフトは、各種三重共鳴法により行った。詳細は討論会にて議論する予定である。



**Figure** <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC spectra of <sup>15</sup>N-labeled recombinant porcine amelogenin in DMSO-d<sub>6</sub> at 300 K after H/D exchange period of 3 hours (left) and 12 hours (right). 2 mM amelogenin dissolved in H<sub>2</sub>O at pH 3.0 (in this pH, amelogenin molecules exist as monomers) were diluted with 10-fold D<sub>2</sub>O at pH 7.0 ( at this pH, amelogenin molecules occur self-assembly) and incubated at 283 K for H/D exchange. After H/D exchange period, the samples were frozen with liquid nitrogen and lyophilized. Lyophilized proteins were dissolved in 90 % DMSO-d<sub>6</sub> (10% D<sub>2</sub>O) at pH 5.0 (adjusted with TCA)

<参考文献>

- [1] Moradian-Oldak J, Leung W, Fincham AG. J. Struct. Biol. 122:320-327, 1998.
- [2] Petta V, Moradian-Oldak J, Yannopoulos SN, Bouropoulos N. *Eur. J. Oral Sci.* 114 (Suppl. 1): 308-314, 2006.
- [3] Delak K, Harcup C, Lakshminarayanan R, Sun Z, Fan Y, Moradian-Oldak J, Evans JS. Biochemistry, 48, 2272-2281, 2009.
- [4] Hoshino M, Katou H, Hagihara Y, Hasegawa K, Naiki H, Goto Y, Nat. Struct. Biol. 9, 332-336, 2002.

コア変異による蛋白質ダイナミクスの変化- 高圧NMR法を用いたstaphylococcal nuclease V66K変異体の研究
○前野 覚大<sup>1,2</sup>,秦 和澄<sup>3</sup>,北原 亮<sup>4</sup>, Michael Chimenti<sup>5</sup>, Bertrand E. Garcia-Moreno<sup>5</sup>, Julien Roche<sup>6</sup>, Christian Roumestand<sup>6</sup>, Karine M., Guillen<sup>6</sup>, Catherine A. Royer<sup>6</sup>, 赤坂 一 之<sup>2</sup>
<sup>1</sup>近大院・生物理工,<sup>2</sup>近大高圧蛋白研センター,<sup>3</sup>立命大GIRO,<sup>4</sup>立 命大・薬,<sup>5</sup>Johns Hopkins Univ. Biophysic.,<sup>6</sup>INSERM・CBS

## Effect of mutation in the core on protein dynamics - A high pressure NMR study of staphylococcal nucleaseV66K.

•Akihiro Maeno<sup>1,2</sup>, Kazumi Hata<sup>3</sup>, Ryo Kitahara<sup>4</sup>, Michael Chimenti<sup>5</sup>, Bertrand E. Garcia-Moreno<sup>5</sup>, Julien Roche<sup>6</sup>, Christian Roumestand<sup>6</sup>, Karine M. Guillen<sup>6</sup>, Catherine A. Royer<sup>6</sup>, Kazuyuki Akasaka<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Grad. Sch. Biol and Sci, Kinki Univ., <sup>2</sup>HPPRC, Kinki Univ., <sup>3</sup>GIRO, Ritsumeikan Univ., <sup>4</sup>Pharm., Ritsumeikan Univ., <sup>5</sup>Biophysic. Johns Hopkins Univ., <sup>6</sup>CBS, INSERM.

Two-state global unfolding of V66K variant occurs cooperatively at high pressure without clear local unfolding, while the partial disordering is observed at turn region. The thermodynamic stability of native state ( $\Delta G^0$ ) is quite different between V66K (~3 kcal/mol) and reference protein (~12 kcal/mol). Unusual pressure shifts (linear and/or non-linear) are observed on the widespread region ( $\beta$ -barrel, helix-1 and helix-3) of V66K variant, suggesting a presence of low-lying excited state characterized as the alternative native state with remarkable non-linear pressure shifts. These results indicate that the substitution of Val-66 with Lys inside of core region affect the rapid conformational fluctuation (< ms) within native state ensemble, that may occur due to the water penetration into hydrophobic core.

<序>

Staphylococcal nuclease (SNase) の $\Delta$ +PHSは、SNase野生型(WT) に対して44-49番 アミノ酸残基のdeletion及び5か所のアミノ酸置換(P117G, H124L, S128A, G50F, V15N)を加えたpseudo wild typeであり、疎水コア内部におけるイオン性アミノ酸の存 在を許容するhyperstable formとして知られている。SNase  $\Delta$ +PHSのV66K変異体は疎水 コア内部にLys側鎖を持ち、側鎖のpKaは5.7(水分子中でのpKaは通常10.4付近) へと 変化する。 $\Delta$ +PHSとV66K変異体の結晶構造は互いに酷似しているが、Lys-66がチャー ジを持たないpH条件では、Lys-66の長い側鎖は疎水コア深部にまで入り込んでおり蛋 白質の分子表面から約12Å離れている。

<キーワード>高圧 NMR, 蛋白質ダイナミクス, Staphylococcal nuclease V66K

<ふりがな>○まえの あきひろ、はた かずみ、きたはら りょう、まいける き めんてぃ、ばーとらんど がるしあもれーの、じゅりあん ろしぇ、くりすてぃあん るーめすたんど、きゃさりん ろいやー、あかさか かずゆき 疎水コア領域の変異が蛋白質のダイナミクスに及ぼす影響を調べるため、本研究ではSNase V66K変異体の構造揺らぎを高圧NMR法で調べ、Δ+PHSの結果と比較した。

<結果・考察>

疎水コア内部に存在する Lys-66 がチャージを持たない pH6 の条件下において、V66K 変異体の構造及びダイナミクスの特性を高圧 NMR 法で調べた。

常圧下で観測された V66K 変異体の ピコ秒-マイクロ秒オーダーのダイナミ クスは、Δ+PHS のそれと比較しても大 きな差異は見られなかった。他方、低 い圧力範囲では (<1500 bar)、各アミノ 酸残基に対応する全ての<sup>1</sup>H 及び<sup>15</sup>N 化 学シフトで明らかな圧力応答が観測さ



Fig.1 Tertiary structure of Snase V66K

れた。これらは主に、平均の水素結合距離と二面角( ø, w) が加圧に伴い変化した事 を反映している。大部分のクロスピークが加圧に伴う線形応答(linear pressure shift) を示したが、幾つかの NMR 信号は非線形の圧力応答(non-linear pressure shift)を示 した。信号強度の減少を伴わない連続的な化学シフト変化は、蛋白質の構造揺らぎが 速い時間スケール(<ms)で起きていることを示している。 ここで、圧力シフトに おける非線形応答を定量的に解析するため、<sup>1</sup>H 及び<sup>15</sup>N 圧力シフトに対して多項式 (二次元)のフィッティングを施した。その結果、V66K 変異体において、疎水コア 内部のLys-66に近接した helix-1とβ-barrel 領域に分布する幾つかのアミノ酸残基で高 い非線形性(high non-linearity)の圧力シフト(<sup>1</sup>H, <sup>15</sup>N)が観測された。圧力シフトに 見られる顕著な非線形応答は、フォールド構造アンサンブル内における低い励起構造 (low-lying excited conformer)の存在を示しており、励起構造の分布率が加圧に伴い 増加したと考えられる。これらの結果は、Δ+PHS コア領域の Val-66 が Lys に置換 (V66K) された効果により、low-lying excited conformer を含むフォールド構造アンサ ンブル内の速い構造揺らぎ(<ms)が疎水コア周辺(helix-1, β-barrel)で増大した事 を示しており、これら低い励起構造への構造転移は疎水コアの局所的な水和を伴う事 が予想された。

また、高い圧力範囲(>1500 bar)において、V66K 変異体の NMR 信号強度が、幾 つかのループ領域に対応するアミノ酸残基を除いて、加圧に伴う協同的な減少を示し た。これは、V66K 変異体ではフォールド-アンフォールド構造の二状態間で global unfolding が生じることを示している。さらに、見積もられた $\Delta G^0$  は $\Delta$ +PHS のそれと比 べて大きく減少しており( $\Delta G^0$  (V66K) = ~3 kcal/mol,  $\Delta G^0$  ( $\Delta$ +PHS) = ~12 kcal/mol)、 Lys 側鎖の導入により分子全体の構造安定性が顕著に低下する事が明らかになった。 IQGAP1のCHドメインのNMR構造およびアクチン認識機構 の解析 ○梅本良<sup>1, 2</sup>, 西田紀貴<sup>1</sup>, 荻野新治<sup>1, 2</sup>, 嶋田一夫<sup>1, 3</sup> <sup>1</sup>東大・院薬系 <sup>2</sup>JBIC <sup>3</sup> BIRC, AIST

# NMR structure of the CH domain of IQGAP1 and its implications for the actin recognition mode

ORyo Umemoto<sup>1, 2</sup>, Noritaka Nishida<sup>1</sup>, Shinji Ogino<sup>1, 2</sup>, and Ichio Shimada<sup>1,3</sup> <sup>1</sup>Grad. Sch. Pharm. Sci. The Univ. of Tokyo, Tokyo, Japan. <sup>2</sup>JBIC, Tokyo, Japan. <sup>3</sup>BIRC, AIST, Tokyo, Japan.

IQ-domain GTPase-activating protein 1 (IQGAP1), a multi-domain protein with a molecular mass of 189 kDa, promotes actin crosslinking at the leading edge of cells, under the control of the small GTPases; Rac1 and Cdc42. Previous studies demonstrated that the direct interaction between actin filaments (F-actin) and IQGAP1 is essential for the promotion of cell migration. This interaction is mediated through an N-terminal actin-binding domain (ABD) (residues 1-210), which contains a calponin homology (CH) domain. In this presentation, as a first step toward understanding the mechanism of the actin-recognition by the single CH domain family, we solved the NMR structure of the actin binding domain of IQGAP1.

IQGAP1は細胞の浸潤先端に局在し、低分子量Gタンパク質であるRac1やCdc42の下流 でアクチンを認識し、その束化を促進するタンパク質である。先行研究により、アク チンフィラメント(F-アクチン)とIQGAP1との相互作用が、細胞の遊走に必須であるこ とが示されている。この相互作用はIQGAP1のN末端に存在する calponin homology (CH)ドメインによって担われているが、その構造およびF-アクチンとの相互作用様式 は解明されていない。CHドメインは3つのサブクラスに分類され、アクチンを認識す る多くのCHドメインはタイプ1/2に属する。タイプ1/2のCHドメインはタンデム型のCH ドメインにてアクチンを認識する一方で、IQGAP1の属するタイプ3のCHドメインは単 一のCHドメインにてアクチンを認識する。しかしながら、その認識機構に関してはほ とんど知見が得られていない。そこで本研究においては、単一のCHドメインのアクチ ン認識機構を解明する第一歩としてIQGAP1のCHドメインのNMR構造決定を行い、その F-アクチン結合様式に関する考察を行った。

[方法]

CHドメインはF-アクチン結合活性を有することが報告されているアクチン結合ド メイン(actin-binding domain; ABD) であるアミノ酸残基1-210およびトリプシン限 定分解実験から構造非形成領域と判断したN末端25残基を除去したABD<sub>26-210</sub>を調製した。 両コンストラクトが同等のF-アクチン結合活性を有することをSPR実験により確認し た。ABD<sub>26-210</sub>に関して定法に従って三重共鳴実験を行い、NMR構造を決定した。

IQGAP1, Actin, Interaction

○うめもとりょう,にしだのりたか,おぎのしんじ,しまだいちお

[結果と考察]

ABDの立体構造

IQGAP1のABDは7本のαヘリックスから構成されており、他のCHドメインの間で保存 されている6本のヘリックスとそれに続くextension領域(アミノ酸残基161-210)から なることが判明した(Fig.1A)。このextension領域は長いループと中央に存在する1 本のαヘリックスからなり、CHドメインと密接にコンタクトしていた。IQGAP1の酵母 のホモログであるRng2と比較すると、両者の構造はよく似ていることがわかった。

#### アクチン結合部位に関する考察

これまでにアクチンと結合する他のCH1ドメインにおいてアクチン結合部位 (actin binding site; ABS) として2つの部位(ABS1およびABS2)が報告されている。 IQGAP1のABDと他のCH1ドメインとのアラインメントから、ABS2に相当する領域のα6 ヘリックスに存在する疎水性残基が保存されていることが明らかとなった。このこと から、これらの疎水性残基(P146, Y150, A154, L157)がIQGAP1のABDにおいてアク チン結合を担っていると考えた。しかしながら、これらの残基はextension領域に位 置する疎水性残基(I194, P197, F199, I202)との long range NOE が観測され、溶 媒に露出していないことが明らかとなった(Fig. 1 B)。

このことから、IQGAP1のアクチン認識様式に関して次のような2つの仮説を立てた。 1) IQGAP1のアクチン結合部位はABS2ではなく、他の部位がアクチン認識を担ってい る。2) アクチン認識においてはABS2をマスクしているextensionに構造変化が生じ、 ABS2が溶媒に露出する。興味深いことに、タイプ1/2に属するアクチン結合タンパク 質であるα-actininのCHドメインにおいてはABS2が構造変化を伴って溶媒に露出する という2) のようなメカニズムが提唱されている。

これら2つの仮説を検証するため、現在ABD上のアクチン結合界面を同定するための 実験を進行中である。



Fig. 1 Solution structure and potential actin-binding site of ABD

A Stereoviews of the overlaid ensemble of the 20 final structures. The side chains in the structured region are shown.

B Ribbon diagram of ABD of IQGAP1, in which ABS2 and the extension are shown. Long range NOEs are observed between the residues in ABS2 and the extension.

#### Reference

Umemoto R, Nishida N, Ogino S, and Shimada I (2010) J. Biomol. NMR, 48, 59-64

ホメオボックス遺伝子産物Six3のSixドメインの立体構 造解析 ○下條秀朗<sup>1</sup>,岡村英保<sup>1</sup>,長土居有隆<sup>1</sup>,池田啓子<sup>2</sup>,川上潔<sup>2</sup>,西村 善文<sup>1</sup> <sup>1</sup>横浜市大・院生命ナノシステム <sup>2</sup>自治医大・分子病態治療研究センター・細胞生物

## NMR studies on the six domain of Six3

○Hideaki Shimojo<sup>1</sup>, Hideyasu Okamura<sup>1</sup>, Aritaka Nagadoi<sup>1</sup>, Keiko Ikeda<sup>2</sup>, Kiyoshi Kawakami<sup>2</sup>, and Yoshifumi Nishimura<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Supramolecular Biology, Graduate School of Nanobioscience, Yokohama City University, Kanagawa, Japan.

<sup>2</sup> Division of Biology, Center of Molecular Medicine, Jichi Medical University, Tochigi, Japan.

The first identified six gene family is sine oculis gene which is essential for the compound eye formation of Drosophila. The six family genes homologous to sine oculis gene have been found in many species. Their gene products, Six proteins contain a conserved Six domain (SD) consisting of 110 amino acids and a homeodomain (HD) consisting of 60 amino acids. Although several members of the six gene family interact with the eyes absent (Eya) gene family functioning as transcriptional activators, Six3 does not interact with any known member of the Eya family. Recently several reports suggested that mouse Six3 interact directly with two proteins: the mouse counterpart of the Drosophila transcriptional co-repressor, Groucho and the DNA replication inhibitor, geminin. The Six3 SD is important for interaction with Groucho and geminin. To understand the molecular basis of the Six3 SD, we determined the structure of the SD of mouse Six3 by using NMR

【背景】

ヒトの体は一つの受精卵からはじまり、時間的空間的に厳密に制御されたシグナル 分子や転写因子のネットワークによって、数多くの異なる機能を備えた細胞集団から なる個体になる。多くの難病性疾患は遺伝子機能の異常や発現の異常によっておこる が、発生過程にかかわる遺伝子異常による疾病も数多くみられる。

Six という命名の由来となった遺伝子はショウジョウバエの複眼形成に異常をきたす 突然変異体の原因遺伝子として同定された *sine oculis* (so)である。その後 so と相同性 を有する遺伝子としてマウスから 6 種類の Six (*sine ocuils* related homeobox)遺伝子、 Six1~Six6報告されている。Six 遺伝子群の保存領域は約 110 アミノ酸残基からなる Six ドメインと 60 アミノ酸残基からなる Six タイプホメオドメインである。

立体構造解析, シックスドメイン

○しもじょうひであき、おかむらひでやす、ながどいありたか、いけだけいこ、かわ かみきよし、にしむらよしふみ これら以外の領域には Six 遺伝子間での相同性はほとんど見られない。種々の生物種で同定された Six 遺伝子群はその相同性から 3 つのサブグループに分けられる。; Six1/Six2 (sine oculis subfamily), Six3/Six6 (optix subfamily), Six4/Six5 (Dsix4 subfamily) Six3/Six6 は眼の初期発生段階に発現する。Six ファミリータンパク質の Six ドメイン は協同作用因子として知られている eyes absent (Eya)と相互作用することが知られて いるが、Six3/Six6 とは相互作用しない。最近、Six3/Six6 と相互作用する因子が 2 種 類報告された;転写抑制因子 Groucho、DNA 複製抑制因子 Geminin。この相互作用に は Six ドメインが必要である。我々は Six3 の Six ドメインの構造と機能の相関を明ら かにするため NMR による立体構造解析を行った。

#### 【実験】

大腸菌による大量発現系を用いて<sup>15</sup>N標識または<sup>15</sup>N,<sup>13</sup>C標識Sixドメインを大量発 現した。グルタチオンセファロースクロマトグラフィー後、PreScission Protease でGST タグを切断し、ゲルろ過クロマトグラフィーを用いて精製した。各種多次元多重共鳴 NMR 測定を行った。スペクトル解析にはNMRPipe, Olivia を使用した。構造計算には プログラム CYANA を用いた。

#### 【結果・考察】

各種三次元測定により帰属を行った (Fig.1)。15N および13C-NOESY スペクトルか ら得られる 1H 間の距離情報とプログラム TALOS+による化学シフトから得られる主鎖二 面角情報をもとに立体構造計算を行った。Six3 の Six ドメインの立体構造は、6本のαヘリッ クスからなるαバレル様構造であった。現在、 最終構造に向けて構造計算を行っている。Six ファミリータンパク質の Six ドメインは大変よ く保存されており、他の Six1~Six6 の Six ドメ インも同様の構造であると考えられる。しかし Six3/Six6 は他の Six ファミリータンパク質と異



Fig 1. <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC spectrum of the Six3SD

なり Groucho や Geminin と結合することから、これらの結合部位を同定することで Six ドメインの構造から機能の違いを解明していきたい。 CD44 リガンド結合ドメインの構造平衡が細胞のローリング活性に与える影響の解明
 〇鈴木美穂<sup>1</sup>,西田紀貴<sup>1</sup>,荻野新治<sup>1</sup>,早坂晴子<sup>3</sup>,宮坂昌之<sup>3</sup>,嶋田一夫<sup>1、2</sup>
 <sup>1</sup>東大・院薬、<sup>2</sup>産総研・BIRC、<sup>3</sup>阪大・医

CD44-mediated cell rolling regulated by two-state conformational equilibrium of the hyaluronan-binding domain.

 $\bigcirc$ Miho Suzuki<sup>1</sup>, Noritaka Nishida<sup>1</sup>, Shinji Ogino<sup>1</sup>, Haruko Hayasaka<sup>3</sup>, Masayuki Miyasaka<sup>3</sup>, Ichio Shimada<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Grad. Sch. Pharm. Sci., the Univ. of Tokyo, Tokyo, Japan <sup>2</sup>BIRC, AIST, Tokyo, Japan <sup>3</sup>Osaka Univ. Grad. Sch. of Med., Osaka, Japan

CD44 is a receptor for hyaluronan (HA) that mediates lymphocyte homing. The extracellular portion of CD44 contains an HA-binding domain (HABD). Our previous study revealed that HABD has the structural equilibrium between the ordered (O) and partially disordered (PD) states. A mutant stabilized in the PD-state (Y161A) displayed a higher HA affinity than wild-type (WT). In this study, we made a mutant, called CC2, which is locked in the O-state by an intramolecular disulfide bond. The CC2 mutant exhibited a lower HA affinity than WT. In the cell rolling analysis, whereas the cells expressing WT CD44 smoothly rolled on the HA, the Y161A cells mainly exhibited the firm adhesion. The CC2 cells showed less stable rolling due to frequent detachment from HA. Based on these results, we conclude that the two-state equilibrium of CD44 HABD is important for CD44-mediated cell rolling

【背景】CD44 は細胞外マトリックスの主成分であるヒアルロン酸 (Hyaluronic acid:HA) を認識する受容体で、HA との相互作用を介し、がん細胞の浸潤やリンパ球のローリングに関与している。CD44 は一回膜貫通型のタンパク質で、細胞外領域に存在する Link module とその両端の付加配列からなる HA 結合ドメイン (HA

binding domain:HABD) を介して HA を認識してい る。これまでに我々は、NMR による解析から、1) 溶 液条件下では、HABD は C 末端付加配列領域が一 定の構造を形成する "ordered state (O-state)"と一定 の構造を形成しない "partially disordered state (PD-state)"の 2 種類の異なる立体構造をとり、その 両者の平衡にあること、2) その平衡は、HA 非結 合時には O-state へ、HA 結合時には PD-state へ と偏ることを示した(Fig.2A, B)。さらに、恒常的に PD-state を形成する Y161A 変異体の HA 結合 親和性は、野生型と比較し 5 倍程度上昇している



Fig.1 Comparison between CD44 HABD structure with and without HA (A) Crystal structure of the CD44 HABD without HA (PDB code: 1UUH). (B) NMR structure of the CD44 HABD with HA (PDB code: 2183). N- and C-terminal extension is colored black. The C-terminal segment that becomes unfolded in the HA-bound state is described by a dashed line.

○すずき みほ、にしだ のりたか、おぎの しんじ、はやさか はるこ、みやさか まさゆき、しまだ いちお

ことを示した。しかし、CD44に2状態の構造平衡が存在する意義は明らかではない。 そこで、本研究では常に O-state を形成する変異体を作製し、CD44 HABD の構造平衡の 生物学的意義を HA 結合親和性および細胞ローリング活性の観点から解明することとした。

【方法】 CD44 HABD の構造を O-state に固定した変異体を得るため、O-state のみ に観測される C 末端領域と Link module との相互作用を分子内 S-S 結合により安 定化した変異体を作製し、NMR 法による構造解析と表面プラズモン共鳴 (SPR) 法に よる親和性解析を行った。次に、内因性 CD44 が発現していないヒト肺癌細胞由来 の VMRC-LCD 細胞に野生型 CD44、Y161A 変異体、CC2 変異体を発現させ、HA を 固定化したキャピラリーおよびプレートを用いて細胞のローリング活性を測定した。

## 【結果と考察】

O-state に平衡が偏った変異体の作製および解析

分子内 S-S 結合導入により構造を O-state に固定し た変異体 (CC2) を作製した。野生型と異なり、CC2 変 異体では HA 存在下にても PD-state 由来のシグナル は観測されないことから、CC2 変異体は常に O-state を形成していることが明らかとなった (Fig.2C, D)。さ らに、SPR 解析から CC2 変異体の HA 結合親和性は 野生型の半分に低下していることが判明した。よって、 HABD の O-state と PD-state は、HA 低親和性および 高親和性状態をそれぞれ反映すると結論した (Fig.2E)。



Fig.2 Conformation of the WT HABD and CC2 mutant in the absence or presence of HA. (A-D): Representative <sup>1</sup>H<sup>15</sup>N HSQC signals of the WT HABD (A,B) and the CC2 mutant (C, D) in the absence (A, C) and presence of 2.8 mM HA<sup>20</sup>(B.D). (E) HA-affinity of O- and PD states.

#### CD44 HABD の構造平衡と細胞ローリングの相関

CD44 HABD に 2 状態間の構造平衡が存在する意義を細胞のローリングの観点か ら解明することを目的として、野生型 CD44、Y161A、CC2 変異体を発現する細胞の ローリング活性を測定した。その結果、野生型および CC2 変異体発現細胞は主にロ ーリングしているのに対し、Y161A 変異体発現細胞では HA と強くしたままローリ ングしない細胞の割合が多いことが判明した (Fig.3)。また、野生型発現細胞は HA と 接着後、ローリングが安定に持続したのに対し、CC2 変異体発現細胞は HA への接 着と解離を繰り返しローリングが安定に持続しなかった (Fig.4)。これより、CD44 HABD が HA 結合親和性の異な 2 状態間の構造平衡にあることが CD44 を介した 細胞のローリングに必要であると結論した。



WT(A), the Y161A mutant (B), the CC2 mutant (C)



#### NMR試料管内転写によるRNAのNMRスペクトルの測定

斉藤裕之<sup>1</sup>,伊谷野悠里<sup>1</sup>,牛田千里<sup>2</sup>,清澤秀孔<sup>3</sup>,○河合剛太<sup>1</sup> <sup>1</sup>千葉工業大学 工学部 <sup>2</sup>弘前大学 農学生命科学部 <sup>3</sup>国立遺伝学研究所 新領域融合研究センター

## In tube transcription for NMR measurement of RNA

Hiroyuki Saito<sup>1</sup>, Yuri Iyano<sup>1</sup>, Chisato Ushida<sup>2</sup>, Hidenori Kiyosawa<sup>3</sup>, OGota Kawai<sup>1</sup> <sup>1</sup>Fac. Eng. Chiba Inst. Tech., Chiba, <sup>2</sup>Fac. Agri. Life Sci., Hirosaki Univ., Hirosaki, <sup>3</sup>TRIC Natl. Inst. Genetics, Mishima, Japan.

Expressions of small RNAs, with 50-100 nt length, from the loci of the sense-antisense transcription in mouse genome were found and investigations of the function of such small RNAs are being conducted. In order to characterize the structures of the small RNAs from mouse, a method of in tube transcription is now introduced. Because the expression was monitored by the Northern hybridization with a DNA probe of 40 nt, the exact position of transcription in mouse cell was unknown. In order to estimate the sequence of an transcribed RNA, we designed two RNAs for the expressed region and those were subjected to the analysis by the in tube transcription method. It was found that one of the two constructs showed iminoproton signals of well structured RNA, suggesting that the corresponding RNA is expressed in mouse cell. Also, this result indicates that the method proposed here is useful for rapid characterization of RNA structures.

私たちは、マウス細胞内に新たに発見された 50-100ヌクレオチドの低分子RNAについて、そ の機能を明らかにするために、多角的な解析を 進めている. この低分子RNAは、哺乳動物にお ける内在性のアンチセンス/非翻訳性RNA (non-coding RNA; ncRNA) の研究中に発見さ れ、その後の解析で、このサイズの低分子RNA はアンチセンスRNAが転写されている遺伝子座 を含め、その他のゲノム全体の領域から転写さ れていることが判明している<sup>1)</sup>.マウスにおい て, センス・アンチセンス発現が確認されてい る遺伝子座は4000を超えており、その多くの遺 伝子座で低分子RNAが発現していることが示唆 されている.本発表では、その解析の一環とし て進めているNMR試料管内での迅速なRNAの構 造プロファイリング手法について報告する. RNA, 試験管内転写, 安定同位体標識



A: Just after mixing of the reaction mixture. B: After 40 h.

さいとうひろゆき,いやのゆり,うしだちさと,きよさわひでのり,○かわいごうた

#### 【方法】

マウス染色体3番にコードされている cSAT-025領域から発現が確認されているRNA<sup>11</sup> について、その発現領域を推定し、NMRスペク トル測定用のRNA配列をデザインした.それぞ れについて、鋳型DNAを用意し(北海道システ ム・サイエンス)、NMR試料管内で転写反応を 行った.転写反応にはT7 RNAポリメラーゼ(大 陽日酸)および安定同位体標識NTP(大陽日酸) を用い、200 uLの反応液を調製した.反応液 を調製後、ただちにNMRマグネットに入れ、 298Kにおいて、スペクトルの測定を行った.

【結果および考察】

Fig. 1は、反応直後および40時間経過後の<sup>13</sup>C選択スペクトルの塩基のH8/H6/H2シグナルが観測される領域を示している.反応液調製直後には、反応の基質であるNTP由来のシャープなシグナルが観測されているが、40時間後には、基質由来のシグナルはほぼ消失し、合成されたRNAに由来するシグナルが観測されている.したがって、NMR試料管内で転写反応が十分に進んだことがわかる.

cSAT-025領域から発現している低分子RNAの一つであるS3について、2種類のRNA配列

(S3-1およびS3-2)をデザインした. それぞれについてNMR試料管内転写を行った結 果をFig. 2およびFig. 3に示した. いずれもイミノプロトン領域のスペクトルを経時 的に示してあり,最下段が反応開始後約3時間で,以後はおよそ7時間毎に測定した 結果である. 2つのスペクトルを比較すると,S3-1の場合には,良く分散したシャー プなシグナルが観測されるのに対して,S3-2では,ブロードなシグナルのみが観測さ れている. このことから,S3-1は特定の立体構造を形成しており,一方,S3-2は特定 の構造を形成していないことが示唆される.

以上のように、NMR試料管内転写法により、RNAの構造的特徴を簡便に解析できることが示された.この手法を活用して、マウスに発現している低分子RNAの構造的特徴を解析し、クラスタリングしていく予定である.

50-100mt 本研究は,新学術領域研究「マウス細胞内に普遍的に存在する50-100 ヌクレオチド低分子RNAの多角的解析」の一環として行われた.また,先端 研究施設共用促進事業による「RNAの構造スクリーニングおよび構造クラス タリング手法の開発」として,理研SSBCのNMR分光計を利用した.

1) Okada, Y., et al., Comparative expression analysis uncovers novel features of endogenous antisense transcription, *Hum. Mol. Genet.* **17**, 1631-1640 (2008).



Fig. 2 In tube transcription of S3-1 RNA



Fig. 3 In tube transcription of S3-2 RNA

## Nox5の活性酸素発生機構の解明

○猪熊聡夫<sup>1</sup>, 久米田博之<sup>2</sup>, 本坊和也<sup>2</sup>, 住本英樹<sup>3</sup>, 稲垣冬彦<sup>2</sup> <sup>1</sup>北大院生命科学構造生物 <sup>2</sup>北大先端生命構造生物 <sup>3</sup>九大医学生化学

## Structural basis of Nox5 activation mechanism

 $\bigcirc$ Toshio Inokuma<sup>1</sup>, Hiroyuki Kumeta<sup>2</sup>, Kazuya Honbou<sup>2</sup>, Hideki Sumimoto<sup>3</sup>, and Fuyuhiko Inagaki<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Lab.Struct.Biol.Grad.Sch.Life Sci.Hokkaido Univ.,Sapporo, Japan. <sup>2</sup>Lab.Struct.Biol.Advanced Life Sci.Hokkaido Univ.,Sapporo, Japan. <sup>3</sup>Grad.Sch.Med.Kyushu Univ.,Fukuoka, Japan.

NADPH oxidases of the Nox family exist in eukaryotes but not in prokaryotes. Reactive oxygen species (ROS) produced by the NADPH oxidase play critical roles in a variety of biological processes, such as host defense, signal transduction, and hormone synthesis. NADPH oxidase 5 (Nox5) is a homologue of the gp91<sup>*phox*</sup> subunit of the phagocyte NADPH oxidase (Nox2) and is expressed in lymphoid organs and testis. Nox5 is distinct from other NADPH oxidases by its unique N terminus, which contains four canonical EF-hands,  $Ca^{2+}$ -binding domains. It's thought that Nox5 is activated by  $Ca^{2+}$ -binding to the EF-hands and produce ROS, because Nox5 activation depend on  $Ca^{2+}$ .

In this study, we have analyzed the structure of the EF-hands region to reveal the molecular mechanism for regulation of Nox5 activity.

[序論]



Fig. 1 Structural model of Nox (A; Nox1-4, B; Nox5)

変換される。この Nox の電子伝達システムは、真核生物のフェレドキシン還元酵素様のC 末細胞質領域と、2 つのヘムを含む6 回膜貫通領域から形成されている。つまり、

#### ROS, NADPH oxidase, EF-hand

○いのくま としお, くめた ひろゆき, ほんぼう かずや, すみもと ひでき, いなが き ふゆひこ
C末細胞質領域のNADPH結合領域とFAD結合領域を介し、NADPHからFADへ、FAD からヘムへ、ヘムから酸素分子へと順々に電子を伝達する。動物のNoxには5種類のサ ブファミリーが存在する(Nox1-5)。Nox1-4は、膜タンパク質のp22<sup>phox</sup>と安定な複合 体を形成する。また、活性化の際には、細胞質内制御因子であるp47<sup>phox</sup>(Nox organizer)、 p67<sup>phox</sup>(Nox activator)が膜に移行しこの複合体に結合し、さらにp40<sup>phox</sup>、Racが結合 することが知られている(Fig. 1A)。一方、他のサブファミリーと異なりNox5には、 細胞質内制御因子は存在せず膜貫通領域のN末側にEFハンドモチーフを4つ持ってい る。Nox5の活性化はカルシウム依存的であることから、このEFハンド領域にカルシ ウムが結合することでNox5は活性化状態へと移行すると言われている(Fig. 1B)。本 研究では、Nox5の活性制御機構を分子レベルで解明するため、はじめに、活性制御ド メインであるEFハンド領域の構造解析を行った。 [結果および考察]

大腸菌によるNox5のEFハンド領域の 発現系を構築し、大量発現後に精製を行 った。各種NMR測定を行い、Nox5のEF ハンド領域のカルシウムフリー状態の構 造をCYANAを用いて決定した。Nox5の EFハンド領域は、カルシニューリンB様 の構造を有していた(Fig.2)。

さらに、Nox5の活性阻害剤であること が示されているmelittinとカルシウム依 存的に結合すること、ならびに結合 に伴いEFハンド領域が大きく構造 変化することを明らかにした (Fig. 3)。一般にEFハンドモチーフはカ ルシウムの結合により疎水性面が 露出することが知られている。実際、 Nox5 EFハンド領域は、カルシウム 튭 の添加で自己会合をおこし沈殿し た。melittinの共存下でNMRスペク トルが観測できたのは、露出した Nox5 EFハンド領域の疎水性面に melittinが結合したためと考えられ る。

Nox5 EFハンド領域においてカ ルシウム結合に伴う疎水性面の露 出は、Nox5の活性制御機構におけ る重要な局面を意味している。 Nox5はp22やp40/p47/p67/Rac複合



Fig. 2 Solution structure of Nox5 EF-hands

A: Superimposed structure

B: Ribbon model of the most stable structure



Fig. 3 [<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N] HSQC spectra of free (gray) and Ca<sup>2+</sup>/ melittin-bound (black) states of Nox5 EF-hands

体のような他の活性制御因子を必要としないため、露出した疎水性面にはNox5中の標的となる疎水性領域が結合し、活性化状態に移行すると推察される。今後は、Nox5の活性制御機構解明のため、活性化状態におけるNox5 EFハンド領域の構造について解析を進める。

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 o生塩 理尋<sup>1</sup>、小橋川 敬博<sup>2</sup>、斉尾 智英<sup>1</sup>、関口 光広<sup>3</sup>、 横地 政志<sup>2</sup>、小椋 賢治<sup>2</sup>、稲垣 冬彦<sup>2</sup> <sup>1</sup>北大生命、<sup>2</sup>北大先端生命、<sup>3</sup>アステラス製薬

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

Masahiro Ushio<sup>1</sup>, Yoshihiro Kobashigawa<sup>2</sup>, Tomohide Saio<sup>1</sup>, Mituhiro Sekiguchi<sup>3</sup>,
 Masashi Yokochi<sup>2</sup>, Kenji Ogura<sup>2</sup>, Fuyuhiko Inagaki<sup>2</sup>
 <sup>1</sup>Grad. Sch. Life Sci. the Univ. of Hokkaido, <sup>2</sup>Fac. Advanced Life Sci. the Univ. of Hokkaido, <sup>3</sup>Astellas 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<sup>(1)</sup>, which was successfully applied for the structural analysis of the Zip PB1 homo dimeric complex<sup>(2)</sup>. 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<sup>(1),(2)</sup>。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

o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<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>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Tm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<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>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℃のTm の上昇が見られ、さらに3~5残基に伸ばすことで約4℃程度と著しいTm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 <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSOC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<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>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。



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

[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.

#### Molecular mobility of protein in agarose gels

 ○Bona Dai<sup>1</sup>, Mika Hirose<sup>2</sup>, Shigeru Sugiyama<sup>2</sup>, Hiroyoshi Matsumura<sup>2</sup> and Shingo Matsukawa<sup>1</sup>
 *Tokyo University of Marine Science and Technology*<sup>1</sup>
 *Grad. Sch. Engineering, Osaka University*<sup>2</sup>

Abstract: The measurements of self-diffusion coefficient (D) and <sup>1</sup>H 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 <sup>1</sup>H 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 <sup>1</sup>H NMR local and translational motion of protein in aqueous solution and agarose gels were investigated by <sup>1</sup>H 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 <sup>1</sup>H 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



Fig.2 Diffusional spin-echo attenuations of HEWL in 0.1 M sodium acetate ( $\blacksquare$ ), 0.4w% agarose gel ( $\triangle$ ) and 1.2w% agarose gel ( $\blacktriangle$ ) by varying field gradient strength (g).

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.

We also measured the <sup>1</sup>H 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.

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

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

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

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

OJoanna Jakus<sup>1</sup>, Yuusuke Tsuchie<sup>1</sup>, Teppei Ikeya<sup>1</sup>, Masaki Mishima<sup>1</sup>, Daniel Nietlispach<sup>2</sup>, Jeremy R. H. Tame<sup>3</sup> and Yutaka Ito<sup>1</sup> <sup>1</sup>Department of Chemistry, Tokyo Metropolitan University, Hachioji, Tokyo, Japan. <sup>2</sup>Department of Biochemistry, University of Cambridge, Cambridge, UK. <sup>3</sup>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  $Ni^{2+}$  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 <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N 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 <sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C-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.** <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMQC spectrum of the methyl region of the {Ile( $\delta$ 1 only), Lue(<sup>13</sup>CH<sub>3</sub>, <sup>12</sup>CD<sub>3</sub>),Val(<sup>13</sup>CH<sub>3</sub>, <sup>12</sup>CD<sub>3</sub>),Val(<sup>13</sup>CH<sub>3</sub>, <sup>12</sup>CD<sub>3</sub>)} - U-[<sup>2</sup>H/<sup>13</sup>C/<sup>15</sup>N]-NikA sample. Assignments for selected residues are indicated.

#### **Materials and Methods**

Biosynthetic precursors of  $\alpha$ -ketobutyrate and  $\alpha$ -ketoisovalerate lead to production of ILV residues that are <sup>13</sup>CH<sub>3</sub>-labeled only at single methyl positions. This strategy generates linear <sup>13</sup>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( $\delta$ 1 only), L(<sup>13</sup>CH<sub>3</sub>, <sup>12</sup>CD<sub>3</sub>),V(<sup>13</sup>CH<sub>3</sub>, <sup>12</sup>CD<sub>3</sub>) - U-[<sup>2</sup>H/<sup>13</sup>C/<sup>15</sup>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(CMCGCBCA)NH and Val-HM(CMCBCA)NH for methyl proton correlations to amide NH group for (i) and (i+1) residues, Ile/Leu-(HM)CM(CGCBCA)NH and Val-(HM)CM(CBCA)NH for methyl carbon correlations to amide NH group for (i) and (i+1) residues and 2D <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>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 <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>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

#### 新規多糖類サクランのNMR構造解析

〇立山誠治、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

OSeiji 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 <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>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<sup>1)</sup>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



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

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<sup>2)</sup>、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℃、

天然物構造解析、多糖、酵素分解

o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<sup>1</sup>H 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<sup>13</sup>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. <sup>1</sup>H 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。



【参考文献】

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

#### <sup>31</sup>P-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<sup>1</sup>、鵜澤 洵<sup>2</sup>、梅沢 洋二<sup>1</sup> <sup>1</sup>微生物化学研究所、理研基幹研<sup>2</sup>

## Stereostructural study of kanamycin 3'- phosphate using <sup>31</sup>P-HOESY

Yumiko Kubota<sup>1</sup>, Jun Uzawa<sup>2</sup> and Yoji Umezawa<sup>1</sup> <sup>1</sup>Institute of Microbial Chemistry, Tokyo, <sup>2</sup>Adv. 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<sup>1,2,3)</sup> and spin-coupling constant between <sup>31</sup>P and <sup>1</sup>H.

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)<sup>4)</sup>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<sup>5)</sup>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 用いおいては、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<sup>6)</sup>。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、<sup>31</sup>P-HOESY 法と<sup>31</sup>P-<sup>1</sup>H 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,<sup>31</sup>P-HOESY 〇くぼた 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(<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>31</sup>P, DOFCOSY, HSOC, HMBC, 1D および 2D の NOESY )を測 定した。<sup>1</sup>H 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、<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H 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。

<sup>1</sup>H {<sup>31</sup>P 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<sup>7)</sup>。

<sup>31</sup>P-HOESY 法で測定した結果



Fig.2 <sup>31</sup>P -HOESY spectrum of kanamycin 3'- phosphate in D<sub>2</sub>O.
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。<sup>3</sup>J<sub>HP</sub>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。

<sup>1</sup>H 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 線幅が広くな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

<sup>31</sup>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<sup>8)</sup>。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'位プロトンのみに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<sup>8)</sup>。

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).
- D.Neuhaus, "Nuclear Overhauser Effect", *Encyclopedia of NMR*, John Wiley & Sons Ltd, 5, 3290 (1996).

#### High Order Spin 系の解析-Selective J-resolved HMQC法の応用 ○降旗一夫 東大院農・応生化,

#### Selective J-resolved -HMQC, A New Method for Measuring Proton-Proton Coupling Constants of High Order Spin Systems Kazuo Furihata

Division of Agriculture and Agricultural Life Sciences, University of Tokyo

Analysis of H-H J coupling constants is important for relative stereochemical studies of natural organic compounds. Overlapping protons or strongly coupled protons make analysis of H-H J coupling constant difficult. This problem can be solved by utilizing a proton attached to <sup>13</sup>C. In a strongly coupled  $H_A$  and  $H_B$  spin system,  $H_A$  attached to <sup>13</sup>C and  $H_B$  connected to <sup>12</sup>C constitute a week coupled proton system resulting in a large chemical shift difference between  $H_A$  and  $H_B$  spread by  $C_A$ - $H_A$  <sup>1</sup>J-coupling. Thus the  $H_A$ - $H_B$  J constant can be clearly determined by analyzing  $H_A$ . We reported J-resolved HMQC as a method to solve this problem<sup>1</sup>. However, analysis of  $H_A$  and  $H_B$  in a strongly coupled -CH<sub>2</sub>-CH<sub>A</sub>(OH)-CH<sub>B</sub>(OH)-CH<sub>2</sub>-) system, for example, becomes difficult even if  $H_A$  and  $H_B$  are coupled weekly. In order to overcome this problem, we developed a new method, selective J-resolved HMQC by decoupling two adjacent CH<sub>2</sub> protons. Application of this method to a model compound, monazomycin with a complicated structure proved its effectiveness for stereochemical studies.

天然有機化合物の相対立体化学の研究において、プロトンープロトンのスピン結合定数の解析は重要である。しかし、シグナルが重なっている場合や化学シフトが接近した high order スピン系ではスピン結合定数の解析は困難になる。この問題を解決する方法として、 <sup>13</sup>Cに結合したプロトンを解析することにより解決する。H<sub>a</sub>と H<sub>b</sub>が high order spin系であ

る場合、<sup>13</sup>Cに結合し<sup>1</sup> $J_{C+H}$ で分裂した $H_A$ のプロトンを利用し、<sup>12</sup>Cに結合した $H_B$ と<sup>13</sup>Cに結合した $H_A$ のfirst orderのspin 系にして解析する。この<sup>13</sup>Cに結合した  $H_A$ を解析することにより、 $H_A と H_B$ の関係 が明らかになる。この方法として J-resolved HMQC法を報告してきた<sup>(1)</sup>。 しかし、multipletに分裂した high order spin系、例えば -CH<sub>2</sub>-CH<sub>A</sub>(OH)-CH<sub>B</sub>(OH)-CH<sub>2</sub>-、あるいは -CH<sub>2</sub>-CH<sub>A</sub>=CH<sub>B</sub>-CH<sub>2</sub>-、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 ンプ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。



Fig.1 Selective J-resolved HMQC pulse sequences.

Selective J-resolved HMQC, high order spin system

ふりはた かずお

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。

#### <u>パルス系列</u>

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<sup>(2)(3)</sup>。 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、プロトンープロトンのスピン結合で展開している。しかし、△t1 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 t1max を展開していない。そのために、f1 方向では、スピンー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、t1max が 300~500ms まで時間展開するようにスピン展開時間(△2)に J-scaling パルス(--nt1/2-180(H, C)-nt1/2--)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 t1、プロトンープロトンのスピン結合は nt1 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。

#### <u>High order spin 系について</u>

プロトン H<sub>A</sub>、H<sub>B</sub>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<sub>A</sub>、H<sub>B</sub>の間のスピン結合は high order の関係にあり、H<sub>A</sub>、H<sub>B</sub>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、 <sup>13</sup>C に結合した H<sub>A</sub>、H<sub>B</sub>との関係において、H<sub>A</sub>、H<sub>B</sub>が 10Hz でスピン結合し、そして、H<sub>A</sub>と <sup>13</sup>C とは 125Hz で結合した場合を考える。図 2 に示すように、H<sub>A</sub>は <sup>1</sup>J<sub>CH</sub>により大きく分裂し、

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





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<sub>2</sub>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。

#### J-resolved-HMQC スペクトル

図3は1,4-dimetoxy-2,3-butandiolのJ-resolved-HMQC-1のスペクトルである。このスペクトルではf1軸において、J<sub>CH</sub>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からは直接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<sub>CH</sub>で二つに分裂し、プロトンープロトンで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<sub>H</sub>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、f1 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<sub>CH</sub>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<sup>(4)</sup>。

#### 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スートラ 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  $^{1}J_{CH}$ で大きく 2 本に分裂する。更に、プロトンープロトンの 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<sub>HH</sub>=15Hz を観測する。また、H12, H13 のクロスピークにおいても、J<sub>HH</sub>=15Hz 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、t1max 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、 nt1max 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



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

ある。このプロトンー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).

**超高速MASのもとでの<sup>1</sup>H-<sup>14</sup>N 2次元固体NMR**: **1 μL以下の微量試料を数分で測定** 〇西山裕介<sup>1</sup>、遠藤由宇生<sup>1</sup>、根本貴宏<sup>1</sup>、黒子弘道<sup>2</sup>、内海博明<sup>1</sup>、山 内一夫<sup>3\*</sup>、樋岡克哉<sup>1</sup>、朝倉哲郎<sup>3</sup> <sup>1</sup>日本電子、<sup>2</sup>奈良女子大、<sup>3</sup>農工大院工

#### <sup>1</sup>H-<sup>14</sup>N 2D solid-state NMR under very fast MAS: A few minutes observation for a sample less than 1 μL

○Yusuke Nishiyama<sup>1</sup>, Yuki Endo<sup>1</sup>, Takahiro Nemoto<sup>1</sup>, Hiromichi Kurosu<sup>2</sup>, Hiroaki Utsumi<sup>1</sup>, Kazuo Yamauchi<sup>3</sup>, Katsuya Hioka<sup>1</sup>, and Tetsuo Asakura<sup>3</sup>

<sup>1</sup>JEOL Ltd., 3-1-2 Musashino, Akishima, Tokyo 196-8558, Japan

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

<sup>2</sup>Department of Biotechnology, Tokyo University of Agriculture and Technology, Tokyo 184-8588, Japan

Sensitivity and resolution enhancement of <sup>1</sup>H detected <sup>14</sup>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 <sup>1</sup>H  $T_2$ ' and efficiently decouples <sup>1</sup>H-<sup>14</sup>N interactions. The Micro-coil contributes to sensitivity enhancement via strong <sup>14</sup>N rf fields and high sensitivity per unit volume. <sup>1</sup>H-<sup>14</sup>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  $\mu$ L.

窒素には<sup>14</sup>Nと<sup>15</sup>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。<sup>14</sup>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<sup>14</sup>N NMR測定が提案 された[1]。この測定においては、<sup>14</sup>Nに隣接するスピン1/2核を用いてHMQCにより間 接的に<sup>14</sup>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<sup>1</sup>H観測<sup>1</sup>H/<sup>14</sup>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<sup>1</sup>H/<sup>14</sup>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)<sup>1</sup>HのT<sub>2</sub>'緩和時間が長くなる。これ は直接次元(<sup>1</sup>H)および間接次元(<sup>14</sup>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くなる。3)単位体積あたりの感度が 高くなる。4)<sup>14</sup>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)<sup>1</sup>H/<sup>14</sup>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

O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<sup>1</sup>H/<sup>14</sup>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。

<sup>14</sup>N NMRは同位体ラベルを必要とせず、<sup>14</sup>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<sup>14</sup>N NMRの組み合わせを発表する。



 $^{1}\mathrm{H}$  $^{1}H/^{14}N$ Figure detected HMQC spectrum of glycyl-L-alanine under 70 kHz MAS. SO coherences were selected in the <sup>14</sup>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 <sup>14</sup>N SQ coherences. SR4<sup>2</sup><sub>1</sub> [4] was

applied during magnetization transfer period to recouple <sup>1</sup>H-<sup>14</sup>N dipolar interactions. Projections on the <sup>1</sup>H and <sup>14</sup>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. Sco. 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<sup>1</sup>、中山 顕貴<sup>1</sup>、立石 健一郎<sup>1</sup>、香川 晃徳<sup>1</sup>、 武田 和行<sup>2</sup>、北川 勝浩<sup>1</sup>(<sup>1</sup>阪大院基、<sup>2</sup>京大院理)

#### <sup>2</sup>H-decoupling-accelerated <sup>1</sup>H spin diffusion in triplet-DNP

 Makoto Negoro<sup>1</sup>, Kenki Nakayama<sup>1</sup>, Kenichiro Tateishi<sup>1</sup>, Akinori Kagawa<sup>1</sup>, Kazuyuki Takeda<sup>2</sup>, and Masahiro Kitagawa<sup>1</sup>
 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 <sup>1</sup>H polarization is attained by partially deuterating host material with appropriate <sup>1</sup>H concentration. In such a dilute <sup>1</sup>H spin system, it is shown that the <sup>1</sup>H spin diffusion rate and thereby the buildup efficiency of <sup>1</sup>H polarization can further be enhanced by continually applying radiofrequency irradiation for deuterium decoupling during the DNP process. The <sup>1</sup>H spin diffusion coefficients are estimated from DNP repetition interval dependence of the initial buildup rate of <sup>1</sup>H polarization, and the result indicates that the spin diffusion coefficient is enhanced by a factor of 2 compared to that without <sup>2</sup>H decoupling.

動的核偏極 (DNP) は電子スピン偏極を核スピンに移すことで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<sub>e</sub>/γ<sub>n</sub> 倍向上させることが可能であり (γ<sub>n</sub>:対 象核スピンの磁気回転比、γ<sub>e</sub>: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<sub>e</sub>/γ<sub>n</sub> 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<sup>1</sup>H 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 プしたゲスト分子 (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<sup>1</sup>H スピンに移され、その局在化した<sup>1</sup>H スピン偏極が「スピン拡散」によってホスト 分子の<sup>1</sup>H スピン、そして興味の対象となる分子の<sup>1</sup>H 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<sup>2</sup>H 化率が高すぎると<sup>1</sup>H スピ ン間の距離が遠くなりすぎ、<sup>1</sup>H スピン拡散が起こりにくくなってしまうので、この<sup>2</sup>H

Key Word: triplet-DNP, spin diffusion, <sup>2</sup>D 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



 $\boxtimes$  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 <sup>1</sup>H (Q=12) and <sup>2</sup>H 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、<sup>2</sup>H-<sup>1</sup>H 間双極子相 互作用がスピン拡散の原動力となる<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H 間のフリップフロップ過程を平均化すること は、<sup>1</sup>H 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<sup>2</sup>H 化サ ンプルにおいて、triplet-DNP の最中に連続的に<sup>2</sup>H デカップリングを施すことで<sup>1</sup>H 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%<sup>2</sup>H 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 ピンに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、<sup>2</sup>H 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、<sup>2</sup>H 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<sup>2</sup>H 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<sup>1</sup>H 希釈領域の<sup>1</sup>H スピンの NMR 信号より広幅で、<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H 同核双極子相 互作用が線形を支配している<sup>1</sup>H リッチな領域からの信号、すなわち、ペンタセン内の<sup>1</sup>H 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<sup>1</sup>H スピンからの NMR 信 号、すなわち、<sup>2</sup>H 化 *p*-テルフェニルの残留<sup>1</sup>H 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<sup>1</sup>H 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<sup>1</sup>H 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<sup>2</sup>H 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<sup>2</sup>H デカップ リングによって確かに<sup>1</sup>H スピン拡散が促進されていることが示された。

図3に<sup>2</sup>H デカップリングを行いながら20ms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<sup>1</sup>H 偏極向上の様子を示す。デカップリングを行った方



 $\boxtimes$  2: (a) <sup>1</sup>H NMR spectrum obtained with a magic echo sequence after a single-shot ISE sequence. (b) <sup>1</sup>H 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) <sup>2</sup>H 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。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、50kHz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で、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<sup>2</sup>H 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<sup>2</sup>H 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~2.0×10<sup>-18</sup>、~1.0×10<sup>-18</sup> m<sup>2</sup>/s と求められた。よって<sup>2</sup>H 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%<sup>2</sup>H 化*p*-テルフェニル単結晶において<sup>2</sup>H 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、<sup>2</sup>H 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 <sup>2</sup>H 化サ ンプル下の <sup>1</sup>H 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 <sup>13</sup>C や <sup>15</sup>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<sup>-</sup>→<sup>13</sup>C、<sup>15</sup>N) と間接的に偏極させる方法 (e<sup>-</sup>→<sup>1</sup>H→<sup>13</sup>C、<sup>15</sup>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



3: Buildup curves of 1H polarization by repeating 3: He initial buildup rate at various repeti-ISE with an interval of 20 ms without <sup>2</sup>H decoupling tion rates obtained with (triangles) and without irradiation (open circles), with on-resonance <sup>2</sup>H de- (circles) <sup>2</sup>H decoupling. Simulated data with coupling irradiation (filled circles), and off-resonance various spin diffusion coefficients is also plot-(+50 kHz)<sup>2</sup>H decoupling irradiation (filled triangles). ted (solid lines).

ピンは低核磁気回転比で低濃度な上に、まわりの<sup>1</sup>Hスピンからの双極子相互作用の影 響で <sup>13</sup>C、<sup>15</sup>N スピン拡散は非常に起こりにくくなってしまっている。このような状況で は、<sup>1</sup>H デカップリングがこの妨げを排除し、<sup>13</sup>C、<sup>15</sup>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<sup>13</sup>C、<sup>15</sup>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 <sup>13</sup>C、 <sup>15</sup>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, "2Hdecoupling-accelerated <sup>1</sup>H spin diffusion in dynamic nuclear polarization with photoexcited 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<sup>1</sup>,肥後聡明<sup>1</sup>,細野 政美<sup>2</sup>,長谷隆司<sup>3</sup>,宮崎隆好<sup>3</sup>, 藤戸輝昭<sup>4</sup>,山田和彦<sup>5</sup>,木吉司<sup>6</sup>,高橋雅人<sup>1,7</sup>,山崎俊夫<sup>7</sup>,前田秀明<sup>1,7</sup> <sup>1</sup>横浜市立大学,<sup>2</sup>日本電子,<sup>3</sup>神戸製鋼所,<sup>4</sup>プローブ工房,<sup>5</sup>東京工業大学, <sup>6</sup>物質・材料研究機構,<sup>7</sup>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 Ebisawa<sup>1</sup>, Toshiaki Higo<sup>1</sup>, Masami Hosono<sup>2</sup>, Takashi Hase<sup>3</sup>, Takayoshi Miyazaki<sup>3</sup>, Teruaki Fujito<sup>4</sup>, Kazuhiko Yamada<sup>5</sup>, Tsukasa Kiyoshi<sup>6</sup>,

Masato Takahashi<sup>1,7</sup>, Toshio Yamazaki<sup>7</sup>, Hideaki Maeda<sup>1,7</sup>

<sup>1</sup> Yokohama City Univ., <sup>2</sup> JEOL Ltd., <sup>3</sup> Kobe Steel, Ltd., <sup>4</sup> Probe Laboratory Inc.,

<sup>5</sup> Tokyo Institute of Technology, <sup>6</sup> NIMS, <sup>7</sup> RIKEN 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<sup>(1)</sup>. 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<sup>0</sup> and Z<sup>1</sup> 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 <sup>13</sup>C-<sup>1</sup>H 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.<sup>(1)</sup> 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<sup>-6</sup>~10<sup>-8</sup>)や外部 電源の電流変化(10<sup>-6</sup>)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

O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, きよしつかさ, 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<sup>0</sup>, Z<sup>1</sup> 成分を検知するために,<sup>13</sup>C - <sup>1</sup>H 固体プローブの MAS ハウジングの上下に、微小な <sup>7</sup>Li 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<sup>0</sup>, Z<sup>1</sup> 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<sup>0</sup>, Z<sup>1</sup> 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(C<sup>10</sup>H<sup>16</sup>)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 0.04ppm/25h に抑制できることを報告した.今回は <sup>15</sup>N <sup>13</sup>C でラ ベル化された L-isoleucine の粉末の <sup>13</sup>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(<sup>13</sup>C-<sup>13</sup>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 1.2ppm/15h ( $=10^{-7}$ /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, 0.24ppm/21h ( $=10^{-8}$ /h) である. これは永久電流モードの LTS 磁石 (10<sup>-8</sup>/h) と同程度の安定度<sup>(2)</sup> 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 <sup>13</sup>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<sub>1</sub>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- <sup>13</sup>C-<sup>13</sup>C NOESY spectra of uniformly <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>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 <sup>13</sup>C NMR frequency of 125.7MHz. [b] In the case of HTS/LTS magnet with external lock.

3, HTS/LTS 1.03GHz NMR 用 (<sup>13</sup>C-<sup>1</sup>H) 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<sup>1</sup>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 (<sup>13</sup>C<sup>-1</sup>H) 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<sup>7</sup>Li 溶液マイクロコイル NMR を装着し,併せてZ<sup>1</sup>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]

- T.kiyoshi, A.Otsuka, S.Matsumoto, K.Zaitsu, 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ーロドプシンの 構造解析

〇川村 出<sup>1</sup>, Lichi Shi<sup>2</sup>, Kwang-Hwang Jung<sup>3</sup>, Leonid Brown<sup>2</sup>, Vladimir Ladizhansky<sup>2</sup> 1横浜国立大学 大学院工学研究院 2グエルフ大学、3ソガン大学

Solid-state NMR structural study of Anabaena Sensory Rhodopsin

○ Izuru Kawamura<sup>1</sup>, Lichi Shi<sup>2</sup>, Kwang-Hwang Jung<sup>3</sup>, Leonid S. Brown<sup>2</sup>, Vladimir Ladizhansky<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Engineering, Yokohama National University, Yokohama, Japan. <sup>2</sup>Department of Physics and Biophysics Interdepartmental Group,

University of Guelph, Ontario, Canada.

<sup>3</sup>Department 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]

アナベナセンサリーロドプシン(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<sup>13</sup>C、<sup>15</sup>N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, くうぁん-ふわぁんじゅん, 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-<sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N]標識ASRを発現させた。菌体の集菌、破砕後の膜画分をDDM (n-dodecyl-β-maltoside)で可溶化し、Ni-NTA agaroseに結合させ、[U-<sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N]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ポソームに、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 <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N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<sup>15</sup>N NMRスペクトルや<sup>13</sup>C-<sup>13</sup>C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<sup>15</sup>N NMR 信号やAliphatic領域の<sup>13</sup>C 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<sup>15</sup>N 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<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N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. <u>386</u> 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

〇土井崇嗣<sup>1</sup>, 増田裕一<sup>1</sup>, 武田和行<sup>1</sup>, 入江一浩<sup>2</sup>, 竹腰清乃理<sup>1</sup> <sup>1</sup>京大院理, <sup>2</sup>京大院農

## Structural analysis of the protofibrils of amyloid $\beta\mbox{-}protein$ using solid-state NMR

○Takashi Doi<sup>1</sup>, Yuichi Masuda<sup>1</sup>, Kazuyuki Takeda<sup>1</sup>, Kazuhiro Irie<sup>2</sup>, and K. Takegoshi<sup>1</sup> <sup>1</sup>Graduate School of Science, Kyoto University, Kyoto, Japan. <sup>2</sup>Graduate School of Agriculture, Kyoto University, Kyoto, Japan.

Alzheimer's disease (AD) is caused by abnormal deposition of 42-residue amyloid  $\beta$ -protein (A $\beta$ 42) in the brain. In the process of fibrillation, A $\beta$ 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 $\beta$ 42 protofibrils, a kind of soluble oligomers, intermolecular proximity of the Ala-21 residues in the A $\beta$ 42 protofibrils was studied by <sup>13</sup>C-<sup>13</sup>C rotational resonance experiments in the solid state. Unlike the A $\beta$ 42 fibrils, no intermolecular <sup>13</sup>C-<sup>13</sup>C correlation was found in the A $\beta$ 42 protofibrils. This result suggests that there is no intermolecular parallel  $\beta$ -sheet in the A $\beta$ 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  $\beta$  タンパク(amyloid  $\beta$ -protein : A $\beta$ 42)は、凝集することにより神経細胞毒性を示 す。A $\beta$ 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 $\beta$ 42のフィブリル形成には分子間平行  $\beta$ -シート構造が重要であること が知られている<sup>[1,2]</sup>が、オリゴマーにおける分子間  $\beta$ -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<sup>[3]</sup>。本研究では、 A $\beta$ 42のオリゴマー形成機構を解明する目的で、A $\beta$ 42プロトフィブリルにおける分子 間平行  $\beta$ -シート構造の有無をRotational Resonance(R2)法を用いて検証した。

【<sup>13</sup>C標識したAB42 サンプルの調製】

Aβ42 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<sup>13</sup>C標識 したAβ42 を化学合成した。R2 法では、2 つの<sup>13</sup>C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<sup>13</sup>C標識したAβ42 と、C<sub>α</sub>のみを<sup>13</sup>C標識したAβ42 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,いりえかずひろ,たけごしきよのり



DAEFRHDSGY EVHHQKLVFF AEDVGSNKGA IIGLMVGGVV IA

Fig. 1. Amino acid sequence of  ${}^{13}C$  labeled A $\beta$ 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 CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> (pH 7.4) 中において 37℃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、Aβ42 プロトフィブリル(収量 2.6 mg)を調製した。CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>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Aβ42 溶液を 37℃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、Aβ42 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一次元 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 のパルスシークエン スを用いて一次元R2 実験を行った。本測定ではCPの後、<sup>13</sup>COと<sup>13</sup>Caの化学シフト差 を利用して<sup>13</sup>COの磁化のみを残し、mixing time ( $\tau$ )の間にR2 によって<sup>13</sup>COから<sup>13</sup>C<sub>a</sub> へ移動した磁化を観測した。

Aβ42 フィブリルの一次元R2 実験では、<sup>13</sup>COから<sup>13</sup>C<sub>α</sub>への磁化移動が観測された (Fig. 3A)。<sup>13</sup>COと<sup>13</sup>C<sub>α</sub>の分子間距離が近いという今回の結果の詳細は、Aβ42 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<sup>13</sup>C<sub>α</sub>シグナルは観測さ れなかった(Fig. 3B)。R2 では 6Å以内の<sup>13</sup>C-<sup>13</sup>C間の双極子相互作用が観測できるこ とから、本結果はAβ42 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。



Fig. 3. <sup>13</sup>C 1D R2 spectra of Aβ42 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/HtrⅡの動的構造 解析 ○池田恵介<sup>1</sup>,江川文子<sup>1</sup>,亀田倫史<sup>2</sup>,林こころ<sup>3</sup>,児嶋長次郎<sup>1,3</sup>, 阿久津秀雄<sup>1</sup>,藤原敏道<sup>1</sup> <sup>1</sup>阪大・蛋白研 <sup>2</sup>産総研・CBRC <sup>3</sup>奈良先端大・バイオ

#### Dynamic Structural Analysis of Halobacterial Transducer Transmembrane Protein, *p*HtrII by Solid-State NMR Spectral Simulations

OKeisuke Ikeda<sup>1</sup>, Ayako Egawa<sup>1</sup>, Tomoshi Kameda<sup>2</sup>, Kokoro Hayashi<sup>3</sup>, Chojiro Kojima<sup>1,3</sup>, Hideo Akutsu<sup>1</sup> and Toshimichi Fujiwara<sup>1</sup> <sup>1</sup>Institute for Protein Research, Osaka University <sup>2</sup>Computational Biology Research Center, AIST <sup>3</sup>Graduate school of Biological Sciences, NAIST

The negative phototaxis of *N. pharaonis* halobacteria is triggered by the light activation of phoborhodopsin *p*pR. A transducer protein, *p*HtrII forms a complex with *p*pR on cell membranes. The structural change of *p*pR induced by photoirradiation is thought to be transmitted through the transmembrane helices and the membrane-adjacent HAMP domain of *p*HtrII to the cytoplasmic catalytic domain. However, little is known about the structure and dynamics of *p*HtrII. 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 <sup>13</sup>C-<sup>13</sup>C 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の膜貫通へリ 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メ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,かめだともし,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]<sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N均一標識pHtrII(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<sup>13</sup>C-<sup>13</sup>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。pHtrll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<sup>a</sup>,C')およびスピンダイナミクスに基づく信号強度計算を行った。 [結果・考察] pHtrII(1-159)の二次構造解析を行うため、プローブ設定温度-60℃,混 合時間25.6 msで<sup>13</sup>C-<sup>13</sup>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<sup>α</sup>-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pHtrII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<sup>α</sup>-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、pHtrII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、pHtrII(100-159)の溶液NMR実験結果と一致している。

続いて、pHtrII(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℃でのspin diffusionスペクトルの解析を行った。-60℃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、pHtrIIの膜貫通へリックスに加え、膜近傍30残基程度、特にHAMPドメインのN 末側のへ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℃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℃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pHtrII(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、<sup>13</sup>C, <sup>15</sup>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、ppRとpHtrII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、シグナル伝達のメカニズムに迫ることがで きると考えている。

#### **P73** クモ牽引糸局所構造モデル化合物の安定同位体ラベルと 固体NMR構造解析 〇佐藤佑哉<sup>1</sup>, 中澤靖元<sup>2</sup>, 朝倉哲郎<sup>1</sup>

1農工大院工 2農工大科博

## Stable isotope labeling of model peptides for local structure of spider dragline silk and the structural analysis using solid- state NMR

OYuya Satoh<sup>1</sup>, Yasumoto Nakazawa<sup>2</sup> and Tetsuo Asakura<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Biotechnology, Tokyo University of Agriculture and Technology, Japan <sup>2</sup>Nature 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 <sup>13</sup>C labeling sites and <sup>13</sup>C 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 <sup>13</sup>C 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



Fig. 1 The primary structure of Nephila Clavipes MaSp1

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。

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-<sup>13</sup>C]Alaで、(b)の配列ではGly rich部位の3 つの位置を[3-<sup>13</sup>C]Ala[1-<sup>13</sup>C]Glyで<sup>13</sup>C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)<sub>4</sub> で両端をはさみ、水溶性を付与した。 (a) (E)<sub>4</sub>GGLGGQGAGAA[3-<sup>13</sup>C]AAAAGGAGQGGYGG(E)<sub>4</sub> (b) A<sup>13</sup>G<sup>14</sup>:(E)<sub>4</sub>(A)<sub>6</sub>GG[3-<sup>13</sup>C]A[1-<sup>13</sup>C]GQGGYGGLGSQGAGRGGLGGQGAG(A)<sub>6</sub>(E)<sub>4</sub> A<sup>26</sup>G<sup>27</sup>:(E)<sub>4</sub>(A)<sub>6</sub>GGAGQGGYGGLGSQG[3-<sup>13</sup>C]A[1-<sup>13</sup>C]GRGGLGGQGAG(A)<sub>6</sub>(E)<sub>4</sub> A<sup>36</sup>G<sup>37</sup>:(E)<sub>4</sub>(A)<sub>6</sub>GGAGQGGYGGLGSQGAGRGGLGGQG[3-<sup>13</sup>C]A[1-<sup>13</sup>C]G(A)<sub>6</sub>(E)<sub>4</sub>

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、 <sup>13</sup>C 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、Ala<sup>13</sup>以外は、一 部、β-sheetとなる。延伸処理を行うと、C端 に近いA<sup>36</sup> 残基でβ-sheet 構造成分が50% まで増加した。一方、N 端に近いA<sup>13</sup> およ び中央のA<sup>26</sup>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B-sheet を形成させ、C 端に 近いA<sup>36</sup> 残基はすべてβ-sheet 構造となる。 さらに、N 端に近いA<sup>13</sup>でも、やはり、 β-sheet 構造が増加する。中央のA<sup>26</sup> 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 A<sup>36</sup> 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、Glv 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、Glv残基は、延伸ならびに酸性 下沈殿処理によって、G<sup>14</sup>,G<sup>27</sup>でランダム



(E), AAAAAAGGAG<sup>14</sup> OGGYGGLGSOGAG<sup>27</sup> RGGLGGOGAG<sup>27</sup> AAAAAA(E),



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

コイルを保ち、G<sup>37</sup>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、Ala<sup>13</sup>、Ala<sup>26</sup>は緩やかに $\beta$ -sheetが増加 するのに対し、A<sup>36</sup> 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。

## 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<sup>1</sup>、鈴木 悠<sup>1</sup>、青木 昭宏<sup>1</sup>、西山 裕介<sup>2</sup>、 樋岡 克哉<sup>2</sup>、朝倉 哲郎<sup>1</sup> <sup>1</sup>農工大院工・<sup>2</sup>日本電子(株)

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

<sup>1</sup>Department of Biotechnology, Tokyo University of Agriculture and Technology. Japan <sup>2</sup> JEOL Ltd.Japan

The analytical methods to determine the inter-molecular structures of alanine oligopeptides in the solid state were developed on the basis of  ${}^{1}\text{H}{}^{-1}\text{H}$  spin diffusion NMR experiment,  ${}^{13}\text{C}{}^{-15}\text{N}$  inter-molecular REDOR observations, X-ray diffraction powder pattern and  ${}^{1}\text{H}$  NMR chemical shift data together with the semi-empirical  ${}^{1}\text{H}$  chemical shift calculations. The co-ordinates of (Ala)<sub>4</sub> with anti-parallel (AP) $\beta$ -sheet structure determined by single-crystal X-ray diffraction analysis were used to examine this analytical method. Then the methods were applied to analyze (Ala)<sub>4</sub> with parallel  $\beta$ -sheet structure, and difference in the inter-molecular structures between (Ala)<sub>6</sub> and (Ala)<sub>7</sub> although both are AP  $\beta$ -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、<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H spin-diffusion 測定、<sup>13</sup>C-<sup>15</sup>N 分子間 REDOR 測定、粉末 X 線測定、 半経験的 <sup>1</sup>H 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(Ala)<sub>4</sub>、(Ala)<sub>6</sub> および(Ala)<sub>7</sub> 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、(Ala)<sub>6</sub> および(Ala)<sub>12</sub> であ るが、後者の構造データは(Ala)<sub>7</sub> と同様であるので、(Ala)<sub>7</sub> 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、((Ala)<sub>n</sub> 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<sup>13</sup>C、 <sup>15</sup>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、ソフトウエア、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。<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H 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 Fig.1 X-ray diffraction powder patterns of alanine



い、分子間構造モデルの作製を行なった。

【結果】(Ala)<sub>4</sub>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(Ala)4の平行(P) β-sheet 構造ならびに (Ala)<sub>6</sub>および(Ala)<sub>7</sub>の APβ-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、(Ala)n、APB-sheet 構造の粉末 X 線回折パターンである。(Ala)7(Ala)12 は poly-alanine APβ-sheet 構造の計算パターンに近く、(Ala)4,(Ala)6 (a) の場合と異なることがわかる。

ここでは、(Ala)7 に関する NMR 構造情報の一部 を示した。分子間 <sup>13</sup>C-<sup>15</sup>N REDOR 測定を行ない距 離情報を得た。(Ala)3[3-13C]Ala4(Ala)3 ならびに (Ala)<sub>4</sub><sup>15</sup>N]Ala<sup>5</sup>(Ala)<sub>5</sub>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、(Ala)4の APβ-sheet 構造と sheet 間の構造が異なる。





Fig.2 Determination of the distance between Ala  $^{13}C\beta$  and  $^{15}N$  nuclei of (Ala)7 by REDOR experiment.



さらに、(Ala)7 について、<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H 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

**Fig.3** (a)<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H spin-diffusion spectra of (Ala)<sub>7</sub> at 0ms and 1ms mixing time (b)Representative<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H spin-diffusion build up curves for (Ala)7

シミュレーション等を加えて(Ala)7構造解析を進めた。(Ala)4の Pβ-sheet 構造ならびに (Ala)<sub>6</sub>の APβ-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。

## **固体<sup>17</sup>ONMRによるメリチンの膜結合構造および配向 の解析** 〇田制侑悟<sup>1</sup>,山田和彦<sup>2</sup>,川村出<sup>1</sup>,内藤晶<sup>1</sup> <sup>1</sup>横国大院工 <sup>2</sup>東工大院理工

## Analysis of structure and orientation of melittin bound to membrane by solid state <sup>17</sup>O NMR

○Yugo Tasei<sup>1</sup>, Kazuhiko Yamada<sup>2</sup>, Izuru Kawamura<sup>1</sup> and Akira Naito<sup>1</sup> <sup>1</sup> Graduate School of Engineering, Yokohama National University, Japan <sup>2</sup>Department 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 temperture ( $T_c$ ). 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 magmetic field. In this study, [<sup>17</sup>O]Trp<sup>19</sup>-melittin is synthesized to observe <sup>17</sup>O NMR for the melittin bound to membrane. <sup>17</sup>O NMR of [<sup>17</sup>O]Trp<sup>19</sup>-melittin powder has provided with 7.3MHz and 0.6 for quadrupole coupling constant ( $C_q$ ) and asymmetry parameter ( $\eta_q$ ), respectively. We will discuss on the analysis of <sup>17</sup>O 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<sub>c</sub>)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<sup>31</sup>P NMR測定からT<sub>c</sub>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 造をとりへ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<sup>17</sup>O 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<sup>17</sup>O 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<sup>17</sup>O 標識した標 識率 75%の Trp<sup>19</sup>(Fig.1)を用いて、選択的に<sup>17</sup>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<sup>19</sup>の<sup>17</sup>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 AVANCEIII - 600 を用 いて基準物質の水(H<sub>2</sub>O)の信号を 0ppm とした。励起パル スとして 1.6 µs 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



Fig.1 Structure of Fmoc [<sup>17</sup>O]-Tryptophan

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ギングが起こ りやすいのでデジタルフィルターかけてリンギング信号を除去した。

【結果と考察】

粉末(膜調製してない)の[<sup>17</sup>O]-Trp<sup>19</sup>-メリチンの固体<sup>17</sup>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<sup>17</sup>ONMR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<sub>2</sub>)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 $C_0$ =7.4 MHzと,非対称因子 $\eta_0$ =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<sup>17</sup>O NMRの相互作用パラメーターと比較してメリチンの腹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<sup>17</sup>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腹結合構造と膜に対する配向を求める予定である。



Fig.2 <sup>17</sup>O DD-MAS NMR spectra of [<sup>17</sup>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-

<sup>0</sup>田巻 初<sup>1</sup>、樋口 真理花<sup>1</sup>、江川 文子<sup>2</sup>、藤原 敏道<sup>2</sup>、横山 順<sup>3,4,5</sup>、木川 隆則<sup>3,4</sup>、下野 和実<sup>3,6</sup>、染谷 友美<sup>3</sup>、白水 美香子<sup>3</sup>、横山 茂之<sup>3,7</sup>、神谷 昌克<sup>1</sup>、菊川 峰志<sup>1</sup>、相沢 智康<sup>1</sup>、河野 敬一<sup>1</sup>、出村 誠<sup>1</sup>

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

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

<sup>o</sup> Hajime Tamaki<sup>1</sup>, Marika Higuchi<sup>1</sup>, Ayako Egawa<sup>2</sup>, Toshimichi Fujiwara<sup>2</sup>, Jun Yokoyama<sup>3,4,5</sup>, Takanori Kigawa<sup>3,4</sup>, Kazumi Shimono<sup>3,6</sup>, Tomomi Someya<sup>3</sup>, Mikako Shirouzu<sup>3</sup>, Shigeyuki Yokoyama<sup>3,7</sup>, Masakatsu Kamiya<sup>1</sup>, Takashi Kikukawa<sup>1</sup>, Tomoyasu Aizawa<sup>1</sup>, Keiichi Kawano<sup>1</sup> and Makoto Demura<sup>1</sup>

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

Rhodopsin is a membrane protein having a typical seven-transmembrane-helical structure. Archael rhodopsin, the structural family of rhodopsin, functions as light-driven ion pump or sensor. Halorhodopsin (HR), one of archael 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 <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N 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

<sup>o</sup>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 (*Np*HR)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<sup>-</sup>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<sup>-</sup> 輸送に重要であるという報告がなされているが、Cl<sup>-</sup>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<sup>-</sup>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、C1<sup>-</sup>の有無による違いを見るため、C1<sup>-</sup>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、C1<sup>-</sup>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。

## 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

 ○渡邉(伊藤)ひかり<sup>1</sup>、上平美弥<sup>2</sup>、近藤正志<sup>3</sup>、佐藤道夫<sup>3</sup>、中越 雅道<sup>3</sup>、内藤晶<sup>1</sup>
<sup>1</sup>横浜国大院・工学府、<sup>2</sup>東北大・多元研、<sup>3</sup>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 <sup>13</sup>C solid-state NMR

○Hikari Watanabe(Itoh)<sup>1</sup>, Miya Kamihira<sup>2</sup>, Masasi Konndou<sup>3</sup>, Michio Sato<sup>3</sup>, Masamichi Nakakoshi<sup>3</sup>, and Akira Naito<sup>1</sup> <sup>1</sup>Gradute School of Engineering, Yokohama National University <sup>2</sup>Institute of Multidisciplinary Research Tohoku University

<sup>3</sup>Instrumental 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. <sup>13</sup>C NMR experiments were performed on the fibrillations of hCT mutants at pH3.3, 5.3 and 7.4. The <sup>13</sup>C NMR signals showed that structural transition of hCT mutants from random coil to  $\beta$ -sheet and random coil near C-terminal regions appeared during fibrillation. Rate constant, k<sub>1</sub>s of hCT mutants are determined to be as fast as those of Wt-hCT, while k<sub>2</sub>s 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<sup>13</sup>C 標識したアミノ酸を用いて、固相法により化学合成を行い、脱保護、逆相 HPLC により精製し、目的の試料を得た。次に、hCT 変異体(F19L-hCT)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がルス下で信号検出する DD-MAS 法を用い、線維成分の観測に交差分離とデカップリングを組み合わせた CP-MAS 法を用いて、同じ試料に対し、交互に線維形成過程を測定した。

【結果と考察】

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。



(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。 Sam

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

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 <sup>13</sup> 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 見られなかったので、溶媒によって構造が変化するのではないことが明らかになった。

線維成分を測定する CP-MAS 法の NMR スペクトル信号が伸長し始めた時間を比較す ると、酢酸水溶液での線維化に対し、HEPES 水溶液では 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。

Sam	ple	Gly10 C=O	Ala26 CH <sub>3</sub>	
Condition: pH3.3	3(酢酸)			
hCT	Monomer(a) Fibril(b)	171.8 (α-helix) 169.9 (β-sheet)	16.9 (random coil) 19.3 (β-sheet), 21.3 (β-sheet)	
F19L-hCT	Monomer(a) Fibril(b)	171.9 (α-helix) 170.0 (β-sheet)	16.9 (random coil) 19.1 (β-sheet), 17.0 (random coil)	
Condition: pH5.3	3 (HEPES)			
F19L-hCT	Monomer(a) Fibril(b)	171.8 (α-helix) 169.6 (β-sheet)	16.9 (random coil) 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)	

Table 2	<sup>°</sup> C chemical	shifts of hCT	and its mutants	(ppm from	TMS) and	l their assignments
---------	-------------------------	---------------	-----------------	-----------	----------	---------------------

(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)線維形成機構においての反応速度解析

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<sub>1</sub>、と線維成長反応の速度定数 k<sub>2</sub>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 <sup>13</sup>C NMR sprctra of [1-<sup>13</sup>C]Gly<sup>10</sup>,F19L-hCT at CP-MAS in the time course of fibril formation

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

Table3 Kinetics parameters f	for fibril formation of	Wt-hCT, F19L-hCT and	L- <sub>3</sub> -mutant hCT
------------------------------	-------------------------	----------------------	-----------------------------

(L<sub>3</sub>-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。 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<sup>1,2</sup>, 坪井裕理<sup>3</sup>, 石田亘広<sup>1</sup>, 志佐倫子<sup>4</sup>, 則武義幸<sup>4</sup>, 守屋繁春 <sup>3,5,7</sup>, 高橋治雄<sup>1</sup>, 菊地淳<sup>2,5,6,7</sup> <sup>1</sup>豊田中研, <sup>2</sup>名大院農, <sup>3</sup>理研ASI, <sup>4</sup>トヨタ自, <sup>5</sup>横市院生命, <sup>6</sup>理研PSC, <sup>7</sup> 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<sup>1,2</sup>, Yuuri Tsuboi<sup>3</sup>, Nobuhiro Ishida<sup>1</sup>, Noriko Shisa<sup>4</sup>, Yoshiyuki Noritake<sup>4</sup>, Shigeharu Moriya<sup>3,5,7</sup>, Haruo Takahashi<sup>1</sup>, Jun Kikuchi<sup>2,5,6,7</sup>

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

Plant biomass including cellulose is abundant renewable resources produced by  $H_2O$  and  $CO_2$  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 <sup>13</sup>C- 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リナリーの導入により、循環型社 会形成が模索されている<sup>1.5)</sup>。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ことが期待される。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<sup>6)</sup>。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、つぼいゆうり、いしだのぶひろ、しさのりこ、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<sup>13</sup>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(<sup>13</sup>C CP-MAS)、可溶化試料は溶液 NMR(<sup>1</sup>H および<sup>13</sup>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<sup>13</sup>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<sup>13</sup>C-<sup>13</sup>C スピン結合に伴う2次元計測と(固体:<sup>13</sup>C-<sup>13</sup>C Refocused INADEQUATE、 溶液:<sup>13</sup>C-<sup>13</sup>C CT-COSY)、1D-NMR データの共相関解析から<sup>7</sup>、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, <u>124</u>, 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.

**固体**<sup>13</sup>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 <sup>13</sup>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 <sup>13</sup>C NMR line shape than that of a pristine NR. However, the static <sup>13</sup>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 <sup>13</sup>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<sup>13</sup>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<sup>1)</sup>。

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。<sup>13</sup>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 $\phi$  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、<sup>13</sup>C NMR ス ペクトルおよび <sup>13</sup>C スピンー格子緩和時間( $T_1^{C}$ )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、なかざわちかこ、くろつたくぞう

<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℃で測定した静止状態固体<sup>13</sup>C NMR ス ペクトルである。(a) は、NR を 60°C の真空中でア ニー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3mm 厚のNR をはさみ、MAS= 5kHz 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℃に設定し てMAS=5kHz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<sup>2)</sup>。 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℃から80℃に温度を上昇させると、メチル 基の<sup>13</sup>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<sup>13</sup>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<sup>13</sup>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 <sup>13</sup>C NMR spectrum of NR at 30°C without MAS.



Fig.2 Temperature dependence of <sup>13</sup>C NMR Chemical Shift of NR.



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

## 

## 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 <sup>13</sup>C Solid State NMR, Cross-Polarization (CP) technique is generally used to obtain higher <sup>13</sup>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<sup>13</sup>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、<sup>13</sup>Cの低い天然存在比(1.1%)と比較的小さな磁気回転比(<sup>1</sup>H の 1/4)に起因する低感度を補うために<sup>1</sup>H/<sup>13</sup>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、<sup>1</sup>H/<sup>13</sup>Cの交差緩和時間 T<sub>CH</sub>と回転系でのスピンー格子緩和時間 T<sub>10</sub>を用いて、

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

と表わされる。交差緩和時間 T<sub>CH</sub> が運動性に、スピン-格子緩和時間 T<sub>10</sub>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<sup>13</sup>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さ 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.

## <sup>23</sup>Na-MQMAS NMR 法による高分子 Na 塩の研究

<sup>°</sup>平沖敏文<sup>1</sup>、藤江正樹<sup>1</sup>、荒樋 周<sup>1</sup>、畠山盛明<sup>2</sup>、齋藤広児<sup>2</sup> 1 北大院工、2 新日鐵先端研

## <sup>23</sup>Na-MQMAS NMR Studies on Na ion complexes of Polymers

<sup>o</sup>Toshifumi Hiraoki<sup>1</sup>, Masaki Fujie<sup>1</sup>, Syu Arahi<sup>1</sup>, Moriaki Hatakeyama<sup>2</sup>, Koji Saito<sup>2</sup> <sup>1</sup> Grad. Sch. Eng., Hokkaido University, <sup>2</sup> Advanced Technology Res. Lab., Nippon Steel Corp.

Solid-state <sup>23</sup>Na 3QMAS NMR measurements were made of sodium salts of poly(glutamic acid), poly(aspartic acid), and poly(methacrylic acid). Local structures of the sodium ion were characterized with the isotropic chemical shift  $\delta_{cs}$  and the quadrupole coupling product  $P_q$  to be 0 ~ -1 ppm and 1.6 ~ 2.1 MHz, respectively.

## 序

水溶性ポリアミノ酸は、対イオンに依存してポリアミノ酸の固体状態の主鎖コンフ オメーションや対イオン結合部位の構造が変化することが知られている。本研究では、 <sup>23</sup>Na MQMAS 法を用いて、高分子に対する Na(*I*=3/2)イオン結合部位の局所構造を検 討した。

#### 実験

<sup>23</sup>NaNMR 測定は JEOL ECA700(16.4T, 185 MHz)により、4mm ローターを用いて室温 で行い、1 M NaCl 水溶液を化学シフト基準に用いた。MQMAS 測定は Z-filter 3QMAS 法を用いた。<sup>13</sup>C-CPMAS 測定は 75MHz で行った。

試料は、ポリメタアクリル酸 Na(PMA-Na)、ポリ グルタミン酸 Na(PGA-Na)、ポリアスパラギン酸 Na(PAA-Na)及び酢酸ナトリウム 3H<sub>2</sub>O を用いた。

#### 結果と考察

 Fig.1 に各試料の <sup>23</sup>Na-MAS スペクトルとその化
 PGA-Na

 学シフト値を示す。高分子系では半値幅が
 400~600Hz の巾広いシングレットが得られた。化

 学シフト値は Na-O 間距離が長くなると、減少する
 PMA-Na

 ので <sup>1)</sup>、得られた結果は Na-O 間距離が
 PMA-Na

 PMANa<PGANa<PAANa の順で長くなることを示</td>
 NaAcetate

 10
 0

 0
 -10

 0
 -10

 0
 -10

 0
 -10

 0
 -10

 0
 -10

 0
 -10

 0
 -10

 0
 -10

 0
 -10

 0
 -10

 0
 -10

 0
 -10

 0
 -10

 0
 -10

 0
 -10

 0
 -10

 0
 -10

 0
 -10

 0
 -10

 0
 -10

 0
 -10

 0
 -10

 0
 -10

 0
 -10

 0
 -10

 0
 -10

 0
 -10
</tr



キーワード:<sup>23</sup>Na MQMAS、高分子錯体、四極子結合定数

○ひらおき としふみ、ふじえ まさき、あらひ しゅう、はたけやま もりあき、さいとう こうじ

<sup>13</sup>C CPMAS スペクトルの化学シフ ト値から求めた高分子のコンフォメ ーションはそれぞれコイル、コイル/ ヘリックス、ヘリックスである。

酢酸ナトリウムの<sup>23</sup>Na 3QMASスペ クトルを Fig.2 に示す。3 種の Na 部位 の存在が明瞭に判別でき、それぞれの 化学シフト等方値( $\delta_{cs}$ )と四極子積 ( $P_q$ ) を求めた。強度が最大のシグナル I は  $\delta_{cs}$ =0.01ppm、 $P_q$ = 1.44MHz である。II は-1.91ppm、1.27MHz、III は-0.34ppm、 1.40MHz である。

Fig. 3 に PGANa の <sup>23</sup>Na 3QMAS スペ クトルを示す。正の傾きを示す巾の広 い 単 一 シ グ ナ ル が 観 測 さ れ 、  $\delta_{cs}$ =0.04ppm、 $P_q$  =1.64MHz が得られた。 この試料のコンフォメーションは 70%がコイルで、30%がヘリックスで あるが、線形に影響はないようである。

Fig. 4に PAANa の<sup>23</sup>Na 3QMAS スペ クトルを示す。PGANa と同様に正の 傾きを示す巾の広い単一シグナルが 得られ、 $\delta_{cs}$ = -1.32ppm、 $P_q$ =2.02MHz である。



Fig. 2<sup>23</sup>Na 3QMAS NMR spectrum of NaAcetate.



Fig. 3 <sup>23</sup>Na 3QMAS NMR spectrum of PGANa.

PMANa の<sup>23</sup>Na 3QMAS スペクトル

(Fig. 5) は PGANa や PAANa と同様な線形を示し、 $\delta_{cs}$ = -0.44ppm、 $P_q$ =2.10MHz である。

高分子 Na 塩の  $P_q$ 値はいずれも低分子結晶の NaAcetate より大きい。 $\delta_{cs}$ はコンフォ メーションにはほとんど依存していない。



1) A. George, S. Sen, J. Stebbins, Solid State NMR, 10, 9(1997).

Fig. 4 <sup>23</sup>Na 3QMAS NMR spectrum of PAANa.

Fig. 5<sup>23</sup>Na 3QMAS NMR spectrum of PMANa.

## リチウムイオン二次電池用微細孔セパレータ内のイオン 拡散解析

○森川卓也<sup>1</sup>,橋本康博<sup>1</sup>,乙部博英<sup>1</sup>,山本挙<sup>1</sup>,吉野彰<sup>2</sup> <sup>1</sup>旭化成株式会社 基盤技術研究所 <sup>2</sup>旭化成株式会社 吉野研究室

## Analysis of ionic mobility in the porous separator for Li ion battery

OTakuya Morikawa<sup>1</sup>, Yasuhiro Hashimoto<sup>1</sup>, Hirohide Otobe<sup>1</sup>, Aguru Yamamoto<sup>1</sup>, Akira Yoshino<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ASAHI KASEI CORP. Analysis & Simulation Center <sup>2</sup>ASAHI KASEI CORP. Yoshino Laboratory

Li-ion, diffusing in confined micro porous spaces of the membrane separator was characterized with PFG-NMR. By placing the membrane sample with its direction appropriately set, every x/y/z component of the ion mobility was individually obtained. Further, with the varied diffusion time, an anomalous diffusion behavior was observed. These anisotropy and anomalous diffusion phenomena may well be related with the inhomogeneity of the micro pore distribution. With further information from FIB-SEM and computer simulation combined, we will discuss the battery characteristics, focusing on the Li-ion diffusion and micro porous structure.

#### 【緒言】

リチウムイオン二次電池(LIB)の出力特性を理解するには、セパレータ内部での イオンの拡散挙動を知ることが重要であり、拡散係数を直接計測可能なPFG-NMRは、 LIBの出力特性を議論するにあたって、非常に有用なツールである<sup>1)</sup>。しかし、バル ク電解液中とは異なり、微細孔を有するセパレータ内部ではイオン拡散が細孔構造に よる制限を受ける。PFG-NMRにより得られるイオンの拡散挙動を理解し、LIBの出力 特性の支配因子を明確にするには、セパレータ細孔構造とイオン拡散の関係を理解す ることが不可欠である。このため、PFG-NMRを用いてセパレータ中でのイオン拡散 を詳細に検討すると共に、FIB-SEMを用いて三次元的に細孔構造を捉え、イオン拡散 と細孔構造を関連付けた。また、計算機シミュレーションによるイオンの流れ計算を 用いることで、イオン拡散に影響を与える細孔構造因子を明確にした。発表では、ハ イレート放電時や、低温環境下において、LIBの出力特性に影響を与えるセパレータ 細孔構造を議論する。

#### 【実験】

電解液を含浸させたセパレータ(旭化成イーマテリアルズ(株)よりサンプル提供)の PFG-NMR測定により得られた電解液各成分の自己拡散係数から、セパレータ細孔内 でのLi<sup>+</sup>の拡散挙動を評価した。なお、自己拡散係数はStejskalの式に基づく拡散プロ ットから求めた。PFG-NMR測定は、JEOL製ECA400に最大13T/mまで勾配磁場を印加 可能な磁場勾配ユニットを接続して行った。電解液には1M LiTFSI / EC-MEC(1:2

PFG-NMR, イオン拡散, リチウムイオン二次電池

○もりかわたくや,はしもとやすひろ,おとべひろひで,やまもとあぐる, よしのあきら vol.%)を用いた。PFG-NMRでは静磁場に平行な方向 (サンプル管の高さ方向)への拡散が検出される。 Fig.1に示すように、セパレータを重ねてサンプル管に 導入することで膜厚方向(Z方向)、円筒状に巻いて サンプル管に導入することで、面内の二方向(X方向、 Y方向)への各成分の自己拡散係数を得た。また、拡 散時間(Δ)を20ms~800msで変化させてPFG-NMR 測定を行い、拡散プロットのΔ依存性を検証した。

セパレータ孔構造の三次元像はFIB-SEM(HITACHI NB5000型)を用いて取得した。前処理によりセパレータ の骨格部分と孔部分との間に電子密度差をつけ、FIBによ る面出し加工とSEMによる撮影を繰り返した。得られた連 続写真を立体構築することで三次元像を得た。

【結果と考察】

セパレータの膜厚方向のイオン拡散の挙動がLIBの放電 特性に影響を及ぼすことは想像に難くない。しかし、放電 条件や温度条件が過酷になることで、セパレータ全体での

イオン拡散の挙動がLIBの出力特性に影響を及ぼす。

Fig.3に示すように、セパレータの種類によって膜厚方 向の拡散性は同等でも、面方向での拡散性の違いが生じ る。このような拡散挙動の差は細孔構造に由来しており、 面方向も含めた、セパレータ全体のイオンの拡散挙動が、 LIBの放電レートを上昇させた際の出力特性に影響を与 えることが示された。

ー方で、更に放電レートを上昇させた場合や極低温での放電では、膜厚方向の拡散挙動や面方向まで含めたセパレータ全体の拡散挙動ではLIBの出力特性を説明することが出来ない。PFG-NMRから得られた拡散プロットでは、Fig.4に破線円で示すように、セパレータ内では拡散係数が小さい成分が存在し、この成分がこれらの電池特性に影響していることがわかった。講演では、PFG-NMRのΔ 依存性評価やFIB-SEMによる三次元構造イメージ、計算機シミュレーションを組み合わせ、セパレータ内に存在する拡散の遅い成分がどのような細孔構造に由来するのかについて、詳細に説明を行う。

#### 【参考文献】

1) Hayamizu K. et al, J. Phys. Chem. B, 1999, 103, 519-524. 【謝辞】

PFG-NMR測定指導と様々なアドバイスをいただきました、(独)産業技術総合研究所 早水紀久子先生に深く感謝いたします。また、サンプル提供、電池評価結果を提供い ただいた旭化成イーマテリアルズ(株)、技術アドバイスをいただいた日本電子(株) 櫻 井智司様に感謝いたします。



Fig. 1 Sample preparation for PFG-NMR measurement



Fig. 2 Fabrication & observation image of FIB-SEM



Fig.3 Diffusion constant of  $L_1^+$  in the separator normalized against the bulk electrolyte.



electrolyte in separator.

## <sup>6</sup>Li/<sup>7</sup>Li MAS NMRによるLiCoO<sub>9</sub>の構造解析

○村上美和<sup>1</sup>,野田泰斗<sup>2,3</sup>,竹腰清乃理<sup>2,3</sup>, 荒井創<sup>1</sup>, 内本喜晴<sup>4</sup>, 小久見善八<sup>1</sup>

<sup>1</sup>京大・産官学連携本部、<sup>2</sup>京大・理、<sup>3</sup>CREST、 4京大・人環

## <sup>6</sup>Li/<sup>7</sup>Li MAS NMR studies on LiCoO<sub>2</sub>

OMiwa Murakami<sup>1</sup>, Yasuto Noda<sup>2,3</sup>, Kiyonori Takegoshi<sup>2,3</sup>, Hajime Arai<sup>1</sup>,

Yoshiharu Uchimoto<sup>4</sup>, Zenpachi Ogumi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Office of Society-Academia Collaboration for Innovation, Kyoto University, Kyoto, Japan.

<sup>2</sup> Graduate School of Science, Kyoto University, Kyoto, Japan. <sup>3</sup> CREST, Japan.

<sup>4</sup> Graduate School of Human and Environmental Studies, Kyoto University, Kyoto, Japan.

<sup>6</sup>Li/<sup>7</sup>Li solid-state magic-angle spinning (MAS) NMR has been employed to study microscopic local structure of LiCoO<sub>2</sub>, which is one of the most widely used cathode materials in lithium ion batteries. The <sup>6</sup>Li/<sup>7</sup>Li MAS spectra consist mainly of a strong sharp signal at 0 ppm and several small signals at ca. 183, 4, -5, -16 ppm. The shift was attributable to hyperfine interaction between Li and paramagnetic Co ions, which are introduced by excess Li ions occupying the Co sites in the  $\alpha$ -NaFeO<sub>2</sub> lattice structure. <sup>7</sup>Li-<sup>7</sup>Li 2D exchange NMR experiment bears cross peaks among the central Li peak and the minor peaks, for which the exchange mechanism is ascribed to spin-diffusion. Analysis of the 2D NMR spectra as well as  $T_1$  measurement allow us to assign the minor peaks and local structures of these minor Li sites near the paramagnetic center is discussed.

コバルト酸リチウム(LiCoO<sub>2</sub>)はLi電池の正極材 料としては一般的な物質であり、いわゆる ・-NaFe0,型の層状構造を持っている。Liの充放電 に伴いLiCoO<sub>2</sub>にLiが出入りし、Liが過剰な Li<sub>1+x</sub>Co<sub>1-x</sub>O<sub>2</sub>(x>1)の固体NMRでは層間のLiのピーク である0 ppmに現れるメインピーク以外に 183, 4, -5, -16 ppmに小さな信号が現れることが知 られているが、その帰属は明らかにされていない<sup>1</sup>。 図1にSigma-Aldrichから購入したLiCoO,の<sup>7</sup>Liと <sup>6</sup>Liの1次元スペクトルを示す。<sup>7</sup>Liは天然存在比が 92.58%であり磁気回転比も<sup>6</sup>Liの約3倍であり感度 は高いが、四極子モーメントが<sup>6</sup>Liの約50倍と大き いために、四極子相互作用の2次摂動による線幅や 常磁性相互作用による線幅などによりマイナーな 信号(図1でA, B, C)は幅広くなり観測が難しい。 スペースの都合で183 ppm付近のスペクトルは示していない。



Fig. 1 <sup>7</sup>Li/<sup>6</sup>Li MAS spectra of LiCoO<sub>2</sub> observed at 9.4 T with the MAS frequency of ca. 20 kHz.

固体NMR,リチウム電池,二次元相関NMR

○むらかみみわ,のだやすと,たけごしきよのり,あらいはじめ,うちもとよしはる. おぐみぜんぱち

図2に<sup>7</sup>Li-<sup>7</sup>Liの2D交換NMRスペクトルを 示した。交換時間は500msであり、マイナー なピーク(A-C)とメインピークの間に交差ピ ークが観測された。この交差ピークは当初は Liイオンの拡散運動による交換に起因する と考えたが、野田らの温度変化測定などによ り、イオンの拡散の交換は遅いことが示唆さ れ、この交差ピークはスピン拡散であると考 えた(ポスターYP5)。さらに交差ピーク強度 のMASの速度依存性などからも交差ピーク の由来がスピン拡散であることが示唆され ている。図1で示されたように<sup>€</sup>Liの方が分 離が良く2D測定にも適しているが交換のメ カニズムがスピン拡散であると示唆された ために本研究では<sup>6</sup>Li-<sup>6</sup>Liの2D交換測定は行 わなかった。

これらのマイナーピークのシフトの 原因は過剰なLiによる結晶欠陥が原因 で現れる常磁性Coとの相互作用による ものと考えられる。そこで、常磁性相互 作用の大きさを見積もるためにこれら のピークの $T_1$ を測定した。<sup>7</sup>Liではスピ ン拡散の影響があることとピークの分 離が悪いために<sup>6</sup>LiでT<sub>1</sub>測定を行った。 メインピークのT<sub>1</sub>が最も長く(ca. 7 s)、 シフトが大きくなるにつれてTiも短く なる傾向が見られた。これはシフトが常 磁性によるものであることを明らかに 示唆している。つまり、これらのピーク シフトとTiの値はこれらピークのLiサ イトと常磁性中心との距離に依存し、距 離が小さいとシフトが大きく、Tiは短く なると考えられた。ここには示していな いが183 ppmのピークのT1は約0.1 sと極



Fig. 2 <sup>7</sup>Li-<sup>7</sup>Li 2D exchange MAS spectrum of LiCoO<sub>2</sub> observed at 9.4 T with the MAS frequency of ca. 19 kHz.



Fig. 3 Recovery curves of  ${}^{6}Li$  signal intensities of LiCoO<sub>2</sub> observed at 14 T with the MAS frequency of ca. 14 kHz.

端に短くなっており、183 ppmのピークを示すLiサイトは常磁性Coの最近傍であるのではないかと考えている。

#### 謝辞

本研究は、新エネルギー・産業技術総合開発機構の「革新型蓄電池先端科学基礎研究 事業」において行われたものであり、関係各位に深く感謝いたします。

#### References

1. S. Levasseur et. al., Chem. Mater. 15 (2003) 348-354.

**アルカリボロハイドライドにおけるイオンの** ダイナミクス 〇治村 圭子,林 繁信 産業技術総合研究所 計測フロンティア研究部門

### Ion dynamics in alkali borohydrides

OKeiko Jimura and Shigenobu Hayashi Research Institute of Instrumentation Frontier, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST).

Hydrogen gas is a clean energy source for fuel cells. Hydrogen storage with high densities is one of key technologies to realize the fuel cells. A number of materials containing hydrogen have been studied as hydrogen storage materials. Among them, Inorganic compounds such as sodium borohydride NaBH<sub>4</sub> and lithium aluminum hydride LiAlH<sub>4</sub> are attractive because of their high mass density of hydrogen. To understand hydrogen states and dynamics is useful to create new hydrogen-storage materials. Solid-state NMR is a powerful method to study local structure and dynamics. In the present work, we focus on alkali borohydrides. We have studied ion dynamics in alkali borohydrides by means of solid-state NMR.

[序] 近年、LiBH<sub>4</sub>を初めとする一連のボロハイドライド(水素化ホウ素化合物)は、 金属水素化物などと複合化させることにより、様々なエネルギー関連機能を示すこと が明らかとなっている。これらの物質は水素の質量密度が高いため、新たな水素貯蔵 材料として注目されている。ボロハイドライド中の水素挙動を調べることは今後の材 料開発に貢献すると期待されている。中でも、固体NMRは水素を直接観測することの できる非常に有効な測定方法として注目されており、特に水素のダイナミクスについ てはもっとも有効な手法である。本研究では、三種類のボロハイドライド(LiBH<sub>4</sub>, NaBH<sub>4</sub>、 KBH<sub>4</sub>) について、固体NMRを用いてイオンのダイナミクスを調べた。

[実験] 試料は、シグマ・アルドリッチ社製の粉末NaBH<sub>4</sub>(99.9%)、KBH<sub>4</sub>(99.9%)、LiBH<sub>4</sub> (95%)を用いた。窒素雰囲気下で適量をパイレックスガラス管 ( $\phi$ 10 mmおよび5 mm) に詰め、ロータリーポンプで真空引きしながら封じ切ったものを測定に用いた。

静止試料のNMR測定には、Bruker ASX200(共鳴周波数<sup>1</sup>H:200.13 MHz, <sup>11</sup>B:64.207 MHz)、Bruker mq20(共鳴周波数<sup>1</sup>H:19.65 MHz)を用いた。 スペクトル測定は、ASX200 を用い、Solid echo法( $\pi/2 - \tau_1 - \pi/2 - \tau_2$ -echo)で行った。  $T_1$ 測定については、ASX200 およびmq20を用い、反転回復法( $\pi - \tau - \pi/2 - \tau_1 - \pi/2 - \tau_2$ -echo)または飽和回復法( $(\pi/2 - \tau_3)_n - \tau - \pi/2 - \tau_1 - \pi/2 - \tau_2$ -echo)(mq20ではn = 0)を用いた。測定温度範囲は、ASX200では約140 Kから440 K、mq20では約150 Kから460 Kである。

固体NMR,水素貯蔵材料,水素化ホウ素化合物

○じむら けいこ, はやし しげのぶ

[結果および考察] 図1に、NaBH<sub>4</sub>における<sup>'</sup>H static NMRスペクトルを示す。高温部で観測さ れた非常にシャープなシグナルは不純物によ るものと考えられる。全測定温度領域で、線幅 約24 kHzのガウス型線形をしたシグナルを観測 した。NaBH<sub>4</sub>は、190 K付近で低温相(正方晶) から室温相(立方晶)への相転移が起こること が知られている。しかし、測定温度範囲内では 明確な線形の変化は観測されず、線幅もほぼ一 定であった。<sup>11</sup>B static NMRスペクトルも、<sup>1</sup>H スペクトルと似たような線形とその温度依存 性を示した。

KBH<sub>4</sub>の<sup>1</sup>H static NMRスペクトルでも、単一成 分のシグナルが観測され、NaBH<sub>4</sub>と似たような線 形を示した。温度変化に伴うスペクトルの線幅 や線形の変化は観測されず、線幅は約17 kHzで あった。

LiBH<sub>4</sub>は、390 K付近で室温相(斜方晶)から 高温相(六方晶)へ相転移することが知られて いる。<sup>1</sup>H static NMRスペクトルでは、単一成 分のシグナルが観測された。380 K以下では線



Fig. 1. <sup>1</sup>H static NMR spectra of NaBH<sub>4</sub> (200.13 MHz).

幅が約27 kHzであった。380 K以上では次第に線幅が小さくなっていき、440 Kでは約 20 kHzであった。一方、温度変化に伴う線形の変化は観測されなかった。

結晶構造から推定される線幅と観測された線幅と比較検討することによって、運動

モードを決めた。その結果、ボロハ イドライドにおけるホウ素を中心と する四面体イオンBH<sub>4</sub>が非常に速い 等方的な再配向運動をしており、140 K付近でも運動モードが変化しない ことを明らかにした。

図2に、NaBH<sub>4</sub>における<sup>1</sup>Hと<sup>11</sup>Bのス ピンー格子緩和時間( $T_1$ )の温度依 存性を示す。190 K付近で相転移が起 こり、 $T_1$ が不連続に変化した。室温 相では温度上昇に伴い、 $T_1$ は徐々に 長くなり<sup>1</sup>Hの $T_1$ は磁場依存性を示さ なかった。一方、低温相では磁場依 存性を示した。この結果を解析して、 BH<sub>4</sub>の再配向運動の速度を決定した。

[謝辞] 本研究は、NEDO水素貯蔵材料先 端基盤研究事業(HYDRO☆STAR)の下で行 われた。



Fig. 2. <sup>1</sup>H and <sup>11</sup>B  $T_1$  of NaBH<sub>4</sub>, (A) <sup>11</sup>B  $T_1$ (64.207 MHz), (B) <sup>1</sup>H  $T_1$  (19.65 MHz) and (C) <sup>1</sup>H  $T_1$  (200.13 MHz).

## ゼオライトにおけるブレンステッド酸点の観測

○小島 奈津子,林 繁信 産業技術総合研究所 計測フロンティア研究部門

#### NMR measurements of Brønsted acid sites on zeolites

ONatsuko Kojima and Shigenobu Hayashi

Research Institute of Instrumentation Frontier, National institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)

Zeolites are solid acid catalysts widely used. OH groups on the zeolite surface work as Brøensted acid. We can study the acid strength and the amount of the acid sites by <sup>1</sup>H MAS NMR measurements. However, it is difficult to get the spectra of the OH groups, because zeolites easily adsorb  $H_2O$  in air. In the present work, we have tried to reduce the  $H_2O$  content as low as possible and we have obtained <sup>1</sup>H MAS NMR spectra of OH groups on several zeolites.

〈緒言〉

ゼオライトは固体酸触媒として広く用いられている。ゼオライト表面の水酸基がブレンステッド酸点となって働いており、<sup>1</sup>H NMRスペクトルの観測により酸強度や酸量を調べることができる。しかし、ゼオライトは空気中の水を容易に吸着してしまい、水酸基本来のスペクトルを得ることが困難である。本研究では、空気中の水分の影響を極力排除して試料を調製し、ゼオライト表面の水酸基の<sup>1</sup>H MAS NMRスペクトルを得たので報告する。

〈実験〉

ゼオライトは、触媒学会参照触媒委員会から提供されたもので、それぞれのコード は次に記載するものを用いた。モルデナイト(HM)はJRC-Z-HM10, -15, -20, ZSM5は JRC-Z5-25H, -70H, -1000H, YゼオライトはJRC-Z-HY5.6、ベータゼオライトは JRC-Z-HB25を用いた。合成時におけるSi0<sub>2</sub>/Al<sub>2</sub>0<sub>3</sub>のモル比が各々、数字で表されてい る。HMならば10, 15, 20、ZSM5ならば25, 70, 1000、Yゼオライトならば5.6、ベータ ゼオライトならば25となっている。HM 10, 15, 20, ZSM5-25H, 1000H, HBEAは、残留し ているNH<sub>4</sub><sup>+</sup>イオンを除くためにあらかじめ535℃で焼成をし、酸点の影響を検討するた めに、全てH型にした。密閉可能な試験管にサンプルを入れ、真空ラインで試験管内 を真空にする。その後、ZSM5-25H, 70H, 1000H, Hベータは試験管の温度を200℃まで、 HM10, 15, 20, HYは300℃まで徐々に上げていき、3時間真空加熱した。真空加熱後、 試験管を密閉して1晩放置した。その後、窒素ガス雰囲気下でMASローターに試料を 充鎮した。

<sup>1</sup>H magic-angle-spinning (MAS) NMR はBruker MSL400 (共鳴周波数: <sup>1</sup>H 400.13MHz) を用いて室温で測定した。Bruker MAS プローブヘッドで、外径4.0 mmのジルコニア 固体NMR, ゼオライト, 固体酸触媒

○こじまなつこ,はやししげのぶ

ローターを使用し、パルス系列は通常のシングルパルスを使用した。<sup>1</sup>Hのスペクトルは、100%テトラメチルシラン(TMS)を基準として表示した。

〈結果と考察〉

ゼオライトを300℃で真空加熱した 後に測定した<sup>1</sup>H MAS NMRスペクトルを Figure 1 に示した。HM10, HM15, HM20 に1.8 ppmのシグナルが観測された。 HM10, HM15では、2.6 ppmにシャープな シグナル、4 ppm付近と6.5 ppm付近に ブロードなシグナルが観測され、HM20 では2.6 ppm、4 ppm、6.5 ppm、8.7 ppm にブロードなシグナルが観測された。 1.8 ppmは孤立したSi-OH、2.6 ppm、4 ppm、HM10 6.5 ppm、のブロードなシグナルはブレ ンステッド酸点Si-OH-A1に帰属される。 HY 5.6では、1.8 ppmに比較的シャー プなシグナル、4 ppm付近にブロードな シグナル、6.5 ppmにシャープなシグナ ルが観測された。1.8 ppmは孤立した Si-OH、4 ppm付近、6.5 ppmのシグ ナルはブレンステッド酸点

ゼオライトを200℃で真空加熱し た後に測定した<sup>H</sup> MAS NMRスペクト ルをFigure 2に示した。ZSM5-25H, ZSM5-70H, ZSM5-1000Hでは1.8 ppm にシャープなシグナルが観測され、 6 ppm付近にブロードなシグナルが 観測された。ZSM5-1000Hでは、1 ppm 付近に2本と8.7 ppmにシグナルが 観測された。1.8 ppm付近は孤立し たSi-OH、8.7 ppmは水素結合した Si-OH---O-Si、6 ppm付近のブロー ドなシグナルはブレンステッド酸

Si-OH-A1に帰属される。



Figure 1. <sup>1</sup>H MAS NMR spectra of H-type mordenites and HY after heating under vacuum.





点Si-OH-A1に帰属される。HBEA 25では、1.8 ppmにシャープなシグナル、5 ppm、8.7 ppmにブロードなシグナルが観測された。1.8 ppmは孤立したSi-OH、8.7 ppmは水素 結合したSi-OH---O-Si、5 ppmはブレンステッド酸点Si-OH-A1に帰属される。

また、上記ゼオライトの<sup>29</sup>Si,<sup>27</sup>A1 MAS NMRスペクトルを観測した。<sup>29</sup>Si MAS NMR スペクトルからは骨格のSi/A1比を算出し、そこから4配位のA1量、すなわち、ブレ ンステッド酸量を見積もった。<sup>27</sup>A1 MAS NMRスペクトルでは4配位および6配位のA1 を観測し、4配位のA1量からブレンステッド酸量を見積もった。これらの結果と<sup>1</sup>H MAS NMRスペクトルから得られた結果を比較して定量的な考察を行った。

## P86 固体NMR法による酸化グラファイト層間内のC<sub>60</sub>分子の 運動状態の研究 ○桑原 大介<sup>1</sup>、井上 大輔<sup>2</sup>、鈴木 勝<sup>1</sup>, 中村 敏和<sup>3</sup>, 石川 誠<sup>4</sup>, 三浦 浩治<sup>4</sup>

1 電通大先進理工、2 電通大量子物質、3 分子研、4 愛教大物理

# Solid-state NMR study of physical properties of C<sub>60</sub> molecule intercalated in graphite oxide

○Daisuke Kuwahara<sup>1</sup>, Daisuke Inoue<sup>2</sup>, Masaru Suzuki<sup>1</sup>, Toshikazu Nakamura<sup>3</sup>, Makoto Ishikawa<sup>4</sup>, Koji Miura<sup>4</sup>

1,2 Univ. of Electro-Communications, 3 Institute for Molecular Science, 4 Aichi Univ. of Education

Recently, Miura and co-workers have synthesized the novel nanocomposite consisting of a stacked single graphite oxide sheet and a  $C_{60}$  fullerene monolayer (GO- $C_{60}$ ) [1]. GO- $C_{60}$  shows a ultralow friction. In  $C_{60}$  fullerene and its compounds, one of the interesting topics is the rotational dynamics. Furthermore, understanding of the rotational dynamics in those materials is of importance to elucidate the mechanism for ultralow friction. Solid-state <sup>13</sup>C NMR experiments for the fullerene and some compounds have revealed this dynamics. Thus motivated, we carried out solid-state <sup>13</sup>C NMR experiments for GO- $C_{60}$ . In addition, we tried to confirm the intercalation of  $C_{60}$  into graphite oxide sheets by using solid-state NMR techniques.

### 1. 緒言

最近,三浦らは膨潤化したグラファイトの層間にC<sub>60</sub>を封入した試料(グラフェン/C<sub>60</sub> 単層膜/グラフェン…)の合成に成功し,超低摩擦となることを明らかにした[1].こ の『超低摩擦』のメカニズムとして,膨潤化したグラファイトの層間内にあるC<sub>60</sub>の 運動状態が関係していると考えられている.単結晶C<sub>60</sub>は室温でほぼ自由な回転運動 をしていることが知られているが,グラフェン/C<sub>60</sub>単層膜/グラフェン…中のC<sub>60</sub>分子の 運動状態の詳細はまだ明らかにされていない.そこで本研究では、グラフェン/C<sub>60</sub>単 層膜/グラフェン…中のC<sub>60</sub>分子の運動状態について知見を得るために、グラフェン/C<sub>60</sub> 単層膜/グラフェン…中のC<sub>60</sub>分子の物性測定を行った.討論会では<sup>13</sup>C NMR測定の結 果を中心に報告する.本研究ではさらに、C<sub>60</sub>がグラフェン層間に封入されているこ とを、固体NMRの手法を用いて確認することを行った.

フラーレン、グラファイト、超低摩擦

○くわはら だいすけ、いのうえ だいすけ、すずき まさる、なかむら としかず、 いしかわ まこと、みうら こうじ

### 2. 実験結果

Fig. 1 にグラフェン/C<sub>60</sub>単層膜/グラフェン… の<sup>13</sup>C NMRスペクトルを示した. 10Kにおい てはC<sub>60</sub>分子の化学シフト異方性に起因する 線幅およそ 200ppmのスペクトルが観測され た.これはCm分子の運動が凍結されているこ とを意味する.一方,70K以上の温度域では 10Kでのスペクトルに加え、144ppm付近にピ ークを持つような鋭いスペクトルが観測され た.この様な鋭いスペクトルはCm分子の回転 運動に由来するものである.120K以上の温度 域ではスペクトル形状の変化は測定の分解能 の範囲内では見られない.また 190-300Kの温 度域での<sup>13</sup>C NMRスペクトル及び縦緩和率<sup>400</sup> T1<sup>-1</sup>により、C60分子は190-300Kの温度域では 運動状態に大きな変化は無く,相関時間にし て 10psecオーダーの等方回転を行っているこ とが明らかになった.







#### 3. C<sub>60</sub>の封入の検証

 $C_{60}$ がグラフェン層間に封入されていることは、粉末X線の回折データを解析すること によってすでに明らかになっている [1].本研究では異なる研究手段、固体NMRの手 法を用いることによってこの重要な結果(「 $C_{60}$ の封入」)を検証することにした. 具体的には、 $C_{60}$ がグラフェン層とナノレベルで隣接して存在していることを明らか にするために、<sup>13</sup>C-<sup>13</sup>C間のREDOR実験を行った.この同種核間のREDOR実験には、 選択的RFパルスを使った新しい「REDORパルス系列」を使用した(Fig. 2).



Fig. 3 には、 テストサンプル all  $^{13}$ C





enriched *L*-alanine を使った予備実験の結果を示した. 会場では, グラフェン/C60単層 膜/グラフェン…を使った実験結果を, C<sub>60</sub>単体を使った結果と合わせて報告する. [1] N. Sasaki and K. Miura, Jpn. J. Appl. Phys. **43**, 4486 (2004).

## 固体NMRによる表面修飾BNナノ粒子の構造と修飾有機 分子の結合状態

○相馬 洋之,林 繁信 独立行政法人 産業技術総合研究所 計測フロンティア研究部門

## Structures of surface-modified boron nitride nano-particles and bonding states of organic molecules studied by high-resolution solid-state NMR

OHiroyuki Souma and Shigenobu Hayashi

Research Institute of Instrumentation Frontier, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Tsukuba, Japan.

It is important that the surface of nano-particles is modified by chemical species having hign affinity with the matrix in order to disperse nano-particles uniformly in the matrix. We demonstrated previously that solid-state nuclear magnetic resonance (SSNMR) can detect the bonding between the surface of the titania nano-particles and the surface-modified reagent. And we proved previously that SSNMR is very useful to characterize the surface-modified nano-particles. In the present study, we have synthesized boron nitride (BN) nano-particles modified by propylphosphonic acid (PPA) and decylphosphonic acid (DPA), and have demonstrated that SSNMR can detect the bonding between the surface of the BN nano-particles and PPA or DPA.

【序論】

ナノ粒子をマトリックス中に均一に分散させるためには、マトリックスと相溶性の 高い化学種でナノ粒子表面を修飾することが重要であり、その表面修飾剤はナノ粒子 表面に対し、共有結合で強固に結合している必要がある。我々はこれまで、チタニア ナノ粒子をプロピルホスホン酸(PPA)やデシルホスホン酸(DPA) で有機修飾し たハイブリッド試料を調製し、チタニアナノ粒子表面の有機分子の結合状態を固体 NMR法で解明してきた[1]。

これまでの研究に引き続き、本研究では窒化ホウ素ナノ粒子(BNナノ粒子)の末端 をPPAとDPAで有機修飾した有機無機ハイブリッド試料を調製し、固体NMRを用いて BNナノ粒子末端に結合した有機分子の結合状態を明らかにすること、そして調製前 後のBNナノ粒子の構造変化の有無を調べることを目的とした。

【実験】

表面修飾剤としてPPA、DPAを用い、BNナノ粒子とのハイブリッド試料を調製した。 PPA/BNナノ粒子、DPA/BNナノ粒子共に、オイルバス中で100℃に加熱し、3日間攪拌 させて試料を得た。各試料におけるナノ粒子表面のリン酸基の結合状態とその構造は、 <sup>31</sup>P CPMAS NMR、<sup>11</sup>B MAS NMR、<sup>1</sup>H MAS NMRにより調べた。測定には、Bruker ASX400分光計(共鳴周波数<sup>31</sup>P:161.98MHz、<sup>11</sup>B:128.34MHz、<sup>1</sup>H:400.13MHz)

固体NMR, BNナノ粒子, 表面修飾

○そうま ひろゆき,はやし しげのぶ

およびBruker ASX200分光計(共鳴周波数<sup>11</sup>B:64.21MHz、<sup>1</sup>H:200.13MHz)を用いた。

【結果・考察】

第一に、調製したPPA/BNナノ粒子とDPA/BNナノ粒子の<sup>1</sup>H MAS NMR測定結果から、 それぞれの試料がPPAおよびDPAで有機修飾されていることを確認した。

続いて、その有機修飾剤PPAおよびDPAの結合状態を明らかにするために、<sup>31</sup>P CPMAS NMRスペクトルを測定した。調製したPPA/BNナノ粒子とその調整に用いた PPA、および調製したDPA/BNナノ粒子とその調製に用いたDPAのそれぞれの<sup>31</sup>P CPMAS NMRスペクトルをFigure 1に示す。この中で、有機無機ハイブリッド試料のス ペクトル(a: PPA/BNナノ粒子、c: DPA/BNナノ粒子)では、2つのシグナルが確認 された。これは、BNナノ粒子と有機修飾剤が結合したことを意味している。そして、





BNナノ粒子中のホウ素原子に結 合した場合と窒素原子に結合し た場合ではリン酸基周囲の環境 が変化するので、シグナルが2本 に分裂した可能性が高い。我々は これを明らかにするため、PPAと DPAをホウ酸とトリエチレンジ アミンに直接結合させた試料を 作成し、<sup>31</sup>P CPMAS NMRを測定 した。そしてそれらの試料のスペ クトルから得られた化学シフト 値を考慮し、今回の有機無機ハイ ブリッド試料の分裂したシグナ ルについて考察した。その結果、 高周波数側のシグナルがホウ素 原子に結合したPPAおよびDPA のリン酸基であり、低周波数側の シグナルが窒素原子に結合した リン酸基である可能性が高いと いう結論に至った。

さらに我々は、<sup>11</sup>B MAS NMR の測定を行った。この結果から、 調製前のBNナノ粒子と、有機無 機ハイブリッド試料におけるホ ウ素原子周囲の構造変化の有無 を確認した。

本研究は、NEDO超ハイブリッド材料技術開発プロジェクトの 支援を受けて行われたものである。

【引用文献】[1] 相馬洋之、千葉亮、林繁信、第48回NMR討論会 (2009).

## 固体 NMR による VH<sub>x</sub>D<sub>y</sub> (x+y≃0.8)の相構造の研究

○鈴木 陽、林 繁信 産業技術総合研究所 計測フロンティア研究部門

### Study of phase structures in VH<sub>x</sub>D<sub>y</sub> ( $x+y\approx0.8$ ) using solid-state NMR

○You Suzuki, Shigenobu Hayashi

Research institute of instrumentation frontier, National institute of advanced industrial science and technology (AIST)

Vanadium (V) metal can absorb a large amount of hydrogen to the extent of a hydrogen-to-metal atomic ratio of 2. It is known that the phase diagrams for vanadium hydride and deuteride are much different. Especially the hydrides and deuterides in which the hydrogen or deuterium contents are in 0.7~1.0 have different vanadium sublattices. In our previous work, the VH<sub>x</sub>D<sub>y</sub> system (x+y=0.8) was studied by X ray diffraction, <sup>1</sup>H NMR and <sup>2</sup>H NMR. And the hydrogen and deuterium diffusion were analyzed by spin-lattice relaxation time. In the present work, we have studied the phase structure in the VH<sub>x</sub>D<sub>y</sub> system (x+y=0.8) at room temperature using <sup>1</sup>H and <sup>2</sup>H MAS NMR.

[序] バナジウム金属は水素ガスと反応し、安 定な水素化物を形成する。水素化物と重水素化 物では相図が大きく異なることが知られている (Fig. 1)。これまでに水素と重水素の混合ガスを 反応させた VH<sub>x</sub>D<sub>v</sub> で x+y=0.8 のものは X 線回折 や固体広幅 NMR を用いた研究を行った。その 結果、VH0.84 ではバナジウムは体心正方格子 (BCT)をとり水素は 6 配位サイトに吸蔵される ことや VD081 ではバナジウムは体心立方格子 (BCC)をとり重水素は 4 配位サイトに吸蔵され ること、 $VH_{04}D_{04}$ では BCC と BCT の混晶とな ることが明らかになった。また、スピン-格子 緩和時間の温度変化から水素や重水素の拡散挙 動についても解析を行った。しかし、固体高分 解能 NMR を用いた研究はまだ行っていない。 本研究では、重水素と軽水素の混合比が異なる バナジウム水素化物における相構造について <sup>1</sup>H, <sup>2</sup>H 固体高分解能 NMR スペクトルを測定し て調べた。



Fig. 1 The phase diagrams of vanadium hydride (A) and deuteride (B)

固体重水素 NMR, 金属水素化物, バナジウム水素化物

○すずき よう, はやし しげのぶ

[実験] 試料はバナジウム金属の粉末と水素ガスと重水素ガスの混合ガスを反応させ て合成した。水素および重水素の含有量は吸蔵された混合ガスの体積から決定した。 <sup>1</sup>H および <sup>2</sup>H NMR の測定には Bruker ASX400 (共鳴周波数 <sup>1</sup>H 400.13 MHz, <sup>2</sup>H 61.423 MHz)を用いた。<sup>1</sup>H, <sup>2</sup>H NMR スペクトルの測定は、試料を外径 2.5 mm のジルコニア ローターに充填し、マジック角回転 (MAS)を 12~20 kHz で行った。通常のシングルパ ルス法で測定を行った。

[結果と考察] Fig. 2に<sup>1</sup>H MAS NMRスペクト ルを示す。Knight Shiftの変化と線幅の変化が 観測された。Knight Shiftの基準として用いら れる裸のプロトンはTMS基準で約30.5 ppmで あり、Knight Shiftは負の方向に働いている。 また、Knight Shiftは和の方向に働いている。 また、Knight Shiftは和の方向に働いている。 また、Knight Shiftは和の方向に働いている。 また、Knight Shiftは和の方向に働いている。 また、Knight Shiftは和の方向に働いている。 また、Knight Shiftは和の方向に働いている。 また、 水素と重水素の混合ガスと反応させた試料で はピークが2つのローレンツ関数で分離する ことができることから、局所的な水素の吸蔵 サイトが異なるドメイン構造が存在する可能 性がある。ピークの線幅はxの増加にともない<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H 間の双極子相互作用が強くなったためと考え



Fig. 2. <sup>1</sup>H MAS NMR spectra of  $VH_xD_y$ , referenced to the signal of TMS. The MAS ratio was 12 kHz. The marks \* indicate background peaks

られる。また、重水素化物では拡散速度の速い4配位サイトに吸蔵され、拡散運動に よって双極子 - 双極子相互作用が平均化されていたのに対し、xが増えるに従い拡散 速度の遅い6配位サイトに吸蔵される水素がふえたため双極子 - 双極子相互作用の平 均化が起こりにくくなった可能性も考えられる。

Fig. 3に<sup>2</sup>H MAS NMRスペクトルを示す。<sup>1</sup>H MAS NMRスペクトルと同様にKnight Shiftの 変化と線幅の変化が観測された。また、Knight Shiftの方向も同様に裸のプロトンに比べ負の 方向であり、xの増加にともない大きくなって いた。しかし、<sup>1</sup>H MAS NMRのスペクトルと は違いピークを2つの成分に明確に分離する ことはできなかった。これは、2つの成分がシ フト値に大きな差がないためと考えられる。 ピークの線幅は<sup>1</sup>H MAS NMRスペクトルと同 様にxの増加にともない増加した。これは<sup>1</sup>H MAS NMRと同様にxの増加にともない<sup>1</sup>H-<sup>2</sup>H 間の双極子相互作用が強くなったためと考え



Fig. 3. <sup>2</sup>H MAS NMR spectra of  $VH_xD_y$ , referenced to the signal of TMS. The MAS ratio was 20 kHz.

られる。また、拡散速度の遅い6配位サイトに吸蔵される重水素が増え、拡散運動に よる双極子 - 双極子相互作用や四極子相互作用の平均化が起こりにくくなった可能 性も考えられる。

[謝辞] 本研究はNEDO水素貯蔵材料先端基盤研究事業(HYDRO☆STAR)の下で行われた。

## ピロリン酸系プロトン導電体の固体NMR

○西田雅一<sup>1</sup>, 源嵜晃司<sup>2</sup>, 深谷治彦<sup>1</sup>, 兼松 渉<sup>1</sup>, 日比野高士<sup>2</sup> <sup>1</sup>産総研中部, <sup>2</sup>名大院・環境

## Solid state NMR study of proton conductors based on metal pyrophosphates

Masakazu Nishida<sup>1</sup>, Koji Genzaki<sup>2</sup>, Haruhiko Fukaya<sup>1</sup>, Wataru Kanematsu<sup>1</sup>, and Takashi Hibino<sup>2</sup>

<sup>1</sup>National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Chubu, Japan.

<sup>2</sup> Graduate School of Environmental Studies, Nagoya University, Nagoya, Japan.

Protons and phosphates in metal prophosphates were analyzed by solid state NMR in order to investigate proton conduction in these materials. The results of solid state NMR analysis suggested that active species of the metal pyrophosphate were dependent on the hygroscopicity: there were different pathways for protons, depending dopant species and preparation procedure.  $In^{3+}$  and  $Al^{3+}$  doped tin pyrophosphates had an active P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> unit, which was easily absorbing moisture, while SnP<sub>2</sub>O<sub>7</sub>-SnO<sub>2</sub> composite has an active PO<sub>4</sub> unit, being less active for moisture. Furthermore, the P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> unit of Mg<sup>2+</sup> doped tin pyrophosphate was restricted in bulk, resulting in less proton conductivity at ambient temperature.

1. 緒言

中温域から活性を発現するプロトン導電体は、三元系触 媒や燃料電池素材としての用途が期待されているが、近年、 ディーゼルパティキュレート(PM)センサとしての応用につ いても注目されている。本研究では、ピロリン酸系プロトン導 電体として、ピロリン酸スズ(SnP<sub>2</sub>O<sub>7</sub>)を低原子価カチオン (M=In, Al, Mg)で置換したドープピロリン酸スズSn<sub>1-x</sub>M<sub>x</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 及びCarbonを担持した焼結体から製造するSnP<sub>2</sub>O<sub>7</sub>-SnO<sub>2</sub>コ ンポジットを対象として、固体NMR計測により系中のプロトン 及びリンの挙動を明らかにし、プロトン導電に係わる活性種 についての知見を得ることを目的とする。



**Fig. 1**. Structure of doped tin pyrophoshate (blue: SnO<sub>6</sub>, yellow: P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>; red: dopant)

### 2. 試料の調製

プロトン導電体Sn<sub>1-x</sub>M<sub>x</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>(M=In, Al, Mg)は、平均粒径が21nmのSnO<sub>2</sub>の超微粒子粉末に 85%のH<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>、各種ドーパント、イオン交換水をそれぞれ加え、300℃で攪拌してスラリー状に した後に、空気中、650℃で2.5時間固相反応を行うことで得た。この際、ドーパントとしては In<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, Al(OH)<sub>3</sub>, Mg(OH)<sub>2</sub>などの酸化物や水酸化物を使用した。SnP<sub>2</sub>O<sub>7</sub>-SnO<sub>2</sub>コンポジットは 8 wt% Carbonを担持したSnP<sub>2</sub>O<sub>7</sub>-SnO<sub>2</sub>焼結体を600℃でリン酸処理することにより得た。

Metal pyrophosphate, <sup>1</sup>H MAS NMR, <sup>31</sup>P MAS NMR

○にしだまさかず, げんざきこうじ, ふかやはるひこ, かねまつわたる, ひびのたかし

#### 3. 研究の結果および考察

最初に、試料調製後、粉砕したSn<sub>1-x</sub>M<sub>x</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>(M=In, Al, Mg) の<sup>1</sup>H MAS NMRの測定を行った。その結果をFig.2に示す。 いずれの試料も10~13ppm付近に強いピークを示したが、リ ン酸処理前のSnO。については5ppm付近に吸着水に基づく弱 いピークを示したのみであった。また、ドープ種の添加により ピークの化学シフトはnon-dope > Al<sup>3+</sup> > In<sup>3+</sup> > Mg<sup>2+</sup>の順に高 磁場シフトしていた。今回測定を行ったMg<sup>2+</sup>ドープ以外の Sn1-M.P.O.はかなり吸湿性が高く、吸湿した水によってピーク は高磁場シフトし、強度も増加していた。

次に、水洗いを行うことで吸湿性の成分を除去し、<sup>1</sup>H MAS NMRの測定を行った。Fig.3に示したように水洗いによりプロト ンのピークは高磁場にシフトし、non-dope, In<sup>3+</sup>, Al<sup>3+</sup> ドープで は9ppm付近に、Mg<sup>2+</sup>では8.3ppmにピークが観察された。一方、 SnP<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-SnO<sub>2</sub>コンポジットでは、水洗いしていない試料でも 7.6ppmと比較的高磁場にピークが現れ、水により除去され るようなSn1-,M.P.O.が有する吸湿性の分子種は含有してい ないと考えられた。

これらのプロトン導電体のバルク環境の相違を、<sup>31</sup>P MAS NMRでさらに観察した。Fig.4に示すように、今回測定を行っ たSn<sub>1-x</sub>M<sub>x</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>の<sup>31</sup>P DD/MAS NMRでは、0ppm付近のPO<sub>4</sub>の 領域と-15ppmと-38ppm付近の2種類のP<sub>2</sub>O<sub>7</sub>の領域にピーク が観察された。また、Fig.5に示すように、<sup>31</sup>P CP/MAS NMR においては、Mg<sup>2+</sup>ドープのみが-38ppm付近にピークが現れ たが、それ以外のnon, In<sup>3+</sup>, Al<sup>3+</sup>ドープでは-12ppm付近にシ ャープなピークが現れていた。一方、SnP<sub>2</sub>O<sub>7</sub>-SnO<sub>2</sub>コンポジ ットでは、DD/MASではMg<sup>2+</sup>ドープと同じように-38ppm付近 にブロードなピークが現れたが、CP/MASでは0ppm付近に かなりシャープなピークを示していた。

電気化学的なデータと合わせ て考察すると、In<sup>3+</sup>, Al<sup>3+</sup>ドープは 吸湿性のP<sub>2</sub>O<sub>7</sub>(-12ppm)が、 SnP<sub>2</sub>O<sub>7</sub>-SnO<sub>2</sub>コンポジットでは非 吸湿性のPO<sub>4</sub>(0ppm) が、それぞ れプロトン導電性に関与している 分子種であると示唆された。一方、 Mg<sup>2+</sup>ドープでは、これらの分子種 の寄与は少なく、ほとんどが不活 性なバルクのP<sub>2</sub>O<sub>7</sub>(-38 ppm)であ り、また、室温でのプロトン導電 性も低くなっていた。緩和時間解 析を含めた議論の詳細について は、当日報告する予定である。



25

## 高磁場固体<sup>43</sup>Ca NMRによるトバモライト生成過程の解析

○名雪三依<sup>1</sup>,橋本康博<sup>1</sup>,綱嶋正通<sup>1</sup>,菊間淳<sup>1</sup>,松野信也<sup>1</sup>, 丹所正孝<sup>2</sup>,清水禎<sup>2</sup>,松井久仁雄<sup>3</sup> <sup>1</sup>旭化成(株),<sup>2</sup>(独)物質・材料研究機構,<sup>3</sup>旭化成建材(株)

## Hydrothermal formation of tobermorite studied by solid-state <sup>43</sup>Ca NMR

OMie Nayuki<sup>1</sup>, Yasuhiro Hashimoto<sup>1</sup>, Masamichi Tsunashima<sup>1</sup>, Jun Kikuma<sup>1</sup>, Shinya Matsuno<sup>1</sup>, Masataka Tansho<sup>2</sup>, Tadashi Shimizu<sup>2</sup>, Kunio Matsui<sup>3</sup> <sup>1</sup>Asahi kasei Corporation, <sup>2</sup>National Institute for Material Science, <sup>3</sup>Asahi kasei Construction Materials Corporation

Tobermorite, a naturally present hydrated calcium silicate, is hydrothermally produced in industry. To clarify the synthetic pathway, we have been performed *in-situ* XRD under autoclaved condition. However, the information on the amorphous phase including a key intermediate, C-S-H, has yet to be extracted. Here, *ex-situ* NMR was carried out for the intermediates quenched at varied reaction time. In our attempt to comprehensively understand the pathway, natural abundance <sup>43</sup>Ca solid-state NMR in addition to the conventional <sup>29</sup>Si and <sup>27</sup>Al NMR spectroscopy was carried out. In this report, we will discuss the structure of the C-S-H and its conversion to tobermorite in terms of the CaO and SiO layer structure as well as the Al<sup>3+</sup> incorporation.

1. 目的

ケイ酸カルシウム水和物のひとつであるトバモラ イト(5CaO・6SiO<sub>2</sub>・5H<sub>2</sub>O)は、オートクレーブ養生に て製造される建築材料の主成分であり、工業的に重 要な鉱物である(Fig.1)。

これまでにトバモライトの生成メカニズム解明の ため、その場(in-situ)X線回折を行った結果、中間 生成物、非晶質相(C-S-H)および不純物として存在



Fig.1 Tobermorite structure.

する AI がトバモライト生成に大きな影響を与えていることが明らかになってきた。 今回我々は、結晶/非晶に関わらず構造情報が得られる固体 NMR を用い、X 線回 折では情報が得られない非晶質相の知見を得ることを試みた。

2. 実験

生石灰 (CaO)、珪砂 (SiO2)、γ アルミナ (Al2O3)を水と混合し予備養生後、オートクレーブ内で加温し反応させた試料について、反応途中の各時点でサンプリング を行い、<sup>27</sup>Al、<sup>29</sup>Si固体NMR測定に加え、<sup>43</sup>Ca固体NMR測定を行った。

カルシウムハイドロシリケート, トバモライト, <sup>43</sup>C a NMR

○なゆきみえ、はしもとやすひろ、つなしままさみち、きくまじゅん、まつのしんや、 たんしょまさたか、しみずただし、まついくにお <sup>43</sup>Ca 固 体 NMR 測 定 は JEOL ECA930 (21.8T) 装置を、<sup>27</sup>Al、<sup>29</sup>Si固体NMR測定 はECA700 (16.4T)を用いて、同位体標識 を行わず、天然存在比のまま測定を行っ た。

3. 結果と考察

Fig.2 にトバモライト合成に関わる化 合物の<sup>43</sup>Ca固体NMRスペクトルを、Fig.3 に各反応時点でサンプリングした試料の <sup>43</sup>Ca、<sup>27</sup>Alおよび<sup>29</sup>Si固体NMRスペクトル を示した。

反応途中の各時点の NMR スペクトル より、中間体として、非晶質(C-S-H)、 カトアイト(hydrogarnet の1種)を経由し たトバモライト生成経路が確認できた。

また、C-S-Hゲルについて、<sup>27</sup>Al-NMR によるAlの取り込まれや<sup>29</sup>Si-NMRによ るシリカ構造(鎖長、Q2/Q3 比)に加え て、<sup>43</sup>Ca-NMRにより、C-S-HのCa構造

(6配位、7配位)についての知見が得られる可能性が示唆された。

今後、トバモライトだけでなく、セメ ント水和過程解析等にも応用が期待でき る。

発表では、in-situ XRD での反応追跡の 結果も交えて、トバモライトの生成過程 について報告する。

【参考文献】

- K. Shimoda et al., J. Magn. Reson. 186, 156-159 (2007)
- G. M. Bowers et al., J. Am. Ceram. Soc. 92, 545-548 (2009)
- D. L. Bryce et al., J. Am. Chem. Soc. 130, 9282-9292 (2008)
- D.Laurencin et al, Magn. Reson. Chem. 46, 347-350 (2008)

謝辞

NMR 測定に関し、多大なご尽力を頂いた日本電子 出口様に感謝致します。



Fig.2 Solid -state <sup>43</sup>Ca NMR (16.4T) spectra of a series of cement based materials.



Fig.3 Hydrothermal formation of tobermorite monitored by solid-state NMR.

## *ϵ*-Keggin型ポリ酸の固体<sup>95</sup>Mo NMR

○飯島隆広<sup>1</sup>, 西村勝之<sup>1</sup>, 山瀬利博<sup>2,3</sup>, 丹所正孝<sup>4</sup>, 清水 禎<sup>4</sup>
(分子研<sup>1</sup>, 東工大<sup>2</sup>, MO デバイス<sup>3</sup>, 物材機構<sup>4</sup>)

Solid state  $^{95}$ Mo NMR of  $\epsilon$ -Keggin polyoxomolybdates

<u>T. Iijima</u><sup>1</sup>, K. Nishimura<sup>1</sup>, T. Yamase<sup>2,3</sup>, M. Tansho<sup>4</sup>, T. Shimizu<sup>4</sup> Institute for Molecular Science<sup>1</sup>, MO Device<sup>2</sup>, Tokyo Institute of Technology<sup>3</sup>, National Institute for Materials Science<sup>3</sup>

We report solid state NMR of  ${}^{95}$ Mo NMR of  $\epsilon$ -Keggin polyoxomolybdates.  ${}^{95}$ Mo static NMR spectra for a diamagnetic crystal of  $[PMo_{12}O_{36}(OH)_4 \{La(H_2O)_{2.75}Cl_{1.25}\}_4]$ . 27H<sub>2</sub>O were measured under moderate (9.4 T) and ultrahigh (21.8 T) magnetic fields to clarify the localization of eight d<sup>1</sup> electrons included in the  $\{Mo_{12}\}$  core. The obtained spectra could be simulated by superimposing two subspectra that arise from Mo(V) and Mo(VI) with the ratio 2:1. NMR parameters were estimated by density functional theory (DFT) calculation with a localized-electron model. From these results, it was found that eight d<sup>1</sup> electrons of Mo(V) are localized to form four Mo(V)-Mo(V) bonds.

【緒言】モリブデンには 0-6 価の原子価状態があり、これまで溶液 NMR では全ての整数原 子価について <sup>95</sup>Mo NMR の研究が報告されている [1]。特に、Mo(0), Mo(II), Mo(VI) は 配位化学や反応性の研究で広く用いられてきた。一方、固体 NMR では、*I* = 5/2 の四極 子核である <sup>95</sup>Mo のスペクトルは、核四極相互作用により線幅が広がってしまうため、固 体 <sup>95</sup>Mo NMR による研究は多くなかった。最近我々は、感度・分解能を向上させるため 強磁場マグネットを使用して、局在化または非局在化した d<sup>1</sup> 電子を有する混合原子価モ リブデン (V, VI) ポリ酸の固体 <sup>95</sup>Mo NMR を測定し、これまで観測例のなかった Mo(V) の固体 <sup>95</sup>Mo NMR スペクトルを報告した [2]。その中で、Mo(VI) サイトに比べ Mo(V) サ イトの <sup>95</sup>Mo 化学シフトは大きくなること、また d<sup>1</sup> 電子の局在性の違いにより化学シフ ト異方性が大きく異なることを示した。

今回研究対象としたのは  $\epsilon$ -Keggin 型の { $Mo_{12}$ }をコアとする化合物 [ $PMo_{12}O_{36}(OH)_4$  { $La(H_2O)_{2.75}Cl_{1.25}$ } $_4$ ] · 27H<sub>2</sub>O (以下 { $Mo_{12}$ }(La)) である。おおよその構造は、{ $Mo_{12}$ } が 4 つの La(H<sub>2</sub>O)<sub>2.75</sub>Cl<sub>1.25</sub> でキャップされたものである [3]。構造式に小数が現れるのは La(III) に配位した H<sub>2</sub>O や Cl が disorder しているためである。電位差滴定の結果による と { $Mo_{12}$ }の Mo は 8 個の Mo(V) と 4 個の Mo(VI) から成っており、Mo も disorder して いるのではないかとされているが、X 線回折の結果からは一つの Mo サイトしか報告され

<sup>95</sup>Mo, ポリ酸

○いいじま たかひろ、にしむら かつゆき、やませ としひろ、たんしょ まさたか、 しみず ただし
ておらず、構造の詳細(Mo(V)のd<sup>1</sup>電子の局在性)は分かっていない。

本研究では、強磁場マグネット等を用いた固体<sup>95</sup>Mo NMR 測定を行い、得られたスペクトルのシミュレーションや量子化学計算により {Mo<sub>12</sub>}(La)の構造を調べたので、結果を発表する。

【実験】9.4 T での <sup>95</sup>Mo 固体 NMR は Varian Inova 400 分光器を用い、共鳴周波数 26.060 MHz で測定した。21.8 T では JEOL ECA 930 分光器を利用し共鳴周波数 60.572 MHz で <sup>95</sup>Mo 固体 NMR 測定を行った。測定は静止サンプルに対しエコー法で行った。スペクト ル・シミュレーションは自作のプログラムを用いて行った。NMR パラメータの DFT 計算 は、VWN + BP の汎関数及び triple-ζ レベルの Slater 型基底関数を用い、ADF 2009.01 で行った。

【結果と考察】Figs. 1(i-a) および 1(ii-a) に それぞれ、9.4, 21.8 T の磁場で測定した {Mo<sub>12</sub>}(La) の<sup>95</sup>Mo NMR static スペクトル を示す。両磁場とも、数千 ppm にわたるブ ロードなスペクトルが得られた。Mo(V) の d<sup>1</sup> 電子が分子全体に非局在化している場合 は、スペクトルは単一成分になるが、これら のスペクトルをシミュレーションするには2成 分 (Mo(V) と Mo(VI)) が必要であった。Fig. 1(b) は、Fig. 1(c) と 1(d) を 2:1 の強度比で 重ね合わせたシミュレーション・スペクトル である。

一方、DFT 計算においても、全てのモリ ブデンが等価であるとする平均構造(X線に よる構造)では計算が収束することはなかっ た。そこで、d<sup>1</sup> 電子の局在化モデルとして Mo-Moの距離を可変(4つの Mo(V)-Mo(V) と2つの Mo(VI)-Mo(VI))として計算を行っ



Fig. 1:  ${}^{95}$ Mo MAS NMR spectra of {Mo<sub>12</sub>}(La) under (i) 9.4 and (ii) 21.8 T. (a) and (b) show the observed and simulated spectra, respectively. (c) and (d) denote spectral components constituting the spectrum in (b).

たところ、計算は収束しリーズナブルな NMR パラメータが得られた。以上のことから、 ε-{Mo<sub>12</sub>} コアの d<sup>1</sup> 電子は局在化しており、Mo(V)-Mo(V) 結合の形成に寄与していると 考えられる。

- M. Minelli, J.H. Enemark, R.T.C Brownlee. M.J. O'Connor, A.G. Webb, *Coord. Chem. Rev.* 68, 169 (1985).
- [2] T. Iijima, T. Yamase, M. Tanasho, T. Shimizu, K. Nishimura, Chem. Phys. Lett. 487, 232 (2010).
- [3] P. Mialane, A. Dolbecq, L. Lisnard, A. Mallard, J. Marrot, F. Secheresse, Angew. Chem. Int. Ed 41, 2398 (2002).

### 固体NMRによる微生物産生ポリアミノ酸および そのポリマーブレンドの構造解析

前田 史郎<sup>1</sup>, 〇黄前 真吾<sup>1</sup>, 熊 輝<sup>1</sup>, 国本 浩喜<sup>2</sup> <sup>1</sup>福井大院工, <sup>2</sup>金沢大院自然

### Structural analysis of microbial poly(amino acid)s and their polymer blends by solid NMR

Shiro Maeda<sup>1</sup>, OShingo Oumae<sup>1</sup>, Xiong Hui<sup>1</sup>, and Ko-Ki Kunimoto<sup>2</sup> <sup>1</sup> Division of Applied Chemistry and Biotechnology, Graduate School of Engineering, University of Fukui, Japan and <sup>2</sup> Division of Material Engineering, Graduate School of Natural Science and Technology, Kanazawa University, Japan.

Solid NMR measurements of poly ( $\gamma$ -glutamic acid) ( $\gamma$ -PGA), its sodium salt ( $\gamma$ -PGA/Na) and poly ( $\epsilon$ -lysine), and their polymer blends were done. <sup>13</sup>C spectrum of  $\gamma$ -PGA differs from that of  $\gamma$ -PGA/Na. C=O peak of  $\gamma$ -PGA and  $\gamma$ -PGA/Na were deconvoluted into three and two peaks, respectively. The miscibility of  $\gamma$ -PGA/PVA was investigated by measuring <sup>1</sup>H spin-lattice relaxation times. There were unassigned peaks in CPMAS spectrum of  $\epsilon$ -PL film cast from aqueous solution at 165ppm in <sup>13</sup>C and 90ppm in <sup>15</sup>N, respectively. These peaks are not observed in powder sample. We assigned these peaks to C=O and NH group of carbamic acid formed by reaction of the amino groups with gaseous CO<sub>2</sub>.

【緒言】

微生物産生高分子は主に3種類知られており、ポリ(ε-リジン)(ε-PL)[1]、ポリ(γ-グルタ ミン酸)(γ-PGA)[2]、シアノフィチンである.ε-PLは、必須アミノ酸の一つであるL-リジンがα位のカルボキシル基とε位のアミノ基でアミド結合した、放線菌の一種であ る*streptomyces albulus*が産生するポリアミノ酸である.γ-PGAはγ位のカルボキシル基 とα位のアミノ基がアミド結合で連なったアニオン性ポリマーで、主として納豆菌な どの*Bacillus*属菌によって産生され水溶性および生分解性を有し、化粧品・医用材料等 の幅広い分野で応用が期待されている.ここではε-PL、γ-PGAとそのナトリウム塩で あるポリ(γ-グルタミン酸ナトリウム)(γ-PGA /Na)、およびそのポリマーブレンドの固 体NMR等を用いた構造解析結果を報告する.

### 【実験】

ε-PL:ε-PL水溶液をテフロンシャーレ上にキャストし室温で風乾後,減圧乾燥させて キャスト試料を作成した.γ-PGA:種々のpHのγ-PGA水溶液をテフロンシャーレ上に キャストし室温で風乾後,減圧乾燥させてキャスト試料を作成した.γ-PGA/PVAポリ マーブレンド:γ-PGA, PVAを別々に水溶液を作成し,種々のモノマーユニット比に なるように混合・撹拌した.混合溶液をテフロンシャーレ上にキャストし,室温で風 乾後,減圧乾燥させてキャスト試料を作成した.固体NMRはChemagnetics CMX Infinity 300を用いて室温で測定した.

微生物産生ポリアミノ酸,固体NMR,ポリマーブレンド

まえだ しろう, 〇おうまえ しんご, しょん ふい, くにもと こうき

#### 【結果と考察】

<u>ε-PL</u> ε-PL の <sup>13</sup>C スペクトルを Fig.1 に、<sup>15</sup>N スペクトルを Fig.2 に示す。水キャスト フィルムにおいて、<sup>13</sup>C では 165ppm、<sup>15</sup>N では 90ppm にパウダーにはないピークが現 れる。これらのピークの帰属は不明だったが、これらを空気中の CO<sub>2</sub> と側鎖の NH<sub>2</sub> が結合することで生成するカルバメート(-NHCOOH)に帰属した。[3]





Fig.1 Solid state <sup>13</sup>C NMR spectra of (a)  $\epsilon$ -PL powder and (b)  $\epsilon$ -PL cast film from aqueous solution. \*spinning side

Fig.2 Solid state  $^{15}N$  NMR spectra of (a)  $\epsilon\text{-PL}$  powder and (b)  $\epsilon\text{-PL}$  cast film from aqueous solution.

<u>γ-PGA</u> γ-PGA 水キャスト試料の<sup>13</sup>C スペクトルの pH 依存性を Fig.3 に示す. pH が γ-PGA の pKa 値(=2.23)よりも低くなると、180ppm 付近のカルボニル炭素の線形は大 きく変化する. 波形解析の結果 3 本のピークでフィットでき, pH が低くなるにつれ て大きくなる高磁場側のピークを二量体を形成している側鎖カルボキシル基に帰属 した. IR 測定においてもはっきりと二量体の存在を示すピークが確認できた.

また,50ppm 付近に現れる脂肪族炭素 Cαについても線形の変化が見られる.pH が pKa 以上になると,側鎖カルボニル基は COO<sup>-</sup>に変化する.負電荷の反発により鎖間 が広がったランダムコイル構造をとり,コンフォメーション変化により Cαの化学シ フトが変化したと考えられる.

<u> $\gamma$ -PGA/PVAポリマーブレンド</u>  $\gamma$ -PGA/PVAポリマーブレンドの<sup>13</sup>CスペクトルをFig.4 に示す. PVAの<sup>13</sup>Cスペクトルの低磁場側のメチン炭素のピークは、立体規則性によ る分子内水素結合様式の違いで、3本に分裂する.ポリマーブレンドにおいても3本の ピークの比率から水素結合様式の変化を知ることができる.また、ポリマーブレンド の材料物性にポリマー間の相溶性が大きく関わってくる.実験室系および回転座標系 スピン-格子緩和時間 $T_1^{H}$ および $T_1\rho^{H}$ 測定を行うことによって相溶性の評価を行った.



Fig.3  $^{13}C$  CP/MAS NMR spectra of  $\gamma\text{-PGA}$  film cast from aqueous solution at (a)pH7.1, (b)pH4.9, (c)pH3.3, (d)pH2.3, and (e)pH1.5



Fig.4 "C CP/MAS NMR spectra of (a)γ-PGA, (b)-(f) γ-PGA/PVA, and (g)PVA. Molar unit ratio of γ-PGA/PVA are (b)2/1, (c)1/1, (d)1/2, (c)1/3, and (f)1/5.

[1] S. Maeda et al., *Polym. Preprints*.2008, 49, 730-731
[2]S. Maeda et al., *Polym. Preprints Jpn.* 2008, 57, 3300, 2009, 58, 1162, 2010, 59, 1060
[3]A. Dos et al., *J. Phys. Chem. B*, 2008, 112, 15604-15614

**P93** 

固体 NMR を用いた石炭灰粘度に与える構造および組成因子の解析

林 雄超<sup>1</sup>、〇出田 圭子<sup>2</sup>、宮脇 仁<sup>2</sup>、持田 勲<sup>3</sup>、尹 聖昊<sup>2</sup> <sup>1</sup>九大総理工、<sup>2</sup>九大先導研、<sup>3</sup>九大炭素センター

### Solid-state NMR analysis of structure and composition of coal ash

Xiongchao Lin<sup>1</sup>, OKeiko Ideta<sup>2</sup>, Jin Miyawaki<sup>2</sup>, Isao Mochida<sup>3</sup>, Seong-Ho Yoon<sup>1,2,3</sup> <sup>1</sup> Interdisciplinary Graduate School of Engineering Sciences, Kyushu univ.,<sup>2</sup> Institute for Materials Chemistry and Engineering, Kyushu univ.,<sup>3</sup> Research and Education Center of Carbon Resources, Kyushu univ.

Coal ashes usually become the cause of many troubles for a stable continuous operation in coal gasification process. Smooth tap-out of molting ash and slag from the gasifier is one of the most important tasks, which is sensitive to compositions and temperature of ash and slag. Correlation between structure and viscosity under various temperatures of the minerals was closely traced using <sup>27</sup>Al-, <sup>29</sup>Si-solid state NMR and XRD, *etc.* to interpret the transition behaviors and crystal structures of coal ash during gasification. Further, effects of Ca and Fe compositions, as are known as fluxing agents, on the structural changes of ash are also examined.

【緒言】石炭ガス化発電ではガス化効率向上と共に、安定操業のために炉内から溶融スラグをい かにスムーズに取り除くかが重要な課題となっている。

そのため、石炭灰の溶融性・流動性が重要となるが、これらは粘度に大きく相関する。これまで 石炭灰の組成から粘度を推定する式が提唱されているが、一部の炭種では必ずしも予想値通りの溶 融挙動を示さないことが分かっている。

一方で、Ca や Fe は粘度に関係する添加剤として知られている。本研究では、これらの Ca や Fe がなぜ粘度低下をもたらすかを調べるために、いくつかの Ca、Fe 含有比の異なる石炭灰について <sup>27</sup>Al および <sup>29</sup>Si 固体 NMR や XRD 等を用いて鉱物の温度による構造変化を検討した。

【実験】 石炭は Ca、Fe 含有量の異なる A炭、D炭、M炭とを用意。組成比を Table に示した。 300-1600℃のいくつかの温度で熱処理を行い、石炭灰を作成した。<sup>27</sup>Al 固体 NMR 測定は JEOL ECA800(18.8T) 3.2mm MQMAS プローブを用い、chemical shift echo 法、<sup>29</sup>Si 固体 NMR 測定は ECA400(9.4T)、3.2mm CPMAS プローブを用いて行った。試料回転速度はすべて 20kHz で行った。

Samples	SiO <sub>2</sub>	$AI_{2}O_{3}$	$Fe_2O_3$	Ca0	K <sub>2</sub> 0	TiO <sub>2</sub>	S0 <sub>3</sub>	MgO	Total	B/A**
D	70. 04	20. 85	5. 45	1.86	0.95	0.31	0.54	ND*	100	0.19
Α	39.86	12.39	7. 43	21. 54	0.84	0.38	5.63	11. 92	100	0.90
М	42.15	16. 51	17. 19	11.04	1. 12	0. 53	5. 72	5.73	100	0.85

Table Composition of ashes with XRF analysis (*mol* % as equivalent oxide)

\*ND: not detected

\*\*  $B=\%Fe_2O_3+\%CaO+\%MgO+\%Na_2O+\%K_2O; A=\%SiO_2+\%AI_2O_3+\%TiO_2$ 

\*\*\* Trace elements Sr, Mn, V, Zr, Y, Zn, Cu,Rb were ignored.

【結果と考察】 Table に示した3種の石炭灰は溶融粘度に数百度の差があることを確認した。

Key words: <sup>27</sup>A1-NMR、<sup>29</sup>Si-NMR、石炭灰

りん しゃんちゃお、Oいでた けいこ、みやわき じん、もちだ いさお、ゆん そんほ

次に各々の炭種について熱処理石炭灰とガス化 炉内で生成したスラグについて XRD と固体 <sup>29</sup>Si-NMR, <sup>27</sup>Al- NMR の結果を示す。いずれの炭種についても 300℃熱処理の低温灰の主成分は、 NMR においては鉄によるブロードニングが観察されるものの XRD, NMR ともに kaolinite と quartz であることがわかる。 しかしながら 1600℃熱処理を施した高温灰では炭種により異な るスペ クトルを与えている。 1300℃以上でのみ流動性を示す D 炭と M 炭では XRD の主成分は mullite と quartz であり、特に、最も粘度の高い D 炭では 1200℃以上で cristobalite の生成がみられ る (データは示していない)。 それに対し、A 炭の XRD パターンは全く異なってお り、Ca を含 んだ複合酸化物の生成があることを示唆している。



スラグの骨格構造を決める<sup>29</sup>Si-NMRからも、D炭、M炭は4配位の化学シフトが3次元的なネットワーク構造(Q<sup>4</sup>)とっていると帰属されるのに対し、A炭はkaolinite(Q<sup>3</sup>)とほぼ同じシフトを保っており、加熱によるネットワーク構造の成長が起こらないことを示唆している。



Fig.2. Solid-state <sup>27</sup>AI- , <sup>29</sup>Si- NMR of coal ashes and slags **\***: spinning side band, **#**: signal from probe or impurity k: kaolinite, q: quartz

このようなネットワーク構造の広がりが粘度に直接影響を与えていることは明らかであるが、その 原因について XRD は slag からほぼなにも情報を与えないのに対し、1600℃石炭灰とスラグの固体 NMR は似通ったスペクトルを与えている。水冷した スラグは規則構造を取りにくいため局所構造を よく表す NMR が 非常に役に立つと言える。発表では <sup>27</sup>A1-STMAS 測定を含め詳細に議論する。

【参考文献】鉄と鋼, vol 95, No. 4, 321-330 金橋ら

超偏極<sup>129</sup>Xe NMRによる触媒担体のポア評価

○服部 峰之<sup>1</sup>、平賀 隆<sup>1</sup>、中田 真一<sup>2</sup> <sup>1</sup>(独)産業技術総合研究所、<sup>2</sup>秋田大学工学資源学部

### Hyperpolarized <sup>129</sup>Xe NMR of Xe in Catalysis Pores

oMineyuki Hattori<sup>1</sup>, Takashi Hiraga<sup>1</sup>, and Shinichi Nakata<sup>2</sup>

<sup>1</sup> National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Tsukuba, Japan.

<sup>2</sup> Engineering and Resources Science, Akita University, Akita, Japan.

<sup>129</sup>Xe NMR techniques have been applied to probe porosity of mesoporous materials and the pore size is known to relate with the chemical shift. Since the Van der Waals radius of Xe is known to be 0.216 nm, the possible pore size to adsorb xenon should be larger than 0.4 nm in diameter. Then the mean pore diameters ranging from 0.4 to 300 nm are the possible target to show the relationship experimentally. We have developed an apparatus to produce the laser induced hyperpolarized (HP) Xe gas and tried to apply it to catalysis samples.

【要旨】超偏極XeガスのNMR応用として、触媒の多孔構造の評価を行った。超偏極 により、1万倍以上の感度向上が得られ、積算なしでも、十分な信号感度が得られる。 数十msから1秒程度の時間分解で、リアルタイム測定が可能になった。触媒に吸着し ているXeの<sup>129</sup>Xe NMRの化学シフトと線幅は、細孔径とXeと細孔との相互作用の大き さに依存する。触媒学会の配布する参照触媒を入手して、<sup>129</sup>Xe NMRスペクトルの取 得を行った。酸化セリウムについて、三種類の製造過程が異なった試料について、試 料の前処理により、シフトとパターンが異なったスペクトル温度依存性の結果を得た。

【超偏極Xe NMR実験】東横化学(株)と産総研で開発した、偏極率3%の超偏極Xeガス をバッチ式で連続供給することを可能とした実用機[1]を使用した。本装置は、原料と なるXe/N<sub>2</sub>混合ガス及びパージ用N<sub>2</sub>ガスのシリンダー収納部、圧力制御部、偏極用セ ル部、及び、システム制御部により構成される。Rbが封入されたパイレックスセルに、 Xe/N<sub>2</sub>の高純度混合ガスを供給し、永久磁石アッセンブルにより生成した約10mTの均 一磁場(~1%)中において794.7nmの半導体レーザー光を照射することにより、1回に約 300mlの超偏極Xeガスを貯留して生成させた超偏極Xeガスは、約10分以上の間隔を開 けて、30mlのシリンジに連続的に取り出され、専用に開発したオンライン式導入管を 接続した試料管中の触媒試料へ導入し接触させた。触媒学会の参照触媒、今回は酸化 セリウム3種類(表:JRC-CEO-1((株)三徳)、JRC-CEO-2(第一稀元素化学工業(株))、 JRC-CEO-3("))について、測定を行った。<sup>129</sup>Xe NMR スペクトルは、6.3Tで、tecmag Apollo Spectrometerにより得た。250ms間隔連続収集と64回積算(Tr=4s)での測定を行っ た。

超偏極Xe,多孔質,触媒

oはっとりみねゆき,ひらがたかし,なかたしんいち

	JRC-CEO-1	JRC-CEO-2	JRC-CEO-3
Fe(%)	0.001以下	0.003以下	0.003以下
比表面積 (m <sup>2</sup> /g)	156.9	123.1	81.4
平均細孔径 (nm)	2.82	7.08	11.6
製造法	炭酸セリウム300℃焼成	中和沈殿、400℃焼成	中和沈殿、600℃焼成



図1.<sup>129</sup>Xe 化学シフト(酸化セリウム)(上)、吸収線幅(FWHM)(下)の温度依存性 (記号:NoTr:処理無し、200deg Ev:200℃で真空引き、RT Ev:室温で真空引き)

【結果】平均細孔径が大きな試料は、シフト値が小さくなる傾向が得られた。200℃ での真空処理では、導入後の信号消衰が早くなり、NMR 信号が検出されない場合が あった。室温での真空処理により、シフト値が増大する傾向がみられた。<sup>129</sup>Xe NMR 測定により、触媒担体の細孔に関する情報が得られることがわかった。

【参考文献】

[1] 大竹紀夫、村山守男、平賀隆、服部峰之、本間 一弘,特開 2004-262668 号公報; 服部峰之,超偏極キセノンガス生成装置実用機の研究開発,工業材料,52(3),86-89 (2004).

### 固体NMRによるポリフルオレン膜の分子配向解析

○福地 将志、福島 達也、後藤 淳、梶 弘典 京大・化研

### Analysis of molecular orientation in polyfluorene films by solid-state NMR

OMasashi Fukuchi, Tatsuya Fukushima, Atsushi Goto, and Hironori Kaji Institute for Chemical Research, Kyoto University, Kyoto, Japan.

Poly (9,9-di-*n*-octyl-2,7-fluorene) (PFO), a prototypical fluorene-based conjugated polymer, is a highly-efficient blue-emitting polymer with potential applications of light-emitting diodes and electrically pumped organic lasers. Recently, it has been reported that optical and electrical properties of organic amorphous films were related to molecular orientations relative to the substrates. In this study, we characterize molecular orientations in amorphous thin films of PFO by solid-state NMR. From chemical shift anisotropy (CSA) measurements, it is found that  $\sigma_{11}$  signal is reduced and  $\sigma_{33}$  signal is enhanced when the thin films are perpendicular to  $B_0$ . This indicates that the fluorene rings tend to be parallel to the substrates. The quantitative analysis will be shown in the presentation.

### 【緒言】

近年、低分子系有機非晶質膜中において、 有機分子の配向と光学的・電気的特性との 間に密接な相関があることが報告され [1,2]、分子の配向を定量的に解析する必要 性が高まってきた。また、青色発光を示す 高分子系有機 EL 材料、 poly



```
(9,9'-di-n-octyl-2,7-fluorene) (PFO) \mathcal{C} \mathcal{E} Fig. 1. Chemical structure of ^{13}C_1-FIQ PFO.
```

分子を配向させることにより、正孔移動度が一桁向上することが報告されている[3]。 そこで本研究では、アモルファス膜における分子配向と電荷輸送特性との相関を明確 にすることを目的として、PFOキャスト膜中における分子の配向を固体NMR法により 詳細に解析することを試みた。

### 【実験】

図1の示すように<sup>13</sup>Cラベルしたポリフルオレン試料(以降、<sup>13</sup>C<sub>1</sub>-FIQ PFOと呼ぶ)を合成した。このラベル試料のキャスト膜(膜厚20±1 µm)を30枚積層し、膜面が静磁場と 垂直、あるいは、平行になるように配置した状態で<sup>13</sup>C化学シフト異方性(CSA)を測定 した。固体NMR測定は、Bruker社製AVANCE III分光計により9.4 Tの静磁場下で行っ

有機EL,ポリフルオレン,化学シフト異方性

○ふくちまさし、ふくしまたつや、ごとうあつし、かじひろのり

た。プローブには、Doty社製7 mm Widelineプローブを用いた。<sup>1</sup>Hと<sup>13</sup>Cの共鳴周波数 はそれぞれ、400.25 MHz、100.66 MHzである。測定は室温で行い、手法としてCP法、 Hahn-echo法を用いた。また、ラベルされていないPFOに対しても、同様にキャスト膜 を作製し、そのCSAを測定した。<sup>13</sup>C<sub>1</sub>-FIQ PFOとラベルされていないPFOの差スペク トルをとることにより、ラベル<sup>13</sup>C炭素のみに対するCSAスペクトルを得た。

### 【結果・考察】

図2(a)に分子の配向がランダムなバル ク試料、(b)に静磁場*B*<sub>0</sub>に対して垂直に配 置したキャスト膜試料、(c)には静磁場*B*<sub>0</sub> に対して平行に配置したキャスト膜試料 の<sup>13</sup>C CSAスペクトルを示す。なお、これ らのスペクトルにおいては、上述の通り 天然存在<sup>13</sup>C炭素の影響を取り除いてある。

図2(b)のスペクトルでは、 $\sigma_{11}$ の信号強 度は、分子がランダムに配向している図 2(a)と比較して減少しており、図2(c)では 逆に増加している。ラベル<sup>13</sup>C炭素の $\sigma_{11}$  (b) に対する主軸方向は分子鎖軸方向に対応 していることから、PFO分子鎖は、膜面に 対して平行に配向する傾向があることが (c) わかる。また、 $\sigma_{33}$ に関しては、図2(b)で はその信号強度は増加しており、図2(c) ではやや減少している。ラベル<sup>13</sup>C炭素の  $\sigma_{33}$ に対する主軸方向はフルオレン環に垂 直な方向に対応していることから、フル オレン環は、膜面に対して平行に配向す る傾向にあることがわかる。現在、分子 <sup>5</sup>0.05



Fig. 2. The <sup>13</sup>C CSA spectra of <sup>13</sup>C<sub>1</sub>-FIQ PFO in BULK (a), in cast films arranged perpendicular to  $B_0$  (b), and in cast films set parallel to  $B_0$  (c).

#### 【謝辞】

PFO合成において御指導および御助力いただきました住友化学株式会社、岡田明彦様、金坂将様、小林諭様に深く感謝いたします。本研究は、日本学術振興会の最先端研究開発支援プログラムにより、助成を受けたものである。

#### 【文献】

- [1] D. Yokoyama, A. Sakaguchi, M. Suzuki, C. Adachi, Org. Electron. 2009, 10, 127.
- [2] D. Yokoyama, A. Sakaguchi, M. Suzuki, C. Adachi, Appl. Phys. Lett. 2009, 95, 243303.
- [3] M. Redecker, M. Inbasekaran, E. P. Woo, D. D. C. Bradley, Appl. Phys. Lett. 1999, 74, 1400.

石炭の多角固体NMR —有機成分と無機成分の構造— ○金橋康二<sup>1</sup>,高橋貴文<sup>1</sup> <sup>1</sup>新日鐵先端研

### Multinuclear Solid-state NMR for Coal—Organic and Inorganic Structure—

OKoji Kanehashi<sup>1</sup>, Takafumi Takahashi<sup>2</sup> <sup>1</sup>Advanced Technology Research Laboratories, Nippon Steel Corporation

Detailed studies on the inorganic matter as well as organic one in coal are very important from the viewpoint of both geology (coalification and diagenesis) and coal utilization. Solid-state NMR, a nuclide specific method, is well suited for the analysis of chemical structure of coal, multicomponent systems. In this study, we have applied to <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N (organic species) and <sup>27</sup>Al, <sup>29</sup>Si, <sup>11</sup>B (inorganic species) solid-state NMR to obtain information about organic and inorganic phases in coal.

石炭は製鉄プロセスにおいて不可欠な天然物である。石炭を乾留して製 造したコークスは鉄鉱石の還元剤として用いられており、最近では高炉に 直接微粉炭を吹き込むことで、高価なコークスの比率を下げた操業が主流 となっている。また、石炭発電においても、ボイラー炉に微粉炭を吹き込 み、燃焼させることで発電を行っており、効率的な操業および石炭由来の トラブルを回避するためにも、石炭の構造を明らかにすることは非常に重 要である。

石炭はそのランクにもよるが、約90 mass%を炭素を始めとした水素・窒 素等の有機成分が占めている。残りの10 mass%程度がアルミニウムやケイ 素等の無機成分であり、これらの有機成分と無機成分が複雑に絡み合った 構造を有していると考えられている。元素選択性があり、バルクの構造情 報が得られる固体NMRは石炭の化学構造を知る上で非常に有効な手法で ある。我々は石炭の有効利用を促進するため、これまでに<sup>13</sup>C, <sup>27</sup>Al, <sup>29</sup>Si等 の構造解析を中心に実施してきたが、最近では環境問題を背景に<sup>15</sup>Nや<sup>11</sup>B 等の微量成分の評価も行っており、今回の発表ではこれらの核種の測定結 果に関して報告する。

固体NMRの測定条件をTable 1に簡単にまとめた。

#### 石炭, 多核固体NMR

○かねはしこうじ,たかはしたかふみ

本要旨では紙面の都合上、石炭中の窒素とホウ素の結果を記す。いずれ も石炭中の含有量は僅かであり(N:約1 mass%、B:約0.01 mass%)、こ れまでの報告例は少ない。

石炭A, Bの<sup>1</sup>H→<sup>15</sup>N CP/MASスペクトルをFig. 1に示す。石炭中の窒素は、 ピリジンタイプやピロールタイプの芳香族、アミドタイプやアミンタイプ 等の脂肪族が考えられるが、今回の測定結果からは、主にピロールタイプ が観測されているのがわかる。またピロールタイプの化学シフトは、環構 造が発達するに従い高磁場側へシフトしていくことから、石炭AおよびB を比べた場合、石炭Bのほうがよりピロール環やベンゼン環が縮合した構 造をとっていると推測される。実際、石炭Bのほうが炭化度が高く、炭素 骨格の芳香族性が高くなっていることから、矛盾しない結果であるといえ る。今回の測定ではCP/MASを用いているため、Nの近傍にHが存在しない ピリジンタイプは観測できていないが、試料をプロトン化することで、ピ リジニウムイオンとして検出できると思われる。

次に、石炭Cの<sup>II</sup>B MASスペクトルをFig. 2に示す。0~20 ppmの領域に3 本の比較的シャープなピークが観測された。化学シフト値から判断すると、 低磁場側の2本ピークは3配位Bの化学シフト領域に近いが、3本のピークい ずれも核四極子結合定数は非常に小さいことから、全てのピークが4配位 構造をとっていると結論付けた。低磁場側の2本のピークは、通常の無機 酸化物の化学シフト領域とは異なっており、有機質と結合した4配位Bであ ると推測した。実際、<sup>I</sup>H→<sup>II</sup>B CP/MASスペクトルではこれらの低磁場の ピークの相対強度が増加していたころから、OHと結合している有機質のB に起因するものと推定している。



Table 1 NMR parameters for coal samples.

Nuclide	Spin	Spectrometer	Pulse sequence	Reference		
<sup>13</sup> C	1/2	CMX-300 INOVA-500	CP/MAS	HMB (17.3 ppm)		
<sup>1</sup> H	1/2	CMX-300 INOVA-500	CRAMPS MAS	Adamantane (1.91 ppm)		
<sup>15</sup> N	1/2	INOVA-500	CP/MAS	Glycine (-347.54 ppm)		
<sup>27</sup> AI	5/2	ECA-700	MAS, MQMAS	AlCl <sub>3</sub> .aq (-0.1 ppm)		
<sup>29</sup> Si	1/2	CMX-300	MAS	PDMS (-34.0 ppm)		
<sup>11</sup> B	3/2	ECA-700	MAS, CP/MAS, STMAS	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> . aq (19.49 ppm)		



Fig. 1  ${}^{1}H \rightarrow {}^{15}N$  CP/MAS spectra for coal A and B.

Fig. 2 <sup>11</sup>B MAS spectra for coal C.

### 無機化合物の固体<sup>1</sup>H NMRにおける高速MASと CRAMPSの分解能の比較

○西浦達也<sup>1</sup>,金橋康二<sup>2</sup>
 <sup>1</sup>三島光産
 <sup>2</sup>新日鐵先端研

## Comparison of spectral resolution between high-speed MAS and CRAMPS in <sup>1</sup>H solid-state NMR for inorganic compounds

OTatsuya Nishiura<sup>1</sup>, Koji Kanehashi<sup>2</sup> <sup>1</sup>Mishima Kosan Co., Ltd. <sup>2</sup>Advanced Technology Research Laboratories, Nippon Steel Corporation

In recent years, Magic angle spinning at very fast spinning frequency, "fast MAS", has been utilized to obtain high resolution <sup>1</sup>H NMR spectra for solids as well as CRAMPS. Fast MAS has some advantages over CRAMPS, e.g. easy to implement and more reliable in the chemical shift. Whereas MAS with the spinning rate up to 60 kHz provides still insufficient spectral resolution compares with CRAMPS for <sup>1</sup>H abundant compounds such as organic polymer, it is promising for inorganic solids with lower concentration of <sup>1</sup>H, causing the smaller dipolar interaction. In this study, we have applied high-speed MAS and CRAMPS to inorganic solids to compare spectral resolution.

<sup>1</sup>H核の固体高分解能NMRスペクトルを得るにはCRAMPSを適用し、<sup>1</sup>H 間の双極子相互作用を平均化する方法が良く知られているが、この方法は (1)条件調整が煩雑、(2)化学シフトの信頼性が低下、(3)定量性に 欠ける、といった問題点を持つ。一方で、近年のハード技術の発展によっ て、60 kHz程度までの非常に高速で試料を回転することが可能なプローブ が入手できるようになり、より簡便に分解能の高い<sup>1</sup>H NMRスペクトルが 得られる期待がある。

有機化合物においては一般に<sup>1</sup>H濃度が高いことから、60 kHz程度の回転 周波数では<sup>1</sup>H間の双極子相互作用が平均化されず、CRAMPSに分解能が及 ばない場合も多い。一方、無機化合物中の水素原子の濃度は低いことから、 CRAMPSを用いずとも十分に分解能の高い<sup>1</sup>H NMRスペクトルが得られる 可能性がある。そこで今回、いくつかの無機化合物において、CRAMPSス ペクトルと高速回転下でのMASスペクトルを測定し、分解能の違いに関す る基礎的検討を行った。

高速MAS, CRAMPS, 無機化合物

○にしうらたつや,かねはしこうじ

<sup>1</sup>H CRAMPS NMRスペクトルはCMX-300 (7.0 T)を用い、BR24のパル ス系列(90°パルス幅:1.3 μs)を用いて1500 Hzの試料回転周波数で測定 した。化学シフトのスケーリングはアジピン酸の高磁場側のメチレン基を 1.5 ppmとした。高速MASスペクトルの測定にはINOVA-500 (11.7 T)を用 い、シングルパルスで10~60 kHzの試料回転周波数で測定した。化学シフ トはアダマンタンのピークを1.91 ppmに設定した。

まず、ピークの線幅に対するMAS速度の依存性をFig. 1に示す。Silicic acidにおいては、MAS速度を上げても線幅がほとんど変化しなかったのに 対し、Kaolin(Al<sub>2</sub>Si<sub>2</sub>O<sub>5</sub>(OH)<sub>4</sub>)やH<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>では回転周期に対してほぼ直線的 に線幅が減少していく傾向が見られ、特にH<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>ではその効果が顕著で あった。これらのMAS速度に対する線幅の依存性の違いは、化合物中の水 素濃度と関連があると考えられる<sup>1)</sup>。上記のSilicic acid、Kaolin、H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>中 の水素濃度はそれぞれ<1 mass%、1.6 mass%、4.9 mass%であり、水素濃度 が高いほど、<sup>1</sup>H間の双極子相互作用が平均化されておらず、MAS速度の 増加に伴う線幅の減少効果が大きくなっていると考えられる。水素濃度が 比較的高いH<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>等では、MAS速度をさらに上げることによって、更なる 線幅の減少が期待できると思われる。

次に、MAS速度が60 kHzの時のMASスペクトルとBR24のパルス系列で 得られたCRAMPSスペクトルを比較した一例をFig. 2に示す。Kaolinにおい ては、両手法でトータルの線幅自体はほぼ等しいものの、高速MASスペク トルではより鮮明に層間と層内に存在する非等価なOH基由来のピークが 分離できている。一方、より水素濃度の高いH<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>では、CRAMPSスペク トルのほうが分解能が高いことから、Fig. 1で見られた傾向と同様、60 kHzのMAS速度では<sup>1</sup>H間の双極子相互作用を平均化するには不十分である といえる。

以上の結果から、無機化合物においても、試料回転周波数が60 kHz程度のMASスペクトルでは分解能の点でCRAMPSに及ばないケースもあるが、 測定の簡便さや定量性の観点から、<sup>1</sup>H核の固体高分解能NMRスペクトル を得る方法として非常に有効であると考えられる。



Fig. 1 Dependence of line width on rotor period for some inorganic compounds in <sup>1</sup>H MAS spectra.



Fig. 2 <sup>1</sup>H solid-state NMR spectra for kaolin (a) and H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (b). Top: CRAMPS spectra, bottom: MAS spectra (v,=60 kHz).



フッ素レスNMRプローブを用いた微量フッ素の化学形態解析

○高橋貴文<sup>1</sup>, 金橋康二<sup>1</sup>, 根本貴宏<sup>2</sup>
 <sup>1</sup>新日鐵・先端研
 <sup>2</sup>日本電子

### Characterization of chemical species for trace amounts of fluorine using a fluorine-less NMR probe

○Takafumi Takahashi<sup>1</sup>, Koji Kanehashi<sup>1</sup>, Takahiro Nemoto<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Advanced Technology Research Laboratories, Nippon Steel Corporation <sup>2</sup>JEOL

Fluorine is one of the elements whose environmental risks have been frequently discussed. Trace amounts of fluorine in by-products of steel-making industry make it difficult to characterize its chemical species. To improve the quality of <sup>19</sup>F-NMR spectra, a fluorine-less NMR probe has been developed by substituting a module and a variable condenser with non-fluorine ceramics. As a result, a <sup>19</sup>F MAS NMR spectrum of synthetic products with fluorine content < 1mass% can be obtained without applying a depth pulse. In addition, new analytical techniques such as <sup>19</sup>F {<sup>27</sup>Al} TRAPDOR and <sup>31</sup>P {<sup>19</sup>F} CPMAS have been employed. In a <sup>19</sup>F {<sup>27</sup>Al} TRAPDOR spectrum, the fluorine atoms bonding with aluminum ones are selectively observed. On the other hand, in a <sup>31</sup>P {<sup>19</sup>F} CPMAS NMR spectrum, the fluorine atoms occurring close to phosphorous ones are selectively observed. The combination of these analytical techniques allows us to characterize the chemical species of trace amounts of fluorine.

【緒言】フッ素(F)は多くの工業製品に用いられる一方、環境負荷物質として濃度・溶出 値双方に関して、厳しい排出規制が設けられている元素でもある。こうした環境規制をクリ アすることが、石炭灰やスラグ等の再利用を進めるうえでの課題である。これまでにも、F の化学形態を制御によるF固定化法が提案されているものの、Fの化学形態解析技術は十分 確立されているとは言えない。特に、1mass%以下の微量Fについては、F含有化合物をNMR で特定するには幾つかの技術的課題が存在する。一般に、NMRプローブ内部のモジュール周 辺には加工のし易さなどの理由からF系樹脂が多用され、強いバックグラウンド(BG)シグ ナルを与える。また、Al-F結合とSi-F結合については、Fの化学シフトが類似しており、<sup>19</sup>F-MAS スペクトルのみでこれらを区別することは難しい。同様に、Ca-F結合を持つ化合物のF化学シ フトも、極めて狭い領域に集中する。そこで、これらの課題を克服するため、FのBG削減に 取り組むとともに、測定技術としてF-Al結合を選択的に抽出する<sup>19</sup>F{<sup>27</sup>Al}TRAPDOR法、P-F 結合を選択的に抽出する<sup>31</sup>P{<sup>19</sup>F}CPMAS法の測定技術を確立した。そのうえで、これらの手 法により、合成試料中の微量Fの化学形態解析を行った。

【実験】NMRスペクトル測定は、JEOL-ECA700(16.4*T*)において、<sup>27</sup>Al-<sup>19</sup>F二重共鳴プローブ (3.2mm) および<sup>31</sup>P-<sup>19</sup>F二重共鳴プローブ(4mm)を用いて行った。

キーワード:びりょうふっそ、とらっぷどーる、ふっそれす 〇たかはしたかふみ、かねはしこうじ、ねもとたかひろ <sup>19</sup>F-MAS NMR測定は、回転速度20kHz、18°パルス ( $0.7\mu$ s)、繰り返し5sにより行った。 <sup>19</sup>F{<sup>27</sup>Al}TRAPDORスペクトル[1]測定は、<sup>27</sup>Al-<sup>19</sup>F二 重共鳴プローブにより、Fig.1に示すパルスシーケ ンスを用いて、回転周波数18kHz、t<sub>1</sub>を回転同期に して行った。<sup>31</sup>P{<sup>19</sup>F}CPMAS測定は、回転速度10kHz、 contact time 0.2msにて行った。



**Fig.1** <sup>19</sup>F $\{^{27}$ Al $\}$  TRAPDOR pulse sequence. The time  $t_1$  is rotor-synchronized.  $v_R$  indicates spinning frequency.

【結果および考察】Fig.2に、プローブ改良前後で測定したフッ素バックグラウンドの比較を 示す。フッ素系材料をモジュール周辺から排除したことによって、大幅なバックグラウンド 削減効果が得られていることが分かる。長期積算によって化学シフト200ppm付近に現れるバ ックグラウンドは、回転を検出するための光ファイバーケーブルに由来するものと考えられ る。次に、Ca(OH)<sub>2</sub>-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-SiO<sub>2</sub>をマトリックスとしてCaF<sub>2</sub>-Na<sub>3</sub>AlF<sub>6</sub>-Ca<sub>5</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>F(FAP=fluorapatite) を混合した試料について、<sup>19</sup>F{<sup>27</sup>Al}TRAPDORスペクトルの測定を行った。その結果、Fig.3 に示すように、Al-F結合を有するNa;AlF6のみが選択的に強調されたスペクトルが確かに得ら れた。更に、今回開発したFレスプローブを用いて、合成試料(F濃度0.7mass%)のFスペクトル 測定を行った。その結果、こうした1mass%未満の微量Fについても、depthパルス[2]を適用 せずに、良好な<sup>19</sup>F-NMRスペクトルが得られた。このスペクトルより、合成試料中Fの化学形 態として、フルオロアパタイト (FAP) の存在が示唆されたため、<sup>31</sup>P-MASスペクトル測定を 行った。しかしながら、<sup>31</sup>P-MASスペクトルは線幅も広く、化学シフトからFAPを特定するこ とは出来なかった。そこで、FAPにおいてはフッ素原子とリン原子が近距離に存在すること に着目し、<sup>31</sup>P{<sup>19</sup>F}CPMASスペクトルを測定した。その結果、FAPの化学シフトと一致するピ ークが観測され、<sup>19</sup>F-NMRスペクトルから推定したように、合成試料中にFAPが存在すること が証明された。



**Fig.2.** Comparison of fluorine background signal before and after improvement of a NMR probe.



**Fig.3.** Plots of <sup>19</sup>F-MAS and <sup>19</sup>F {<sup>27</sup>Al} TRAPDOR spectra. The symbol \* indicates spinning side bands.

【結言】微量Fの分析に向けて、Fバックグラウンドの削減、測定技術の高度化を実施した。 これらの技術を用いた多面的な解析により、Fの化学形態が詳細に解析出来ると考えられる。

【引用文献】<sup>1</sup>Cory&Ritchey, J.Magn.Reson. (1988) 80 128, <sup>2</sup>Grey&Vega, J. Am.Chem. Soc. (1995) 117 8232

### LEDパッケージの劣化に関するマイクロプローブを 用いた固体NMR構造解析

○石田宏之<sup>1</sup>,三好理子<sup>1</sup>,三輪優子<sup>1</sup>,樋岡克哉<sup>2</sup>,朝倉哲郎<sup>3</sup> <sup>1</sup>(㈱東レリサーチセンター、<sup>2</sup>日本電子(㈱、<sup>3</sup>農工大院

# Structural Analysis of LED Package by Solid-State NMR Using Micro probe

OHiroyuki Ishida<sup>1</sup>, Riko Miyoshi<sup>1</sup>, Yuko Miwa<sup>1</sup>, Katsuya Hioka<sup>2</sup>, and Tetsuo Asakura<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Toray Research Center, Inc., Shiga, Japan.

<sup>2</sup> JEOL Ltd., Tokyo, Japan.

<sup>3</sup> Department of Biotechnology, Tokyo University of Agriculture and Technology, Tokyo, Japan.

It has been very difficult to analyze the materials in electronics field by solid-state NMR because of the lack of sample volume. Recently, micro probe makes it possible to observe a small amount of samples. As a result of the analyses for the LED encapsulation resin or LED phosphor, some cross-linking structures were made in degraded LED encapsulation resin, and it was supposed change of valence state of Ce in degraded LED phosphor. Furthermore, oxidation or defection of Ce from the crystalline was suggested in degraded LED phosphor.

【緒言】 近年、市場拡大の著しい自 色LEDにおいて重要な課題は、信頼 性の問題である。信頼性には、一つ 一つの白色LEDの耐久性と、多数の 白色LEDが使用されるために生じ る輝度のばらつきが含まれる。白色 LEDの耐久性、すなわち劣化に関し ては、光束の経時劣化、最終的にチ ップの経時劣化が起こると言われ ているが、実際には、これらの劣化 要因が複雑に混ざっており、劣化モ



Fig. 1 Photographs of microprobe and sample tube.

ードの解析を非常に困難なものにしている。

従来、固体NMRの測定には試料量が数百~数十mg程度必要であったことから、このような試料量の少ないものの分析は不可能であった。しかしながら、マイクロプロ ーブの開発により、0.5~1mg程度でも測定可能となり、LED中の樹脂や蛍光体など の微量試料のものも分析することができるようになった。ここでは、白色LDEの封止 樹脂や蛍光体などについて過電圧劣化試験を行った結果に関して報告する。

LED封止樹脂, LED蛍光体, マイクロプローブ

○いしだひろゆき,みよしりこ,みわゆうこ,ひおかかつや,あさくらてつろう

【実験】 市販の白色 LED について 9V での過電圧劣化試験を行い、通電前試料と 通電試験により全く輝かなくなった劣化試料を測定に供した。9V で通電した場合、 すぐに輝かなくなるものや長時間継続して輝くものなど、かなりのばらつきがあった。

固体 NMR 測定は、Bruker 社製 Avance400 に JEOL 社製マイクロプローブ(Fig.1) を装着して行った。マイクロプローブ用サンプル管(ジルコニア製 内径:0.5mm、 外径:1mm、長さ:7.4mm、試料容積:0.8µL)は、Fig.1 の写真のように、ほぼ、 米粒と同程度の大きさである。このマイクロプローブで測定可能な核種は<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>27</sup>Al, <sup>79</sup>Br などである。

【結果と考察】 Fig.2 に、LED の劣 化前後の封止樹脂について測定した <sup>13</sup>C DD/MAS スペクトルを示した。 1ppm にメチル基由来、134~128ppm にフェニル基由来と推定されるピーク が観測されていることから、この樹脂 は、メチルシリコーンとフェニルシリ コーンの共重合あるいは混合物である ことが推定された。ピーク面積比より、 メチルシリコーンとフェニルシリコー ンのモル比は約 70/30 と見積もられた。

劣化試料のスペクトルでは、10ppm 近傍に小さなピークが観測されている。 このピークはコンタクトタイムを短く して測定した<sup>13</sup>C CP/MAS スペクトル で、より大きな強度を示したことから、 架橋由来のピークであることが示唆さ れた。さらに、固体<sup>1</sup>H NMR 測定を行 った結果、この試料中にビニルシロキ サンが重合されていることが分かった。 これらの結果より、架橋構造としては –SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si–構造などが推定される。

**Fig.3** に、**LED** の劣化前後の蛍光体 および YAG 結晶 (Y<sub>3</sub>Al<sub>5</sub>O<sub>12</sub>) について 測定した <sup>27</sup>Al MAS スペクトルを示し



Fig.2 <sup>13</sup>C DD/MAS spectra of encapsulation resin in LED (a) before degradation and (b) after degradation.



Fig.3 <sup>27</sup>Al MAS spectra of phosphor in LED (a) before, or (b) after degradation, and (c) YAG.

た。約 0ppm に 6 配位 Al 由来、約 50~70ppm に 4 配位 Al 由来のピークが観測され ている。劣化試料においては、通電前試料や YAG 結晶に比べて、6 配位 Al 由来のピ ークがややブロードなこと、スピニングサイドバンド(図中\*印)の強度が大きいこ とから、通電時の熱や光などにより、YAG の結晶構造の対称性の低下や、YAG にド ープされた Ce の欠損や酸化状態の変化、価数変化などが起きていることが推測され る。

【謝辞】 本研究の一部は、科学技術振興機構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】(平成20-22年度)により実施されたものである。 ○吉水 広明<sup>1</sup>, 岡澤 誠裕<sup>1</sup>, 奥村 祐生<sup>1</sup>, 傘 俊人<sup>1</sup>
 <sup>1</sup>名工大・院工

### Characterizations of the Oriented Materials by NMR Techniques

•Hiroaki Yoshimizu<sup>1</sup>, Masahiro Okazawa<sup>1</sup>, Yuki Okumura<sup>1</sup>, Toshihito Karakasa<sup>1</sup> <sup>1</sup>Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology, Nagoya, Japan.

It was already confirmed that the layered structure of the liquid crystalline aromatic polyester with n-alkyl (C14) side chain (B-C14) could be easily oriented by magnetic field. In this study, the magnetically oriented layered structure of B-C14 was characterized by <sup>13</sup>C CP/static NMR. The sample of B-C14 which was prepared by quenching to room temperature (RT) from 160 °C in the isotropic liquid state was used as non-oriented and starting samples for the magnetic orientation under magnetic field of 9.4 T. As a result, the best temperature condition was determined 130 °C on heating from room temperature, and 70 °C on cooling from 160 °C. Furthermore, to clarify the gas transport properties of polymeric crystalline structure, poly(4-methyl-1-pentene) (PMP) membranes were drawn and investigated the oriented structure.

【緒言】我々はいくつかの高分子化合物における結晶など高秩序化された構造相の特 徴を活かし,気体分離特性などの物性が大幅に向上する可能性について検討している. この目的に対し,結晶相等を高度に一方向へ配向させることはきわめて有効であると 考える.そして,分子配向構造の評価に各種NMR法を駆使して,精密かつ正確な種々 の構造情報を獲得することもまた重要な研究課題である.本発表では,固体<sup>13</sup>C NMR 法を用いた配向試料の直接評価に加え,気体の拡散挙動評価を通じて間接的な配向構 造評価について報告する.具体的には,1,4-ジアルキルエステルと4,4-ビフェノール からなりサーモトロピック液晶性を示す,アルキル側鎖を有する全芳香族ポリエスル (B-C14;側鎖アルキル側鎖の炭素数は14)が形成する,1分子レベルで交互に配列した 層状構造を磁場配向させた場合や、半結晶性高分子であるポリ4-メチル-1-ペンテン (PMP)を延伸配向させた場合について,典型的無配向(ランダムコイル)高分子の諸デ ータとも比較しながら,各種NMR法の有用性について言及する.なお,本稿では主 にB-C14の結果について述べる.

[実験] B-C14の合成は既報に従った.磁場無印加の環境下で等方性液体状態である 温度(160 ℃)で5分以上静置した後,室温まで急冷したものを無配向試料とし,これを 9.4 Tの超電導磁石内で,所定温度まで昇温し15分間保持した後に室温まで冷却した 場合(昇温過程)と,160 ℃で5分保持した後に所定温度まで冷却して15分間保持してか ら室温に下げた場合(降温過程)の,二通りの方法で磁場配向させた.PMPサンプルは 三井化学(株)より供与された様々な延伸倍率のPMP膜を用いた.これらの試料の固体 <sup>13</sup>C NMR CP/static並びに各種気体の収着状態におけるPFG NMR測定を行った.

磁場配向,気体のNMR,気体拡散係数

oよしみず ひろあき, おかざわ まさひろ, おくむら ゆうき, からかさ としひと

[結果と考察] Figure 1 に一例とし て、9.4Tの超伝導磁石内で室温から 図中に示した温度まで昇温させたの ち、再び室温まで徐冷した各サンプ ルの固体<sup>13</sup>C NMR 測定結果を示す. 左側のスペクトルはサンプル調製時 に印加した磁場方向を分光計の静磁 場(B<sub>0</sub>)方向と一致させて設置し得た ものであり,右側のものは Boとは垂 直な方向を軸に 90°回転させて得 たものである.最下段に比較のため に示した無配向試料(磁場無印加で 調製)のスペクトルは典型的な粉末 スペクトル線形である.これに対し, 磁場配向試料の配向方向を Bo と平 行において観測したスペクトルでは, 特に 150 ppm 付近にシャープなピ ークが観察され,これは配向方向を 静磁場方向と垂直において観測した



Fig. 1 <sup>13</sup>C CP/static NMR spectra of B-C14 at room temperature; (left) c axis is parallel to B<sub>0</sub> (right) c axis is perpendicular to B<sub>0</sub>.

スペクトルとの比較並びに主鎖芳香族炭素の化学シフト異方性を考慮すると層状構 造の c 軸が静磁場方向に配向していると解釈できる.また,このピークの強度や線幅 が配向温度により異なることが確認されたので,強度比と線幅を配向度の指標とした. 磁場印加時の温度条件は昇温過程では 130 °C,降温過程では 70 °Cのとき最も配向す ることが確認された.昇温過程では 130 °C付近で持つ分子の運動性が最も磁場配向に 適しているためだと考えられ,降温過程では運動性のとても高い等方性液体状態から 徐々に運動性を失いつつ配向をしていくため,より低い温度で最も配向したと考えら れた.なお,これらの解釈は X 線回折データと全く矛盾ないが,NMR データをよく 見ると,30 ppm 付近に観測されている側鎖アリファティック炭素由来のピーク線形 も  $B_0$ 方向依存性を示しており,標準的な X 線回折実験では得難い情報が含まれてい る点は,NMR 法の有用性を示す点として強調される.

一方, B-C14の配向方向と各種気体の拡散異方性も一致しており,これらは従来 法として実施した気体収着実験で得た収着量の経時変化データを,平膜を仮定した解 析から得られる気体拡散係数値が,配向試料と無配向試料で異なることからも証明さ れる.但し,拡散異方性を確実に実験証明するには,サンプル形状を平膜とした上で 膜面に対し配向方向が平行なものと垂直なものの二種類を用意する必要があるが, PFG NMR 法では一つの配向試料を測定時に B0 に対して平行方向もしくは垂直方向 に設置して測定するだけで良く,この点もまた NMR 法の有用性といえる.

PMP サンプルについての結果は当日説明する.

### 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<sup>12</sup>,上平(石島) 美弥<sup>2</sup>,杉本 収<sup>2</sup>,丹治 健一<sup>2</sup>,
 中村 浩蔵<sup>3</sup>,石井 剛志<sup>2</sup>,熊澤 茂則<sup>2</sup>,加藤 晃一<sup>1</sup>,
 内藤 晶<sup>4</sup>,中山 勉<sup>2</sup>
 <sup>1</sup>自然科学研究機構・岡崎統合バイオサイエンスセンター,
 <sup>2</sup>静岡県大院・生活健,<sup>3</sup>信州大・農,<sup>4</sup>横浜国大院・工

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

○Yoshinori Uekusa<sup>1,2</sup>, Miya Kamihira-Ishijima<sup>2</sup>, Osamu Sugimoto<sup>2</sup>, Ken-ichi Tanji<sup>2</sup>, Kozo Nakamura<sup>3</sup>, Takeshi Ishii<sup>2</sup>, Shigenori Kumazawa<sup>2</sup>, Koichi Kato<sup>1</sup>, Akira Naito<sup>3</sup>, and Tsutomu Nakayama<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Okazaki Institute for Integrative Bioscience, National Institutes of Natural Sciences

<sup>2</sup>Department of Food and Nutritional Sciences, University of Shizuoka

<sup>3</sup>Department of Bioscience and Biotechnology, Shinshu University

<sup>4</sup>Graduate 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  $\gamma$  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 <sup>31</sup>P–<sup>13</sup>C 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– $\pi$  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、<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H 同種核及び<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>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  $\gamma$  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<sup>31</sup>P-<sup>13</sup>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、 $ECg \in D_2O$  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<sup>13</sup>C ラベルした [<sup>13</sup>C]-ECg は化学 合成することにより得た。この [<sup>13</sup>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<sup>13</sup>C-<sup>31</sup>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<sup>-10</sup> [m<sup>2</sup>/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、[<sup>13</sup>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<sup>13</sup>C-<sup>31</sup>P原子間距離を<sup>13</sup>C-<sup>31</sup>P REDOR 実験により測定したところ、この原子間距離は 5.3 ± 0.1 Å 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  $\pi$  電子とカチオン- $\pi$  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  $\pi$ - $\pi$  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  $\pi$ - $\pi$  相互作用がリン脂質分子との間で働くカチオン- $\pi$  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.

### **P102** 不飽和脂質を含有するバイセルに関する 固体NMRを用いた研究

上釜 奈緒子<sup>1</sup>、辻 暁<sup>2</sup>、○西村 勝之<sup>1</sup> <sup>1</sup>分子科学研究所,<sup>2</sup>兵庫県立大学

### Magnetic Alignment of Bicelle Composed of Un-, and Saturated Phosphatidylcholine as Studied by Solid State NMR Spectroscopy

Naoko Uekama<sup>1</sup>, Satoru Tuzi<sup>2</sup>, and o Katsuyuki Nishimura<sup>1</sup> <sup>1</sup>Institute for Molecular Science, <sup>2</sup>University of Hyogo

We have reported the development of new bicelle composed of un-, and saturated lipids together with phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>) 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 (DMPC) 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 bicelle<sup>1)</sup>. 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 (PIP<sub>2</sub>) 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 PIP<sub>2</sub>/POPC/DMPC/DHPC-bicelle, and SAPC/POPC/DMPC/DHPC-bicelle were prepared with q value of 3.0. Orientational properties of those bicelles were compared based on <sup>31</sup>P-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)  $PIP_2$ , and (e) SAPC used in this study.

Fig. 2 <sup>31</sup>P-NMR spectra of (a) PIP<sub>2</sub>/POPC/DMPC/ DHPC-bicelle, (b) POPC/DMPC/DHPC-bicelle (c) SAPC/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 <sup>31</sup>P-NMR spectra for (a) PIP<sub>2</sub>/POPC/DMPC/ DHPC-bicelle, (b) POPC/DMPC/ DHPC-bicelle, and (c) SAPC 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  $\delta_{\perp}$ edge of axially symmetric powder pattern of <sup>31</sup>P chemical shift anisotropy from multi lamella vesicles (MLVs). As shown in Figure 2 (a), PIP<sub>2</sub>/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,  $\delta_{\perp}$ edge of axially symmetric powder pattern of <sup>31</sup>P chemical shift anisotropy from MLVs was appeared. Furthermore, magnetic alignment of SAPC/POPC/DMPC/DHPC–bicelle was lower than those of other bicelles. Thus we concluded that polar head region of PIP<sub>2</sub> 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<sub>1</sub><sup>+</sup>, B<sub>1</sub><sup>-</sup>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 〇渡邉英宏,高屋展宏,三森文行 独立行政法人

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

OHidehiro 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  $M_0^{\text{MASE}}$  map was obtained, in which signal intensity was expressed as the product of  $B_1^-$  and  $M_0(1-e^{-\text{TR/T}})$ . The ratio of this  $M_0^{\text{MASE}}$  map to the  $B_1^+$  map showed a similar spatial pattern in different human brains. These ratios of  $M_0^{\text{MASE}}$  to  $B_1^+$  in 24 subjects were averaged and then fitted to obtain a universal ratio map of  $B_1^-/B_1^+$  ( $\rho$ ). Uniform image intensity was achieved by using both the measured  $B_1^+$  and calculated  $B_1^-$  from the  $\rho$  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  $B_1^+ \ge B_1^{-*}$ 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、 $S = M_0^{\text{MASE}} \exp(-\text{TE}/T_2)$ によるフ ィッティングを行い  $M_0^{\text{MASE}}$ 画像を算出した。この画像強度は  $B_1$  と  $M_0(1-\exp(-\text{TR}/T_1))$ 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  $M_0^{\text{MASE}}$ 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  $\rho$  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  $\rho$  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  $\rho$  を算出した。次に、 $B_1^+$ 分布と、 $\rho B_1^+$ 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*<sub>1</sub><sup>+</sup>、*B*<sub>1</sub>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  $B_1^+$ ,  $M_0^{\text{MASE}}$  and  $M_0^{\text{MASE}}/B_1^+$  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  $M_0^{\text{MASE}}$  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  $M_0^{\text{MASE}}$  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<sup>1</sup>,新田尚隆<sup>2</sup>,本間一弘<sup>2</sup> <sup>1</sup>産業技術総合研究所 光技術研究部門 <sup>2</sup>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**

OTakuya Ogura<sup>1</sup>, Naotaka Nitta<sup>2</sup> and Kazuhiro Homma<sup>2</sup> <sup>1</sup>Photonics Research Institute, AIST, Tsukuba, Japan. <sup>2</sup>Human 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 Erastgraphy 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、にったなおたか、ほんまかずひろ

-397-

### <sup>1</sup>H-NMRメタボロミクスの医療応用 ーその3 ーバイオフルイドにおけるマーカー定量

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

### Clinical application of <sup>1</sup>H NMR metabolomics-3. Marker quantification in bio-fluid

Itiro Ando<sup>1,</sup>, Takuo Hirose<sup>1</sup>, Kazuhisa Takeuchi <sup>1,2</sup>, Yutaka Imai<sup>1,</sup> Hiroshi Sato<sup>1</sup>, <sup>O</sup>Masako Fujiwara<sup>1</sup> <sup>1</sup> Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University, Sendai, Japan, <sup>2</sup>CKD Center, Koujinkai Central Hemodialysis Clinic, Sendai, Japan

Quantitative analysis of metabolites is important in <sup>1</sup>H 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 <sup>1</sup>H 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。<sup>1</sup>H 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ルイドは血液(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ルイドでは一般に TSP または DSS (sodium 2,2 dimethyl -2-silapentane-5-sulfonate-*d*<sub>6</sub>) 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<sup>1</sup>H NMR のスペクトル

キーワード:メタボロミクス、バイオフルイド、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 1 D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 <sup>1</sup>H-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

〇佐々木宏和<sup>1,2</sup>、玉田努<sup>3</sup>、坪井裕理<sup>2</sup>、近山英輔<sup>1,2</sup>、菊地淳<sup>1,2,4,5</sup> <sup>1</sup>横市院・生命、<sup>2</sup>理研・PSC、<sup>3</sup>理研・ASI、<sup>4</sup>名大院・生命農、<sup>5</sup>理研・BMEP

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

○Hirokazu Sasaki<sup>1,2</sup>, Tsutomu Tsuchida<sup>3</sup>, Yuuri Tsuboi<sup>3</sup>,
 Eisuke Chikayama<sup>1,2</sup>, Jun Kikuchi<sup>1,2,4,5</sup>
 <sup>1</sup>Grad. Sch. NanobioSci., Yokohama City Univ.; <sup>2</sup>RIKEN PSC;
 <sup>3</sup>RIKEN ASI; <sup>4</sup>Grad. Sch. Bioagr. Sci., Nagoya Univ.; <sup>5</sup>RIKEN 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 metabonomic 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



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

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<sup>1)</sup>。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,つぼいゆうり,ちかやまえいすけ,きくちじゅん

【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Acyrthosiphon 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、<sup>'</sup>H-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、粉砕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<sup>2)</sup>で 検出した。

### 【結果と考察】

まず植物につい て<sup>I</sup>H-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<sup>H</sup>--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<sup>3)</sup>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<sup>4)</sup>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T2緩和速度

○高屋 展宏、渡邉 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 ( $f_M = 1$  – 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 $R_2 = \alpha$  [Fe]+ $\beta$   $f_{agarose} + \gamma$  (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<sub>gelatin</sub>)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<sub>2</sub>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N MR装置を用いた。シークエンスの条件は 90°,180° パルスに 270 µ s, 540 µ 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<sub>2</sub>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<sub>2</sub>をR<sub>2</sub>=  $\alpha$  [Fe]+ $\beta$  f<sub>gelatin</sub>+ $\gamma$  (f<sub>gelatin</sub>: ゼラチン分画)の式で重回帰分析を行った。この際、 $\gamma$ 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<sub>2</sub>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 $\alpha$ 、ゼラチンの寄与する項の係数 $\beta$ ともにB<sub>0</sub>とともに増大した(表1)。高分子量分画f<sub>M</sub>に相当する項の係数 $\beta$ の磁場依存性つい 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<sub>0</sub>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<sub>0</sub>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<sub>0</sub>に依存しない部分は古典的双極子相互作用、 B<sub>0</sub>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ると、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  $\alpha$ 、 $\beta$ 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
$\alpha$ [Fe]	$0.27 \pm 0.0062$	$0.52 \pm 0.012$	$0.98 \pm 0.036$	$1.4 \pm 0.062$
β[Gel]	$8.37 \pm 0.888$	$26.3 \pm 1.75$	$74.7 \pm 5.08$	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  $\alpha$  and  $\beta$  obtained with a multiple regression analysis for the observed R<sub>2</sub> values in gelatin gels doped with vearious amounts of ferritin at four B<sub>0</sub> strengths.  $\gamma$  was from a buffer solution containing no ferritin nor gelatin.



93.7

Fig.1  $B_0$  dependence of coefficient  $\beta$  in two model systems of gelatin gel and agarose.

Table2. Comparison of  $\beta$  values in vivo, in gelatin, and in agarose gels at 4.7T.

【参考文献】

agarose

0.24

[1] F. Mitsumori, H. Watanabe, N. Takaya, Magn. Reson. Med., Vol.62, 1326-1330 (2009).

[2] 高屋展宏、渡邉英宏、三森文行 第48回 NMR 討論会講演要旨集,p374(2009)

0.43

#### **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 〇 葭田 征司<sup>1</sup>、伊達 康博<sup>14</sup>、守屋 繁春<sup>123</sup>、菊地 淳<sup>1245</sup>

1橫市院生命、<sup>2</sup>理研BMEP、<sup>3</sup>理研ASI、<sup>4</sup>理研PSC、<sup>5</sup>名大院生命農

# Investigation of metabolic profiling methods for aquatic organism from Keihin region

○Seiji Yoshida<sup>1</sup>, Yasuhiro Date<sup>1,4</sup>, Shigeharu Moriya<sup>1,2,3</sup>, Jun kikuchi<sup>1,2,4,5</sup> <sup>1</sup>Grad. Sch. NanoBioSci., Yokohama City Univ.; <sup>2</sup>RIKEN BMEP; <sup>3</sup>RIKEN ASI; <sup>4</sup>RIKEN PSC; <sup>5</sup>Grad. 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 <sup>1</sup>H-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<sup>1)</sup>。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<sup>2)</sup>。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 変動すると考え、餌と海水を制御可 能な人工環境、制御できない自然環





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 り粉砕後、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<sup>1</sup>H-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、フリーソフトウエア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[□]それぞれの内蔵部および筋肉部を<sup>1</sup>H-NMR で計測し、PCA 解析を行った (Fig.2)。内蔵部の 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、 マハゼの内蔵部および筋 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 〇小林直宏<sup>1</sup>、原野陽子<sup>1</sup>、池上貴久<sup>1</sup>、児嶋長次郎<sup>1</sup>、佐藤純子<sup>1</sup>、 中村春木<sup>1</sup>、阿久津秀雄<sup>1</sup>、藤原敏道<sup>1</sup>

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.

ONaohiro Kobayashi<sup>1</sup>, Yoko Harano<sup>1</sup>, Takahisa Ikegami<sup>1</sup>, Chojiro Kojima<sup>1</sup>, Junko Sato<sup>1</sup>, Haruki Nakamura<sup>1</sup>, Hideo Akutsu<sup>1</sup> and Toshimichi Fujiwara<sup>1</sup> *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 (Magnetic Resonace Ontology)" system. Using the core program, we have developed a GUI based analysis tool with the spectrum viewer, Sparky, for NMR data analaysis 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、よりシステマ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 (Magnetic Resonace Ontology) 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 オーマット、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するなどの方法により将来的な研究者コミュ ニティーによる更新、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となる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エ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

### 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<sup>1</sup>,小橋川敬博<sup>1</sup>,齊尾智英<sup>2</sup>,稲垣冬彦<sup>1</sup> <sup>1</sup>北大先端生命 <sup>2</sup>北大生命科学

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

OMasashi Yokochi<sup>1</sup>, Yoshihiro Kobashigawa<sup>1</sup>, Tomohide Saio<sup>2</sup>, Fuyuhiko Inagaki<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Faculty of Advanced Life Science, Hokkaido University

<sup>2</sup> 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 プロトコー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1 0~20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)



連鎖スコア値 (対数) スペクトル相関係数

参照スペクトル 帰居候補スペクトル(参照スペクトルに近い位置にあるほど連鎖スコア値が大)

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系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<sup>1,2</sup>、尾形善之<sup>1</sup>、森岡祐介<sup>2</sup>、菊地淳<sup>1,2,3</sup> <sup>1</sup>理研PSC、<sup>2</sup>横浜市大院生命ナノ、<sup>3</sup>名大院生命農

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

Eisuke Chikayama<sup>1,2</sup>, Yoshiyuki Ogata<sup>1</sup>, Yusuke Morioka<sup>2</sup>, Jun Kikuchi<sup>1,2,3</sup> <sup>1</sup>RIKEN PSC, <sup>2</sup>Graduate School of Bionano., Yokohama City University, <sup>3</sup>Graduate 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 ベ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合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<sup>1,2</sup>、小林直宏<sup>2</sup>、原野陽子<sup>2</sup>、松浦孝則<sup>2</sup>、阿久津秀雄<sup>2</sup>、 中村春木<sup>2</sup>、藤原敏道<sup>1</sup> <sup>1</sup>科学技術振興機構-BIRD、<sup>2</sup>阪大蛋白研

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

○Eiichi Nakatani<sup>1,2</sup>, Naohiro Kobayashi<sup>2</sup>, Yoko Harano<sup>2</sup>, Takanori Matsuura<sup>2</sup>, Hideo Akutsu<sup>2</sup>, Haruki Nakamura<sup>2</sup>, Toshimichi Fujiwara<sup>2</sup> <sup>1</sup>JST-Institute for Bioinformatics Research and Development <sup>2</sup>Institute 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。

- データ登録ウェブサイト(ADIT-NMR; http://nmradit.protein.osaka-u.ac.jp/bmrb-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、こばやしなおひろ、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 登録データ入力のページを区別する。 先ず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。

p 1: Select a file to aproad:		- 全核
j 2: Select the type of (Auta in this 6) (constants 0) (order 1708 format or (A Consultante upload is required. *) (antibility (A Constantia upload is required. *) NMU, that file (Constantsey < <=noth (Assigned characteristic) the structure of a (Assigned characteristic) the structure of a (antibility of the structure of a (antip Solid) in the interface. Once your solars Solid) in the interface. Once you	le: nmCIP format) ) up selected>>) <u>(Com</u> 1. * (Additional types non-standard residue standable by the ADI have passed the up to	ert data files to NMR-STAR), of NMR data are optional.) ) or ligand, JoNR software, it will be used discrete and begin editing this
will be possible to return to this screen the fields within the interface from thos on b. Chaose file accention:	to upload more files, a files.)	but it will not be possible to as
will be possible to return to this science, the fields within the interface from too pp 3: Choose the operation: Up(back) The fiels not nearly second on the server and this is pressed. (For large coordinate files, upload can sometimes take a minute or Proc.)	to upload more files, a files.) (Check ordy: Dow not area the file.)	but it will not be possible to an <u>(Vetetra Constants)</u> (Check early: Doos of the provide the file.) (To hape any factor file.) files, velidation can scontinue take a minute or two.)

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://bmrb.protein.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。

Contrainates versus Assigner Chiefmen	a annov vinecker
Constants file (2008 or ann/CDF facture):	
You may lest up to 5 Assequed chemical shift lifes against the ee	ordanate file at once with this
Assignal Chemine shift ite 1 (NMR, the 8 x (recent)	75
Assigned Chemical shift for L (NAR, der Richerent) Assigned Chemical shift for J (NAR), der Schemiste	76 76
Assigned Chemised Mellifiel (NMR, die Statienen) Assigned Chemised Mittalie & COMS, die Statiemanij Andersed Chemised Mittalie & COMA-res: Astronauti	10 66 76
Anagoni Chemen (Millike LONOR) die Solimenti Anagoni Chemeni (Millike ZONOR) der Solimentij Anagoni Chemeni (Millike ZONOR) von Solimentij Anagoni Chemeni (Millike ZONOR) von Zohemeni	

Fig 2. Web checker for nomenclature consistency between PDB and Chemical Shifts http://nmradit.protein.osaka-u.ac.jp/cgi-bin/bmrb-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。 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<sup>1</sup>、野田 泰斗<sup>2</sup>、竹腰清乃理<sup>2</sup> (<sup>1</sup>日本電子(株),<sup>2</sup>京大院・理)

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

○Takashi Mizuno<sup>1</sup>, Yasuto Noda<sup>2</sup>, K. Takegoshi<sup>2</sup> (<sup>1</sup>JEOL ltd., <sup>2</sup>Grad 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 <sup>6</sup>Li at 7 Tesla. <sup>6</sup>Li (I=1)has good property of resolution due to small quadrupolar coupling but is hard to be observed in a sence of sensitivity because of low gyromagnetic ratio (1/6.5 of that of <sup>1</sup>H) and low natural-abundance(7.6%), which should be overcome by our "cryocoil MAS". In the context, we show the <sup>6</sup>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<sup>6</sup>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。<sup>6</sup>Li NMR 測定の共鳴周波数は 44.3492 MHz(0.0ppm, LiCl 1M 水溶液基準)。varian 社製の 5 $\phi$  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<sub>2</sub> の <sup>6</sup>Li95% 標識試料 60mg。

■結果・考察 <sup>6</sup>Li MAS NMR の1次元ス ペクトルで比較すると、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

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



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

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<sup>6</sup>Li-<sup>6</sup>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 <sup>6</sup>Li MAS-NMR by the cryocoil MAS probe. (a) Comparison of S/N w/ or w/o cryo-operating by the prototype-2nd. <sup>6</sup>Li MAS-NMR by Hahn-echo. Sample: 95% Labeled <sup>6</sup>LiCoO<sub>2</sub>. Spinning speed= 5 kHz. Bottom: Coil temperature=298 K, Amp. temperature =298K, 90° pulse width=10.0 $\mu$ s (input 157 W). Top: Coil temperature=17 K, Amp. temperature =47 K, 90° pulse width=5.0 $\mu$ s (input 157 W). (b) <sup>6</sup>Li-<sup>6</sup>Li 2D exchange NMR with cryo-operating by the prototype-2nd. 16 scans with each 256 t1 points (sampling time of 333  $\mu$ s) 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 〇三浦亨、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

OToru 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に多くの物質に対して迅速に精確な定量値 が得られる分析法として期待されている<sup>1)</sup>。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<sup>2)</sup>。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- $d_4$ 、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、クロルフェナピル (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- $d_3$ (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

Table 1. Optimized NMR measurement and process parameter sets.

Measurement conditions	
nudeus	<sup>1</sup> H(3987822 MHz)
aperciral width	8990.423 Hz(100 ppm)
acquiaition time	4 s
number of translants	0
pulse width	10 us
de couple	<sup>10</sup> C (acquisition period , MPF6
relaxatium delay	8 00
temperature	25 °C

Process conditions		
window function	Tic	
phase correction	manual	
base line isometican	on	
integration	30 Hz outside of <sup>12</sup> 0 satelite	

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 RESERCH) で解析し、Figure 1に示すスペクトルを得た。最適化した

キーワード:定量NMR、解析条件、妥当性確認

著者ふりがな:〇みうらとおる、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、



Figure 1.<sup>1</sup>H 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.

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。

【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㈱の有福和紀氏、末松孝子博士、和光純薬工業㈱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 48<sup>th</sup> Annual Meeting of the NMR Society Japan (2009).

### 体内に飲み込まれた物質の NQR による検知

〇山根千英,中原優,篠原淳一郎,赤羽英夫,糸﨑秀夫 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(200g)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)<sup>1</sup>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 〇赤羽英夫, Bryn Baritompa, 篠原淳一郎, 糸﨑秀夫 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

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

We are developing a small NQR  $\cdot$  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 <sup>14</sup>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 <sup>4</sup>N nuclei using an air compressor and solenoid valves. A single-shot NQR signal from diethylamine hydrochloride was observed.

### <u>はじめに</u>

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 周波数探查, 装置開発

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

#### <u>システムの概要</u>

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)、エアー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



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

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)を用い、制御ソフトの 開発には LabVIEW を用いた。

### 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<sup>14</sup>N NQR 縦緩和時間 が共に長い(T1≧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(~2g) 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



モア周波数が、窒素原子核の NQR 周波数を通過 <sup>14</sup>N NQR spectrum from diethylamine する時に最大となる。NQR 測定は、低磁場下で hydrochloride (2 g).

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、ノイズでは無 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<sup>14</sup>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査において有効であると示唆された。 参考文献

- 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).

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

OMami 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 <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>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. <sup>13</sup>C NMR spectrum of this compound observed at 30°C showed two sets of resonances from pyrrolidine-ring carbons which are cisoide and transoide 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, <sup>1</sup>HNMR, <sup>13</sup>CNMR, 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<sup>1</sup>HNMR, <sup>13</sup>CNMR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<sup>1)</sup>。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、<sup>13</sup>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<sup>2)</sup>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℃、50℃、70℃で測定した <sup>13</sup>CNMR スペクトルを示した。30℃で観測 された二組のピークが、70℃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℃と 70℃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 <sup>13</sup>C NMR spectra of the compound, S51972, and its expansion in DMSO- $d_6$  solution.



Fig.3 <sup>13</sup>C NMR spectra of the compound, S51972, obtained at 1)  $30^{\circ}$ C, 2)  $50^{\circ}$ C and 3)  $70^{\circ}$ 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、糸﨑秀夫 大阪大学大学院基礎工学研究科

### Automatic scanning for NQR frequencies

OJunichiro 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 <sup>14</sup>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。



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

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 C1、C2 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、C1 と C2 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。



Frequency:1.036MHz

(c) Matching and tuning algorithm

Fig.3 Matching and tuning mechanism. (a) Equivalent circuit of resonator. (b) RF field intensity for a fixed frequency calculated as a function of C1 and C2. The maximum intensity is possible to obtain by selecting C1 and C2. (c) Matching and tuning algorithm to search maximum RF field intensity by adjusting C1 and C2 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 共鳴周波数自動探查手法

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 共鳴周波数探査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。その後の周波数探査の工程は、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 共鳴周波数探査実験

NQR 共鳴周波数自動探査を、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<sup>[1]</sup>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 ッピング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 波数を探査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 共鳴周波数探査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.

-432-

### キーワード索引 (数字・アルファベット)

<sup>1</sup> H MAS NMR ·····P88
<sup>1</sup> H- <sup>27</sup> Al FSLG HETCOR ······L29
<sup>13</sup> C, <sup>15</sup> N filter P9
<sup>13</sup> C 直接測定
$15d\text{-}PGJ_2\cdots\cdots\text{-}P47$
<sup>19</sup> F 標識タンパク質P39
II 型 AAA-ATPase L9
<sup>2</sup> H decouplingL3
$^{23}Na\text{-}MQMAS\cdots P80$
<sup>27</sup> Al NMRP92
<sup>27</sup> Al 体 NMR
<sup>29</sup> Si NMR ·····P92
<sup>31</sup> P MAS NMR ·····P88
<sup>31</sup> P-HOESYP64
3 次元 NOESYP22
<sup>43</sup> Ca NMR ······P89
4D NOESYYP13
<sup>95</sup> MoP90
(A)
actin $\cdots$ P55
agarose gel ·····P61
agarose gel ·····P61 A-quartet ·····P29
agarose gel ·····P61 A-quartet ····P29 (B)
agarose gel ·····P61 A-quartet ····P29 (B) bHLH transcription factor ·····P7
agarose gel ·····P61 A-quartet ····P29 (B) bHLH transcription factor ·····P7 BMRB ······P111
agarose gel ·····P61 A-quartet ····P29 (B) bHLH transcription factor ····P7 BMRB ·····P111 BN ナノ粒子 ····P86
agarose gel ·····P61 A-quartet ····P29 (B) bHLH transcription factor ····P7 BMRB ······P111 BN ナノ粒子 ····P86 (C)
agarose gel ·····P61 A-quartet ····P29 (B) bHLH transcription factor ·····P7 BMRB ·····P111 BN ナノ粒子 ····P86 (C) CD44 ·····P57
agarose gel ·····P61 A-quartet ····P29 (B) bHLH transcription factor ···P7 BMRB ·····P111 BN ナノ粒子 ····P86 (C) CD44 ·····P57 chemical shift anisotropy ·····L14
agarose gel ·····P61 A-quartet ···P29 (B) bHLH transcription factor ····P7 BMRB ·····P111 BN ナノ粒子 ····P86 (C) CD44 ·····P57 chemical shift anisotropy ·····L14 conformational equilibrium ····P57
agarose gel ·····P61 A-quartet ····P29 (B) bHLH transcription factor ···P7 BMRB ·····P111 BN ナノ粒子 ····P86 (C) CD44 ·····P57 chemical shift anisotropy ·····L14 conformational equilibrium ···P57 CP ·····P79
agarose gel ·····P61 A-quartet ····P29 (B) bHLH transcription factor ····P7 BMRB ·····P111 BN ナノ粒子 ····P86 (C) CD44 ·····P57 chemical shift anisotropy ·····L14 conformational equilibrium ···P57 CP ·····P96
agarose gel ·····P61 A-quartet ····P29 (B) bHLH transcription factor ···P7 BMRB ·····P7 BMRB ·····P7 BMRB ·····P86 (C) CD44 ·····P57 chemical shift anisotropy ····L14 conformational equilibrium ···P57 CP ·····P79 CRAMPS ·····P96 cross-saturation ···P28
agarose gel ·····P61 A-quartet ····P29 (B) bHLH transcription factor ···P7 BMRB ·····P111 BN ナノ粒子 ····P86 (C) CD44 ·····P57 chemical shift anisotropy ····L14 conformational equilibrium ···P57 CP ·····P79 CRAMPS ·····P96 cross-saturation ···P28 Cryocoil ····P112
agarose gel ·····P61 A-quartet ····P29 (B) bHLH transcription factor ···P7 BMRB ·····P7 BMRB ·····P7 BMRB ·····P86 (C) CD44 ·····P57 chemical shift anisotropy ····L14 conformational equilibrium ···P57 CP ·····P79 CRAMPS ·····P96 cross-saturation ···P28 Cryocoil ·····P112 (D)
agarose gel ·····P61 A-quartet ····P29 (B) bHLH transcription factor ···P7 BMRB ·····P86 (C) CD44 ·····P57 chemical shift anisotropy ····L14 conformational equilibrium ···P57 CP ·····P79 CRAMPS ·····P96 cross-saturation ···P28 Cryocoil ·····P112 (D) DARR ·····YP1

DHFRP52
disulfide bondYP18
domain orientationP40
$(\mathbf{E})$
EB1 ·····P30
E-box binding ······P7
EF hand ·····P59
ESP1
ESP1 受容体
$\mathbf{ESP} \ \mathcal{P}_{\mathcal{T}} \in \mathbb{U} - \cdots \cdots \mathbb{P}_{34}$
(F)
FABP4P42
FKBP
FliK·····P43
FLYA ·····L18
(G)
GIPAW 法 ···································
GPVIP41
G-quartet ·····P29
(H)
HCA(N)CO ······L3
High order spin system ·····P65
HMGP40
in situ 光照射-固体 NMR YP4
in-cell NMRYP15, P37, P39, P49
INPHARMA ······P41
interaction ······P55
IQGAP1 ·····P55
(L)
larger protein NMR ·····P62
LBT ·····P60
LED 蛍光体 ······P98
LED 封止樹脂 ······P98
$(\mathbf{M})$
Mal ·····P36
MASP2
mitochondria ······YP18
molecular mobility ·····P61
MR エラストグラフィ

Musashi ··		···· P9
	(N)	RDC ·

()
NADPH oxidase ·····P59
Nanodisc ······YP14
NF-κB シグ ナリング ······P50
NMRP35, P40
NMR spin-label ······YP18
NMR プローブ開発 P113
NMR 滴定法P12
non uniform sampling ·····P62
NQRYP7, P118
NQR・NMR 二重共鳴分光装置 P116
NQR 核磁気モーメント YP7
NQR 周波数探查
(0)
Orange domain ······P7
(P)
PFG-NMR ·····P81
phox ·····YP14
PH ドメイン YP2
$\pi$ - $\pi$ stackingP29
+TIPsP30
protein ·····P61
Protein dynamics ·····P49
protein structure ······L14
Protein-ligand interaction ·····P32
PX dmain ······YP14

RDC ······YP12
Relaxation ·····P49
RNA
RNase ·····P46
(S)
SAILL4, P32
segmental isotope labelingP28
Selective J- resolved HMQC ······P65
selective methyl protonationP62
staphylococcal nuclease V66K ······P54
STD
SUMO 化翻訳後修飾P27
SWAP-70
(T)
TCS 実験
TIR ドメインP36
transferred cross-saturationP13
TRAPDOR ·····P97
triplet-DNP ·····P67
TROSY ······L14
TSP
Tubulin ·····P24
two-component system ·····P28
(V)
VRK1 L2
(Z)
Zeolite ·····P84
Zn <sup>2+</sup> フィンガードメインP50

### (あ行)

アイソトポマー YP8
アプタマー L8
アミノ酸選択ラベルP75
アミロイド線維P76
アミロイド線維阻害P76
アミロイドβタンパク YP1, P70
アミロイドベータペプチドP35
アメロジェニンP53
アラニン連鎖ペプチドP73
アルツハイマー病P35
安定化
安定同位体標識L19, P26, P58
安定同位体ラベルL21
イオン液体P77
イオン拡散P81
異核測定
異種核多次元 NMRYP15, P37
異種相関L27
異性化平衡P11
イネP10
インスリンP15
液体物検査
エピトープマッピングP3
塩橋YP11
オリゴマーP20
オルタナティブスプライシング L9
オントロジーP108
(か行)
解析条件
回転エコー二重共鳴L22
回転磁場系P102
外部ロックP68
化学シフト YP3
化学シフト異方性P94
化学シフト摂動P77
化学修飾
可逆的配位数変化
拡散 ······ YP5

核磁気緩和
核四極子共鳴
核小体局在シグナルL9
画像不均一性
カチオン-π相互作用P100
活性酸素
カテキン
過渡的構造
カドミウムYP16
カナマイシン 3'リン酸P64
カリウムチャネルYP17
カルシウムハイドロシリケートP89
カルモジュリンYP16
環境メタボロームP107
感度向上
緩和時間YP6, P78
緩和時間測定P42
緩和分散法
気孔の分化P16
帰属解析
気体拡散係数P99
気体の NMRP99
キナーゼ
絹フィブロインL21
凝集L6
共分散
共鳴周波数探查 P118
局所構造
金属水素化物P87
クモ牽引糸P72
グラファイト
クルクミン YP1
結合サイトP8
高磁場条件
高圧 NMR
高圧力L5
高温超伝導P113
交換 NMR ······ YP5
抗菌ペプチドP33
交差飽和法

高磁場 NMRP68
高周波磁場P102
酵素P24
構造解析 L1
高速 MAS
高速 MAS
酵素分解
抗プリオン化合物
高分子錯体
高分子量タンパク質P26
酵母発現系
固体 <sup>15</sup> N NMRL28
固体 NMRL11, L21, YP8, P66, P69,
P71, P72, P73, P76, P82,
P83, P84, P86, P91, P101
固体 NMR 法 ······YP3
固体 <sup>17</sup> O NMR ······P74
固体酸触媒P84
固体重水素 NMR
コバルト酸リチウムYP5
コレステロールL23
昆虫 ······P105
(さ行)
最小二乗フィッティングL20
最大エントロピー法YP13, P22
細胞質ダイニン
差スペクトル P1
酸素還元反応
サンプリング条件P107
サンプル調製L6, P45
四極子結合定数P80
四極子相互作用P74
シグナルアサイメントP69
自己集合P53

脂質 ······P45 脂質二重膜 ······YP2 脂質ラフト ·····L23 自然免疫 ····P33, P46 シックスドメイン ····P56 自動構造計算 ····L18

シトクロム <i>c</i>
磁場安定化P68
磁場配向
シミュレーション YP7
ジャスモン酸P10
重水素交換P53
主成分分析
ジユビキチンL5
受容体
準安定状態P25
常磁性ランタニドP4
常磁性 NMR ······P17
常磁性緩和効果
触媒P93
植物
植物細胞P16
植物バイオマスL27
試料管内転写P58
試料調製YP20
親和性制御P14
水素化ホウ素化合物P83
水素結合L4
水素貯蔵材料P83
ストレス耐性P10
スピン拡散P67
スフィンゴミエリンL23
スペクトルシミュレーションP71
スペクトルデータベース P117
石炭P95
石炭灰
ゼラチンゲル
セラミド輸送タンパク質P51
セルロース
セルロース分解 YP8
選択標識L2
相関係数P109
相互作用
相互作用解析P30
装置開発
阻害剤構築P41

側鎖交換性水素	$\cdots L4$
第一原理計算	······ P110
ダイナミックレンジ	······L24
多核固体 NMR	······P95
多孔質	······P93
多重結合部位	·····P27
縦緩和時間	······ P3
多糖	······P63
妥当性確認	······ P114
多変量解析	······ YP9
タンパク質間相互作用	·····P19
蛋白質ダイナミクス	···P52, P54
チオエステル転移反応	·····P27
地磁気 NMR	······ YP6
窒素含有カーボン	······L28
窒素 14	······P66
超 1GHz NMR	······ P113
超高磁場	······ P5
超低摩擦	······P85
超偏極 Xe	······P93
定量	······P104
定量 NMR	······ P114
データ登録	······ P111
データ評価	······P108
データベース	P108, P111
鉄	······L26
転移 NOE	·····P33
転移交差飽和法	····· P2
電磁界シミュレーション	······ P115
電子伝達複合体	·····P38
転写因子複合体	·····P31
転写コアクチベーター	···P12, P31
天然物構造解析	······P63
天然変性タンパク質	·····P12
糖	······P18
糖鎖	······P11
糖鎖	•••••• P1
動的核分極(DNP)法	······L11
動的核偏極	·····P67
特異的認識	·····P34

トバモライトP89	9
トランスポーターP1:	3
(な行)	
二次元 NMRP2	1
二次元相関 NMRP82	2
ヌクレオソームコアP2:	3
(は行)	
バイオマス分解Pe	6
バイオマス前処理YP9	9
配向P78	8
バイセル	1
薄膜 ······L2	5
バナジウム水素化物P8'	7
パルス法	3
ハロロドプシンP7	5
光活性中間体	4
光受容体P44	4
光照射固体 NMRL1:	2
光中間体L1:	2
ヒストンP2:	3
微生物産生ポリアミノ酸P9	1
微生物叢	6
非線形サンプリングYP13, P2:	2
ヒ ト脳L20	6
非破壊検知	5
標準酸化還元電位P1'	7
表面修飾	3
微量フッ素	7
ピルビン酸L1	9
ピロリン酸スズP88	3
フィトクロムP44	4
富栄養化水P10'	7
フェリチン	3
フェロモンP34	4
複合生物系代謝P103	5
複合体	)
物質循環L2'	7
フッ素レスP9'	7
フラーレンP8	5
プリオンLa	3

プリオン病
プローブ
プロトフィブリルP70
プロトン移動YP10
分子間構造P73
分子間βシートP70
分子動力学
分子内水素結合YP10
分子内相互作用P51
ペプチドP45
ヘムP21
ヘムタンパク質P20
べん毛P43
ホスト-ゲスト化学YP12
ポリアラニン
ポリグルタミンL22
ポリ酸
ポリフルオレンP94
ポリマーブレンド
(ま行)
フィクロプローブD08

マイクロプローブP98	
マウスフェロモンYP19	
膜タンパク質YP17, P38, P71	
膜蛋白質	
マジック角回転L25, P78	
マルチドメイン蛋白質P48	
ミオグロビン	
無機化合物	
無細胞タンパク質合成P19	
無細胞発現系	
ムチン P1	
メタ相関解析	

メタボロミクス
メチオニン選択標識YP16
メチル TROSYYP17
メリチンP74
免疫グロブリン

### (や行)

有機 EL
有機化合物
ユビキチン
溶液 ······P5
溶液 NMRP24, P47, P48, P117
橫緩和
橫緩和速度
四重鎖 DNAP21

### (ら行)

著者索引		Peter	E. Wr	ight L20, P1	2 五十	嵐 麗桐	尌 L6
(アルファベット)		Peter	Guent	ert	五十	嵐 俊江	<b>介</b> P20
Ad Bax	L17			L18, YP13, P1	5 西村	いくこ	E P17
Bertrand E. Garcia-Mo	rene	Shige	ru Sug	giyama P6	2 池上	貴久	YP11, P5,
	P55	Shing	go Mats	sukawa P6	2		P51, P109
Bona Dai	P62	Shun	suke N	Ieshitsuka P	7 池田	啓子	P57
Brian O. Smith	YP13	Steve	n Mad	ing P11	2 池田	恵介	P72
Bryn Baritompa	P117	Sunilk	umar N	I. Puthenpuracka	al 池谷	鉄兵	L18, YP13,
Catherine A. Royer	P55			P5	3	P1	5, P23, P50, P63
ChristianRoumest	P55	Vladi	mir La	dizhansky P7	0 石井	毅	L6
Chun-Jiun Yang	L4				石井	剛志	P101
Daniel Nietlispach			(3	ī十音)	石川	誠	P86
L15, YP13	, P23,		(	あ行)	石田	亘広	P78
P50	), P63	相沢	慎一	P4	4 石田	宏之	P99
Edward J. Auerbach	L26	相沢	智康	P34, P54, P7	6 石森	浩一郎	昭 P39
Eldon L. Ulrich	P112	青木	昭宏	$\mathbf{P7}$	4 市川	大哉	P51
Gerhard Wagner	L19	赤坂	一之	L5, P53, P5	5 市川	正史	P64
H. Jane Dyson	P12	赤羽	英夫	YP6, YP′	7, 出田	圭子	P93
Helen M. Berman	P112		Р	116, P117, P11	9 出原	敏孝	L11
Hideaki Fujiwara	L13	審良	静男	P4	7 伊藤	隆	L1, L18, YP13,
Hiroyoshi Matsumura	P62	阿久清	<b>車</b> 秀太	É L11, P72	2,	YP19	, P15, P23, P25,
Ho Sup Yoon	L2		]	P79, P109, P11	2	P31	, P32, P38, P49,
J. E. Jakus	P63	朝倉	哲郎	L21, P67, P73	3,		P50, P63
J.R.H. Tame	P63			P74, P9	9 伊藤	(新澤)	恭子 P39
John L. Markley	P112	浅野	敦志	$\mathbf{P7}$	9 糸崎	秀夫	YP6, YP7
Jonathan C. Lansing	L20	芦田	淳	P8	0	Р	P116, P117, P119
Josephine C. Ferreon	P12	足立	わかな	۲ P4	7 稻岡	斉彦	P46
Julien Roche	P55	穴井	孝弘	L1	1 稲垣	冬彦	L3, YP14, P4,
JunGoo Jee L4, P3	3, P45	阿部	綾	Р	3 P	37, P47	, P60, P61, P110
Karine M. Guillen	P55	雨貝	真実	P2	1 犬飼	宗弘	L25
Kevin Gardner	L7	編田	宏一	P4	4 井上	大輔	P86
Kwang-Hwang Jung	P70	荒井	創	P8	3 井上	将行	L22
Leonid Brown	$\mathbf{P70}$	新井	宗仁	P1	2 猪熊	聡夫	P60
Lichi Shi	$\mathbf{P70}$	荒樋	周	P8	1 猪股	晃介	P40, P43
Markus Waelchli	YP13	有竹	浩介	P4	8 井原	俊英	P115
Michael Chimenti	P55	安西	高廣	YP1	7 今井	駿輔	YP16
Michael Garwood	L26	安藤	一郎	P10	5 今井	貴雄	Р9
Michael Sattler	L10	入江	清史	P1	8 今井	潤	P105
Mika Hirose	P62	飯倉	智弘	YP	8 伊谷	野 悠	里 P59
Mitsuhiko Ikura	L16	飯島	隆広	P9	1 入江	一浩	YP1, P71

岩岡	諒	L8	大野	綾子	P40	神谷	步	L6
岩浪	克之	L29	大山	貴子	Р9	神谷	昌克	P34, P54, P76
岩本	成人	P36	岡崎	宏紀	L23	亀田	倫史	P72
岩谷	奈央子	L9	岡澤 詩	誠裕	P100	亀谷	俊輔	P74
上釜	奈緒子	P102	岡島	麻衣子	- P64	加茂	直樹	YP4, L12
植草	義徳	P101	尾形	善之	P111	傘	俊人	P100
植田	啓介	L11	岡野	栄之	P9	川合	克久	YP2
上田	卓見	P13, P29	岡村	英保	P57	河合	· 剛太	P59
上田	寛	P42	小川	勇	L11	川上	潔	P57
上脇	隼一	P41	小川	童也	L21	川崎	· 久美子	РЗ2 Р32
鵜澤	洵	P2, P65	荻野 🔅	新治	P56	河野	敬一	P34, P54, P76
生塩	理尋	P61	荻野 🔅	新治	P58	河野	慎	YP17
丑田	公規	P2	小久見	善八	. P83	川畑	俊一良	ß P34
牛田	千里	P59	奥村	祐生	P100	川村	· 出	L12, YP4,
内本	喜晴	P83	小椋	賢治	L3, YP14, P4,			P70, P75
内海	博明	P67			P37, P61	木吉	司	P69
宇仁	武史	P21	小倉	卓哉	P104	木川	隆則	L2, P76
梅沢	洋二	P65	小倉	立己	P6	菊川	峰志	P34
梅本	良	P56	小澤	新一郎	S P20	菊川	峰志	P76
裏出	良博	P48	乙部	専英	P82	菊地	淳	L27, YP8, YP9,
海野	幸子	P19	小野	明	L4, P33			P6, P78, P106,
江川	文子	P72 P76	小野	克輝	P42			P108, p111
榎園	能章	P37, P47		(7	か行)	菊間	淳	P90
海老潭	睪 佑輔	P69	甲斐荘	正恒	Ľ L4, L18,	北川	千尋	YP15
遠藤	斗志也	YP17			P20, P33	北川	勝浩	P68
遠藤	由宇生	P67	香川	晃徳	P68	北沢	創一度	ß P26
王淮	毐梅	L6	梶 弘	典	YP3, P95	北原	亮	L5, P26, P55
黄前	真吾	P92	片平 二	正人	L8, P9	北村	成史	P79
大石	徹	L23	加藤	晃一	L5, YP12,	吉川	雅英	P14
大木	出	YP11			P26, P101	衣笠	晋一	P118
大木	進野	YP15, P17,	加藤(	言幸	P48	清澤	秀孔	P59
		P64	加藤	兑子	P45	木吉	司	P114
大久伊	ネ 忠恭	P48	金場	哲平	L1, P31, P49	櫛引	崇弘	P34
大澤	匡範	YP16, P1,	金子	童雄	P64	国本	: 浩喜	P92
		P20	金橋	隶二	P96, P97, P98	久野	敦	P19
大澤	一弘	L12	兼松	歩	P89	久保	:田 智日	P11
大塚	昭弘	P114	狩野	俗考	P37	久保	:田 由美	€子 P2, P65
大手	洋子	P115	鎌足	進司	P8	熊木	康裕	P34, P54
大浪	真由美	P27	上平	美弥	P77	熊澤	茂則	P101
᠇᠊᠋᠊᠋᠊	香穂里	P23	上平 (2	石島)	美弥 P101	久米	田 博之	Ł L3, P37, P60
倉田	理恵	P45	佐藤	昌彦	P24	鈴木	悠	L21, P74
-----	------	----------------	----	--------	-----------------	-----	-----------	-----------------
胡桃坊	え 仁志	P24	佐藤	道夫	P77	鈴木	陽	P88
黒木	重樹	L28	佐藤	佑哉	P73	鈴木	倫太郎	P10, P28
黒子	弘道	P67	佐藤	純子	P109	鈴木	美穂	P58
黒津	卓三	P79	佐藤	博	P105	須藤	雄気	L12, YP4
桑田	一夫	P8	池田	晙求	L18	住本	英樹	P60
桑原	大介	P86	菅野	茂夫	P17	関宏	ミ子	P2
源嵜	晃司	P89	重光	佳基	YP13, P23	関口	光広	P61
向 琑	1716	L6, P46	志佐	倫子	P78	瀬谷	司	
合田	名都子	L9	篠	阿弥宇	YP9			P37
河野	俊之	P36, P45, P46	篠原	淳一郎	YP7, P116,	相馬	洋之	P87
越田	高史	L8			P119	染谷	友美	P76
小柴	生造	L2	嶋田	一夫	L19, YP16,		(†	と行)
児嶋	長次郎	YP11, P5,		YP18	8, P1, P3, P13,	太虎	<b>è林</b>	P18, P22, P30
	]	P45, P72, P109		P14, I	P16, P20, P27,	高折	晃史	L8
小島	奈津子	P85		P29, l	P42, P52, P56,	高垣力	加藤 こ	ニずえ P42
後藤	淳	P95			P58,	高野	誠	P45
小橋川	敬博	YP14, P4,	嶋田	知生	P17	高橋	雅彦	L6
		P110	島本	茂	P48	高橋	貴文	P96, P98
小林	祐次	P48	清水	禎	P90, P91	高橋	利和	L29
小林	直宏	P44, P109,	治村	圭子	P84	高橋	治雄	P78
		P112	下條	秀朗	P57	高橋	栄夫	L19, P3, P16,
近藤	正志	P77	下野	和実	P76			P27, P52
	(5	と行)	熊	堚	P92	高橋	大樹	L11
斉尾	智英	P4, P61, P110	白川	昌宏	YP11	高橋	雅人	P69, P114
斉藤	香織	P22	白川	昌宏	L9, YP11,	高橋	三雄	P16
齋藤	公児	P81		]	P15, P32, P40,	高屋	展宏	L26, P103,
西道	隆臣	P36			P43, P50			P107
斉藤	貴志	P36	白水	美香子	P76	宝田	理	P14
齋藤	岡山	P115, P118	秦多	殊斌	P48	竹内	理	P47
斎藤	裕之	P59	神藤	平三郎	P28	竹内	恒	L19, YP16,
佐伯	邦道	P25	榛葉	信久	P16		P3,	, P27, P42, P52
榊原	大介	P38	菅瀬	謙治	L6, L20, P26	竹内	誠	P17
坂倉	俊康	L29	杉木	俊彦	P27, P52	竹内	和久	P105
坂田	研二	L27	杉本	収	P101	竹腰	清乃理	L24, YP1,
坂本	光一	P39	鈴木	榮一郎	P16		YP5, 1	P71, P83, P113
佐々木	、 敦子	P38	鈴木	孝	L23	武田	和行	YP1, P68, P71
佐々木	、 宏和	P106	鈴木	勉	P20	武田	光広	L4, P33
佐藤	宗太	YP12	鈴木	不律	YP3	田制	侑悟	P75
佐藤	徹	YP18	鈴木	勝	P86	立和名	4 博昭	P24

楯 舅	Í—	L14, P41,	永井	義崇	P32	根来	誠	P68
		P44, P53	長尾	聡	P21	根本	: 貴宏	P67
楯 匪	重子	P41	中川	敦史	P112	根本	: 貴弘	P98
伊達	康博	L27, YP8, P6	中越	雅道	P77	野田	泰斗	YP5
立石	健一良	3 P68	中込	秀樹	P114	野田	泰斗	L25, YP5,
立山	誠治	P64	中澤	千香子	P79			P83, P113
田中	利好	P45	中澤	靖元	P73	野本	: 直子	P39
谷口	雅浩	P35	中田	真一	P94	則武	義幸	P78
谷村	隆次	P42	永田	崇	L8, P9		(13	t行)
高橋	栄夫	P42	中谷	英一	P112	浜津	[ 順 平	L18
田巻	初	P76	長土居	計 有隆	P24, P57	はが	約 紗智子	YP18, P35
丹治	健一	P101	中富	晶子	YP15	箱嶋	敏雄	L1, P31
丹所	正孝	P90, P91	長友	重紀	P18, P22,	橋本	: 康博	P82, P90
近山	英輔	L27, P106,			P30	長谷	: 隆司	P69, P114
		P111	仲野	朋子	YP10	秦	和澄	L5, P55
辻 明	尭	YP2, P102	中野	佑亮	P30	畠山	盛明	P81
津嶋	崇	P47	中原	優 YP	7, P116, P119	服部	3 峰之	P94
土江	祐介	P23, YP13, P63	中村	浩蔵	P101	服部	3 良一	YP11
土田	努	P106	中村	新治	L11	花島	; 知美	P15, P50
土屋	渉	P10, P28	中村	壮史	P16	花田	賢太郎	P52
綱嶋	正通	P90	中村	敏和	P86	浜津	: 順平	P15
坪井	裕理	YP9, P106	中村	春木	P109, P112	濱津	』 順平	P38, P50
手塚	福栄	L6	中山	顕貴	P68	早坂	[ 晴子	P58
出村	誠	P34, P54, P76	中山	勉	P101	林	こころ	P72
寺内	勉	L4, P33	鍋島	真美	P118	林	繁信	L29, P84,
寺尾	佳代于	YP17	行木	信一	L6			P85, P87, P88
寺沢	宏明	YP18, P35,	名雪	三依	P90	林	宣宏	P38
		P36	成松	久	P11	林	裕志	YP9
天野	剛志	L9, P51	成松	由規	P11	早野	\$ 陽介	P8
土井	崇嗣	P71	西浦	達也	P97	原田	幸祐	YP14
東原	和成	YP18, P35	西尾	拓動	L12	原野	\$ 陽子	P109, P112
徳田	尚美	YP2	西ヶ谷	氵 有輝	P45	樋岡	克哉	P67, P74, P99
戸田	充	L11	西川	諭	L8	樋口	真理花	P76
栃尾	尚哉	L2	西川	富美子	L8	肥後	1 聡明	P69
杤尾	豪人	P40, P43	西田	紀貴	P14, P56, P58	日高	前 徹郎	L12, YP4
友永	雄也	L12, YP4	西田	雅一	P89	日比	野 高士	P89
豊永	翔	P1	西村	勝之	P91, P102	平沖	1 敏文	P81
	(	な行)	西村	善文	P24, P57	平賀	【隆	P94
内藤	間	L12, YP4,	西山	裕介	P67, P74	平金	主真	YP18
		P75, P77, P101	新田	尚隆	P104	平野	; 貴志	L5

平林	淳	P19	前田	佳子	L23	森	ЕŻ	P17
廣明	秀一	L9, P51	前田	秀明	P69, P114	森井	尚之	P11
広瀬	進	P32	前野	覚大	P53, P55	森岡	祐介	P111
廣瀬	卓男	P105	真刂	鳥司	L8	森川	卓也	P82
廣田	俊	P21	益田	祐一	YP10	森下	了	L8
黄 貧	多率	YP15	増田	裕一	YP1, P71	森戸	昭等	P43
深尾	陽一朗	P45	町山	麻子	P13, P29	守屋	繁春	P78, P108
深田	はるみ	YP11	松井	久仁雄	P90	森脇	義仁	P24
深谷	治彦	P89	松浦	孝則	P112	諸原	理	YP12
福井	泰久	YP2	松岡	茂	L22		(1	や行)
福島	達也	P95	松木	陽	L11	八木注	睪 仁	YP2
福田	真嗣	L27	松野	信也	P90	矢木	真穂	L5, P26
福地	将志	YP1, P95	松森	信明	L23	安田	智一	L23
藤江	正樹	P81	三浦	浩治	P86	安田	弘之	L29
藤田	大士	YP12	三浦	亨	P115	谷田川	│ 達也	YP1
藤田	誠	YP12	三神	すずか	L1, YP19	柳澤	吉紀	P114
藤戸	輝昭	P69	三島	正規	L1, L18,	山内	一夫	P67
藤原	健一郎	L9	r	YP13, YI	P19, P15, P23,	山口	圭一	P8
藤原	芳江	L9		P25, l	P31, P32, P38,	山口	敏幸	L23
藤本	瑞	P10, P28			P49, P50, P63	山口	芳樹	YP12
藤原	敏道	L11, YP11,	水越	弓子	P3	山崎	和彦	P11
		P5, P44, P72,	水野	志乃	P44	山崎	俊夫	L22, P9,
	$\mathbf{P7}$	6, P109, P112	水野	敬	YP5, P113			P69, P114
藤原	正子	P105	三田	肇	P22	山崎	俊正	P10, P28, P45
降旗	一夫	P66	三森	文行	L26, P103,	山澤	哲	YP8
古板	恭子	YP11, P5			P107	山路	俊樹	P118
古川	亜矢子	L8	湊な	進一	P13, P29	山瀬	利博	P91
古川	早苗	P11	宮坂	昌之	P58	山田	和彦	P69, P75
古川	大祐	P13	宮崎	健介	P49	山根	千英	P116
逸見	光	P19, P22	宮崎	隆好	P69, P114	山本	挙	P82
細川-	武藤 淳.	二 P8	宮脇	仁	P93	山本	泰彦	P18, P22, P30
細田	和男	L6, P46	三好	理子	P99	楊	享竣	P33
細野	政美	P69, P114	三輪	優子	P99	尹星	聖昊	P93
細谷	沙織	P38, P50	村井	元紀	L22	横川	真梨子	YP14, P1
堀消	生日	P2	村上	美和	P83	横地	政志	P4, P47,
本坊	和也	P60	村田	道雄	L23			P61, P110
本間	一弘	P104	村山	秀平	P40	横山	茂之	L2, P76
	(ま	行)	持田	勲	P93	横山	順	L2, P76
前崎	綾子	P25, P31	森巷	昏哉	P78	吉浦	知絵	P13
前田	史郎	P92	森智	習行	P31	吉川	信也	P39

吉川	正敏	P114
吉田	卓也	P48
葭田	征司	P108
吉田	直樹	YP14
吉永	壮佐	YP18, P35
吉野	彰	P82
吉益	雅俊	P38
吉水	広明	P100
梁 明	「秀	L8
林林	超	P93
	(	(わ行)
若松	馨	L6, P46
和田	昭盛	L12, YP4
和田	侑士	P53
渡辺	健太	P114
渡邉	翔大	YP6
渡邉((	尹藤)	ひかり P77
渡邉	英宏	L26, P103,
		P107