

42 残基のアミロイド β ($A\beta_{42}$) 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

○増田裕一¹, 福地将志¹, 谷田川達也¹, 武田和行¹, 入江一浩², 竹腰清乃理¹

¹京都大学大学院・理学研究科, ²京都大学大学院・農学研究科

Analysis of interaction sites of curcumin with the fibrils of 42-residue amyloid β -protein ($A\beta_{42}$) using solid-state NMR

○Yuichi Masuda¹, Masashi Fukuchi¹, Tatsuya Yatagawa¹, Kazuyuki Takeda¹, Kazuhiro Irie², and K. Takegoshi¹

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

Aggregation of 42-residue amyloid- β 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 β -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 ($A\beta_{42}$) 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、 $A\beta_{42}$ 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¹⁾。本研究では、 $A\beta_{42}$ 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. ¹³C 標識した $A\beta_{42}$ 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 $A\beta_{42}$ の凝集モデルを提示している (Fig. 1)²⁾。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 ¹³C で標識した $A\beta_{42}$ 凝集体に、¹³C で標識したクルクミンを混合し、これら

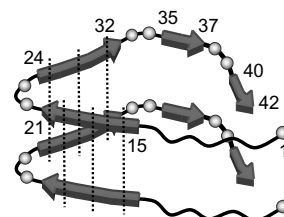


Fig. 1. The aggregation model of $A\beta_{42}$.²⁾ Dotted lines show intermolecular β -sheet.

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

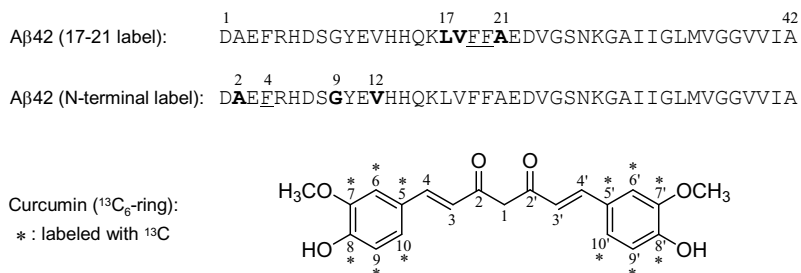


Fig. 2. Selective labeling of $\text{A}\beta_{42}$ and curcumin with ^{13}C . Labeling scheme in the $\text{A}\beta_{42}$ sequence: bold letter, uniformly labeled with ^{13}C ; underlined letter, only C_β is labeled with ^{13}C . Curcumin was labeled at its aromatic carbons with ^{13}C .

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 ^{13}C 標識した $\text{A}\beta_{42}$ 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 $\text{A}\beta$ 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、 $\text{A}\beta_{42}$ は芳香環以外の炭素を標識した (Fig. 2)。

^{13}C 標識した $\text{A}\beta_{42}$ 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 ^{13}C 標識したクルクミンを 5 等量添加し、さらに 1 h 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

一次元の CP/MAS スペクトルを測定したところ、 $100 \sim 150$ ppm 付近にクルクミンの ^{13}C シグナルを確認することができた (Fig. 3)。全ての ^{13}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 $\text{A}\beta_{42}$ 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 ^{13}C - ^{13}C 双極子-双極子相互作用を観測する目的で、 ^{13}C - ^1H dipolar-assisted rotational resonance (DARR)³⁾ 実験を行った。DARR は Fig. 4 に示すように、MAS 周波

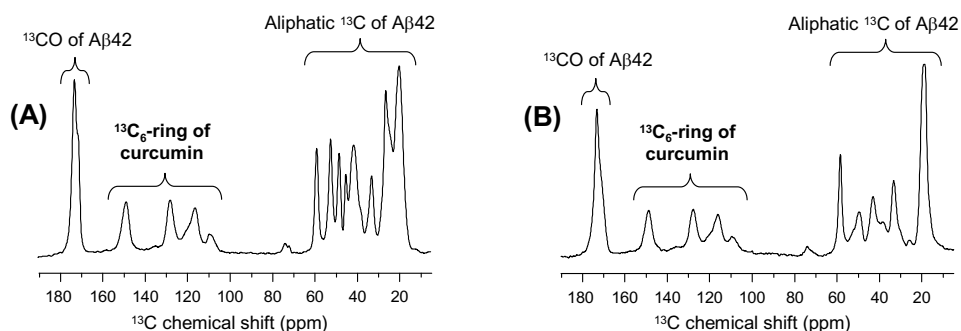


Fig. 3. 1D ^{13}C CP/MAS spectra of the curcumin ($^{13}\text{C}_6$ -ring)-bound $\text{A}\beta_{42}$ (17-21 label) fibrils (A) and the curcumin ($^{13}\text{C}_6$ -ring)-bound $\text{A}\beta_{42}$ (N-terminal label) fibrils (B).

数に等しい強度のラジオ波を ^1H 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 β 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 β 42 の ^{13}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)^{4,5)} 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_2 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 A β 42 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ったことから、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と考えられる。一方、クルクミンと N 末端領域の炭素の ^{13}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 ^{13}C の中でも、7, 7' および 8, 8' 位の ^{13}C はそれ以外の ^{13}C に比べて A β 42 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 A β の凝集阻害能が著しく低下することが報告されている⁶⁾。7, 7' および 8, 8' 位の炭素が A β 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、A β との相互作用において重要であることを支持している。

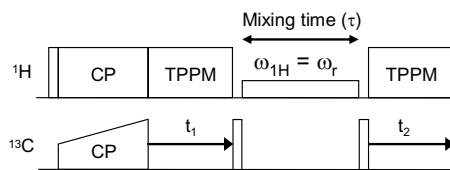


Fig. 4. Pulse sequence of 2D DARR experiments.³⁾

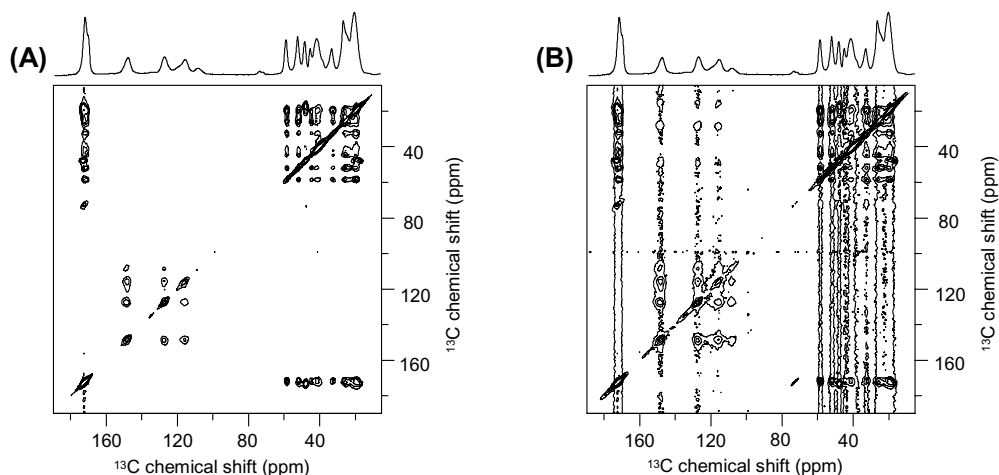


Fig. 5. 2D FT DARR spectra of the curcumin($^{13}\text{C}_6$ -ring)-bound A β 42 (17-21 label) fibrils. (A) and (B) are the same spectra, but the lower limit of the shown spectra are 3% (A) and 1% (B) of the highest peak.

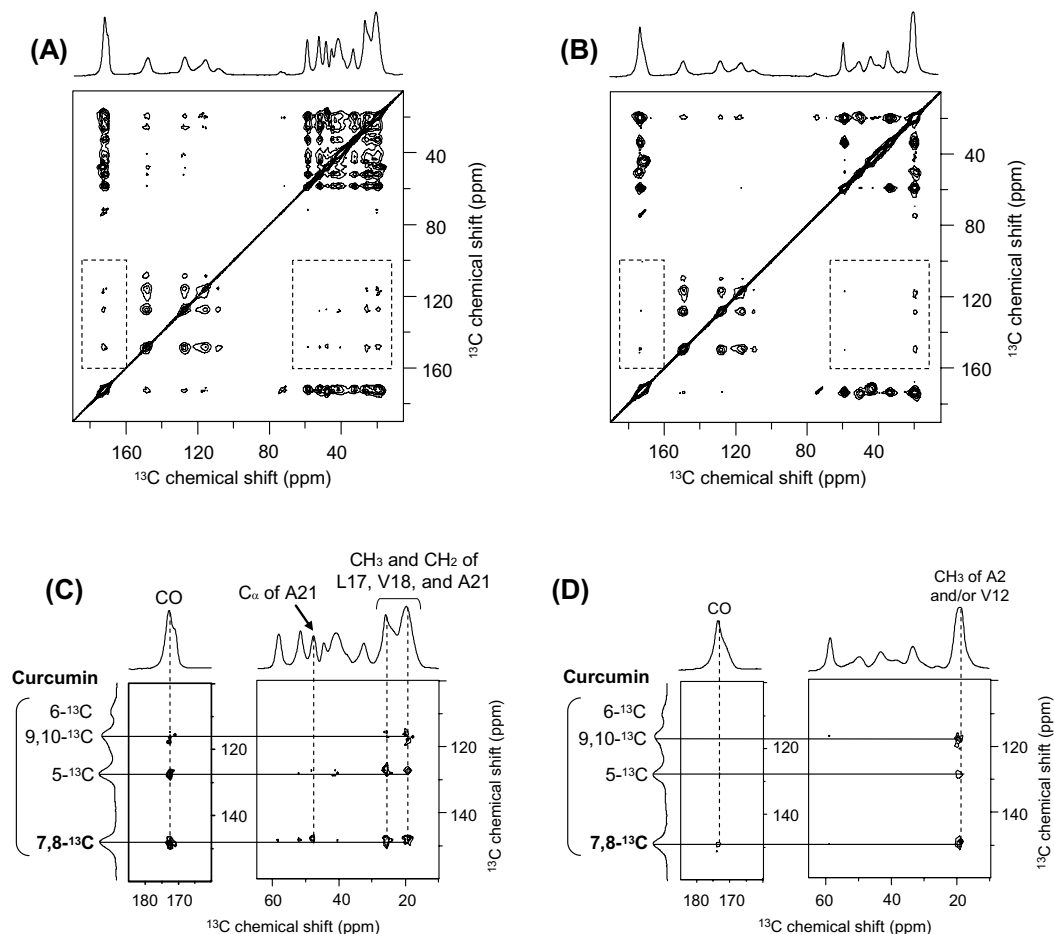


Fig. 6. 2D covariance-processed DARR spectra of the curcumin ($^{13}\text{C}_6$ -ring)-bound A β 42 (17-21 label) fibrils (A and C) and the curcumin ($^{13}\text{C}_6$ -ring)-bound A β 42 (N-terminal label) fibrils (B and D). Spectra C and D are enlarged displays of the spectra framed by dotted line 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 ^{13}C - ^{13}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 A β 42 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、A β 42 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]

1) 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) Brüscheweiler, 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¹、川合克久¹、八木澤 仁¹、福井泰久²、辻 暁¹
¹兵庫県立大学大学院 生命理学研究科、²Natl. Hlth. Res. Inst., Taiwan

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

○Naomi Tokuda¹, Katsuhisa Kawai¹, Hitoshi Yagisawa¹, Yasuhisa Fukui², Satoru Tuzi¹
¹Grad. Schl. Life Sci., Univ. Hyogo, ²Natl. 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)P₃ specific binding site and a nuclear localization signal sequence, respectively, both of which 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 ¹³C NMR spectra of the membrane associated SWAP-70 PH domain revealed that a conformational transition of the C-terminal α -helix to a random coil like structure and a structural alteration of the β -sandwich occur at the membrane surface. The conformational alteration would expose NLS involved in the C-terminal α -helix to water and facilitate recognition by Importin- α .

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)P₃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

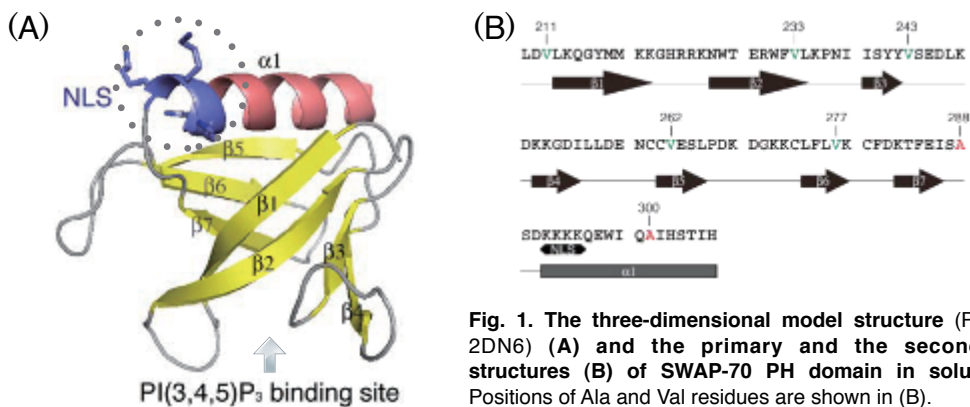


Fig. 1. The three-dimensional model structure (PDB# 2DN6) (A) and the primary and the secondary structures (B) of SWAP-70 PH domain in solution. Positions of Ala and Val residues are shown in (B).

2. 実験方法

大腸菌大量発現系を用いて、 $[3-^{13}\text{C}]$ Alaおよび $[1-^{13}\text{C}]$ 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)P₃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、懸濁液の状態ですべてNMR測定用サンプル管に密封し、 ^{13}C NMR測定に用いた。測定は、Chemagetics CMX Infinity-400(^{13}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

$[3-^{13}\text{C}]$ Alaおよび $[1-^{13}\text{C}]$ Val標識SWAP-70 PHドメインの ^{13}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。

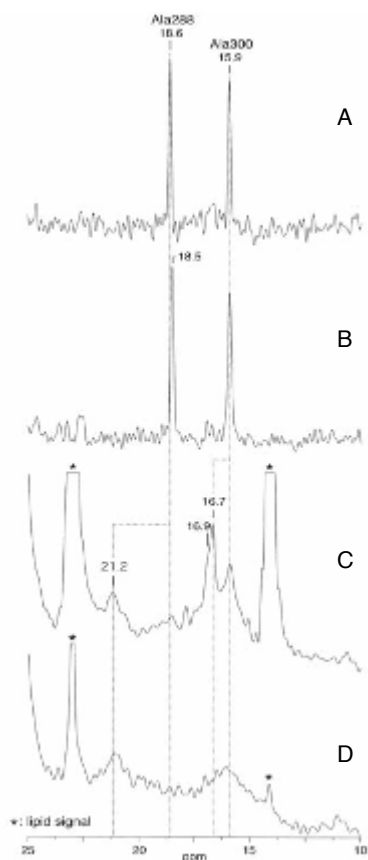
水溶液中におけるSWAP-70 PHドメインの立体構造

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 ^{13}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。 β 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 β 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

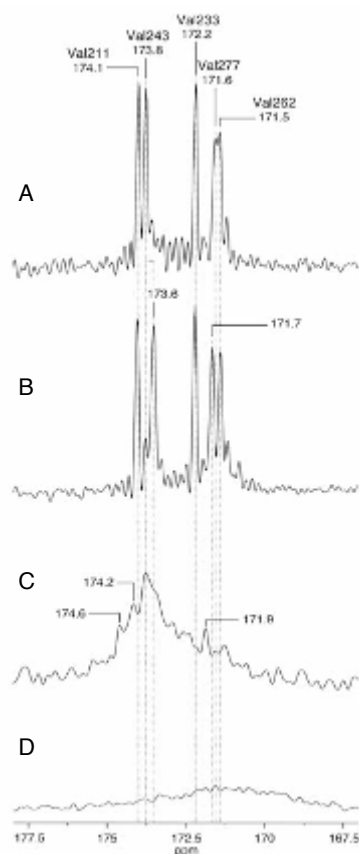
る。また、C末端 α ヘリックスの中央に位置するAla300の信号も、基質非結合状態と同じ15.9 ppmに観測されており、C末端 α ヘリックス構造にも変化は見られない。

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 ^{13}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 $[3-^{13}\text{C}]\text{Ala}$ および $[1-^{13}\text{C}]\text{Val}$ 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 β シート構造を示している。この信号は、 β 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



← Fig. 2. ^{13}C NMR spectra of $[3-^{13}\text{C}]\text{Ala}$ -labeled SWAP-70 PH domain. unliganded PH domain in solution (A), PH domain forming complex with Ins(1,3,4,5) P_4 in solution (B), DD-MAS (C) and CP-MAS (D) ^{13}C NMR spectra of PH domain bound to PI(3,4,5) P_3 embedded in POPC/PI(3,4,5) P_3 vesicles.



→ Fig. 3. ^{13}C NMR spectra of $[1-^{13}\text{C}]\text{Val}$ -labeled SWAP-70 PH domain. unliganded PH domain in solution (A), PH domain forming complex with Ins(1,3,4,5) P_4 in solution (B), DD-MAS (C) and CP-MAS (D) ^{13}C NMR spectra of PH domain bound to PI(3,4,5) P_3 embedded in Di-O-DMPC/PI(3,4,5) P_3 vesicles.

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¹³C 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 MgCl₂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。

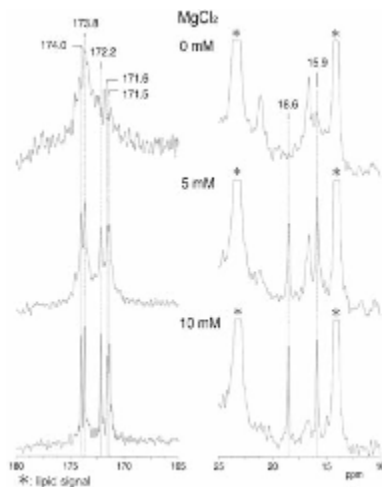


Fig. 4. Effect of MgCl₂ on the solid-state ¹³C NMR spectra of the [3-¹³C]Ala-labeled and [1-¹³C]Val-labeled SWAP-70 PH domain bound to PI(3,4,5)P₃ in vesicles.

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-70 PH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

○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

○Furitsu 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 δ form (δ -Alq₃) 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) (Alq₃)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 -Alq₃結晶に対してNMR等方化学シフト値を求め、 δ -Alq₃のCP/MAS ¹³C 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

ペクトルから得られた実測値[5]との比較検討を試みた。

<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 -Alq₃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Alq₃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 -Alq₃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。

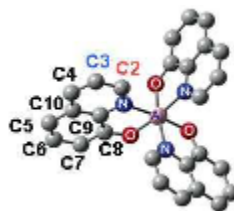


Fig. 1. The structure of facial-Alq₃.

Fig. 3(a)およびFig. 3(b)には、それぞれ γ -および δ -Alq₃の実測CP/MAS ¹³C 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Alq₃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]。

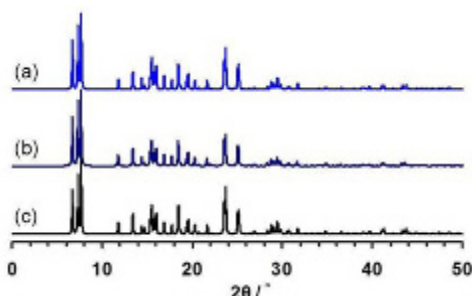


Fig. 2. Calculated X-ray profiles for crystal structures of δ -Alq₃; (a) proposed by Cölle et al., (b) proposed by Rajeswaran, et al., and (c) after the optimization of all the atomic coordinates for the Cölle's structure.

Rajeswaranらによって報告された δ -Alq₃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

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、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図. 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 -Alq₃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。

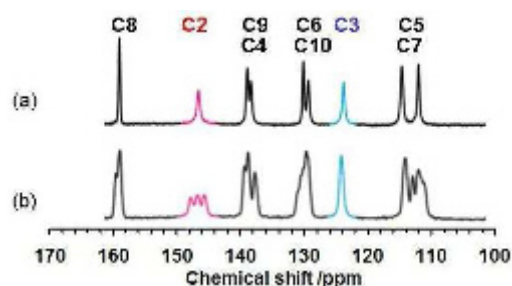


Fig. 3. Experimental CP/MAS ¹³C NMR spectra of (a) γ -Alq₃ and (b) δ -Alq₃. See Fig. 1 for the assignments of resonance lines.

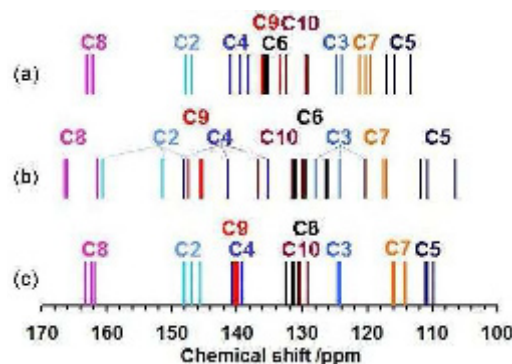


Fig. 4. NMR isotropic chemical shifts calculated from the crystal structures of (a) δ -Alq₃ proposed by Cölle et al., (b) that by Rajeswaran et al., and (c) that after the optimization of all the atomic coordinates for the Cölle's structure.

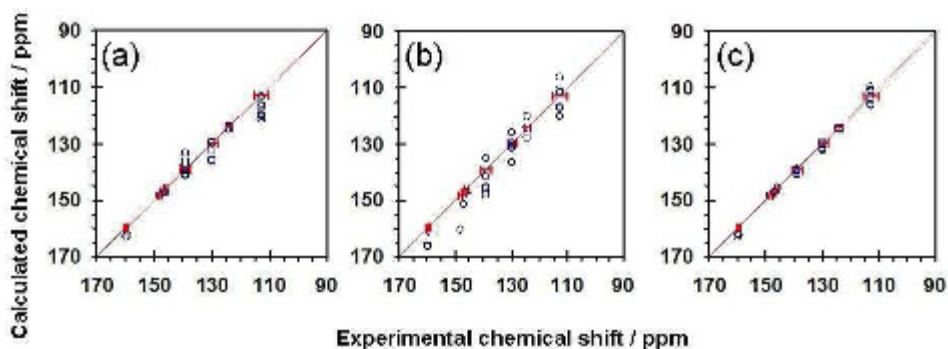


Fig. 5. Comparison of experimental and calculated isotropic chemical shifts of δ -Alq₃ crystals. For the chemical shift calculations, the structures proposed by Cölle et al. and by Rajeswaran et al. are used in (a) and (b), respectively. In (c), all the atomic coordinates are optimized for the Cölle's 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り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 -Alq₃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*.

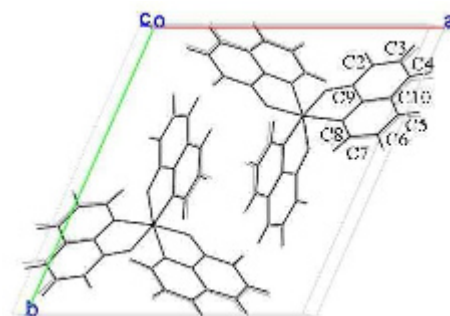


Fig. 6. Crystal structures of δ -Alq₃. Grey lines show the structure proposed by Cölle et al. Black lines show the structure after the optimization of all the atomic coordinates for the Cölle's structure.

YP4

光照射固体NMRによる光受容膜タンパク質ppR-pHtrII複合体の負の走光性発現に関わるTyr174の局所構造変化の解析

○日高徹郎¹, 友永雄也¹, 川村出¹, 和田昭盛², 須藤雄気³, 加茂直樹⁴, 内藤晶¹

¹横国大院・工学府, ²神戸薬科大・薬学部, ³名大院・理学研究科,

⁴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

○Tetsuro Hidaka¹, Yuya Tomonaga¹, Izuru Kawamura¹, Akimori Wada², Yuki Sudo³, Naoki Kamo⁴, Akira Naito¹

¹Graduate School of Engineering, Yokohama National University, Yokohama, Japan.

²College of Pharmaceutical Sciences, Kobe Pharmaceutical University, Hyogo, Japan.

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

Pharaonis phoborhodopsin (ppR) functions as a negative phototaxis receptor in *N.pharaonis*. ppR forms a complex with pHtrII, and this complex transmits the phototaxis signal into cytoplasm. However, initial step of the signal transduction mechanism induced by the retinal photoisomerization of ppR, has not yet well understood. In this study, we focused on the property at Tyr174 of F-helix in ppR and investigated dynamic structure of [1-¹³C]Tyr-, [¹⁵N]Pro-ppR and ppR/pHtrII 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 ppR changed to the M intermediate. Furthermore, it was observed that a local rather than overall structure of ppR 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。

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

*in situ*光照射-固体NMR, レチナルタンパク質, 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F helix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、負の走光性功能が失活したT204A変異体ppR^[1,2]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, 20-¹³C]retinal、[1-¹³C]Tyr、[¹⁵N]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、破碎、膜画分の可溶化、Ni²⁺-Agaroseによる精製を行い、[15, 20-¹³C]retinal、[1-¹³C]Tyr、[¹⁵N]Pro-ppRおよびnon-label pHtrIIを得た。[1-¹³C]Tyr、[¹⁵N]Pro-T204A^{ppR}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, 20-¹³C]retinal、[1-¹³C]Tyr、[¹⁵N]Pro-ppR/pHtrIIについて¹³C,¹⁵N REDOR (Rotational Echo Double Resonance) filter^[3]、*in situ*光照射¹³Cおよび¹⁵N 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チ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。

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



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

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[1-¹³C]Tyr174と[¹⁵N]Pro175の帰属

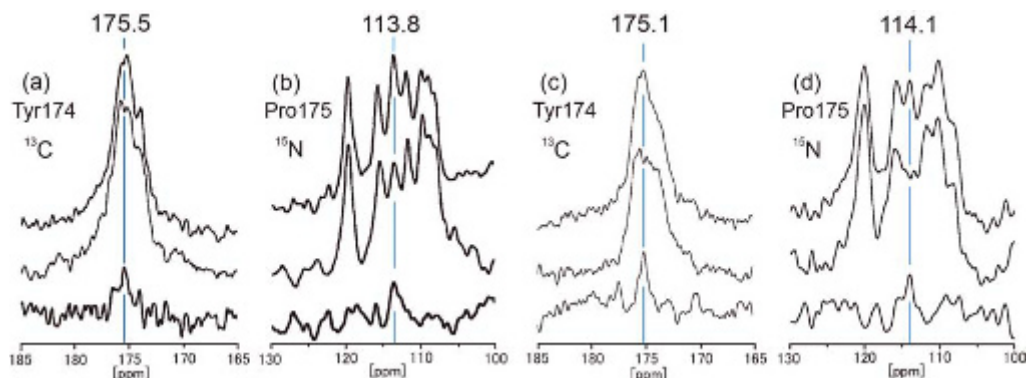


Fig. 2 REDOR filtered ¹³C, ¹⁵N NMR spectra of [1-¹³C]Tyr, [¹⁵N]Pro-ppR and ppR/pHtrII. Top, middle and bottom spectra are UNREDOR, REDOR and UNREDOR minus REDOR, respectively. (a), (b): ppR monomer. (c), (d) : ppR/pHtrII complex.

Fig. 2 (a), (b)に [1-¹³C]Tyr, [¹⁵N]Pro-ppR、Fig. 2 (c), (d)に[1-¹³C]Tyr, [¹⁵N]Pro-ppR/pHtrII complexの基底状態の¹³C REDOR filter測定の結果を示す。Fig. 2に示すように、ppR monomerではTyr174は175.5 ppm、Pro175は113.8 ppmで、pHtrII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[1-¹³C] Tyr174のREDOR filterを行い、174.7 ppmの信号をT204A monomerの[1-¹³C] Tyr174の信号に帰属し、T204A monomerはppR 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 ppR 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, 20-¹³C]retinal-ppR monomer および ppR/pHtrII complex におけるレチナールの C₂₀ の ¹³C 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 C₂₀ 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、[1-¹³C]

Tyr, [^{15}N]Pro-*ppR* および [^{1-13}C]Tyr, [^{15}N]Pro-*ppR/pHtrII* の *in situ* 光照射 ^{13}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 [^{1-13}C]Tyr174 の 175.1 ppm のピークと [^{15}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。

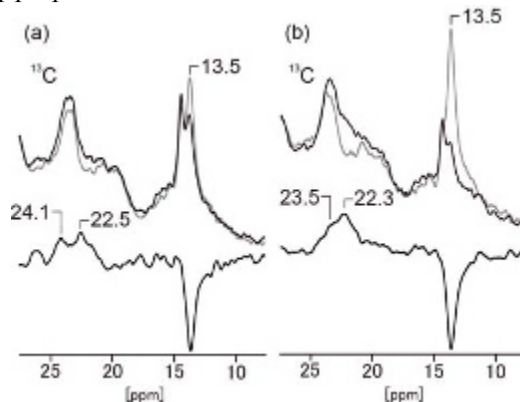


Fig. 3 *In situ* photo-irradiated ^{13}C CP MAS NMR spectra of [15 , $^{20-13}\text{C}$] retinal-*ppR* (left), *ppR/pHtrII* complex (right) at 253 K. Gray and black lines are ground states and M intermediate. The bottom spectra are difference spectra of ground state minus M intermediate.

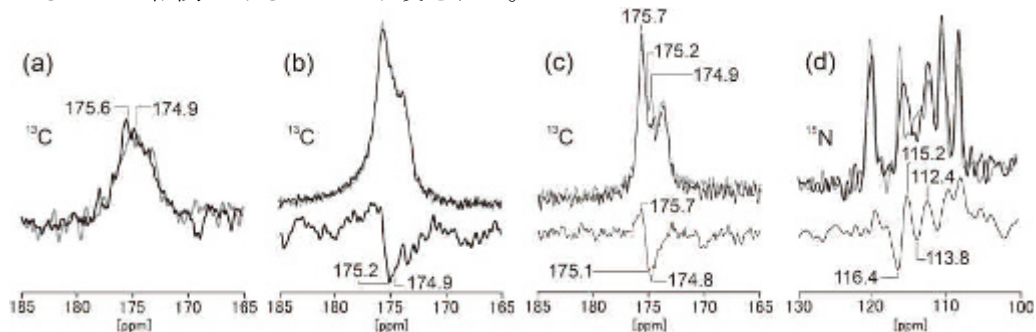


Fig. 4 *In situ* photo-irradiated ^{13}C CP, DD MAS spectra of [^{1-13}C]Tyr, [^{15}N]Pro-*ppR* monomer and *ppR/pHtrII* complex. (a) and (b) are DD and CP MAS spectra of *ppR* monomer, respectively. (c) and (d) are ^{13}C and ^{15}N CP MAS NMR spectra of *ppR/pHtrII*, respectively. The bottom spectra 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 *ppR* 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 *ppR* の信号伝達状態では F ヘルックスの *pHtrII* 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

⁶Li MAS NMRによるLiCoO₂の微視的機構の解析:
イオン拡散とスピン拡散

○野田 泰斗¹、水野 敬²、竹腰 清乃理¹

¹京大・理

²日本電子(株)

**⁶Li MAS NMR of LiCoO₂ from a microscopic viewpoint:
ion diffusion and spin diffusion**

○Yasuto Noda¹, Takashi Mizuno², and K. Takegoshi¹

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

²JEOL 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_xCoO₂ ($x > 1$), 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 LiCoO₂ 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。⁷Li 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。⁶Li 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 ⁷Li に比べて小さく分解能がよい。そこで ⁶Li をエンリッチした LiCoO₂ 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 ⁶Li 95% 標識した LiCoO₂ 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攪拌した後に蒸発させ前駆体を得た。前駆体を 400°C で 1 時間煅焼した後粉砕して 4 つに分割し、それぞれ 600°C、700°C、800°C、900°C で 10 時間本焼した。

⁶Li 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]の値より外部校正した。

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°C で本焼した試料の交換 NMR の結果を示す。0 ppm に LiCoO_2 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_2 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 へシフトするが、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 へシフトした。

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。 LiCoO_2 中のリチウムイオンの拡散係数は 100°C 上昇すると二桁以上大きくなり 400K で 10^{-11} 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ともに局所構造モデルを議論する。

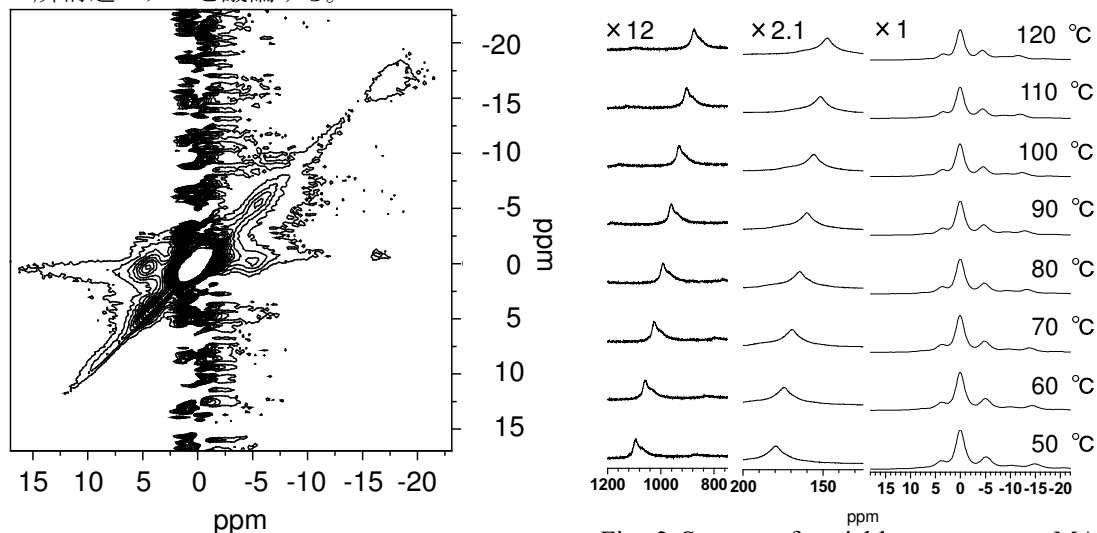


Fig. 1 Contour plot of 2D exchange ^6Li NMR obtained by Cryocoil MAS probe.

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

【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

○渡邊翔大, 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^{1,2,3}。しかし、拡散係数に関してはサンプル体積が大きいと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⁴。

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

ここで、 $a = 3\mu_0^2 \hbar^2 / 320\pi^2$ 、 μ_0 は真空の透磁率、 γ は核磁気回転比、 τ_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

液体物検査, 地磁気NMR, 緩和時間

○ わたなべしょうた, あかばひでお, いとぎきひでお

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⁵。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。

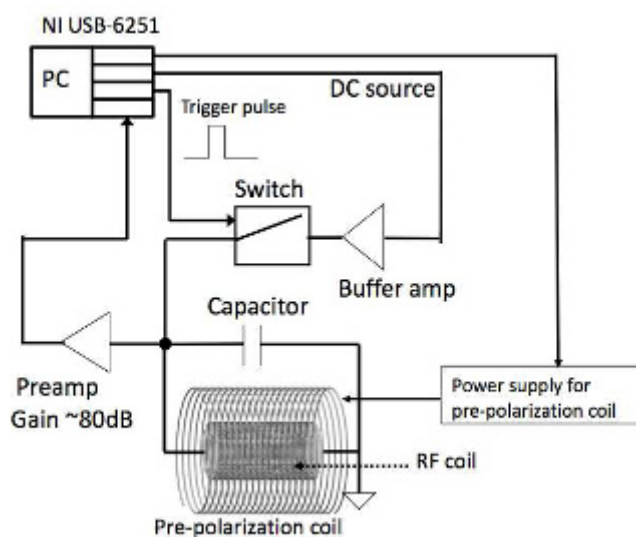


Fig.1 Schematic diagram of Earth's Field NMR Spectrometer. A TTL output from a multifunction data-acquisition (DAQ) board was used to control the pre-polarization coil. An analog voltage signal (DC source) from the DAQ was connected to a tank circuit via a buffer amplifier. A TTL output was used to control 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_{1P} 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_{1E} 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、 τ_E を一定とし τ_P を変化させた場合のFID信号の増減から推定する。 τ_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 τ_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間 T_{1E} の測定は、 τ_P を一定とし τ_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 μ 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_1 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_{1P} , T_{1E} 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。

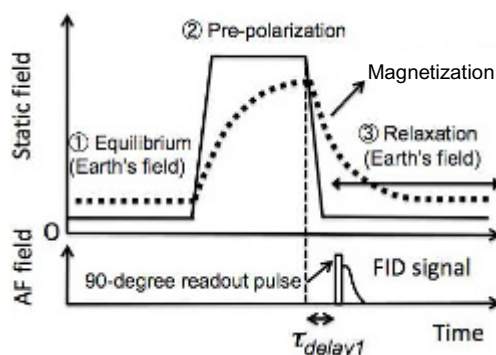


Fig.2 magnetization process during and after the pre-polarization pulse.

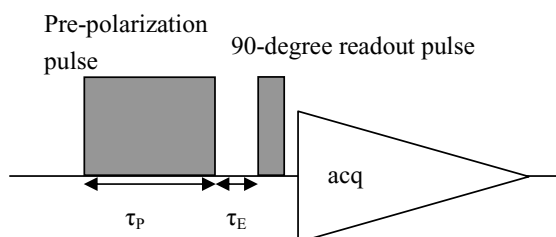


Fig.3 Pulse sequence for measuring T_1

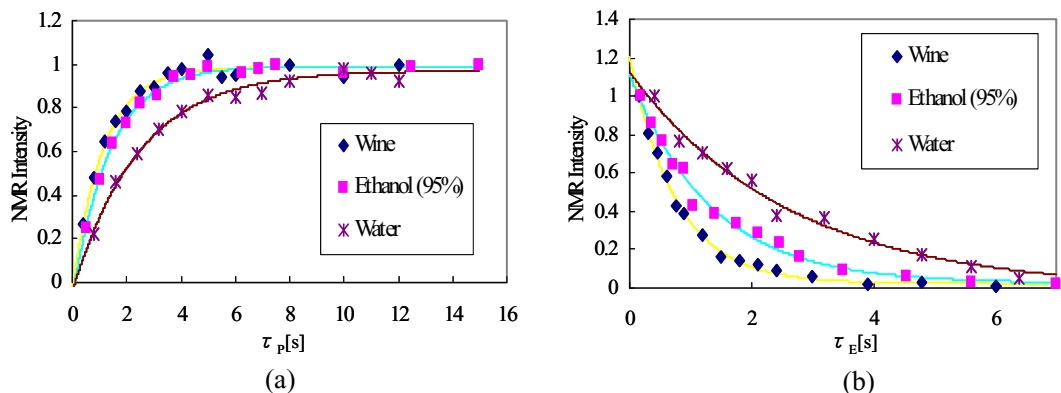


Fig.4 T_1 curve of NMR signal for Wine, Ethanol(95%) and Water during Pre-polarization pulse (35.2mT) (a), and in Earth's Field ($31.7 \mu T$) (b).The lines represent the fitted results.

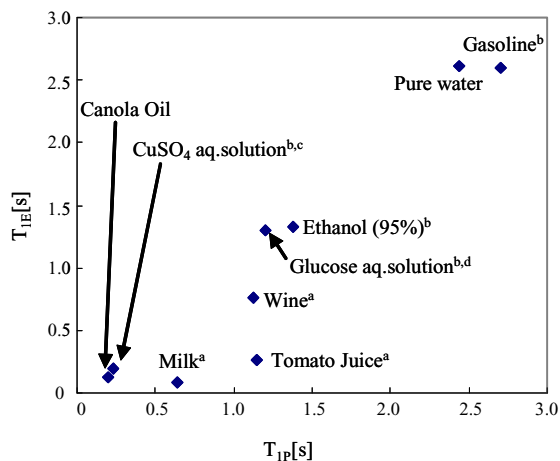


Fig.5 Relationship between T_{1P} and T_{1E} for various samples.

- a. Samples in unopened bottles.
- b. without degassing dissolved oxygen.
- c. concentration for $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ aqueous solution : $2.0 \mu M$
- d. concentration for glucose aqueous solution : $1.7 M$

【参考文献】

1. S. Kumar; *Appl. Magn. Reson.* **25**, 585-597, (2004)
2. 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)

Electromagnetic simulation of NQR remote detection○Yu Nakahara¹, Junichiro Shinohara¹, Hideo Itozaki¹ and Hideo Akaba¹¹Graduate 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 ¹⁴N を持つことから、その技術を応用したセキュリティ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。

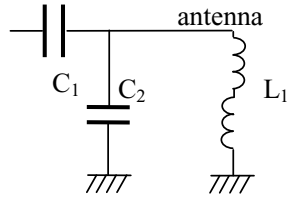
アンテナ構造

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。

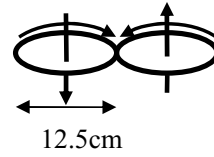
この構造のアンテナについてシミュレーションにより、送信磁場分布、NQR信号受信感度分布を検討した。

キーワード: NQR、シミュレーション、NQR核磁気モーメント

○なかはらゆう、しのはらじゅんいちろう、いとぎきひでお、あかばひでお



(a) Resonant circuit



(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ルとして計算する。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、 μ_0 は透磁率、 I は電流である。

$$B_x(x,y,z) = \frac{\mu_0 I}{4\pi} \int_0^{2\pi} R_a z \cos \varphi \frac{1}{\{(x-R_a \cos \varphi)^2 + (y-R_a \sin \varphi)^2 + z^2\}^{\frac{3}{2}}} d\varphi \quad (1)$$

$$B_y(x,y,z) = \frac{\mu_0 I}{4\pi} \int_0^{2\pi} R_a z \sin \varphi \frac{1}{\{(x-R_a \cos \varphi)^2 + (y-R_a \sin \varphi)^2 + z^2\}^{\frac{3}{2}}} d\varphi \quad (2)$$

$$B_z(x,y,z) = \frac{\mu_0 I}{4\pi} \int_0^{2\pi} R_a \frac{R_a \sin \varphi + R_a - x \cos \varphi - y \sin \varphi}{\{(x-R_a \cos \varphi)^2 + (y-R_a \sin \varphi)^2 + z^2\}^{\frac{3}{2}}} d\varphi \quad (3)$$

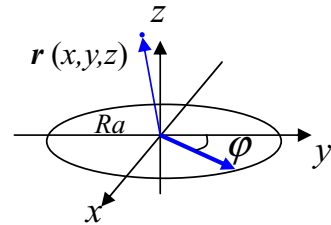


Fig.2 Simulation coordinate system

(2)受信磁場

NQR試料中のスピンの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を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。

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

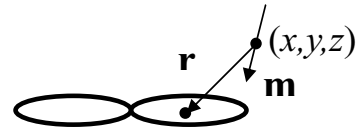


Fig.3 Dipole coordinate system

(3)磁気ダイポール

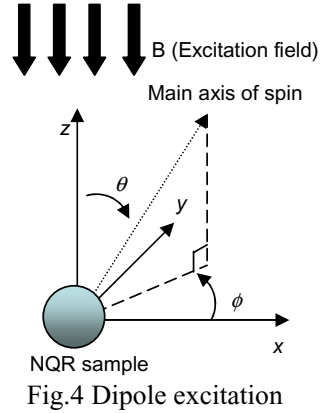
NQR 計測では、多結晶のサンプルを用いるのでスピンの主軸方向があらゆる方向へ一様に分散しているとみなせる。一般的に単結晶では、磁化ベクトルを直交座標で式 (5)のように示されるので、多結晶ではこのベクトルを全方向について積算することで磁気ダイポールの磁化ベクトルを計算することができる。積算した結果を式 (6)に示す^[1]。

$$M(\theta, \phi) = C \sin(\gamma B \tau \cos \theta) \begin{pmatrix} \sin \theta \cos \phi \\ \sin \theta \sin \phi \\ \cos \theta \end{pmatrix} \quad (5)$$

$$M_{\text{single}}(\theta, \phi) = \int_0^\pi d\theta \int_0^{2\pi} d\phi C \sin \theta \sin(\gamma B \tau \cos \theta) \begin{pmatrix} \sin \theta \cos \phi \\ \sin \theta \sin \phi \\ \cos \theta \end{pmatrix} \quad (6)$$

$$= \begin{pmatrix} 0 \\ 0 \\ C\sqrt{\pi/2\gamma B\tau} J_{3/2}(\gamma B\tau) \end{pmatrix}$$

$J_{3/2}$: 3/2 次のベッセル関数
 τ : 送信パルス幅
 B : 磁場強度



このように、多結晶ではスピンの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 ($B\tau$) 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樣な磁場を照射し、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°C に保ちながらパルス幅を 1 μ s 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。

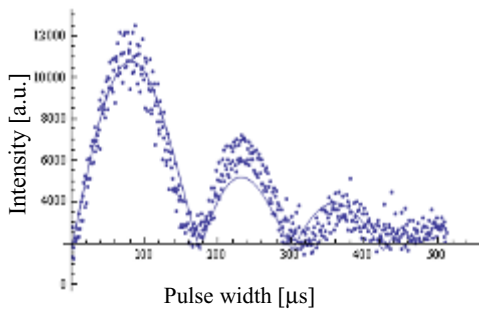


Table.1 Experimental parameters

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

Fig.5 Pulse width dependence of NQR signal intensity

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

Table.2 Fitting parameters

	Confidence interval[95%]	
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:5×5×5cm³)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。

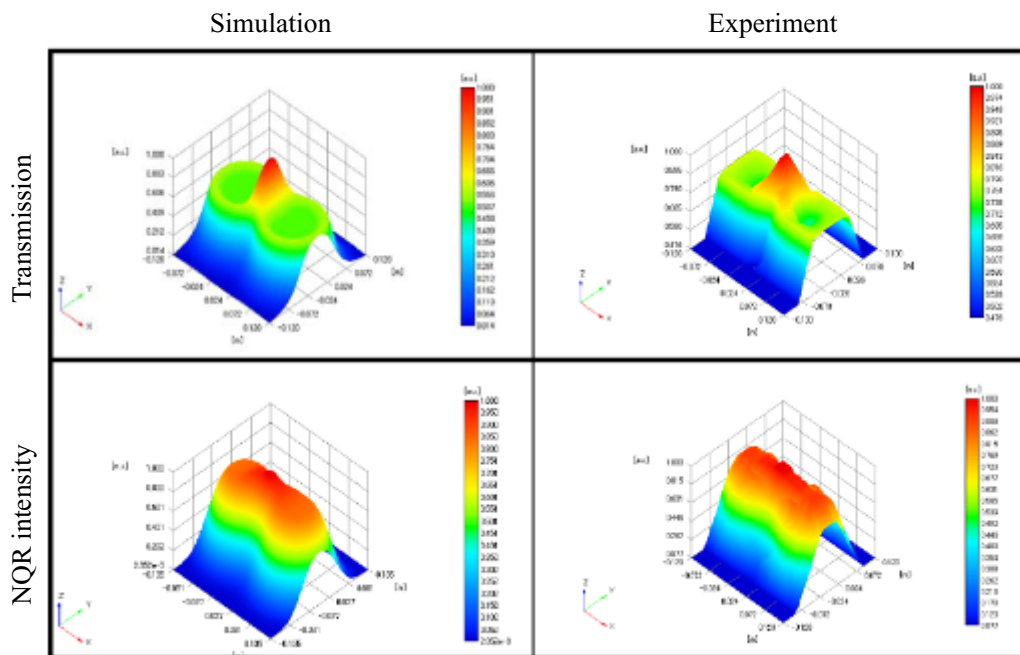


Fig.6 Comparison of simulation and experiment

Table.3 Experimental parameters

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。

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

ビオ・サバ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

廃水・廃棄物処理系バイオプロセスにおける¹³C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^{1,2}、伊達 康博^{1,2}、山澤 哲³、菊地 淳^{1,2,4,5}

¹横市院生命、²理研PSC、³鹿島技研、⁴理研BMEP、⁵名大院生命農

Data mining of solid to solution dynamics during ¹³C crystal cellulose degradation in the waste disposal bioprocess

○Tomohiro Iikura^{1,2}, Yasuhiro Date^{1,2}, Akira Yamazawa³, Jun Kikuchi^{1,2,4,5}

¹Grad. Sch. NanobioSci., Yokohama City Univ., ²RIKEN PSC, ³Kajima Corp., ⁴RIKEN BMEP,

⁵Grad. 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 ¹³C cellulose as a substrate into high temperature methane fermentation sludge used for residual food processing, and measured the sludge by solid NMR (¹³C-CP/MAS and ¹³C-¹H HETCOR) and by solution NMR (¹H and ¹³C) 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¹⁾、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²⁾、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³⁻⁶⁾。ここでは、バイオマスとして ¹³C 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 ¹³C/¹²C 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)。

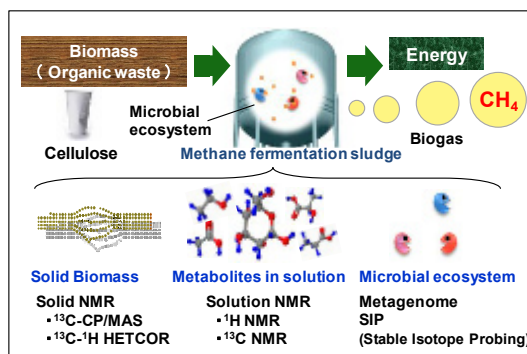


Fig.1 Strategy of data mining for biomass degradation in waste disposal bioprocess.

セルロース、アイソトポマー、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 ^{13}C 標識セルロースを添加し、 55°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 (^{13}C -CP/MAS, CT = 1 msおよび ^{13}C - ^1H HETCOR, CT = 50 μs)、分解代謝混合物を溶液NMR (^1H -watergateおよび ^{13}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⁷⁾。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 ^{13}C セルロースが菌体に代謝されたことによる ^{13}C - ^{13}C 、 ^{13}C - ^{12}C アイソトポマーと固体NMRシグナルの協動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.*, **82**, 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.*, **110**, pp87.
- 7) Mochida *et al.* (2009) *BMC Genomics*, **10**, e563.

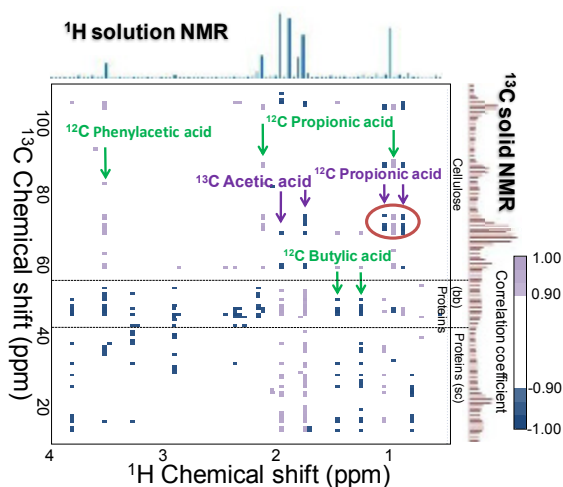


Fig.2 Covariant analysis between solid ^{13}C CP/MAS (vertical) and solution ^1H (horizontal) data matrices during dynamic changes of biomass degradation in waste disposal bioprocess.

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

○篠 阿弥宇¹, 坪井 裕理², 林 裕志³, 菊地 淳^{1,3,4,5}

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

Correlation exploration of pretreatment conditions for application of biomass profiling.

○Amiu Shino¹, Yuuri Tsuboi², Hiroshi Hayashi³, Jun Kikuchi^{1,3,4,5}

¹RIKEN PSC, ²RIKEN ASI, ³Grad. Sch. NanoBio., Yokohama City Univ., ⁴Grad. Sch. Bioagri., Nagoya Univ., ⁵RIKEN 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 ¹H-¹³C 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^{1, 2)}。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、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^{3, 4)}。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⁵⁾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にした。

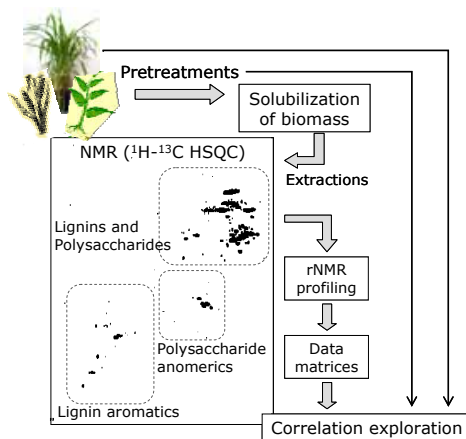


Fig. 1 Scheme of our biomass profiling strategy.

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, つばい 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碎後、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、 ^1H NMR および ^1H - ^{13}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 rNMR⁶⁾ を用いてマトリクス化し、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 [Δ], 収穫ギニアグラス [\diamond], 立枯れギニアグラス [\circ] 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 \times 9 条件 \times 164ROI をデータマトリクス化し、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性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).
- 2) 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。

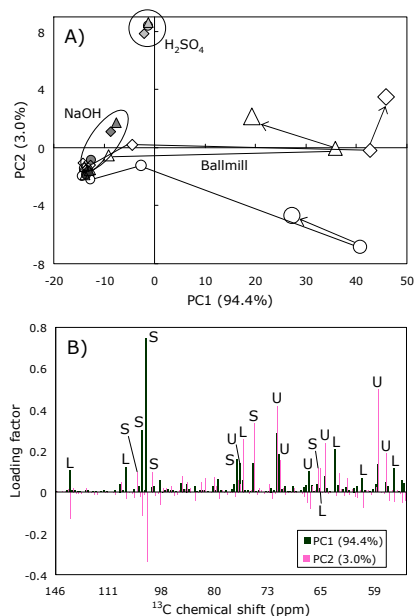


Fig. 2 PCA of 2D HSQC-derived 27 data matrices for pretreated plant biomass. A: Score plot. B: Loading plot. (S: Saccharide, L: Lignin, U: Unknown)

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¹, 益田祐一¹

¹お茶大院・理

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

○Tomoko Nakano¹, and Yuichi Masuda¹

¹Department 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 ¹⁵N-¹H 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 by the steric repulsion and to size of the conjugate system.

【背景・目的】

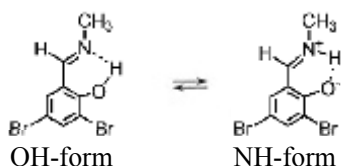
水素結合が関与するプロトン移動(PT)は、酸-塩基反応の素過程として、化学反応や生命科学反応において普遍的な過程である。通常、電子的基底状態間でのPT過程の反応障壁は、反応系と溶媒の再配列エネルギー程度であるため、溶媒の効果が反応を支配する大きな要因となる。このため、PT反応ダイナミクスに対する、反応ポテンシャル、あるいは、トンネル相互作用の、溶媒に起因したゆらぎの効果に関しては、種々のモデルが提唱されるとともに、多くの計算機シミュレーションがおこなわれてきた¹⁾。一方、これらに対する実験的検証は、光励起状態を介したUV過渡吸収を用いた研究²⁾によるものに限られている。しかしながら、このような系では多くの場合、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。

Scheme1に示すような $-N^+ \cdots H \cdots O^- \rightleftharpoons -N \cdots H-O-$ 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³⁾、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, まずだゆういち

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、 Schiff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_1 の測定を組み合わせることにより、 $N \cdots H \cdots O$ 系における水素結合の構造、プロトンダイナミクス、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。



Scheme 1 : Tautomeric equilibrium of Schiff bases

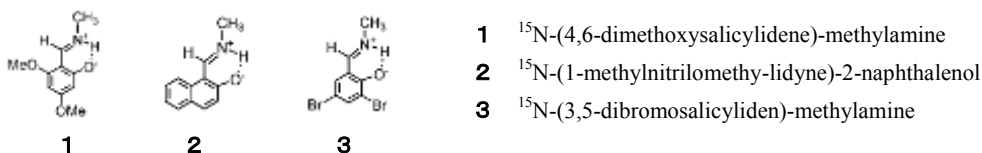
【方法】

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_1)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_{NH} 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_{PT} 、 τ_R とすると、 T_1 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_R 、 τ_{PT} 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⁴⁾下記(Scheme 2)の3種類の ^{15}N をラベルした Schiff塩基を対象とした。そして、 T_1 の測定から ^{15}N - 1H 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。



Scheme 2 : Structures of the studied compounds

1H との磁気双極子-双極子相互作用による ^{15}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、 τ_R)に依存する。 τ_R (ここでは

N-H ベクトルについての回転相関時間が τ_{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 $T_1^{dd}(\text{NH})$ 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、 $\tau_R' = P_{\text{NH-form}}\tau_{R(\text{NH})} + P_{\text{OH-form}}\tau_{R(\text{N}\dots\text{H})}$ とする。

$$T_1^{dd}(\text{NH})^{-1} = \left(\frac{\mu_0}{4\pi}\right)^2 \gamma_H^2 \gamma_N^2 \hbar^2 \tau_R' (P_{\text{NH-form}} r_{\text{NH}}^{-6} + P_{\text{OH-form}} r_{\text{N}\dots\text{H}}^{-6}) \quad [1]$$

$$T_1^{dd}(\text{NH})^{-1} = \left(\frac{\mu_0}{4\pi}\right)^2 \gamma_H^2 \gamma_N^2 \hbar^2 \tau_R' (P_{\text{NH-form}} r_{\text{NH}}^{-3} + P_{\text{OH-form}} r_{\text{N}\dots\text{H}}^{-3})^2 \quad [2]$$

【結果・考察】

CD_2Cl_2 , CD_3CN 中で ^1H , ^{13}C , ^{15}N 核の NMR を測定した。実測値 $T_1^{dd}(\text{NH})$ は、 ^{15}N 濃縮した試料およびその ^2D 置換体の ^{15}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 $\tau_{R(\text{NH}, \text{N}\dots\text{H})}$ は、 ^{13}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} 、 $r_{\text{N}\dots\text{H}}$ は、分子軌道計算(MP2/6-311G(d,p))から vibrational averaging の効果⁵⁾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⁶⁾。これらの値を用い、eq 1, 2 の極限式から予測される $T_1^{dd}(\text{NH})$ 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。

Table 1 : Summary of data

Compound	1		2	3
solvent	CD_2Cl_2	CD_3CN	CD_2Cl_2	CD_2Cl_2
$^1J_{\text{NH}}$ (Hz)	-49.8	-46.4	-60.6	-14.4
P_{NH}	0.55	0.51	0.67	0.16
r_{NH} ^{※a} (Å)	1.068	1.068	1.046	1.085
$r_{\text{N}\dots\text{H}}$ ^{※a} (Å)	1.689	1.689	1.655	1.698
$\tau_{R(\text{NH})}$ (s)	1.43E-11	1.23E-11	1.23E-11	9.19E-12
$\tau_{R(\text{N}\dots\text{H})}$ (s)	1.45E-11	1.24E-11	1.25E-11	8.96E-12
Observed values of $T_1^{dd}(\text{NH})$ (s)	32.6	43.2	42.0	107
Expected values of $T_1^{dd}(\text{NH})$ ^{※b, c} (s) [$\tau_R \ll \tau_{PT}$]	35.8	44.2	31.0	151
Expected values of $T_1^{dd}(\text{NH})$ ^{※b, c} (s) [$\tau_R \gg \tau_{PT}$]	44.7	56.3	36.4	206

^{※a} obtained by ab initio MO calculations : MP2(6-311++G(d,p)).

^{※b} calculated with r_{NH} and τ_R according to equation [1] or [2].

^{※c} 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 (ΔG) 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

$\tau_{PT} \gg 1.43 \times 10^{-11}$ s であることがわかった。一方、**2** は 2~3 kJ/mol の ΔG 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べ PT の方が速い。さらに、 $\tau_{R(NH)}$ は **1** で 1.43×10^{-11} s、**2** で 1.23×10^{-11} 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。

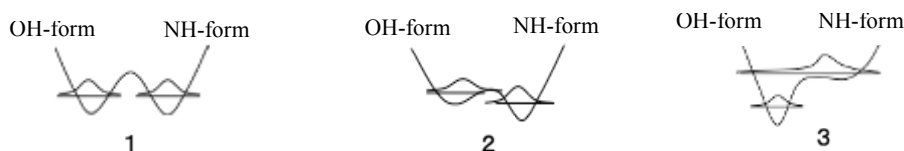


Figure 1 : Proposed PT potentials

1 については CD_2Cl_2 に加え、誘電率の異なる CD_3CN 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

¹³C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^{1,2}、大木出²、古板恭子¹、池上貴久¹、深田はるみ³、
白川昌宏⁴、藤原敏道¹、児嶋長次郎^{1,2}

¹阪大・蛋白研、²奈良先端大・バイオ、³阪府大・生命環境、
⁴京大・工

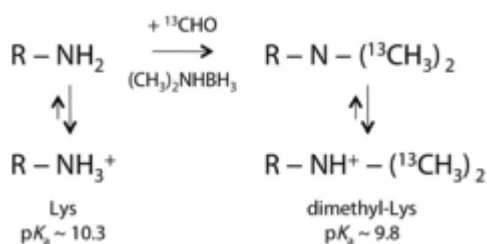
A method developed for analysis of salt bridges mediated by lysine side chains using ¹³C-methyl groups as probes

○Yoshikazu Hattori^{1,2}, Izuru Ohki², Kyoko Furuita¹, Takahisa Ikegami¹, Harumi Fukada³,
Masahiro Shirakawa⁴, Toshimichi Fujiwara¹, Chojiro Kojima^{1,2}

¹Institute for Protein Research, Osaka University, ²Graduate School of Biological Sciences, Nara Institute of Science and Technology, ³Graduate School of Life and Environmental Sciences, Osaka Prefecture University, ⁴Graduate School of Engineering, Kyoto University.

¹³C-methylation of lysines is known as an effective chemical modification for introduction of ¹³C-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 ¹³C-methyl groups can be used as probes to study electrostatic interactions of lysines. Here we show the correlation between the chemical shift values of ¹³C-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¹³Cメチル化は、化学修飾によりリジン側鎖に二つの¹³C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、¹³Cメチル基をプローブとして、



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、 ^1H - ^{13}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間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 ^{15}N 標識体、YUH, Dsk2p_{UBA}およびp62_{UBA}の非標識体を大腸菌の発現系で調製した。 ^{13}C メチル化反応には、 ^{13}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、 ^1H - ^{13}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_{UBA}およびp62_{UBA}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 ^1H 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_{UBA}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。

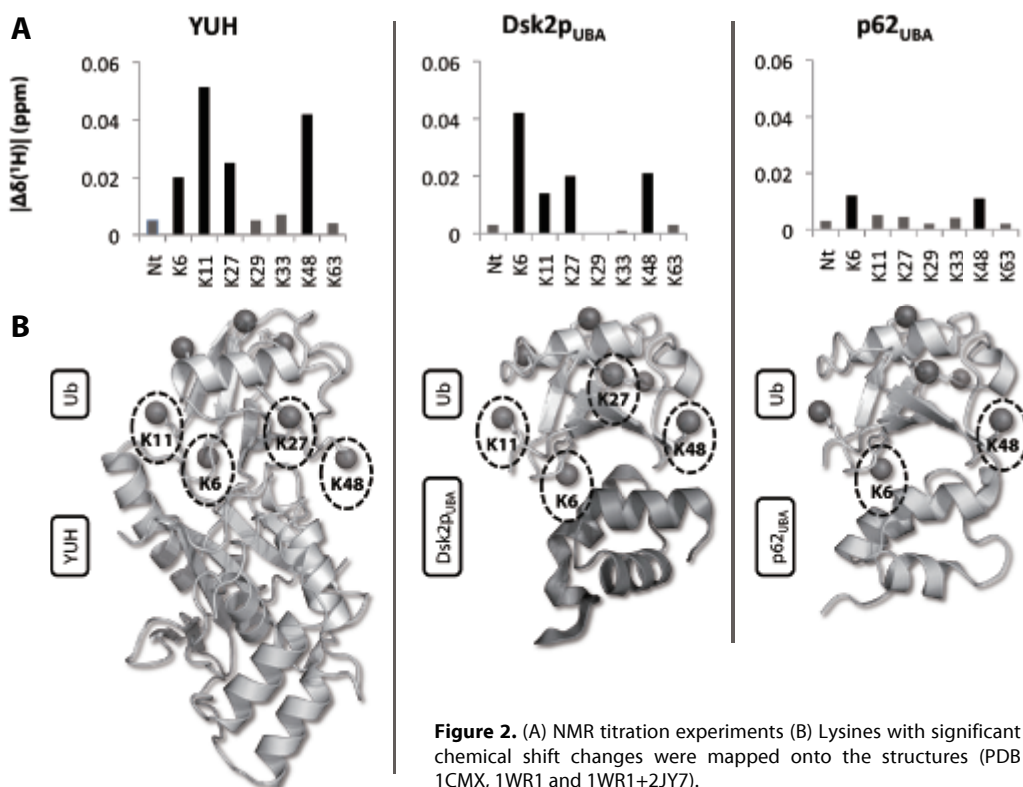


Figure 2. (A) NMR titration experiments (B) Lysines with significant chemical shift changes were mapped onto the structures (PDB 1CMX, 1WR1 and 1WR1+2JY7).

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 interaction between YUH and Ub or methylated Ub obtained from ITC

	Ub	methylated Ub
N	0.85 ± 0.05	0.90 ± 0.07
$K_d/\mu\text{M}$	9.4 ± 0.3	5.7 ± 0.1
$\Delta H/\text{kcal mol}^{-1}$	-4.0 ± 0.3	-4.0 ± 0.3
$\Delta S/\text{cal K}^{-1} \text{mol}^{-1}$	9.5	10.5

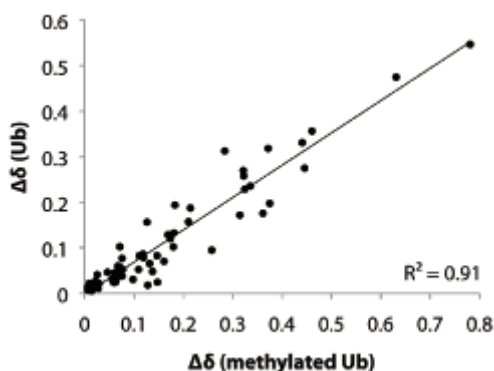


Figure 3. Correlation plots of chemical shift changes of backbone NH of Ub and methylated Ub caused by the presence of YUH

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 ^{13}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 ^1H - ^{13}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 $\text{p}K_a$ 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。

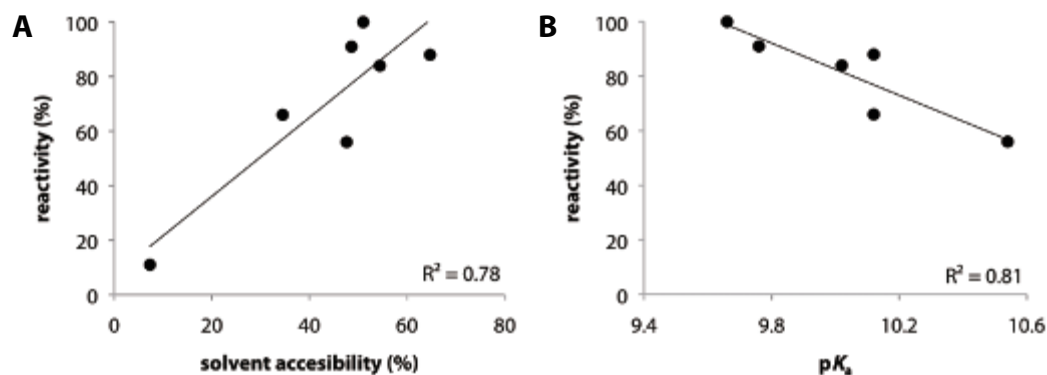


Figure 4. Correlation plots between reactivity of methylation and solvent accessibility (A) or $\text{p}K_a$ values of methylated lysines (B)

化学シフト値と塩橋の相関

Ubに加えてFKBP12についても ^1H - ^{13}C HSQCスペクトルの帰属が完了した (Figure 5)。FKBP12の ^1H - ^{13}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 ^1H 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 ($\text{COO}^- \cdots \text{NH}_3^+$) に依存して、 ^1H 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_a 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。

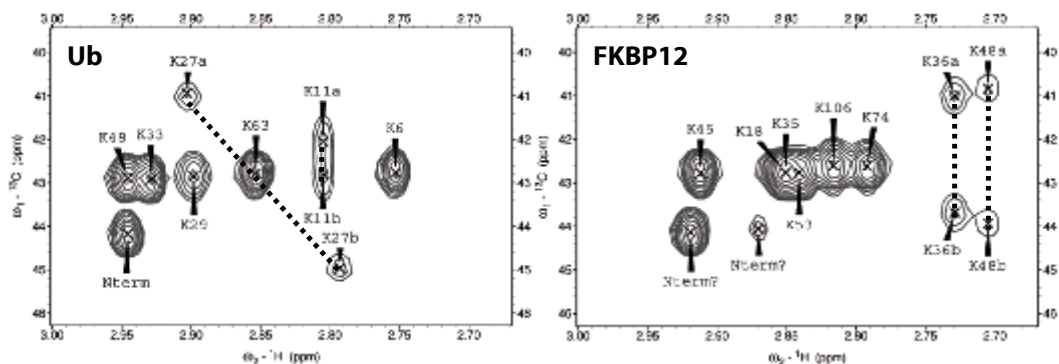


Figure 5. ^1H - ^{13}C HSQC spectra of methylated Ub and methylated FKBP12 (500 MHz, 303 K, pH 6.8)

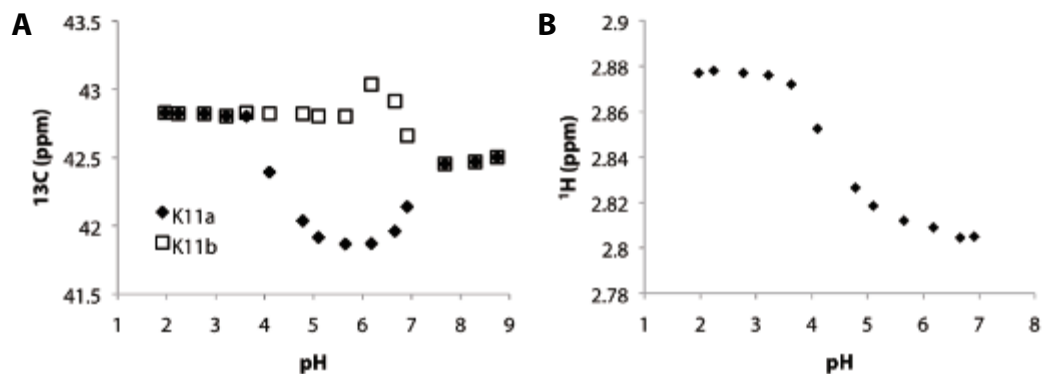


Figure 6. ^{13}C (A) and ^1H (B) chemical shift changes of methylated K11 of Ub induced by pH changes

[参考文献]

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

Structural Analysis with RDC induced by Host-Guest Chemistry

○Osamu Morohara¹, Daishi Fujita¹, Sota Sato¹, Yoshiki Yamaguchi², Koichi Kato^{3,4,5}, and Makoto Fujita^{1,5}

¹Department of Engineering, The University of Tokyo, Tokyo, Japan. ²Riken, Saitama, Japan.

³Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University, Aichi, Japan.

⁴Okazaki Institute for Integrative Bioscience, Aichi, Japan. ⁵CREST

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が誘起されるのではないかと考えた (Fig. 2)。

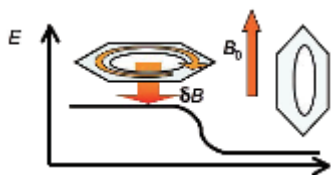


Fig. 1 Energy difference of aromatic molecule in a magnetic field.

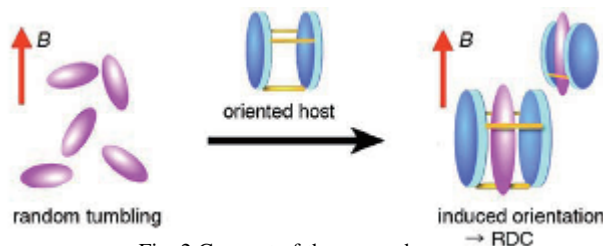


Fig. 2 Concept of the research.

RDCは、300から920 MHzまでのNMR装置を使用し、¹³C-coupled ¹H-¹³C HSQCまたは¹H-coupled ¹³C-¹H HETCOR測定により¹H-¹³C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(¹J_{CH})と、磁場強度に依存するRDC値(¹D_{CH})との和である。¹D_{CH}は磁場強度Bの2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 ^1H - ^{13}C について得られた $^1D_{\text{CH}}$ と B^2 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。

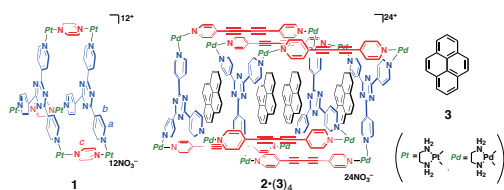


Fig. 3 Structures of **1**–**3**.

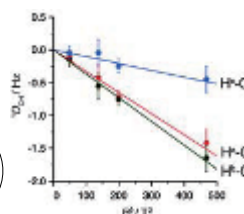


Fig. 4 $^1D_{\text{CH}}$ vs. B^2 plot for **1**.

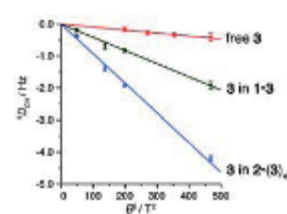


Fig. 5 $^1D_{\text{CH}}$ vs. B^2 plot for **3**. Averaged values are plotted.

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-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-NH₂) **4**を選び、ホスト錯体**5** (Fig. 6)に包接したところ、 ^1H 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、($^1J_{\text{CH}} + ^1D_{\text{CH}}$)と B^2 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-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。

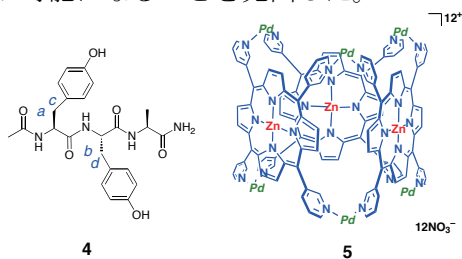


Fig. 6 Structures of **4** and **5**.

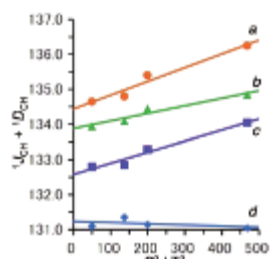


Fig. 7 ($^1J_{\text{CH}} + ^1D_{\text{CH}}$) vs. B^2 plot for **4** in **5**.

RDC, ホスト-ゲスト化学

〇もろはらおさむ, ふじただいし, さとうそなた, 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¹, 池谷 鉄兵^{1,2}, 土江 祐介¹, 三島 正規¹,
Daniel Nietlispach³, Markus Waelchli⁴, Peter Guentert²,
Brian O. Smith⁵ and 伊藤 隆¹

¹ 首都大学東京(東京都立大), ²Institute of Biophysical Chemistry, J. W. Goethe-University Frankfurt, ³Department of Biochemistry, University of Cambridge, ⁴ブルカーバイオスピン, ⁵Division of Biochemistry and Molecular Biology, University of Glasgow

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

Yoshiki Shigemitsu¹, Yuusuke Tsuchie¹, Teppei Ikeya^{1,2}, Masaki Mishima¹, Daniel Nietlispach³, Markus Waelchli⁴, Peter Guentert², Brian O. Smith⁵ and Yutaka Ito¹

¹Department of Chemistry, Tokyo Metropolitan University; ²Institute of Biophysical Chemistry, J. W. Goethe-University Frankfurt; ³Department of Biochemistry, University of Cambridge; ⁴Bruker BioSpin; ⁵Division 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 ¹³C/¹⁵N-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 restraints.

[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: ○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 づえるひり, ペーたー ぎゅんたーと, ぶらいあん おー すみす, いう 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・膺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 $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 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°C で測定を行った. 4D $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ separated NOESY 測定は, 従来法 $512^*(^1\text{H}^{\text{N}}) \times 32^*(^1\text{H}) \times 24^*(^{13}\text{C}) \times 8^*(^{15}\text{N})$ 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, $512^*(^1\text{H}^{\text{N}}) \times$

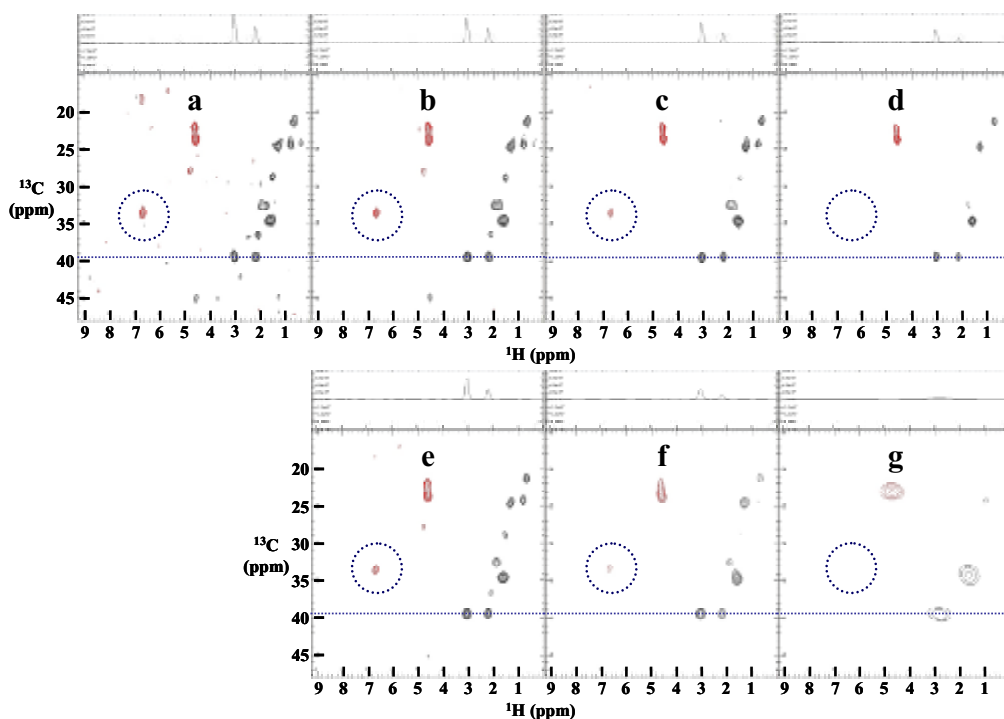


Figure 1: Contour plots of $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ slices ($^1\text{H}^{\text{N}}$ chemical shift: 7.678 ppm, ^{15}N chemical shift: 121.16 ppm) from seven 4D $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ separated NOESY spectra processed with 3D MaxEnt from full (reference) data (a), simulated data with 1/4 (b), 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), $512 * (^1\text{H}^{\text{N}}) \times 768$ random sampling complex points (データ③, 1/16), $512 * (^1\text{H}^{\text{N}}) \times 192$ 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 $512 * (^1\text{H}^{\text{N}}) \times 21 * (^1\text{H}) \times 15 * (^{13}\text{C}) \times 5 * (^{15}\text{N})$ (データ⑤, 1/4), $512 * (^1\text{H}^{\text{N}}) \times 13 * (^1\text{H}) \times 10 * (^{13}\text{C}) \times 3 * (^{15}\text{N})$ (データ⑥, 1/16), $512 * (^1\text{H}^{\text{N}}) \times 8 * (^1\text{H}) \times 6 * (^{13}\text{C}) \times 2 * (^{15}\text{N})$ (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。

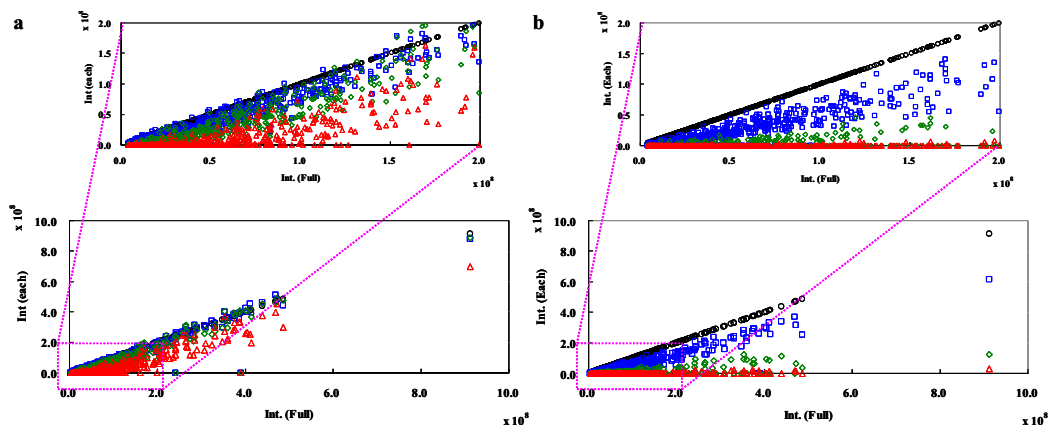


Figure 2: NOE cross peak intensities in various 4D $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ separated NOESY spectra. **a.** Comparison of NOE cross peak intensities between reference (data①) and various *nonlinearly* sampled data sets. **b.** Comparison of NOE cross peak intensities between reference (data①) and various *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 $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ separated NOESY 測定のうちそれぞれ①~⑦のデータについて 3D MaxEnt で処理したものであるから、 $^1\text{H}^{\text{N}}$: 7.678 ppm, ^{15}N : 121.16 ppm の化学シフトに相当する 2D $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ 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. サンプル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* とサンプル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う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.

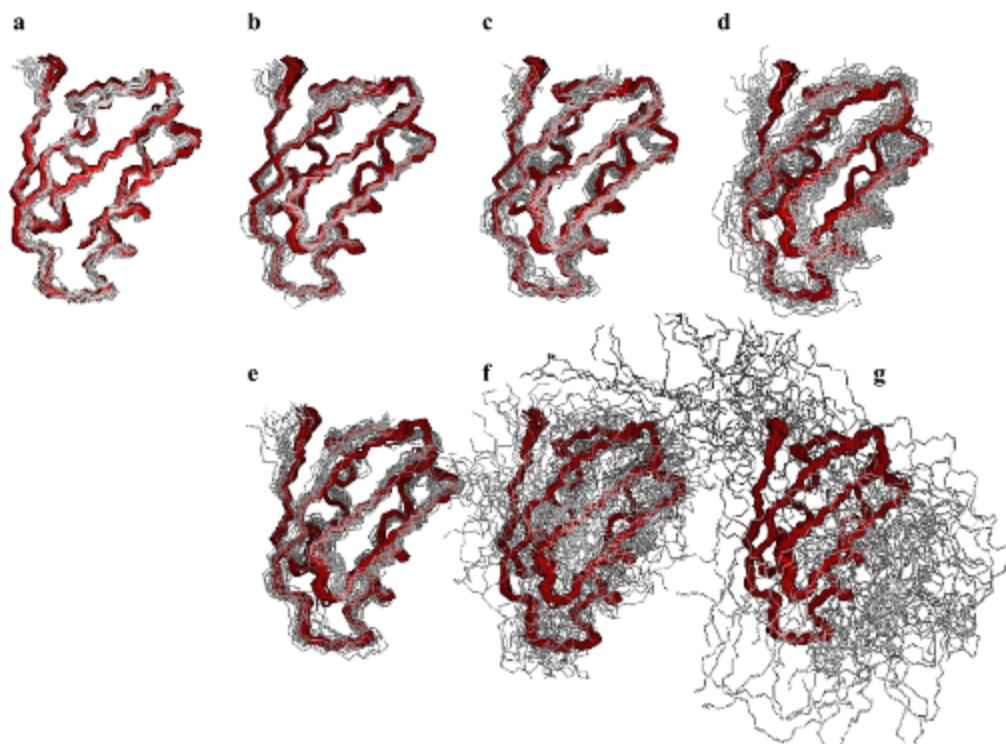


Figure 3: Superposition of 20 final structures calculated based on the NOE-derived distance restraints from seven 4D ¹³C/¹⁵N separated NOESY spectra processed with 3D MaxEnt from full (reference) data (a), simulated data with 1/4 (b), 1/16 (c), 1/64 (d) *nonlinear* sampling points and simulated data 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¹, 小橋川敬博², 原田幸祐¹, 小椋賢治², 横川真梨子², 稲垣冬彦²

¹ 北大・生命科学院

² 北大・先端生命

Phosphoinositide-incorporated Nanodisc: A tool for studying protein-membrane interactions

○Naoki Yoshida¹, Yoshihiro Kobashigawa², Kohsuke Harada¹, Kenji Ogura², Mariko Yokogawa², and Fuyuhiko Inagaki²

¹ Lab. Struct. Biol. Grad. Sch. Life Sci. Hokkaido Univ.

² 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 protein-phosphoinositides (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.

背景

タンパク質-脂質相互作用解析を行う場合に、脂質二重膜モデルとしてミセル、バイセル、リポソームが使われてきた。しかし、ミセル及びバイセルは界面活性剤が入っているため、タンパク質を変性させる可能性があり使用できるタンパ

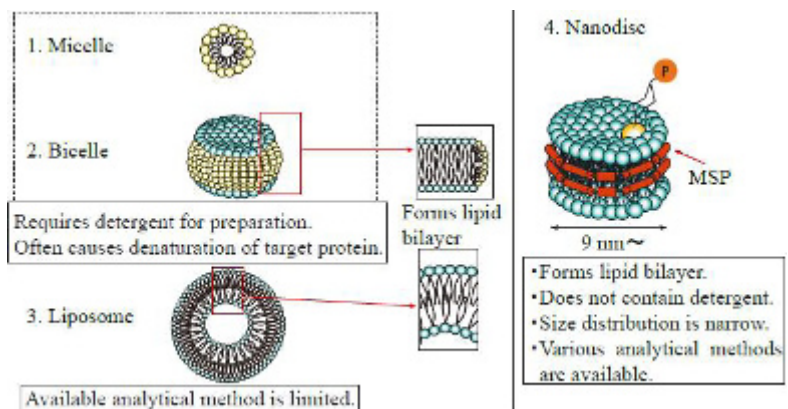


Fig1. Feature of lipid bilayer mimetics used for studying protein-lipid interaction.

Key word: phox, PX domain, Nanodisc

○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 OH 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)P₂, PI(3,5)P₂, PI(4,5)P₂, PI(3,4,5)P₃ 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^{phox} 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 ³¹P 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。

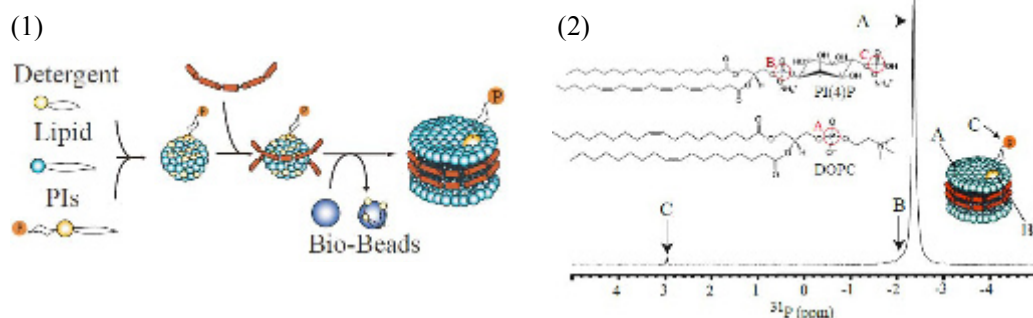


Fig2. (1) Schematic representation of preparation of PI-incorporated Nanodisc.
(2) ³¹P NMR spectrum of PI(4)P-incorporated Nanodisc.

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^{phox} 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)P₂, PI(3,5)P₂, PI(4,5)P₂, PI(3,4,5)P₃ 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^{phox}PX ドメインとプルダウンアッセイを行った。その結果、p47^{phox}PX ドメインは PI(3)P, PI(3,4)P₂, PI(3,5)P₂, PI(3,4,5)P₃ 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)P₂ 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。

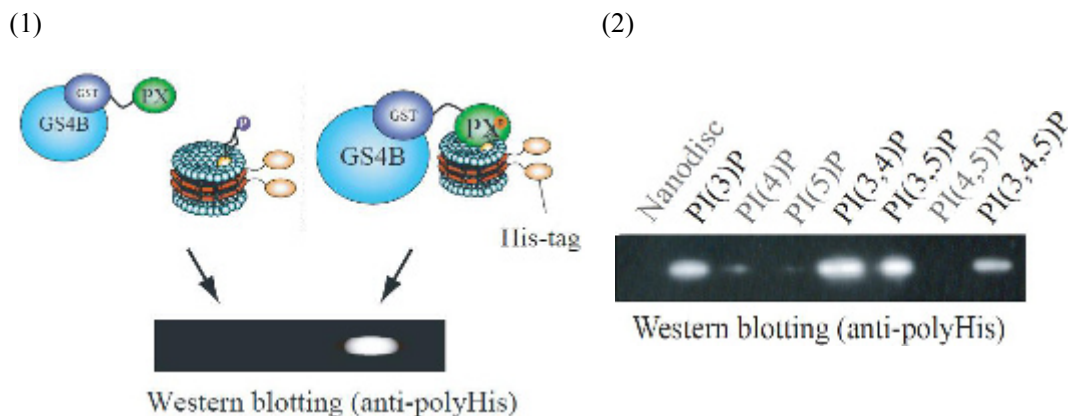


Fig3.

(1) Schematic representation of the pull down binding assay using PIs-incorporated Nanodisc
(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^{phox} 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)P₂ 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)P₂ 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 K_d=20 nM、及び K_d=6 μM 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

^{15}N で標識した p47^{phox} PX ドメインに PI (3,4)P₂ 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、 ^1H - ^{15}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)P₂ 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、スピンドラブ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。

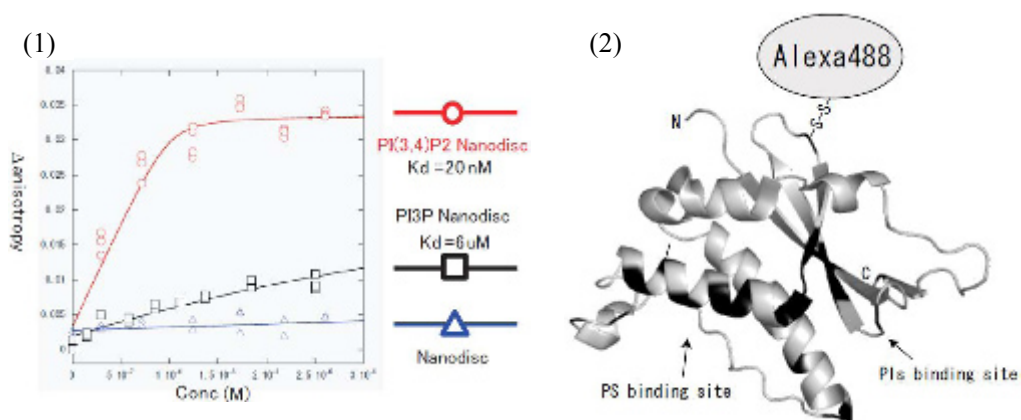


Fig4.

(1) Fluorescence polarization measurement of Alexa488 labeled p47^{phox} PX domain
(2) ^1H - ^{15}N HSQC-based-NMR titration experiment. The residues whose signal intensity was reduced upon the addition of PI(3,4)P₂ 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¹, 北川千尋², 中富晶子², 大木進野¹

¹北陸先端大学院大・マテリアルサイエンス、²北大・院・理

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

○Dasol Hwang¹, Chihiro Kitagawa², Akiko Nakatomi², and S. Ohki¹

¹Japan Advanced Institute of Science and Technology (JAIST), ²Hokkaido University

Calmodulin (CaM) is a Ca²⁺-binding protein to regulate various enzymes. Normally, one CaM molecule binds four Ca²⁺ ions with increasing Ca²⁺ concentration in cells. However, *Saccharomyces cerevisiae* (yCaM) binds only three Ca²⁺ 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 ¹H-¹⁵N HSQC, ¹H-¹³C HSQC, and ¹¹³Cd-NMR.

【背景】カルモジュリン

(CaM) は真核生物細胞に普遍的に存在するCa²⁺結合タンパク質である。Ca²⁺を結合したCaMが多様な標的酵素を活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Ca²⁺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

は変異によりCa²⁺結合能を欠いている。それにも関わらず、yCaMのEF4のFヘ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Ca²⁺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Ca²⁺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



Fig. 1. Amino acid sequences of CaM and its variants employed in this study. Only EF4 is summarized in this figure. Boxes indicate Ca²⁺-binding loop.

カルモジュリン, カドミウム, メチオニン選択標識

○ ふあん 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 INOVA 750を用い、298Kで行った。構造情報を得るために、均一 ^{15}N 標識試料の ^1H - ^{15}N HSQCと ^{13}C -methyl Met]選択標識試料の ^1H - ^{13}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^{2+} の代わりに使われている ^{113}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 Δ 4とCCM Δ 5が結合する Ca^{2+} 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 Δ 4とCCM Δ 5は全長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 ^{113}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 ^{113}Cd を結合するが、標的ペプチド非存在下の ^{113}Cd -NMRスペクトルでは Ca^{2+} 高親和性のEF3とEF4に結合した Cd^{2+} 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^{2+} 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^{2+} 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 (Fig. 2 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^{2+} 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。

発表では、均一 ^{15}N 標識試料の ^1H - ^{15}N HSQCと ^{13}C -methyl Met]選択標識試料の ^1H - ^{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。

【参考文献】

- [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.

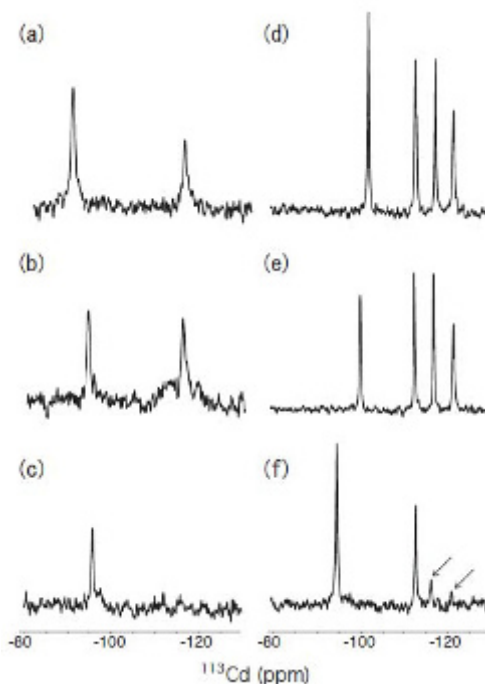


Fig. 2. ^{113}Cd -NMR spectra of CaM and its variants. Left (a, b, and c) and right (d, e, and f) indicate CaM (or variant) without and with skMLCK peptide, respectively. CCM0 (a and d), CCM Δ 4 (b and e), and CCM Δ 5 (c and f).

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¹, 大澤匡範¹, 竹内恒², 嶋田一夫^{1,2}

¹東大薬

²BIRC/AIST

Structural basis underlying the dual gate properties of KcsA

○Shunsuke Imai¹, Masanori Osawa¹, Koh Takeuchi², and Ichio Shimada^{1,2}

¹ Grad. Sch. Pharm., The Univ. of Tokyo

² 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^+ titration experiment revealed that the activated and inactivated states correspond to the K^+ -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^+ 透過路上に K^+ の透過を阻むhelix bundle

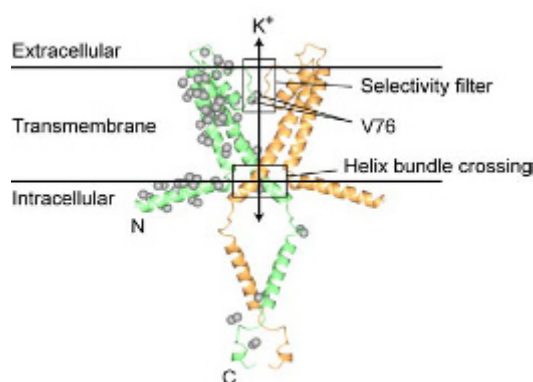


Fig.1 Structural model of KcsA

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⁺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ン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)。

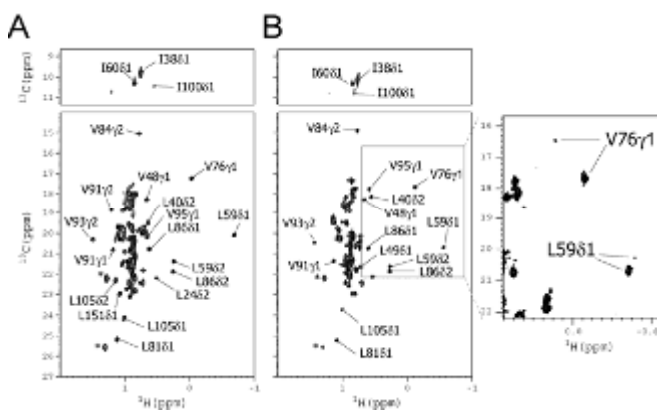


Fig.2 Methyl-TROSY spectra of KcsA
Methyl-TROSY spectra acquired at pH 6.7 (A) and 3.2 (B) at 45°C in the presence of 120 mM K⁺ are shown. At acidic pH, some methyl groups exhibited two signals, indicating conformational equilibrium under the acidic condition (B, inset).

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にするため、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ではほぼ一致し、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¹H: -0.13 ppm, ¹³C: 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⁺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。

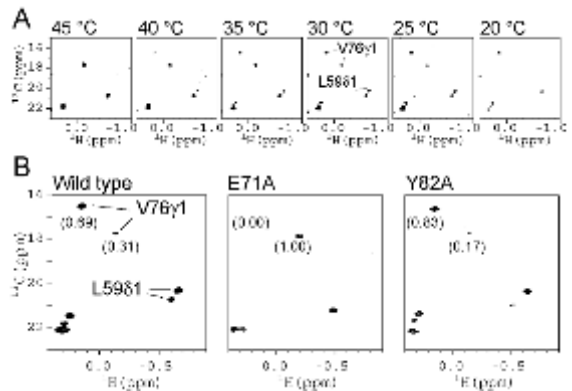


Fig.3 Conformational equilibrium under the acidic condition.

(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⁺,H₂O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⁺との相互作用を解析するため、K⁺ 滴定実験を行った。その結果、開状態における K⁺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⁺結合型、不活性化状態が K⁺非結合型にそれぞれ対応することを示している。また、V76 γ1 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⁺との相互作用の解離定数が閉状態において 6 mM, 開状態において 50 mM 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⁺の存在下、溶媒を 100% D₂O から 10% D₂O / 90% H₂O 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 γ1 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)。

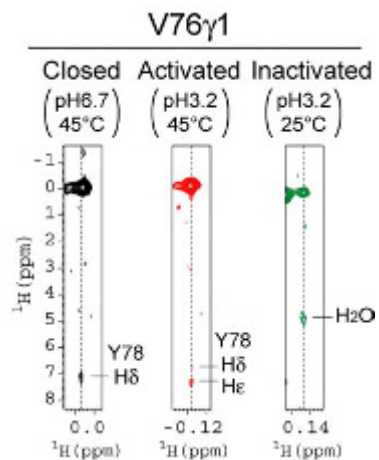


Fig.4 NOE strips from V76 γ1 in the closed, activated, and inactivated states in the presence of 120 mM K⁺ and 90% H₂O are shown.

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^+ 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^+ が結合した状態が活性化状態、 K^+ 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^+ 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^+ 親和性が高く、 K^+ 濃度が数 mM と低い細胞外側から K^+ 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^+ 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^+ 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^+ 結合状態にあるために、この平衡は K^+ 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 チャンネルとよく類似しており、以上の知見はこれらのチャンネルにも適用できると期待される。

【参考文献】

- 1) Imai S 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

○安西高廣¹、河野慎¹、寺尾佳代子¹、遠藤斗志也¹

¹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

○Takahiro Anzai¹, Shin Kawano¹, Kayoko Terao¹ and Toshiya Endo¹

¹Department 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 methanesulfonylthioate))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、¹⁵N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-Erv1の三者複合体を形成する可能性が示唆された。

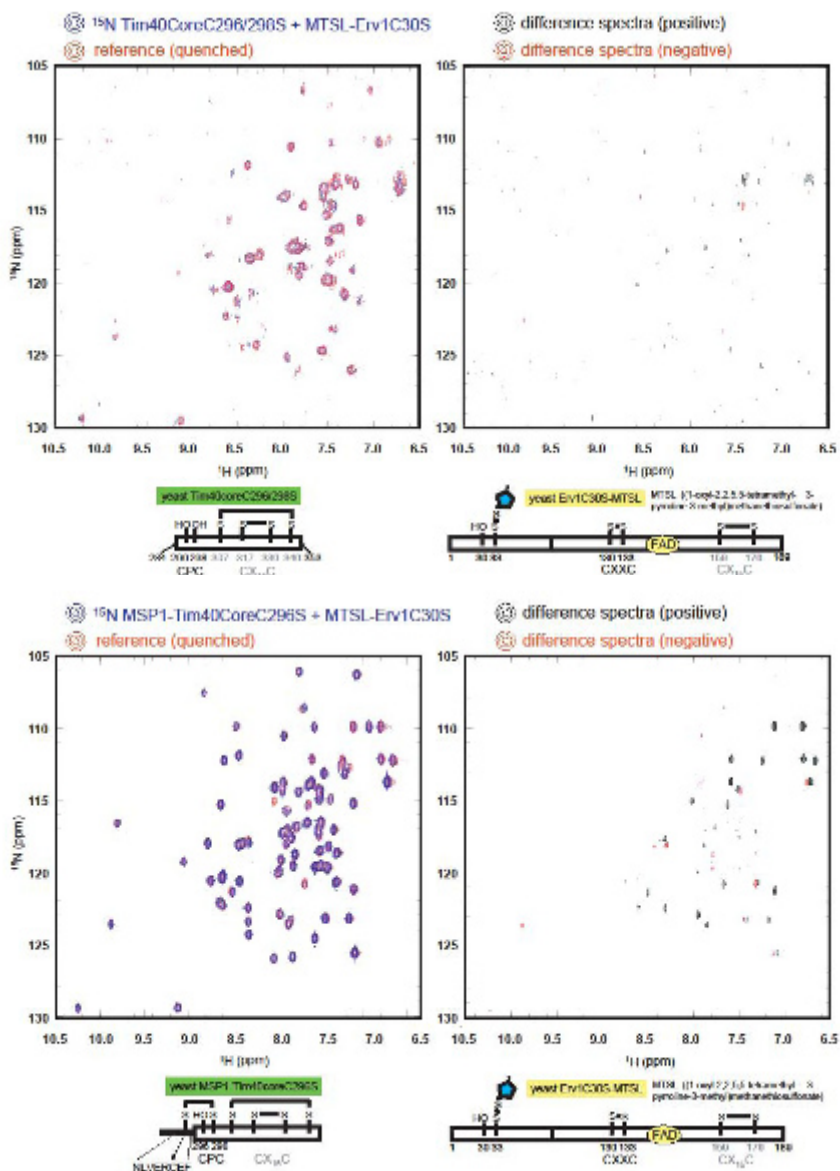


Fig. 1 NMR spin-label method for MTSL-Erv1 and Tim40 or MSP1-Tim40

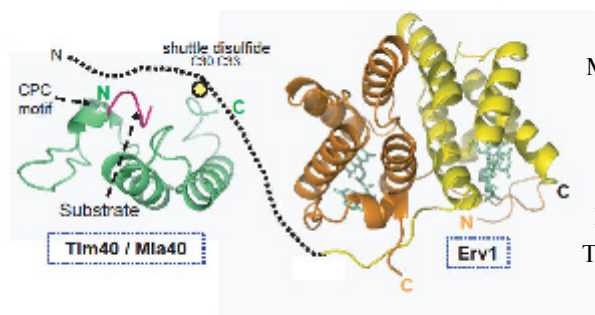


Fig. 2 Ternary complex model of Tim40, substrate and Erv1

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¹, 吉永 壮佐¹, 佐藤 徹², はが 紗智子²,
嶋田 一夫³, 東原 和成², 寺沢 宏明¹

¹熊本大学 大学院 生命科学研究部, ²東京大学 大学院
農学生命科学研究科, ³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 Hirakane¹, Sosuke Yoshinaga¹, Toru Sato², Sachiko Haga², Ichio Shimada³,
Kazushige Touhara², Hiroaki Terasawa¹

¹Faculty of Life Sciences, Kumamoto University,

²Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo,

³Graduate 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 (exocrine-gland-secreting peptide 1) 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变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¹⁾。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²⁾。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 2 receptor p5) であることを明らかにした³⁾。

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⁴⁾。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、トロンピ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】

¹⁵N および ¹³C¹⁵N 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 ¹H 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化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化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 すすか, 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 ^{13}C and ^{15}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、 ^{13}C , ^{15}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。

Key words ; complex, phosphorylation, sample preparation

○みかみ すすか, いたう ゆたか, みしま まさき

【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 °C で一晚発現誘導をかけ ^{13}C , ^{15}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、 ^{13}C -CT-HSQC (for 15% ^{13}C labeled sample)、 ^{13}C separated NOESY、 ^{15}N separated NOESY、 ω 2-2D ^{13}C , ^{15}N filtered NOESY & TOCSY、 ^1H - ^{31}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 で一晚発現誘導をかけた。菌体を破碎後、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 (^{13}C , ^{15}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^{-4} 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 Casein kinase II (CK II)、Casein 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_D (M)
—	2.4×10^{-4}
S2514	5.9×10^{-6}
S2516	2.9×10^{-5}
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 ^1H 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。

(A)



(B)

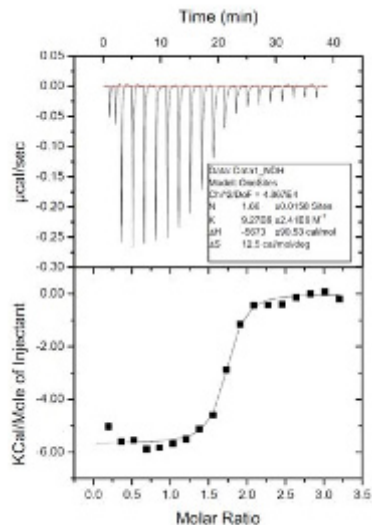
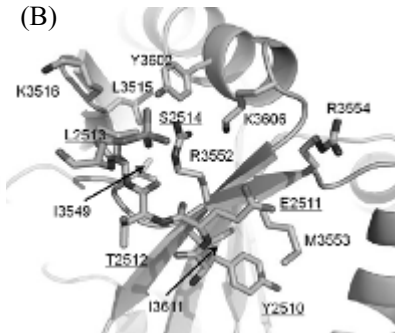


Fig. 1 ITC measurement

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 ^{13}C 、 ^{15}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、CK II、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。 ^{15}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)。

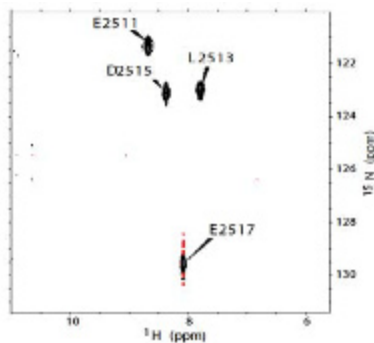


Fig. 3 ^1H - ^{15}N HSQC spectrum of pSMRT in complex with SPOC

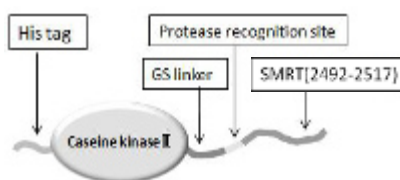


Fig. 4 Schematic drawing of the chimera protein

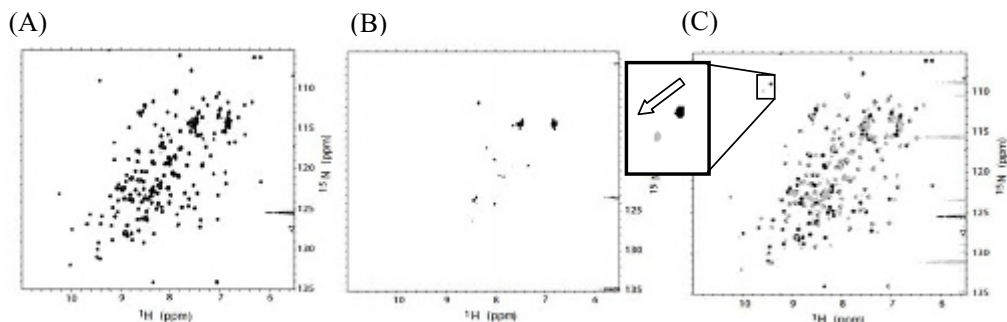


Fig. 5 Binding analysis of SPOC and chimera (A)SPOC (B)SPOC:chimera=1:1 (C)overlay of SPOC/digested chimera complex with free SPOC. (black : free, gray : complex)

【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。