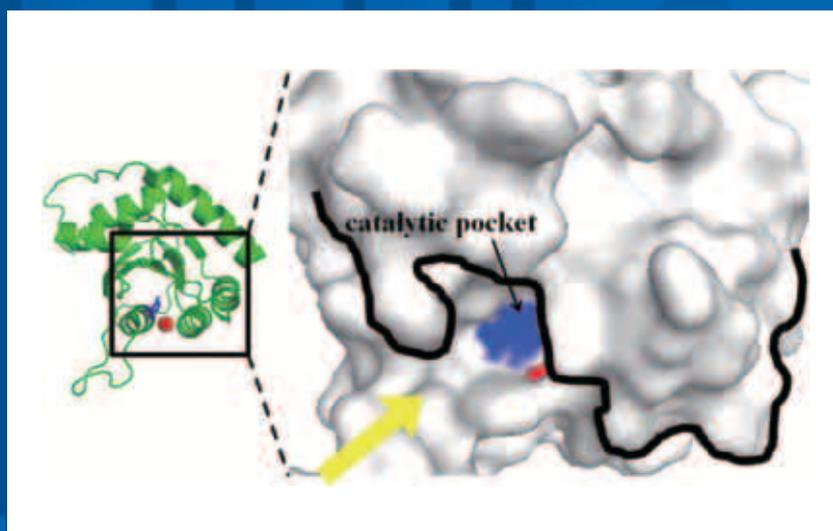


固体クライオコイル MAS プローブ



A3G CD2 の活性ポケットの構造



表紙の図

(上段)：固体クライオコイルMASプローブ (図3)

京都大学大学院理学研究科化学 竹腰清乃理

(下段)：リアルタイムNMR法によるAPOBEC3GのDNAデアミネーション反応の定量解析 (図4)

サントリー生命科学財団生物有機科学研究所学 古川亜矢子

NMR

BULLETIN OF THE NUCLEAR
MAGNETIC RESONANCE SOCIETY OF JAPAN

Vol. **5**

October 2014

日本核磁気共鳴学会
The Nuclear Magnetic Resonance Society of Japan

CONTENTS

●会長メッセージ

国際貢献を視野に入れたNMR学会の活動	4
内藤 晶	

●巻頭エッセイ

NMRに魅せられ育まれて	5
鈴木 榮一郎	

NMRによる構造生物学	8
西村 善文	

●解 説

リアルタイムNMR法によるAPOBEC3GのDNAデアミネーション反応の定量解析	11
古川 亜矢子	

NMRのハードウェアに関するメモ 1. 主に送信系について	16
根本 暢明	

●トピックス

植物の気孔密度を調節する機構	32
大木 進野、森 正之	

高磁場MAS-DNP法を用いた超高感度固体NMR	39
高橋 大樹	

●若手ポスター賞講演

第52回NMR討論会若手ポスター賞について	47
-----------------------	----

若手ポスター賞I受賞講演

高温超伝導バルク磁石を用いた高分解能MRI	48
玉田 大輝、巨瀬 勝美、柳 陽介、伊藤 佳孝、仲村 高志	

選択的オートファジーにおけるユビキチン認識	52
Erik Walinda、森本 大智、小沼 剛、菅瀬 謙治、朽尾 豪人、白川 昌宏	

NMRを用いたヒト主要組織適合複合体の動的なペプチド認識及び構造維持機構の解明	54
谷中 冴子、上野 貴将、Shi Yi、Qi Jianxun、Gao George、津本 浩平、菅瀬 謙治	

メチル化リジンの化学シフトと塩橋との相関に関する理論的・実験的研究	56
服部 良一、Jakub Sebera、Vladimír Sychrovský、古板 恭子、大木 出、池上 貴久、藤原敏道、児嶋 長次郎	

固体NMRによるタンパク質の構造解析に向けた ¹³ C-常磁性緩和促進の研究	60
木戸 浩貴、田巻 初、江川 文子、亀田 倫史、神谷 昌克、菊川 峰志、相沢 智康、河野 敬一、藤原敏道、出村 誠	

MAS下の新CP法：異方性による低効率化の克服	62
神原 孝之、村上 美和、野田 泰斗、武田 和行、竹腰 清乃理	

若手ポスター賞II受賞講演

TRAF6を標的としたタンパク質間相互作用阻害剤の探索および構造解析	66
守谷 潤、竹内 恒、田井 健二、米田 直樹、新井 謙三、小林 直樹、福西 快文、井上 篤、木原 美穂、村上 拓己、千葉 健一、嶋田 一夫	

NMRスペクトルの多変量解析によるアクリル系共重合体の一次構造解析	68
百瀬 陽、前田 智也、直野 辰哉、浅川 聖子、坂尾 竜一、押村 美幸、平野 朋広、右手 浩一	

ポリオレフィンの溶液 ¹³ C NMRにおけるピーク強度の定量性	72
茂呂 ふみか、佐藤 浩子、恩田 光彦	

脂質二重膜再構成H ⁺ -ATP合成酵素 subunit c-ringの固体高分解能NMR法による構造決定	74
戸所 泰人、姜 秀珍、湯面 郁子、岩崎 郁、鈴木 俊治、吉田 賢右、藤原敏道、阿久津秀雄	

¹ H DQ MASを用いた医薬品原薬中の微量フリー体の定量 ～固体NMRの検出限界は？～	76
丸吉 京介、Dinu Iuga、Steven P. Brown	

●NMR基礎講座

分子複雑系	78
菊地 淳	

NMR法により明らかとなるタンパク質複合体の機能的運動性	83
竹内 恒、嶋田 一夫	

DNP(動的核偏極)～その基礎原理から最新の応用研究まで～ 根来 誠	90
●NMR史点描	
Gorterの失敗(下) 寺尾 武彦	94
●海外学会報告	
若手研究者渡航費助成金について	97
若手研究者渡航費助成金 5 th APNMR 参加報告書 小倉 立己	99
若手研究者渡航費助成金 The 5 th Asia-Pacific NMR symposium 参加報告書 田中 孝	101
若手研究者渡航費助成金 The 56th Annual Rocky Mountain Conference on Magnetic Resonance 参加報告書 奥下 慶子	102
若手研究者渡航費助成金 EUROMAR2014参加報告書 伊藤 研悟	103
若手研究者渡航費助成金 XXVI th ICMRBS参加報告書 森本 大智	105
若手研究者渡航費助成金 XXVI th ICMRBSの参加報告書 鴨志田 一	106
若手研究者渡航費助成金 Report of Participation in the ICMRBS XXVI Chun-Jiun Yang	108
●技術レポート	
固体クライオコイルMASプローブの開発 竹腰 清乃理	109
●NMR便利帳	
¹³ C/ ¹ H DNP-MASプローブの開発 中村 新治	113
●NMR研究室便り	
東京農工大学 朝倉研究室 朝倉 哲郎	118
横浜国立大学理工学部 内藤研究室 榎野 義輝	121
公益財団法人サントリー生命科学財団 生物有機科学研究所 森 祥子、岩下 孝	124
●若手NMR研究会報告	
千葉県生命の森リゾートで開催された第15回若手NMR研究会便り 天野 亮	127
●注目すべき最新の論文	
水中で起きる両親媒性ポリアスパラギンの温度応答性のNMR研究	15
α 型アイソタクチックポリプロピレンの熱延伸下における 2本鎖パッキング転移と転移が引き起こす分子運動および熱特性：固体NMRによる研究	46
逆ミセルを用いたタンパク質の溶液NMRにおける動的核スピン偏極法	100
●NMR学会からのお知らせ	
1. 日本核磁気共鳴学会の決定事項	130
2. 第53回NMR討論会(2014)	132
3. ニュースレターの記録	138
4. 日本核磁気共鳴学会規約	140
5. 日本核磁気共鳴学会機関誌投稿規程	144
6. 賛助会員名簿	145
7. 日本核磁気共鳴学会機関誌編集委員会委員名簿(2014～2015年度)	145
8. 編集後記	146

国際貢献を視野に入れたNMR学会の活動

日本核磁気共鳴学会会長

内藤 晶

日本核磁気共鳴学会第7期会長に就任いたしました内藤であります。どうぞよろしくお願ひいたします。

私はNMR学会が発足した2002年から歴代会長の荒田会長、甲斐荘会長、安藤会長、阿久津会長、嶋田会長、朝倉会長、の下で評議員、理事を務め、7期目の会長として就任いたしました。学会が発足にいたったのには、国際会議などの母体となる学会組織が必要との目的があったように思います。その目的は2005年の第1回アジア太平洋NMRシンポジウム(The 1st AP NMR Symposium)を日本で開催することで1つ達成することができました。その国際会議は阿久津大会会長の下、私は、大会実行委員長を務めさせていただきました。その会が原型となり、2nd, 3rd, 4th, 5th AP NMR Symposiumとして今も続いていることは喜ばしいことです。

NMR学会は、会員の皆様の間で生き生きとNMRに関する研究交流ができるように、NMR討論会などの国内および国際会議開催の支援、若手研究者の海外渡航支援、NMR学会会員のニュースレターの発行、NMR学会機関誌の発行等を学会活動事業の柱にしていまいりました。これらの柱となる事業に関しては、会員の皆様の意見を聞きながら、さらに強化したいと考えております。また、2014年4月には日本学術会議協力学術研究団体に指定されており、NMR学会は日本の学界をリードする立場になるまで成長を遂げています。

私はNMR学会誌3巻、4巻の編集委員長をしていた経験もあり、NMR学会誌の編集事業はこれまで以上に、充実させていきたいと考えております。この度は、このように立派なNMR学会誌5巻が発行されましたことに、山本編集委員長をはじめ編集委員の皆様へ感謝申し上げます。NMR学会誌発行はNMR学会の重要な柱であり、鈴木前編集委員長

によるNMR学会誌1巻、2巻の発行を経て、NMR学会誌3巻、4巻では、会員からの研究報告や技術レポートの内容を大幅に増やして、会員の皆様に役に立つ情報を提供してまいりました。このNMR学会誌5巻では、さらに充実した内容になっており、会員に必要な情報を供給する重要な媒体になっていることは大変喜ばしいことであります。一方で、学会誌発行には費用がかかるため、学会誌冊子体発行を廃止する学会が増えてきております。このNMR学会誌5巻では、希望者のみに学会誌冊子体を配布するという、どの学会も行っていないユニークな方法で会員へのサービスの向上と費用の節約に努力されていることは特筆すべきことであります。

先に述べた、学会活動の柱となる事業の中で、国際会議の開催支援を強化することにより、国際貢献を視野に入れた活動には特に力を入れて取り組みたいと思っています。さしあたり、2016年に京都で開催されるICMRBSを手厚く支援したいと考えております。長期的にはISMARやAP NMR Symposiumを日本で開催できるように支援活動をしたいと思っています。このような、国際会議を日本で開催することにより、日本でのNMR研究の実力を世界に示すことができると同時に、世界に通用する若手研究者が育ってくれることが願いであります。私が実行委員を務めた第1回アジア太平洋NMRシンポジウムにおいて、会議を手伝ってくれた学生たちが外国人研究者相手でもてきばきと対応して、会議期間中に大きく成長したことが今も生き生きと思ひ出されます。

このような、会員の皆様の立場に立ったNMR学会のさらなる発展のため、微力ではありますが、頑張りたいと思います。会員の皆様のご協力をよろしくお願ひいたします。

2014年秋

NMRに魅せられ育まれて

味の素株式会社、現バイオ産業情報化コンソーシアム

鈴木 榮一郎

NMRスペクトルとの最初の出会いは、振動分光学・分子力場が主題の島内武彦先生の研究室でブタジェン誘導体の共鳴ラマン効果・紫外吸収・電子励起状態に関する卒業研究をすることになり、合成した誘導体の構造確認のためプロトンNMRを分析室に依頼し、“6.0ppmにシングレット1本”と、文献値との一致をみた時であり、明快な情報を与えるが、特段奥のある分光法ではなく単純な道具との第一印象であった。しかし、より本格的な出会いが、味の素(株)入社後にやって来た。

入社翌年(1978年)に都市センターで開催されたNMR討論会が最初の参加であり、諸先輩の御発表に触れ、NMRの奥深さに大いに魅せられたことを思い出す。味の素中研にラマンはなく、最初に取り組んだのは、「食品中の水の状態」の評価法を開発することを目的とした広幅パルスNMR装置(ブルカーのminispec P-20; 20MHz)を用いた研究であった。その数年前に富士フィルムさんとの同時購入で割安で手に入れた装置と、上司の永嶋伸也氏(故人)から聞いた。また、この研究テーマが設定されたのは、荒井綜一先生がISOPOW(International Symposium on Properties of Water)の第二回会合を日本に誘致なさったので、発表を含めて全面協力するためでもあった。

入社翌年の国際会議の発表準備という忙しさであったが、当時としても迅速な学会発表を目指した研究は珍しい。最初、様々な食品素材の反転回復法による T_1 やCPMG法による T_2 の測定をしていたが、結局、“凍結曲線法”と呼ぶに至った未凍結水分量の温度依存性曲線を描くことにしたところ、種々の興味深い現象、特に凍結-解凍の両過程が一致しない履歴現象の数々に出会うに至ったことが今でも新鮮な記憶として残る。

また、オシロスコープ画面上にストアしたFID曲線を手書きでなぞって片対数目盛の方眼紙でデータ処理している姿を見るに見かねてか、当時同じ職場の大先輩だった甲斐荘正恒先生が、XYレコー

ダーを取付けてくれる技師を紹介してくださったことも良い思い出である。その後更に発展して、当時の価格で1千万円を超えるミニコンを購入して、それをP-20に取り付ける追加予算数百万円も決裁され、FORTRANの駆動プログラムも書き上げて稼働を開始したまではよかったが、波形記憶装置の発するクロック・ノイズを、試料管内に挿入した熱電対が高感度アンテナとして拾ってしまうという大トラブルに出合って「これでは巨額の投資が無駄になる!」と冷や汗をかいたことも今となっては懐かしい思い出である。

やがて会社は、JEOLから400MHz装置(当時国内最高レベルの磁場強度)を導入することとなり、主として有機化合物の構造決定・確認の業務、及び、装置メンテナンスの責任者となった。研究テーマに今よりも自由度があり、特に研究対象がアミノ酸・核酸ならば会社の理解は比較的得やすかった。そこで、入社時に所属していた坪井正道研究室の西村善文先生(現・横浜市大)のDNAテトラマー試料のプロトンNMR測定をこの400MHz装置で行うことになり、当初、筆者自身がその主担当になったことは大いに勉強になった。

坪井研の兄弟研が生化のNMR研究室であり、その担当教授の宮澤辰夫先生(故人)からは「(実験室で仮眠していた自分を一酸化炭素中毒から助けて下さった命の恩人である坪井さんではなく)西村君の研究として認知する」との話があった。元々が赤外・ラマン分光出身の宮澤先生は、折節、様々な助言をくださった方である。特に、「(生体分子の構造研究では)NMRはラマンよりも得られる情報量が遥かに多い。」と先生が断言してくださったので、ラマン装置を導入することを見送った(必要があれば直接の師匠だった浜口宏夫先生にお願いすることにした)経緯があり、NMRに集中できることになった。その測定での経験をベースにカリフォルニア大学サンフランシスコ校(UCSF)薬学部のNMR研究室(Tom James研)に留学して、

GE / Nicoletの500 MHz装置と分子動力学計算ソフトAMBERによるアデニン・チミン交互配列のDNAデカマーのNMR研究を行うことに行き着き、二重らせん構造内部に水和トンネルを配し、外部のリン酸基の負電荷をナトリウムイオン正電荷で中和して安定化した構造モデルを提唱するに至ったのであった。

しかし、帰国後、会社(出身)のNMR人としては甲斐荘先生の先代に当たる中村朝郎さん(故人;ハーバード大学時代のOleg Jardezkyのポストドクを経験;アミノ酸・ペプチドのNMR研究に従事)から、「DNAの研究は企業研究になじまないから、西村先生らのアカデミアに任せておきなさい。(そろそろ課長昇格適齢期の)君自身が手伝えることはもう止めにして、君は産業視点に立ったタンパク質の研究に移行しなさい。また、最初君自身が担当していたのは分かるが、先生の論文への君の連名は遠慮しなさい。」との指導が発せられた。但し、中村さんは、西村先生と筆者の関係の深化においては、留学直前・直後に、西村先生が最も尊敬する科学者である京極好正先生(故人;当時、阪大蛋白研教授)への表敬訪問を勧めるなど、重要な役割を果たしてくださり、その後の西村先生の先輩・盟友である阿久津秀雄先生をはじめとした“蛋白研・京極人脈”との交流の礎石となったと思われる。

そのような経緯で、筆者が最初に手掛けたタンパク質は、サイトカインの一つのインターロイキン-2(IL-2)であったが、X線解析のための結晶化が難航しただけでなく、そのアグリゲーションを起こし易い物性のため、NMRにとっても極めて難物であった。そこで、配列中にヒスチジンとチロシンが各々3残基あるので、それに焦点を当てることにした。ヒスチジンのpH滴定が終わり、その美しいデータに感動しつつ、ある日の夕刻、荒田先生にご覧頂きに行った。先生から、「NMRデータは帰属がないと意味がない。」という趣旨の初歩的なご指導を頂いてしまった。恥ずかしくもあり、悔しくもあったので、帰途思案の結果、「そうだ、最近入った世界最高のMS装置を使えば荒田先生が驚くようなスピードで帰属できるのは?」との思いで、帰宅せずに会社に戻って、MS室を覗くと、そこには平山和雄さんと明石知子さんが未だ仕事をしていた。事の次第を話すと、平山さんが、「分かった。化学修飾は、MSのメインテーマ。重水素交換も修飾の一種。従って、これは頼まれ仕事ではなく、自分たちにとっても重要なテーマとして取り組みたい。」と

快諾してくださったのを思い出す。

IL-2に難渋していた頃、同級生の田之倉優君(現東大院農学生命科学教授)が、幾つかの地方大学医学部を転勤した上で東大・生化(高橋健治教授の研究室)に戻って来ており、彼から、RNAのグアノシン3'末端特異的切断活性を有するリボヌクレアーゼT1(RNaseT1)に関する共同研究の申し込みがあった。その理由は、高橋研でRNaseT1を取り扱っていると、周辺の研究室から(遺伝子発現等が上手くないか)のはRNaseT1が空中を浮遊しているためではないかなどの)苦情が出る、鈴木さんの所は、分析棟が独立建屋だからバイオから苦情が出ないでしょう、とのことであった。会社で種々議論の後、「当社には、核酸系うま味調味料(5'ヌクレオチド)の生産を将来は酵素法で行いたいという長年の宿願があるから、リボヌクレアーゼの研究ならば良い経験になるのではないか?」との会社上層部からの風が吹いた。(宮澤研の稲垣冬彦先輩の研究等で)RNaseT1が頗る良い溶解物性を有していることを知っていたので、「当社のタンパク質構造機能研究は、これまでのところ性状の悪いタンパク質ばかりで難渋しており、このままでは、成功体験を得ることができずに、年月ばかりが過ぎていく。そこで、まずこの酵素で一流誌に掲載されるような成果を出すことで自信を付けよう。」と唱えた。これが最初の核酸関連酵素との出会い・経緯のあらましである。

そして、ブルカーの600 MHzを用いたトランスグルタミナーゼの研究からも「フレキシブル領域変異」の着想を得て、会社のコアビジネスである「うまみ調味料」の生産に最先端の科学技術を適用することに重点化し、実際に工業化プロセスに使えるヌクレオシドの酵素的リン酸化用の実用酵素の創製が実現するとともに、他の産業用酵素の高機能化研究に企業研究として一定の継続的期待を頂けるようになった。当時も、アカデミアのタンパク質構造機能研究・構造生物学が主として創業志向で行われていたことは良く承知していたが、筆者の見通しとして(上記中村さんの助言もあり)、それらの立体構造に基づく創薬研究が企業で実を結ぶには時期尚早で時間が掛かり過ぎると考えていた。心底、このままではまずい、創薬関連ではないテーマで早々に会社に認められる成果を出さないと、わが国におけるこの分野自体の存続が危ない、と考えたことを思い出す。

また、ノーベル賞を受賞なさる前年頂いたErnst

先生からの「君も何か大きな局面に立ち向かう際は、私が2次元NMRの実験で行ったようなアプローチ（事実上不可能であることを証明すべく入念に準備する）で取組むと良い」との助言の効果は大きかった。このような流れの中で、京極一嶋田一夫プロジェクト（お台場JBICプロジェクト）の立上げ

参画への会社の決断は極めてスムーズなものとなった。

以上を一言でまとめると、全てはNMRとその関係者に育まれてのことである、とつくづく回想する昨今である。



鈴木 榮一郎 (すずき・えいいちろう)

- 1974.3 東京大学理学部化学科卒業
- 1977.3 東京大学大学院薬学系研究科中退
- 1977.4 味の素株式会社入社、中央研究所分析研究部配属
- 1982.3 同上薬学博士（論文）
- 1984.10 カリフォルニア大学サンフランシスコ校 (UCSF) NMR研究室博士研究員
- 1989.7 味の素株式会社主任研究員（その後、主席研究員、特別主席研究員を経る）
- 2005.7 同上退職、役員（理事）就任
- 2013.6 役員（上席理事）退任、客員フェロー就任
- 2014.5 同上退任、現職（バイオ産業情報化コンソーシアム (JBIC) 研究員、東京大学大学院農学生命科学研究科特任教授、横浜市立大学大学院生命医科学研究科客員教授など）

NMRによる構造生物学

横浜市立大学大学院生命医科学研究科

西村 善文

はじめに：DNAの構造生物学

私が最初にNMRの話聞いたのは東京大学薬学部の坪井研究室に進学した1970年だ。坪井研では伝統的な赤外分光とともにDNAやタンパク質の機能構造解析(構造生物学)の研究が、当時大学院学生だった森川さん、阿久津さん、高橋さん、中西さん、曾良さんや丁度米国から助教授で戻られた京極先生により行われていた。京極先生はNMRの研究を開始し、坪井研ではPopleのNMRの輪講や後ではFarrar-Beckerの輪講などもあったが、すぐに大阪大学に移られた。私はレーザーラマン分光による生体高分子の構造解析を博士論文のテーマとして行った。さらに坪井研の助手として塩基配列に依存したDNA二重らせん構造の多様性と多形性のテーマで1982-85年に特別推進研究を行い片平君や楯君等が参加した。また坪井研から味の素に就職した鈴木君や高橋君とNMRによるDNA構造の共同研究を行い、更に当時東大工学部の助手の中村さんとDNA構造の計算解析を行った。坪井先生の後任に荒田先生が着任され、京極先生や宮沢先生の協力もありDNAやDNA結合タンパク質のNMRによる構造解析を開始した。まもなく荒田研にブルカーの400 MHzのNMRが導入され私は光CIDNPを立ち上げた。

2. 転写関連因子の構造生物学

1989年に横浜市立大学に新設された大学院総合理学研究科の教授に就任した。NMRによるDNA結合タンパク質の構造解析を本格的に行うため、原がん遺伝子産物のMybの分子生物学を行っていた理研の石井さんと共同研究を開始した。幸いにも横浜市は新設研究室に分子生物学関連の設備や500 MHzのNMRを設置してくれた。NMR設置に当たってはブルカーの植木さんやベリヒリさんにお世話になった。1990年に京極先生が代表で重点領域研究「DNAの高次構造を識別する蛋白質」を立ち上げた。総括班で大阪大学の相本さんにMyb

のDNA結合ドメイン中の3個のリピート構造の話をしたら、各リピートのペプチド合成を行うことになった。その結果¹H-NMRだけで各リピートの立体構造を求めることができ、その後緒方君はラベルしたMybのDNA結合ドメインとDNA複合体の構造解析も行った。重点研究は1994-98年に西村が代表の「蛋白質の高次構造に基づくシグナル認識機構の解明」に繋がり、新たに600 MHz NMR装置を導入することができた。横浜へのNMR研究の還元ということで1995年に産学官連携で「よこはまNMR構造生物学研究会」を立ちあげた。なお重点研究は1998-2001年に稲垣さんが代表の「多次元情報伝達とその制御における蛋白質間相互作用の役割」、2003-09年に阿久津さんが代表の「膜インターフェイスを制御するソフトな分子間相互作用」、2009-13年に嶋田さんが代表の「過度的複合体が関わる生命現象の統合的理解」、2009-13年に佐藤さんが代表の「天然変性タンパク質の分子認識機構と機能発現」、2014年から神田さんが代表の「動的構造生命科学を拓く新発想測定技術」の新学術領域研究に繋がりNMR構造生物学研究の一つの流れを形成したといえる。

大腸菌の転写因子としては当時東京大学の溝渕先生や三瓶さんとのプリンリプレッサーによる共同研究がある。プリンリプレッサーはAMPやGMPの生合成を調節し、N末にDNA結合ドメインをC末に2量体形成ドメインを持つ。2量体形成ドメインにプリン塩基が結合すると、2量体形成ドメインの構造が変化しお互いのDNA結合ドメインが近づき、特異的にオペレータDNAに結合して、AMPやGMPの生合成に関わる遺伝子の発現を抑制する。ヘリックスターンヘリックスモチーフを持つDNA結合ドメインはDNAの大きな溝に弱く結合するが、お互いのDNA結合ドメインが近づくとC末に新たにヒンジヘリックスが形成されDNAの小さな溝で特異的な結合を強化する。

大腸菌の転写活性化因子としては当時名古屋

大学の水野さんとの浸透圧応答転写調節因子の OmpR の DNA 結合ドメインの共同研究がある。また現在防衛大学の牧野さんとの共同研究で大腸菌リン酸レギュロンの転写活性化タンパク質 PhoB の DNA 結合ドメインと DNA 複合体の NMR による動的構造解析を岡村君が行った。フリーのときには PhoB の DNA 結合ドメインのコアの構造は揺らいでいるが DNA と複合体を形成すると硬くなることを NMR によるメチル基の動的構造解析で明らかにした。その後横浜市大の木寺さんや池口さんの MD 計算の結果 PhoB の DNA 結合ドメインの DNA 認識はポピュレーションシフトであることが分かった。Myb の DNA 結合ドメインもフリーのときに揺らいでいて複合体を形成すると硬くなることを NMR で解明され、DNA 結合ドメインの揺らぎは DNA 認識に非常に重要であることが分かっている。

2001年に横浜市大は理研との連携大学院として鶴見キャンパスに新専攻を設置した。構造生物学に特化した新専攻では新たに900 MHzと800 MHzのNMRを導入し、また文科省の地域結集型共同研究事業として700 MHzのフロー型NMRを設置しマシンタイムを民間企業に開放した。なお、この取り組みはその後先端施設共用促進事業として文科省から補助を受け、2014年からはNMRプラットフォームとして新たに横浜市大鶴見キャンパスに950 MHz LC-NMR装置の新規導入と900 MHz固体NMRや480本オートサンプラー付きの800 MHz NMRの設置などすべてのNMR装置を更新することができた。これもひとえに企業の方々のNMR利用の成果の賜物であり感謝したい。

3. 転写制御ドメインの天然変性領域

タンパク質の動的な挙動が機能上非常に重要であることは転写因子のDNA結合ドメイン以上に転写制御ドメインで明らかになった。ATF2の転写活性化ドメインはN末サブドメインがZnフィンガー様構造を持ちC末サブドメインが天然変性領域を持つことを長土居君が明らかにした。天然変性領域は自身のDNA結合ドメインをマスクしてヘリックス様構造で相互作用することがわかった。リン酸化によりこのマスクが弱まりDNA結合ドメインが特異的にDNAに結合する。更に神経特異的な転写抑制因子NRSF/RESTのN末転写抑制ドメインは天然変性領域でコリプレッサー mSin3のPAHドメインと特異的に結合してヘリックスを形成することを野村君がNMRで明らかにした。結合とカップル

してヘリックスが形成される誘導適合機構がPAHドメイン上で起こることを大阪大学の肥後さんがMD計算で明らかにした。NRSF/RESTは神経細胞の形成に必要な約1000種類の遺伝子に共通するサイレンサーに結合してmSin3・HDAC(ヒストン脱アセチル化酵素)複合体をリクルートし遺伝子発現を抑制する神経の機能上非常に重要なタンパク質である。NRSF/RESTが神経細胞で発現するとハンチントン舞踏病や神経疼痛や髄芽種や線維筋痛症等の様々な神経疾患が生じる。そのような疾患ではNRSF/RESTとmSin3の相互作用を阻害する化合物は非常に有効な治療薬になる。現在長崎大学の植田さんや製薬ベンチャー企業や産総研の福西さん等と平尾さんや下條君が共同研究を行っている。一部化合物がモデルマウスで有効であることを見出した。

現在富山大学にいる大熊さんとの共同研究で基本転写因子TFIIEの α サブユニットと β サブユニットのコアドメイン構造を解析するとともに、TFIIE α の酸性ドメインのN末天然変性領域が基本転写因子TFIIHのp62サブユニットのPHドメインと結合する様子もNMRで奥田君が明らかにした。TFIIEの酸性の天然変性領域はPHドメインの塩基性表面で伸びた紐様構造で結合していた。静電的な相互作用によるTFIIEの紐の位置を決定しているのはTFIIEの2個の疎水的なアミノ酸がPHドメインの疎水的なポケットに突入していることであった。この結合様式は非常に特異的で、最近がん抑制遺伝子産物のp53のリン酸化転写活性化ドメインでも、通常観察されている複合体中での両親媒性ヘリックスではなく伸びた紐様構造で結合することを奥田君が始めて明らかにした。

4. 染色体関連タンパク質のNMR

Mybドメインを持つタンパク質として染色体末端のテロメア結合タンパク質のTRF1とTRF2がある。各MybドメインとテロメアDNA複合体構造を西川君や花岡君が解析した。現在各タンパク質のin vivoの役割を明星大学の清水さんや早稲田大学の胡桃坂さんと共同研究を行っている。さらにTRF2のN末天然変性領域の塩基性ドメインの機能構造解析を胡桃坂さんと共同で行っている。

染色体構造に関連する因子としてクロモドメインを含む一連のタンパク質がある。クロモドメインはもともとエピゲノムのマーカーであるメチル化ヒストンH3を認識するドメインとして有名である。東

京大学の堀越さんとの共同研究で下條君がEsa1のクロモドメインのN末天然変性領域がRNA認識に必要であることを見出し、また奥田君が酵母のクロマチンリモデリング因子のChd1のタンデムな2個のクロモドメインの構造解析を行った。現在Eaf3の構造解析と機能解析を行っている。更に現在名古屋市の中山さんとの共同研究でChp1のクロモドメインはヒストンH3K9のメチル化を認識しさらにセントロメアのノンコーディングRNAを認識するがその認識には結晶構造では解析されていなかったN末天然変性領域が必要であることを下條君が見出した。またヘテロクロマチン因子HP1のクロモドメインのN末天然変性領域の役割の構造解析も行っている。

染色体構造の基本単位はヒストンH2A、H2B、H3、H4各2量体に146塩基対のDNAが1.75回左巻きに巻きついたヌクレオソームである。ヌクレオ

ソームの形成と解離は遺伝子の発現制御上非常に重要な機構であり、様々なヒストンシャペロンが関与する。筑波大学の奥脇さんとの共同研究でヒストンシャペロンNAP1とヒストンH2AH2Bの相互作用構造を森脇君がNMRではじめて明らかにした。ヒストンのN末は非常に長い天然変性領域があり、またヒストンシャペロンにも非常に長い酸性の天然変性領域がある。これら天然変性領域が機能上非常に重要であることが最近分かってきた。

いま、タンパク質の構造解析としてはX線結晶学が王道である。しかし機能上非常に重要な天然変性領域を含んだタンパク質の構造生物学の遂行には、動的構造解析が可能なNMRが不可欠である。将来はNMRによるタンパク質の動的構造解析が少なくともクロマチン関連因子の構造生物学では王道になるに違いないということを予感して筆を置きたい。



西村 善文 (にしむら・よしふみ)

1971年 東京大学薬学部卒
 1976年 東京大学大学院薬学系研究科博士課程中退
 1976年 東京大学薬学部教務職員
 1977年 東京大学薬学部助手
 1989年 東京大学薬学部助教授
 1989年 横浜市立大学大学院総合理学研究科教授
 2013年 横浜市立大学大学院生命医科学研究科長
 2014年 横浜市立大学大学院生命医科学研究科長・名誉教授
 現在に至る。

リアルタイムNMR法によるAPOBEC3GのDNAデアミネーション反応の定量解析

サントリー生命科学財団 生物有機化学研究所

古川 亜矢子

1. はじめに

HIVは、宿主因子を利用することによって自己を増殖する。一方、宿主側もHIVの増殖を阻害する宿主因子を有しており、その一つがapolipo-protein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like 3G (APOBEC3G; A3G) タンパク質である。A3Gは、activation-induced cytidine-deaminase (AID) に代表されるシトシンデアミネース酵素に保存されたアミノ酸配列 (H-X-E-X₂₃₋₂₈-P-C-X-C) をN末端とC末端に有し、C末端ドメインのみ (CD2) が、HIVの標的細胞内でHIVのRNAから逆転写されて生じた(−)DNAのシトシンをデアミネーションしてウラシルに変換する活性を保持している。この酵素活性により、HIVのゲノムDNA上に広い範囲にわたって存在するGをAへと変異することができ、A3GはHIVの増幅を阻害する抗HIV活性を示す。本稿では、このA3GのCD2が保持する抗HIV活性の根幹であるデアミネーション反応機構をリアルタイムNMR法によって解析した結果を解説する^[1]。

2. APOBEC3Gの酵素反応の特徴

A3Gは、一本鎖DNA中に存在する連続的につながったCCCの三番目のシトシンを好んでデアミネーションすることが知られている^[2]。また、興味深いことにA3Gによるデアミネーション反応は位置依存的であり、一本鎖DNA上において5'側により多く変異が導入される。さらに、高速AFMやFRETによって、A3Gは一本鎖DNAに非特異的に結合するため結合能が非常に弱いことや、DNAの両方向に約30 nm (69 nucleotide) スライドし続けることが示されている^[3,4]。このような特徴的な酵素反応は、酵素反応の解析によく用いられるミカエリス・メンテン式で解析することが困難である。そこで、このような酵素反応のための反応速度論モデルを構築し、リアルタイムNMR法と合わせることで、A3Gの酵素反応機構を明らかにした。

3. リアルタイムNMR

リアルタイムNMR法は、化学シフトの変化を追跡する方法とシグナル強度を追跡する方法が存在する。化学シフトの変化を追跡する例としては、¹⁵N-HSQCとNOESYスペクトルを経時的に測定することによって蛋白質のフォールディング過程を解析している報告がある^[5]。シグナル強度を追跡する例では、GTPaseがGDPを加水分解してGTPに変換する反応速度を、GTPaseの¹⁵N-HSQCスペクトルから解析している報告がある^[6]。このように、リアルタイムNMR法は、適したNMR測定法を選択することによって、経時変化していく反応を止めることなく追跡できる手法である。また、同時に複数の場所で起こる反応を一度に追跡することも利点の一つである。本研究では、一本鎖DNA上でA3Gによって引き起こされる複数のデアミネーション反応を、TOCSY法によって解析した(図1)。

4. リアルタイムNMR法によるA3Gの

位置依存的なデアミネーション反応の解析

NMR管に標的一本鎖DNA(表1)を入れ、A3Gを添加後に消失するシトシンのピーク強度をリアルタイムに追跡する。具体的には、TOCSYスペクトルを連続測定し、デアミネーションされることによって消失するシトシンの5位と6位の¹Hの相関ピーク強度を時間に対してプロットした(図2)。最初に、2個のCCCを含む一本鎖DNA (S_{2ccc}) に対するA3G全長とA3G CD2のデアミネーション反応を追跡した(図2a, b)。その結果、どちらの場合でも5'側のCCCにおけるデアミネーション反応の方が早いことが分かった。また、A3G CD2のみでも位置依存的にデアミネーションすることや、A3G CD2がA3G全長よりも酵素活性が高いことを明らかにした。すなわち、これらの結果は、A3G CD2は位置依存的デアミネーション反応を起こすのに重要であることを示唆している。続いて、A3Gが一本鎖DNA上

表1 研究に用いた核酸の種類

Name	Sequence
S ₂ CCC	5'-ATTCCCAATTTTTTTTTTATACCCATTT-3'
S _{CCC} SSCCC	5'-ATTCCCAATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTATACCCATTTT ₂₀ -3'
S _{CCC} dsCCC	5'-ATTCCCAATTCGCGAACGCGCAAGCGCATACCCATTTT ₂₀ -3' 3'-GCGCTTGCGCGTTTCGCG-5'
S _{5'} CCC	5'-TTACCCATT-3'
S _m CCC	5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTACCCATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'
S _{3'} CCC	5'-TTTACCCATTT-3'

をスライドしてデアミネーション反応を起こしているか否かを調べるために、2本鎖DNAを含む核酸(S_{CCCdsccc})を用いて同様の実験を行った(図2c, d)。A3Gは2本鎖DNAには結合できないため、2本鎖DNAはA3Gのスライドを阻害する。実験結果は、5'側と3'側のCCCにおけるデアミネーション速度がほぼ同等になった(図2d)。このことは、リアルタイムNMR法でもA3G CD2がDNA上をスライドすることを検出可能であることを示している。さらに、同じ長さであるが異なる位置にCCCを含む1本鎖DNA(S_{5'ccc}, S_{mccc}, S_{3'ccc})を用いてデアミネーション反応速度を比較した結果、5'側>中央>3'側のCCCの順で反応速度が異なることも明らかにした(図3b)。

5. モデルの構築

A3G CD2の位置依存的デアミネーション反応機

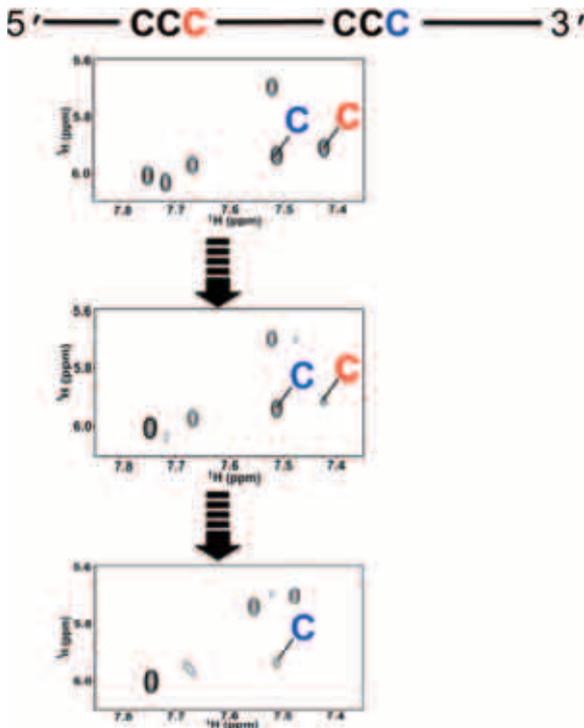


図1 TOCSY法によるデアミネーション反応の追跡

構を説明するために、反応速度論モデルを構築した(図3a)。このモデルは、A3G CD2は、どの塩基にも同じ結合速度定数k_{on}で結合し、同じ解離結合定数k_{off}で解離する。また、両方向に同じ速度k_sでDNA上をスライドし、一度スライドし始めると向きを変えないことを仮定している。3'からCCCに入った時の酵素活性をk_{cat(3'→5')}とし、3'からCCCに入った時の酵素活性をk_{cat(5'→3')}とした。A3Gと1本鎖DNAとの結晶構造はまだ決定されていないが、以前に筆者らが決定したA3G CD2単体の溶液構造には活性ポケットの片側に壁が存在する^[7, 8](図4)。この壁が、CCCが正確に活性ポケットに入ることを決定していると推測できる。よって、A3G CD2の活性ポケットにCCCが入る過程において、スライドする方向によって異なる2つのk_{cat}が存在すると仮定した(図3a)。通常の酵素反応では、酵素は生成物に結合できないが、A3Gは、1本鎖DNAに非特異的に結合するため酵素に対する基質と生成物の和は一定になる。そのため、A3Gによるデアミネーション反応の変化量は、式(1)のように表すことができる。

$$I(t) = I_0 \exp(-k_{deami} t) \tag{1}$$

I₀は、最初のシグナル強度であり、k_{deami}は見かけのデアミネーション速度を表し、下記のように記述できる。

$$k_{deami} = \frac{[^N\text{S}][^N\text{E}]}{S_0 K_d} \{k_{cat(3' \rightarrow 5')} (1 - \alpha^n) + k_{cat(5' \rightarrow 3')} (1 - \alpha^{N-n+1})\} \tag{2}$$

$$[^N\text{S}] = \frac{1}{2} (-^N\beta + S_0 - E_0 + \sqrt{(^N\beta - S_0 + E_0)^2 + 4E_0 ^N\beta}) \tag{3}$$

$$[^N\text{E}] = \frac{1}{2} (-^N\beta - S_0 + E_0 + \sqrt{(^N\beta + S_0 - E_0)^2 + 4E_0 ^N\beta}) \tag{4}$$

$$\alpha = k_s / (k_s + k_{off}), \quad ^N\beta = \frac{K_d}{2 \{N + 1 - (1 - \alpha^{N+1}) / (1 - \alpha)\}} \tag{5}$$

Nは、全長の塩基の数を表し、nは反応するシ

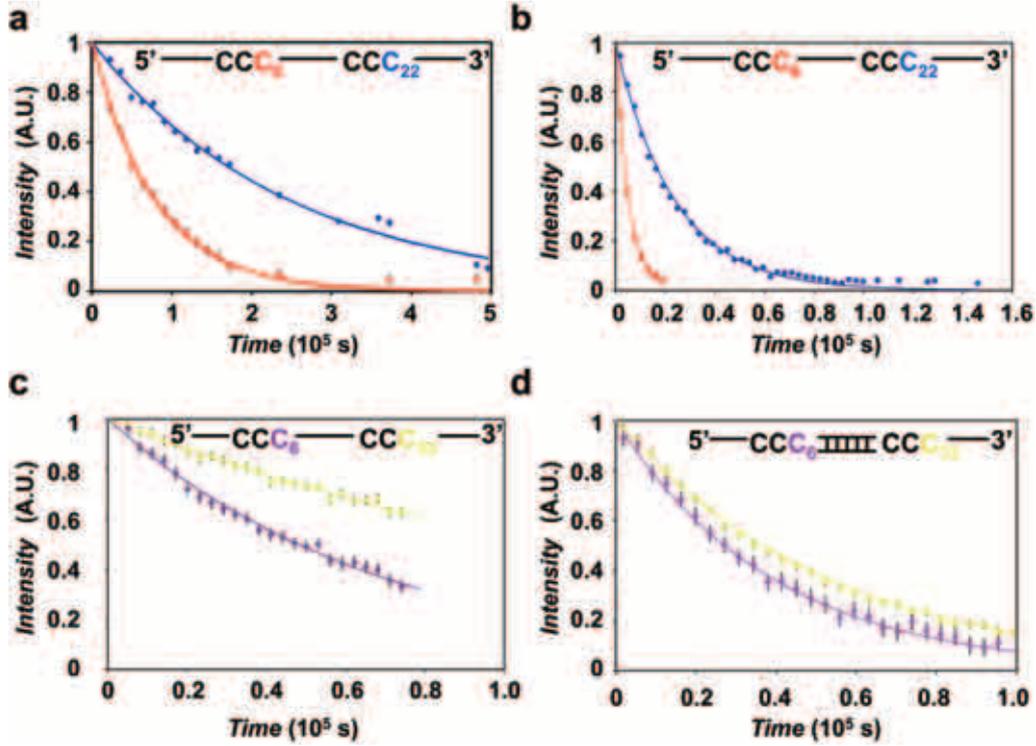


図2 デアミネーション反応のリアルタイムモニタリング

(a) 全長A3Gの S_{2CCC} に対する反応 (b) A3G CD2の S_{2CCC} に対する反応 (c) A3G CD2の $S_{CCCSSCCC}$ に対する反応 (d) A3G CD2の $S_{CCCdSSCCC}$ に対する反応

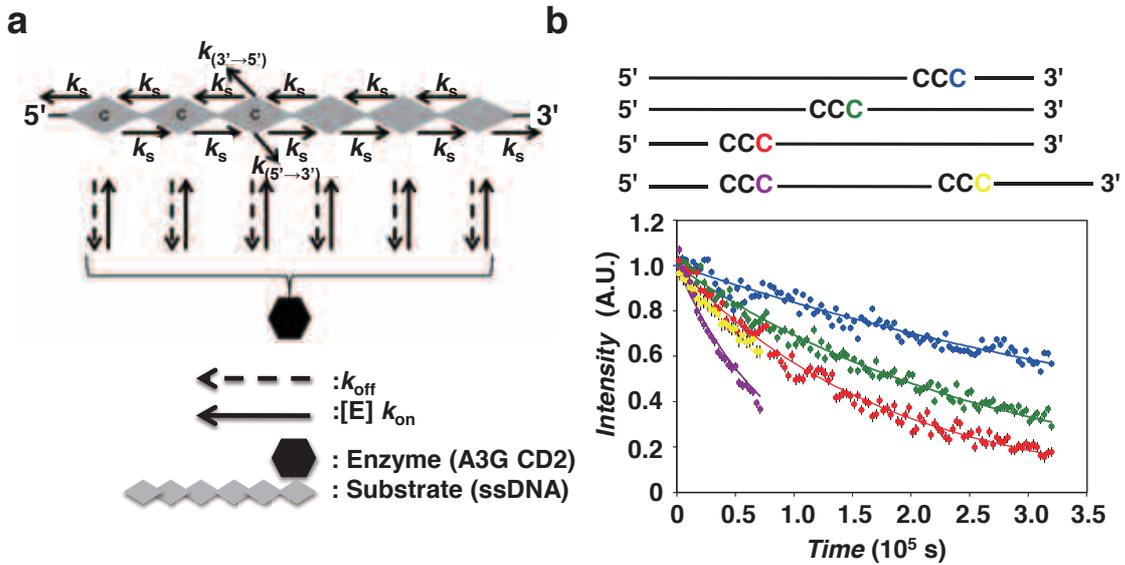


図3 リアルタイムNMR法による位置依存的デアミネーション反応の定量解析

(a) A3G CD2によるデアミネーション反応の速度論モデル (b) リアルタイムNMRのデータ。 S_{5CCC} のC6(赤)、 S_{mCCC} のC26(緑)、 $S_{3'CCC}$ のC45(青)、 $S_{CCCSSCCC}$ のC6(紫)、C33(黄)

シンの3'末端からの位置を表す。 $[^N S]$ はフリーの基質濃度、 $[^N E]$ はフリーの酵素の濃度である。 α 、 $K_d (= k_{off}/k_{on})$ 、 $k_{cat(3 \rightarrow 5)}$ 、 $k_{cat(5 \rightarrow 3)}$ は、下記の測定条件に依存しないパラメーターである。DNAの長さが異なる条件やA3GとDNAの比が異なる条件で測定したリアルタイムNMRのデータ (S_{5CCC} 、 S_{mCCC} 、 $S_{3'CCC}$ と $S_{CCCSSCCC}$ 中の2つのCCC) のグローバルフィットを行った結果、上記 (1) の式によくフィットし、 k_{cat}

($3 \rightarrow 5$) は 68 s^{-1} 、 $k_{cat(5 \rightarrow 3)}$ は 14 s^{-1} という結果が得られた^[9]。この2つの異なる k_{cat} が、A3Gによるデアミネーション反応が位置依存性を示す要因である。A3Gは、1本鎖DNA上のいずれの場所にも均等に結合後、どちらの方向にもスライドする。よって、5'側にあるCCCの方が、A3Gが3'側から入る頻度が高くなる。そのため、あたかもA3Gが5側のCCCにより多くの変異を導入しているように見える

わけである。

場をお借りして感謝します。

7. まとめ

デアミネーション反応のリアルタイムNMRデータを新規に構築した反応速度論モデルで解析することによって、A3Gの位置依存的なデアミネーション反応の機構を明らかにした。A3Gの位置依存的なデアミネーション反応は、A3Gが標的シトシンに入る方向によって異なる酵素活性 k_{cat} を持っていることで説明ができることを示した(図5)。

近年、APOBECファミリーによるデアミネーション反応が、DNAの脱メチル化過程に関与することが報告されている。また、他の酵素によってDNA上のシトシンが様々な修飾を受け、エピジェネティックに機能していることも報告されている。これらの酵素反応の詳細な反応機構は解明されておらず、今回紹介したリアルタイムNMR法による解析が期待される。

8. 謝辞

本稿で述べた研究成果は、京都大学エネルギー理工学研究所の片平正人教授と永田崇准教授、サントリー生命科学財団生物有機科学研究所の菅瀬謙治主席研究員の支援により推進されました。この

参考文献

- [1] A. Furukawa, K. Sugase, R. Morishita, T. Nagata, T. Kodaki, A. Takaori-Kondo, A. Ryo, and M. Katahira, (2014) Quantitative analysis of location- and sequence-dependent deamination by APOBEC3G using real-time NMR spectroscopy. *Angew. Chem. Int. Ed.* **53**, 2349-2352.
- [2] Q. Yu, R. Konig, S. Pillai, K. Chiles, M. Kearney, S. Palmer, D. Richman, J. M. Coffin, N. R. Landau, (2011) Single-strand specificity of APOBEC3G accounts for minus-strand deamination of the HIV genome. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**, 435-442.
- [3] S. Shlyakhtenko, A. Y. Lushnikov, A. Miyagi, M. Li, R. S. Harris, Y. L. Lyubchenko, (2012) Nanoscale structure and dynamics of ABOBEC3G complexes with single-stranded DNA. *Biochemistry* **51**, 6432-6440.
- [4] G. Senavirathne, M. Jaszczur, P. A. Auerbach, T. G. Upton, L. Chelico, M. F. Goodman, D. Rueda, (2012) Single-stranded DNA scanning and deamination by APOBEC3G cytidine deaminase at single molecule resolution. *J. Biol. Chem.* **287**, 15826-15835.
- [5] M. Mizuguchi, G. J. Kroon, P. E. Wright and H. J. Dyson, (2003) Folding of a β -sheet protein monitored by real-time NMR spectroscopy. *J. Mol. Biol.* **328**, 1161-1171.
- [6] M. T. Mazhab-Jafari, C. B. Marshall, M. Smith, G. M. C. Gasmi-Seabrook, V. Stambolic, R. Rottapel, B. G. Neel, and M. Ikura, (2010) Real-time NMR study of three small GTPases reveals that fluorescent 2-(3)-O-(N-methylanthraniloyl)-tagged nucleotides

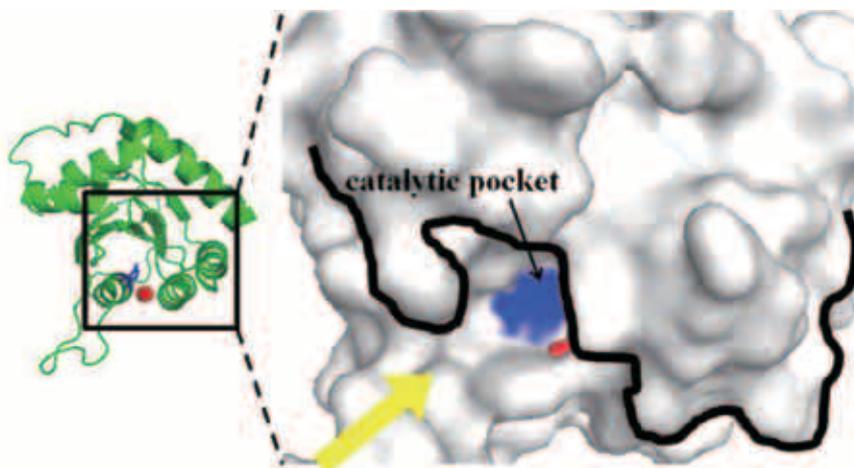


図4 A3G CD2の活性ポケットの構造

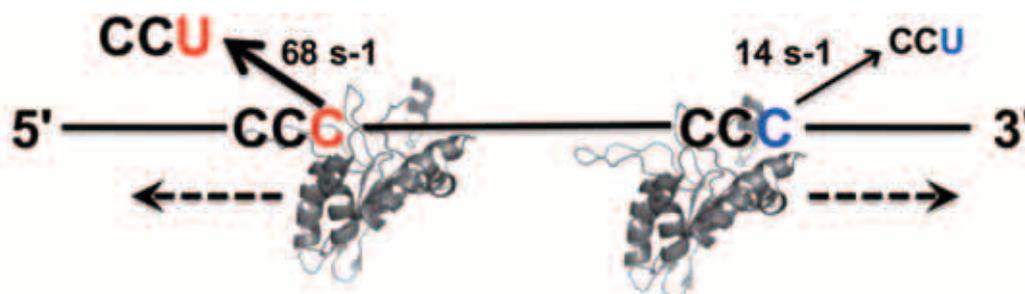


図5 A3G CD2の位置依存的デアミネーション反応機構

alter hydrolysis and exchange kinetics. *J. Biol. Chem.* **285**, 5132-5136.

- [7] L. G. Holden, C. Prochnow, Y. P. Chang, R. Branstetter, L. Chelico, U. Sen, R. C. Stevens, M. F. Goodman, X. S. Chen, (2008) Crystal structure of the anti-viral APOBEC3G catalytic domain and functional implications. *Nature* **456**, 121-124.
- [8] A. Furukawa, T. Nagata, A. Matsugami, Y. Habu, R.

Sugiyama, F. Hayashi, N. Kobayashi, S. Yokoyama, H. Takaku, M. Katahira, (2009) Structure, interaction and real-time monitoring of the enzymatic reaction of wild-type APOBEC3G. *EMBO J.* **28**, 440-451.

- [9] K. Sugase, T. Konuma, J. C. Lansing, P. E. Wright, (2013) Fast and accurate fitting of relaxation dispersion data using the flexible software package GLOVE. *J. Biomol. NMR* **56**, 275-283.



古川 亜矢子 (ふるかわ・あやこ)

2002年 東京理科大学理学部応用化学科 卒業

2007年 東京理科大学大学院理学研究科化学専攻博士後期課程修了
日本学術振興会特別研究員 (DC1)

2007年-2010年 横浜市立大学大学院生命ナノシステム科学研究科 特任助教

2010年-2012年 京都大学エネルギー理工学研究所 日本学術振興会特別研究員 (PD)

2012年~現在 公益財団法人サントリー生命科学財団生物有機科学研究所 研究員
慶應義塾大学医学部医化学教室 特任助教

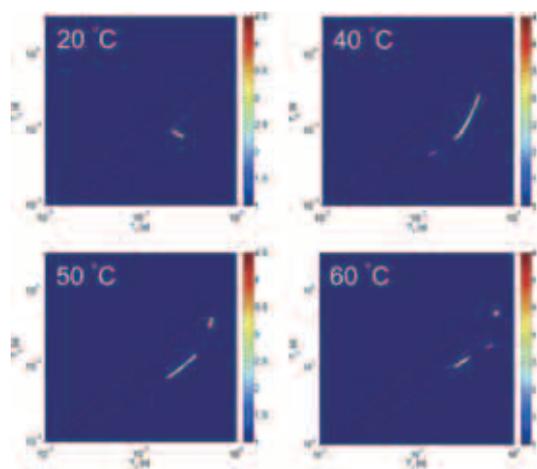
2009年日本核磁気共鳴学会会員

注目すべき最新の論文①

水中で起きる両親媒性ポリアスパラギンの温度応答性のNMR研究

NMR studies of thermo-responsive behavior of an amphiphilic poly(asparagine) derivative in water
E.watanabe et al., *Polymer* **55**, 278-286 (2014).

生体適合性両親媒性ポリアスパラギン (PAD) 水溶液は、温度に応じて可逆的にゾルーゲル転移を示す。このゾルーゲル転移現象を、溶液および固体¹³C NMRスペクトルを観測してPADの運動性から説明した。また、²H NMR緩和時間、 T_1 と T_2 の相関関係を逆ラプラス変換によって2次元マップに展開し、水分子の運動性を解析することにより、ゾルーゲル転移現象の水分子とPADとの相互作用を視覚化することに成功した。右図のPAD水溶液は40°Cから粘度上昇が始まり、58°Cで最高粘度70 Pa·sに到達した後、粘度は下降する。水分子の運動性を図から見ると、20°Cでは T_1 と T_2 がほぼ同じ値をもつ分子のみであるのに対し、ゲル化する40°Cでは2種類以上の水分子が観測された。PADと相互作用している水分子の T_2 は短い値を示し分布が小さい。これはゲル化したPAD鎖のネットワーク中に捕獲された水分子と帰属された。このようにゾルーゲル転移中の水分子の運動性の違いを視覚化できることを示したことは非常に有意義であり興味深い。



ポリアスパラギン10wt%重水溶液中の重水素2次元 T_1 - T_2 逆ラプラス変換マップ図。破線は $T_1=T_2$ を示す。ピーク強度はlogスケールで色分けされている。原図の一部を削除してある。(Reproduced with permission from Elsevier)

[防衛大学校 浅野敦志]

NMRのハードウェアに関するメモ

1. 主に送信系について

(株)JEOL RESONANCE

ソリューション・マーケティング部アプリケーションサポートチーム

根本 暢明

序

本稿ではNMR (Nuclear Magnetic Resonance ; 核磁気共鳴) のハードウェアについて概説する。ここに挙げる装置は、現在までに市場で販売された「ような」装置を元にしてはいるが、必ずしも実際の装置はこのとおりではない。むしろ原理原則を説明するため、古典的な道具立てであることは予めお断りしておきたい。これは、何か隠そうとかいう意味が有るわけではなく、本質を分かりやすく伝えるためであることはご理解いただけるかと思う。以前に比べて状況は良くなったが、NMRを使い学ぼうとする皆さんが、特にハードウェアについて理解を深めようとした時に、参考となる良いテキストがあまり無いことが筆者に本稿を書かせた主な原因である。本稿は、高等学校の物理を履修程度の知識を前提として、一部例外はあるが極端に難しい記述はある程度避けるようにした。基本的にNMRを初めて触る人が手にするハンドブックとなるように心がけたつもりである。参考文献にあげる教科書などと併せてお読みいただくことで理解が深まると思われる^[1~19]。

もともと本稿は、「第6回若手NMR研究会 (2005

年、和歌山)」での筆者のトーク、「NMRハードウェアの概説」を話した時に作ったテキストが大元のいわゆる「底本」である。さらに、昨年筆者の勤務先における「JEOL RESONANCE 2013年NMR ユーザーズミーティング」(東京および大阪) で話をするとき改訂を加えた配布資料に対して、今回さらに加筆訂正を加えた。

ところで、今日的な、フーリエ変換型NMR (FT-NMR) のハードウェアを構成する主なものを挙げると、磁石、分光計 (スペクトロメーター)、コンピュータ、となる (Figure 1) (それ以外には、設置室、電源、コンプレッサー、冷媒および冷媒の製造、貯蔵、移動する手段などが必要であるが、それらについては「別の所」で述べたい)。ErnstがFT-NMRの開発をするために、当時の大型計算機を必要としていた時代はともかく、現在までに、学校や家庭で普段使いのパソコンで十分NMRの装置をドライブし、そのデータをフーリエ変換およびその他の処理をすることは全く問題なくなった。したがって本稿では、限られた紙面ということもあり、コンピュータについては触れない。また、磁石についてもほんの少々記述するにとどめ、紙面の大半をNMRの分光計およびその周辺について集中させたいと考える。本稿の執筆に際し、編集委員会には複数回の掲載を認めて頂いた。そういったわけで、第一回の今回は、大まかな全体の説明の後、主に分光計の送信系について述べさせていただいて、第二回は、主に分光計の受信系、プローブなどについて述べる予定である。また、近い将来、どこかインターネット上のサーバーに、紙面に掲載することができなかったものを増補版として掲載するつもりである。そちらには、上記に述べたような、あまり教科書などには載らないような、「裏方のNMRハードウェア」、溶液蛋白質測定におけるセッティングケーススタディと、ハードウェアのトラブルシューティングなどについて述べたい。



Figure 1 NMRの3大主要部品

左からホストコンピュータ、NMR分光計 (大きい方の箱、床に置かれた小さい箱には前置増幅器などが入っている)、(超伝導) 磁石。(株)JEOL RESONANCE提供。

NMRのメーカは(筆者の勤務先であるところの)国内1社、外国2社の概ね3社がmajor-vendorとして様々な製品を世に出している。非常にありがち、かつ、困ったことに、メーカごと部品や測定方法に関する用語が統一されていない。可能な限り一般性のある日本語を使用することを試みたが、お使いの装置メーカのもの用語が異なる場合もあるかもしれない。お許しいただきたい。さらに筆者が過去に筆者のホームページや筆者の勤務先の配付資料等で述べたことと重複する箇所も多い。そういったこともお許し頂くより他ない。また内容が筆者の専門分野である生体高分子(特にタンパク質、ペプチド)の溶液測定分野に内容が大きく偏ってしまっていることもお詫び申し上げたい。

なお、本稿の内容および筆者の講義内容に基づいて、NMRを操作したり部品を交換するなどして、装置が故障したり、火災が発生したりなど、人的ないし物的ないし時間的ないし金銭的被害が発生しても、筆者および筆者の勤務先は何ら関係なく一切責任を負わない。あくまで自己責任でお願いしたい。

1. オーバービュー：

各部品の名称と機能の簡単な説明

以下、本稿で使用する用語の確認の意味も兼ね、NMRハードウェアの各部品と機能などを簡単に説明する(Figure 1)。

ホストコンピュータ：

人間が分光計に対し、積算命令等を出し、NMR信号をフーリエ変換する。以前は多次元フーリエ変換を実行するために、高い計算パワーを有するメインフレームコンピュータやエンジニアリングワークステーションを使用していた。そのため高価であった。しかし、現在までの爆発的なコンピュータの発達により、家庭用あるいは事務用のパソコンで、通常の1次元ないし2次元データのデータ処理することは問題なくなった。以前であれば、データ処理のためにワークステーションの使用時間を割り振って使用したりしていたのだが、安価なパソコンで処理できることで、そういったことも不要になった。大学の研究室では、学生さんの個人所有のパソコンでデータ処理を行い、出来上がったスペクトルをすぐにドローイングソフト、ワープロソフトやプレゼンテーションソフトへ渡し、レポート、論文の図、ポスターやプレゼンテーションファイルの作

製まで、一台のパソコンで完結することが当たり前になった。このことは隔世の感がある。また、インターネット環境が進化したことで、100km以上離れた場所の装置にアクセスするようなことも可能になってきている。ネットワーク経由テレビ電話機能などとも相まって、遠隔の測定やメンテナンスのサポートも平易になってきた。

分光計：

分光計コンピュータ：分光計内に配置したコンピュータで、ホストコンピュータから渡されるパルスシーケンスの内容を送信系に伝える。また、ADC(Analog to Digital Converter)で取得したデータをホストコンピュータに渡す。

シーケンサ：分光計コンピュータからの命令で、パルスのタイミングを調整する。

周波数シンセサイザ：安定した高周波を発生させる。

ミキサ：シーケンサからの中間周波数と周波数シンセサイザからの信号を混合する。

アッテネータ：出力を減らす。

パワーアンプ：高周波パルスの電力を増幅する。

デュプレクサ：パワーアンプからプローブへの高出力信号と微弱なNMR信号を振り分ける。

プローブ(プローブヘッド、アンテナ)：RFパルスをサンプルに電磁波として与え、NMR信号を獲得する。

プリアンプ(前置増幅器、ヘッドアンプ)：プローブで得た微弱なNMR信号を増幅する。

シムコイル：磁場の空間的不均一度を補正する。

磁石：

強烈な静磁場を発生させる。大きく分けて永久磁石(地球を含む)と電磁石に分類することができる。電磁石は、さらに、常温運転の磁石と超伝導磁石に分類できる。近年ヘリウムの供給不足が発生したこともあり、永久磁石および冷凍器付き超伝導磁石に脚光が浴びている。どちらも通常の運転時にヘリウムの蒸発がない。超伝導磁石では、何らかの理由で超伝導磁石の超伝導状態が破れると、磁石を流れている電流がジュール熱を発生する。すると、液体ヘリウムが気化し、さらにコイルを流れる電流がジュール熱を発生し、磁石のヘリウム槽に存在する液体ヘリウムが一気に蒸発する。この現象をクエンチ(quench)と呼ぶ。クエンチが起きると、非常に多量の液体ヘリウムが一気に蒸発す

る。そのため、NMR室が極端に狭い場合、酸素分圧が低下して、酸欠・窒息のため死亡する可能性がある。普通の神経の人であれば、その場に居続けることはせず、まず室外に逃げられるので大丈夫であろうが、NMR室で「お昼寝」をすることは非常に危険である。また最近では、新しいタイプの、バルク超伝導体を使用したNMR用の磁石も開発されている^[20, 21]。

2. シム

特に溶液の高分解能NMRにおいては、磁石内部のプロープ内のサンプルを配置する場所で非常に高い均一度が要求される。ちなみに、次号の、プロープの項で述べるが、非常に良く分解能調整された状態で、クロロホルム CHCl_3 (d_6 -アセトン溶液) の ^1H -NMRスペクトルは、0.4 ~ 1 Hz程度の非常に狭い線幅(半値全幅)を示す。今、クロロホルムの d_6 -アセトン溶液を600 MHz (^1H の共鳴周波数)装置で測定することを考えよう。また、面倒なのでサンプル管の水平方向(radial方向、XないしY方向)の磁場は理想的に全く均一で、サンプル管の上下方向(axial方向、Z方向)が不均一だと仮定する。その場合、サンプルの上部とサンプルの下部の間20 mmほど離れている場所で、サンプル上部と下部で主磁場 B_0 強度が1%違っていたと仮定する。サンプル上部で14.1705 T、サンプル中央部で14.1000 T、サンプル下部で14.0295 Tのように線型に違っていると仮定する。そのような状態で、上述のクロロホルムの d_6 -アセトン溶液を測定したとする。そうすると、おおざっぱに言って、サンプル上部とサンプル下部で ^1H の共鳴周波数にして6 MHzの違いになり、クロロホルムの線幅も6 MHz (= 10,000 ppm!)になる。全く高分解能ではない。言い方を代えると、0.6 Hz程度の分解能を出そうと思えば、0.1 ppb (ppbはparts per billionのことで10億分の1のことである。つまり、1 ppb = 10^{-3} ppm)だが、決して間違っても1 mppmなどと書いてはいけない)程度の均一度は必要であることになる。つまり、外径5 mm (内径4.2 mm)、長さ20 mm程度のプロープ内の有効体積(体積にして300 μL 未満)を0.1 ppb程度の均一度にしないとこの分解能が出ないことになる。これは相当大変だ。実際には、コイルに直流電流を流すことにより、磁場補正を行う。このためのコイルをシムコイルといい、磁場補正を行うことをシミングという。超伝導磁石を使用したシステムにおいては、2種類のコイルを使用す

る。コイルのうち一つは磁石内に設置された超伝導シムコイルであって、もう一つは磁石の筐体外、プロープの外側に巻かれた室温シムコイルである。超伝導シムは超伝導磁石励磁後、納入するメーカーの担当者が調整するので、ユーザはその存在を忘れていくことが多い。

以下シムの軸に関し考察する。磁石中心を原点にとり、中心軸(主磁場 B_0 の向き)をz方向とし、z軸と直交する面上にx軸とy軸をとり、 r, θ, ϕ を極座標における3つの座標成分とすると(次ページ参照)、磁石の原点近傍でのz軸方向の磁場成分 B_z は、以下のように描くことができることが知られている^[22]：

$$B_z(r, \theta, \phi) = A_0 + \sum_{n=1}^{\infty} A_n r^n P_n(\cos\theta) + \sum_{n=1}^{\infty} \sum_{m=1}^n [r^n P_n^m(\cos\theta) (A_n^m \cos(m\phi) + B_n^m \sin(m\phi))] \quad \dots\text{式2-1}$$

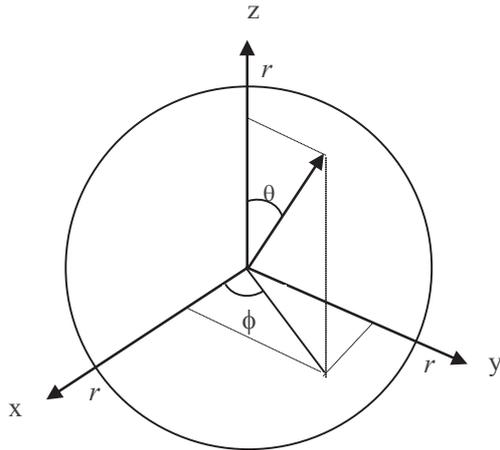
(小難しい数式が飛び出すので、数式アレルギーのある方は読み飛ばして頂いて結構である)。

ここで、 n, m は負でない整数、 A_n^m および B_n^m は定数であり、 P_n はルジャンドル多項式であって、 P_n^m はルジャンドル陪関数である。また、 $m=0$ の場合には、 A_n や B_n 、 P_n といったように、 m を省略する。一般に、均一度が高い磁石の中心にあつては、xおよびy方向への磁場成分(あえて書くなら、 B_x および B_y)はy方向のz方向への磁場成分 B_z に比べて十分小さく無視することができるので、以下、方向への磁場成分 B_z のみ考える。z軸に垂直な平面内で ϕ に依存しない値をとる磁場を軸方向(axialまたはアキシャル方向)磁場といい、 ϕ に依存する値をとる磁場を回転方向磁場(radial、またはラジアル方向)磁場という。つまり、式2-1において、第一項は場所に依存しない項であり、第二項および第三項は場所に依存する項であって、第二項はおおざっぱに言ってz方向のポジションに依存するアキシャル項で、第三項はx, y方向のポジションに依存するラジアル項である。シミングとは式2-1において、第二項および第三項を減少させ理想的には消し去ることに他ならない。通常のNMR試料管は円筒状なので、x, y, zからなるcartesian系(直交座標系)よりは、 r, θ, ϕ からなる極座標系の方が便利であることなどから、こういった表記をする。

まず式2-1の第二項である、アキシャル方向の磁場を考える。第二項を無理矢理cartesian系に展開することを考える。(正直、計算が大変なので、こ

ここでは第二項を4次まで展開する。 $z = r \cos \theta$ であり、 $r^2 = x^2 + y^2 + z^2$ であることに着目し、ルジャンドル多項式を代入すると以下ようになる^[14,15]：

$$\begin{aligned} & \sum_{n=1}^4 A_n r^n P_n(\cos \theta) \\ &= A_1 r P_1(\cos \theta) + A_2 r^2 P_2(\cos \theta) + A_3 r^3 P_3(\cos \theta) \\ & \quad + A_4 r^4 P_4(\cos \theta) \\ &= A_1 z + A_2 \left(\frac{2z^2 - (x^2 + y^2)}{2} \right) + A_3 \left(\frac{2z^3 - 3z(x^2 + y^2)}{2} \right) \\ & \quad + A_4 \left(\frac{8z^4 - 24z^2(x^2 + y^2) + 3(x^2 + y^2)^2}{8} \right) \end{aligned}$$



$$\begin{aligned} x &= r \sin \theta \cos \phi \\ y &= r \sin \theta \sin \phi \\ z &= r \cos \theta \end{aligned}$$

ちなみに、x、yがzに比べて十分小さいと近似すると、

$$\sum_{n=1}^4 A_n r^n P_n(\cos \theta) \Rightarrow A_1 z + A_2 z^2 + A_3 z^3 + A_4 z^4$$

となり、zの多項式になる(めでたし、めでたし)。

続いて、式2-1の第三項(ラジアル項)

$$\sum_{n=1}^{\infty} \sum_{m=1}^n [r^n P_n^m(\cos \theta) (A_n^m \cos(m\phi) + B_n^m \sin(m\phi))]$$

を考える。

$$R_n^m = r^n P_n^m(\cos \theta) (A_n^m \cos(m\phi) + B_n^m \sin(m\phi))$$

ただし $m \leq n$ …式2-2

*1もう少し言うと、質量mの粒子が、ポテンシャルV(r)の力場内に存在しているときのSchrödinger方程式

$$-\frac{\hbar^2}{2m} \nabla^2 \psi + V(r) \psi = E \psi$$

を考える。動径方向の項と角度項に

$$\psi(r, \theta, \phi) = R(r) \times Y(\theta, \phi)$$

のように変数分離したすると、このときの角度項は球面調和関数

$$Y_{l,m}(\theta, \phi)$$

$$= (-1)^{(m+|m|)/2} \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \sqrt{\frac{(2l+1)(l-|m|)!}{2(l+|m|)!}} P_l^{|m|}(\cos \theta) \times e^{im\phi}$$

である。この式と式2-2を比較して頂くと、実は式

とおく。そうすると、ラジアル項をアキシャル項と同様無理矢理計算すると(これまた筆者は根性なしなので、3次までを展開すると)、

$$R_1^1 = A_1^1 x + B_1^1 x$$

$$R_2^1 = 3A_2^1 z x + 3B_2^1 z y$$

$$R_2^2 = 3A_2^2 (x^2 - y^2) + 6B_2^2 xy$$

$$R_3^1 = \frac{3}{2} x (4z^2 - x^2 - y^2) A_3^1 + \frac{3}{2} y (4z^2 - x^2 - y^2) B_3^1$$

$$R_3^2 = 15z (x^2 - y^2) A_3^2 + 30zxy B_3^2$$

$$R_3^3 = 15x (x^2 - 3y^2) A_3^3 + 15y (3x^2 - y^2) B_3^3$$

となる。どこかで見たような項が出てきた(めでたし、めでたし)*1。

ここまでシムによる磁場の均一化において、 B_z 磁場の大きさが場所によってどのように異なるかを、式2-1に示すアキシャル項およびラジアル項にわけ、かつ、それらを多項式に展開したもので示した。したがって、もし、 A_n^m や B_n^m といった係数とかけ算されている相手(例えば A_1^1 に対してはx)のような B_z 磁場の強度勾配(つまり、x方向の座標に比例して B_z 磁場が1次で変化するような強度勾配)を生み出すことができれば、 $-A_n^m$ や $-B_n^m$ を発生させることでこれらの項をキャンセルすることができ、磁場を均一化することができることになる。以前の低磁場の装置においては、これらの項に相当するコイルを実際に巻き、それらに流す電流を調製することで磁場を均一化していた(Figure 2-A)。しかし、対象とする超伝導磁石が大型化し、また、効率的な溶媒除去を実現する必要性などのため、より高次の項を用いて磁場の均一度を向上させる必要が出てきたが、次数が大きくなると、そのようなコイルを巻くのが非常に困難になる。

そこで、マトリックスシムと呼ばれるシムが開発された(Figure 2-B)。このシムでは、上記の各項に相当するコイルを1対1で巻くのではなく、シムの項の数と同じ数のコイルを巻き、それらに流す電

2-2を r^n で割ったものとこの球面調和関数は、非常に似た形をしていることがお分かりいただけると思う。したがって、第三項のΣの内側の r^n を外に出したものを無理矢理図示すると、水素原子核の電子軌道(1s, 2s, 2p...)と同じ形をすることが想像できると思う(このあたり、物理に強い人には当たり前のことらしいが、腐れ化学屋の筆者には非常に新鮮であった)。NMR現象を量子力学的に説明している教科書は珍しくないが、シムの解説に量子力学で使用する物理数学の知識が必要だとは正直思わなかった。気の利いた量子力学の教科書や物理数学の教科書には必ずこの球面調和関数の記述があるので、興味のある人は参照して欲しい。

流を専用のコンピュータ、DC電源とDAC (Digital to Analog Converter) でコントロールして、トータルで上記の、 $-A_n^m$ や $-B_n^m$ に相当する項を発生させ

る。したがって、この場合、1本1本のコイルはZ1のようなシム項と直接1対1に対応していない。さらに、シムの項より多いシムコイルを用意し、

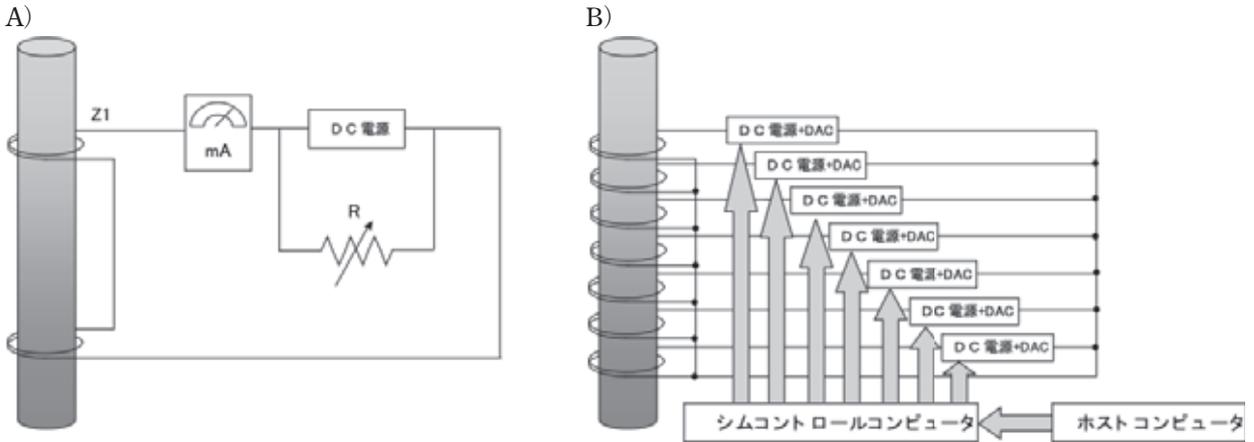


Figure 2 シムコイルの概念模式図

A) シムの項とコイルが1対1対応しているケース。1本1本のコイルに流す電流をコントロールすることで、それぞれのコイルが発生する補正磁場をコントロールする。ここでは例えばZ1のようなシム項1つ分のみ示す。B) マトリックスシム。シムの項の数と同数のコイルを用意し、専用のシムコントロールコンピュータが1本1本のコイルに流す電流を計算し、コイル全体で磁場補正を行う。したがって、この場合、1本1本のコイルはZ1のようなシム項と1対1に対応していない。さらに、シムの項の数より多数のコイルを用意し、シムコントロールコンピュータがコイルに流す電流を計算する際にラグランジュの未定乗数決定法を用いて、シムコイルに発生するジュール熱を最低になるように調節することを特長とするシムをラグランジュシムと呼ぶ^[22, 23]。

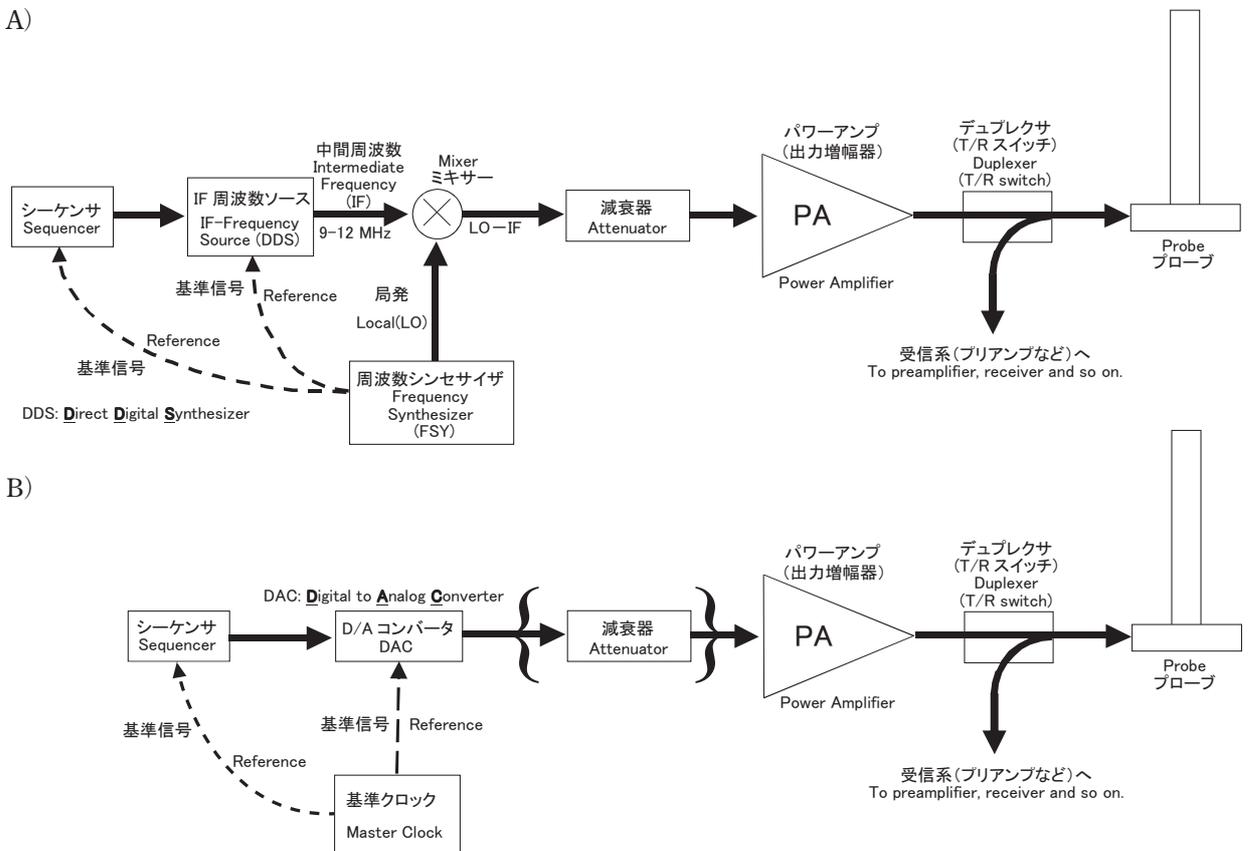


Figure 3 NMRの送信系に関するブロックダイアグラム

シーケンサからプローブまでに入っている部品に関して記す。A) 今までの装置。途中、DDSで作られた中間周波数と、FSY (Frequency SYnthesizer) で作られた周波数が混合された後、PA (Power Amlifier) へ送られる。B) 今後はミキシングを行わずにDAC (Digital to Analog Converter) を使うことで必要な波形を合成しPAに送るものや、digital PAを用いた装置も出てくるかもしれない。

このシミュレーションコンピュータがコイルに流す電流を計算する際に、ラグランジュの未定乗数決定法を用いて、シミュレーションコイルに発生するジュール熱を最低になるように調節することを特長とするシミュレーションをラグランジュシミュレーションと呼ぶ^[22,23]。

3. NMR 分光計における送信系

3-1 NMR送信系のオーバービュー

Figure 3に、シーケンサからプローブまでのNMR送信系に関するブロックダイアグラムを示す。分光計コンピュータから命令を受けたシーケンサは、どのタイミングでパルスが発生させるか調整し、周波数、位相、強度といったデータを中間周波数 (Intermediate Frequency ; IF) の周波数ソース (DDS (Direct Digital Synthesizer ; デジタル

直接合成) などに伝える。この周波数ソースでは、シーケンサから伝えられた情報を基に、中間周波数の信号にシーケンサからの情報でゲートのon/offを行う。このようにして作られた中間周波数のパルスは、ミキサにおいて周波数シンセサイザが作り出した局発周波数 (Local Frequency ; LO) と混合され、その周波数の差の信号がパワーアンプにおいて電力が増幅されたのち、デュプレクサ (T/Rスイッチ) を経て、プローブに到達する。

タンパク質溶液の多核測定では、パルスをどのチャンネルから、こういったタイミングで、こういったパワーで、こういった位相で発生させるか、という組み合わせを変化させることで、様々な情報を引き出すことができる。この項目では、シンフォニーのフルスコア (Figure 4-A) にも似た抽象化

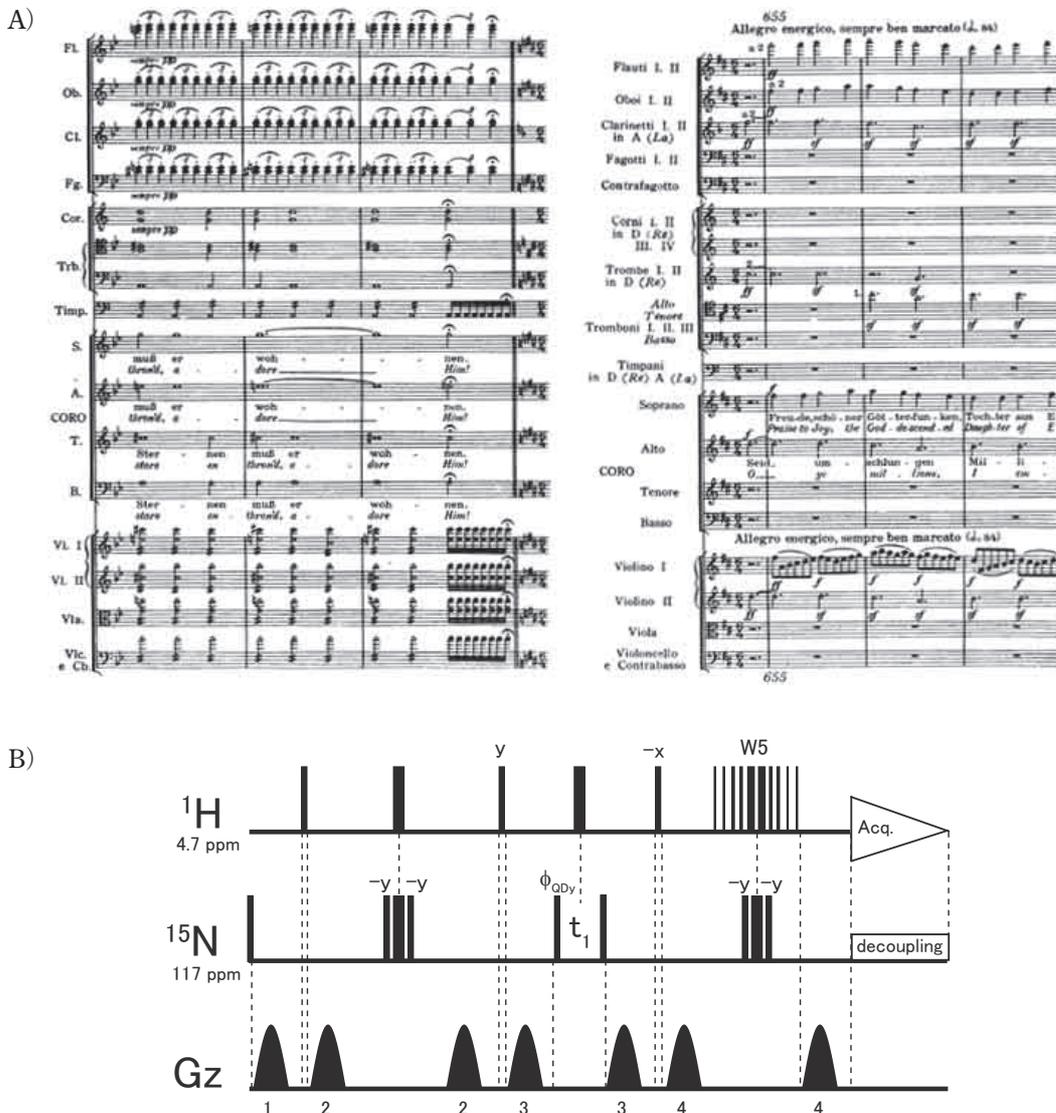


Figure 4 A) L. van Beethoven 作曲、交響曲第九番二短調「合唱付き」より。最終楽章中盤、二重フーガの冒頭部を示す。管弦楽曲のフルスコアにはどのパートがどのタイミングでどの音程の音を発するかが示してある。B) ^{15}N - ^1H HSQC 実験のパルスダイアグラム例。どのチャンネルがどのタイミングでこういったイベント (パルス) を発生させるのか、概念的に示している。つまり縦軸は異なるチャンネルを示し、横軸は時間経過を示す。横軸の順序は概ねあっているが、時間はデフォルメしてある。

された複雑怪奇な図形であるパルスダイアグラム (Figure 4-B) が、NMR分光計上どのように実行され、パルスが発生されるか (Figure 5-Aおよび5-B) について詳しく説明していく。さらに、この項では、ほかのNMRの教科書にはほとんど説明の載っていないミキサについて詳述する (つまり、二つの異なる周波数信号の周波数の和and/or差を取り出すにはどうしたら良いか、という点について触れられているNMRの教科書がほとんどない)。また、タンパク質溶液の多核測定では比較的重要になる、フィルタの使用方法についてもふれる。以下、シーケンサからプローブの方向に向かって、送信系でいったい何が起きているかについて述べる。

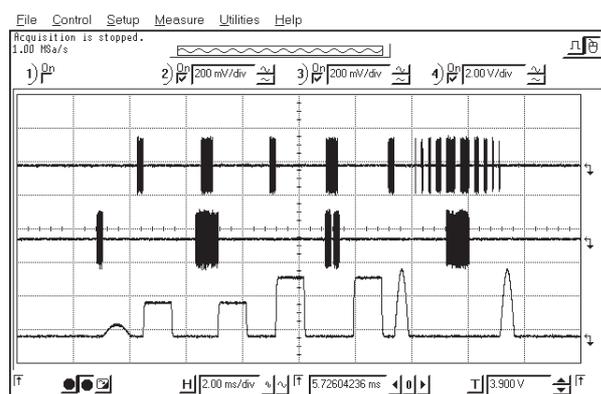
3-2 周波数源

NMRの他の分析方法と大きく異なることの一つが、得られるスペクトル情報の横軸および縦軸の絶対値は基本的に相当アバウトでも許してもらえるということである。例えば、分光光度計でも質量分析計でも、自分が使用しているNMR以外の装置を思い浮かべていただくとよく分かるのだが、分光光度計で波長が異なったり、吸光度がおかしかったりすると、装置として意味をなさない。NMRの1次元スペクトルにおいては、通常横軸は化学シフトであって、縦軸は強度である。縦軸の強度は怪しく、かつ、化学シフトの絶対値は相当怪しいことも多いが (言い換えれば化学シフトは通常「基準物質」で校正するわけで、装置が示している横軸の正体は周波数である)、二つのピーク間の周波数の

差は相当信じてよい (ちなみに、NMR 1次元スペクトルの縦方向は強度なのだが、これは最終的にADCに入ってきた電圧をデジタル表示したものである。無理矢理次元を与えると電圧V(ボルト)に比例関係のある無単位である。スペクトルの隙間がいっぱい空いていて、つまり、ピーク本数が相当少なくかつ信号が相当シャープで、SN比が非常に高く信号がノイズに埋もれることもなく、ベースラインが直線で、励起するパルスのパルス強度やオフレゾナンス効果も気にしなくて良く、アナログないしはデジタルフィルタの有効帯域に比べスペクトル幅が狭い、というような状況であれば、積分曲線も意味があるのかもしれないが、これにしても、筆者が思うに有効数字せいぜい3桁程度のお話である)。この周波数の正確さを出しているのは、実は周波数シンセサイザである。「(従来の)超伝導磁石に冷媒を再充填しないと、いつかクエンチする」、とか、「電気がないとNMRは動かない」といった、(特に本稿では非常にありがちな)アイロニー的なコンテキストを別にすると、NMRの装置周りで積極的に信じてもいい事項というのは実に少ない。しかし、一つだけあげるとすると、NMRに使用されている周波数シンセサイザの出している周波数だけはほとんど狂わず、相当正確だと信じて良いと思われる (ただし、出力電力が時々落ちるなど、当然周波数シンセサイザだって故障する)。この項では周波数シンセサイザについて述べる。

NMRに使用されている周波数シンセサイザの原理を簡単に説明する。非常に安定させたOCXO

A)



B)

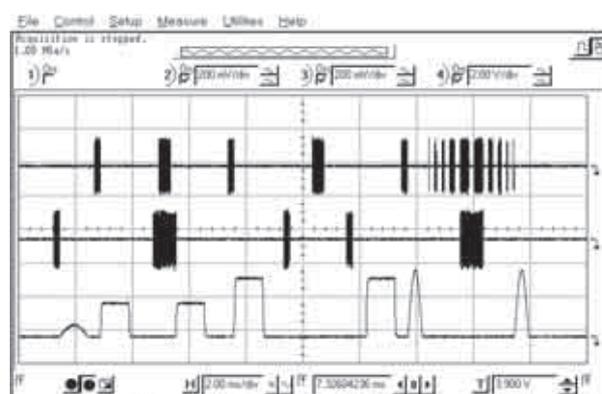


Figure 5 $\{^{15}\text{N}\} \cdot ^1\text{H}$ HSQC実験のパルスシーケンス

パワーアンプで電力増幅する前のパルスをおシロスコープで観測した (サンプリング速度は1MSa/s)。上段が ^1H 、中央の段が ^{15}N 、下段がZ方向の磁場勾配パルスである。実際のパルスシーケンスを基に、パルス長、強度、パルスの形など、多少脚色してある。この実験では、 ^1H の溶媒消去にW5パルス列を用いたWATERGATE法^[24]を使用しており、また、 ^{15}N の磁化の反転には $90^\circ(-y) - 180^\circ(x) - 90^\circ(-y)$ のコンポジットパルスを使用している。また取り込み期における ^{15}N のコンポジットパルスデカップリングは省略している。A) t_1 (^{15}N の展開時間) がまだ小さい状態、B) t_1 時間がある程度増加した状態。

(Oven Controlled Xtal Oscillator、恒温槽つき水晶振動子)に例えば10.000 000 00 MHz基準周波数を発生させる。このOCXOはその名の通り水晶振動子を恒温槽の中に入れ、恒温槽の温度を一定に保つように制御することで、極めて安定した基準周波数を発生する。基準周波数はその後、PLL回路(Phase Locked Loop; 位相同期回路)などで、分周・通倍される(別の言い方をすれば、基本周波数が n/m 倍される。ここで n 、 m は1以上の整数)。そして、最後に、DDSで発生させた比較的低い周波数と混合し出力する。なおNMR装置によっては、DDSが周波数シンセサイザの筐体内にあるものもあれば、筐体外の別部品になっているものもある。ところでOCXOで発生させた基準周波数は、NMRの共鳴周波数を作るのみならず、そのまま基準周波数のまま(例えば10.000 000 00 MHzのまま)、ないしは周波数変換したものを外部出力し、NMRの他の場所での基準信号として使用される。例としては、DDSの基準、シーケンサのクロック、ADCの取り込みタイミングクロックなどである。つまり、この基準周波数がずれると、NMRの共鳴周波数以外の周波数制御、時間制御がしっちゃんかめっちゃうかになる。溶液測定における周波数ロックをしない状態で超伝導磁石は0.1 ~ 10 Hz (^1H)/h程度ドリフトし、磁場強度が徐々に落ちていく。例えば14.1 T磁石(^1H の共鳴周波数600 MHz)で、6 Hz (^1H)/hのドリフトがあったときに、これをppm単位に換算すると、0.01 ppm/hである。しかし、NMRの周波数源に使用している水晶振動子が作り出す基準周波数は0.001 ppm/°C、つまり、1 ppb/°C程度である。水晶振動子の周波数が狂う主たる原因は動作温度の変化である。つまり、室温が安定していれば基準周波数も安定するので、NMR実験室の室温管理は非常に重要である。

DDSはメモリに収納されているデジタルテーブルとして正弦曲線を引き出し、この情報をDAC(Digital to Analog Converter、デジタル・アナログ変換器)へ送り、LPF(Low Pass Filter、低域通過フィルタ)を通すことで必要な周波数を合成する(この方法によって合成された信号は、高周波に少なからざるノイズを含むためLPFが必須である)。OCXOおよびPLL回路からなる周波数シンセサイザの周波数を変化させるには、特にPLL回路の応答が比較的遅いため、数 μs ~ 数10 μs 程度の時間が必要であったが、DDSは出力の周波数、位相、強度を非常に短時間に变化させることが可能であ

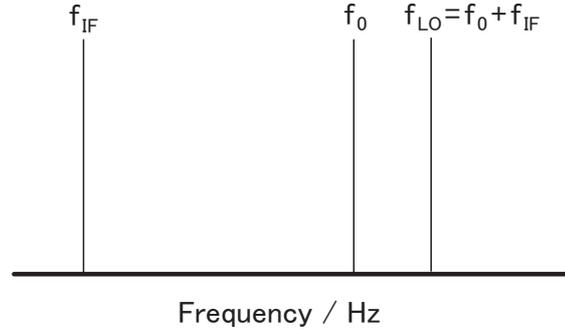


Figure 6 送信系で登場する周波数の関係模式図
 ^1H の600 MHzスペクトルを、中間周波数(IF) 10 MHzの装置で観測する場合、周波数は以下の通りである：
 f_{IF} (中間周波数) ~ 10 MHz、 f_0 (共鳴周波数) ~ 600 MHz、 f_{LO} (局発周波数) ~ 610 MHz。

る。また、DDSは基本的に低い周波数帯で使用され、極端に高い周波数帯では使用できない。

3-3 周波数ミキシング：周波数の和と差

NMRの送信系のみならず、受信系においても、信号の周波数を上げたり下げたりすることはそこかしこで行われている。言い換えれば、2つの周波数の異なる信号の、周波数の和や差の周波数に相当する別の周波数に変換する必要があるということである。Figure 6に、送信系で登場する周波数の関係模式図を示す。装置上、中間周波数 f_{IF} と局発周波数 f_{LO} は3-2で述べた周波数源で作られ、ミキサにてミキシングされ、その差の周波数である、 f_0 (あえていうと共鳴周波数)が作られる。この周波数が加工され、パワーアンプで電力が増幅された後、プローブに送られる。

具体的には、Figure 7で示すようなDBM(Double Balanced Mixer; ダブルバランスミキサ)などのような部品でミキシングが行われる(これ以外にもダイオードの電流特性の非線形性を用いたものもある)。

DBMでは、「大きな信号」がスイッチの役目をして、「小さな信号」の符号を反転させる。したがって、「大きな信号」がたとえ正弦波であっても、矩形波との掛け算をしているようなイメージを持って頂くとよいかと思う。つまり、「大きい信号」の周波数を f_L とし、「小さい信号」の周波数を f_s とすると、出力信号の振幅 A_0 は、

$$A_0 = \sin(2\pi f_s t + \phi) \times \begin{cases} 1 \cdots (2n\pi < t < (2n+1)\pi) \\ -1 \cdots ((2n+1)\pi < t < 2(n+1)\pi) \end{cases}$$

n は整数

と書くことができる。このかけ算の後ろ側の矩形波部分をフーリエ級数展開すると、

$$A_0 = \sin(2\pi f_s t + \phi) \times \frac{4}{\pi} \sum_{k=1}^{\infty} \frac{\sin(2(k-1)\pi f_L t)}{2k-1}$$

$$= \sin(2\pi f_s t + \phi) \times \frac{4}{\pi} \left[\sin(2\pi f_L t) - \frac{1}{3} \sin(6\pi f_L t) + \frac{1}{5} \sin(10\pi f_L t) \dots \right]$$

後ろ側の第一項だけとりだすと、

$$A_0 = \frac{4}{\pi} \sin(2\pi f_s t + \phi) \times \sin(2\pi f_L t)$$

$$= \frac{2}{\pi} [\cos(2\pi(f_s + f_L)t + \phi) - \cos(2\pi(f_s - f_L)t + \phi)]$$

となるため、周波数の和と周波数の差を得ることができる。ところで、DBMで信号を混合しただけでは、周波数の和および差の両方が出力されるので、周波数の和ないし差の欲しい信号をLPFなどのフィルタを使用して選択する必要があったが(Figure 8)、SSB (Single Side-Band) ミキサを使用することで、BPF (Band Pass Filter) を使用することなく、周波数の和ないし差の一方を直接得ることができる (Figure 9)。

Figure 10に、NMR分光計における正弦波の例を示す。Figure 10を見ると、周波数シンセサイザで発生させた610MHzの局発周波数が10MHzの中間周波数と混合され、600MHzとなっていることがわかると思う。なお、これは送信系における周波数ミキシングの例である。(アナログ・ヘテロダイン直交検波の) 受信系では、共鳴周波数の信号を局発周波数と混合して(ミックスダウンして)、中間周波数近傍のベースバンドまで落とし、位相の異なる中間周波数とさらに混合して(ここもミックスダウンして)、オーディオ帯域の信号としてADCで取り込むので、計2回周波数ミキシングをすることになる。一方、デジタル直交検波 (Digital Quadrature Detection ; DQD) の場合、一度だけ比較的高い周波数でミックスし、ADCで取り込む1回の場合が多いと思われる。

3-4 シーケンサ

前項までに、送信系において、どのように必要な

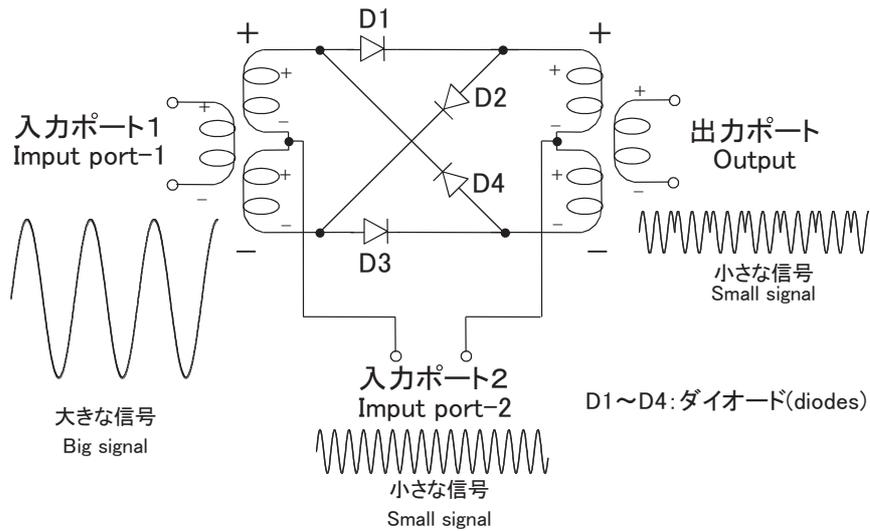


Figure 7 DBM(Double Balanced Mixer) の典型的な回路図

DBMには入力ポートが2つ、出力ポートが1つあると考えて良い。周波数の異なる「大きな信号」と「小さな信号」を入力ポートより入力し(この場合、入力ポート1と入力ポート2、回路的には異なる働きをするが、同じ結果を得ることができるので、どちらが「大きな信号」でも良い)、周波数の和および差に混合された「小さな信号」を出力ポートから得る。このとき、信号の大きさがある程度違っていないと、望ましい動作をしないので注意が必要である。トランスの巻き回数はすべて同一とする。入力ポートの電圧が正のとき(正しくは、ダイオードD1のアノード側の電圧が正の時、ないしは、トランスによる位相進みを無視すると)、ダイオードD1およびD2には電流が流れ、ダイオードD3およびD4には電流が流れない。このとき、入力ポート2に「小さな信号」があると、入力ポート1側のトランスの midpoint、ダイオードD1、出力ポート側のトランス midpoint、と通り、「小さな信号」が流れる。この途中、出力ポート側のトランスから出力ポートに信号が伝わる。逆に、入力ポートの電圧が負のとき(正しくは、ダイオードD1のアノード側の電圧が負の時、ないしは、トランスによる位相進みを無視すると)、ダイオードD3およびD4には電流が流れ、ダイオードD1およびD2には電流が流れない。このとき、入力ポート2に「小さな信号」があると、入力ポート1側のトランスの midpoint、ダイオードD3、出力ポート側のトランス midpoint、と通り、「小さな信号」が流れる。この途中、出力ポート側のトランスから出力ポートに信号が伝わるが、このとき、入力ポートの電圧が負のときと比べ、信号の極性が反転する。つまり、「大きな信号」の極性で、出力ポートの信号は、「小さな信号」が符号を反転する。これはデジタル信号伝達におけるPSK (Phase Shift Keying) と同様の位相変調信号となる。

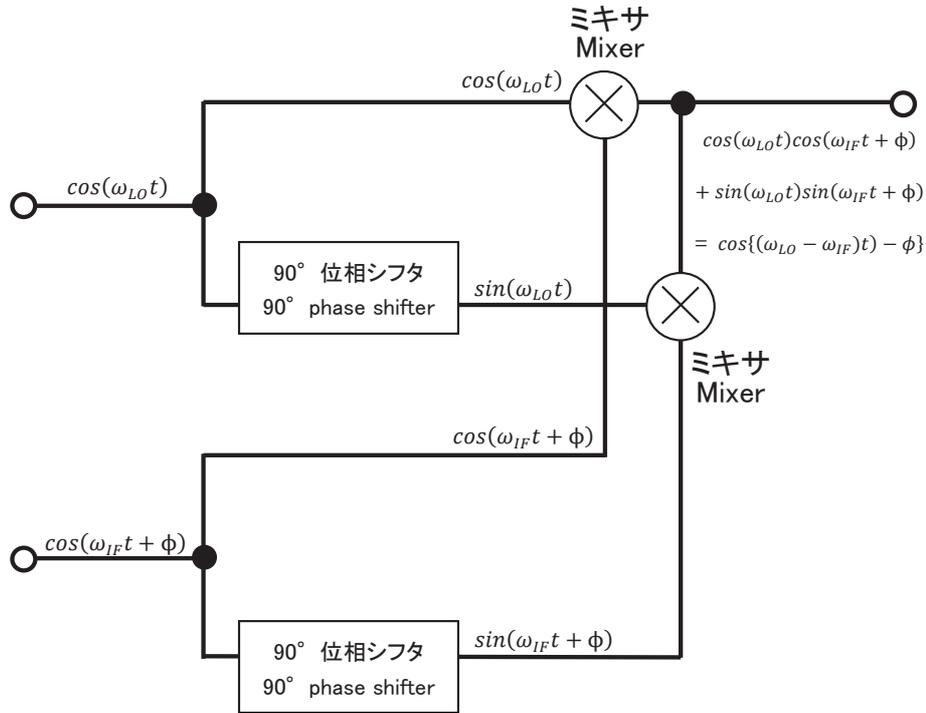


Figure 8 SSB(Single Sideband) ミキサの回路図

ω_{LO} と ω_{IF} の周波数の差が必要な場合、それぞれ別々に 90° 位相シフタで 90° 位相の異なる成分を発生させ、 \cos 成分は \cos 成分どうし、 \sin 成分は \sin 成分どうし DBM (Double Balanced Mixer) のようなミキサで混合した後足し合わせると、三角関数の加法定理から、周波数の差のみを得ることができる。

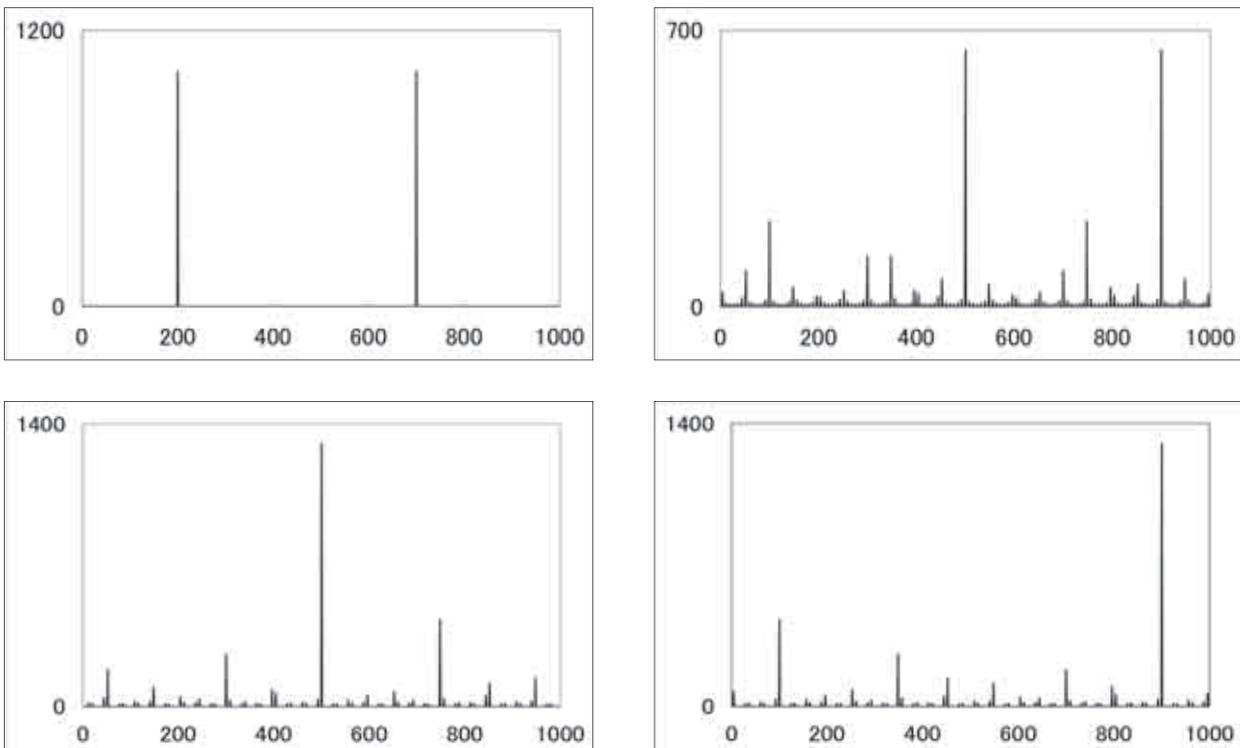


Figure 9 DBM(Double Balanced Mixer) およびSSB(Single Side Band Mixer) のシミュレーション結果

左上) 周波数比が200:700の正弦波をスプレッドシート上で発生させ、それをフーリエ変換したもの(絶対値スペクトル)。右上) 上述のDBMの入力ポート1に相当する信号として、周波数比200の信号を、入力ポート2に相当する信号として、周波数比700の信号を入力したとして、得られた信号をフーリエ変換したもの(絶対値スペクトル)。周波数の差に相当するところの周波数比500と、和に相当するところの周波数比900のところにピークを得た(またスプリアスも多数存在する)。ついで、Figure 8に示した、SSBミキシングをシミュレーションした。左下) DBMで混合した信号の和を、右下) DBMで混合した信号の差をフーリエ変換したもの。それぞれ周波数比500と900のところにピークを得た。

周波数が作成されるか述べてきた。もう少し詳しく述べると、分光計コンピュータからシーケンサに対し、デジタル情報で命令が渡され、シーケンサはそのうち、中間周波数を作成するのに必要な周波数、位相、強度の情報をDDS(直接周波数シンセサイザ)に渡す(Figure 11)。DDSが合成した中間周波数はシーケンサに戻され、ゲートをかけられパルスの形になったものが、ミキサで周波数シンセサイザが発する局発周波数と混合される(Figure 12)。分光計コンピュータのデジタル命令からアナログの高周波に変換するインターフェースがシーケンサといえよう。DDSを使用するかどうかは別にして、最近のマシンではこのように中間周波数に対し

てゲートを掛けパルスにしている。そして、その中間周波数のパルスが局発の信号と混合される。なぜこのようなまどろっこしい方法をしているかと言えば、周波数シンセサイザの周波数や位相を変更するには1~10 μsの時間がかかり非常に低速であるが、DDSを使用することで数百nsという非常に短い時間で高速に周波数、位相、強度を変更することができるためである。また、多次元測定において、通常、間接測定軸の化学シフトは、 t_1 時間等の間接測定軸の展開時間の増大によってもたらされる。したがって、複雑怪奇なパルスシーケンスにあっても、破綻しないような強靱な論理回路が必要である。

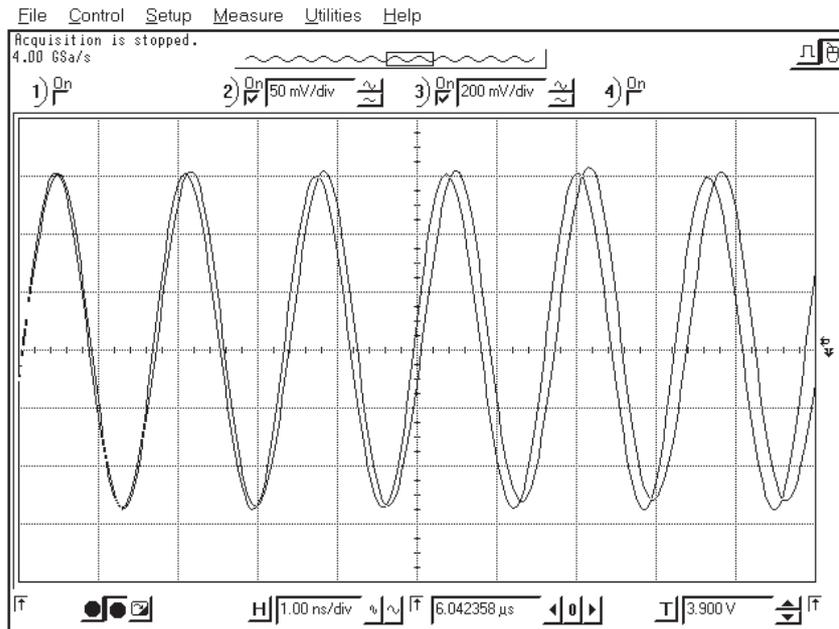


Figure 10 局発周波数 f_{LO} と、ミキサで中間周波数 f_F と混合された f_0 (あえていうと共鳴周波数)の実測信号。高速サンプリングが可能なオシロスコープを使用して観察した。ここでは、局発周波数が610MHzであり、中間周波数10MHzと混合され、600MHzの信号となっている。周期の短いほうが610MHz、周期の長い方が600MHzの信号である。

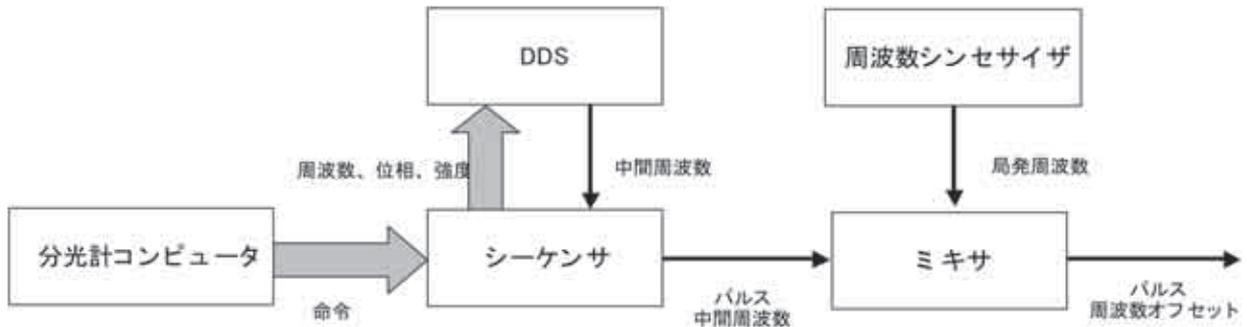


Figure 11 送信系のうち、分光計コンピュータからミキサまでの概念模式図

デジタルの情報を太い矢印で、高周波RF信号を細い矢印で示す。分光計コンピュータからシーケンサに対し、デジタル情報で命令が渡され、シーケンサはそのうち、周波数、位相、強度の情報をDDS(直接周波数シンセサイザ)に渡す。DDSが合成した中間周波数はシーケンサに戻され、ゲートをかけられ、パルスの形になったものが、ミキサで周波数シンセサイザが発する局発周波数と混合される。

3-5 成形パルス (いささかソフトな話)^[10]

かつてNMRで使用するパルスは、すべて矩形波(方形波ともいう)であった。ところがエレクトロニクスの発達により、パルスの形(厳密に言えば包絡線)を時々刻々と時間変化させることが比較的容易にできるようになった。現在、成形パルス(shaped pulse)は、RFでも磁場勾配パルスでも使用されているが、本稿ではRFの成形パルスについて述べる。本来的には、成形パルスの定義は、「時々刻々パルスの強度を変化させたパルス」であったはずだが、現在までにこの概念がRF成形パルスにおいては拡張され、強度のみならず、位相や分光計によっては周波数を時々刻々と変化させるパルスを意味するようになってきた。

本来、たとえば矩形波パルスであっても、パルス長が長くなれば長くなるほど励起帯域は狭くなるので、長いパルスを用いることでスペクトル上のある特定部位だけ励起する選択励起は可能である。しかしながら、矩形波の励起特性は、矩形波をフーリエ変換するとsinc関数($\sin x/x$)になるため、その励起帯域のごく近傍ではその強度を均一と近似して良い(通常のハードパルスによる励起はこれに相当する)が中心から離れるにつれ強度が低下し、また励起対象とする領域の外側でもある程度磁化を励起してしまうことになる。したがって、一般的に、励起する帯域では特性がフラットで、帯域の端の立ち上がり、立ち下がりが急峻であることが望ましい。そのような周波数領域の特性をもつパルス

を、時間領域で強度の時間変化させることで作成する試みは長年行われてきた。

さらに、成形パルスの利用方法の一つは、オフレゾナンスパルスの発生である。つまり、パルスの強度や位相を時間変化させることでトランスミッタのオフセットから離れた場所を励起することができる。前者を強度変調、後者を位相変調と呼ぶ。これらのオフレゾナンスパルスはタンパク質溶液の多核測定において特に ^{13}C に対して頻繁に用いられる。もとのパルスの形を $A(t)$ とし(矩形波であれば、 t によらず $A(t)$ は一定)、変調幅を Δf とすると、振幅変調では振幅を、

$$A_{amp}(t) = \cos(2\pi\Delta ft + \phi) \times A(t)$$

および位相変調ではパルスの位相を、

$$\phi_{PM}(t) = \phi(t) - 2\pi\Delta ft$$

のように変化させる。

従来、成形パルスの記述は、成形パルスのパルス長を有限個(例えば512個)からなるセグメント(通称、「短冊」)に分割し、その強度、位相をパーソナルコンピュータ等のスプレッドシートソフトウェアで計算し、書式を整形したのち使用することが多くあったが*2、最近では式による記述も可能となった。以下、Gauss波形を例に説明する。

k を定数、 t を時刻、 t_{max} をパルス長、時刻 t における強度を $A(t)$ 、とすると、Gauss関数は、

$$A(t) = \exp\left(-k\left(\frac{t_{max}-t}{2}\right)^2\right)$$

のようになる。NMRの出力波形として取り扱うの

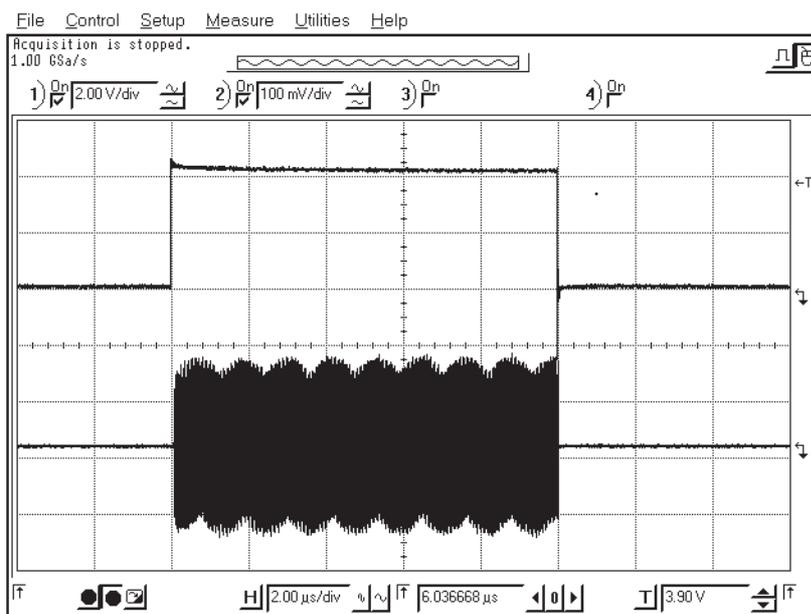


Figure 12 デジタルオシロスコープで観察したRFパルス

上部にゲート信号、下部に中間周波数信号を示す。この図では横方向が2.00 $\mu\text{s}/\text{div}$ なので、10.0 μs のパルスである。

は離散値であり、連続関数ではありえない。NMR向きには、 i 番目の強度を A_i 、 i の最大値を i_{\max} とし、truncation値による打ち切り値を指定し、さらに、 i_{\max} の半分でピークが来るようにすると、

$$A(i) = \exp\left(-\left(\frac{2i}{i_{\max}-i}-1\right)^2 \times \log(\text{truncation})\right)$$

のように書く。これを最近の分光計では、式を「短冊」に変換することなく、直接式で記述することが可能であるような装置もある。また別の例として、I-BURP2などのある種の成形パルスはその波形がフーリエ級数の係数として与えられる^[25]。すなわち、

$$A(t) = a_0 + \sum_j (a_j \cos(j\omega t) + b_j \sin(j\omega t))$$

であるときに、 a_j および b_j のみで波形を指定することができる。以下に例として、I-BURP2を表すフーリエ級数の係数を示す。

$a_0 = 0.50$	
$a_1 = 0.81$	$b_1 = -0.68$
$a_2 = 0.07$	$b_2 = -1.38$
$a_3 = -1.25$	$b_3 = 0.20$
$a_4 = -0.24$	$b_4 = 0.45$
$a_5 = 0.07$	$b_5 = 0.23$
$a_6 = 0.11$	$b_6 = 0.05$
$a_7 = 0.05$	$b_7 = -0.04$
$a_8 = -0.02$	$b_8 = -0.04$
$a_9 = -0.03$	$b_9 = 0.01$
$a_{10} = -0.02$	$b_{10} = 0.01$

このように式で成形パルスを記述することのメリットは、1) 非常に長い成形パルスの場合、表による記述では、セグメント一本一本が時間方向に伸びるだけなので、非常に粗い形状になってしまうのに対し、式による記述では、パルスが長くなっても、メモリの許す範囲でセグメントの本数を増やすことができるため、形状が破綻しにくい、2) また短いパルスも問題で、いかなるNMR分光計においても、イベントを記述することができる最小時間というものが存在するが、仮に表による記述による成形パルスを当初デザインされたパルス長より極端に

短くすると、セグメント1本あたりの長さがそのような最小時間を下回り破綻するので、式で書くところのリミットに対して破綻しない、3) さらに、式で書くことによりパルス長を変更した際のパルスの再作成が不要である(例えば、8192分割で記述された1msのパルスを1.0001msに変更する場合、表で記述すると正確なパルスにならず、再作成が必要になることがある)。

3-6 パワーアンプ

周波数シンセサイザで作られた局発周波数とDDSが作った中間周波数がミキサにおいて混合され、周波数オフセットのパルスとなる。このパルスは減衰器(アッテネータ)で信号強度が減衰されたのちパワーアンプに送られる^{*3}。パワーアンプ入力前の信号は、せいぜい数~十dBm程度の電力しかないのだが、これを数十W~数kWの電力までパワーアンプで増幅する。また言い方を換えれば、パワーアンプ入力前の信号は弱いので、これ自体が装置の部品を壊す可能性はないものの、パワーアンプで電力が増幅された信号は扱い方を間違えると装置を破壊するので注意が必要である。またNMR装置に使用されるパワーアンプは、通常リニアアンプであり、入力と出力が理想的には線形になっているはずのものである。しかし、アンプの最大出力付近では、この理想性が崩れ、入力を例えば1dB増加させても、出力が対応して大きくならないことがある。もし、非常にお金に余裕があるのであれば、巨大な出力のパワーアンプを購入し(ちなみに、パワーアンプの値段は最大出力と指数関数的な関係があると思われる。出力のちょっとだけ高いアンプは想像を絶するほど高額である)、その出力を1/4程度に絞って使用すれば、出力の全領域に対して線形性が保たれ、計算で出したパワーレベルのパルス長をある程度信頼できるので、非常に使い勝手がよい。もし、線形性が保たれていない状態でも使用しないとイケない場合、その出力でのパルス長を決めないとイケないことになる。筆者らのグ

*2 実際に成形パルスをそのようにして作成し、できあがったパルスがちゃんと動作するかどうかNMR装置を使用して確かめるのは非常に楽しい。¹Hの成形パルスの評価にはdoped-waterなどの試料を使用する。90°パルスの場合、成形パルスの単一パルスを発生させ、周波数オフセットをスキャンし励起プロファイルを確認するが、180°パルスの場合、inversion(反転)パルスではSel.180-Hard90のようなシーケンスで、

RefocusパルスではHard90-delay-Sel.180-delayのようなシーケンスで評価する。¹³Cの場合は、直接観測で行っても良いし、間接測定で行ってもよい。

*3 以前はダイヤル式のアッテネータを使用し、減衰量をダイヤルで決めて使用していたが、現在までにNMR分光計で使用するアッテネータは概ねコンピュータで設定できるようになっている。

ループでは、非線形最小自乗カーブフィッティングを使用して Nutation 実験の結果から 90° パルス長を得る方法を開発した (MUSASHI, Multiple Spectra Analyzing System with Hyper Intelligence)^[26, 27]。この方法を用いて、 ^1H のパルス出力を変化させたときの、 90° パルス長の変化を Figure 13 に示す。

3-7 フィルタ群とケーブリング

NMR では、実にいろいろな場所で周波数フィルタ (以降、単にフィルタとする) が使用されている。このフィルタは機能で分類すると、低域通過フィルタ (Low Pass Filter、以下 LPF)、高域通過フィルタ (High Pass Filter、以下 HPF)、バンドパスフィルタ (Band Pass Filter、以下 BPF)、ノッチフィルタ (Notch Filter、Band Rejection Filterともいう、以下 BRF) の 4 種類に分類される。機能を Table 1 にまとめた (f_c はカットオフ周波数)。

多核測定、特に溶液の多核測定の場合、パワーアンプ以降プローブまでのケーブルをどう接続するか (ケーブリングという) で、スペクトルの質に甚大な影響を及ぼす場合があるため、この接続方法とフィルタの使用方法は思いのほか重要である。多くの場合、メーカーのエンジニアがセットしたままで使用していることが多いと思われるが、装置の用途によっては変更してみると良くなる場合もある。ケーブリングをする際に、気を付けることはどういったフィルタをどこに挿入するかである。基本的に、

原則1) プローブ (の観測しようとしている核のチャンネル) からプリアンプまでの間は、BPF より HPF か LPF のどちらかを使用する。

原則2) 多核デカップリングをする場合、パワーアンプの後ろからプローブまでのどこかに、できれば BPF ないしは HPF/LPF を入れるようにする。また観測核は、パワーアンプの後ろ、プリアンプの前にできれば BPF を入れる。

原則3) 溶液測定の場合： ^2H のロックプリアンプに他のチャンネルにノイズが乗らないように注意する。具体的にはロックプリアンプの前に ^2H の BPF を付ける (もとから付いていることも多い)。また、磁気回転比 γ が ^2H と比較的近い ^{15}N では ^2H -rejection のフィルタを ^{15}N のパワーアンプとプローブの間に入れたほうが良いケースもある。

という原則を守る。原則1) の理由は、プローブと

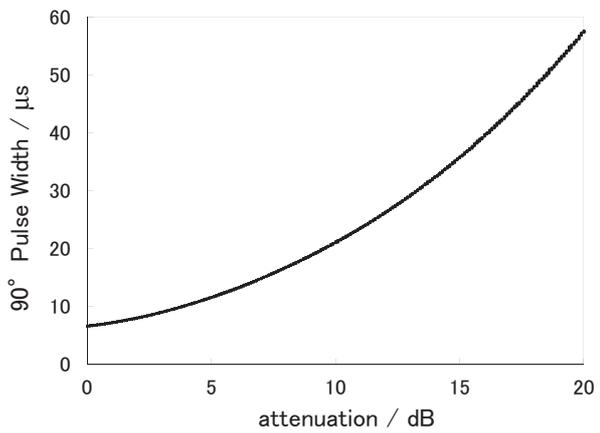


Figure 13 ^1H のパルス出力を変化させたときの、 90° パルス長変化

パルスの出力を最大出力から 0.1dB 刻みで減衰量 20dB まで変化させ、設定出力ごとに 90° パルス長を測定した。さらに、その測定を 10 回繰り返した。つまり 90° パルス長を計 2,010 回測定したことになる。総測定時間は約 2 日である。

Table 1 フィルタの分類

HPF	f_c より高い周波数を通す。
LPF	f_c より低い周波数を通す。
BPF	f_c 近傍の周波数を通す。
BRF	f_c 近傍の周波数のみ通さない。

プリアンプの間に HPF ないし LPF を入れないと、プローブに入り込んだ目的周波数以外の周波数ノイズがプリアンプに流れ込むからである。特に、観測核以外の核を多核デカップリングする場合、そのデカップリングノイズがプローブを通じてプリアンプに入ることになりかねないので、注意が必要である。ただし BPF を使用すると信号損失が HPF ないし LPF より多いため BPF を使用しない。送信するパルスが減衰するのはパルス長を伸ばすかパワーを増加させればことが足りるが、受信信号は減衰して欲しくない。

原則2) の理由は、パワーアンプの出力というのは基本的にノイズまみれであって、欲しい周波数成分以外のノイズが乗っていることが少なくないため、特に多核デカップリングをする際には、観測核にノイズを乗せかねないために必要である。

原則3) の理由は、ロックが振れば、磁場が揺れてしまい、スペクトルが汚くなる場合があるので、原則2) と同様に、多核のデカップリングノイズを ^2H のロックプリアンプに入れられないためである。

3-8 デュプレクサ (T/R スイッチ)

このあとのプローブの項目のところで詳述する

ことだが、NMRのプロープにおいて、通常、送信用のコイルと受信用のコイルは同一のコイルである。したがって、送信時と受信時に送信系と受信系を切り替える必要がある。そのためのデバイスがデュプレクサ (duplexer) ないしはT/Rスイッチ (Transmitter / Receiver switch) である。以下に、Crossed Diodesを使用したデュプレクサの概念図を示す (Figure 14)。

Crossed Diodesは、微弱な電圧の信号に対し (理想的には) インピーダンス無限大となり通過を阻止するが、大きな電圧の信号に対しては (理想的には) インピーダンスゼロとなり通過させる。したがって、パワーアンプからの送信系出力はCrossed Diodes 1を通過し、プロープに入る。またパワーアンプが発生する微弱なノイズはこのCrossed Diodesで阻止される。また、 $\lambda/4$ ケーブルを隔てて接続されたCrossed Diodes 2のおかげで、強大なパワーアンプからの信号がプリアンプ (受信系) に紛れ込むことがない。また受信時においては、プロープからのNMR信号がCrossed Diodes 1および2でブロックされ、プリアンプへのみ伝えられるので、信号の欠損が少ない。

なお、このCrossed Diodesを使用したデュプレクサは、現在必ずしもNMR分光計に使用されてはいない。現在は、このCrossed Diodesにかわり、高速のスイッチを使用し、セパレーションを向上させている。

4. 前半に対するあとがき

ここまで、NMRのハードウェアのうち、特に送信系について述べてきた。送信系と言ってもまだプ

ロープについてお話をしていないので、まだまだ終わらない (RF波の流れを考えた時に、プロープは送信系の終点であり、受信系の起点であって、折り返し地点のようなものである)。後半では、このプロープの話と受信系の話を中心に、前半で取りこぼした、溶液システムにおけるロック、シミングについても述べる予定である。

謝 辞

「第6回若手NMR研究会 (2005年、和歌山)」に参加し、筆者に対し、その時のレジメを「どこかでちゃんと形にしておくべきだ」と原稿を書くように勧め、日本核磁気共鳴学会誌に推薦して頂いた、学会誌編集委員の横浜市立大学の池上貴久教授に心より感謝します。また、および編集委員長の筑波大学山本泰彦教授を始め編集委員会の諸先生方には、本稿を書くチャンスを賜り、厚く御礼申し上げます。また出稿が遅れ、大変ご迷惑をお掛けし申し訳ございませんでした。また、底本から本稿にいたるまで温かく応援をしてくれてそれぞれの専門について説明の労を厭わなかった、筆者の勤務先である、(株) JEOL RESONANCEの同僚たちにも感謝します。

引用文献

- [1] Anderson, W. A. and Ernst, R. R., (1965) US Patent 3, 475, 680, "Impulse resonance spectrometer including a time averaging computer and a Fourier analyzer".
- [2] T.D.W.クラリッジ著、竹内敬人、西川実希訳 (2006) 有機化学者のための高分解能NMRテクニック、講談社サイエンティフィック、東京.
- [3] Claridge, T. D. W. (2008) High-Resolution NMR

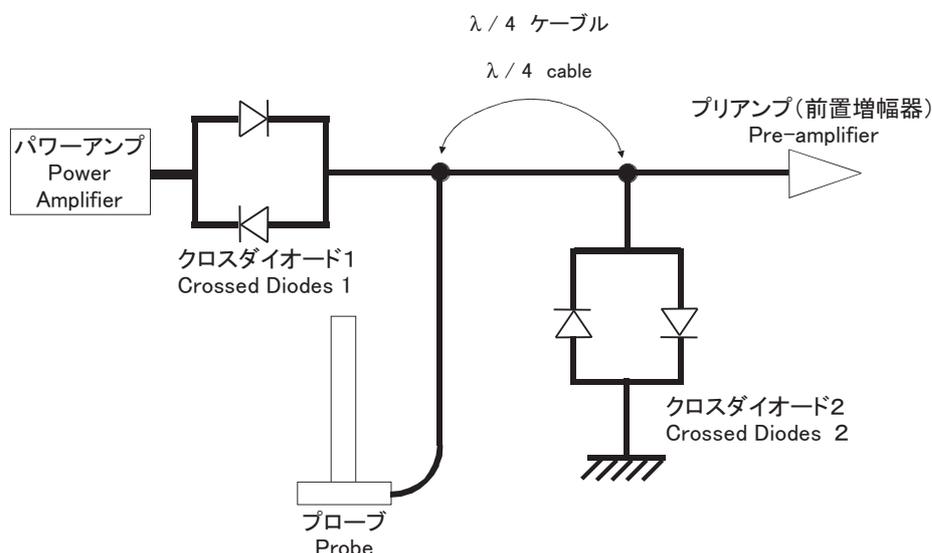


Figure 14 Crossed-diodesを使用したデュプレクサ (T / Rスイッチ) の使用例

- Techniques in Organic Chemistry, Volume 27, Second Edition (Tetrahedron Organic Chemistry), Elsevier, Amsterdam.
- [4] Keeler, James (2005) *Understanding NMR spectroscopy*, Wiley, Chichester, England.
- [5] Keeler, J., L., *Understanding NMR Spectroscopy*, Chapter 5: How the Spectrometer Works, <http://www.keeler.ch.cam.ac.uk/> (2014.9.8確認).
- [6] 荒田洋治 (2000) *NMRの書*, 丸善, 東京.
- [7] 竹腰清乃理 (2011) *磁気共鳴—NMR—核スピンの分光学*, サイエンス社, 東京.
- [8] 田代充, 加藤敏代著, 日本分析化学会編 (2009) *分析化学実技シリーズ機器分析編第3巻*, 共立出版, 東京.
- [9] 引地邦男, *NMRノート*, http://www.h6.dion.ne.jp/~k_folder/ (2014.9.8確認)
- [10] Sattler, M., Schleucher, J., & Griesinger, C. (1999) Heteronuclear multidimensional NMR experiments for the structure determination of proteins in solution employing pulsed field gradients. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, **34**(2), 93–158. doi:10.1016/S0079-6565(98)00025-9.
- [11] 巨瀬勝美 (2004) *NMRイメージング*, 著, 共立出版, 東京.
- [12] ピーター・ルイテン, カレン・ヤンセン編著, 井上徹監訳, 今村恵子, 栗原泰之, 栗原宣子共訳 (1992) *MRIの原理と応用—基礎からEPIまで*, 通商産業研究社, 東京.
- [13] 今西好正, 徳原正則, 小谷博子 (2009) *心から納得・理解できるMRI原理とMRS 豊富なカラーシェーマによる積み上げ方式 今こそ知りたい学生/技師/研修医/医師のために*, 医療科学社, 東京.
- [14] 森口繁一, 宇田川銈久, 一松信 (1987) *岩波数学公式II級数・フーリエ解析*, 岩波書店, 東京.
- [15] 森口繁一, 宇田川銈久, 一松信 (1987) *岩波数学公式III特殊関数*, 岩波書店, 東京.
- [16] Behzad Razavi 著, 黒田忠広監訳 (2002) *RFマイクロエレクトロニクス*, 丸善, 東京.
- [17] 山村英穂 (2003) *定本トroidal・コア活用百科*, CQ出版, 東京.
- [18] 長澤絵 (2004) *ミキサの動作原理と実デバイスの特性*, トランジスタ技術, 181, 483.
- [19] 渡波郁 (2003) *CPUの作り方*, 毎日コミュニケーションズ, 東京.
- [20] Ogawa, K., Nakamura, T., Terada, Y., Kose, K., & Haishi, T. (2011) Development of a magnetic resonance microscope using a high Tc bulk superconducting magnet. *Applied Physics Letters*, **98**(23), 234101. doi:10.1063/1.3598440.
- [21] Nakamura, T., Itoh, Y., Yoshikawa, M., Sakai, N. (2011). 研究論文 バルク超電導体を用いた小型無冷媒磁石のNMR応用—NMR信号を用いたバルク磁石の評価—Application of a Compact Cryogen-free Superconducting Bulk Magnet to NMR - Evaluation of a Superconducting Bulk Magnet using NMR Signal-. *低温工学 (J. Cryo. Soc. Jpn.)*, **46**(3), 139-148.
- [22] 石川彦成, 木田惇 (1996) 補正磁場発生装置、特開平8-316031.
- [23] 石川彦成, 志野英雄, 須藤誠, 工藤修士, 木田惇 (1995) ラグランジュの乗数法により発熱が最小になるよう電流を制御するシム、第34回NMR討論会講演要旨集 (つくば), 191-194.
- [24] Liu, M., Mao, X., Ye, C., Huang, H., Nicholson, J. K., & Lindon, J. C. (1998). Improved WATERGATE Pulse Sequences for Solvent Suppression in NMR Spectroscopy. *Journal of Magnetic Resonance*, **132**(1), 125-129. doi:10.1006/jmre.1998.1405
- [25] Geen, H., & Freeman, R. (1991). Band-selective radiofrequency pulses. *Journal of Magnetic Resonance (1969)*, **93**(1), 93-141. doi:10.1016/0022-2364(91)90034-Q.
- [26] Kurimoto, T., Asakura, K., Yamasaki, C., & Nemoto, N. (2005). MUSASHI: NMR Pulse Width Determination Method by Nonlinear Least Square Curve Fitting. *Chemistry Letters*, **34**(4), 540-541. doi:10.1246/cl.2005.540.
- [27] 栗本智充, 根本暢明, 朝倉克夫, 山崎千春 (2004) *NMR測定条件の最適化方法*, 特開2004-325407.



根本 暢明 (ねもと・のぶあき)

1967年 神奈川県横浜市生まれ。

1991年 大阪大学理学部化学科卒業。

1996年 大阪大学大学院理学研究科博士後期課程を「所定の年限在学し、所定の単位を修得の上退学」。

1996年 鳥取大学医学部教務職員。

1997年 バリアン・ジャパン (株) アプリケーションケミスト。

2002年 日本電子 (株) 研究員。

2005年 博士 (薬学)、大阪大学大学院薬学研究科 (2004年度)。

2011年 日本電子 (株) のNMR及びESR部門のスピンアウトに伴い、(株) JEOL RESONANCEへ異動、現在に至る。独身。

趣味は、クラシック音楽鑑賞 (特にCDやBlu-ray audio、ハイレゾデータの蒐集)、ドライブ、映画鑑賞など。

植物の気孔密度を調節する機構

¹北陸先端科学技術大学院大学、²石川県立大学

大木 進野¹、森 正之²

はじめに

細胞外に分泌されるペプチドやタンパク質は、細胞表面の糖鎖や膜タンパク質と相互作用するものが多い。細胞外でのこの相互作用が引き金となって細胞内にある種のシグナルが伝達され、何らかの生理現象が発現する。植物に話を限定しても、受精、胚形成、根の生長、気孔密度の調節などがこの仕組みを巧みに利用していることがわかってきた^[1~4]。このような重要な生命現象に関与する分泌性ペプチドやタンパク質の発現には極めて大きな時間・空間的偏りがあり、さらに、発現量そのものが非常に少ないために、かつては同定すら難しかった。ところが近年になって、バイオインフォマティクスやマイクロアレイといった比較的新しい手法の導入によってこの分野の研究が長足の進歩を遂げ、次々と新規物質が報告されるようになってきた。これら新規物質の機能は、主に遺伝子組み替え植物体の表現型を観察することで議論されている。

本学会誌の読者であれば、興味深い生理活性を持つ新規ペプチドやタンパク質の発見に続く研究として、当然、NMRを活用した構造解析や相互作用解析を考えるだろう。しかしながら、植物の分野ではこれが一筋縄ではいかない。その理由は、広く利用されている大腸菌を使った安定同位体標識試料を調製するシステムでは植物由来のペプチドやタンパク質の調製に苦勞することが多いからである。このような状況を打開するには、代替システムとして酵母やセルフリーを試してみるのも妙案である。最近では昆虫細胞や動物細胞のシステムも開発されているので、目的タンパク質の調製に成功する可能性は格段に上がっている^[5]。どの方法にも一長一短があるので、試料発現システムの選択肢は多い方が好ましい。筆者らは、以上のような背景のもと、特に植物のペプチドやタンパク質の調製に適した新システムを構築した。本稿では、新しく開発した試料発現システムの概略とそれを気孔密度調節ペプチドの構造機能研究に応用した事例について紹介したい。

BY2 細胞の試料発現システム

植物のペプチドやタンパク質を発現するには植物細胞が最適という発想で、液体培地で増殖するタバコBY2細胞 (*Nicotiana tabacum* cv. Bright Yellow 2) を利用した試料発現システムを構築した。この細胞は古くからよく研究されており、現在は理化学研究所バイオリソースセンターから入手が可能である。BY2細胞の増殖速度は植物細胞のなかで最も早いことが知られているので、実験時間短縮の観点から試料発現用には適している。また、BY2細胞は、葉緑体を欠損しているため光合成をせず、増殖に必要な全ての窒素・炭素を培地から取り込む特徴を持つ。つまり、安定同位体標識を施すという点から見ても、BY2細胞はNMR試料の作製に適していると言える。培地に加える窒素源には、それぞれ2g/L程度のKNO₃とNH₄NO₃を利用する。これらの¹⁵N安定同位体標識試薬は市販されている。一方、炭素源には、通常、シュークロースを用いるのだが、その¹³C安定同位体標識試薬は非常に高価である。この問題を解決するため、筆者らは安価なグルコースでもBY2細胞が増殖する条件を検討した。

もうひとつの深刻な問題は、目的タンパク質の発現量が低いことであった。これは、目的タンパク質をコードする遺伝子をプロモーターと連結して染色体DNAに導入する際、強力なプロモーターがないことに起因している。筆者らは、RNAウイルスベクターのcDNAをBY2染色体DNAに導入することでこれを解決した。cDNAから転写されたウイルスが自己増殖するときに同時に目的タンパク質をコードするRNAも増殖させるというアイデアである。また、目的タンパク質の発現を誘導できるように、エストラジオールによって活性化する転写因子も同時に発現させた。開発したBY2細胞の試料発現システムの概略を図1に示す^[6,7]。このシステムを用いてカルモジュリンやDHFRなどいくつかのよく知られたタンパク質試料の調製を試みたところ、数ミリ

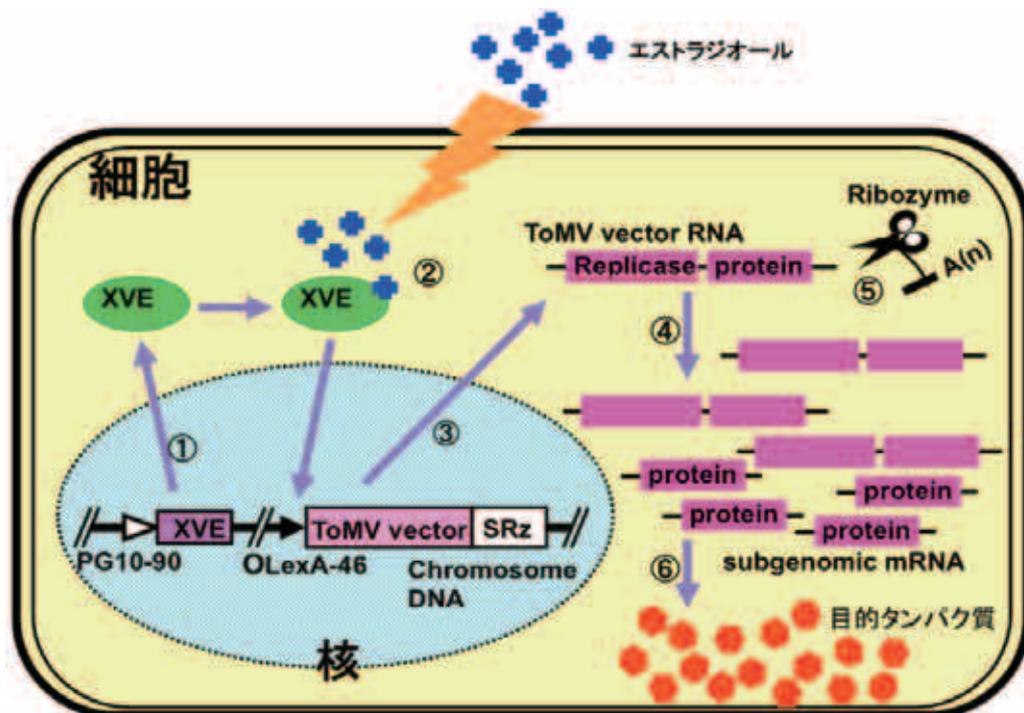


図1 BY2を用いたタンパク質発現の概略図

図中の番号の説明：①特定の分子（エストラジオール）で活性化される転写因子（XVE）が産生。②エストラジオールでXVEが活性化。③目的タンパク質の遺伝子を含むウイルスの遺伝子（ウイルスベクター）が産生。④ウイルスベクターが増殖。⑤触媒活性を持つRNA（リボザイム）による切断。⑥目的タンパク質の大量発現。

グラムの試料を得るためには僅か50～100 mL程度の培地で細胞を培養すればよいことがわかった^[8]。現在、BY2細胞の培地には15 g/Lのグルコースを用いているが、この程度の培養スケールでNMR用試料が調製できるので、必要な¹³C安定同位体試薬の量は大腸菌の場合とさほど大きくは変わらない。

核、小胞体や液泡などいろいろな性質と働きの器官を植物細胞が持っていることを積極的に活用するために、目的タンパク質を発現する際にシグナルペプチドを付加することにした。目的タンパク質の性質に合わせて発現後の局在を制御し、収量や立体構造形成の効率を向上させようという狙いである。予備的な実験の結果では、小胞体移行のシグナルペプチドを付加しておけば、BPTIやSSIなど複数のジスルフィド結合を有するタンパク質でも、生合成された分子が正しい立体構造を形成して可溶性の状態になることが確認できた^[8,9]。つまり、精製の段階で可溶化やリフォールドの実験操作は一切不要になる。もちろん、目的タンパク質にHis x 6やGSTなどの精製用タグを付加して発現させることもできる。

ストマジエンの立体構造

陸生植物の葉には二酸化炭素を吸収し酸素と水

を排出するための気孔が存在する。気孔研究の歴史は長い。例えば、気孔が光に反応して開くことは、進化論でその名を知られたダーウィンの息子（F. Darwin）が今から実に100年以上も前の1898年に報告している。しかし、その数（密度）の調節機構については長らく不明だった。ごく最近になって、気孔の数を減らす働きをする分泌性のペプチド（EPF1；EPFはepidermal patterning factorの略）が発見された^[4]。そのときから、逆の働き、つまり、気孔の数を増やす働きをする分子も存在するに違いないと予想されていた。さほど時間をおかず、全く意外なところからそれは見つかった。EPF1のホモログをデータベース検索した結果として9種の新規ペプチド候補をコードする遺伝子が同定されたのだが、そのうちの1つの産物であるEPFL9（ストマジエン）が気孔の数を増やす働きをするという実験結果がほぼ同時期に複数の研究グループから報告された^[10~12]。ファミリーのアミノ酸配列アラインメントを図2aに示す。類似のアミノ酸配列を持つストマジエンと他の分子が全く逆の生理活性を示すことは非常に興味深い。筆者らはEPFファミリーの構造機能相関をNMRで解明することにした^[13]。

EPFファミリーのペプチドは分子内に3あるいは

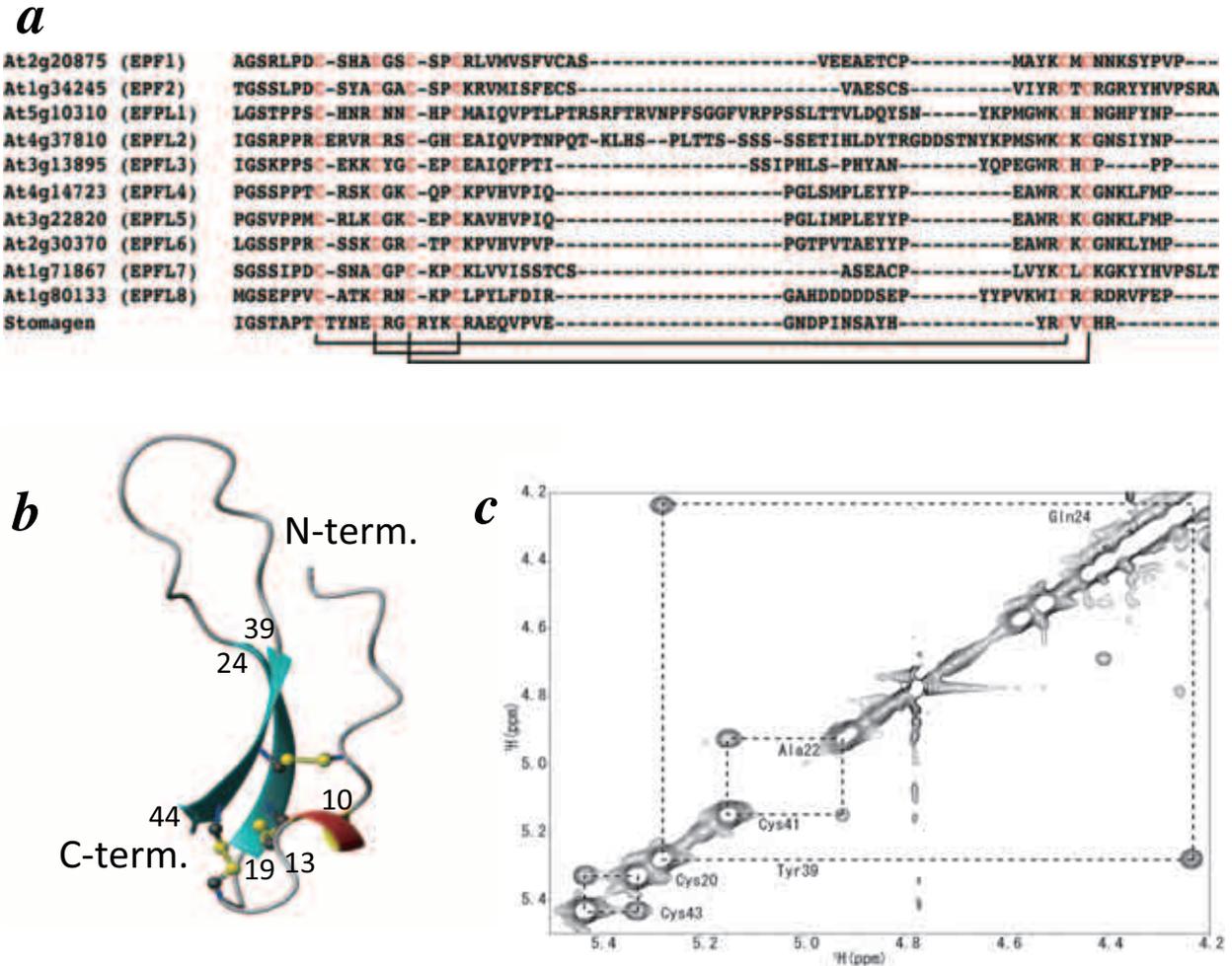


図2 ストマジエンの構造

(a) EPFファミリーの1次構造アラインメント。よく保存されたシステイン残基を赤字で示した。また、実験的に決定したストマジエンのジスルフィド結合も線で示した。(b) 溶液NMR法で決定したストマジエンの3次構造のリボンモデル (PDB ; 2LIY)。(c) ストマジエンのNOESYスペクトルの拡大図。βシート内のC_αH同士のNOEクロスピークが観測されている。

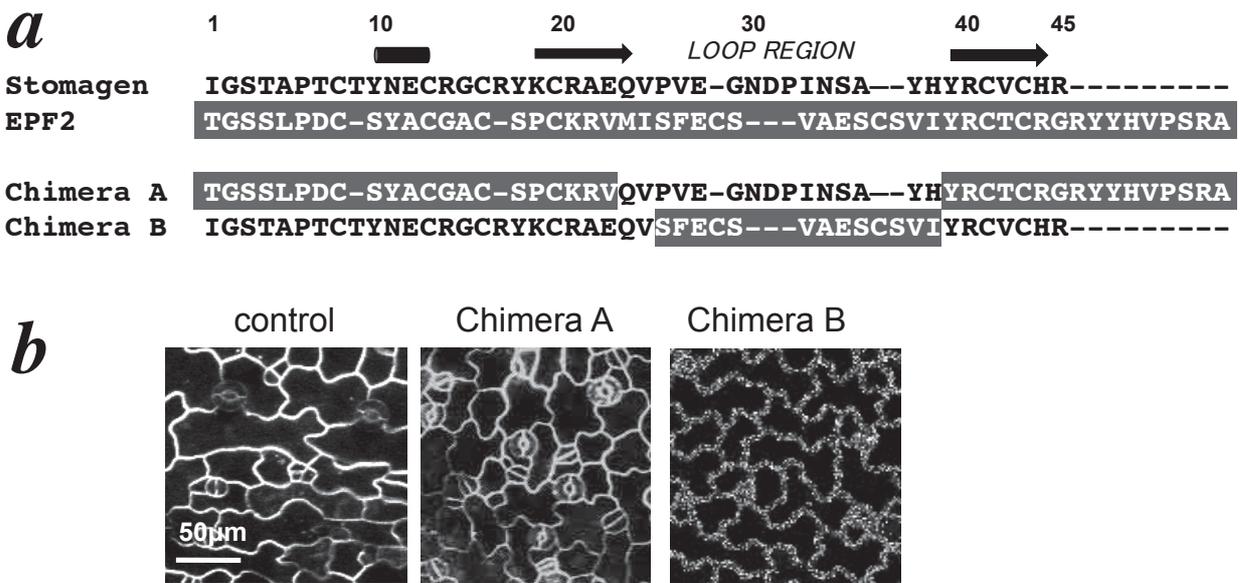


図3 変異体のアミノ酸配列と生理活性

(a) ストマジエンとEPF2のループ部分を入れ替えた変異体 (chimera A, chimera B) のアミノ酸配列。(b) それぞれの変異体を振りかけたシロイヌナズナの葉の顕微鏡写真。Chimera Aは気孔の数を増やし、chimera Bは気孔の数を減らしていることがわかる。

4組のジスルフィド結合を持っており、大腸菌の試料調製システムでは生理活性を持つ十分な質と量の試料を調製することができなかった。そこで、筆者らが開発したBY2細胞のシステムを利用して試料を調製した。次に、試料の酵素消化産物を質量分析に供することでジスルフィド結合の位置を決定した。ストマジエンは45残基の小さい分子であるため、非標識試料を用いたクラシカルな手法でも立体構造解析が可能だと考えられたが、今回はBY2細胞のシステムを利用した試料の最初のNMR構造解析であるため、あえて ^{13}C 、 ^{15}N 安定同位体標識を施した試料を調製した。定法に則って各種2,3次元NMRスペクトルの測定と解析を行い、**図2b**に示す立体構造を得た。特に β シートの部分は、この2次構造を示す典型的な C_αH 同士のNOEクロスピークが2次元NOESYスペクトル中に観測された(**図2c**)。立体構造は、1回転のヘリックスがこの逆平行 β シートを裏打ちするコアの部分とそこから伸びる長いループから出来ていることが判明した。コアの部分に3組のジスルフィド結合が存在する。ファミリーのアミノ酸配列のアラインメントを再び眺めると、コアの部分はアミノ酸配列がよく保存されており、特に6個のシステイン残基はすべてのペプチドで共通であることがわかる。EPF2についても幾つかのNMRスペクトルを測定し、それらの情報も

あわせて立体構造のモデリングを行ったところ、すべてのファミリーメンバーの立体構造はストマジエンのものと似通っており、コアと長いループから出来ていることが予想された。

構造から機能を議論する

ここまで解析してきた結果から、ループの部分が生理活性機能を担っているのではないかと予測できた。そこで筆者らはこの仮説の妥当性を検証するために、**図3a**に示すようなループ部分を入れ替えた2種類の変異体を作成して、それらの生理活性を測定することにした。その結果、ストマジエンのループとEPF2のコアを持つ変異体は気孔の数を増やし、EPF2のループとストマジエンのコアを持つ変異体は気孔の数を減らすことが明らかになった(**図3b**)。したがって、筆者らの仮説が正しいことを実験的に証明できた。また、ループ部分に相当する短い合成ペプチドは全く生理活性を示さなかった。

次に、ストマジエンのコア部分にある3組のジスルフィド結合に関わる残基をすべて置換した変異体を作成した(**図4a**)。この変異体の1次元NMRスペクトルを測定したところ、 β シートを形成している残基由来の C_αH のシグナルは、野生型のように低磁場シフトした位置には観測されなくなっていた(**図4b**)。これは、もはやコア構造が崩れている

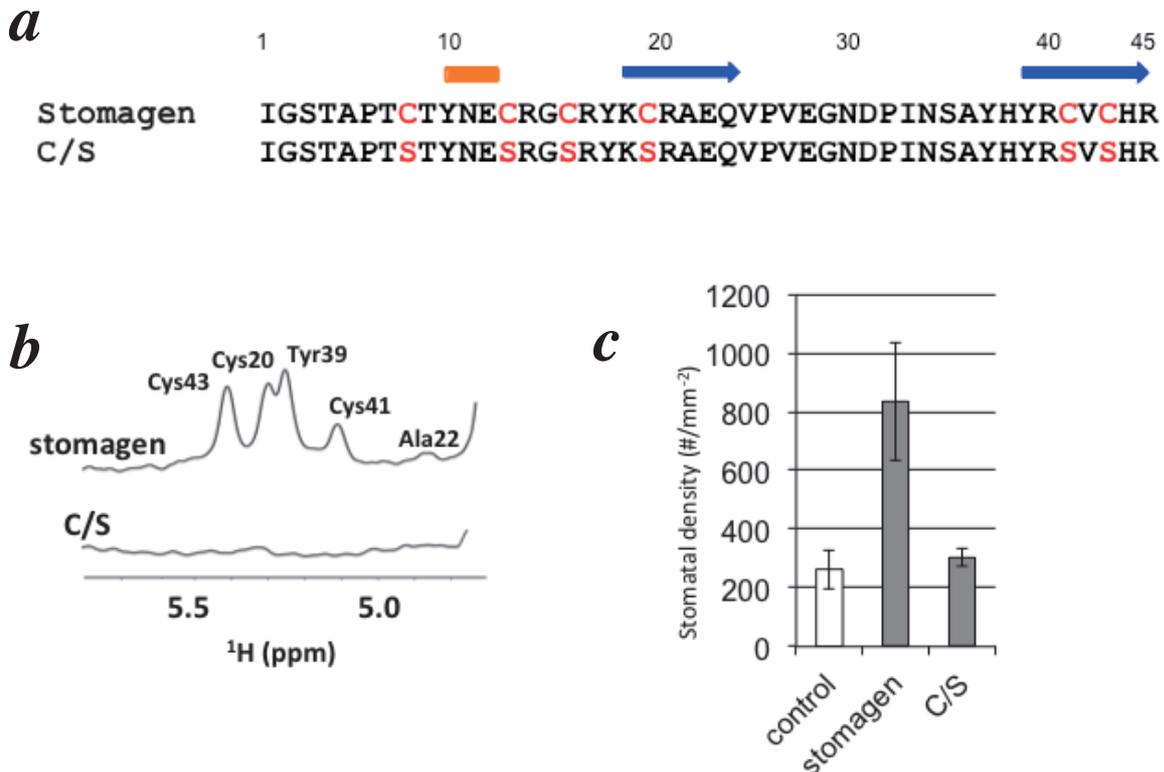


図4 システイン残基の役割

(a) アミノ酸配列、(b)NMRスペクトルの拡大図、(c) 生理活性。

ことを示唆している。活性測定も試みたが、この変異体は何も生理活性を示さなかった(図4c)。これらのことから、ファミリーでよく保存された3組のジスルフィド結合はコアの立体構造を形成するために必要であり、このコア構造がループを支えている構造が生理活性の発現にはならないことがわかった。

さらに、ストマジエンとEPF2が共存する場合の表現型を調べたところ、図5aに示したように、競合しているような結果が得られた。¹⁵N標識されたストマジエンに対してEPF2を滴定して¹H-¹⁵N HSQCスペクトルを測定したところ、滴定前後でスペクトルに変化が見られなかった(図5b)ことか

ら、ストマジエンとEPF2は直接相互作用をしないことが明らかになった。最後に、ストマジエンのループを取り除いた変異体を作製した。コアの構造が崩れないように、2本のストランドをグリシンが5残基続く短いリンカーで連結した。変異体の¹H-NMRを測定すると、低磁場シフトしたC_αHの領域のスペクトルは野生型ストマジエンのものと全く一致していた(図6b)。このことから、変異体の立体構造が野生型ストマジエンのコア部分と同等であることが担保された。脱線するが、本研究では、図4bの結果も合わせて、1次元の¹H-NMRスペクトルを効果的に利用して立体構造の確認を行うことができた。最もシンプルな1次元NMRの実験

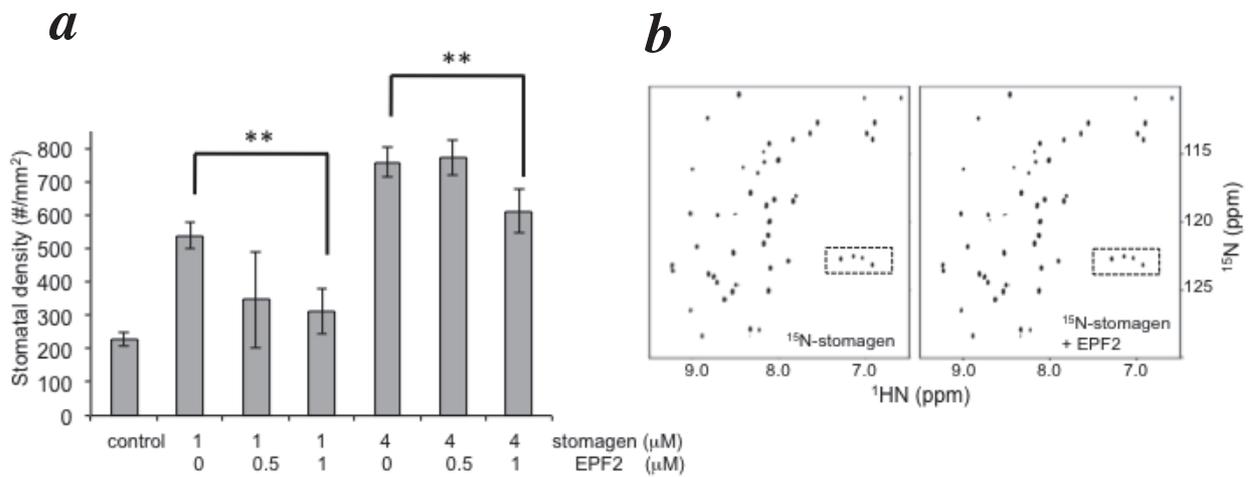


図5 ストマジエンとEPF2の競合

(a) ストマジエンとEPF2を同時に加えたときのシロイヌナズナの葉表面の気孔の数。(b) ¹⁵N標識ストマジエンのHSQCスペクトル。点線内は折り返りのシグナル。

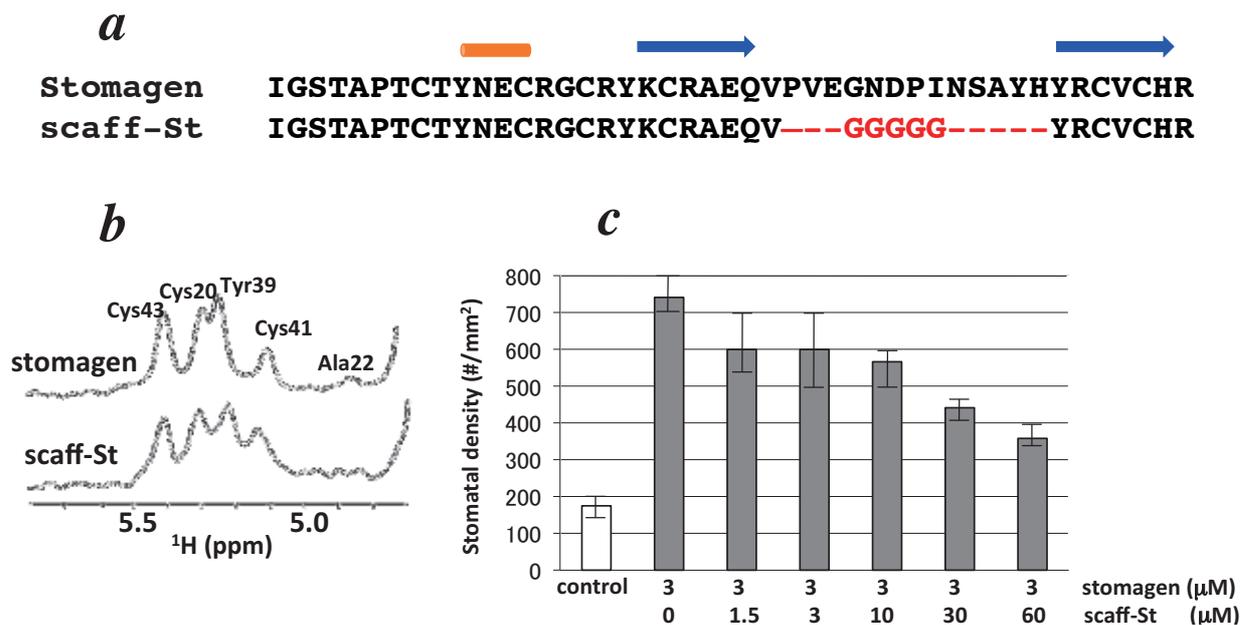


図6 コア部分の構造と機能

(a) ループ部分を削除してグリシンリンカーでつないだ変異体のアミノ酸配列。(b) NMRスペクトルの拡大図。(c) 生理活性。

であっても、今なお大変強力な分析手法であることを改めて実感する。さて話を戻して肝心の生理活性であるが、これは図6cに示す面白い結果となった。コアの部分野生型ストマジエンと競合し、ストマジエンの活性を阻害しているように見える。しかしながら、ストマジエンに比べて1桁高い濃度でなければその効果が現れてこない。何かに対する結合を仮定した場合、コア部分だけではストマジエンそのものよりも結合能力が弱いと推定される。この結果と滴定実験の結果を合わせて考えると、ファミリーで共通のコア部分は結合能力が弱いながらも分子認識に関わっている可能性が浮上する。生理活性を決めているのはあくまでもループ部分であるが、相手方の分子の同一サイトをファミリー全体で奪い合っているのかもしれない。葉の表面で観察される気孔密度という表現型は、これら複数のペプチドの量や正・負の活性のバランスの結果として成り立っていると思われる。

おわりに

EPFファミリーの結合相手となるのは、膜タンパク質のERECTAファミリーとTMMであると見られている^[14]。どちらもLRR(ロイシン・リッチ・リピート)を細胞外ドメインに持つ1回膜貫通タンパク質である。ERECTAファミリーの膜タンパク質は、ホモマーにもTMMとのヘテロマーにもなるといわれている。ERECTAファミリーに属するタンパク質は細胞内にリン酸化ドメインを持つがTMMは細胞内ドメインを持たない。そのため、最終的な細胞内へのシグナル伝達はERECTAファミリーを通して達成されると考えられている。細胞の外から内へシグナルが伝達する機構の構造生物学的な解明は、複雑な平衡が存在しているこの系においては極めてチャレンジングな問題に見える。

BY2細胞を用いたタンパク質試料発現システムの高度化とその応用研究は現在も進行中である。最近、植物の胚形成の初期段階で働く分泌性ペプチドの調製と溶液NMR構造解析に成功した^[2]。また、植物のペプチドやタンパク質だけでなく、ヒト由来のいくつかのタンパク質の発現もできるようになった。バリン、ロイシン、イソロイシンなど、NMRの解析に極めて有用なメチル基を持つ残基の選択標識技術も確立できた^[15]。重水素標識やセレンメチオニン標識も目処がついてきた。今後はERECTAやTMMの調製にこの技術を応用して、EPFファミリーとの相互作用をNMRで観測してみ

たい。

謝辞

本稿で紹介した研究の一部は、竹内誠博士、古市いづみさん(北陸先端科学技術大学院大学)、玉井淳史博士、土肥浩二博士(石川県立大学)の協力によって行われました。ここに記して感謝いたします。また、本研究の一部は以下の研究費によって行われました。JST-CREST(代表:石川雅之)、JST-Astep(代表:森正之)、JST先端計測(代表:大木進野)、科研費(20510198、25440017。代表:大木進野)。

参考文献

- [1] S. Okuda, H. Tsutsui, K. Shiina, S. Sprunck, H. Takeuchi, R. Yui, R.D. Kasahara, Y. Hamamura, A. Mizukami, D. Susaki, N. Kawano, T. Sakakibara, S. Namiki, K. Itoh, K. Otsuka, M. Matsuzaki, H. Nozaki, T. Kuroiwa, A. Nakano, M.M. Kanaoka, T. Dresselhaus, N. Sasaki & T. Higashiyama. (2009) Defensin-like polypeptide LUREs are pollen tube attractants secreted from synergid cells. *Nature* **458**, 357-361.
- [2] L.M. Costa, E. Marshall, M. Tesfaye, K.A.T. Silverstein, M. Mori, Y. Umetsu, S.L. Otterbach, R. Papareddy, H.G. Dickinson, K. Boutiller, K.A. VandenBosch, S. Ohki & J.F. Gutierrez-Marcos. (2014) Central cell-derived peptides regulate early embryo patterning in flowering plants. *Science* **344**, 168-172.
- [3] G. Pearce, D.S. Moura, J. Stratmann & C.A. Jr. Ryan. (2001) RALF, a 5-kDa ubiquitous polypeptide in plants, arrests root growth and development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **98**, 12843-12847.
- [4] K. Hara, R. Kajita, K.U. Torii, D.C. Bergmann & T. Kakimoto. (2007) The secretory peptide gene EPF1 enforces the stomatal one-cell-spacing rule. *Genes Dev*. **21**, 1720-1725.
- [5] H. Takahashi & I. Shimada. (2010) Production of isotopically labeled heterologous proteins in non-*E. coli* prokaryotic and eukaryotic cells. *J. Biomol. NMR* **46**, 3-10.
- [6] M. Mori, N. Fujihara, K. Mise & I. Furusawa. (2001) Inducible high-level mRNA amplification system by viral replicase in transgenic plants. *Plant J*. **27**, 79-86.
- [7] K. Dohi, M. Nishikiori, A. Tamai, M. Ishikawa & M. Mori. (2006) Inducible virus-mediated expression of a foreign protein in suspension-cultured plant cells. *Arch. Virol*. **151**, 1075-1084.
- [8] S. Ohki, K. Dohi, A. Tamai, M. Takeuchi & M. Mori. (2008) Stable-isotope labeling using an inducible viral infection system in suspension-cultured plant cells. *J. Biomol. NMR* **42**, 271-277.
- [9] 大木進野、森正之(2012) 気孔の数を増やすペプチドの構造と機能の解析—調製困難なタンパク質試料を発現・標識する技術の開発と応用事例. 未来材料 **12**, 45-50.
- [10] L. Hunt, K.J. Bailey & J.E. Gray. (2010) The signaling peptide EPFL9 is a positive regulator of stomatal development. *New Phytol* **186**, 609-614.

- [11] T. Kondo, R. Kajita, A. Miyazaki, M. Hokoyama, T. Nakamura-Miura, S. Mizuno, Y. Matsuda, K. Irie, Y. Tanaka, S. Takada, T. Kakimoto & Y. Sakagami. (2010) Stomatal density is controlled by a mesophyll-derived signaling molecule. *Plant Cell Physiol.* **51**, 1-8.
- [12] S.S. Sugano, T. Shimada, Y. Imai, K. Okawa, A. Tamai, M. Mori & I. Hara-Nishimura. (2010) Stomagen positively regulates stomatal density in *Arabidopsis*. *Nature* **463**, 241-244.
- [13] S. Ohki, M. Takeuchi & M. Mori. (2011) The NMR structure of stomagen reveals the basis of stomatal density regulation by plant peptide hormones. *Nat. Commun.* **2**, 512.
- [14] J.S. Lee, T. Kuroha, M. Hnilova, D. Khatayevich, M.M. Kanaoka, J.M. McAbee, M. Sarikaya, C. Tamerler & K.U. Torii. (2012) Direct interaction of ligand-receptor pairs specifying stomatal patterning. *Genes Dev.* **26**, 126-136.
- [15] 「¹³Cメチル基標識したタンパク質を合成する方法」2011年(国内)；特願2011-152215号。



大木 進野 (おおき・しんや)

北陸先端科学技術大学院大学 教授

1993年；北海道大学大学院理学研究科高分子学専攻博士課程中退、北海道大学理学部附属高分解能NMR研究室・教務職技官、1995年；同 助手、1996年；学位(博士(理学)北海道大学)取得、香港科技大学・リサーチアソシエイト、1997年；JST 博士研究員(東京都立大学理学部)、2002年；NMR学会会員、北陸先端科学技術大学院大学ナノマテリアルテクノロジーセンター 助教授、2007年；同 准教授、2011年；現職。



森 正之 (もり・まさし)

石川県立大学 准教授

1993年；京都大学大学院農学研究科農林生物学専攻博士課程修了、1998年；石川県立農業短期大学 助教授、1995年；石川県立大学生物資源工学研究所 助教授、2007年；現職。

高磁場 MAS-DNP 法を用いた超高感度固体 NMR

Department of Physics, ETH Zurich

高橋 大樹

1. はじめに

固体 NMR は試料の状態 (結晶、非晶質あるいは脂質二重膜中の試料等) によらず測定でき、無機・高分子材料から生体系試料に至るまで幅広く利用されている。しかしながら、NMR 特有の感度の低さ、さらに異方性相互作用に由来するシグナルの広幅化により、上記のメリットを最大限に活かしていない。そのため、固体 NMR の高感度化が重要な課題となっている。近年、高出力・高周波マイクロ波光源 (ジャイロトロン) 及び伝送系、極低温試料回転固体 NMR プロブやラジカル増感剤などの開発により、高磁場においてマジック角試料回転下での DNP (MAS-DNP) が行われるようになった^[1,2]。初めてジャイロトロンを使った高磁場 DNP が達成されてからおよそ 20 年、現在では高磁場 DNP-NMR 装置が市販化され^[3]、ここ 2、3 年で欧米を中心に急速に普及してきた。高磁場 DNP-NMR 装置については前号で解説されているので^[4]、本稿では高磁場 MAS-DNP 法を用いた研究に焦点を当てて、それらをいくつか紹介する。

2. MAS-DNP 実験

電子スピンの高い分極を核スピンの移す機構はいくつか知られているが、一般に行われている MAS-DNP 実験の条件 (~ 100 K, $B_0 > 5$ T, $T_{1e} > 1/\omega_e$) では主に Cross Effect が用いられている^[5,6]。この機構では、カップルした 2 つの電子スピンの共鳴周波数差が核スピンの共鳴周波数と一致することで分極移動が起こる。このため、ラジカル増感剤には g 値異方性の大きなニトロキシドラジカルを 2 つ結合したバイラジカルが主に用いられる。また、ラジカルは試料中に均一に存在する必要があるため、測定温度においてガラス状となる溶媒にラジカルを溶かし、観測試料と混合する。一般に水溶性ラジカルではグリセロール-水混合系が、水に不溶なラジカルでは 1,1,2,2-テトラクロロエタンなどの有機溶媒が用いられている。

DNP ではマイクロ波照射によりラジカル近傍の核スピんに分極が移り、スピン拡散によって試料全体へ広がる。観測試料のサイズが大きいとスピン拡散に時間がかかるため、十分な感度増強を得るためには T_1 が長くないといけない。また、ラジカル分子直近の核スピンは常磁性緩和促進、および常磁性シフトの影響でシグナルが消失する (bleaching)。生体系試料へよく用いられているバイラジカル TOTAPOL の場合、ラジカルからおおよそ 1 nm の範囲にあるシグナルが消失すると見積もられている^[7]。さらに、MAS-DNP 実験は低温で行うため、シグナルの広幅化が特に生体系試料で問題となる。これらの「負」の効果も考慮に入れて MAS-DNP 実験を行う必要がある。

通常、DNP 実験における DNP 効果は、マイクロ波がオンとオフの状態で作られたスペクトルの S/N 比を比べた DNP 感度増強度 (ϵ_{DNP}) によって評価される。しかし、上記のように DNP 実験では通常の固体 NMR 実験に比べていくつかの負の効果が含まれるため、 ϵ_{DNP} が大きくても全体としての DNP 実験の感度は通常の固体 NMR とほとんど変わらないか、あるいは通常の固体 NMR より悪くなる場合もある。さらに、マイクロ波がオフの状態ではニトロキシドラジカルを含む DNP 試料にマジック角試料回転を行うと、シグナル強度が下がることが示された^[8]。特に低温になるほど (すなわち電子スピンの緩和時間が長いほど) この効果は顕著である。したがって、マイクロ波がオンとオフの状態を比べる方法は DNP による感度増強を正しく反映しない。DNP の効果を正確に評価するには、通常の固体 NMR で得られるスペクトルと比較するのが最も合理的である。

図 1 には DNP によって S/N 比が格段に上がった例、及び下がった例を示した。試料は TOTAPOL が均一に散りばめられた微結晶セルロース (左) と DMSO-水混合系に TOTAPOL と共に溶解されたグリシン (右) である。どちらも ϵ_{DNP} (b,e vs. c,f) は

20にも関わらず、通常の固体NMRで得られる粉末試料のスペクトル (a, d) と比較すると、セルロースでは47倍のS/N比が得られたのに対し、グリシンでは0.021倍とDNP実験によってS/N比が小さくなった。これは、不均一な構造のまま溶液中で凍ったことによるシグナルの広幅化、及び溶液を用いたことで試料全体の体積が増え観測試料の濃度が薄まったことが原因である。このように同じ ϵ_{DNP} が得られても、DNP実験全体としての感度は大いに異なることがあるので注意したい。また、溶媒のシグナルが観測したいシグナルを覆い隠してしまうことがあるので溶媒の選択にも注意が必要である。

筆者らは DNP 実験を評価するため Absolute Sensitivity Ratio (ASR) という指標を導入した^[9]。これはDNP実験と室温における通常の固体NMR実験で得られる単位時間当たりのS/N比を比較したものである。ASRは次に示す8個の因子により決まる。

$$\text{ASR} = \epsilon_{\text{DNP}} \cdot \epsilon_T \cdot \eta_{\text{T1}} \cdot \chi_{\text{bleach}} \cdot \chi_{\text{LW}} \cdot \chi_{\text{mass}} \cdot \chi_{\text{seq}} \cdot \chi_{\text{ex}} \quad (1)$$

- 1) ϵ_{DNP} : DNP感度増強度 (マイクロ波がオンとオフの状態でのS/N比の比較)。
- 2) ϵ_T : 低温により得られるS/N比の増大度。ボルツマン分極の増大と熱雑音の減少による。
- 3) η_{T1} : 繰り返し時間の比の平方根。単位時間当た

りのS/N比を比較するため。

- 4) χ_{bleach} : bleachingによる効果。
- 5) χ_{LW} : シグナルの線幅の比。
- 6) χ_{mass} : ローターに詰まった観測試料の質量の比。溶媒などの質量を除いた値。
- 7) χ_{seq} : 混合時間などで起こる磁化の減衰度の比。各種緩和時間に依存。ラジカル存在下ではこれらの緩和時間が短くなるので、特に多次元NMR測定では注意が必要である^[10]。
- 8) χ_{ex} : その他の効果。DNP実験は18.8Tまで達成されているが、通常の固体NMRではさらに高い磁場で測定が可能であり、その分感度が上がる。また、現在のDNP実験で使用されるローターのサイズは限られているが通常の固体NMRでは様々な大きさが使える。より大きなローターを使えば測定サンプル量が増え、また小さなローターを使えば高速で試料回転を行うことができ線幅が改善される。通常の固体NMRではこれらによりS/N比が改善されるため、DNPで得られる感度向上は相対的に小さくなる。つまり、ASRはさらに小さくなる。

通常のDNP実験では1、2項は正に働き、4-8項は負に働く。3項は低温により T_1 が長くなるが、ラジカルにより短くなるので一概に言えない。ただし、 T_1 が極端に長い試料ではラジカル添加により T_1

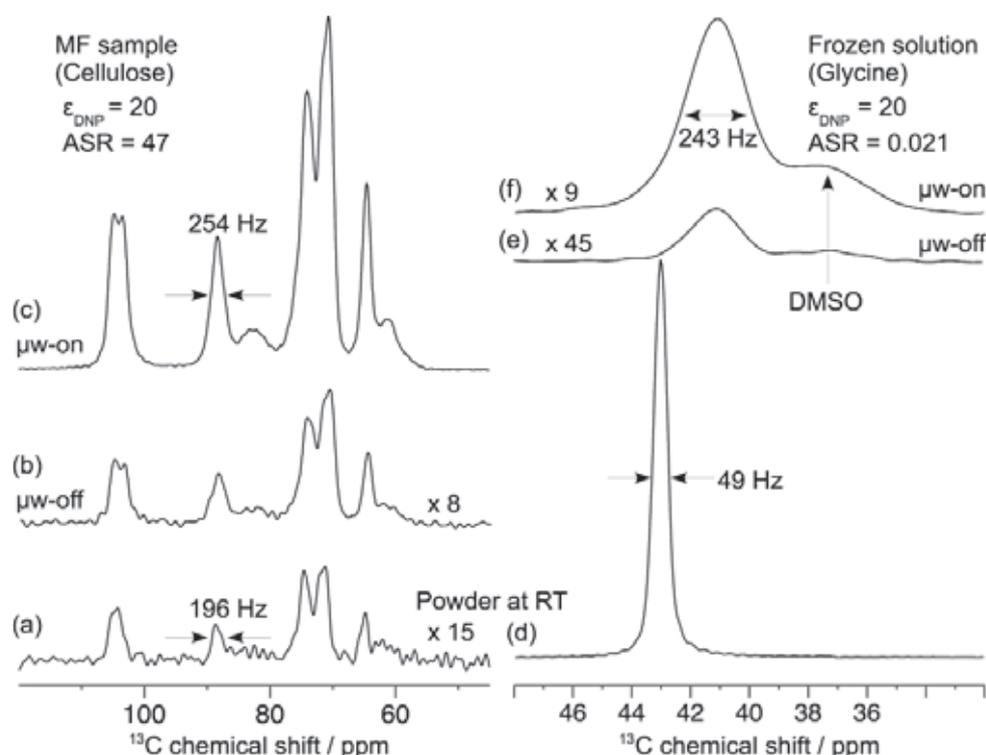


図1 微結晶セルロース (a-c) と $[2-^{13}\text{C}]$ グリシン (d-f) の ^{13}C -CPMAS スペクトル。(a, d) 粉末試料を通常の固体NMRで室温において測定。(b, c, e, f) DNP用試料を105Kでマイクロ波オン (c, f) とオフ (b, e) の状態で測定。MAS周波数8kHz、静磁場9.4T。(文献9より)

が短くなるので、 η_{TI} は大きく正に寄与する。グリシンの例では χ_{LW} と χ_{mass} が大きく負に寄与し、小さなASRとなった。DNP実験で重要なのは正の因子を最大化するだけでなく、同時に負の因子をできるだけ最小化することである。以下、DNPの実際の応用例を紹介する。

3. 低い天然存在比の核種への応用

NMRで観測可能な核種のうち ^1H や ^{19}F 、 ^{31}P などのようにほぼ100%の天然存在比の核種はあまりない。特に生体系固体NMRでよく用いられる ^{13}C や ^{15}N の天然存在比はそれぞれ1.1%、0.37%と低いため通常は同位体標識される。しかしながら、いつも容易に同位体標識できるとは限らない。ここで活躍するのがDNPによる超高感度化である。これまで ^{13}C 、 ^{15}N 以外にも ^{17}O (0.037%)^[11]、 ^{29}Si (4.7%)^[12]、 ^{119}Sn (8.6%)^[13]などの測定がDNPを用いて天然存在比で行われた。さらに ^{13}C においては、0.01%しか存在しない ^{13}C - ^{13}C の相関もDNPによる高感度化で高速に測定できるようになった。この節では天然存在比での2次元 ^{13}C - ^{13}C 相関実験を取り上げる。

上で示したセルロースはMatrix-Free法を用い、 χ_{LW} と χ_{mass} による負の寄与を最小化してASRを高めている。紙面の都合上Matrix-Free法については参考文献を参照されたい^[9, 14]。ここではおよそ50のASRが得られたが、これは単純計算で2,500倍高速に測定できることを意味する。通常、同位体標識されていないセルロースの2次元 ^{13}C - ^{13}C 相関実験は数日かかるが、DNPを用いればこれが数分で与えるという計算である。実際にDNPを用いて行った2次元 ^{13}C - ^{13}C 相関実験の結果を図2に示す。すべての直接結合の相関がわずか20分で観測された。この方法を用いれば、合成された固体化合物を素早くスクリーニングすることができ、DNPは化学・製薬産業において非常に有用な方法となるであろう。

さらにこの手法はペプチドナノ集合体に応用された^[15]。ペプチドナノ集合体は半導体やドラッグデリバリーなどへの応用や、さらにはアミロイド研究のモデル物質ともなり、構造解析は重要である。Cyclo-Phe-Pheジペプチドを用いたペプチドナノチューブにおいては320という大きなASRが得られ、天然存在比での2次元 ^{13}C - ^{13}C 相関実験によりすべての ^{13}C シグナルが帰属された(図3a, b)。また、残基内相関以外にも残基間、さらには超分子構造解析に欠かせない分子間の遠い相関も観測さ

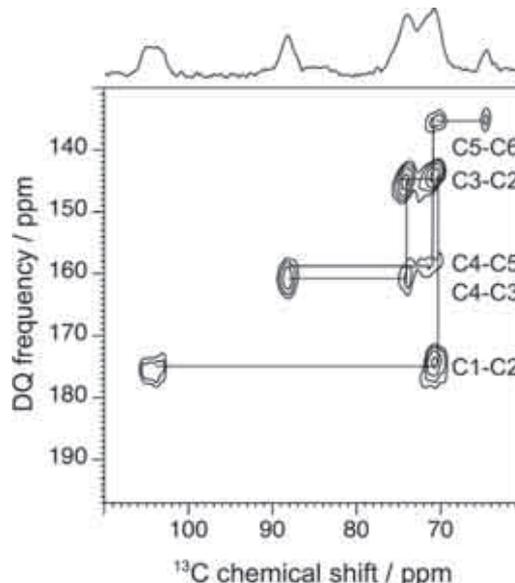


図2 天然存在比でのセルロースの2次元DQ-SQ ^{13}C - ^{13}C 双極子相関スペクトル。静磁場9.4T、測定温度105K、MAS周波数8kHz、POST-C7混合時間1.4msで測定。(文献9より)

れた(図3c)。ここで特筆すべきは、天然存在比での ^{13}C - ^{13}C 相関実験ではdipolar truncationが起こらないため、長距離の相関が比較的観測しやすいことである。このように、DNPで感度を高めることで、天然存在比でも高速な ^{13}C - ^{13}C 相関実験が可能となった。その他、 ^{13}C 以外の核種でも低天然存在比で2次元同種核相関実験が現在試みられている。

4. 無機・高分子材料への応用

固体NMRは固体材料をそのままの状態に構造解析できるため材料研究に有用である。特に環境・エネルギー問題に欠かせない新規触媒の開発には固体表面の構造解析が重要であり、固体NMRが大いに役立つ。しかしながら、多孔質物質においても表面を構成している原子の割合は小さく、通常固体NMRでは感度が悪い。さらに、このような化合物は同位体標識が難しい。幸い、生体系試料と異なり固体材料は低温によるシグナルの広幅化の影響が小さいか、あるいはほとんどないため、DNP実験に特に向いている。このためこれまで比較的多数の実験例が報告されている。

Lesageらは有機修飾された多孔質シリカの官能基を解析するためにDNPを用いた^[16]。ここでは χ_{mass} による負の寄与を極力抑えるために、ラジカルを溶解した溶媒をincipient wetness impregnation法によって試料に含浸させた。この方法により表面に存在する有機官能基の ^{13}C においておよそ50倍の ϵ_{DNP} が得られ、目的のシグナルが観測されただけ

でなく、合成過程で得られた副生成物も観測することができた。さらには、有機官能基の ^{13}C だけでなく、それと結合している ^{29}Si も観測されている^[12]。ほかにも様々な有機-無機ハイブリッド材料や金属有機構造体といった材料にこの方法が応用されている。

また、DNPは $I = 1/2$ 核だけでなく、四極子核にも適用されている。メソポーラスアルミナもまた触媒の開発に重要な物質であり、固体表面の原子レベルでの構造解析が欠かせない。 ^1H は表面にのみ存在するため、 ^1H から観測核(ここでは ^{27}Al)へCPを行い固体表面を選択的に観測するのは以前からの常套手段であるが、四極子核では緩和時間が早いこともありCP効率が非常に悪い。それゆえ、表面選択的な ^{27}Al の観測には感度増大が重要である。LeeらはDNPを用いて表面選択的 ^{27}Al -NMR実験を行った^[17]。得られた ϵ_{DNP} は15程度であるが、低温によるボルツマン分極の増大、熱雑音の減少、および緩和時間が長くなったことでのCP効率の改善により、ASRは184となった。これはおよそ34,000

分の1という測定時間の短縮を意味する。

この大きなASRにより表面選択的 ^{27}Al - ^{27}Al 双極子相関実験も可能となった(図4)。測定時間はおよそ4時間である。もしDNP(低温も含めて)を使わなかったら単純計算で15年はかかることになり、通常の固体NMRでは不可能な実験である。この相関実験により Al^{IV} サイト(4配位型)と Al^{VI} サイト(6配位型)が Al^{V} サイト(5配位型)により繋がっていることが示された。このようにDNPは四極子核の観測にも多大な利益をもたらす。また四極子核以外にも、通常の固体NMRでは観測が難しい磁気回転比が小さな核種への応用にも注目されている。

その他、DNPの有機高分子への応用もいくつか報告されている。参考文献をいくつか挙げるので興味のある方は是非参照していただきたい^[18,19]。

5. 生体系試料への応用

生体系試料では同位体標識が容易に行われているが、多次元NMRや長距離測定、生体膜中あるいは細胞中に存在する濃度の低い蛋白質などを解析

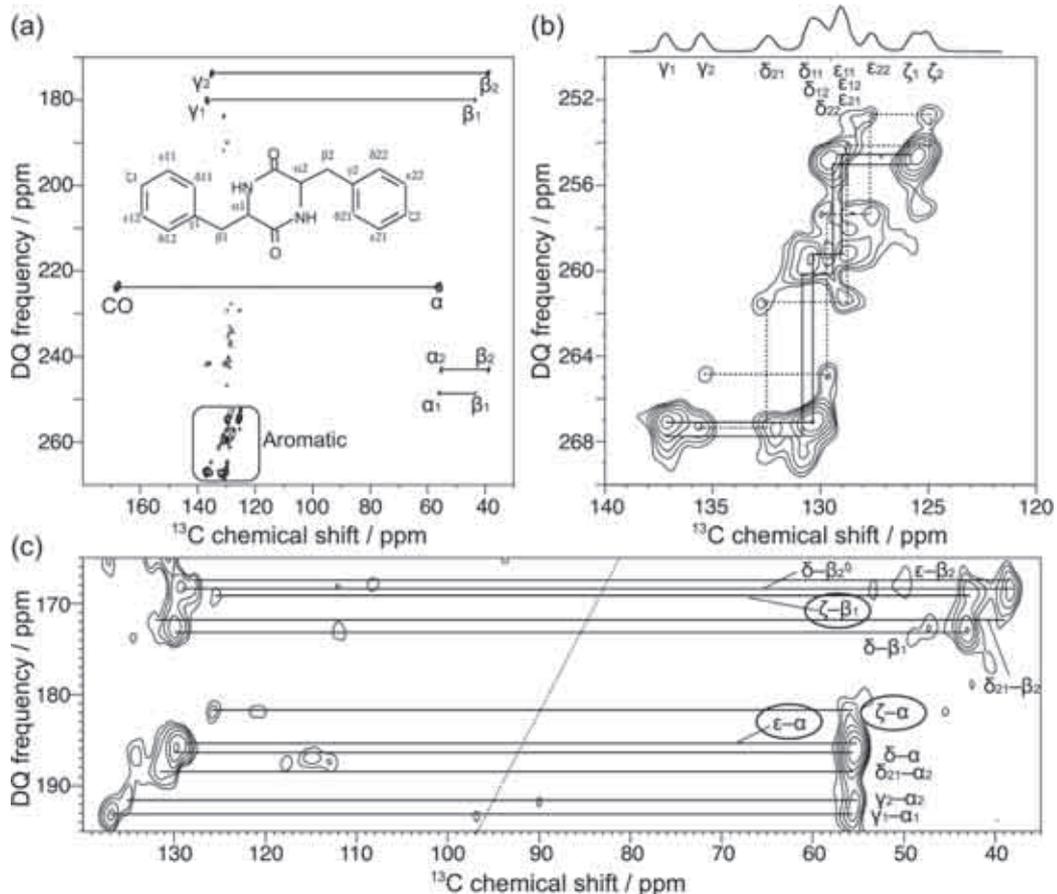


図3 (a) 天然存在比でのCyclo-Phe-Pheナノチューブの2次元 ^{13}C - ^{13}C INADEQUATEスペクトル。測定温度105 K、MAS周波数12.5 kHz。DQ周波数軸において C^{α} - C^{β} のクロスピークは折りたたまれ240-250 ppmに現れている。(b) 芳香環領域の拡大図。(c) 2次元DQ-SQ ^{13}C - ^{13}C 双極子相関スペクトル。MAS周波数10.5 kHz、SPC5混合時間7.62 ms。すべて静磁場9.4 Tで測定。(文献15より)

する上で高感度化は欠かせない。これまで生体系試料ではアミロイド^[20, 21]、膜蛋白質^[22, 23]、巨大複合体^[24~26]、そして細胞丸ごと^[27~29]といったチャレンジングなシステムに応用されている。しかしながら、生体系試料では低温に起因するシグナルの広幅化が大きな問題である。このため、選択的標識など同位体標識法を工夫してシグナルを減らす必要がある。また、測定温度を若干上げて広幅化があまり起こらないような試みもされている。しかし、この場合はDNPの効果が減少してしまうので、この温度でも長い緩和時間を有したラジカル増感剤の開発が必要である。

低温下では構造の不均一性のために広幅化が起こるが、このような広幅化は高磁場化することによって改善することができない。幸い、固体NMRの重要なターゲットの1つであるアミロイド線維では、低温による広幅化の効果が小さい。つまり、線幅を主に決定しているのは双極子相互作用などから生じるhomogeneous broadeningであると報告されている^[21]。そのためアミロイド線維の信号は高磁場化することで線幅が改善される。しかし、高磁場になるとDNPの効果が低下してしまう。DNP実験を高磁場化するためには、新しいラジカル増感剤やヘリウムガスによる極低温試料回転プローブの開発などにより電子スピンの緩和時間を長くし、DNPの効率を上げていかなければならない。

また、DNPで感度を上げることで、測定したい物質を精製せずにそのまま（濃度が高くないまま）測定することができる。例えば、分離した細胞膜中に存在する膜蛋白質をそのまま精製・再構成せずに測定したり^[30]、さらには細胞中でそのまま測定したりできる^[27~29]。一例としてグラム陽性菌である枯草菌の細胞壁の研究にDNPを用いた例を示す^[28]。DNP実験では溶媒の種類やラジカルの濃度といった条件をまず最適化しなければならない。詳細は省略するが、これらの最適化実験によりTOTAPOLが細胞壁の主要構成物質であるペプチドグリカン（**図5a**）に親和性を示すことがわかった。この親和性によりTOTAPOLは細胞全体に均一に存在するのではなく、主に細胞壁（ペプチドグリカン）に存在する。ここで、マイクロ波を照射するとまず細胞壁のシグナルが増強される。その後、 T_1 が十分に長ければさらにスピン拡散が起こり細胞全体へと分極が広がっていくが、この実験条件では T_1 が短いため、結果として細胞壁のシグナルのみが選択的に増強される（**図5b**）。また、ラジカ

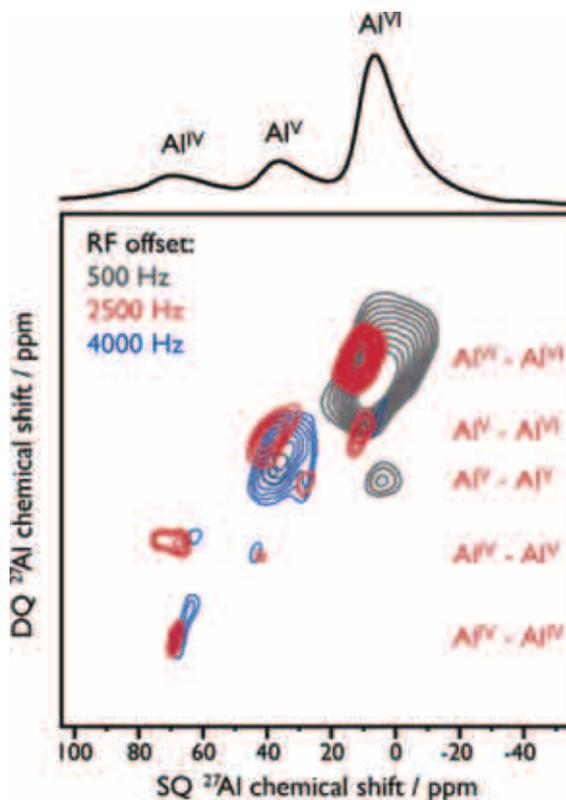


図4 メソポーラスアルミナの表面選択的DQ-SQ ^{27}Al - ^{27}Al 双極子相関スペクトル。静磁場9.4 T、測定温度103 K、MAS周波数8 kHzで測定。上は1次元 ^{27}Al -CPMASスペクトル。2次元NMR観測のパルスシーケンス中、双極子リカップリングパルス (BR_2^1) はオフセット依存性を示すため、適切な相関ピークを取得するため複数のオフセット値で測定を行っている。（文献17より）

ルの濃度が高すぎるとbleachingにより多くのシグナルが消失するが、この場合も選択的に細胞壁のシグナルが消失する（**図5c**）。ここで前者のスペクトルから後者を取り除くことで、細胞内部由来のシグナルが取り除かれ、スペクトルの線幅の大きな改善につながる（**図5d**）。このように、均一に ^{13}C 標識された細胞のような大きなシステムにおいて、注目する物質あるいは領域を選択的に感度を上げて観測することができる。TOTAPOLがペプチドグリカンに親和性を有するのは偶然ではあるが、今後は着目する系に結合能を持つラジカル増感剤を合成するなどして、他のシステムにも応用が可能である。

MAS-DNP法の生体系試料への応用は低温での広幅化の問題があり、チャレンジングではあるが、このように測定法を工夫したり、同位体標識法を工夫することで克服できると思われる。この点に関し、今後のさらなるブレイクスルーに期待する。

6. おわりに

参考文献の発表年を見ていただいたらわかるように、ここで参照した文献のほとんどはここ2、3年に発表されたものである。このように固体NMRにおいてDNPを用いた研究は現在非常にホットなトピックであり、今後もますます盛んになってくると思う。また、本稿では紹介できなかったがTOTAPOLよりもはるかに大きい ϵ_{DNP} を示すラジカル増感剤が開発されてきている。さらにマイクロ波発振装置やDNPプローブ等、各要素の進歩によりMAS-DNP法が固体NMRにおいて日常的に使われる日もそう遠くはないであろう。

謝 辞

ここで紹介した研究の中で筆者らの研究はフラ

ンス原子力・代替エネルギー庁(CEA)で行ったものである。I acknowledge all the collaborators involved in the work presented in this article and particularly special thanks go to Drs Gaël De Paëpe, Sabine Hediger and Daniel Lee for fruitful and exciting discussions. また、DNPの研究へ導いてくださった藤原敏道先生(大阪大学蛋白質研究所)に感謝いたします。

参考文献

- [1] Becerra, L.R., Gerfen, G.J., Temkin, R.J., Singel, D.J., and Griffin, R.G., (1993) Dynamic nuclear polarization with a cyclotron resonance maser at 5 T. *Phys. Rev. Lett.* **71**, 3561-3564.
- [2] Hall, D.A., Maus, D.C., Gerfen, G.J., Inati, S.J., Becerra, L.R., Dahlquist, F.W., and Griffin, R.G., (1997) Polarization-enhanced NMR spectroscopy of

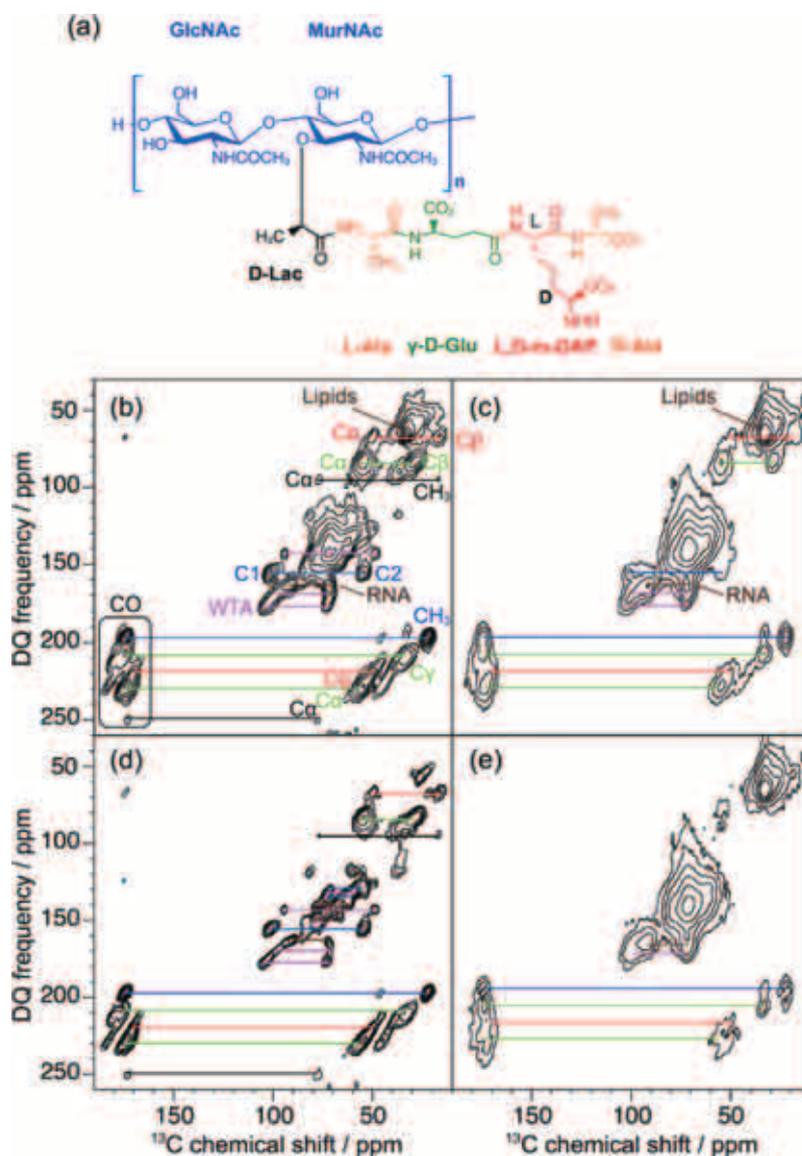


図5 (a) ペプチドグリカンの構造式。(b, c) SPC5リカップリングを用いた2次元DQ-SQ ^{13}C - ^{13}C 双極子相関スペクトル。静磁場9.4T、測定温度105K、MAS周波数13kHzで測定。TOTAPOL濃度：(b) 5mM、(c) 60mM。(d, e) 差スペクトル：(d) b-c、(e) c-b。(文献28より)

- biomolecules in frozen solution. *Science* **276**, 930-932.
- [3] Rosay, M., Tometich, L., Pawsey, S., Bader, R., Schauwecker, R., Blank, M., Borchard, P.M., Cauffman, S.R., Felch, K.L., Weber, R.T., Temkin, R.J., Griffin, R.G., and Maas, W.E., (2010) Solid-state dynamic nuclear polarization at 263 GHz: spectrometer design and experimental results. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **12**, 5850-5860.
- [4] 藤原 敏道 (2013) 高磁場DNP装置の開発. *NMR学会誌* **4**, 113-116.
- [5] Thurber, K.R., and Tycko, R., (2012) Theory for cross effect dynamic nuclear polarization under magic-angle spinning in solid state nuclear magnetic resonance: The importance of level crossings. *J. Chem. Phys.* **137**, 084508.
- [6] Mentink-Vigier, F., Akbey, U., Hovav, Y., Vega, S., Oschkinat, H., and Feintuch, A., (2012) Fast passage dynamic nuclear polarization on rotating solids. *J. Magn. Reson.* **224**, 13-21.
- [7] Lange, S., Linden, A.H., Akbey, U., Franks, W.T., Loening, N.M., van Rossum, B.J., and Oschkinat, H., (2012) The effect of biradical concentration on the performance of DNP-MAS-NMR. *J. Magn. Reson.* **216**, 209-212.
- [8] Thurber, K.R., and Tycko, R., (2014) Perturbation of nuclear spin polarizations in solid state NMR of nitroxide-doped samples by magic-angle spinning without microwaves. *J. Chem. Phys.* **140**, 184201.
- [9] Takahashi, H., Lee, D., Dubois, L., Bardet, M., Hediger, S., and De Paëpe, G., (2012) Rapid natural-abundance 2D ¹³C-¹³C correlation spectroscopy using dynamic nuclear polarization enhanced solid-state NMR and matrix-free sample preparation. *Angew. Chem., Int. Ed.* **51**, 11766-11769.
- [10] Takahashi, H., Fernández-de-Alba, C., Lee, D., Maurel, V., Gambarelli, S., Bardet, M., Hediger, S., Barra, A.-L., and De Paëpe, G., (2014) Optimization of an absolute sensitivity in a glassy matrix during DNP-enhanced multidimensional solid-state NMR experiments. *J. Magn. Reson.* **239**, 91-99.
- [11] Blanc, F., Sperrin, L., Jefferson, D.A., Pawsey, S., Rosay, M., and Grey, C.P., (2013) Dynamic Nuclear Polarization Enhanced Natural Abundance 17O Spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 2975-2978.
- [12] Lelli, M., Gajan, D., Lesage, A., Caporini, M.A., Vitzthum, V., Mieville, P., Heroguel, F., Rascon, F., Roussey, A., Thieuleux, C., Boualleg, M., Veyre, L., Bodenhausen, G., Copéret, C., and Emsley, L., (2011) Fast Characterization of Functionalized Silica Materials by Silicon-29 Surface-Enhanced NMR Spectroscopy Using Dynamic Nuclear Polarization. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 2104-2107.
- [13] Gunther, W.R., Michaelis, V.K., Caporini, M.A., Griffin, R.G., and Román-Leshkov, Y., (2014) Dynamic Nuclear Polarization NMR Enables the Analysis of Sn-Beta Zeolite Prepared with Natural Abundance ¹¹⁹Sn Precursors. *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 6219-6222.
- [14] Takahashi, H., Hediger, S., and De Paëpe, G., (2013) Matrix-free dynamic nuclear polarization enables solid-state NMR ¹³C-¹³C correlation spectroscopy of proteins at natural isotopic abundance. *Chem. Commun.* **49**, 9479-9481.
- [15] Takahashi, H., Viverge, B., Lee, D., Rannou, P., and De Paëpe, G., (2013) Towards structure determination of self-assembled peptides using dynamic nuclear polarization enhanced solid-state NMR spectroscopy. *Angew. Chem., Int. Ed.* **52**, 6979-6982.
- [16] Lesage, A., Lelli, M., Gajan, D., Caporini, M.A., Vitzthum, V., Mieville, P., Alauzun, J., Roussey, A., Thieuleux, C., Mehdi, A., Bodenhausen, G., Copéret, C., and Emsley, L., (2010) Surface Enhanced NMR Spectroscopy by Dynamic Nuclear Polarization. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 15459-15461.
- [17] Lee, D., Takahashi, H., Thankamony, A.S.L., Dacquain, J.P., Bardet, M., Lafon, O., and De Paëpe, G., (2012) Enhanced solid-state NMR correlation spectroscopy of quadrupolar nuclei using dynamic nuclear polarization. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 18491-18494.
- [18] Ouari, O., Phan, T., Ziarelli, F., Casano, G., Ausenac, F., Thureau, P., Gigmes, D., Tordo, P., and Viel, S., (2013) Improved Structural Elucidation of Synthetic Polymers by Dynamic Nuclear Polarization Solid-State NMR Spectroscopy. *ACS Macro Lett.* **2**, 715-719.
- [19] Blanc, F., Chong, S.Y., McDonald, T.O., Adams, D.J., Pawsey, S., Caporini, M.A., and Cooper, A.I., (2013) Dynamic Nuclear Polarization NMR Spectroscopy Allows High-Throughput Characterization of Microporous Organic Polymers. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 15290-15293.
- [20] Bayro, M.J., Debelouchina, G.T., Eddy, M.T., Birkett, N.R., MacPhee, C.E., Rosay, M., Maas, W.E., Dobson, C.M., and Griffin, R.G., (2011) Intermolecular Structure Determination of Amyloid Fibrils with Magic-Angle Spinning and Dynamic Nuclear Polarization NMR. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 13967-13974.
- [21] Lopez del Amo, J.-M., Schneider, D., Loquet, A., Lange, A., and Reif, B., (2013) Cryogenic solid state NMR studies of fibrils of the Alzheimer's disease amyloid- β peptide: perspectives for DNP. *J. Biomol. NMR* **56**, 359-363.
- [22] Bajaj, V.S., Mak-Jurkauskas, M.L., Belenky, M., Herzfeld, J., Griffin, R.G., (2009) Functional and shunt states of bacteriorhodopsin resolved by 250 GHz dynamic nuclear polarization-enhanced solid-state NMR. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106** 9244-9249.
- [23] Linden, A.H., Lange, S., Franks, W. T., Akbey, U., Specker, E., van Rossum, B.-J., and Oschkinat, H., (2011) Neurotoxin II Bound to Acetylcholine Receptors in Native Membranes Studied by Dynamic Nuclear Polarization NMR. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 19266-19269.
- [24] Sergeev, I.V., Day, L.A., Goldbourn, A., and McDermott, A.E., (2011) Chemical Shifts for the Unusual DNA Structure in P ϕ 1 Bacteriophage from Dynamic-Nuclear-Polarization-Enhanced Solid-State NMR Spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 20208-20217.
- [25] Gelis, I., Vitzthum, V., Dhimole, N., Caporini, M.A., Schedlbauer, A., Carnevale, D., Connell, S.R., Fucini, P., and Bodenhausen, G., (2013) Solid-state NMR enhanced by dynamic nuclear polarization as a novel tool for ribosome structural biology. *J. Biomol. NMR* **56**, 85-93.
- [26] Fricke, P., Demers, J.-P., Becker, S., and Lange, A., (2014) Studies on the MxiH Protein in T3SS Needles Using DNP-Enhanced ssNMR Spectroscopy.

- ChemPhysChem* **15**, 57-60.
- [27] Renault, M., Pawsey, S., Bos, M.P., Koers, E.J., Nand, D., Tommassen-van Boxtel, R., Rosay, M., Tommassen, J., Maas, W.E., and Baldus, M., (2012) Solid-State NMR Spectroscopy on Cellular Preparations Enhanced by Dynamic Nuclear Polarization. *Angew. Chem., Int. Ed.* **51**, 2998-3001.
- [28] Takahashi, H., Ayala, I., Bardet, M., De Paëpe, G., Simorre, J.P., and Hediger, S., (2013) Solid-state NMR on bacterial cells: selective cell wall signal enhancement and resolution improvement using dynamic nuclear polarization. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 5105-5110.
- [29] Yamamoto, K., Caporini, M.A., Im, S.C., Waskell, L., and Ramamoorthy, A., (2014) Cellular solid-state NMR investigation of a membrane protein using dynamic nuclear polarization. *Biochim. Biophys. Acta* DOI: 10.1016/j.bbamem.2014.07.008.
- [30] Jacso, T., Franks, W.T., Rose, H., Fink, U., Broecker, J., Keller, S., Oschkinat, H., and Reif, B., (2012) Characterization of membrane proteins in isolated native cellular membranes by dynamic nuclear polarization solid-state NMR spectroscopy without purification and reconstitution. *Angew. Chem., Int. Ed.* **51**, 432-435.



高橋 大樹 (たかはし・ひろき)

Department of Physics, ETH Zurich

2002年 大阪大学理学部卒業

2008年 大阪大学理学研究科博士後期課程修了 (博士 (理学))

2009年 英国 Warwick 大学博士研究員

2011年 フランス原子力・代替エネルギー庁 (CEA) 博士研究員

2013年 スイス連邦工科大学チューリッヒ校 (ETH Zurich) 博士研究員

2014年 日本核磁気共鳴学会会員 (再入会)

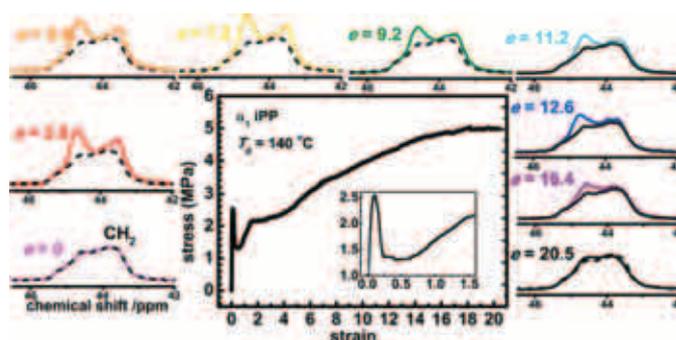
注目すべき最新の論文②

α 型アイソタクチックポリプロピレンの熱延伸下における 2本鎖パッキング転移と転移が引き起こす分子運動および熱特性： 固体NMRによる研究

Two Chain-Packing Transformations and Their Effects on the Molecular Dynamics and Thermal Properties of α -Form Isotactic Poly(propylene) under Hot Drawing: A Solid-State NMR Study
J. Kang and T. Miyoshi, *Macromolecules* **47**, 2993-3004 (2014).

固体 ^{13}C NMR法とDSC法を用いて、 α 型パッキング状態のアイソタクチックポリプロピレン (iPP) を100 ~ 150°Cで一軸延伸した時に発現する、パッキング構造、結晶厚さ、分子運動性の変化を詳細に解析した。 α 型iPPには非秩序構造の α_1 型と秩序構造を維持している α_2 型の2種類が存在する。一例として右図の変化を紹介する。 α_1 型リッチiPPを熱延伸すると、低いひずみ率($e=3-7$)で $\alpha_1 \rightarrow \alpha_2$ 型転移が急激に起こることを固体NMRスペクトルから明らかにしている。この変化は、等方的な融

解と分子鎖拡散による再結晶化が起こったためである。高いひずみ率($e \sim 20$)では、 ^1H スピン拡散実験により結晶相が9.2 nmから17.0 nmへ厚くなった。CODEX法を用いた分子運動解析では、ヘリックスジャンプ運動の相関時間が4.2 msから $e \sim 20$ のひずみで7.2 msへとわずかに遅くなった。構造物性に関する研究について重要な方向性を示している。



α_1 型リッチアイソタクチックポリプロピレンを140°Cで引き延ばした時の応力-ひずみ曲線と各ひずみ (e 値) の ^{13}C CPMAS NMRスペクトル。破線のスペクトルは元の α_1 型スペクトルを示す。(Reproduced with permission from the American Chemical Society)

[防衛大学校 浅野敦志]

第52回NMR討論会若手ポスター賞について

NMR学会では、若手ポスター賞に、大学や公的研究機関の若手研究者を対象とするカテゴリーⅠと、企業でNMRを使用する若手研究者および大学や公的研究機関の共通研究施設や分析センター等の職員を対象とするカテゴリーⅡの2つのカテゴリーを設け、若手のNMR研究者の優れた業績を評価する体制を整えています。さらに、それぞれのカテゴリーの最優秀若手ポスター賞受賞者には、若手のNMR研究者をエンカレッジしたいとの(株)JEOL RESONANCEの御厚意により、JEOL RESONANCE賞として、各々、10万円が授与されます。

第52回NMR討論会(2013年11月12-14日)の若手ポスター賞へのエントリーは、カテゴリーⅠへは21件、そしてカテゴリーⅡへは12件でした。第52回NMR討論会の第一日目に実施されたポスターセッションで、カテゴリーⅠは23名、カテゴリーⅡは7名の評議員が審査員を務め、厳正なる審査を通して、下に示す通り、受賞者を決定致しました。なお、若手ポスター賞ⅠおよびⅡ、そしてJEOL RESONANCE賞の受賞者の選考要領の詳細は、NMR学会誌4巻pp.44-47(2013)に記載されている通りです。授賞式は、第二日目の懇親会の場で行われると共に、第三日目には、受賞者全員が口頭発表を行いました。受賞者の方々が、将来、世界のNMRの研究を牽引して下さることを願ってやみません。

若手ポスター賞Ⅰ受賞者

“JEOL RESONANCE賞” 玉田大輝氏(筑波大学)

高温超伝導バルク磁石を用いた高分解能MRI

Erik Walinda氏(京都大学)

Ubiquitin Recognition in Selective Autophagy

谷中冴子氏(東京大学)

NMRを用いたヒト主要組織適合複合体の動的なペプチド認識及び構造維持機構の解明
服部良一氏(大阪大学)

メチル化リジンの化学シフトと塩橋との相関に関する理論的・実験的研究

木戸浩貴氏((北海道大学)

固体NMRによるタンパク質の構造解析に向けた¹³C-常磁性緩和促進の研究

神原孝之氏(京都大学)

MAS下の新CP法:異方性による低効率化の克服

若手ポスター賞Ⅱ受賞者

“JEOL RESONANCE賞” 守谷潤氏(エーザイ(株))

TRAF6を標的としたタンパク質間相互作用阻害剤の探索および構造解析
百瀬陽氏(三菱レイヨン(株))

NMRスペクトルの多変量解析によるアクリル系共重合体の一次構造解析

茂呂ふみか氏((株)三井化学分析センター・構造解析研究部)

ポリオレフィンの溶液¹³C NMRにおけるピーク強度の定量性

戸所泰人氏(大阪大学大学院・理学研究科分析機器測定室)

脂質二重膜再構成H⁺-ATP合成酵素 subunit c-ringの固体高分解能NMR法による構造決定

丸吉京介氏(第一三共(株)・分析評価研究所)

¹H DQ MASを用いた医薬品原薬中の微量フリー体の定量 ~固体NMRの検出限界は?~

若手ポスター賞担当理事

藤原敏道、西村善文、山本泰彦、河合剛太

P62**高温超伝導バルク磁石を用いた高分解能MRI**○玉田大輝^{1,2}, 巨瀬勝美¹, 柳陽介³, 伊藤佳孝³, 仲村高志^{1,2}¹筑波大学大学院 数理物質科学研究科 電子・物理工学専攻²理化学研究所³(株)イムラ材料開発研究所**High-Resolution Magnetic Resonance Imaging Using a High T_c Bulk Superconducting Magnet**○Daiki Tamada^{1,2}, Katsumi Kose¹, Yosuke Yanagi³, Yoshitaka Itoh³, and Takashi Nakamura^{1,2}¹ *Institute of Applied Physics, University of Tsukuba.*² *RIKEN.*³ *IMURA MATERIAL R&D CO., LTD.*

A high critical temperature (T_c) superconducting bulk magnet is a promising magnet for high resolution magnetic resonance imaging (MRI). A bulk magnet MRI system we developed in 2011 showed their potential for high resolution imaging by acquiring the MR image with the resolution of (50 μm)³. However, there are still challenges to achieve higher resolution, and better quality imaging because of the inhomogeneity of the magnetic field, the shielding effect of the magnet, and low signal-to-noise ratio due to small voxel volume. In this study, we designed the new bulk magnet using the finite element method to achieve higher homogeneity with lower shielding effect. In addition, the compressed sensing method was used for MR imaging to improve the signal-to-noise ratio per unite time. Finally, MR images were acquired to show the usefulness of our system.

【はじめに】高温超伝導バルク磁石 (バルク磁石) [1]は, 現在広く用いられている超伝導磁石や永久磁石に続く新たなNMR/MRI用磁石である. 我々のグループは, 2011年に4.7 Tに着磁されたEuBCOバルク磁石を用いたMR microscopeを開発し, 生体試料の高分解能撮像 (分解能(50 μm)³) に成功した[2]. しかしながら, さらなる高分解能・高画質のMR画像を得るにあたって, いくつかの問題点が存在する.

まず初めに静磁場均一性の不足である. これは, 高温超伝導体結晶の不完全性や着磁中の磁石内の温度勾配, 着磁手法の問題に起因する[3]. さらに, 高温超伝導体のマイスナー効果による勾配磁場の遮蔽があるため, 勾配磁場効率が減少するという問題も存在する[3]. また, 高分解能撮像においては, ボクセル体積が小さくなるため, 十分な信号対雑音比 (SNR) を得るためには数時間から数日に及ぶ長時間の信号積算が必要である. そのため, 生体試料のように時間経過とともに試料の性質が変化する場合は, 高分解能撮像が困難である. これらの問題を解決するために, 本研究では, 有限要素法解析による最適化計算を行うことで, 従来設計のバルク磁石よりも, 均一な静磁場を持ったバルク磁石を開発した. また, 高温超伝導体の内径を広げることで,

MRI, 高温超伝導, マイクロイメージング

○たまだいき, こせかつみ, やなぎようすけ, いたうよしたか, なかむらたかし

勾配磁場コイルとバルク磁石との間で生じるマイスナー効果の低減を試みた。さらに、撮像サンプリング法に Compressed Sensing (CS)[4,5]を用いることで、単位時間当たりのSNRを改善した。これらの結果、生体試料を $(32\mu\text{m})^3$ の高分解能で撮像することに成功した。

【システム】本研究で用いたMRIシステム (Fig.1) は、バルク磁石 (磁場強度4.74 T, ボア径23 mm), MRIコンソール (MRTechnology社製), RFコイル及び勾配磁場コイルから構成されている。

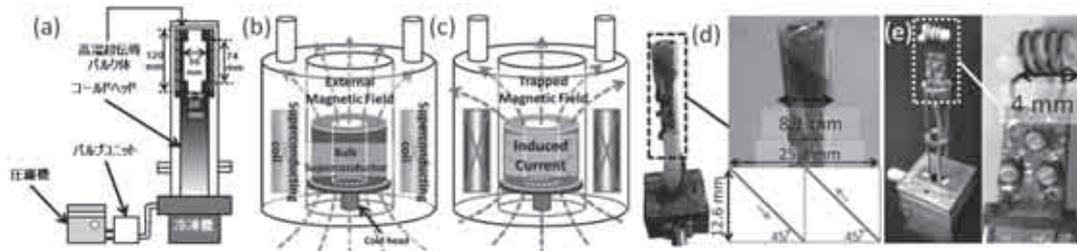
高温超伝導バルク磁石は、リング状の EuBCO 高温超伝導バルク体 (転移温度 $T_c=93\text{ K}$, 外径 60 mm), 冷凍機及び圧縮機で構成されている。バルク体は冷凍機コールドヘッドに設置されている。

本研究では、 B_1 分布の不均一性に由来するアーチファクトを避けるために、8mm管用RFコイルとして、鞍型コイルの代わりに Twisted Loop Coil (TLコイル, 直径8.1 mm, $Q=52$ (-3dB)) を採用した[6]。TLコイルは、極めて単純な構造であるにも関わらず、均一な B_1 分布を発生させることが可能である。また、小型サンプルの撮像にはソレノイドコイル (直径4 mm, 長さ4 mm, $Q=106$ (-3 dB)) を用いた。

勾配磁場コイルに関しては、GX, GYコイルとしてGolayコイルセット, GZコイルとしてMaxwellペアを用いた。勾配磁場コイルは、内径14.7 mm, 外径18.0 mmのアクリルパイプ上に直径0.3 mmの被覆銅線を配置することで作成した。また、コイルのターン数は10とした。



Figure 1 MRI system used in this study.



Figures 2 (a) Schematic of the bulk magnet. (b, and c) The bulk magnet was magnetized using the field cooling method. (d) Twisted Loop Coil (8.1 mm diameter) (e) Solenoid Coil(4 mm diameter, 4 mm length, and 4 turns).

【手法】高温超伝導バルク磁石は、内径28 mmおよび36 mmのEuBCO高温超伝導バルク体の組み合わせで構成されている。磁石の構造をFig.2(a)に示す。上部と底部に関しては、内径28 mm, 中央部に関しては内径36mmの超伝導体を用いた。バルク磁石の構造は、静磁場分布が均一になるように有限要素法による電磁界解析(PHOTO-Series)を用いて決定した。バルク磁石の着磁方法として静磁場着磁法を採用した。また、着磁に用いる磁石として NMR用ワイドボア超伝導磁石 (JASTEC JRTC-300/89) を用いた。具体的な着磁手順を次に示す。まず、着磁用超伝導磁石の磁場強度を4.74Tとし、超伝導シムを用いて磁場を均一化した。次に、冷凍機を用いてバルク磁石を100Kにまで冷却し、Fig.2(b)のように着磁用超伝導磁石の磁場中心に設置した。さらに、温度を50Kまで徐々に下げた後、着磁用超伝導磁石の磁場を4.74Tから徐々に消磁した。最後にバルク磁石を冷凍機の最低温度 (40K) で安定させ、バルク磁石の着磁が完了した。

(Fig.2(c)). バルク磁石の性能評価のために、静磁場分布及びバルク磁石中の勾配磁場効率を計測した. 静磁場の計測方法には、位相差法を用いた. 計測時のファントムの溶液には、硫酸ニッケルを用いた. 撮像には3Dスピネコー法 (TR/TE=100/10 ms, 分解能=(200 μm)³, マトリクスサイズ=64³) を用いた. また、静磁場の評価領域は直径6 mm, 高さ6 mmの円柱領域とした.

TL コイル (Fig.2(d)) 及びソレノイドコイル

(Fig.2(e)) は、可変キャパシタを用いて 202 MHz に同調させた. TL コイルは Fig.2(d)にあるコイルパターンに従って製作した. コイルパターンが印刷された OHP シート (幅 25.4 mm, 高さ 12.8 mm) 上に厚さ 0.3 mm, 幅 3 mm の銅箔を配置することでコイルを製作した. また、コイルは 33 pF のキャパシタを用いて分割した. Figs.3(a, and b)と(c, and d)は、それぞれ TL コイルと鞍型コイル (直径 8.1 mm) を用いて 8mm 試験管に入った硫酸ニッケル水溶液 (Fig.3(d)) を撮像した結果である. 鞍型コイルでは、静磁場方向及び径方向に不均一性が確認された (信号の変動係数(CV)=0.21) のに対して、TL コイルは、信号強度の変化が小さいことがわかる (CV 値=0.15).

MR画像のSNRはボクセル当たりの試料体積に比例するため、高分解能撮像を行う際には、長時間の信号積算が要求されるという問題がある. 近年、少ないサンプリング点数から元の信号を復元するCS法を利用した撮像時間短縮手法が提案された[4].

そこで、本研究では、サンプリング点数を減らし、積算回数を増やすことによって、単位時間あたりのSNRの向上を試みた[5]. CSにおける信号のアンダーサンプリングにはReduction Factor (R) = 5のランダムフェーズエンコーディング (全サンプリング点数に対して20%のサンプリング点数) を用いた. 取得したk-spaceデータは、GPU(NVIDIA, Tesla1060)とFast Composite Splitting Algorithm (FCSA) を用いて再構成を行った. CSの有用性を確認するために、生体試料 (ヤマゴボウ) の撮像実験を行った. 比較のため、通常のフルサンプリング(FS)法とCS法を用いた. 撮像シーケンスには3DSEシーケンス(TR/TE=100/10 ms, 分解能=(50 μm)³, マトリクスサイズ=256³, FS法の信号積算回数=2, CS法の信号積算回数=10)を用いた. FS及びCS法の撮像時間はいずれも3.6時間である.

最後に、本システムの有用性を示すために、生体サンプル (ダンゴムシ, リンゴの種子) の撮像実験を行った. ダンゴムシは、酢酸エチルを用いて殺虫処理をした後、3DSE シーケンス(TR/TE=600/10ms, 分解能=(50 μm)³, FOV = (12.8mm)³, マトリクスサイズ=256³, 撮像時間=36.5 時間, 信号積算(NEX)=16)と TL コイルを用いて撮像した. また、リンゴの種の撮像には 3DGE シーケンス(TR/TE=70/10ms, 分解能=(32 μm)³, FOV = (8.19 mm)³, NEX=5, マトリクスサイズ=256³, 撮像時間=1.3 時間)とソレノイドコイル

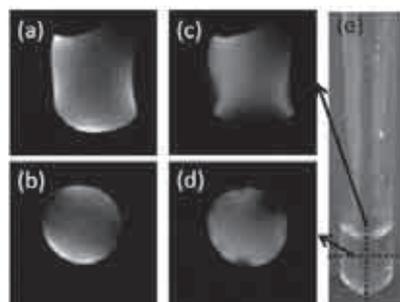


Figure 3 (a-d) MR images of NiSO₄ doped water using the saddle shape coil (a, and b), and TL coil (c, and d). (e) NiSO₄ doped water in a 8 mm NMR tube.



Figure 4 (a) *Phytolaccaceae* (b, and c) MR images of *Phytolaccaceae* using spin echo sequences with full sampling (b), and CS sampling (c).

ルを用いた。

【結果・考察】本研究で開発したバルク磁石の静磁場均一性は、27.9 ppmであった。さらに、勾配磁場コイルを用いた一次シミングを行った結果、18.8 ppmの静磁場均一性を達成した。これは、従来設計のバルク磁石[2]で得られた均一性31.2 ppm (1次シミングあり) よりも約4割改善されている。また、従来設計のバルク磁石におけるGX, GY, GZコイルの勾配磁場効率はそれぞれ、12.6 G/cm/A, 11.4 G/cm/A, 8.3 G/cm/Aであった。これに対して、本研究で開発したバルク磁石における勾配磁場効率はそれぞれ、14.1 G/cm/A, 13.0 G/cm/A, 10.1 G/cm/Aであった。これらの結果から、マイスナー効果の影響が小さくなったことで勾配磁場効率が改善したことが示された。これによって、さらなる高分解能撮像が可能になると考えられる。

ヤマゴボウ (Fig.4(a)) をFS法及びCS法で撮像し、SNRを比較した結果、CS法を用いることによって、単位時間当たりのSNRが大幅に向上したことがわかった。FS法を用いた画像(Fig.4(b))のSNRが5.2であるのに対して、CSを用いたMR画像Fig.4(c)のSNRは25であった。

Fig.5 (a)は、8mm試験管に入ったダンゴムシである。また、Figs.5 (b, and c)はダンゴムシ断面のMR画像である。また、Figs.5 (d, and e)はMR画像を最大値投影(MIP)処理したものである。CSを用いることによって、ホルマリン等の化学固定されていない生物の構造や形状を現実的な撮像時間内に高分解能 ($(50 \mu\text{m})^3$) で撮像することに成功した。Figs. 6は、リンゴの種 (Fig. 6(a)) のMR画像 (Fig. 6(b)) と、MIP画像 (Fig. 6(c)) である。1.3時間という短時間で十分なSNRを持った($32 \mu\text{m})^3$ の高分解能撮像に成功した。これらの画像に、静磁場の不均一性由来するアーチファクトはほとんど見られなかった。

【結論】本研究では、有限要素法解析を用いた最適化計算に基づいて磁石の設計及び開発を行った。その結果、静磁場均一性は従来設計で得られる均一性に比べて約4割改善した。また、高温超伝導体の内径を大きくすることで、マイスナー効果の影響を減少することに成功し、バルク磁石中の勾配磁場効率が1割から2割改善することを確認した。さらに、CS法を用いることで、短時間当たりのSNRを大幅に改善することに成功した。これらの結果、従来設計のバルク磁石で得られた結果を上回る高分解能撮像 ($(32 \mu\text{m})^3$) に成功した。

【謝辞】本研究はJSPS科研費25・490の助成を受けたものである。

【参考文献】 [1] T. Nakamura, et. al., Concept Magn. Reson. B (Magn. Reson. Eng.) 31B (2007) 65. [2] K. Ogawa, et. al., Appl. Phys. Lett. 98 (2011) 234101. [3] D.Tamada, et. al., Physica C, 492 (2013) 174. [4] M. Lustig, et al., Magn. Reson. Med. 58 (2007) 1182. [5] D.Tamada, et. al., Proc., ISMRM, 21th Annual Meeting (2013) 0136. [6] W. Loew, et. al., Proc., ISMRM, 20th Annual Meeting (2012) 2623.

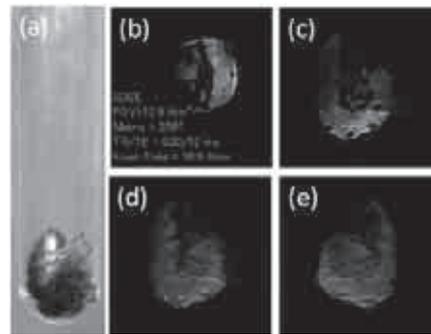


Figure 5 (a) Pill bug. (b, and c) MR images of the pill bug using spin echo sequences with CS. (d, and e) Minimum intensity projection of the MR images.

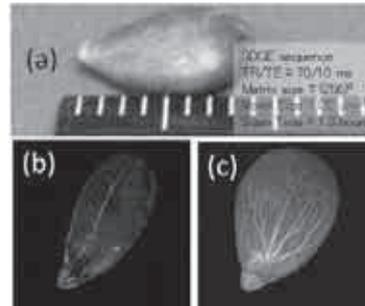


Figure 6 (a) Apple seed. (b, and c) MR images of the apple seed using gradient echo sequences with CS.

P26**選択的オートファジーにおけるユビキチン認識**

○バリンダ エリック¹, 森本大智¹, 小沼 剛², 菅瀬謙治², 朽尾豪人¹, 白川昌宏¹

¹京大・工学研究科・分子工学専攻

²サントリー生命科学財団・生物有機化学研究所

Ubiquitin Recognition in Selective Autophagy

○Erik Walinda¹, Daichi Morimoto¹, Tsuyoshi Konuma², Kenji Sugase², Hidehito Tochio¹ & Masahiro Shirakawa¹

¹*Kyoto University Graduate School of Engineering, Kyoto, Japan*

²*Suntory Foundation for the Life Sciences, Osaka, Japan*

Eukaryotes degrade proteins via one of two major pathways – the ubiquitin-proteasome system and autophagy. While the proteasome system is limited to degradation of single-domain proteins that fit into the narrow (~ 13 Å) opening of the proteasome barrel, autophagy is thought to be a bulk degradation system that is capable of recycling entire organelles, protein oligomers and large protein aggregates which may be toxic to the cell.

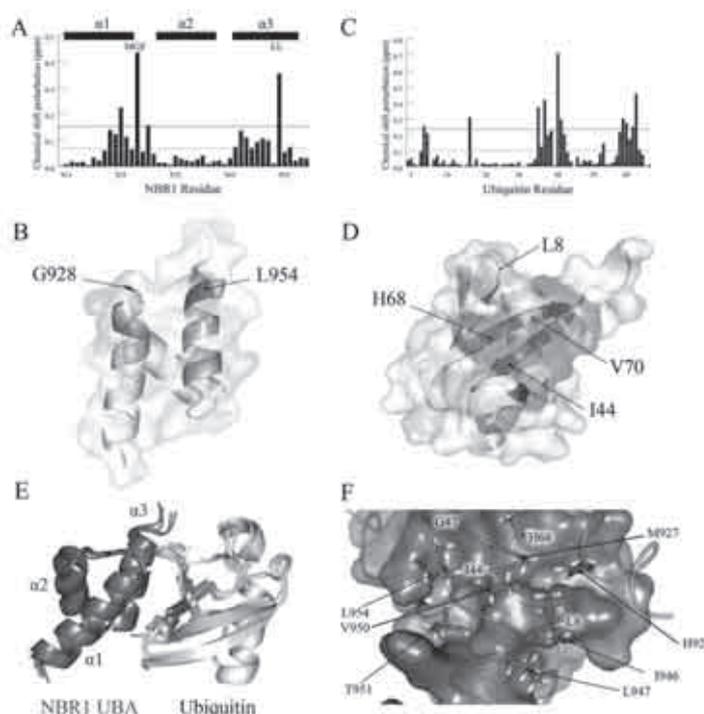
Autophagy (“self-eating”) is a conserved pathway, in which cytoplasm and organelles are engulfed by vesicles called autophagosomes. By fusion of these vesicles with lysosomes, cellular constituents and protein aggregates can be degraded or, when nutrients are scarce, subjected to turnover. The vital importance of autophagy is reflected by studies in mice that develop neurodegeneration if autophagy is inhibited, presumably due to irreversible accumulation of protein aggregates in neurons.

Long believed to be a somewhat random degradation system, recent evidence suggests that specificity in autophagy. This “selective autophagy” is thought to be mediated by autophagy receptor proteins containing ubiquitin-associated (UBA) domains that recognize ubiquitin-marked substrates (Kraft et al., 2010) and deliver them to autophagosomes for degradation.

Ubiquitin, UBA Domain, Autophagy

○ぼりんだえりっく, もりもとだいち, こぬまつよし, すがせけんじ, とちおひでひと, しらかわまさひろ

While UBA domains show high conservation in both – amino-acid sequence and tertiary structure, their affinity for various types of ubiquitin are completely different. We are studying structure and dynamics of the autophagy receptor proteins p62 and NBR1 by NMR to understand their specificity for ubiquitin and its respective recognition mechanism (Walinda et al., 2014).



Structure of the NBR1 UBA-Ubiquitin Complex. *A*, normalized chemical shift perturbation (CSP) values of NBR1 UBA on binding to ubiquitin plotted as a function of amino acid residue. The evolutionarily conserved MGF and LL motifs and α -helices are indicated. *B*, surface representation of the chemical shift changes mapped on the solution structure of NBR1 UBA. *C*, ubiquitin backbone amide CSP on complex formation with NBR1 UBA. *D*, surface representation of (*C*) mapped on the structure of ubiquitin (PDB ID: 1UBQ). The horizontal lines in *A* and *C* and surfaces in *B* and *D* are colored as follows: magenta: $\delta_{av} \leq \text{CSP} < \delta_{av} + 1\sigma$; red: $\text{CSP} \leq \delta_{av} + 1\sigma$. *E*, overlay of the 4 lowest-energy structures of NBR1 UBA in complex with ubiquitin as calculated from orientational, ambiguous and unambiguous distance restraints. *F*, close-up view of the UBA-ubiquitin interface. Surface residues of ubiquitin in contact with the UBA are colored green and residues of NBR1 UBA involved in hydrophobic contacts with ubiquitin are shown as blue sticks.

References

- Kraft, C., Peter, M., and Hofmann, K. (2010). Selective autophagy: ubiquitin-mediated recognition and beyond. *Nat Cell Biol* **12**, 836-841.
- Walinda, E., Morimoto, D., Sugase, K., Konuma, T., Tochio, H., and Shirakawa, M. (2014). Solution Structure of the Ubiquitin-associated (UBA) Domain of Human Autophagy Receptor NBR1 and its Interaction with Ubiquitin and Polyubiquitin. *J Biol Chem*, in press.

P34**NMRを用いたヒト主要組織適合複合体の動的なペプチド認識及び構造維持機構の解明**○谷中冴子¹, 上野貴将², Shi Yi^{3,4}, Qi Jianxun^{3,4}, Gao George^{3,4}, 津本浩平^{1,5,6}, 菅瀬謙治⁷¹東大・新領域, ²熊大・エイズ研, ³Beijing Institute of Life Science・CAS, ⁴Institute of Microbiolog・CAS, ⁵東大・工学系研究科, ⁶東大・医科研, ⁷サントリー生科財団・生有研**Dynamic Regulation of Peptide Recognition and Stabilization of a Human Leukocyte Antigen Revealed by NMR**○Saeko Yanaka¹, Ueno Takamasa², Shi Yi^{3,4}, Qi Jianxun^{3,4}, Gao George^{3,4}, Kouhei Tsumoto^{1,5,6}, Kenji Sugase⁷¹Graduate School of frontier Sciences, the University of Tokyo., ²Center for AIDS Research, Kumamoto University., ³Beijing Institute of Life Science, Chinese Academy of Sciences., ⁴Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences., ⁵Graduate School of Engineering, the University of Tokyo., ⁶Institute of Medical Science, The University of Tokyo., ⁷Bioorganic Research Institute, Suntory Foundation for Life Sciences.

In immune-mediated control of pathogens, human leukocyte antigen (HLA) class I complexes present various antigenic peptides and activates cytotoxic T lymphocytes (CTLs). The stability and long-lived presentation of the peptide-HLA complex (pHLA) depends heavily on the bound peptide. Crystal structures of pHLAs, however, are very similar to each other, irrespective of the bound peptides. Thus, the inherent determinant of pHLA stabilization remains elusive. In this study, we examined the mechanism by which HLA-B*35:01 recognizes various peptides and stabilizes the complex by elucidating the conformational dynamics of HLA-B*35:01 using relaxation dispersion NMR spectroscopy. Our data revealed that HLA loosely binds to peptides and then transiently forms a minor conformation in which the peptide is more tightly bound, circumventing pHLA disintegration.

ヒト主要組織適合複合体(HLA)は抗原蛋白質から切り出された様々な抗原ペプチドと結合し、それぞれに特異的な細胞傷害性T細胞(CTL)を活性化する抗原提示に重要な蛋白質である。既にHLAと様々なペプチドとの複合体の結晶構造が明らかであるがそれらの結晶構造に大きな差異はない。一方、HLAのCTL活性持続時間は提示するペプチドによって大きく異なり、本研究で用いたHLA-B*3501について円偏光二色性(CD)の測定から、変性中点温度と細胞中での活性持続時間との間に相関がある事を我々は明らかにしている。また、示差走査熱量測定(DSC)の結果は溶液中の構造の差異を示唆していた。

 緩和分散, ヒト主要組織適合複合体

○ やなかさえこ, うえのたかまさ, つもとこうへい, すがせけんじ

結晶構造では確認されない構造の差異が溶液中に存在する理由として、溶液中には準安定なマイナー構造が存在し、最安定構造とのアンサンブル構造を取ることが考えられる。そこで、活性持続時間が異なる3つのHLAペプチドVY8-5A、VY8-3A、RY11-8Aに着目し、溶液中におけるマイナー構造の特徴を原子分解能で解析できる、NMR緩和分散測定による動的構造解析を行った。その結果、特にペプチドとHLA重鎖の結合部位に揺らぐ残基が多く見られ、活性持続時間の長く熱安定なpHLAの方が揺らぎやすいことが明らかとなった。更に、緩和分散の温度依存性の解析から、マイナー構造はタイトにパッキングした構造であることが示された。

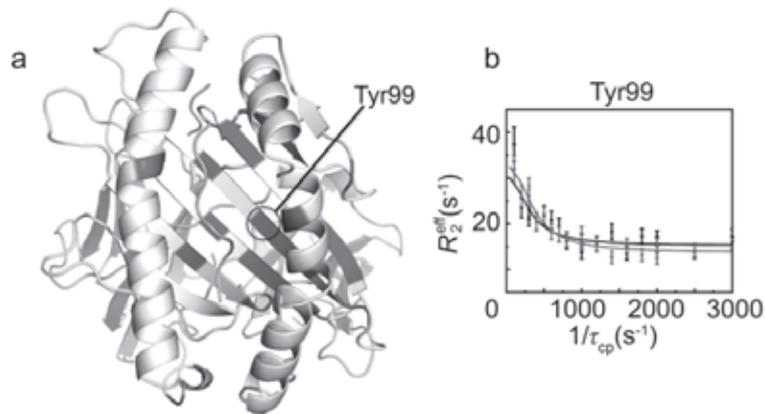


Fig. 1 Profile of HLA fluctuation

(a) The residues showing relaxation dispersions are plotted on the crystal structure of HLA as gray. The positions around Tyr99 important for selective peptide recognition is encircled. (b) Relaxation dispersion profiles for Tyr99 recorded at 14.1 T (black) and 17.6 T (gray).

pHLAはペプチドが結合している周辺の残基を動的に構造変化させ、タイトにパッキングすることで、構造を維持していると考えられる。また、ルースにペプチドと結合したメジャー構造が多様なペプチドの認識に重要であると考えられる。

また、本研究ではpHLAのマイナー構造がpHLAのレセプターであるTCRとの相互作用に関わる可能性が示唆されたため、今後pHLA-TCR相互作用におけるpHLAのマイナー構造の役割について検証していきたい。



Fig. 2 Diagram of HLA fluctuation

The pHLA heavy chain is shown in gray, and the peptide as a trapezoid. Water molecules are shown as gray circles.

P38

メチル化リジンの化学シフトと塩橋との相関に関する理論的・実験的研究

○服部良一¹、Jakub Sebera²、Vladimír Sychrovský²、古板恭子¹、大木出³、池上貴久¹、藤原敏道¹、児嶋長次郎¹

¹大阪大学 蛋白質研究所

²チェコ科学アカデミー 有機化学・生化学研究所

³奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科

Theoretical and experimental study about the correlation between the chemical shift of methylated lysine and salt bridge

○Yoshikazu Hattori¹, Jakub Sebera², Vladimír Sychrovský², Kyoko Furuita¹, Izuru Ohki³, Takahisa Ikegami¹, Toshimichi Fujiwara¹, Chojiro Kojima¹

¹Institute for Protein Research, Osaka University

²Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of Czech Republic

³Graduate School of Biological Sciences, Nara Institute of Science and Technology

NMR signals derived from the methyl groups of methylated-lysine residues are sensitive probes to monitor the electronic environments of lysine side-chain amino groups. Here we quantitatively demonstrate that the salt bridge formation induces upfield shift and split peaks in the ¹H-¹³C HSQC spectrum of the methyl group of the methylated-lysine residue. Experimental chemical shift values were compared to the theoretical values calculated by the quantum chemical calculation based on density functional theory, and surprisingly good correlation was obtained for both ¹H and ¹³C chemical shifts. The split peaks were also explained by the salt bridge formation. These features are useful for determining the strength of the lysine-mediated salt bridges.

【背景】

塩橋は、対に帯電したタンパク質側鎖間の非共有性の相互作用であり、イオン結合性と同時に水素結合性を有する。NMR法では、タンパク質中の水素結合を、化学シフト・スピンカップリング・同位体シフトなどから、生理的環境下で同定可能である。しかしながら、塩橋に含まれる水素結合性について、NMR法を用いた解析例はほとんどない^{1,2}。その理由として、塩橋での水素結合に関与するプロトンは溶媒との交換性が高く、直接的な検出が難しいことや、主鎖アミド基を介した水素結合と比べて運動性が高く、本質的には過渡的な相互作用であることが挙げられる。NMR法によって塩橋に関する構造情報が得られないということは、NMR法を用いたタンパク質構造解析において、実験的な証拠をもとに塩橋形成の有無を反映させられないということ意味する。そのため、塩橋に関する構造情報取得のための手法が必要とされている。

化学シフト、メチル基、塩橋

○はっとりよしかず、じゃかぶせべら、うらじみーるしくろふすきー、ふるいたきょうこ、おおきいずる、いけがみたかひさ、ふじわらとしみち、こじまちょうじろう

還元的メチル化法では、化学修飾によってリジン側鎖アミノ基に高感度な ^{13}C メチル基を導入することができる (Fig. 1)。

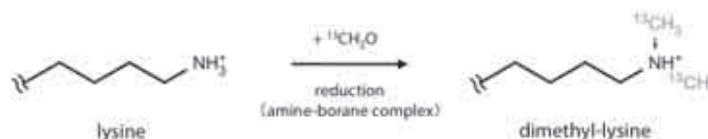


Fig. 1 ^{13}C -methylation of lysine side-chain amino group.

この ^{13}C メチル基は、他のリガンドやタンパク質との相互作用解析に用いられるほか^{3,4}、直接的なNMR検出が難しいアミノ基の静電的環境の間接的な検出にも用いられてきた^{5,6}。それは、メチル化によってアミノ基の pK_a が0.5-1程度しか変化しないため、メチル基の化学シフト変化から、本来のアミノ基の静電的性質を推定できるからである。とくに、塩橋形成とメチル基の化学シフトの関連についてはいくつもの議論がされてきたが、これまでに系統的かつ定量的な研究報告はない。そこで本研究では、3種のタンパク質のリジン側鎖アミノ基に導入したメチル基の化学シフトを得て、その塩橋形成との相関を明らかにした。

【結果と考察】

1. 化学シフト値とN...O間距離の取得

タンパク質として、分子量10 kDa前後であり、順に7、8および10残基のリジン残基を有するユビキチン、FKBPおよびチオレドキシンをを用いた。これらを還元的メチル化法によって完全に ^{13}C ジメチル標識し、 ^1H - ^{13}C HSQC測定を行った (Fig. 2)。そして、リジンをアルギニンに置換した変異体を用いて、すべての帰属を完了した。帰属された25残基のうち、8残基については非等価な ^{13}C シフトを示し、そのうちの3残基は ^1H シフトも非等価であった。非等価な ^1H シフトを示す3残基は、タンパク質内部に埋もれて塩橋を形成する、または複数の酸性アミノ酸残基と塩橋を形成すると思われるリジンであった。本研究ではそれらの残基を解析から除外し、タンパク質表面で単純な対になっている塩橋について、一般性を見出すことに焦点を当てた。また他には、芳香環に近接しており環電流シフトの影響が大きいと思われる3残基を除いた。よって、合計19残基の ^1H および ^{13}C 化学シフトを解析に用いた。

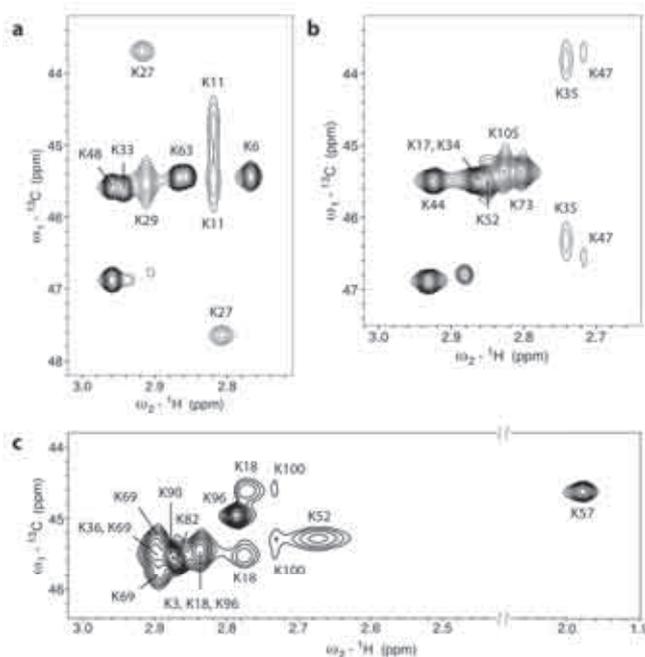


Fig. 2 ^1H - ^{13}C HSQC spectra of (a) ubiquitin, (b) FKBP and (c) thioredoxin acquired at pH 6.8, 30 °C and 400 MHz NMR.

塩橋形成の指標としては、結晶構造におけるリジン N_c 原子から 2 つのアスパラギン酸 O_δ 原子またはグルタミン酸 O_ϵ 原子までの平均距離 ($N\dots O$ 間距離) を求めた (Fig. 3a)。一般に、塩橋は $N\dots O$ 間距離が 4 Å 以内であると定義され、エネルギー的な安定化に寄与する距離である⁷。

2. 1H シフトと $N\dots O$ 間距離の対応

メチル基 1H シフトとそれに対応する $N\dots O$ 間距離をプロットすると、 $N\dots O$ 間距離が短くなるにつれて、 1H シフトが小さくなる (高磁場シフトする) ことが示された (Fig. 3b)。通常、水素結合に関与する場合の 1H シフトは低磁場シフトを示すため、非常に興味深い結果であった。ここから、メチル化リジンの塩橋は、側鎖カルボキシル基とメチル基との水素結合 ($CH\dots O$ 相互作用) ではなく、アミノ基との水素結合 ($NH\dots O$ 相互作用) によって安定化していると推測された。そして、メチル基の高磁場シフトは、古典的には、側鎖カルボキシル基の局所的な電場および磁気異方性をもたらす空間的な影響であると考えられた。

しかしながら、この有意ではあるが小さな高磁場シフトの傾向を古典的なモデルから説明することは困難であった。そこで、密度汎関数理論 (B3LYP/6-311++G**) に基づく構造最適化と化学シフト計算を行った。その結果、構造最適化によって $CH\dots O$ 相互作用が見られた 2 残基では低磁場シフトを示したが、その他の残基では $NH\dots O$ 相互作用が見られ、かつ実験値と同程度の高磁場シフトを示したことから、実験的に得られた相関が強く裏付けられた。

3. ^{13}C シフトと $N\dots O$ 間距離の対応

^{13}C シフトについては、過去にもその非等価性と塩橋形成の関連が示唆されているが、本研究においても同様の傾向が示された (Fig. 4a)。さらには、 ^{13}C シフト自体が、 1H シフトと同様、 $N\dots O$ 間距離が短くなるにつれて高磁場シフトすることが明らかとなった

(Fig. 4b)。 1H シフトと同様の塩橋形成による高磁場シフトは、同じく側鎖カルボキシル基からの空間的な影響によるものであると考えられた。

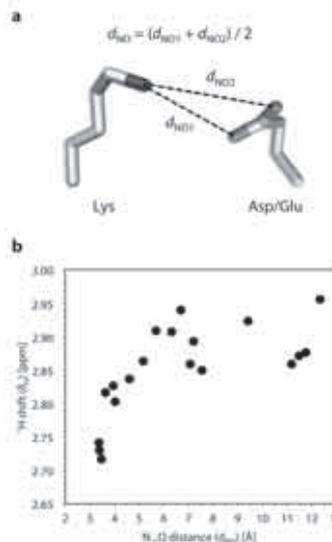


Fig. 3 (a) Schematic representation of $N\dots O$ distance in salt bridge. (b) Correlation plot between $N\dots O$ distances and 1H shifts

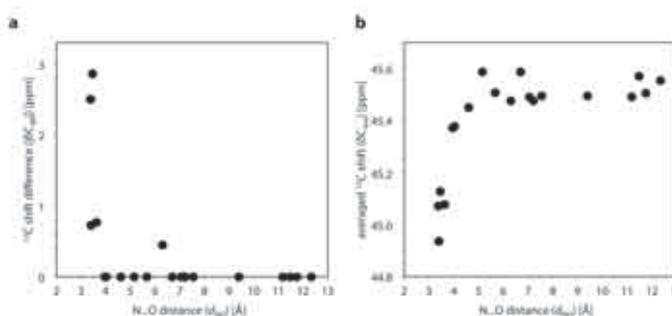


Fig. 4 Correlation plot between $N\dots O$ distances and (a) ^{13}C shift differences or (b) averaged ^{13}C shifts.

4. 塩橋が失われた場合のメチル基 ^1H および ^{13}C シフト変化

pH を下げて側鎖カルボキシル基をプロトン化させる、または酸性アミノ酸残基へ変異を導入することによって塩橋を損失させると、塩橋を形成していたメチル化リジンのメチル基 ^1H シフトは低磁場シフトを、 ^{13}C シフトは非等価性の解消および低磁場シフトを示した (Fig. 5)。すなわち、これまでに得られたメチル基の化学シフトについての特徴が、塩橋形成によるものであることが示された。

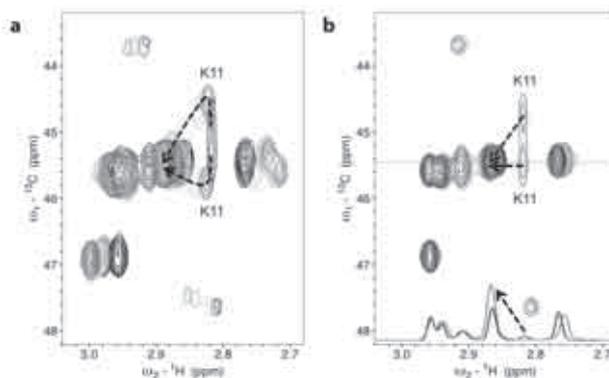


Fig. 5 Peak shifts of the methyl groups of K11 in ubiquitin induced by (a) the pH changes from 6.9 to 3.2 and (b) the mutation of E34Q (E34 forms a salt bridge to K11).

【結論】

リジン側鎖に導入したメチル基の化学シフトの高磁場シフトと塩橋形成に関与する側鎖N...O間距離が定量的に相関することが、理論的および実験的に確かめられた。NMR法における塩橋形成の同定は、タンパク質の物性解明や構造精密化において極めて貴重な情報となる。また、高磁場シフトが本来のリジンの塩橋で見られる水素結合(NH...O相互作用)を間接的に反映したものであることに加えて、NMR法によって構造決定されたメチル化修飾FKBPが、非修飾体と同等の立体構造(主鎖RMSD 0.9 Å)を有することから、化学修飾によるNMRプローブ法として、有用なものであるといえる。

【文献】

- (1) Liu, A. Z.; Hu, W. D.; Majumdar, A.; Rosen, M. K.; Patel, D. J. *J. Biomol. NMR* **2000**, *17*, 305.
- (2) Tomlinson, J. H.; Ullah, S.; Hansen, P. E.; Williamson, M. P. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 4674.
- (3) Bokoch, M. P.; Zou, Y. Z.; Rasmussen, S. G. F.; Liu, C. W.; Nygaard, R.; Rosenbaum, D. M.; Fung, J. J.; Choi, H. J.; Thian, F. S.; Kobilka, T. S.; Puglisi, J. D.; Weis, W. I.; Pardo, L.; Prosser, R. S.; Mueller, L.; Kobilka, B. K. *Nature* **2010**, *463*, 108.
- (4) Hattori, Y.; Furuita, K.; Ohki, I.; Ikegami, T.; Fukada, H.; Shirakawa, M.; Fujiwara, T.; Kojima, C. *J. Biomol. NMR* **2013**, *55*, 19.
- (5) Gerken, T. A.; Jentoft, J. E.; Jentoft, N.; Dearborn, D. G. *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 2894.
- (6) Zhang, M. J.; Vogel, H. J. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 22420.
- (7) Kumar, S.; Nussinov, R. *Chembiochem* **2002**, *3*, 604.

P74

固体NMRによるタンパク質の構造解析に向けた ^{13}C -常磁性緩和促進の研究

○木戸浩貴¹, 田巻初¹, 江川文子², 亀田倫史³, 神谷昌克¹, 菊川峰志¹, 相沢智康¹, 河野敬一¹, 藤原敏道², 出村誠¹

¹北海道大学大学院・生命科学院

²大阪大学・蛋白質研究所

³産業技術総合研究所・生命情報工学研究センター

Structural analysis of proteins by paramagnetic relaxation enhancement of ^{13}C -NMR in solid states

○Kouki Kido¹, Hajime Tamaki¹, Ayako Egawa², Tomoshi Kameda³, Masakatsu Kamiya¹, Takashi Kikukawa¹, Tomoyasu Aizawa¹, Keiichi Kawano¹, Toshimichi Fujiwara² and Makoto Demura¹

¹Graduate School of Life Science, Hokkaido University, Sapporo, Japan.

²Institute of Protein Research, Osaka University, Suita, Japan.

³Computational Biology Research Center, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Tokyo, Japan.

Paramagnetic relaxation enhancement (PRE) provides longer distance information than NOE and spin diffusion. Thus, it is widely used for structure analysis of the biomolecules in solution NMR. Recently, ^{15}N -PRE is applied to analysis protein backbone structures by solid-state NMR. In contrast, ^{13}C -PRE has an advantage that it provides not only backbone information but also side-chain information. However, qualitative analysis of ^{13}C -PRE in fully ^{13}C labeled proteins is difficult due to spin-diffusion. In order to solve this problem, we aimed to develop a method for the measurement of ^{13}C -PRE and the estimation of distance in solid-state NMR. We will discuss the validity of distances derived from ^{13}C -PRE method.

【緒言】

常磁性緩和促進(PRE)はNOEやスピン拡散に比べ、より遠距離の構造情報を得ることが可能である。そのため溶液NMRではタンパク質などの生体高分子の構造の決定や精密化に広く利用されている。近年、固体NMRにおいても、 Cu^{2+} による ^{15}N の縦緩和促進の定量解析によって、タンパク質の主鎖構造が決定可能であることが示された¹。その一方、 ^{13}C を用いたPREでは ^{15}N では得られない側鎖の情報が得られる利点があるが、 ^{13}C 均一標識分子ではスピン拡散の影響を受けやすく、 ^{15}N と同様の手法ではPREの定量的な解析が困難である。そこで本研究では固体NMRによる ^{13}C -PREの定量的な測定法の開発を目的とし、構造が既知のタンパク質GB1を用いて研究を行った。

固体NMR, 常磁性緩和促進

○きどころき, たまきはじめ, えがわあやこ, かめだとし, かみやまさかつ, きくかわたかし, あいざわともやす, かわのけいいち, ふじわらとしみち, でむらまこと

【実験手法】

大腸菌で調製した ^{13}C , ^{15}N 均一標識GB1のE19C変異体に Mn^{2+} または Zn^{2+} を付加したN-[S-(2-pyridylthio)cysteamyl]EDTAを常磁性/反磁性タグとしてC19のチオール基に結合させた^{1,2}。その後、分子間PREを抑制するため均一標識GB1:非標識GB1=1:3で希釈し、バッチ法で微結晶を調製した。この試料を3.2mmローターに詰め、600 MHz固体NMR装置 (Varian社製Infinity plus) を用いて測定を行った。定量的な解析のため、 ^{13}C -PRE効果のみを観測する必要がある。そこで、 ^{13}C -PRE効果の時間依存性を測定する目的で、2次元 ^{13}C - ^{13}C DARR法パルスシーケンスの交差分極 (CP) 後に37.5 kHzのスピロック期を導入した。緩和速度 $R_{1\rho}$ はスピロック時間を0, 0.6, 1.0, 2.1 msと変えて測定し、算出した。試料回転速度は12.5 kHz、CP接触時間は160 μs 、DARR混合時間は20 ms、測定温度は -10°C で行った。

【結果・考察】

2次元 ^{13}C - ^{13}C DARR法によるスペクトルの解析の結果、常磁性タグ (Mn^{2+}) の導入によるPRE効果によって、部位特異的に主鎖・側鎖の信号強度が減弱していることが確認された (Fig. 1)。これらの信号から得られた減衰曲線を指数関数でフィッティングを行い、緩和速度を算出し、Solomon-Bloembergen 式から距離を求め、結晶構造の既知の距離と比較を行った。そのうち、 ^{13}C -PRE効果により信号が消失した原子は15個あり、信号が分離されていて定量的な解析ができた原子は60個あった。解析から得られた距離は、既知の構造の距離との相関があり、誤差はおおよそ $\pm 5\text{\AA}$ だった。また、 C' や C_α など主鎖の距離だけでなく、 ^{15}N -PREの測定から得ることのできない C_β や C_γ などの側鎖の距離も得ることができた。

【結論】

以上のことから、スピロックを導入したDARR法によって ^{13}C -PREを定量的に解析することに成功した。また、 ^{13}C 核を使った常磁性緩和解析によって主鎖だけでなく側鎖の距離情報を得ることができた。

【参考文献】

¹ Sengupta I., *et al.*, Nat. Chem., 2012, **4**, 410-417.

² Nadaud P. S., *et al.*, J. Am. Chem. Soc., 2009, **131**, 8108-8120.

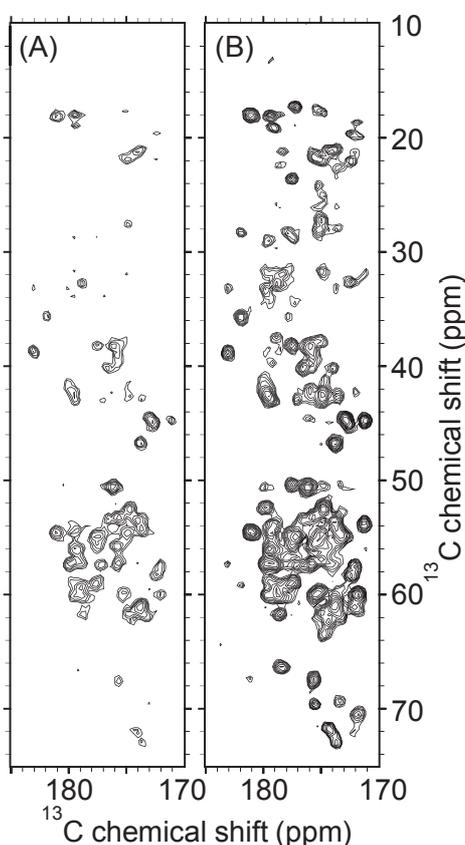


Fig.1 2D ^{13}C - ^{13}C correlation spectra of GB1. C' region of 19EDTA- Mn^{2+} sample (A) and 19EDTA- Zn^{2+} (B).

P112

MAS 下の新 CP 法：異方性による低効率化の克服

○神原孝之¹, 村上美和², 野田泰斗¹, 武田和行¹, 竹腰清乃理¹¹京都大学大学院理学研究科²物質・材料研究機構（現職は京都大学 産官学連携本部）**Novel cross-polarization scheme under magic-angle spinning that can overcome the degrading effect by anisotropies**○Takayuki Kamihara¹, Miwa Murakami², Yasuto Noda¹, Kazuyuki Takeda¹, and K. Takegoshi¹¹Division of Chemistry, Graduate School of Science, Kyoto University, Kyoto, Japan.²National Institute for Materials Science, Ibaraki, Japan.

Cross-polarization (CP) is one of the most commonly used solid-state NMR techniques. One well-known problem for CP is as follows. For nuclei with large chemical shift anisotropy and/or quadrupolar interaction, it is known that spin lock under magic-angle spinning (MAS) becomes difficult, leading to inefficient CP.

In this work, we develop a new CP sequence effective for nuclei with large anisotropy. Its key feature is that the new CP does not use spin locking as CP occurs among the Z magnetization modulated by the combination of two pulses with the opposite phases each other. By alternating the phase of the pair pulse synchronous with MAS, one can realize CP, thus avoiding degradation by anisotropic interactions. The CP efficiency of this new pulse sequence is demonstrated on ¹⁹F-¹³C and ¹H-¹³C systems.

1、序論

交差分極(Cross Polarization, CP)は、固体試料中の2つの核種間の磁化移動によって、低感度核の信号強度を増大させる手法である。一般には、磁化をラジオ波 (RF) が作る磁場の方向にとどめておくスピロックと、Hartmann-Hahn (H-H) 条件を満たすことが必要とされている。しかし、異方性の大きな核に対して magic-angle spinning (MAS) 下で CP を行う場合には、RF の照射強度が不十分であると異方性の MAS による時間変化のためにスピロック効率が低下するため、CP 効率が低下してしまうことが以前の研究からわかっている^{[1]-[3]}。ゆえにこれらの核で CP を行う場合には、MAS で方向が時間変化するスピロック磁場に断熱的に磁化を追従させるために極端に弱い RF 強度を用いるか、異方性を無視できるほど強い RF 強度を用いる必要がある^{[1][2]}。前者では CP 効率が低く、後者では強い RF 照射により生じた熱が試料の劣化をもたらす可能性がある。本研究では、異方性による CP 効率の低下を克服する新たな CP 法を開発しその効果を検証する。

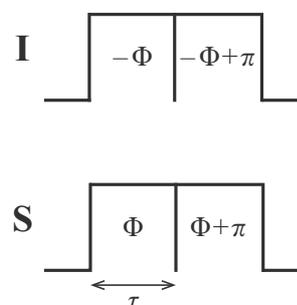


Fig. 1 The pulse unit used in a new CP sequence

交差分極, 化学シフト異方性, ¹⁹F

○かみはらたかゆき, むらかみみわ, のだやすと, たけだかずゆき, たけごしきよりのり

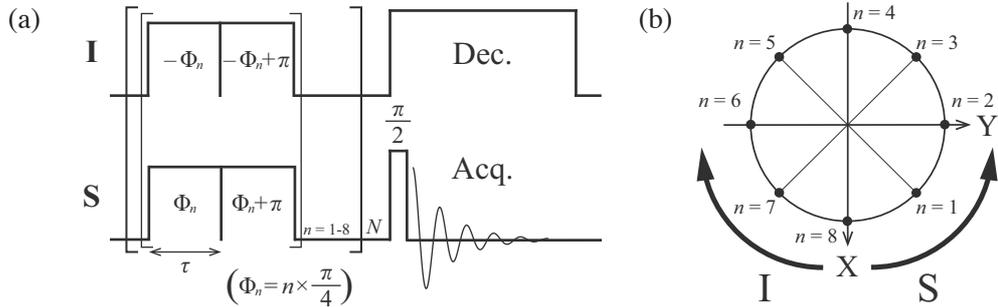


Fig. 2 (a) Pulse sequence for the new CP sequence. (b) A diagram of the direction of phase rotation in the new CP sequence.

今回提唱する新CP法ではスピンロックパルスを用いず、代わりに位相を π だけ変えた2パルスの組 (**Fig. 1**) を組み合わせたものを用いる。従来法では異方性によるRFオフセットの時間変化のためにスピンロック効率が低下していたが^[3]、本手法ではCPは縦磁化間で行われるために異方性の時間変化は原理的には影響しない。また、RFパルスを位相反転したペアで用いるために、RF磁場の不均一性の影響を抑えることができる。

以前に、位相反転した2 π パルスを組み合わせたCP法としてcomposite 0° pulse cross-polarization (COMPOZER)^[4]を提示し、静止試料に対してその有効性を確認していたが、COMPOZERではMASによって双極子相互作用が時間依存性を持つことによりCP効率が大きく損なわれてしまっていた。新CP法はその弱点を克服しており実際に以下に示すように、MAS条件下での有効性を¹H-¹³C間、¹⁹F-¹³C間で実証することができた。以降、この新しいCP法をCOMPOZER with Z rotation (CPZ)法と呼ぶ。

2. 理論

COMPOZERではI-S間の双極子相互作用の平均ハミルトニアンとして $\bar{H}_d = d(I_+S_- + I_-S_+)$ 、つまり異種核間flip-flop相互作用を得て、縦磁化間でCPを実現していた。 d は双極子相互作用の空間部分であるが、MAS下では時間依存し($d \rightarrow d(t)$)、平均化されてゼロになるためにCP効率は低下していた。そこで平均ハミルトニアンのスピンの部分に z 回転を行うことを考えた。

$$\tilde{H}_d = d(t) \cdot (I_+S_- + I_-S_+) e^{-i\omega t} \quad (1)$$

z 方向の回転であるために縦磁化間の交差分極を妨げることはせず、スピンの部分の z 回転とMAS回転による $d(t)$ の干渉によりMAS下でCPができると考えた。 z 軸周りの回転はRFパルスの照射位相を回転させることによって実現した。すなわち、RFパルスの照射位相 Φ_n を $\Phi_n = n \times \pi/4$ とすると、時間推進演算子 $U_0^{(n)}(t)$ は、

$$U_0^{(n)}(t) = e^{+i\frac{n\pi}{4}I_z} e^{-i\omega_1 I_x t} e^{-i\frac{n\pi}{4}I_z} e^{-i\frac{n\pi}{4}S_z} e^{-i\omega_1 S_x t} e^{+i\frac{n\pi}{4}S_z} \quad (2)$$

と表される。これを双極子相互作用ハミルトニアンに作用させると、

$$\begin{aligned} \tilde{H}_d^{(n)}(t) &= \{U_0^{(n)}(t)\}^{-1} H_d U_0^{(n)}(t) \\ &= \{U_0^{(n)}(t)\}^{-1} d(t) I_z S_z U_0^{(n)}(t) \\ &= d(t) \left(I_z \cos \omega_1 t + I_x \sin \omega_1 t \sin \frac{n\pi}{4} + I_y \sin \omega_1 t \cos \frac{n\pi}{4} \right. \\ &\quad \left. + S_z \cos \omega_1 t - S_x \sin \omega_1 t \sin \frac{n\pi}{4} + S_y \sin \omega_1 t \cos \frac{n\pi}{4} \right) \end{aligned} \quad (3)$$

となる。 ω_{I1} 、 ω_{IS} はそれぞれ I スピン、S スピンのRF照射強度である。 $d(t)$ は双極子相互作用定数であり、以下のように表せる。

$$d(t) = C_1 \cos \omega_r t + C_2 \cos 2\omega_r t \quad (C_1, C_2 : const.) \quad (4)$$

ω_r はMAS周波数に対応している。式(3)の括弧内を整理すると、

$$\begin{aligned} \tilde{H}_d^{(n)}(t) = d(t) \times \{ & a_{zz}^{(n)} I_z S_z (\cos \Sigma t + \cos \Delta t) \\ & + (a_{xx}^{(n)} I_x S_x + a_{xy}^{(n)} I_x S_y + a_{yx}^{(n)} I_y S_x + a_{yy}^{(n)} I_y S_y) (\cos \Sigma t - \cos \Delta t) \\ & + (a_{zx}^{(n)} I_z S_x + a_{zy}^{(n)} I_z S_y) (\sin \Sigma t + \sin \Delta t) \\ & + (a_{xz}^{(n)} I_x S_z + a_{yz}^{(n)} I_y S_z) (\sin \Sigma t - \sin \Delta t) \} \end{aligned} \quad (5)$$

となる。ここでは $a_{ij}^{(n)}$ ($i, j = x, y, z$) は時刻 t に無関係な定数とし、 $\Sigma = \omega_{I1} + \omega_{IS}$ 、 $\Delta = \omega_{I1} - \omega_{IS}$ とおいた。**Fig. 2**に示すように、RFパルスの照射位相を I スピンと S スピンで逆方向に回転させるようにした。パルスブロックを8個組み合わせたものに対し、パルス幅を τ として平均ハミルトニアンを求めると、

$$\bar{\tilde{H}}_d \propto f(\Sigma, \Delta, \tau) (I_+ S_- + I_- S_+) \quad (6)$$

のようになり、flip-flop項が現れる。このハミルトニアンにより、MAS下で I スピンの縦磁化が S スピンの縦磁化に移る。

3. 実験・考察

3-1. ^1H - ^{13}C 間のCP効率の比較

試料としてアダマンタンを用い、MAS周波数を20 kHz、CPZに用いるパルス幅を6.25 μs として、測定を行った。この幅はMAS周期の1/8に相当し、これにより式(5)中のsinを含む項が相殺される。この条件で平均ハミルトニアンを計算すると、

$$\bar{\tilde{H}}_d \propto \int_0^{2\tau} (\cos \Delta t - \cos \Sigma t) (C_1 \cos \omega_r t + C_2 \cos 2\omega_r t) dt \times (I_+ S_- + I_- S_+) \quad (7)$$

となり、ハミルトニアンの大きさが Σ と Δ に依存することがわかる。**Fig. 3**にアダマンタンで ^1H - ^{13}C 間のCPプロファイル (^{13}C のRF強度を50 kHzと一定にして、CP信号強度の ^1H のRF強度に対する依存性を見たもの)を示す。通常のCP (三角、点線)と比較すると、H-H条件である $\Delta = 0$ の位置を中心とした信号の増大が確認でき、さらにH-H条件からのズレにも強いことがわかる。通常のCPで効率が悪いのはRF磁場の不均一性のためだと考えられ、CPZは予想通りRF磁場の不均一性に強いことが示されている。

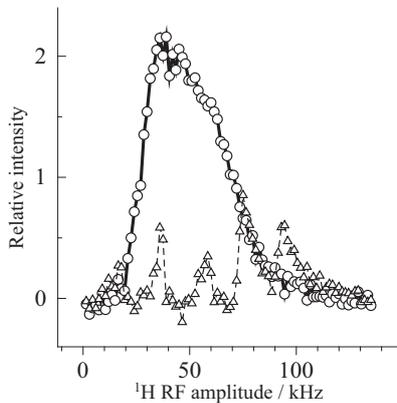


Fig. 3 CP profiles of adamantane for CPZ (circles and bold line) and conventional CP sequence (triangles and dashed line). RF amplitude for ^{13}C channel was ca. 50 kHz in both experiments. The signal intensities were normalized by the intensity in its thermal equilibrium.

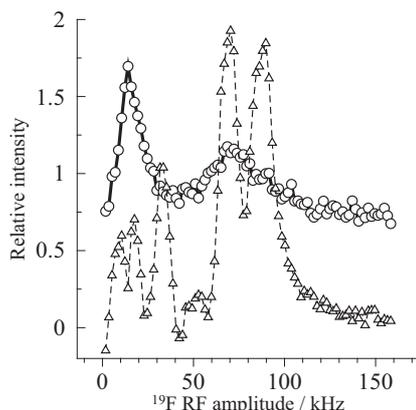


Fig. 4 CP profiles of poly(tetrafluoroethylene), $(-\text{CF}_2)_n$, for CPZ (circles and bold line) and conventional CP sequence (triangles and dashed line). RF amplitude for ^{13}C channel was ca. 50 kHz in both experiments. The signal intensities were normalized by the intensity in its thermal equilibrium.

3-2. ^{19}F - ^{13}C 間のCP効率の比較

異方性の影響を検証するために、化学シフト異方性の大きな ^{19}F に対してCPZを用いた。試料としてテフロン $(-\text{CF}_2)_n$ の粉末試料を用いて、従来のCPとCPZの効率比較を行った。ここでは $\Delta=0$ でのマッチング条件ではなく、いわゆるサイドバンドマッチングがおこる照射条件を採用した。これは通常のCPではRF強度を大きくする必要があるが、CPZでは弱いRF条件でもCPを起こすことができることを示すためである。

MAS周波数を20 kHz、パルス幅を12.5 μs として、測定を行った(**Fig. 4**)。この幅はMAS周期の1/4に相当し、これにより式(5)中の \sin を含む項が相殺される。またこの条件では、 $\Delta=0$ のときに $\cos\Delta t$ の項がゼロになるので、照射強度が等しい点では原理的にはCPが起らない。全体の信号強度が底上げされているのは、 ^{19}F 磁化が回復する間に回復した ^{13}C の縦磁化が足し合わされているためである。通常のCPでは効率が悪くなるRF強度の小さい領域でも、CPZでは十分なCP効率を確保できていることが示された。RF強度が大きい領域 (~80 kHz) での効率はCPZのほうが悪い。この理由はまだ判っていないが、この領域でパルス幅が 2π パルス近くになっていることが関係しているのではないかと考え、現在検討中である。

4. まとめ

MAS条件下において有効な新しいCP法(CPZ)を開発した。 ^1H - ^{13}C 間のCP実験から、CPZはH-H条件からのズレに強く、RF磁場の不均一性の影響が少ないことが示された。また、 ^{19}F - ^{13}C 間のCP実験から、通常のCPではスピロック効率が落ちるためCP効率が低下していたRF強度の小さな領域においても、RF強度の大きな領域とほぼ変わらない程度のCP効率を達成できた。

5. 参考文献

- [1] Vega, A. J., *J. Magn. Reson.* **1992**, 96, 50-68.
- [2] Vega, A. J., *Solid State Nucl. Magn. Reson.* **1992**, 1, 17-32.
- [3] 神原ら、第51回NMR討論会要旨集 **2012**, P71, pp. 306-307.
- [4] Fukuchi, M.; Ramamoorthy, A.; Takegoshi, K., *J. Magn. Reson.* **2009**, 196, 105-109.

P40

TRAF6を標的としたタンパク質間相互作用阻害剤の探索および構造解析

○守谷 潤¹, 竹内 恒², 田井 健二¹, 米田 直樹¹, 新井 謙三³,
小林 直樹⁴, 福西 快文², 井上 篤¹, 木原 美穂¹, 村上 拓己⁴,
千葉 健一¹, 嶋田 一夫⁵

¹エーザイ株式会社, ²産業技術総合研究所, ³H3 Biomedicine, ⁴サン
プラネット株式会社, ⁵東京大学大学院 薬学系研究科

Development and Structural Analysis of a Protein-protein Interaction Inhibitor Targeting TRAF6

○Jun Moriya¹, Koh Takeuchi², Kenji Tai¹, Naoki Yoneda¹, Kenzo Arai³, Naoki Kobayashi⁴,
Yoshifumi Fukunishi², Atsushi Inoue¹, Miho Kihara¹, Takumi Murakami⁴, Kenichi Chiba¹,
and Ichio Shimada⁵

¹Eisai Co., Ltd., ²National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, ³H3
Biomedicine Inc., ⁴Sunplanet Co., Ltd., ⁵Graduate School of Pharmaceutical Sciences, the
University of Tokyo

Tumor Necrosis Factor (TNF) receptor associated factor 6 (TRAF6) is an intracellular signal transducer for the TNF receptor superfamily, which was reportedly shown as a promising target for the treatment of rheumatoid Arthritis. We identified initial hits for small-molecule inhibitors of TRAF6-receptor interaction through *in silico* screening. Subsequently, the hit analogues were synthesized and finally we've got the most potent inhibitor. The NMR interaction analyses (INPHARMA and DIRECTION) along with the docking and MD simulation revealed the structural characteristic of the protein-compound interaction, which satisfied the structure-activity-relationship and useful for the further optimization of the compounds.

TRAF6はTNF受容体superfamilyなどのシグナル伝達を仲介するアダプタータンパク質である。TRAF6を介する細胞内シグナル伝達は、免疫応答、炎症反応、骨再形成などを誘起することが知られており、TRAF6-受容体相互作用はリウマチ治療の有望な標的となっている。しかし、TRAF6-受容体の相互作用表面は広く平坦であり、弊社保有ライブラリを用いたHigh throughputs screeningでは阻害活性を有する低分子化合物を同定するには至っていない。本研究においては、より広範な化合物空間を探索するため*in silico* スクリーニングを利用したヒット化合物の探索と合成展開を行い、高親和性化合物を得ることに成功した。また、NMR相互作用解析と計算機科学的手法の融合により、構造活性相関を満たし、さらなる合成展開の可能性を示唆する有効なTRAF6との複合体モデルを構築できた。

Drug discovery, Protein protein interaction inhibitor, Structural analysis

○もりや じゅん, たけうち こう, たい けんじ, よねだ なおき, あらい けん
ぞう, こばやし なおき, ふくにし よしふみ, いのうえ あつし, きはら みほ, む
らかみ たくみ, ちば けんいち, しまだ いちお

シード化合物 (ER-000564989-000) の発見および合成展開

TRAF6の結晶構造に対して100万化合物の*in silico*スクリーニングを行った。高スコア化合物のうち、SPRにてTRAF6-受容体 (RANK) ペプチド阻害作用、およびマウス骨髄細胞の破骨細胞への分化阻害を示した4化合物をヒットとした。これら4化合物をそれぞれTRAF6に添加したところ、全ての化合物についてTRAF6のNMRスペクトルパターン変化が観測された。しかし、ER-000564989-000を除く3化合物については同時にTRAF6の凝集を誘起し、特異的な相互作用阻害剤開発という観点から不適格であると判断し、ER-000564989-000をシード化合物として選択した。

ER-000564989-000について活性向上の余地があると考えられたため合成展開を行った。その結果、最終的に高親和性化合物ER-000520940-000を得ることに成功した。本化合物は骨髄細胞への分化阻害アッセイ系においてもER-000564989-000に比べ活性向上が認められた。

NMRデータに基づいたTRAF6-ER-000520940-000の構造推定

化学シフト摂動法および変異実験の結果から、ER-000520940-000結合部位はRANK結合部位と重複することが示唆された。そこで結合部位情報を基にドッキング計算を行ったところ、化合物が互いに反対の向きに結合した2種の構造が得られた。TRAF6-RANK-ER-000520940-000を用いたINPHARMA実験は、そのうち一方を支持するNOEピークを与えたことから、複合体構造を一義的に決定することが出来た (Figure a, b)。本構造をさらに精密化するために、TRAF6-ER-000520940-000間のDIRECTION実験を行い、実験結果を拘束条件としたドッキング計算により最終的な複合体モデルを得た (Figure c)。複合体構造中において化合物の一部はRANKペプチドと同様の相互作用を形成していたが、RANKの利用していないサイトに対する相互作用も確認された。また、化合物の相互作用は、合成展開の過程で得られたSAR (Structure Activity Relationship) を説明するものであった。今回得られた構造を活用することにより、更なる高活性化合物の構築が可能となる。

本研究は、平坦な表面を有するタンパク質に対する阻害剤探索の戦略を提案するものであり、その中でNMRが多面的に活用できる有用な解析技術であることを示した。

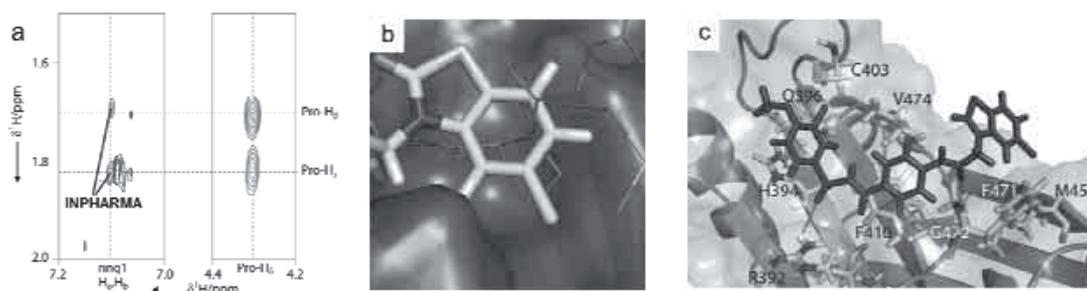


Figure.

a) NOESY spectrum of the mixture of TRAF6, RANK, and ER-000520940-000. b) TRAF6-ER-000520940-000 (stick) complex structure overlaid with RANK (line). c) Molecular surface representations of TRAF6 complexed to ER-000520940-000 obtained by docking simulation.

P10

NMRスペクトルの多変量解析によるアクリル系共重合体の一次構造解析

○百瀬 陽^{1,2}, 前田智也², 直野辰哉^{1,2}, 浅川聖子², 坂尾竜一²,
押村美幸², 平野朋広², 右手浩一²

¹ 三菱レイヨン ² 徳島大院ソシオテクノサイエンス研究部

Analysis of Primary Structures of Methacrylate Copolymers and Terpolymers by Multivariate Analysis of ¹³C NMR Spectra

○Hikaru MOMOSE^{1,2}, Tomoya MAEDA², Tatsuya NAONO^{1,2}, Seiko ASAKAWA², Ryuichi SAKAO², Miyuki OSHIMURA², Tomohiro HIRANO², and Koichi UTE²

¹ Mitsubishi Rayon Co. Ltd., Hiroshima, Japan.

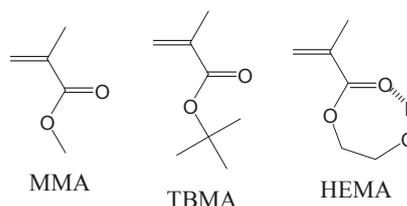
² Department of Chemical Science and Technology, The University of Tokushima, Tokushima, Japan.

¹³C NMR spectra of copolymers exhibit complicated splitting due to comonomer sequences and tacticities, and thus assignment of individual resonance peaks is troublesome. In the present paper, multivariate analysis was applied to get quantitative information about primary structures, such as chemical composition, comonomer sequence and tacticity, from ¹³C NMR spectra of copolymers and terpolymers of methyl methacrylate, *tert*-butyl methacrylate, and 2-hydroxyethyl methacrylate without making assignment for the resonance peaks.

【緒言】 機能性を有する高分子材料には多成分共重合体がいられることが多い。これらの共重合体の分子量, 組成, 連鎖構造などの構造因子を詳細に解析することは, 材料の性能向上に不可欠である。NMRは高分子の構造解析に用いられる手法の1つである。しかし一般に, 多成分共重合体のNMRスペクトルは, 組成, モノマー連鎖および立体規則性などを反映して複雑に分裂しており, 直接解析することは難しい。

多変量解析は, 複雑かつ大量の情報を, いくつかの有用な情報へと変換する強力な手法である。例えば, 合成高分子に関しては, 近赤外, 赤外およびラマンスペクトルへの適用が数多く知られている^[1]。また, いわゆるメタボロミクスと呼ばれる生物代謝産物の網羅解析では, 新薬の開発などで実用化が図られている^[2]。

そこで本研究では, 多変量解析をメタクリル酸メチル(MMA), *tert*-ブチル(TBMA), および2-ヒドロキシエチル(HEMA)からなる二元および三元共重合体の¹³C NMRスペクトルへ応用し, 複雑に分裂したスペクトルの帰属を行うことなく, 共重合組成, モノマー連鎖および立体規則性に関する定量的な情報の取得を試みた。



Scheme 1. Chemical structures of monomers.

Multivariate analysis, Methacrylate copolymer, Primary structure

○ももせ ひかる, まえだ ともや, なおの たつや, あさかわ せいこ, さかおり ゆういち, おしむら みゆき, ひらの ともひろ, うて こういち

【実験】 本研究で用いた試料はすべて、乳酸エチルのモノマー混合物20 wt%溶液中、フリーラジカル重合で合成した。各種試料をそれぞれ8 wt/vol%の CDCl_3 溶液（二元共重合体の場合）または $\text{CDCl}_3/\text{DMSO-}d_6$ [4/6 (mol/mol)] 混合溶液（三元共重合体の場合）とし、10 mmφ THプローブを装備したJEOL JNM- ECX400を用いて55 °Cで測定した。スペクトルの積算回数は5000回、パルス幅は7.5 μs (45°), 繰り返し時間は2.73 sとして、 ^{13}C NMRスペクトルを得た(Figure 1)。多変量解析にはJEOL Alice2 ver.5 for metabolome ver 1.6とPattern Recognition SystemsのSirius ver. 7.0を用いた。

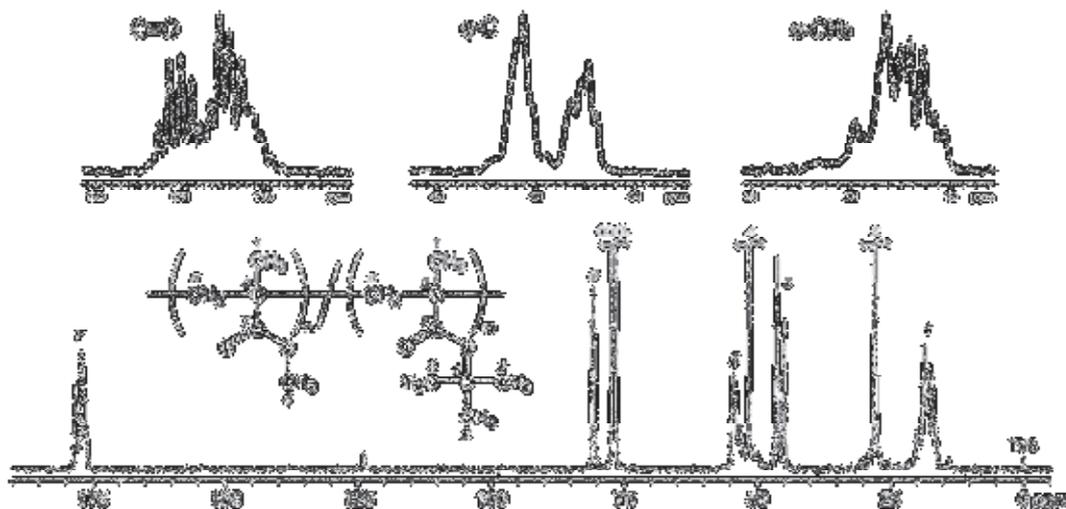


Figure 1. 100 MHz ^{13}C NMR spectrum of poly(MMA-co-TBMA) with 55.5 mol% in TBMA units, as measured in chloroform-*d* at 55 °C.

【MMA-TBMA二元共重合体の共重合組成とモノマー連鎖解析】 MMAとTBMAの各単独重合体(PMMA, PTBMA), 組成が異なるPMMAとPTBMAの混合物9種, 組成や収率が異なるMMA-TBMA共重合体16種の合計27種の試料を準備した。 ^{13}C NMRスペクトルの中で, 2つのモノマー単位の共通骨格であるカルボニル炭素(175.0–179.0 ppm), 主鎖4級炭素(44.1–48.1 ppm)および α -メチル炭素(15.1–23.1 ppm)の各共鳴領域を0.25 ppm間隔でバケット積分し, 主成分分析(PCA)を行った。Figure 2にスコアプロットを示す。

単独重合体とこれらの混合物の第1主成分(PC1)のスコアはTBMA組成の増加とともに単調に減少した。共重合体のPC1スコアも同様の傾向を示した。そこで, PC1スコアとTBMA組成の相関を調べたところ, 相関係数 $R^2 = 0.998$ の直線となることから, PC1スコアは組成を反映することがわかった。単独重合体2種とこれらの混合物9種を検量用データとした部分最小二乗回帰(PLSR)を行い, 共重合体16種のTBMA組成を決定することを試みた。その結果, 別途 ^1H NMR測定から求めたTBMA組成に対して, $R^2 = 0.997$, 相対標準偏差(RSD) = 3.4 %で一致した^[3]。

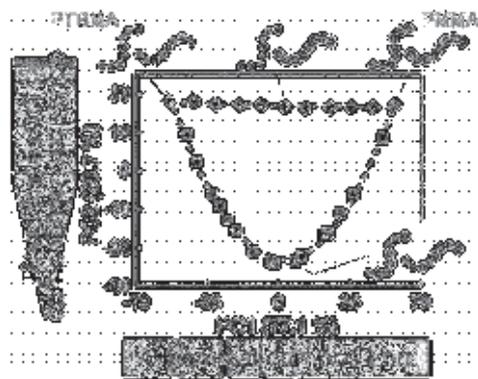


Figure 2. PCA score plots for ^{13}C NMR signals of the carbonyl, backbone quaternary and α -methyl carbons of PMMA (\blacklozenge), PTBMA (\blacklozenge), their blends (\diamond) and poly(MMA-co-TBMA)s obtained at early (\square) and late (\blacksquare) stages of copolymerization.

一方、共重合体の第2主成分(PC2)のスコアは組成が等モル付近で最小となり、組成が偏るにつれ単独重合体に近づくことから、PC2はモノマー連鎖の不連続性を反映すると考えられる。モノマー連鎖の不連続性を定量的に表す指標としてランナンバー $f_{MT}^{[2]}$ を採用し、PC2スコアと f_{MT} の関係を調べた。初期共重合体9種の仕込みモノマー組成と共重合体の組成から算出したモノマー反応性比($r_{MMA} = 0.81 \pm 0.06$, $r_{TBMA} = 1.26 \pm 0.03$)を用いて求めた f_{MT} とPC2スコアとは良い相関($R^2 = 0.996$)を示すことがわかった。また、単独重合体2種と初期共重合体9種を検量用データとしたPLSRにより、高重合率の共重合体7種のランナンバーを $R^2 = 0.997$, $RSD = 7.1 \text{ mol\%}$ の精度で予測できた^[4]。

【MMA-TBMA二元共重合体の立体規則性解析】 重合温度を -40°C から 80°C に変化させ、組成が異なるMMA-TBMA共重合体25種を準備した。バケット積分間隔を 0.05 ppm とした以外は、先述した手順と同様にしてPCAを行った。Figure 3にスコアプロットを示す。TBMA組成の増大にともない、PC1スコアが増大したため、PC1は共重合組成が反映されていることがわかった。一方、PC2スコアは、重合温度が低下するにつれて増大した。一般に、メタクリレートモノマーのラジカル重合では、重合温度の低下とともにシンジオタクチシチー（側鎖基が同じ側にあるメソ(m)連鎖に対する、異なる側にあるラセモ(r)連鎖の割合）が増大することが知られている^[5, 6]。また、モノマーの種類によらず、 r 連鎖を含むNMRシグナルが正のPC2ローディングとして観測された。これらの結果から、PC2はシンジオタクチシチーを反映していることがわかった。

そこで、Figure 3の網掛けで示した16種の共重合体を検量用データとしたPLSRを行い、残り9種の共重合体を「未知試料」として、その3連子立体規則性分率（イソタクチック mm 、ヘテロタクチック mr およびシンジオタクチック rr ）の推定を試みた。なお、共重合体の rr , mr , mm は、TBMA単位を酸加水分解の後、メチルエステル化することによりPMMAへと変換した試料の ^{13}C NMRスペクトルから求めた。その結果、PLSRで予測した rr , mr , mm は、実測値に対して $R^2 = 0.500$ (mm), 0.717 (mr), 0.825 (rr), $RSD = 26.0 \%$ (mm), 10.1% (mr), 4.3% (rr)で一致した。

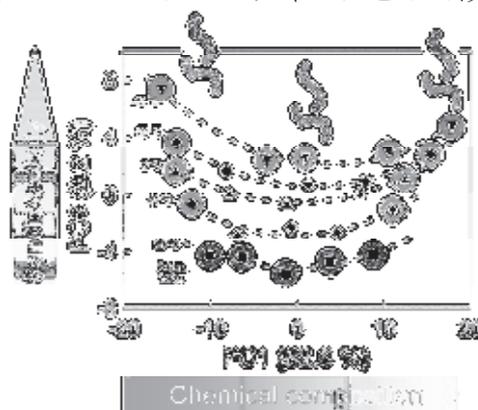


Figure 3. PCA score plots for ^{13}C NMR signals of the carbonyl, backbone quaternary and α -methyl carbons of 25 poly(MMA-co-TBMA)s polymerized at -40°C (∇), -20°C (\bullet), 0°C (\blacktriangle), 40°C (\blacklozenge) and 80°C (\blacksquare).

【MMA-TBMA-HEMA三元共重合体の共重合組成とモノマー連鎖解析】 MMA-TBMA二元共重合体の検討で用いた27種に加え、HEMAの単独重合体(PHEMA)、組成が異なる単独重合体3種の混合物25種、組成や収率が異なるMMA-HEMAおよびTBMA-HEMA二元初期共重合体各14種、組成が異なるMMA-TBMA-HEMA三元共重合体32種の合計113種を準備した。2系列の二元共重合体には、初期共重合体9種と、高重合率共重合体5種の2グループを、三元共重合体には、初期および高重合率の共重合体を16種ずつ、それぞれ準備した。 ^{13}C NMRスペクトルの中で、二元共重合体の場合と同様に、カルボニル炭素($173.0\text{--}177.0 \text{ ppm}$)、主鎖4級炭素($41.5\text{--}45.5 \text{ ppm}$)および α -メ

チル炭素(14.2–18.2 ppm)の各共鳴領域を0.05 ppm間隔でバケット積分し、データの中心化と規格化を行った後、PCAを行った。

Figure 4に三次元スコアプロットと、3つの主成分平面への投影図を併せて示す。PC1-PC2投影図で、3種の単独重合体を頂点とし、これらの混合物が面内を埋めるような三角相図が示された。この結果から、PC1とPC2のスコアの組み合わせが組成を反映することがわかった。一方、PC1-PC3およびPC2-PC3投影図では、二元あるいは三元共重合体のPC3スコアは組成が等モル付近で最大となり、組成が偏るにつれて各単独重合体に近づいた。また三次元スコアプロットは、単独重合体とそれらの混合物で構成される平面を底面とし、3系列の二元共重合体が各側面となる三角錐を形成していたことから、PC3はモノマー連鎖の不連続性を反映していると考えられる。これは、MMA-TBMA二元共重合体の解析における考え方の拡張である。そこで、MMA-TBMA二元共重合体の場合と同様に、モノマー連鎖の不連続性を定量的に表す指標として3種存在する異種2連子モノマー連鎖 f_{MT} 、 f_{TH} 、 f_{HM} の総和 $f_{2\text{-hetero}}$ を考え、PC3スコアと単独重合体3種および初期三元共重合体9種の $f_{2\text{-hetero}}$ の関係を調べた。その結果、PC3スコアは良い相関($R^2 = 0.928$)を示したことから、PC3スコアは主として $f_{2\text{-hetero}}$ を反映していることがわかった。

次に、単独重合体3種とこれらの混合物34種に3系列の二元共重合体44種を加えた81種を検量用データとしたPLSRにより、三元共重合体の組成を推定した。 ^1H NMR測定から別途求めた組成に対し、PLSRによって推定された組成は、 $RSD = 14.1\%$ (MMA), 6.5% (TBMA), 9.4% (HEMA)でそれぞれ一致した。また、上記81種の試料群を検量用データとした三元共重合体の f_{MT} 、 f_{TH} 、 f_{HM} をPLSRで推定したところ、理論値に対して、 $RSD = 19.9\%$ (f_{MT}), 12.1% (f_{TH}), 31.1% (f_{HM})でそれぞれ一致した。

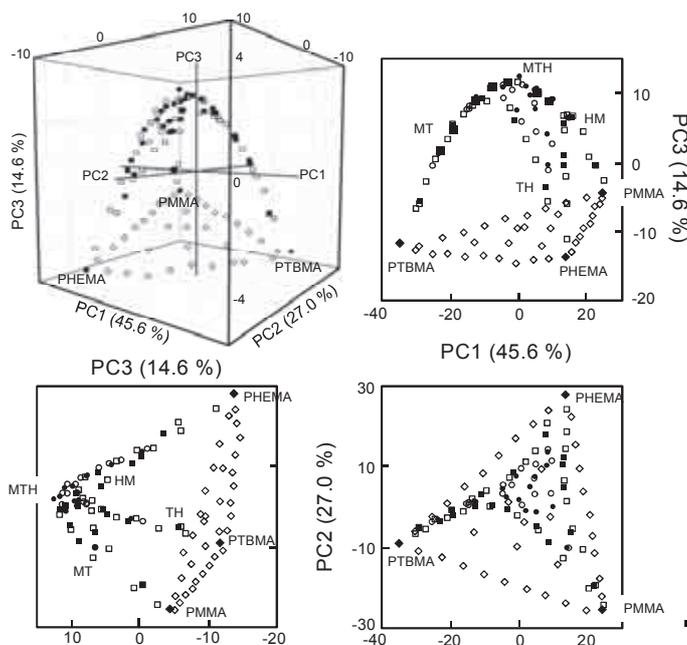


Figure 4. PCA score plots for ^{13}C NMR signals of 113 samples and its projected plots. Symbols: PMMA, PTBMA, PHEMA (\blacklozenge), homopolymer blends (\diamond), copolymers (\square , \blacksquare), and terpolymers (\bullet).

References.

- [1] 総説として, a) Chalmers, J. M., Everall, N. J. (1996) *TrAC* **15**, 18-25. b) 下山 昌彦 (1998) *日本赤外線学会誌* **8**, 78-86. [2] 総説として, a) Viant M. R., Ludwig C., Gunthe U. L. "Metabolomics, metabonomics and metabolite profiling", ed. Griffiths W. J. (2008) Cambridge: Royal Society of Chemistry; p. 44-70 [chapter 2]. b) 吉田 欣史, 久原 とみ子, 菊池 淳 (2009) *ぶんせき*, **7**, 371-378. [3] Momose, H., Hattori, K., Hirano, T., Ute, K. (2009) *Polymer* **50**, 3819- 3821. [4] Momose, H., Maeda, T., Hattori, K., Hirano, T., Ute, K. (2012) *Polym. J.* **44**, 808-814. [5] Harwood, H. J., Ritchey, W. M. (1964) *J. Polym. Sci. B: Polym. Lett.* **2**, 601-607. [6] Ito, K., Yamashita, Y. (1965) *J. Polym. Sci. A: General Papers* **3**, 2165-2187.

P14 ポリオレフィンの溶液¹³C NMRにおけるピーク強度の定量性

○茂呂ふみか¹, 佐藤浩子¹, 恩田光彦¹

¹ (株) 三井化学分析センター・構造解析研究部

Quantitative Evaluation of ¹³C NMR Peak Intensity for Polyolefin Solution

○Fumika Moro¹, Hiroko Sato¹, and Mitsuhiro Onda¹

¹ Analysis Research Lab., MITSUI CHEMICAL ANALYSIS & CONSULTING SERVICE INC.

Microstructure analysis of polyolefins is essential to understand their mechanical or environmental properties because they are widely used in our daily life as plastic materials. To obtain quantitative ¹³C NMR spectra, the inverse gated decoupling (IGD) method is frequently employed to avoid steady state NOE since the degree of enhancement vary according to different carbons in the ¹³C NMR signal intensity. The recycle time is usually set to three times of the longest T_{1C} in the sample for 45 degree pulse. For natural abundance of ¹³C nuclei, however, it is time consuming to obtain the quantitative ¹³C NMR. Thus, complete ¹H decoupling (CPD) method is still widely employed for engineering purpose by carefully choosing signals for quantification. In this work, we examined several NMR parameters for conventional CPD and IGD sequences to achieve ¹³C NMR analysis quantitatively. Quantitative DEPT with alternative enhancement by polarization transfer is also discussed.

[背景・目的]

¹³C NMR法は、ポリオレフィンの一次構造解析（組成、連鎖分布、立体規則性等）に広く応用されている。¹³C NMRスペクトルでは、インバースゲートデカップリング法を用いて測定（以下IGDと記載）することにより、炭素核ごとに異なるNOEによる感度増強を除いて定量解析する方法が提案されている¹⁾。しかしながら、¹³C核は感度が低いことから、単位時間当たりの積算効率を稼ぐために45°パルス（一般に、繰り返し時間は最長 T_{1C} の3倍程度に設定）を用いても、ポリオレフィンの微細構造解析には非常に長い測定時間が必要となる。このため、¹H核をスピンドカップリングした測定（以下CPDと記載）でNOEによる感度増強のもと、NOEが同等で緩和時間の短いシグナルを選択することで定量されてきた²⁾。

機能性を向上するため様々なポリマーが開発される中で、新たなポリマー系について、その都度最適な測定条件を確認するのは非常に手間である。全ての炭素シグナルの定量性が確保できれば、より精度よく、より簡便にポリオレフィンの一次構造情報が得られると期待される。

これらの状況から、今回、¹³C NMRのピーク強度の定量性について検討を実施した。従来用いられてきたCPDおよびIGDに加え、分極移動による感度増強が期待できるQuantitative DEPT³⁾による¹³C NMR測定を実施した。

Polyolefin, ¹³C NMR, Quantitative

○ もろふみか, さとうひろこ, おんだみつひこ

[実験]

SCIENTIFIC POLYMER PRODUCTS, INC.より入手したポリプロピレン(PP)、ポリ 4-メチル-1-ペンテン(P4MP)を重水素化テトラクロロエタンに 10%(w/v)で加熱溶解し、測定試料とした。

[結果]

Table 1 に PP および P4MP の T_{1C} 、 T_{1H} 、NOE を側鎖 CH_3 (最長 T_1) と主鎖 CH_2 (最小 T_1) を抜粋して示した。

Table 1. T_{1C} , T_{1H} and NOE factor for PP and P4MP

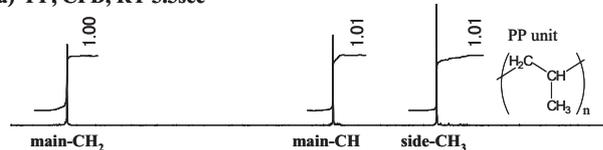
Sample	side chain CH_3			main chain CH_2		
	T_{1C}/s^a	T_{1H}/s^a	NOE factor ^b	T_{1C}/s^a	T_{1H}/s^a	NOE factor ^b
PP	2.24	1.08	2.7	0.82	0.61	2.7
P4MP	1.60	1.03	2.5	0.27	0.45	2.1

^a Relaxation time obtained by inversion recovery method.

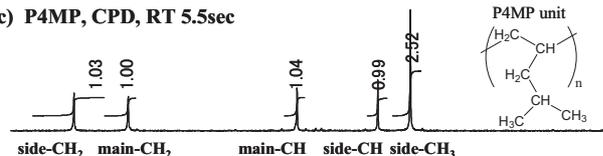
^b NOE factors were determined from comparison of signal intensities with complete ¹H decoupling (CPD) or inverse gated decoupling (IGD) during the recycle time.

Fig.1(a)および(b)に PP および P4MP の 45° パルス、繰り返し時間 5.5 秒、CPD の ¹³C NMR スペクトルを示す。この条件化で PP の各炭素のピーク強度はおおむね炭素数に比例するが、P4MP では側鎖 CH_3 のピーク強度が大きい。これは、P4MP では側鎖 CH_3 基の NOE(2.5) が、他の炭素核の値 (NOE=2 程度) よりも大きいためと考えられる。そこで IGD を用いた ¹³C NMR 測定を行い、強度比を確認した。しかしながら、側鎖 CH_3 の相対ピーク強度は 2.52→2.32 に減少したものの、炭素数の相対値から予想される理論値 2 よりも、大きい値となった(Fig. 1(d))。繰り返し時間を 20 秒と十分長く取ると、transient NOE が抑制され、定量的なピーク強度が得られた(Fig. 1(e))。当日は、CPD および IGD 測定の検討結果に加え、分極移動で感度が増強される Quantitative DEPT による ¹³C NMR の定量性についても、検討した結果をあわせて報告する。

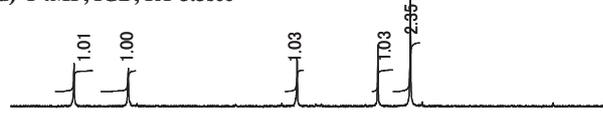
(a) PP, CPD, RT 5.5sec



(c) P4MP, CPD, RT 5.5sec



(d) P4MP, IGD, RT 5.5sec



(e) P4MP, IGD, RT 20sec

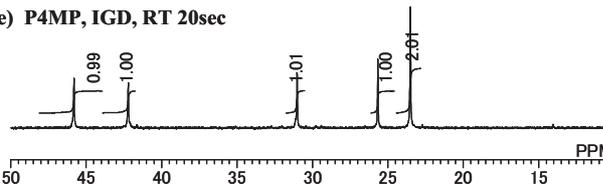


Fig.1 Solution ¹³C NMR spectra of (a) polypropylene (PP) with complete ¹H decoupling (CPD) and 5.5s of recycle time (RT), (b) poly 4-methyl-1-pentene (P4MP), CPD and 5.5s of RT, (c) P4MP with inverse gated decoupling (IGD) and 5.5s of RT, and (d) P4MP, IGD and 20s of RT.

[参考文献]

- 1) P. J. Adriaensens et al., *Polymer*, **44**, 3483-3489 (2003)
- 2) Y. Zhang, *Polymer*, **45**, 2651-2656 (2004)
- 3) B. Jing et al., *Anal. Chem.*, **80**, 8293-8298 (2008)

P64

脂質二重膜再構成 H^+ -ATP合成酵素subunit *c*-ringの固体高分解能NMR法による構造決定

○戸所泰人^{1,2}, 姜秀珍³, 湯面郁子¹, 岩崎郁¹, 鈴木俊治^{4,5}, 吉田賢右^{4,5}, 藤原敏道¹, 阿久津秀雄^{1,3}

¹阪大・蛋白研, ²阪大・理, ³ソウル大学, ⁴東工大・資源研, ⁵京産大・総合生命

Structure determination of H^+ -ATP synthase subunit *c*-ring reconstituted into lipid bilayer by solid-state NMR

○Yasuto Todokoro^{1,2}, Su-jin Kang³, Ikuko Yumen¹, Iku Iwasaki¹, Toshiharu Suzuki⁴, Masasuke Yoshida^{4,5}, Toshimichi Fujiwara¹, Hideo Akutsu^{1,3}

¹Institute for Protein Research, Osaka University, ²Department of Science, Osaka University, ³Department of Biophysics and Chemical Biology, Seoul National University, ⁴Chemical Resources Laboratory, Tokyo Institute of Technology, ⁵Department of Molecular Bioscience, Kyoto Sangyo University

A rotary motor ATP synthase is located in bacterial plasma membranes, thylakoid membranes of chloroplasts, and mitochondrial inner membranes. F-type ATP synthase from a thermophilic *Bacillus* PS3 (TF_0F_1 -ATP synthase) is one of them. TF_0 subunit *c* (TF_0c) consists of 72 amino acids, and forms an oligomeric ring, which acts as a proton motor. The proton-transfer mechanism has not been understood in detail however several structures of *c*-ring have been determined in crystals. Thus, we determined the structure of the TF_0c -ring reconstituted into liposomes to elucidate the proton-transfer mechanism by solid state NMR.

H^+ -ATP合成酵素は生体エネルギー変換系の最終段に位置する巨大膜タンパク質複合体であり、真核生物ではミトコンドリア内膜に、バクテリアでは細胞膜に存在する。ATP合成酵素は、生体膜を介した水素の電気化学的ポテンシャルを利用して、ADPとリン酸からATPを合成する。バクテリアでは、主に $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$ のサブユニットからなる膜表在性の F_1 と ab_2c_{8-15} のサブユニットで構成される膜内在性 F_0 から構成され、サブユニット c は複数集まってring構造を形成している。本研究では、好熱菌PS3由来ATP合成酵素 F_0 のサブユニット c -ring (以下 TF_0c -ring) に注目した。 c -ringは、生物種によってring構造を構成するオリゴマーの数が異なるが、プロトン輸送によるringの回転は共通している。近年、X線結晶構造解析により界面活性剤中のring構造が幾つか報告されたが、脂質膜中の構造は全く報告されておらず、回転メカニズムの詳細はいまだ解明されていない。そこで、回転メカニズム解明に向けて、生体内の環境に近い脂質膜中での TF_0c -ringの構造決定を固体NMRによりおこなった。

試料は大腸菌大量発現系により¹³C,¹⁵N均一およびリバースラベル法による部分標識 TF_0c -ringを計4種類調製した。界面活性剤を用いてインタクトな TF_0c -ringを精製し、

固体NMR, ATP合成酵素, 膜蛋白質

○とどころやすと, かんすじん, ゆめんいくこ, いわさきいく, すずきとしはる, よしだまさすけ, ふじわらとしみち, あくつひでお

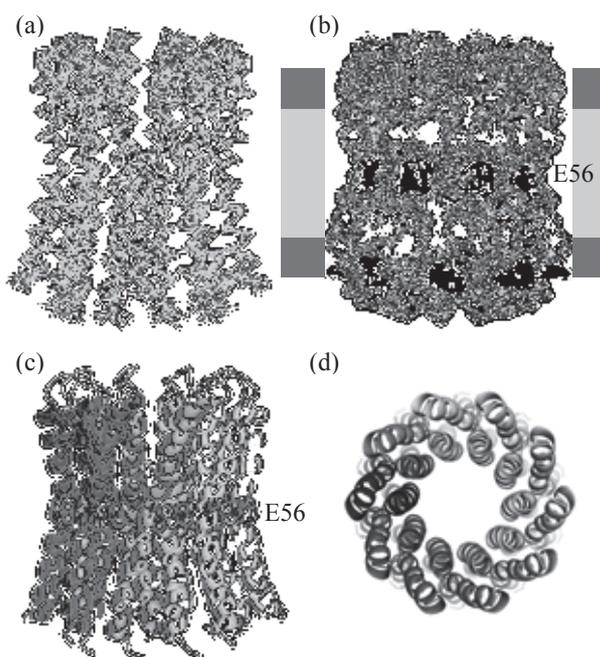


Fig. 1 Structures of TF₀c-ring in membrane determined by solid-state NMR. (a) Superimposed 10 structures. (b) Electrostatic potential mapped with positive areas in black and negative in gray. Cartoon representation of the ring, viewed from membrane (c) and F₁ (d).

DMPC (dimyristoylphosphatidylcholine) でできた脂質二重膜に再構成した。さらに無細胞蛋白質発現系によりアミノ酸選択標識したサンプル2種類を調製した。

上記の6種類のサンプルについて、残基間 2D $^{13}\text{C}^{\alpha}_{i+1}$ - $^{13}\text{C}^{\alpha}_i$ 相関、2D $^{15}\text{N}_{i+1}$ - $^{13}\text{C}^{\alpha}_i$ 相関スペクトルを測定し、配列特異的に主鎖を帰属した。分解能の悪い固体NMRのシグナルのオーバーラップを改善するために、選択ラベルサンプルを使用した。選択ラベルは経験的にシグナルが分散し、アミノ酸配列で帰属がつながるようにデザインした。それらを相補的に用いることで配列特異的に主鎖を帰属が可能となった。また、主鎖の帰属をもとに2D ^{13}C - ^{13}C 相関スペクトルから側鎖の帰属もおこなった。

距離相関を得るためにDARR法あるいはspin diffusion法を用いて2D ^{13}C - ^{13}C 相関スペクトルを測定した。上

記の選択標識した試料は分子間距離を得る測定においてもシグナルの重なりが軽減でき、非常に役に立った。それぞれのサンプルについて混合時間 15、50、100、200、400、600、700 msのスペクトルを測定し距離情報を得た。

得られた距離情報によりXplor-NIHを用いてTF₀c-ringの構造計算を行った。TF₀c-ringは同一の10分子が集まったデカマーであり、分子間の帰属において左右の区別ができない。そこでモノマーのみの構造を決め、結晶構造の分子間の重なりを仮定してリング構造モデルを作成し、分子間の帰属を判別した。最終的には拘束条件として1分子につき分子内1538個(ヘリックス間も含む)、分子間25個の距離制限、TALOSによる二面角制限、水素結合を拘束条件に200個構造計算した。エネルギーの低い10個のTF₀c-ring構造について重ねて表示した (Fig.1a)。

TF₀c-ringは脂質膜中で決定された最初の構造であるが、界面活性剤中の結晶構造と同様に砂時計型の構造をとっていた。また、構造の内側4~34残基、外側41~71残基でヘリックスをとるhelix-turn-helixのヘアピン構造となっていた (Fig.1c,d)。ターンの中心に位置するE39 C^αと対角分子のものとの距離(直径)は40 Åであり、高速AFMによる直径39±3 Åと一致した。表面電荷は脂質との接触面は活性部位であるE56付近を除いて疎水的で、ヘリックスの両端には電荷を持ち、DMPC膜の厚さ45 Å(黒: 極性部、灰: 疎水部)に合う構造となっていた (Fig.1b)。活性部位E56は膜内の疎水的环境にあるため、側鎖の方向が内側のclosed構造となっている。この結果はSAILアミノ酸を用いて活性部位E56-N23の構造を解析した結果と一致した。サブユニットab₂とともに脂質に再構成することでE56とN23にどのような変化が見られるか興味深い。

P108**¹H DQ MASを用いた医薬品原薬中の微量フリー体の定量
～固体NMRの検出限界は？～**○丸吉京介¹, Dinu Iuga², and Steven P. Brown²¹第一三共株式会社・分析評価研究所²ウォーリック大学・物理学科**What is the lowest concentration of a minor free form component that can be detected by ¹H DQ MAS experiments in pharmaceutical solids?**○Keisuke Maruyoshi¹, Dinu Iuga², and Steven P. Brown²¹*Analytical & Quality Evaluation Research Laboratories, Daiichi Sankyo Co., Ltd., Hiratsuka, Japan.*²*Department of Physics, University of Warwick, Coventry, U.K.***The limit of detection for free form of cimetidine obtained with ¹H magic-angle spinning (MAS) solid-state NMR is determined. The free form can be detected and quantified in a physical mixture with the salt form down to a concentration of 1% w/w by solid-state NMR experiments recorded at 850 MHz.**

Salt formation is an approach to improve the rate of dissolution and aqueous solubility of acidic and basic pharmaceutical products.¹ Approximately a half of all drugs on the market are developed in salt forms nowadays. However, a salt can become unstable chemically and physically during various processing steps, it may transform to a free acid/base form or another polymorph or solvate. The solid state transformation from the salt to free form will alter the properties of the active pharmaceutical ingredient (API) and this is extremely undesired. To investigate the quality of pharmaceutical products, an efficient and high-sensitive method is required. Solid state NMR spectroscopy has become a standard tool for analytical research in pharmaceutics.² Although ¹³C CP MAS is commonly used for pharmaceutical analysis, the potential of applying ¹H solid-state NMR is being increasingly recognised. Concretely, the ¹H double-quantum (DQ) solid-state NMR experiments (DQ MAS and DQ CRAMPS) are powerful methods for obtaining information of dipolar-coupled protons, with DQ peaks being observed for close (typically less than 3.5 Å) through-space H-H proximities.^{3,4} Therefore, two-dimensional ¹H DQ spectra constitute “fingerprints” for the identification of a specific form of an organic molecule.⁵ A drawback of the ¹H DQ CRAMPS method is the presence of spectral noise due to the homonuclear decoupling, i.e., a lower detection limit could be expected in a ¹H DQ MAS experiment at high magnetic field. We have recorded ¹H DQ MAS spectra at a ¹H Larmor frequency of 850 MHz and a MAS frequency of 30 kHz for a cimetidine hydrochloride salt/free form mixture (20%, 10%, 5%, 1% and 0.5% free form) samples and determined the limit of detection for the free form component as 1% by following the pair of cross peaks at a ¹H DQ frequency of 7.4 + 11.6 = 19.0 ppm derived from the free form (Figure 1).

¹H DQ MAS, Polymorph, Limit of detection

○まるよしけいすけ, Dinu Iuga, Steven P. Brown

This result is on a level with limits of detection by both powder X-ray diffraction and ^{13}C CP MAS NMR for minor polymorph components. This is important for the pharmaceutical industry, e.g., offering the potential to enable polymorph conversion to be detected much earlier in e.g. stability testing.

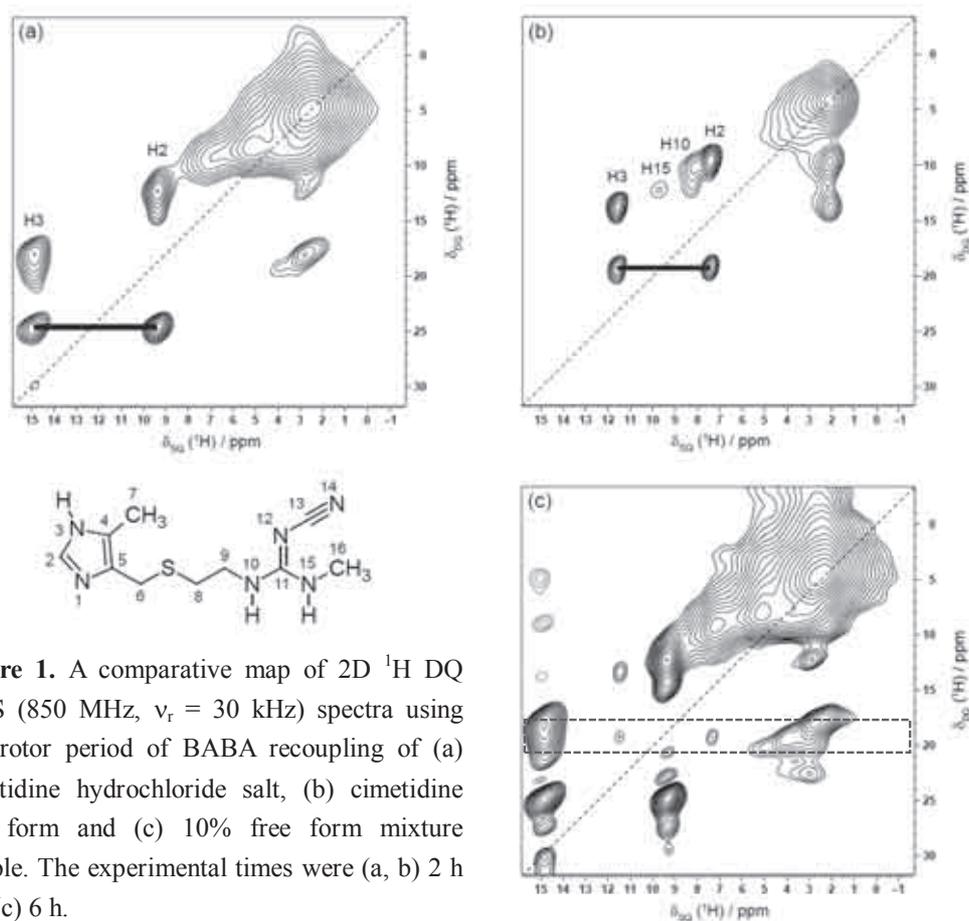


Figure 1. A comparative map of 2D ^1H DQ MAS (850 MHz, $\nu_r = 30$ kHz) spectra using one rotor period of BABA recoupling of (a) cimetidine hydrochloride salt, (b) cimetidine free form and (c) 10% free form mixture sample. The experimental times were (a, b) 2 h and (c) 6 h.

Acknowledgement

The UK 850 MHz solid-state NMR Facility used in this research was funded by EPSRC and BBSRC, as well as the University of Warwick including via part funding through Birmingham Science City Advanced Materials Projects 1 and 2 supported by Advantage West Midlands (AWM) and the European Regional Development Fund (ERDF).

References

- [1] Serajuddin, A. T. M. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2007**, *59*, 603.
- [2] Harris, R. K. *Analyst* **2006**, *131*, 351.
- [3] Brown, S. P. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2007**, *50*, 199.
- [4] Brown, S. P. *Solid State Nucl. Magn. Reson.* **2012**, *41*, 1.
- [5] Griffin, J. M., Martin, D. R., Brown, S. P. *Angew. Chem. Ind. E.* **2007**, *46*, 8036.

分子複雑系

横浜市立大学大学院生命医科学研究科
理化学研究所環境資源科学研究センター
名古屋大学大学院生命農学研究科

菊地 淳

はじめに

NMRを主軸とする研究者には、実験が苦手あるいは嫌いな方も見受けられる。かく言う筆者も、学生時代には蛋白質精製に苦手意識を憶えた時期を経験し、精製カラム調製の際に涸らして徹夜したり、毎朝の電気泳動確認に憂鬱だった記憶がある。確かに蛋白質のような複雑なスペクトルを示す分子は、丁寧な精製を経てこそ構造解析等が可能になる。しかし、生体膜中の脂質分子や膜蛋白質^[1]、さらにはin-cell NMRのように精製を経ない分子複雑系でも^[2]、情報抽出が可能なのはNMR法の強みでもある。つまり、とにかく様々な未精製試料をNMR管に放り込んでも、情報抽出さえできれば実験操作を楽して研究できる。こんな妄想中に出合ったNature姉妹誌の総説から^[3]、筆者は分子複雑系NMRに本腰を入れ始めた。

脱実験室の時代へ

分子複雑系で構成される生命科学の世界では、実験と解析のアプローチが多様になりつつある。メタゲノムやプロテオームといった、分子複雑系試料を一斉計測しても何らかの有用情報が抽出可能な技術革新が進んできたためである。前世紀には単離微生物を無菌操作し、目的遺伝子をクローニングし、蛋白質機能を追跡していた研究アプローチから、今ではヒトの糞便や農地土壌等の難培養微生物まで含めた微生物生態系を一斉計測しても、健康状態や農産物生長特性といった有用情報も得られる^[4]。換言すれば、これまでは研究費の多くを実験室内の設備や試薬に費やしていた時代から、未精製試料を扱い“楽する”ことで、実験室外の試料サンプリングと、その一斉解析に移行する“脱実験室”の時代が到来しつつある。つまりヒト集団や自然環境等への貴重な試料アクセスをいち早く築き、また解析技術高度化を推進した研究室が、脱実験室時代をリードすることに繋がる。

データ駆動型アプローチ

ヒト糞便や海水等、身近な試料の一斉解析でも一流誌を狙える脱実験室時代が到来した背景には、従来の科学研究のアプローチとして王道である仮説駆動型のみならず、データ駆動型アプローチが胎動してきたことによる^[5,6]。前者は仮説ありきで知りたい分子のみに着目しているのに反し、後者は仮説無しに計測から始まり、得られたデータの分類・傾向から健康と疾患を区分するバイオマーカー分子を発見したり、新たな課題創出へと結びつける(図1)。こうしたデータ駆動型アプローチを経て、筆者らも含めてNature、Science誌にさえ存在感を見せつけてきたNMR利用法の一つに、マウスやヒトの体液・排泄物を一斉解析するメタボミクスである^[7,8]。

低分子混合系の解析・メタボミクス^[9]

ヒトは恒常性を維持し続ける生物であり、多様な微生物と共生した超有機体として存在している為、分子複雑系の代謝反応場を形成している。ヒトに限らずとも、あらゆる生物は栄養、行動、外的ストレス等のさまざまな生体環境変動要因の曝露を受けているにも関わらず、その恒常性を維持し続けるメカニズムはいまだ部分的にしか解明されていない。この代謝ブラックボックスである代謝反応場としての多細胞生物を、尿や糞便といった出力情報を用いて、食や運動などの入力に対する代謝応答を解析する研究領域はメタボミクスと呼ばれている。メタボミクスではNMR、LC/MS、GC/MSといった分析機器が広く用いられているが、各機器によって検出される物質には差異が存在する。たとえばヒトの尿ではNMRで209種類の代謝物の検出に成功しており、他の2つの手法と比較して高い網羅性と独自性を併せ持つ分析機器と位置付けられている^[10]。

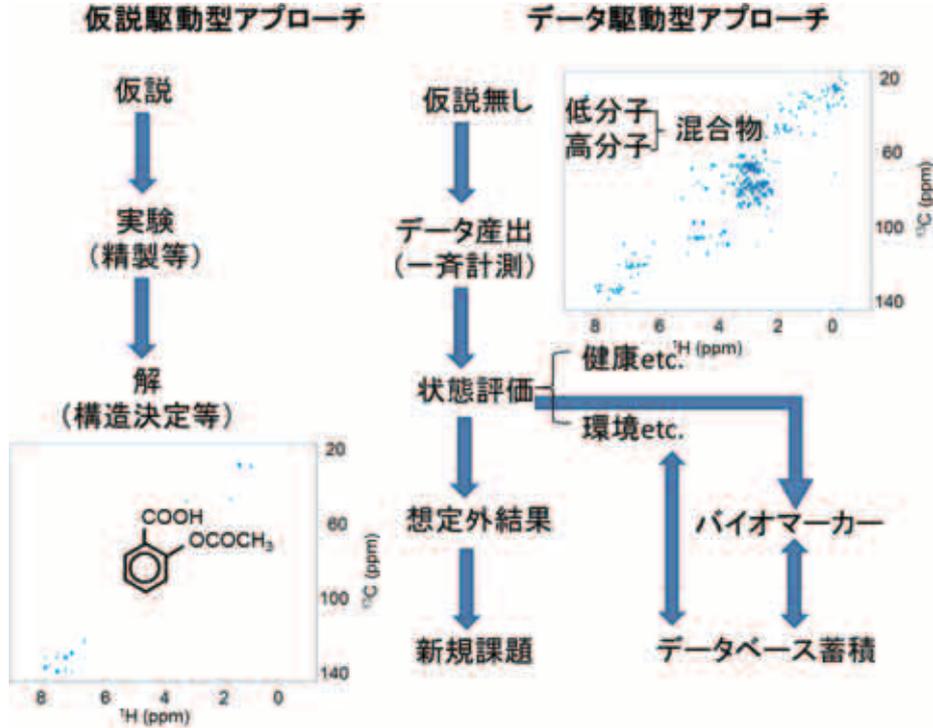


図1 科学の王道としての仮説駆動型アプローチ (左) とデータ駆動型アプローチ (右)

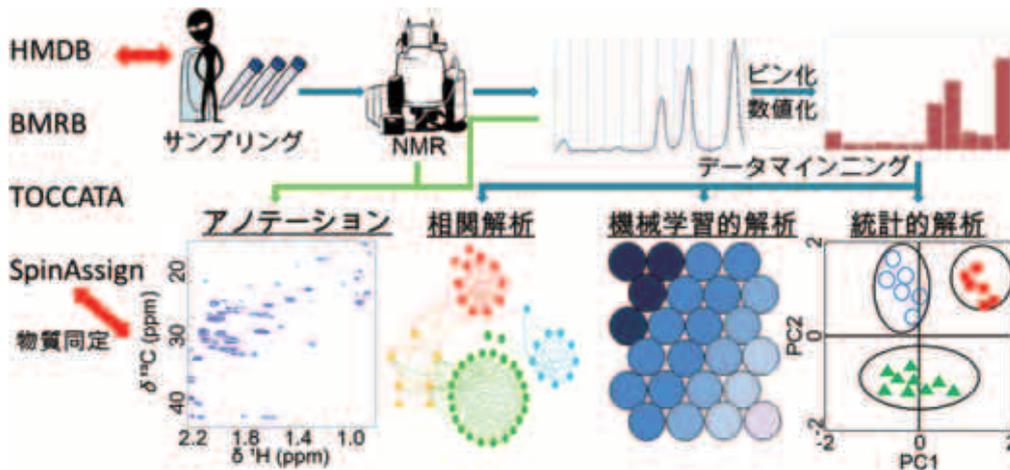


図2 低分子代謝混合物の一斉計測で健康等の状態評価を行うメタボノミクス解析

NMR メタボノミクス法

メタボノミクスは入力情報に対する代謝応答を出力情報から解析することが主な目的であるため、入力情報の収集が何よりも重要となることを念頭に入れて出力試料 (尿や糞便など) の分析を行う。NMRにて得られたスペクトルデータはケミカルシフトの区画化 (bin 化) および数値化を行い統計的、時には機械学習的に解析を行う。また、結果を解釈する上で強力なツールとなるものにデータベースや統計的手法があげられる (図2)。

データベースや統計手法の活用

尿や糞便のような分子複雑系の莫大な NMR データは目で見て違いを捉えることは困難なため、まず

サンプルの違いを明確 (集団分離) にする必要がある。多変量解析は手法の観点から統計解析と機械学習の2つに大別され、また入力情報の観点から判別分析と非判別分析 (機械学習の場合は教師データの有無) に分けることができる。統計手法の非判別分析としてはPCA (principal component analysis) が主流である。この方法は分散が最大となるように直線を引いたものを主成分スコアPC1 (principal component 1) 軸とし、それに直交するようにPC2軸を引く、以後この作業を因子の数だけ繰り返していく方法であり、すなわち、サンプル間の違いを最大限に表現する統計手法である。PCAによりうまくクラスタリングされたのならば、そのスコアに対する寄与率を表す、因子負荷量からそのクラスターを

形成している原因物質を見いだすことができる。

因子負荷量の強いシグナルから、物質同定に重要な役割を担うのがデータベースである。NMRにおける主要なデータベースとして構造情報が詳細に記載されているBMRB^[11]、TOCSYスピン結合の情報から帰属可能なTOCCATA、ヒト代謝物に特化したHMDB^[10]、HSQCからアノテーションが可能なSpinAssign^[12]などがあげられ、用途によって使い分けることで高精度なアノテーションが可能となる。筆者らが開発したSpinAssignはNMRの化学シフトをもとにデータベースと照合、相同性の高い物質を抽出して提示するプログラムである。相同性の指標としてp-valueを採用しており、異なるアルゴリズムを用いている点で、他のデータベースとの差別化がなされている。

メタボミクスの実際例

ヒトには、歳や性別、疾患の有無や摂取栄養、更には腸内微生物叢の違いなどが存在し、たとえば、薬物動態や感受性などは到底ゲノム情報だけで解釈できるものではない。2012年に高齢者施設の入院介護者や通院者178人の糞便試料を対象とした解析により、DASHスコアと呼ばれる食事内容の定量データと、次世代シーケンサーによる微生物叢データ、¹H-NMRによる糞便抽出物データとの密接な関係性が報告されている^[13]。特に、老化や健康状態の衰えと、腸内微生物叢の多様性減少との間に強い相関性が見いだされており、微生物多様性を保つ食生活や適切な運動環境の維持が議論されている。

さらに筆者らは、ビフィズス菌を無菌マウスにプロバイオティクスとして用い、O157による感染死

の予防株投与群と非予防群の代謝物プロファイルを区分化、他データと組み合わせて酢酸の腸壁防御効果についてNature誌で提案することにも成功した^[14]。最近ではさらにNature誌にて、高繊維食および低繊維食マウスの比較解析から、制御性T細胞の分化誘導が片利共生細菌による酪酸産生に起因していることを突き止めることもできた^[15]。加えて2014年にはフラクトオリゴ糖のプレバイオティクス効果によるIgA産生と腸内微生物由来のチラミンや酪酸産生が相関していることを示した^[16]。さらに類似の手法は低分子のみならず高分子複雑系であるバイオマスへも適用可能であり、次項にて紹介する。

生体高分子複雑系バイオマス NMR

NMR法の歴史は上述のような生命科学より、むしろ化学分野で広く利用されてきた。しかし多くの化成品原料となる原油の持続的供給は難しいとされ、一部でもバイオマスへの代替を推進していく必要性が指摘されている^[17]。バイオマスのような高分子複雑系の解析にもNMR法は適用されており、そもそも固体原料であることから固体NMR法、あるいは成分構成比を詳細に解析する目的ではDMSO系溶媒に可溶化した溶液NMR法が用いられている(図3)^[18]。まず筆者らの可溶化バイオマスを対象にした溶液NMR解析例を紹介したい。

植物バイオマスの組成評価の際には、低分子抽出後の高分子残渣をボールミル破碎し、リグノセルロース画分として、可溶化した後に¹H-¹³C HSQC法で計測する。この際、クロロフォルムで可溶化する場合には、極性基に対してメチル化修飾を行う場合が多い。しかし最近になって、イオン液体の

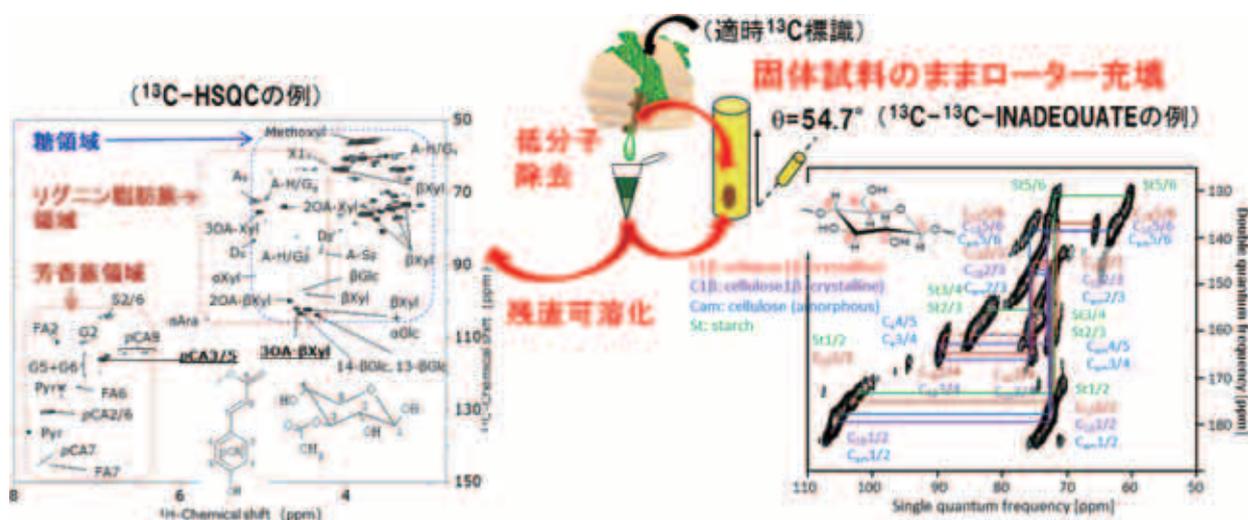


図3 高分子混合物・バイオマスの溶液NMR(左) および固体NMR(右) 解析例

構成成分として頻繁に用いられるイミダゾール基が、セルロースの水素結合切断に有効なことが分かっていたため^[19]、非修飾化リグノセルロースでも、DMSO/Pyridine混合溶媒を用いることで可溶化できる。筆者らの研究室でも、現在はこの手法を採用して、種々のバイオマス草本や樹木の細胞壁プロファイリングを試行し始めている。我々はこれらの実験データベースをまとめ、なおかつユーザーが計測した¹H, ¹³Cシグナル値を入力してアノテーションを試みることが可能なwebツールBm-Char (<https://database.riken.jp/ecomics/biomass>)を開発し、全世界に公開している^[20]。この際、低分子混合物を前提としたメタボノミクスでも述べたように、複雑な多数のシグナルをデータマトリックス化させれば、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が可能となる。筆者らはその具体例として、ヤトロファ7組織の¹³C-HSQCスペクトルを多変量解析し、例えば種皮に種々のリグニン成分が相対的に多い特徴等が図示できている^[21, 22]。

運動性の差で固体バイオマスのシグナルを分離

天然に存在するセルロースはI型とよばれる分子鎖が逆平行に並んだ結晶構造をしている。しかしながら、植物セルロースの固体NMRスペクトルでは、4位の炭素は結晶由来のシグナルの他にも高磁場側にブロードな成分が観測される。この成分は緩和時間が結晶構造のそれとは異なるため非晶構造のセルロースに由来すると考えられている。筆者らは、セルロースの最小構成単位であるセロビオース(D-Glc-1, 4-β-D-)をモデル構造として分子動力学計算し、派生させた座標に対して量子化学計算により理論化学シフト値を得た^[23]。イオン液体に溶解させたセルロースを再固化させて得られた非晶セルロースの化学シフトをJ-INADEQUATE法によって帰属し、得られた実験値と前述の理論値を比較することで非晶構造を探索できた。

一方で植物バイオマスについて固体NMR計測を試みると、結晶・非晶の違いはあってもセルロースのシグナル以外はなかなか観測できない(図3右)。これは、セルロースとヘミセルロースの物性の違いがヘミセルロースの解析を困難にするためである。筆者らは、物性の違いをシグナルの分離に利用する実験法としてDipolar-dephasing-filtered-(DDF-)INADEQUATEのパルス系列を作成し、植物バイオマス試料に適用した^[24]。Dipolar-dephasing

法によってフィルタリングされずに残った磁化をJ-INADEQUATE型の混合および展開をおこない自由減衰を取得した。得られたFIDをフーリエ変換することでリグノセルロースの高分子複雑系から、分子運動が高いヘミセルロースを選択された¹³C-¹³Cのdouble-quantumの相関スペクトルが取得することを可能とした。

おわりに

バイオマスや生体組織などの不均一かつ固形試料を計測できることもNMRの大きな特徴である。インタクトな組織内の代謝混合物計測には、MAS法が多く用いられる。SakellariouらはMACS法という試料管内自体に検出コイルを導入し、コイルと試料との距離を極限まで縮めることで必要試料量を二桁軽減してnLオーダーの固形試料を計測できる技術を開発し、Nature誌に報告している^[25]。このMACS技術を、小型NMR装置に適用しようとする試みも始まっている。MACSに限らずとも、とにかく装置を小型化するという観点では、最近ベンチャー企業からのベンチトップ型装置の市販化が目立つ。通常は化合物の構造解析用の60 MHzクラスが多いが、何と云っても低価格で電磁石である点は、メンテナンスの便利さなど魅力が多い^[26]。冒頭で述べたように、ヒト検体、食品や工場の製造工程試料の未精製物を即NMR計測へと進める脱実験室化を推進できれば、将来は小規模病院や健診車、さらには工業製品や農林水産物の品質管理用などに、汎用性高く低価格な装置が活用される日が来るかもしれない。

引用文献

- [1] Kikuchi, J.; Williamson, M. P.; Shimada, K.; Asakura, T. *Photosynth Res* 2000, **63**, 259.
- [2] Sakakibara, D.; Sasaki, A.; Ikeya, T.; Hamatsu, J.; Hanashima, T.; Mishima, M.; Yoshimasu, M.; Hayashi, N.; Mikawa, T.; Walchli, M.; Smith, B. O.; Shirakawa, M.; Guntert, P.; Ito, Y. *Nature* 2009, **458**, 102.
- [3] Nicholson, J. K.; Connelly, J.; Lindon, J. C.; Holmes, E. *Nat Rev Drug Discov* 2002, **1**, 153.
- [4] 菊地淳; 守屋繁春; 福田真嗣; 大野博司 複合微生物系の統合メタボローム解析; CMC出版: 2010, 147.
- [5] Asakura, T.; Date, Y.; Kikuchi, J. *Anal Chem* 2014, **86**, 5425.
- [6] Ito, K.; Sakata, K.; Date, Y.; Kikuchi, J. *Anal Chem* 2014, **86**, 1098.
- [7] Clayton, T. A.; Lindon, J. C.; Cloarec, O.; Antti, H.; Charuel, C.; Hanton, G.; Provost, J. P.; Le Net, J. L.; Baker, D.; Walley, R. J.; Everett, J. R.; Nicholson, J. K. *Nature* 2006, **440**, 1073.
- [8] Smith, M. I.; Yatsunenkov, T.; Manary, M. J.; Trehan,

- I.; Mkakosya, R.; Cheng, J.; Kau, A. L.; Rich, S. S.; Concannon, P.; Mychaleckyj, J. C.; Liu, J.; Houpt, E.; Li, J. V.; Holmes, E.; Nicholson, J.; Knights, D.; Ursell, L. K.; Knight, R.; Gordon, J. I. *Science* 2013, **339**, 548.
- [9] 三澤拓真；伊藤研悟；菊地淳 生物工学会誌 2014. 印刷中
- [10] Bouatra, S.; Aziat, F.; Mandal, R.; Guo, A. C.; Wilson, M. R.; Knox, C.; Bjorndahl, T. C.; Krishnamurthy, R.; Saleem, F.; Liu, P.; Dame, Z. T.; Poelzer, J.; Huynh, J.; Yallou, F. S.; Psychogios, N.; Dong, E.; Bogumil, R.; Roehring, C.; Wishart, D. S. *PLoS ONE* 2013, **8**, e73076.
- [11] Cui, Q.; Lewis, I. A.; Hegeman, A. D.; Anderson, M. E.; Li, J.; Schulte, C. F.; Westler, W. M.; Eghbalian, H. R.; Sussman, M. R.; Markley, J. L. *Nat Biotechnol* 2008, **26**, 162.
- [12] Chikayama, E.; Sekiyama, Y.; Okamoto, Y.; Nakanishi, Y.; Tsuboi, Y.; Akiyama, K.; Saito, K.; Shinozaki, K.; Kikuchi, J. *Anal Chem* 2010, **82**, 1653.
- [13] Claesson, M. J.; Jeffery, I. B.; Conde, S.; Power, S. E.; O'Connor, E. M.; Cusack, S.; Harris, H. M. B.; Coakley, M.; Lakshminarayanan, B.; O'Sullivan, O.; Fitzgerald, G. F.; Deane, J.; O'Connor, M.; Harnedy, N.; O'Connor, K.; O'Mahony, D.; van Sinderen, D.; Wallace, M.; Brennan, L.; Stanton, C.; Marchesi, J. R.; Fitzgerald, A. P.; Shanahan, F.; Hill, C.; Ross, R. P.; O'Toole, P. W. *Nature* 2012, **488**, 178.
- [14] Fukuda, S.; Toh, H.; Hase, K.; Oshima, K.; Nakanishi, Y.; Yoshimura, K.; Tobe, T.; Clarke, J. M.; Topping, D. L.; Suzuki, T.; Taylor, T. D.; Itoh, K.; Kikuchi, J.; Morita, H.; Hattori, M.; Ohno, H. *Nature* 2011, **469**, 543.
- [15] Furusawa, Y.; Obata, Y.; Fukuda, S.; Endo, T. A.; Nakato, G.; Takahashi, D.; Nakanishi, Y.; Uetake, C.; Kato, K.; Kato, T.; Takahashi, M.; Fukuda, N. N.; Murakami, S.; Miyauchi, E.; Hino, S.; Atarashi, K.; Onawa, S.; Fujimura, Y.; Lockett, T.; Clarke, J. M.; Topping, D. L.; Tomita, M.; Hori, S.; Ohara, O.; Morita, T.; Koseki, H.; Kikuchi, J.; Honda, K.; Hase, K.; Ohno, H. *Nature* 2013, **504**, 446.
- [16] Kato, T.; Fukuda, S.; Fujiwara, A.; Suda, W.; Hattori, M.; Kikuchi, J.; Ohno, H. *DNA Res* 2014.
- [17] 菊地淳 植物の生長調節 2008, **43**, 144.
- [18] 小松功典；菊地淳 細胞工学 2014. 印刷中
- [19] Okushita, K.; Chikayama, E.; Kikuchi, J. *Biomacromolecules* 2012, **13**, 1323.
- [20] Kikuchi, J.; Ogata, Y.; Shinozaki, K. *J. Ecosys. Ecogr* 2011, **S2**, 001.
- [21] Watanabe, T.; Shino, A.; Akashi, K.; Kikuchi, J. *Plant Biotechnol-Nar* 2012, **29**, 163.
- [22] Watanabe, T.; Shino, A.; Akashi, K.; Kikuchi, J. *PLoS ONE* in press.
- [23] Mori, T.; Chikayama, E.; Tsuboi, Y.; Ishida, N.; Shisa, N.; Noritake, Y.; Moriya, S.; Kikuchi, J. *Carbohydr Polym* 2012, **90**, 1197.
- [24] Komatsu, T.; Kikuchi, J. *J. Phys. Chem. Lett.* 2013, in press.
- [25] Sakellariou, D.; Le Goff, G.; Jacquinet, J. F. *Nature* 2007, **447**, 694.
- [26] Mitchell, J.; Gladden, L. F.; Chandrasekera, T. C.; Fordham, E. J. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc* 2014, **76**, 1.



菊地 淳 (きくち・じゅん)

理化学研究所環境科学研究センター・チームリーダー。名古屋大学大学院生命農学研究科・客員教授、横浜市立大学大学院生命医科学研究科・客員教授を兼任。博士(工学)。現在の研究テーマとしては、混沌とした生体分子混合物からの情報抽出技術の開発を担っており、動植物や微生物群集から、環境水や土壌まで幅広く解析対象としている。こうした研究活動から自然の理を追求し、情報発信することで美しい地球の持続的な営みに貢献したい。

NMR法により明らかとなる タンパク質複合体の機能的運動性

¹産業技術総合研究所・創薬分子プロファイリング研究センター

²東京大学・大学院薬学系研究科

竹内 恒¹、嶋田 一夫²

はじめに

生命現象は生体内に存在する多数のタンパク質、核酸、脂質などが互いに相互作用することにより維持される。例えば、タンパク質だけを考えても1個のヒトの細胞の中には、最大数万種類のタンパク質が同時に存在し、その総数は100億個にも及ぶ。さらに細胞中のタンパク質の種類および個々のタンパク質の数は、細胞の種類と異なるとともに、環境や機能発現に伴い常に変動している。そのため細胞がその機能を発揮する際には、多種の生体分子が共存する細胞中で個々のタンパク質がその機能に応じて必要十分な“親和性”と“特異性”を発揮する必要がある。例えば細胞内にあるシグナル伝達タンパク質が、不特定のタンパク質と相互作用すると、外部からのシグナル入力も拡散し、細胞は機能を果たせなくなる。逆に分子シャペロンなど、多くのタンパク質を“汎特異的”に認識し、その機能を補助するタンパク質の存在も細胞機能の維持には不可欠である。

すなわち必要十分な“親和性”と“特異性”に基づく機能的なタンパク質複合体の形成は、タンパク質が生体内でその特異的活性を発揮するために不可欠であり、その分子機構を理解することは、生物学的に重要なタンパク質機能の理解につながる。現在、タンパク質複合体の立体構造決定の多くはX線結晶構造解析に依っており、複合体形成機構は結晶中において安定的に観察される特異的な相互作用によって記述されることが多い。しかしながらそのような理解は、タンパク質複合体形成の一面を見ているにすぎない。後に述べるように、複合体形成に伴う自由エネルギー変化のうち、X線結晶構造解析に基づく構造解析は水素結合、塩橋の形成など位置特異的結合に起因するエンタルピーの寄与を説明するのは得意であるが、結合に伴うもう一つの重要なエネルギー項であるエントロピー変化を説明するには不向きである。エントロピー変化は系の

もつ自由度を示す指標であり、静止画しか提供できないX線結晶構造解析が、自由エネルギーにおけるこの重要な要因にアクセスできないのは自明のことともいえる。

本稿ではタンパク質複合体の形成を支配する熱力学的要因を概説し、結合に伴いタンパク質の持つエントロピー変化を解析する実験科学的手法としての溶液NMR手法を紹介する。特に近年、溶液NMR法を用いた速い運動性の定量的解析により、タンパク質の持つ構造的自由度を反映する“構造エントロピー”が結合において重要な役割を果たすことが再認識されており、この点に着目した解説を行う。タンパク質複合体の形成という非常に複雑な現象を明らかにするためには、様々な実験科学的、論理的手法の融合とさらなる発展が不可欠であるが、その際にタンパク質の持つ運動性を定量的に解析可能な唯一の手法としての溶液NMR法が非常に重要な役割を果たす。

タンパク質相互作用の親和性、 特異性と結合自由エネルギー

タンパク質が、その生理活性を発揮するためにはタンパク質などの生体分子を含むリガンドに対して必要十分な親和性と特異性が必要である。ここではタンパク質 (P) とその相互作用相手であるリガンド (L) が1:1で結合し、複合体 (PL) を形成する最も単純な系を考える。



この時、タンパク質とリガンドの親和性を示す結合定数 (K_A) は、平衡状態において非結合状態にあるタンパク質およびリガンドのモル濃度 (それぞれ $[P_{\text{free}}]$ 、 $[L_{\text{free}}]$) とタンパク質複合体のモル濃度 ($[PL]$) により以下のように記述される。

$$K_A = [PL] / [P_{\text{free}}] \cdot [L_{\text{free}}] (\text{mol}^{-1}) \quad \dots(2)$$

一方、複合体形成に伴うギブス自由エネルギー変化量 (ΔG) は、タンパク質複合体の持つ自由

エネルギー (G_{PL}) と非結合状態におけるタンパク質およびリガンドの自由エネルギーの和 ($G_P + G_L$) の差となる。

$$\Delta G = G_{PL} - (G_P + G_L) \text{ (cal)} \quad \dots(3)$$

物質の部分モル自由エネルギー G_A は、物質 A のモル濃度により式 (4) の様に記述されるため、この関係を式 (3) に代入すると、式 (5) が導出される。

$$G_A - G_A^0 = RT \ln [A] \text{ (cal}\cdot\text{mol}^{-1}) \quad \dots(4)$$

(G_A^0 : 標準モル自由エネルギー (以下、標準自由エネルギーと呼ぶ)、R: 気体定数、T: 絶対温度)

$$\Delta G = \Delta G^0 + RT \ln \left(\frac{[PL]}{[P_{\text{free}}] \cdot [L_{\text{free}}]} \right) \text{ (cal}\cdot\text{mol}^{-1}) \quad \dots(5)$$

ここで系が平衡状態に達した場合を考える。平衡状態では、複合体の形成と解離が釣り合い、系全体の自由エネルギー変化量 ΔG はゼロとなる。よって、式 (5) は式 (6) に変換され、標準自由エネルギーの変化量 ΔG^0 は、結合定数 K_A と式 (7) のように対応付けられる。

$$\Delta G^0 = -RT \ln \left(\frac{[PL]}{[P_{\text{free}}] \cdot [L_{\text{free}}]} \right) \text{ (cal}\cdot\text{mol}^{-1}) \quad \dots(6)$$

$$= -RT \ln K_A \text{ (cal}\cdot\text{mol}^{-1}) \quad \dots(7)$$

これはタンパク質が単独で水溶液中に存在する場合と比べて、リガンドと複合体を形成した場合に“系全体の”自由エネルギーが低くなるほど、その親和性が大きくなることを意味する。室温 (25°C) では $1.4 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ のエネルギー差が10倍の結合定数が変化に相当し、結合定数 10^9 mol^{-1} (解離定数として 1 nM) の相互作用は、約 $-12 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ の ΔG^0 に相当する。

複合体形成に伴う自由エネルギー変化は、様々な熱力学定期要因に起因するが、大きく分けると系の「安定性」を反映するエンタルピー変化 ΔH と系の「乱雑さ」を表すエントロピー変化 $-T \cdot \Delta S$ の和として表現される (式 (8))。エンタルピー変化が水

素結合の形成など特異的な相互作用を反映する静的なエネルギー量であるのに対して、エントロピー変化はより動的な系の乱雑さや自由度を反映する項である。

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T \cdot \Delta S^0 \text{ (cal}\cdot\text{mol}^{-1}) \quad \dots(8)$$

式 (8) は、たとえ結合の強さが同じであっても、相互作用の駆動力が大きく異なる可能性を示している。図1にはタンパク質複合体形成における典型的な3種の熱力学的パターンを示した。これらのタンパク質複合体は同じ結合定数を示すが、Iの相互作用はエンタルピー利得が大きいがエントロピー的には損失している。IIはその逆でありIIIでは両者がともに結合に寄与している。

タンパク質複合体の立体的、静電的な相補性に起因する引力は、主にエンタルピー的エネルギー利得につながる。ファンデルワールス相互作用、静電相互作用、水素結合などがそれにあたるが、実験的には等温滴定型熱量測定 (ITC) により、結合に伴うわずかな熱量変化を測定することで、これらの原子間引力に起因する ΔH の総量を直接求めることが可能である。また ΔH を構成する成分に関しては、X線結晶構造解析などによりタンパク質複合体の立体構造を精度良く決定することができれば、複合体の立体構造中での官能基間の距離、角度から、複合体形成に寄与する重要な相互作用を推定することができる。これまでの研究で、理想的な水素結合は、最大 $-5 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ ほどのエンタルピー変化をもたらすとされている。このような情報を基に、立体構造中で各官能基が結合にどのように寄与しているかを定性的に考察することが可能である。しかしながらX線結晶構造解析のみから個々の相互作用の ΔG^0 への寄与やその総和を定量的に明らかにすることは不可能である。これは以下に述べる水和・脱水和、構造エントロピー (conformational entropy) など結合自由エネルギー変化をもたらすその他の重要な要素を、複合体のX線結晶構造解析から直接見積もることが困難なためである。さらに結晶構造解析から得られる複合体構造は、平衡状態にあるタンパク質が取りうる構造の一つであり、必ずしも代表的な構造を反映しない可能性を考慮しなければならない。

タンパク質複合体は水溶液中で形成される。よって、その形成機構の理解には周辺の水に対する考察が不可欠である。水溶液中におけるタンパク質分子の周囲には、普通の水とは異なり運動が制限された水和水が存在する。そのためタンパク

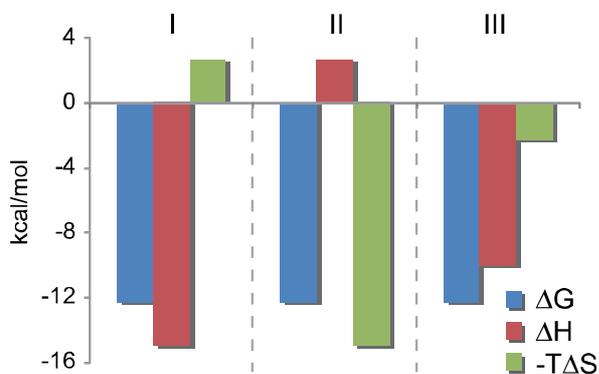


図1 タンパク質相互作用における典型的な3種の熱力学的パターン

ここに示すI~IIIのスキームはすべて同じ結合定数 (10^9 M^{-1}) を示すが、その熱力学的特徴は大きく異なる。

質複合体の形成は、界面における水和水の排除(脱水和)を伴う。脱水和のエネルギー的な寄与は、界面の極性により正負が反転し、経験的に式(9)のように表現できることが知られている^[1]。非極性基では、脱水和により、制限されていた水の自由度が増大することがエントロピー的エネルギー利得を生じさせる。このようにして形成される“引力的”な相互作用は、疎水性相互作用と呼ばれる。一方、水と静電的な相互作用を形成する極性基では、エントロピー的利得よりも、水との静電的相互作用が失われることによるエンタルピー損失が主となる。よって水素結合がタンパク質複合体形成にエネルギー的に寄与できるのは、脱水和に伴うエンタルピー損失を凌駕するエネルギー利得が水素結合の形成により導入された場合だけである^[2]。

$$\Delta S_{\text{solvent}} = 0.45 \cdot \Delta ASA_{\text{apolar}} \cdot \ln(T/385) - 0.26 \cdot \Delta ASA_{\text{polar}} \cdot \ln(T/335) \text{ (cal} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}) \quad \dots(9)$$

($\Delta ASA_{\text{apolar}}$, $\Delta ASA_{\text{polar}}$ それぞれ結合前後での親水、疎水表面積の変化 (\AA^2))

実験的には温度、圧力、イオン強度などに伴う熱力学量変化の解析、X線・中性子結晶解析、NMRによる水の分布解析やテラヘルツ分光法などによりタンパク質の水和状態が解析されている。しかしながら水和水の滞在時間の多様性などから、一つの実験的手法でタンパク質表面の水和分布をすべて明らかにすることは難しい。将来的にはこのように多様な実験と理論的手法が融合することによりタンパク質表面の水和状態を求める新たな手法の開発が望まれる。

またタンパク質が立体構造的な自由度を内包する柔らかな存在であることを見逃してはならない。例えば、複合体形成により相互作用界面におけるタンパク質の運動性が制限されると、構造エントロピー(ΔS_{conf})の低下が引き起こされる。エントロピーは系の持つ等価な状態の数(自由度)により定義されるため(式(10))、その数がN個からM個に減るとエントロピー変化量は式(11)のようになる。

$$S^{\circ} = RT \ln N \text{ (cal} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}) \quad \dots(10)$$

$$\Delta S^{\circ} = RT \ln (M/N) \text{ (cal} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}) \quad \dots(11)$$

タンパク質側鎖などが複合体形成に伴い固定され、回転自由度を失うと、完全に自由だった回転異性体1個につき $0.4 \text{ kcal mol}^{-1}$ の構造エントロピーを損失する。これは約2倍の結合定数変化に相当する。このような構造エントロピーの変化は、これまで脱水和に伴う溶媒エントロピーの変化に比べて

小さく無視できるものと考えられてきた。しかしながら、近年の溶液NMR技術の発展により、タンパク質の構造エントロピー変化を実験的に見積ることができるようになったことで、時に複合体形成におけるエントロピー変化の総量に匹敵するほどの無視できないエネルギー項目として再注目されつつある^[3~5]。

タンパク質複合体形成におけるエントロピー変化の実験的測定

結合定数から複合体形成の自由エネルギー変化量(ΔG_{tot})を逆算し、等温滴定型熱量測定(ITC)や結合定数の温度依存性(van't Hoffプロット)からエンタルピー変化量(ΔH_{tot})を導出することで、その差分である複合体形成に伴うエントロピー変化の総量(ΔS_{tot})を求めることは比較的容易である(式(12))。しかしながら、結合によるエントロピー変化は、タンパク質(ΔS_{pro})、リガンド(ΔS_{lig})、溶媒(ΔS_{solv})に起因するエントロピー変化の和であり^[6]、その要因を理解するためには、それぞれの寄与を何らかの方法で見積もらなくてはならない(式(12))。

$$\begin{aligned} \Delta G_{\text{tot}} &= \Delta H_{\text{tot}} - T \cdot \Delta S_{\text{tot}} \\ &= \Delta H_{\text{tot}} - T \cdot (\Delta S_{\text{pro}} + \Delta S_{\text{lig}} + \Delta S_{\text{solv}}) \text{ (cal} \cdot \text{mol}^{-1}) \end{aligned} \quad \dots(12)$$

溶媒排除効果による ΔS_{solv} の増大は、経験的にそれらを導き出す式(9)が提案されている。一方、タンパク質やリガンドのエントロピー変化量は、それぞれ分子全体の動きを反映する回転並進エントロピー(ΔS_{RT})と分子の内部運動に起因する構造エントロピー量の変化(ΔS_{conf})に細分化できる(式(13))。このうち ΔS_{RT} は結合前後の分子量に依存する項目であるため、結合前後での分子量変化から算出することができる。一方、 ΔS_{conf} は複合体形成により側鎖の回転、ループの振動などタンパク質が内包するps-ns時間スケールの運動性が変調を受けるとその値が変化する^[7]。タンパク質にはms- μ s時間スケールのより遅い運動も内在し^[8,9]、これらはタンパク質の機能発現において重要とされるが^[8]、このような遅い運動は一般的に協同的で独立な構造異性体の数が限定されるため、構造エントロピー変化には大きく寄与しないと考えられている^[4]。

$$\Delta S_{\text{pro}} = \Delta S_{\text{conf}} + \Delta S_{\text{RT}} \text{ (cal} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}) \quad \dots(13)$$

溶液NMR法は、他の構造生物学的手法と異なりタンパク質分子の内部運動を水溶液中でありのまま

に解析できるため、 ΔS_{conf} の解析に最適である。溶液NMR実験で各種核磁気緩和速度を測定することによりLipariとSazaboにより提唱されたモデルフリー解析などを通じて^[10,11]、ps–ns時間スケールの局所運動を分離・定量することができる。モデルフリー解析において、ある原子間結合がどれだけ乱雑に運動しているかは、オーダーパラメーター (S^2) を用いて表現される。 S^2 は0から1までの値を取るが、観測した原子間結合が分子全体に対して完全

に無秩序に運動している場合には0、一定方向に配向している場合は1となる。ある結合が分子全体の動きに対して角度 θ の円錐内を自由に動けるとすると(diffusion-in-cone model, 図2挿入図)、その S^2 は以下のように表現される。

$$S^2 = (\langle 3\cos^2\theta - 1 \rangle / 2)^2 \quad \dots(14)$$

S^2 は結合の持つ自由度を示す値であり、構造エントロピーと直接関連付けられる。

$$S_{\text{conf}} = k \cdot \ln \pi [3 - (1 + 8S^2)^{1/2}] (\text{cal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}) \quad \dots(15)$$

図2には式(15)から計算される S^2 と S_{conf} の関係を図示した。異なる運動モデルを仮定すると、同じ S^2 でもエントロピーの絶対値は変化する。そのため S_{conf} の絶対値を求めることは困難である。しかしながら、どのような運動モデルを採用しても図2のグラフの相対的形状はほぼ一定であり、モデル依存的定数 C を付加した式(16)により近似することが可能である^[12,13]。また図からわかるとおり、 S^2 と S_{conf} は広い範囲で1次関数的な相関を示す。

$$S_{\text{conf}} = C + k \cdot \ln \pi [3 - (1 + 8S^2)^{1/2}] \quad \dots(16)$$

すなわち複合体形成前後での S^2 を比較することで、タンパク質局所の ΔS_{conf} を定量的に捉えることができる。NMR緩和測定においては、主鎖アミド、側鎖メチル基の S^2 を比較的容易に求めることが可能である^[10,11,14,15]。図3にはKayらにより提唱され

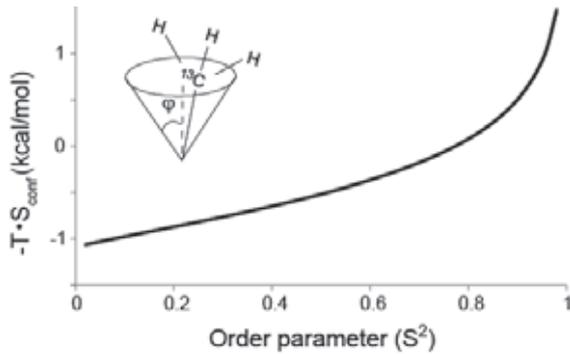


図2 オーダーパラメーターと構造エントロピーに由来するエネルギー変化。Diffusion-in-coneモデルを仮定した場合の298Kでの値。構造エントロピーの絶対値は仮定するモデルによって変化するが、グラフの形状に大きな変化はない(上下に平行移動する)。よってオーダーパラメーターの変化量に対する構造エントロピーの変化量はモデルによらずほぼ一定となる。

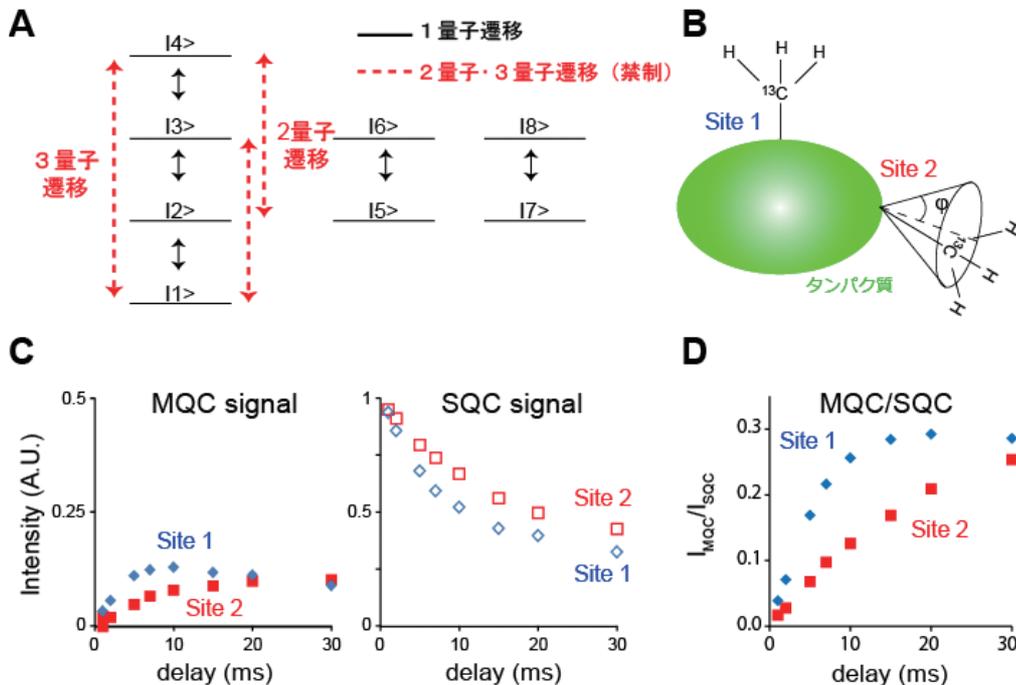


図3 メチル禁制遷移を利用した運動性解析：(A) メチル基のエネルギー準位と多量子(禁制)遷移(B) タンパク質中におけるメチル運動性の相違(C) タンパク質中のメチル基の多量子遷移と1量子遷移に由来するシグナルの時間依存性と(D) その強度比。Site1と2の運動性の違いを反映し異なった時間依存性が観測される。図中のグラフは、200 μM の分子量25kDaのタンパク質を用いて600MHz, TXIクライオプローブを用いて約1.5日かけて測定されたデータを基に作成した。

た禁制コヒーレンス遷移 (FCT) 解析による S^2 算出の概要を示した^[14, 15]。筆者らは高分子量タンパク質においても S^2 を求めることのできる本手法を様々な局面において利用しており、ここで少し詳しく述べたいと思う。図3Aにはメチル基のエネルギー準位と多量子 (禁制) 遷移を示した。メチル基は3個の水素核から構成されるため、ほかの官能基に比べて複雑なエネルギー準位を示しており、1量子遷移のみならず、2量子、3量子の多量子遷移も考えることができる。このうち多量子遷移はメチル軸周りの回転 (ps時間スケール) とメチル中心軸の運動が同一の時間スケールで起こっている場合には生じないが、タンパク質など回転相関時間が遅い分子中において、メチル基中心軸の自由度が制限されると、メチル軸周りの回転とメチル中心軸の運動に乖離が生じ、各遷移準位間で緩和速度の相違が生じる結果、普段起こらない多量子遷移が観測されるようになる。この現象は、周辺の水素密度が低くなることで各メチル基が磁氣的に隔離される重水素化タンパク質で特に顕著に観測される。ここで重要なのは、多量子遷移の生じる効率がメチル中心軸の速い運動性の度合いに依存する点である。この運動性が抑制されるほど多量子遷移が効率的に生じ、メチル基の多量子遷移と1量子遷移の強度比を測定すると、運動性を反映して異なった時間依存性が観測される (図3B-D)。ここでTRACTなどの実験から独立に求められる系全体の回転相関時間 τ_c が決まれば、式 (17, 18) によりメチル基中心軸の S^2_{axis} を求めることが可能である。

$$\left| \frac{I_{\text{MQC}}}{I_{\text{SQC}}} \right| = C \frac{\eta_{\text{tanh}} (\sqrt{\eta^2 + \delta^2_{\text{T}}})}{\sqrt{\eta^2 + \delta^2} - \delta_{\text{tanh}} (\sqrt{\eta^2 + \delta^2_{\text{T}}})} \quad \dots (17)$$

$$\eta = \frac{9}{10} [P_2(\cos\theta_{\text{axis, HH}})]^2 \frac{S^2_{\text{axis}} r_{\text{H}}^4 \hbar^2 \tau_c}{r_{\text{HH}}^6} \quad \dots (18)$$

(γ_{H} : 水素の核磁気回転比、 r_{HH} : メチル基における水素間距離、 δ : 周辺プロトン密度を反映する定数)

FCT法などにより求められる S^2 から、式 (16) に従って結合前後で個々の結合の持つ ΔS_{conf} を算出できる。積算的アプローチでは各結合の S^2 から求まる ΔS_{conf} を足し合わせることで、タンパク質の全体の ΔS_{conf} を推算する。たとえば主鎖の ΔS_{conf} は、N末端からC末端までのアミド結合の ΔS_{conf} の単純和として表現される。またアミノ酸側鎖内においては、側鎖全体の ΔS_{conf} を緩和解析により算出可能なメチル基の S^2 から見積もることが可能である^[16, 17]。例えばLeu側鎖全体の ΔS_{conf} は、2個の $C^\gamma - C^\delta$ 結合の S^2 変化の平均

(S_{avg}^2) から式 (19) のように算出される。

$$\Delta S_{\text{conf}} = -3.10 k \cdot \Delta S_{\text{avg}}^2 (\text{cal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}) \quad \dots (19)$$

一方Wandらは複数のカルモデュリン (CaM) 複合体のメチル基緩和解析およびITCによる結合の熱力学的解析を行い、結合前後での S^2 変化の合計値とタンパク質の構造エントロピー変化量が1次相関を示すことを見出している^[4, 18~20]。この1次線形相関関係から、 S^2 変化量に対するタンパク質の ΔS_{conf} 変化量を決定するのが経験的アプローチである。Kalodimosらによって行われたcatabolite activator protein (CAP) 変異体とDNAとの相互作用解析においても同様の1次相関関係が指摘されており^[5, 21~23]、最近では各残基の側鎖の持つ回転自由度により求めた S^2 変化を補正することで、CaMとCAPで行われた解析を統一的に満たす関係式も提示されている^[24]。Kalodimosらの解析においては、CAPに変異を導入するとDNAとの相互作用に伴うエンタルピー変化は大きく失われるが、複合体形成時のタンパク質構造の S^2 が低下し、 ΔS_{conf} に起因するエントロピー利得により野生型と同等の結合定数を示すことが知られている。この変異体において ΔS_{conf} の結合への寄与は -22 kcal/mol と試算されている^[22]。またAkkeらはGal3Cと低分子リガンドとの相互作用において、 ΔS_{conf} が結合に積極的に寄与していることを報告している^[25]。筆者らも多剤耐性転写制御因子 (MDTR) の運動性解析を通じて、MDTRが薬剤結合時に結合部位から遠く離れた部分における ΔS_{conf} を増大させる“運動性の再配分”を起こすことにより高親和性と多剤結合を両立するメカニズムを見出している。以上の結果は、タンパク質の ΔS_{conf} がタンパク質複合体形成において無視できない重要な要素であることを示している。

しかしながら、積算的・経験的アプローチともにタンパク質全体の ΔS_{conf} をNMR解析結果のみから、正確に算出する方法としての確立を見ているわけではない。積算的アプローチでは、誤差の蓄積が起こる可能性が否定できない。また経験的アプローチでは複数のタンパク質複合体に対する統一なパラメーターの導出が可能になった点は大きな進歩と言えるが、これが他のタンパク質にどこまで拡大適用できるかはまだ検証を要する。また運動が等方的でない膜タンパク質など、球状タンパク質と構造的特徴が大きく異なるタンパク質において同様な適用が可能かどうかは慎重な検討を要する。また両手法ともに S^2 変化量を算出した観測結合間に、協同的な運動が存在しない (あるいは存在するとして

も同程度である)ことを仮定している。一方、正確に ΔS_{conf} を求めようとすると、タンパク質中における観測核の密度を増やしていく必要があり、観測核間の相関は必然的に増大する。よって観測核間の協同性の評価は今後より重要になってくると思われる。以上のような課題はあるものの、さらなる技術開発や計算機科学的手法の融合により、NMRを用いてより正確に ΔS_{conf} を算出する手法の開発が進むと思われる。

5. おわりに

本稿ではタンパク質複合体の運動性が、そのエントロピーの性質を通じて複合体形成の親和性に重要な影響を及ぼすことを議論し、 ΔS_{conf} を定量的に算出する唯一の実験的手法としての溶液NMR法について解説した。X線結晶構造解析においても、温度因子がタンパク質分子の運動性を反映するという議論があるが、温度因子は結晶中の分子の並進的な差異をも包含する。また運動性の時間スケールが失われていることにも注意を要する。先にも述べたように、 ΔS_{conf} の算出において重要なのは、協同性の低い速い運動性である。緩和実験によるタンパク質の運動性解析においては、分子の回転相関時間付近に相当する、いわゆるsupra- τ_c 領域の運動性を評価することが難しい。残余双極子(RDC)実験により解析可能な当該領域の運動性の存在が、 ΔS_{conf} にどのような影響を与えるのかは今後の課題である。また本稿で述べたようにタンパク質複合体の形成時には結合に伴うタンパク質複合体の構造的な揺らぎのみならず、周辺の水、特異的結合に起因するエンタルピー変化も考慮する必要がある。個々の実験はその一部を明らかにするのみであり、横断的な理解には、様々な実験科学的手法、さらには計算機科学的手法を融合的に適用する必要がある。また溶液NMR法を用いた運動性解析の発展から、 ΔS_{conf} の重要性が再認識されたように実験技術の進歩が、タンパク質相互作用ひいては生命現象のより深い理解につながることも指摘したい。

今回はあまり述べなかったが、結合の熱力学的性質は特異性を決定する重要な要因である。筆者らは、NMR解析などを通じてMDTRの一種であるLmrRが、特異的相互作用に依存するエンタルピー的相互作用を排除し、エントロピー的相互作用を行うことで様々な薬剤に対する汎特異的相互作用を成立させていることを見出している。またタン

パク質複合体の形成は、タンパク質が生理効果を発揮する際の第一歩に過ぎない。タンパク質複合体の形成は、結合部位のみならず遠位の立体構造や構造平衡にアロステリックな影響を及ぼす。例えばGタンパク質共役型受容体(GPCR)に細胞外からリガンドが結合すると、結合したリガンドの性質に応じてGPCRの構造平衡が変化し、細胞質側におけるGタンパク質の活性の度合いが調整される^[26]。このような場合においてもタンパク質の持つ構造平衡からその機能を理解する研究はますます重要となってくる。その際、タンパク質が機能とは関係なく、単純に保持する柔軟性と機能につながる機能的運動性(functional dynamics)を明確に区別する方法論の確立が必要となる^[8]。このような手法の確立は、薬剤・タンパク質複合体の静的な立体構造に依存した従来の“構造創薬(Structure based drug design)”を、より動的でダイナミックな文脈でとらえる“立体構造に導かれた創薬(Structure Guided Drug Development)”に発展させる上でも重要であり、その際にはタンパク質の持つ運動性を生理条件で定量的に解析可能な唯一の手法としての溶液NMR法が非常に重要な役割を果たすことを確信している。

参考文献

- [1] Hilser, V.J., Garcia-Moreno E, B., Oas, T.G., Kapp, G. & Whitten, S.T. (2006) A Statistical Thermodynamic Model of the Protein Ensemble. *Chemical Reviews* **106**, 1545-1558.
- [2] Cabani, S., Gianni, P., Mollica, V. & Lepori, L. (1981) Group contributions to the thermodynamic properties of non-ionic organic solutes in dilute aqueous solution. *Journal of Solution Chemistry* **10**, 563-595.
- [3] Akke, M. (2012) Conformational dynamics and thermodynamics of protein-ligand binding studied by NMR relaxation. *Biochem Soc Trans* **40**, 419-23.
- [4] Wand, A.J. (2012) The dark energy of proteins comes to light: conformational entropy and its role in protein function revealed by NMR relaxation. *Curr Opin Struct Biol*.
- [5] Kalodimos, C.G. (2011) NMR reveals novel mechanisms of protein activity regulation. *Protein Sci* **20**, 773-82.
- [6] Zhou, H.X. & Gilson, M.K. (2009) Theory of free energy and entropy in noncovalent binding. *Chem Rev* **109**, 4092-107.
- [7] Karplus, M., Ichiye, T. & Pettitt, B.M. (1987) Configurational entropy of native proteins. *Biophysical Journal* **52**, 1083-1085.
- [8] Osawa, M., Takeuchi, K., Ueda, T., Nishida, N. & Shimada, I. (2012) Functional dynamics of proteins revealed by solution NMR. *Curr Opin Struct Biol* **22**, 660-9.
- [9] Mittermaier, A.K. & Kay, L.E. (2009) Observing biological dynamics at atomic resolution using NMR.

- Trends Biochem Sci* **34**, 601-11.
- [10] Lipari, G. & Szabo, A. (1982) Model-free approach to the interpretation of nuclear magnetic resonance relaxation in macromolecules. 1. Theory and range of validity. *Journal of the American Chemical Society* **104**, 4546-4559.
- [11] Lipari, G. & Szabo, A. (1982) Model-free approach to the interpretation of nuclear magnetic resonance relaxation in macromolecules. 2. Analysis of experimental results. *Journal of the American Chemical Society* **104**, 4559-4570.
- [12] Yang, D. & Kay, L.E. (1996) Contributions to Conformational Entropy Arising from Bond Vector Fluctuations Measured from NMR-Derived Order Parameters: Application to Protein Folding. *Journal of Molecular Biology* **263**, 369-382.
- [13] Li, Z., Raychaudhuri, S. & Wand, A.J. (1996) Insights into the local residual entropy of proteins provided by NMR relaxation. *Protein Science* **5**, 2647-2650.
- [14] Sun, H., Kay, L.E. & Tugarinov, V. (2011) An Optimized Relaxation-Based Coherence Transfer NMR Experiment for the Measurement of Side-Chain Order in Methyl-Protonated, Highly Deuterated Proteins. *The Journal of Physical Chemistry B* **115**, 14878-14884.
- [15] Tugarinov, V., Sprangers, R. & Kay, L.E. (2007) Probing Side-Chain Dynamics in the Proteasome by Relaxation Violated Coherence Transfer NMR Spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society* **129**, 1743-1750.
- [16] Diehl, C., Genheden, S., Modig, K., Ryde, U. & Akke, M. (2009) Conformational entropy changes upon lactose binding to the carbohydrate recognition domain of galectin-3. *Journal of Biomolecular NMR* **45**, 157-169.
- [17] Li, D.-W. & Brüschweiler, R. (2009) A Dictionary for Protein Side-Chain Entropies from NMR Order Parameters. *Journal of the American Chemical Society* **131**, 7226-7227.
- [18] Frederick, K.K., Marlow, M.S., Valentine, K.G. & Wand, A.J. (2007) Conformational entropy in molecular recognition by proteins. *Nature* **448**, 325-9.
- [19] Lee, A.L., Kinnear, S.A. & Wand, A.J. (2000) Redistribution and loss of side chain entropy upon formation of a calmodulin-peptide complex. *Nat Struct Biol* **7**, 72-7.
- [20] Marlow, M.S., Dogan, J., Frederick, K.K., Valentine, K.G. & Wand, A.J. (2010) The role of conformational entropy in molecular recognition by calmodulin. *Nat Chem Biol* **6**, 352-8.
- [21] Popovych, N., Sun, S., Ebright, R.H. & Kalodimos, C.G. (2006) Dynamically driven protein allostery. *Nat Struct Mol Biol* **13**, 831-8.
- [22] Tzeng, S.R. & Kalodimos, C.G. (2009) Dynamic activation of an allosteric regulatory protein. *Nature* **462**, 368-72.
- [23] Tzeng, S.R. & Kalodimos, C.G. (2012) Protein activity regulation by conformational entropy. *Nature* **488**, 236-40.
- [24] Kasinath, V., Sharp, K.A. & Wand, A.J. (2013) Microscopic insights into the NMR relaxation-based protein conformational entropy meter. *J Am Chem Soc* **135**, 15092-100.
- [25] Diehl, C. et al. (2010) Protein flexibility and conformational entropy in ligand design targeting the carbohydrate recognition domain of galectin-3. *J Am Chem Soc* **132**, 14577-89.
- [26] Kofuku, Y. et al. (2012) Efficacy of the β 2-adrenergic receptor is determined by conformational equilibrium in the transmembrane region. *Nat Commun* **3**, 1045.



竹内 恒 (たけうち・こう)

産業技術総合研究所 創薬分子プロファイリング研究センター・主任研究員

2003年 日本学術振興会特別研究員。2004年東京大学大学院薬学系研究科機能薬学専攻博士課程修了。2005年 ハーバード大医学部ポストドクトラルフェロー。2006年日本学術振興会海外特別研究員。2010年より産業技術総合研究所。〔専門〕構造生物学。2010年 日本核磁気共鳴学会会員。



嶋田 一夫 (しまだ・いちお)

東京大学 大学院薬学系研究科・教授

1980年東京大学大学院理学系研究科生物化学専攻修士課程修了。1980年(株)東レリサーチセンター・構造化学研究部入社。1987年(財)東京都臨床医学総合研究所・生理活性物質研究部入所。1989年東京大学薬学部薬品物理化学講座助手。1994年より同大学大学院薬学系研究科生命物理化学教室教授。2001年産業技術総合研究所生物情報解析研究センター分子認識解析チームチームリーダー併任。2008年産業技術総合研究所バイオメディシナル情報研究センターセンター長併任。2013年産業技術総合研究所研究顧問併任。〔専門〕構造生物学。2002年 日本核磁気共鳴学会会員。

DNP(動的核偏極)

～その基礎原理から最新の応用研究まで～

大阪大学基礎工学研究科

根来 誠

DNP(動的核偏極)は、誕生から60年かけてじっくりと発展していった。現在では様々な試料において、極低温下でDNPを行うことで、通常のNMR分光やMRIに比べて一万倍程度高感度な測定が可能である。具体的には、ポリマー、リゾチーム、膜たんぱく質、バクテリオファージ、薬品、アミロイドなどの高感度分析、細孔物質の界面解析などへと適用されている。また、高偏極化した物質を溶かして体内に注射することで、代謝イメージング、pHイメージングが可能で、がん治療の効果判定にも応用されている。本稿では、DNPの基礎原理について説明し、歴史的経緯に沿って上記の応用を紹介していく。また、試料を室温に保ったまま一万倍程度の高感度化が可能となる「トリプレットDNP」についても紹介する。

DNPの基礎原理

NMR分光やMRIは、通常室温で数から数十テスラ(T)の静磁場下で行われる。このような環境下での原子核スピンのZeemanエネルギーは熱エネルギーよりも非常に小さいため、熱平衡状態のスピンの向きはほとんど揃っていない。スピンの向きが揃っている程度を示す偏極率を、

$$P = \frac{N_{\uparrow} - N_{\downarrow}}{N_{\uparrow} + N_{\downarrow}}$$

と定義する。 N_{\uparrow} は上向きスピンの数、 N_{\downarrow} は下向きスピンの数である。磁場強度 B_0 、温度 T 下の環境において、磁気回転比 γ のスピンの熱平衡状態での偏極率は、Maxwell-Boltzmann分布則より、

$$P = \tanh \frac{\hbar \gamma B_0}{2kT}$$

と表される。例えば、標準的な固体NMR分光の環境である9.4T、300K下での ^1H スピン偏極率は0.0032%である。NMRの感度はこの核スピン偏極率に比例する。

1953年、Overhauserは、核スピン偏極率が外部

からの操作によって向上できることを発見した^[1]。これが動的核偏極と呼ばれる現象で、具体的には不対電子が試料中に存在している場合に、電子スピンの共鳴周波数近傍のマイクロ波を照射することで核スピン偏極率が向上することを示した。

DNPのメカニズムには、Overhauser Effect、Solid Effect、Thermal Mixing、Cross Effectなどがある^[2~5]。ここでは、代表的なSolid Effectについて説明する。静磁場下の電子スピンと核スピンの2スピン系を考える。このような系のエネルギー準位図を図1に示す。スピン間に相互作用がない系では状態 $|1\rangle$ は、電子スピンが下向きで核スピンが上向きの $|\downarrow_e \uparrow_n\rangle$ を表す。状態 $|2\rangle$ 、 $|3\rangle$ 、 $|4\rangle$ はそれぞれ $|\downarrow_e \downarrow_n\rangle$ 、 $|\uparrow_e \uparrow_n\rangle$ 、 $|\uparrow_e \downarrow_n\rangle$ である。 $|1\rangle - |4\rangle$ 間と $|2\rangle - |3\rangle$ 間は禁制遷移である。熱平衡状態の占有率は丸の数で表される。電子スピンの方が ^1H スピンよりも磁気回転比が660倍大きいので、電子スピン偏極率の方が660倍高い。スピン間に双極子相互作用がある場合は、 $|1\rangle$ は一次の摂動を考慮すると、 $|\downarrow_e \uparrow_n\rangle + q |\downarrow_e \downarrow_n\rangle$ となる。 q は双極子相互作用強度に比例し、核スピンの共鳴周波数に反比例する。 $|2\rangle$ 、 $|3\rangle$ 、 $|4\rangle$ は、それぞれ、 $|\downarrow_e \downarrow_n\rangle - q |\downarrow_e \uparrow_n\rangle$ 、 $|\uparrow_e \uparrow_n\rangle - q |\uparrow_e \downarrow_n\rangle$ 、 $|\uparrow_e \downarrow_n\rangle + q |\uparrow_e \uparrow_n\rangle$ である。そして、 $|1\rangle - |4\rangle$ 間の遷移確率は q^2 に比例する有限値になる。 ω_e と ω_n をそれぞれ電子スピンと核スピンの共鳴周波数として、 $|1\rangle - |4\rangle$ 間のエネルギー差に相当する $\omega_e + \omega_n$ の周波数のマイクロ波を照射すると、 $|1\rangle - |4\rangle$ 間の占有率が交換する。すると、 $|1\rangle - |3\rangle$ 間、 $|2\rangle - |4\rangle$ 間が非平衡となり、電子スピンの T_1 緩和で $|3\rangle$ から $|1\rangle$ へ、 $|4\rangle$ から $|2\rangle$ へと非可逆的に遷移する。最終的に、核スピン偏極率が電子スピンと同等の偏極率に向上され、理想的には660倍の高感度化が可能になる。 $|2\rangle - |3\rangle$ 間にマイクロ波を照射しても同様に高感度化できる。Thermal MixingとCross Effectは電子スピン2個と核スピン1個の3

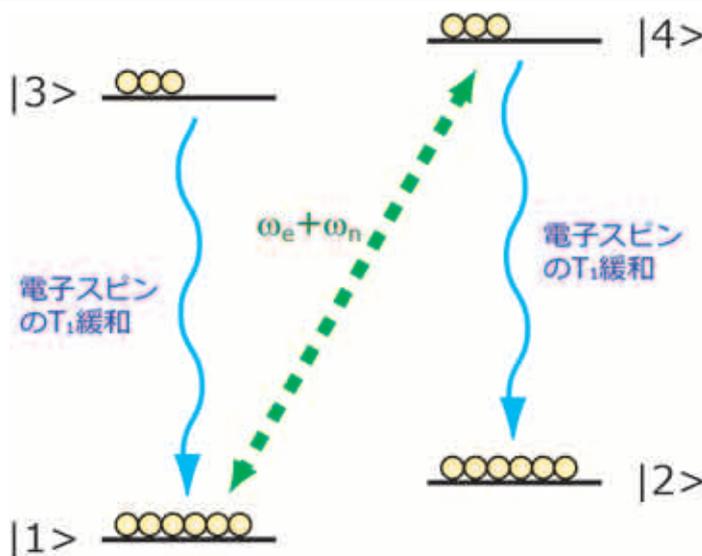


図1 電子スピンと核スピンの2スピン系のエネルギー準位図

スピン過程であり、やはり660倍の高感度化が可能となる。

DNP の応用

DNPは、非常に限られた試料でしか実現されていなかった1960年代から、基礎物理学研究のために用いられてきた。原子核物理学の分野では、加速した粒子を核偏極したバルク固体標的へと衝突させ、その散乱の様子から原子核内部構造を探る研究が進められた^[2]。この種の偏極標的を用いた散乱実験は、現在でもCERNの長期実験計画に盛り込まれている。また、物性物理学の分野では磁性の研究に用いられた^[3]。

DNPのNMR分光への応用はまず1970年代後半から80年代にかけて、ポリマーに適用された^[4]。そして、1997年にGriffinらによってX線解析に用いられる水とグリセロールの凍結ガラス中に不対電子を持つフリーラジカルと一緒に溶かしたリゾチームの高偏極化に成功し、ここから本格的な固体NMR分光への応用が始まる^[5,6]。このときのサンプル温度は77K以下の低温で、マイクロ波源には140GHz帯のジャイロトロンを用いており、5Tの高磁場下で実験が行われた。磁場強度が高ければ高いほど分解能と感度は良くなるため、さらなる高磁場化が目指されていった。そして、高磁場下でもCross Effectによって高効率なDNPが可能となる水溶性ピラジカルを開発し、現在は10Tを超える磁場下でのDNPが可能である^[5,7]。2001年にはバクテリオファージに^[8]、2006年にはアミロイドに^[9]、2008年には膜貫通性たんぱく質に適用された^[10]。2010年には細孔物質の高偏極化が実現され、界面

の解析が行われた^[11]。新薬開発や様々な新材料開発にも応用されている。

2003年にはArdenkjaer-Larsenらによって、極低温下でDNPを行ってから水に溶解させることで、一万倍高偏極化した偏極率30%程度の液体を得ることができるようになり^[12]、DNP法の液体NMR分光、そしてMRIへの本格的な応用が始まる。同年、ねずみに高偏極化された尿素を注射してその灌流¹³C MRIに成功する^[13]。2006年にはピルビン酸による代謝イメージングに成功し^[14]、2007年には化学療法の効果判定に応用され^[15]、2008年には腫瘍のpHイメージングが行われた^[16]。2013年にはがん患者への臨床研究が行われた^[17]。ピルビン酸以外の代謝物質では、つい最近グルコースの代謝イメージングに成功した^[18]。シングレット状態を利用した長寿命化によって^[19]、今後はさらに使用可能な代謝物質が増え応用範囲が広がると期待される。

トリプレット DNP

熱平衡状態の電子スピンを偏極源とした場合の同環境下での偏極率向上の限界は660倍であるため、さらなる高感度化を目指す上で低温環境が必要となる。ペンタセンなどの光励起三重項状態(図2)の電子スピンを偏極源に用いるDNP(トリプレットDNP)では、この限界を超えて高偏極化・高感度化が可能になる。光励起三重項状態では項間交差(intersystem crossing)の際の選択則によって、分子に応じてスピン占有率が決まっている。ペンタセンでは温度・磁場に依存せずに、73%と非常に高い電子スピン偏極率となる。

1993年、Henstraらによって、Integrated Solid

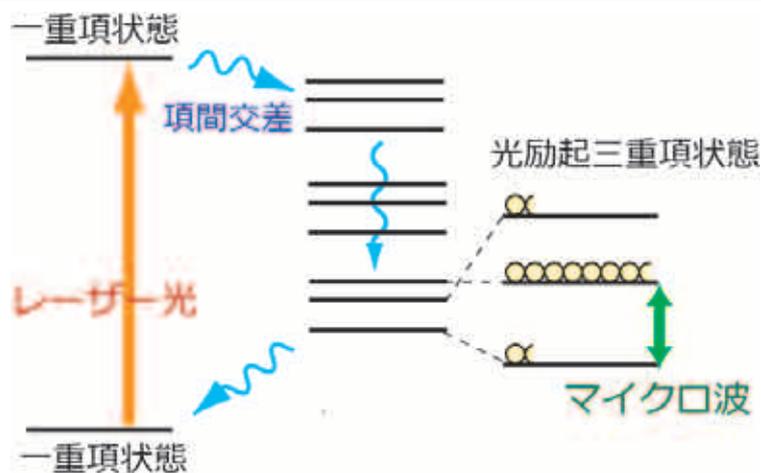


図2 ペンタセン分子のエネルギー準位図

Effectを用いて効率的にトリプレットDNPを行うことで、試料を室温に保ったまま ^1H スピン偏極率を、0.35T、室温下の熱平衡状態の5500倍である0.66%まで高めることに成功した^[20]。その後日本で活発に研究され、飯沼らが室温で1.3%の ^1H スピン偏極率を得ることに成功し^[21]、武田らが105K下で ^1H スピン偏極率を、ペンタセンによる原理限界である73%まで向上することに成功した^[22]。そして、筆者らは p -terphenyl結晶中の ^1H スピン偏極率を、試料を室温に保ったまま34%まで向上することに成功した^[23]。

むすびに

本稿では、DNPの基礎原理と歴史的な経緯、現在の応用研究に関して説明した。物理学者・NMR専門家によるDNPメカニズムの理解、技術者によるミリ波技術・低温技術の発展、材料科学者による新規偏極剤の開発や試料調整技術の開発、そして生化学者や医学者による応用の開拓を、上手く並行して進められたことが成功の背景にある。本稿で紹介した多岐にわたる応用研究は測定時間の短縮のみならず本質的な進歩であり、今後も益々の発展が期待される。トリプレットDNPでは、試料を室温に保ったまま、偏極率を34%まで向上できるというブレークスルーが示された。通常の固体NMR分光が行われる環境下での熱平衡状態の偏極率の実に一万倍である。これにより、従来の熱平衡状態の電子スピンを用いる方法より低コストで高感度が達成できること、さらに、低温を嫌う生物物質や樹脂材料の高感度化への応用が可能になることが期待される。これまでは基礎物理研究に用いられるのみであったが^[24, 25]、最近凍結ガラス状態での高偏極化に成功しており^[26]、今後は従来DNP法の歴史

と同様にNMR分光やMRIへの応用研究が発展していくことが期待される。

参考文献

- [1] Overhauser, A. W., (1953) Polarization of nuclei in metals, *Phys. Rev.* **92**, 411-415.
- [2] Jeffries, C. D., (1963) *Dynamic Nuclear Orientation*. Interscience Publisher, New York.
- [3] Abragam A. and Goldman, M., (1982) *Nuclear Magnetism – order and disorder*. Clarendon Press, Oxford.
- [4] Wind, R. A., *et al.*, (1985) Applications of dynamic nuclear polarization in ^{13}C NMR in solids, *Progress in NMR Spectroscopy* **17**, 33-67.
- [5] Maly, T., *et al.*, (2008) Dynamic nuclear polarization at high magnetic fields, *J. Chem. Phys.* **128**, 052211.
- [6] Hall, D. A., *et al.*, (1997) Polarization-enhanced NMR spectroscopy of biomolecules in frozen solution, *Science* **276**, 930-932.
- [7] Matsuki, Y., *et al.*, (2012) Helium-cooling and -spinning dynamic nuclear polarization for sensitivity-enhanced solid-state NMR at 14 T and 30 K, *J. Magn. Reson.* **225**, 1-9.
- [8] Rosay, M. *et al.*, (2001) Sensitivity-enhanced NMR of biological solids: Dynamic nuclear polarization of Y21M fd bacteriophage and purple membrane, *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 1010-1011.
- [9] van der Wel, P. C. A., *et al.*, (2006) Dynamic nuclear polarization of amyloidogenic peptide nanocrystals: GNNQQNY, a core segment of the yeast prion protein Sup35p, *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 10840-10846.
- [10] Mak-Jurkauskas, M. L., *et al.*, (2008) Energy transformations early in the bacteriorhodopsin photocycle revealed by DNP-enhanced solid-state NMR, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 883-888.
- [11] Lesage, A., *et al.*, (2008) Surface enhanced NMR spectroscopy by dynamic nuclear polarization, *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 15459-15461.
- [12] Ardenkjaer-Larsen, J. H., *et al.*, (2003) Increase in signal-to-noise ratio of > 10,000 times in liquid-state NMR, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 10158-10163.
- [13] Golman, K., *et al.*, (2003) Molecular imaging with endogenous substances, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 10435-10439.
- [14] Golman, K., Zandt, R., and Thaning, M., (2006)

- Real-time metabolic imaging, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 11270-11275.
- [15] Day, S. E., *et al.*, (2007) Detecting tumor response to treatment using hyperpolarized ^{13}C magnetic resonance imaging and spectroscopy, *Nature Med.* **13**, 1382-1387.
- [16] Gallagher, F. A., *et al.*, (2008) Magnetic resonance imaging of pH in vivo using hyperpolarized ^{13}C -labelled bicarbonate, *Nature* **453**, 940-943 (2008).
- [17] Nelson, S. J., *et al.*, (2013) Metabolic Imaging of Patients with Prostate Cancer Using Hyperpolarized [^{13}C]Pyruvate, *Science Trans. Med.* **5**, 198ra108.
- [18] Rodrigues, T. B., *et al.*, (2014) Magnetic resonance imaging of tumor glycolysis using hyperpolarized ^{13}C -labeled glucose, *Nature Medicine* **20**, 93-97.
- [19] Warren, S. W., *et al.*, (2009) Increasing Hyperpolarized Spin Lifetimes Through True Singlet Eigenstates, *Science* **27**, 1711-1714.
- [20] Henstra, A., Lin, T.-S., Schmidt, J., and Wenckebach, W. Th., (1990) High dynamic nuclear polarization at room-temperature, *Chem. Phys. Lett.* **165**, 6-10.
- [21] Iinuma, *et al.*, (2005) Proton polarization with p-terphenyl crystal by integrated solid effect on photoexcited triplet state, *J. Magn. Reson.* **175**, 235-241.
- [22] Takeda, K., (2009) Triplet State Dynamic Nuclear Polarization. VDM Verlag, Saarbrücken.
- [23] Tateishi, K., *et al.*, (2014) Room temperature hyperpolarization of nuclear spins in bulk, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 7527-7530.
- [24] Negoro, M., Tateishi, K., Kagawa, A., and Kitagawa, M., (2011) Scalable Spin Amplification with a Gain Over a Hundred, *Phys. Rev. Lett.* **107**, 050503.
- [25] Tateishi, K., *et al.*, (2013) Hyperpolarization of Thin Films with Dynamic Nuclear Polarization Using Photoexcited Triplet Electrons, *J. Phys. Soc. Jpn.* **82**, 084005.
- [26] Tateishi, K., Negoro, M., Kagawa, A. and Kitagawa, M., (2013) Dynamic nuclear polarization with photoexcited triplet electrons in a glassy matrix, *Angew. Chem. Int. Ed.* **52**, 13307.



根来 誠 (ねごろ・まこと)

2005年 大阪大学基礎工学部電子物理学科 卒業

2006年 日本核磁気共鳴学会会員

2011年 大阪大学大学院基礎工学研究科博士後期課程 修了
博士(理学)(大阪大学)取得

2011年 大阪大学大学院基礎工学研究科 助教 現在に至る

Gorterの失敗(下)

京都大学

寺尾 武彦

これまでに述べたようにGorterは凝縮系のNMRを二度試みてともに失敗したが、今回はその後の関連した動きをまとめたい。

ネガティブな結果を発表することは稀なことであったが、Gorterは周囲に勧められて^[1]、どちらの失敗実験もオランダの出版社エルセビアが1934年に創刊したばかりのジャーナルPhysicaに発表している^[2,3]。ネガティブな結果でも公表すれば科学界に何らかの影響を与える可能性がある。NMRを開発しようとした研究者たちはGorterの失敗実験をどう受け止めたのであろうか。第二次世界大戦の影響でPhysicaを手に入れるのは当時かなり困難であったため、PurcellらがGorterの二つの論文をマイクロフィルムで読んだときにはかなり準備が進んでいた^[4]。Purcellらは、Gorterが同じような実験をして検出できなかったことを知り、たいそうがっかりしたが、今さら実験を中止する段階にはなかった。それに、彼らは、試料を測定前に長い間磁場中に置いておき、かつ磁場を非常に均一にすることによってGorterの困難を克服できると考え、実行に移した。一方、Blochは、何か事を始めるに当たって文献を念入りにチェックしたりしないし、他人が既に発見していることでも自分で再発見して

研究することを好む人だったので、GorterがNMRの試みに失敗したことを全く知らなかった^[5]。これは無知が幸いするという稀な例の一つである、とBlochは言っている^[6]。事前に知っていればやらなかった可能性もあるということだろう。他方、分子線共鳴を実現させたRabiとRamseyは、1944年のある晩ケンブリッジで一緒に過ごし、戦争終了後の実験計画を立てた^[7]。有力なアイデアの一つは発振器への影響によるNMR信号の検出だった。嬉しいことにS/Nの見積もりも良く、本気で取り組もうとしたが、Gorterが同じことを試みて不成功に終わったことを知って他の実験より優先順位を下げた。PurcellやBlochよりも早い時期にアイデアを得たが、彼らと違ってアイデア段階でGorterの論文を知ってしまった。こちらは知ることが負の効果をもたらすという稀な例の一つと言えよう。RabiとRamseyには残念な影響を与えたものの、Gorterの失敗実験の発表が結果的にNMRの開発を遅らせることにならなかったのは幸いである。

凝縮系でのNMRを成功させたPurcellら^[8]およびBlochら^[9]の実験は失敗したGorterらの1942年の実験とは何が違ったのだろうか。3グループとも電磁的検出を採用し、CW法で検出を試みている。しかし、GorterらがLC発振器のコイルに試料を入れて共鳴点近傍で発振周波数がずれるのを検出しようとしたのに対し、PurcellおよびBlochのグループは、発振器の周波数は一定でその出力を試料を入れた共振器に導き、前者はスピンのrf電力の吸収を、後者は横磁化の運動による誘導起電力を測定することによって共鳴を検出しようとした。また、Gorterは常温では十分な周波数のシフトを期待できないため低温で測定を試みたのに対し、PurcellとBlochは常温で実験を行った。これらのことによってGorter方式が受けるさまざまな制約を、意識はしなかったものの自動的に回避できている。核スピンの T_1 についてのまともな理論ももちろんデータも皆無な中で、PurcellとBlochは T_1



図1 Cornelis Jacobus Gorter(1907-1980)

が1時間あるいはそれ以上長い可能性を想定していたが、たまたま採用した試料の T_1 は幸いなことに短くて、それぞれ10ms(パラフィン)と2s(水)であった。これらの短い T_1 は常温での速い分子運動のなせる技であり、低温では用いた試料の T_1 がたまたま短い確率は非常に小さい。しかも、10msという T_1 は初めて信号を検出するには理想的であるが、Gorter方式には短すぎて検出は不可能になる。Blochらは最初探した範囲には共鳴が見つからず、最終的には磁場をかなりあげてから電源を切った。そのとき信号がオシロスコープを横切るのを観測した。速い断熱通過によって初めて共鳴が観測されたのだ。このやり方では T_1 程度の時間待った後に行えば T_1 が何時間であろうと信号が観測されるが、Gorter方式に適用したとすると周波数測定を行う間もなく共鳴点を通過してしまう。Gorterの失敗は、一般に長い T_1 のせいにはされているが、前回述べたように実はそれほど長いわけではなく、Gorterが採用した検出法が成功する条件を厳しくしていることによるといえる。

Gorterが最初に試みた熱測定によるNMRの検出はその後、成功している。まず、サイクロトロン共鳴に適用され、次いでESRおよびNMRで信号が観測された。ESRの最初の実験例では室温でDPPHを試料として行われ、感度は通常の方法と比べ少なくとも同程度であった^[10]。NMRはすべて極低温で行われており、最初の論文では強磁性体中の ^{57}Co およびフェリ磁性体中の ^{55}Mn がゼロ磁場で検出された^[11]。これら磁性体では核磁化の歳差運動が超微細結合を通して整列した電子磁化を変調するため信号が著しく増大することが熱検出を行いやすくしており、その後さまざまな磁性体で熱的検出が行われてきた。非磁性体では金属アルミニウムおよび常磁性イオンをドープした Ca^{19}F_2 (図2)に対する応用例がある^[12]。それぞれ1.8Tおよび0.94Tの磁場中で1.2Kの温度で測定された。 T_1 は前者で1.5s、後で10s程度以下であった。Gorterの実験に比べて高磁場かつ低温であることがスピン系が吸収する電力を大きくしていることが成功の原因の一つであろう。おそらく T_1 も短く、さらに吸収電力を増大させているであろう。低温のため試料の比熱が小さいことや温度測定技術の向上も感度改善に貢献している。熱測定の装置はきわめて単純で、送信器は連続波の周波数をスイープするだけであり、受信器は試料の温度を測るだけである。受信器は本質的に完全に広帯域であり、かつ

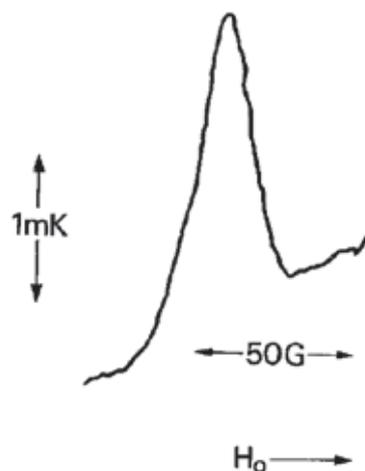


図2 熱測定による CaF_2 中 ^{19}F のスペクトル^[13]

強いrf磁場の照射中に信号が観測できる特徴がある。もし、有効な応用が見つかれば、温度上昇は磁場の二乗に比例するので現在でははるかに高感度で測定可能である。

発信器の周波数のシフトで共鳴を検出するという試みはGorter以外に誰も行っていないが、発信器への何らかの影響で検出することはCW法の一つとして行われた。なかでも“Pound box”とよばれたマージナル発信器^[13]がよく知られている。発信器の共振回路のコイル中に置かれた試料は共鳴点でrfエネルギーを吸収するので、発振強度の減少として共鳴が検出される。共鳴点付近でラジオ波帯磁率の分散成分は発振周波数をシフトさせるが、吸収成分は発振強度を減衰させるわけである。マージナル発信器は簡単であり、広い範囲で周波数を容易に変えられる利点がある。Purcell, H. C. Torreyとともに凝縮系のNMRを開発したR. V. Poundは自ら始めたゼロ磁場NQRにこの発信器を用い、共振回路の可変コンデンサーの軸をモーターで回転させて、どこに出るか分からない信号を探索した。では、もしGorterがこのような吸収成分に着目した方法を思いついていたとすれば、共鳴実験に成功したであろうか。吸収信号を観測するにはrf磁場の強度が T_1 に応じた最適値に近い必要があり、 T_1 が長いほど強度を弱くしないと信号が消滅してしまうので、 T_1 のわかっていない試料で信号をさがすのは慎重さを要する。しかし、Gorterは、熱測定の実験において、核スピンによるラジオ波エネルギーの吸収は、Boltzmann分布をあまり乱さないときに大きく起こると考えていた(この考えは間違っているが、ここではそれは問わない)にもかかわらず、ゼーマン準位間の占拠数の差を消失させるにあまりある強い H_1 を照射してしまっている。このこ

とを考えると、吸収成分に着目していたとしても成功は覚束無かったかもしれない。

ともあれ、検出に失敗したとは言え、Gorterが、史上初めて静磁場に垂直にrf磁場を照射し、その周波数を核スピン系のゼーマン分裂の間隔に一致させて共鳴を起こすことを思いついて実行に移した点は、大いに評価されてしかるべきであろう。最後に、Gorterは、NMRの失敗実験を除けばNMRの研究を行うことはなかったものの、NMRの発展に貢献したことが一つあることを述べておこう。それは交差緩和の現象の発見であり、Gorterらが常磁性緩和の研究で見いだしたものだ^[14~16]。これをBloembergenらが核スピンの場合にも拡張し、詳しい説明を行って、それが現在のNMRの礎の一つとなっている^[17]。

文 献

- [1] Interview of Dr. C. J. Gorter by John L. Heilbron on November 15, 1962, Niels Bohr Library & Archives, American Institute of Physics, College Park, MD USA, <http://www.aip.org/history/ohilist/4639.html>.
- [2] Gorter, C. J. (1936) *Physica*, **3**, 995.
- [3] Gorter, C. J., and Broer L. J. F. (1942) *Physica*, **9**, 591.
- [4] Gerstein, M. (1994) "Purcell's role in the discovery of nuclear magnetic resonance: Contingency versus inevitability", *Am. J. Phys.* **62**, 596.
- [5] Hahn, E. L. (1985) "Felix Bloch and Magnetic Resonance", *Bull. Magn. Reson.* **7**, 82.
- [6] Bloch, F. "Opening Lecture", *Proceedings of the Fourth International Symposium on Magnetic Resonance*, 1 (1971). Rehovot and Jerusalem.
- [7] Ramsey, N. F. (1985) *Bull. Magn. Reson.* **7**, 94.
- [8] Purcell, E. M., Torrey, H. C., and Pound, R. V. (1946) *Phys. Rev.* **69**, 37.
- [9] Bloch, F., Hansen, W. W., and Packard, M. (1946) *Phys. Rev.*, **69**, 127.
- [10] Pound, R.V., and Knight, W. D. (1950) *Rev. Sci. Instrum.* **21**, 219.
- [11] Schmidt, J., and Solomon, I. (1966) *J. Appl. Phys.* **37**, 3719.
- [12] Gill, D., and Shaltiel, D. (1967) *J. Appl. Phys.* **38**, 765.
- [13] Trodahl, H. J., and Turrell, B. (1973) *J. Low Temp. Phys.* **10**, 217.
- [14] de Vrijer, F. W., and Gorter, C. J. (1952) *Physica*, **18**, 549.
- [15] Smits, L. J., Derksen, H. E., Verstelle, J. C., and Gorter, C. J. (1956) *Physica*, **22**, 773.
- [16] Verstelle, J. C., Drewes, G. W. J., and Gorter, C. J. (1958) *Physica*, **24**, 632.
- [17] Bloembergen, N., Shapiro, S., Pershan, P. S., and Artman, J. O. (1959) *Phys. Rev.*, **114**, 445.



寺尾 武彦 (てらお・たけひこ)

1966年、京都大学理学部物理学科卒業。1973年、京都大学理学博士。1975年、京都大学理学部(化学科)講師。同助教授、同教授を経て、1995年、京都大学大学院理学研究科教授。2005年、定年退職、京都大学名誉教授。2008年、ISMAR Fellow。2011年、日本核磁気共鳴学会名誉会員。

若手研究者渡航費助成金について

NMR学会では、NMR研究を行う若手研究者が海外で行われる国際会議(学会・シンポジウム等)で自分の研究成果を発表する場合、あるいはNMR Practical course等の測定・解析技術の実践を学ぶ学術集会へ出席する場合の渡航費を補助します。NMR関連会議等のほか、生物・化学・物理系、材料・高分子系など基礎科学から応用科学の海外国際会議等のNMR関連研究発表への渡航助成についても広く募集します。

◆ 応募資格

- ・応募時に会費納入済みの日本核磁気共鳴学会会員であり、35歳以下であること。
- ・大学院生、博士研究員、およびそれに準ずる者。
- ・他の旅費補助金を受けていないこと(本助成金で足りない部分を研究室等で補填するものは可とする)。
- ・所属する研究室において選考を経た後、同じ国際会議に対して1名のみ応募すること。

◆ 応募方法(詳細は学会ホームページ(<http://www.nmrj.jp/index.php>)をご覧ください。)

1. 応募書類

- ・若手研究者渡航費助成金応募申請書(様式指定、推薦理由、応募理由を記入のこと)
 - ・略歴(様式自由)
 - ・学会発表、論文リスト(様式自由)
 - ・参加予定の国際会議の発表要旨
- 以上の書類を電子メールに添付(PDF形式あるいはWord形式)して送付すること。

2. 応募期間

国際会議の開催時期に応じて、年に3回募集を行う。

- (A) 7-10月開催の学会は4月10日-5月31日を募集期間とする。
- (B) 11-2月開催の学会は8月1日-9月15日を募集期間とする。
- (C) 3-6月開催の学会は前年の12月1日-1月15日を募集期間とする。

3. 応募書類送付先

若手研究者渡航費助成金選考委員長 高橋 栄夫 (hid@tsurumi.yokohama-cu.ac.jp)

◆ 選考方法

若手研究者渡航費助成金選考委員会において、応募締切日までに受け付けた応募者からA、B、C各期に若干名の援助金受領者を選考し、各応募締切日から1カ月以内に、その結果を会長名で本人宛てに通知します。また受領者はNMR討論会において賞状をもって顕彰します。採択件数は年間5名程度とします。

◆ 助成額

助成額：1件あたり10万円

助成金の贈呈は参加報告書(下記参照)提出後となります。

◆ 報告の義務

援助金受領者は参加した国際会議等の参加報告書(書式はNMRニュースレターの投稿規定に従うこと)を帰国後1ヶ月以内に選考委員長宛てに提出してください。NMRニュースレター、機関誌および学会ホームページで参加報告書を公開します。

◆ 過去の本助成金採択者

平成25年7月－10月開催の学会に参加した助成金採択者

田中 孝 首都大学東京大学院 博士前期課程2年 5th APNMR Symposiumに参加

小倉 立己 横浜市立大学大学院 博士後期課程2年 5th APNMR Symposiumに参加

平成26年7月－10月開催の学会に参加した助成金採択者

伊藤 研悟 横浜市立大学大学院 博士後期課程2年 Euromar 2014に参加

奥下 慶子 東京農工大学工学部 特任助手兼博士後期課程1年 56th Rocky Mountain Conference on
Magnetic Resonanceに参加

YANG Chun-Jiun 名古屋大学理学研究科 博士研究員 ICMRBS 2014に参加

鴨志田 一 首都大学東京大学院 博士後期課程1年 ICMRBS 2014に参加

森本 大智 京都大学工学研究科 非常勤研究員 ICMRBS 2014に参加

若手研究者渡航費助成金選考委員 高橋 栄夫、朝倉 哲郎

5th APNMR 参加報告書

横浜市立大学大学院 生命ナノシステム科学研究科 生体超分子システム科学専攻 博士後期課程2年

小倉 立己

本学会の支援事業である若手研究者渡航費助成金の援助を受け、2013年10月27日から31日の間にブリスベンで開催された5th APNMRに参加しました。故京極好正先生、故阿久津政明様並びにご家族の皆様、株式会社LAシステムズ、日本核磁気共鳴学会朝倉哲郎会長をはじめ、関係者の皆様に心より御礼申し上げます。

本学会はオーストラリア第三の都市であるブリスベンで行われ、会場近くの川に沿って博物館や公園、学校などの施設があり、人が多く非常に活気のある場所でした。また本会はアジア中心ということもありそれほど大きなものではなかったのですが、各社がベンチトップ式NMRの展示を行っていたり、配布された資料にもその広告が入っていたりと、NMR装置の小型化で新分野の創出が期待されるものかと感じました。

私は本会にて、「Integrated metabolomics approach using ^1H - and ^{13}C -NMR spectra for evaluation of metabolic dynamics in complex microbial ecosystems」というタイトルでポスター発表を行いました。作物非食部の土壌微生物による分解過程の解析を、 ^1H や ^{13}C -NMR、HSQC-TOCSYといった各種測定手法を用いて計測し、各データを統合することにより植物の分解動態の明示化を行いました。また、分解に伴う微生物叢の変動も評価し、NMRデータとの相関解析を行うことにより、植物体の分解反応と分解微生物群の関係を評価しました。分解反応の解析を行う際、 ^1H -NMRのみではシグナルがオーバーラップし解析が難しい糖の領域を、 ^{13}C -NMRや2D-NMRを用いることで各シグナルの帰属を行うことが可能となり、糖から有機酸・アミノ酸への糖代謝をより詳しく評価することができ、ポスター発表の際に聞きに来てくださった方々に ^{13}C -NMRによる代謝動態評価や微生物叢解析、およびそれらデータの相関解析結果に興味を持って

わる微生物を評価できる、代謝物と微生物叢の相関解析について興味を持って頂きました。また私自身様々な方のポスターを拝見し、TOCSYのパルスデザインを変化させることによる検出シグナルの選択法の開発やヒツジのCallipyge mutationについての研究など、様々な分野の研究内容に触れることができたことも貴重な体験となりました。

本会ではNMRに関わる様々な方々の講演がありましたが、会場の注目を集めていた講演としてHorst Joachim Schirra先生の線虫を使ったメタボローム解析のお話がありました。Schirra先生は線虫のPhosphineガス抵抗因子であるdehydrolipoamide dehydrogenase (DLD)を発見し、NMRによるメタボローム解析や遺伝子解析などの手法を用いてDLDのPhosphine抵抗性作用の解明をしていました。Schirra先生のこの研究はScience誌にも掲載されており、NMRを用いたメタボロミクス研究が今後もこのような一流誌に貢献されればと期待されます。

Schirra先生の講演のほかに私が興味を引かれたのが、新規測定法を紹介されていた西山祐介先生、Hanudatta Atreya先生の講演でした。西山先生は0.75 mmの高速固体MASプローブを用い、radio-frequency driven recoupling法を用いることによる単位時間あたりのSNR向上が達成されていました。一般に固体NMRでは感度の問題があるものの、 ^1H 検出型解析を行うことは切望されていましたが、本手法では分子運動性の差異等から T_1 の異なる多様な有機物質が、比較的容易に ^1H 高速計測に移行できると期待されます。またHanudatta Atreya先生の講演では、GFT-projectionを用いたHSQC-TOCSYにより、オーバーラップする相関シグナルの単離を行う手法を構築していました。NMRを用いて複合成分の解析を行った場合、シグナルのオーバーラップが理由で正確に解析できないこともあり、そのためそれらのシグナルを単離して解析で

きるようになることで、NMRを用いたメタボロミクス研究のさらなる高度化が実現するものと期待されます。そのほかにも2D-NMRの計測時にどうしてもネックとなってしまう計測時間の短縮にMultiple Receiver法を用いた手法の開発など、私の用いて

こなかった興味深い手法の話がされ、非常にいい刺激を受けられる機会となりました。

最後になりましたが、今回このような機会を与えてくださいました日本核磁気共鳴学会に重ねてお礼申し上げます。

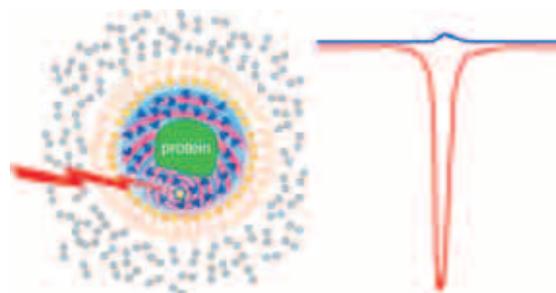
注目すべき最新の論文③

逆ミセルを用いたタンパク質の溶液NMRにおける動的核スピン偏極法

Reverse Micelles As a Platform for Dynamic Nuclear Polarization in Solution NMR of Proteins

K. G. Valentine et al., *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 2800-2807 (2014).

本論文では、不対電子スピンの大きな偏極を核スピンに移してNMRの検出感度を飛躍的に増大させる動的核偏極(DNP)を、水溶液中のタンパク質に適用するための新しい手法が提案されている。DNPをタンパク質のNMRに適用する場合、電子スピンの偏極を増大させるために行うマイクロ波の照射による試料の加熱と水溶液へのマイクロ波の吸収の不均一性が問題となる。必要最少量の水溶液を試料調製に使用すれば、試料の加熱を低減することができる。そして、試料を微粒子にすれば、水溶液の表面の水分子に優先的に吸収される性質をもつマイクロ波を、試料全体に到達させることが可能となる。有機溶媒中の逆ミセルにタンパク質とラジカルを封入することにより、これら2つが同時に達成される。本研究では、①逆ミセルの水相にラジカルとタンパク質を単純に混合して封入する方法、②タンパク質にラジカルを結合させて逆ミセルに封入する方法、③ラジカルが極性基に結合したリン脂質を含む逆ミセルにタンパク質を封入する方法が試され、いずれの方法でもタンパク質のNMRの検出感度が増大することが確認されたが、最も良好な結果が得られたのは③であった。



有機溶媒中の逆ミセルの内部の水相にタンパク質とラジカルを封入(左)。逆ミセルに封入された flavodoxin の¹H NMR シグナル(右)。DNP適用の有(赤)、無(青)の比較。(Reproduced with permission from the American Chemical Society)

[筑波大学 柴田友和]

平成23年度若手研究者渡航費助成金による The 5th Asia-Pacific NMR symposium参加報告書

首都大学東京大学院 理工学研究科 分子物質化学専攻 博士前期課程2年

田中 孝

この度、若手研究者渡航費助成金により第5回 APNMR (Asia-Pacific NMR Symposium) に参加させていただき、故京極好正先生、故阿久津政明様ならびにご家族の皆様、核磁気共鳴学会関係者の方々に心より御礼申し上げます。

第5回 APNMR Symposium はオーストラリア・クイーンズランドのブリスベンで10月27日から10月30日までの4日間開催されました。オーストラリアの春から夏に移り変わりつつある快い気候の中で学ぶことができました。ブリスベンは近代的なビルや歴史的な建造物が共存するオーストラリア第3の都市ですが、緑豊かで公園の多い街並みが特徴の美しい街でした。

私は本学会にて、「Structural analysis of proteins inside living sf9 cells by in-cell NMR spectroscopy」という題目でポスター発表を行いました。¹³C/¹⁵N 標識した培地で培養することによって streptococcus protein G B1 domain (GB1) を発現した sf9 細胞を試料として用いることにより、真核細胞内においては初となる蛋白質主鎖シグナルの帰属に成功したという内容でした。これまでに報告されている *Xenopus oocytes* や HeLa 細胞を用いた in-cell NMR では、単離・精製および高濃度に濃縮可能な安定同位体標識蛋白質が必要であり、単離・精製が困難であったり、不安定である蛋白質には適用できないといった問題点がありました。私達は真核細胞発現系として実績のある昆虫細胞 sf9/baculovirus 蛋白質発現系を用い、細胞内において GB1 を発現させることで測定試料とし、Non-Uniform Sampling (NUS) と Quantitative



学会会場の様子

Maximum Entropy reconstruction (QME) を組み合わせて用いることで良質な 3D 3重共鳴 NMR スペクトルの取得に成功しました。また、真核細胞を用いた in-cell NMR では初となる、細胞内における蛋白質主鎖の 80% 程度の帰属に成功しました。

本学会では、Gerhard Wagner を始めとした各国の著名な研究者や、アジア・オセアニア地域で活躍する若手研究者の発表を聞くことができました。蜘蛛や蛇といった、毒を有する生物に由来する蛋白質の構造解析など、特色ある研究が多く発表されていました。また、私が専門としている蛋白質の溶液 NMR だけでなく、材料化学に対する固体 NMR の進捗状況や、MRI を用いた研究状況を知ることができ、私自身の知見を広める良い機会となりました。各国において熱心に研究に取り組む研究者の話聞くことは非常に刺激的であり、今後は本学会で得た知識、経験を自身の研究へ最大限活用していきたいと考えております。

The 56th Annual Rocky Mountain Conference on Magnetic Resonance 参加報告書

東京農工大学 工学部 生命工学科 特任助手

奥下 慶子

私はこの度、本学会の若手研究者渡航費助成の支援を受け、2014年7月13日～7月17日までアメリカ合衆国コロラド州のカッパーマウンテンという標高3000m以上の高地で行われた56th Annual Rocky Mountain Conference on Magnetic Resonanceに参加させていただきました。日本核磁気共鳴学会長である内藤先生をはじめ、選考をいただいた先生方やその他の関係者の皆様に深くお礼を申し上げます。

このRocky Mountain Conferenceは、大きくEPRとSolid-state NMRのシンポジウムに分かれており、EPRについては毎年、Solid-state NMRについては4年に一度行われている学会です。参加者数については、EPRとSolid-state NMRではほぼ同様なNMRの方がやや多く、それぞれ100人程度でした。私自身は、Solid-state NMRのシンポジウムの方に参加していました。Solid-state NMRのセッションでは、DFTによる化学シフト計算を利用した構造解析、Cqの大きい多核測定のためのUltra-Wideline NMRのテクニック、膜タンパクの解析、DNPの無機系材料への応用がメインピックとなっていました。

なかでもUltra-Wideline NMRでは、広い励起幅をカバーするためにWURST-CPMG、BRAIN-CPというadiabaticパルスの利用やCPMGスペクトルの足し合わせを利用した手法を用いて実験を行っており、緩和時間の測定でも異方性が生じないように工夫されていたのが印象的でした。また、緩和時間の逆ラプラス変換を利用して、測定で得られたWidelineスペクトル線形を分離する方法についても紹介していました。このような緩和時間を利用したスペクトル分離の考え方は、複数の構造ドメインを含む系を解析対象としている自分自身の研究テーマにも適用しうる考え方であるため、今後の発展について注目していきたいと考えています。

またさらに、膜タンパクの解析ではthrough-bond/through-spaceの各種多次元スペクトルによ

る化学シフトの帰属の他に、PISEMAを用いた配向角の解析や各種 ^1H spin diffusion系の測定を駆逐することにより、生体膜中のモルフォロジー構造を解析するための秀逸な研究例を目の当たりにしました。最新の手法を用いた結果というわけではありませんでしたが、混合系でも緩和時間の差異をうまく利用することで、注目したい成分を定量的に解析できるという固体NMRの利点を、膜タンパクのような系の解析では最大限に利用しているということを実感できました。

私自身は、「Analysis of Local Structure and Morphology of Silk II type *Bombyx mori* silk fibroin via the solid-state 2D ^{13}C - ^{13}C DARR and Relaxation measurement」というタイトルでポスター発表を行いました¹。この発表では、特に分子間パッキングの異なる2種類の β -sheetが共存する家蚕絹のSilk II型構造中における、互いの β -sheetドメインの存在状態とドメインサイズがポイントとなっています。本研究では、化学シフトの帰属と β -sheet間の近接に関する情報を ^{13}C - ^{13}C DARRスペクトルにより解析し、ドメインサイズに関する情報は T_1^{H} 、 $T_{1\rho}^{\text{H}}$ といった緩和時間の値から得ました。今回解析した試料は結晶部と呼ばれる、最も β -sheet構造を取りやすい主要な繰り返し配列部分ですが、より複雑な実際の家蚕絹糸や各種応用条件下での構造と運動性を解析するためには、今回の学会で見聞きしたような定量的なspin diffusionの利用、緩和時間を利用した複数成分の分離手法が重要になると考えています。

最後になりましたが、今回の国際学会参加により、多くの研究のヒントを得ることができました。このような貴重な機会を与えていただき、ありがとうございました。

参考文献

- [1] Okushita, K.; Asano, A.; Williamson, M. P.; Asakura, T. *Macromolecules* 2014, **47**, 4308-4316

EUROMAR2014 参加報告書

横浜市立大学大学院 生命医科学研究科 生命医科学専攻 博士後期課程2年

伊藤 研悟

この度、本学会の第1回若手研究者渡航費助成金の支援を受け、2014年6月29日から7月3日の間にスイスのチューリッヒで開催されたEUROMAR 2014に参加しました。本助成金によりNMR国際学会に参加させていただいたことを、故京極好正先生と故阿久津政明様ならびにご家族の皆様、株式会社エルエイシステムズ、日本核磁気共鳴学会内藤晶会長をはじめ関係者の皆様にご心より御礼申し上げます。

欧州で最大規模のNMR学会である本会では、世界各国から先端的な研究者が集い、口頭発表及びポスター発表を含めると500題を超える発表が行われました。また、企業ブースではベンチトップ式小型NMRや新型オートサンプルチェンジャー、構造解析のソフトウェアなどの展示が行われており、NMRユーザーとして有益な情報を得ることができました。

私は本会にて、「Assignment of unknown metabolites by computing of correlated-signal based network, structure-explored graph isomorphism and shielding constants」と題したポスターを“Computation and Theory”の分野で発表しました。海藻類は産業的な利用価値が高いと考えられています^[1]、有用機能について評価されていない物質は多数存在しているため、海藻類の¹³C標識サンプルを作製し、多様なNMR計測法により代謝混合物群の網羅的な分析を行いました。しかし、従来法では帰属が出来ない未知シグナルが多数検出されたため、量子化学に基づく新規帰属法の構築および評価を試みました。まず、代謝混合物群を想定した標品の混合物を作製し、多次元NMR計測により得られた相関シグナルのネットワーク解析を行いました。分離されたネットワークの各ピークに対してデータベース検索を行い、得られた部分構造を組み合わせることで構造を推定しました。推定構造は標品の混合物中のものと一致し、安定配座の化学シフトの理論値は未知シグナルの実測値に

近い値となりました。また、同様の手法を¹³C標識海藻の代謝混合物スペクトルに適用し、データベース検索^[2]で100%一致したグルタミン酸の理論的な裏付けを行うことができ、混合物中の未知シグナルの帰属への可能性が示唆されました。聴講に来て下さった方々は、ネットワーク解析や構造推定の方法、配座解析に用いた自己組織化マップについて興味を持っていただく方が多い印象でした。ネットワーク解析においては、アルゴリズムやプログラムの議論を行い、推定部分構造の組み合わせ方や化学シフトの理論理の精度などについて指摘を受けました。また、我々が2014年に発表した海藻成分の統合解析の論文^[3]についても興味を持って頂いた方がいました。これらの議論を通して、論文化に向けてはネットワーク解析および配座解析の方法などをもう少し改良すべきだと考えました。

本会では、溶液NMRをはじめ、固体NMRやEPR、MRIの最新の研究内容を知ることができました。今回の口頭発表及びポスター発表の中で特に興味があった研究は、コンピューテーション、固体NMR、メタボロミクスの分野でした。自身が登録した“Computation and Theory”の分野の発表内容としては、MD計算によるシミュレーションとNMR、ESPを組み合わせたアプローチが多い印象でした。MD計算は、様々な分子の状態や現象を多様な条件下でシミュレートすることで知ることができ、本研究でも化学シフトの理論値を求める際に、最も存在しうる分子構造を推定するために用いました。D. Sezerらの発表では、MDシミュレーションを用いて水中におけるテンポールのDNP結合係数とその変化のメカニズムを報告し、また、MD計算によるDNAのESRスペクトルを報告していました^[4]。S. OlssonおよびD. LesovoyらはMD計算を用いたタンパク質のダイナミクスについての発表を行っており、これらのMD計算のアプローチは自身の研究においても参考になるものでした。また、I. Kuprovらの口頭発表およびポスター発表では、

“Spinach”^[5]というスピンダイナミクスのシミュレーションのためのソフトウェアライブラリの報告があり、GaussianやGAMESS、ORCAといった量子化学系の計算結果を取り込み解析ができるものでした。オープンソースとのことでしたので帰国後に使用してみました。GUIとしてはシンプルで使いやすいと感じましたが、機能面としてはまだ開発段階と考えられ、これからの機能の拡張に期待できると考えられました。また、“Metabonomics”の分野で発表された、間接次元ポイント数の軽減で計測時間短縮に結び付けられるNUS^[6]や、間接次元で高い分解能が期待できるASAP-HSQC^[7]などはとても興味深く、自身の研究でも使用してみたいと考えました。このような解析技術やNMR計測技術など、

私がまだ試したことのない技術が多くあり、良いインスピレーションを受けたと思います。

最後に、今回このような貴重な機会を与えてくださいました日本核磁気共鳴学会に重ねて御礼申し上げます。

参考文献

- [1] Date, Y. et al. (2012) *Polymer J.* **44**, 888
- [2] Chikayama, E. et al. (2010) *Anal. Chem.* **82**, 1653
- [3] Ito, K. et al. (2014) *Anal. Chem.* **86**, 1098
- [4] Sezer, D. and Roux, B. (2014) *Adv. Exp. Med. Biol.* **797**, 115
- [5] Hogben, H. J. et al. (2011) *J. Magn. Reson.* **208**, 179
- [6] Kazimierczuk, K. et al. (2010) *Prog. Nucl. Mag. Res. Sp.* **57**, 420
- [7] Schulze Sünninghausen, D. et al. (2014) *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 1242

日本核磁気共鳴学会「若手研究者渡航費助成金」 XXVIth ICMRBS 参加報告書

京都大学工学研究科分子工学専攻

森本 大智

この度、平成26年度第1回若手研究者渡航費助成金の支援を受け、8月24日から30日にかけてアメリカ合衆国のダラスで開催されたXXVIth International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems (ICMRBS)に参加しました。ダラスはアメリカ合衆国の南部に位置し、日中の気温は35度を超え、日本の夏に負けない過酷な暑さでした。食事はタコス等のメキシコ料理が多く取り入れられており、メキシコとの国境に近いダラスならではのものです。また、5日目の学会イベントでは、Perot Museum of Nature and Scienceという博物館を貸切り、懇親会を行いました。恐竜の化石や剥製を横目に議論や歓談することは国内で経験したことが無く非常に印象的で記憶に残る懇親会でした。

本学会では、100以上の口頭講演ならびに300以上のポスター発表が行われました。著名な研究者の最新の研究成果を直接聞くことができ、多くの情報収集することができました。特に、固体NMRやMRI、そしてNMRと他の分析ツール(SAXS等)との融合研究に関する研究発表が目立ちました。挑戦的(超高分子量)な観察対象や、より複雑な系に対する研究が積極的に行われていました。

本学会において私は、“Ubiquitylation directly in-

duces folding destabilization of substrate proteins”という題目でポスター発表を行いました。翻訳後修飾因子の一つであるユビキチン分子は、他の修飾因子(リン酸基やメチル基)に比べ分子量が大きく、基質タンパク質の物理的な性質(分子形状や分子運動)に影響を与えると考えられます。本研究では、ユビキチン化による基質タンパク質の熱力学的安定性への影響の検証を行いました。蛍光測定でユビキチン化による基質タンパク質の構造不安定化を確認し、さらにNH HeteroNOE測定により、ユビキチン化による基質タンパク質の構造摂動を検出しました。

発表の際、多くの先生から本研究に興味を持って頂き、沢山の議論を交わしました。また、議論の中で更なる課題(異なる時間スケールにおける緩和測定など)が見つかり、非常に有意義な学会となりました。本学会の参加により得た経験、知識を活かし、本研究をより一層発展させていきたいと考えます。

最後に、学会参加支援をして下さった故京極好正名誉教授、故阿久津政明氏、御家族の皆様、そして日本核磁気共鳴学会関係者の方々に深く感謝致します。

若手研究者渡航費助成金による XXVIth ICMRBSの参加報告書

首都大学東京大学 理工学研究科 分子物質化学専攻 博士課程後期1年

鴨志田 一

2014年8月24～29日の6日間、アメリカ合衆国テキサス州ダラスで行われたXXVIth ICMRBSへ参加しましたので報告致します。会場は日本から直行便で約12時間、ダラス・フォートワース国際空港から私鉄を利用して約1時間の所にある、ダラス市街地の一際目立つ建物、Hyatt Regency Dallasで行われました。本学会では、アメリカを中心にヨーロッパ、アジアといった世界中の多くの研究者たちが150を超える口頭発表、300を超えるポスター発表が行われました。開催期間中、ダラスは晴天に恵まれ、気温が連日40℃近くもあり、唸る暑さでしたが、会場内は冷房の効いた部屋で穏やかに行われました。

私はこのICMRBS 2014で「An In-Cell NMR



会場のHyatt Regency Dallas



口頭発表会場の様子

Study of Monitoring Stress-Induced Increase of Cytosolic Ca^{2+} Concentration in HeLa Cells」というタイトルでポスター発表致しました^[1]。内容は、代表的な Ca^{2+} 結合タンパク質の1つであるcalbindin D_{9k} タンパク質をヒト培養細胞であるHeLa細胞内に導入すると、NMR試料管内のストレス環境により、時間が経つにつれて細胞内の Ca^{2+} 濃度が上昇する様子を、*in vitro*と比較した結果、Calbindin D_{9k} の Mg^{2+} 結合型から Ca^{2+} 結合型へ2Dスペクトルの変化をモニタリングできたというものです。

本学会は、Macromolecular Dynamics, Amyloid Diseases, Proteins & Nucleic Acids, Membrane Proteins, Isotope Labelling & In Cell NMR, Intrinsically Disordered Proteins, Metabolomics, Paramagnetic Agentsなどのセッションに分かれていました。特にSAXS法を用いたタンパク質の立体構造の決定法やPCS、PREといった常磁性緩和効果を用いた長距離情報による立体構造決定法、また天然変性タンパク質を対象にした研究などが特に多くみられ、今一番ホットなテーマだと思いました。自分の研究テーマである*in-cell* NMRに関して言えば、本学会での報告はほとんどされておらず非常に残念でしたが、常磁性緩和効果や天然変性タンパク質などの研究は、当研究室の主な研究課題であり、*in-cell* NMRに応用可能であることから、



ポスター会場の様子

今後の発展研究に向けて大変勉強になり参考になりました。

今回の ISMRBS 2014 の全体を通して私が感じたことは、NMR だけでタンパク質の立体構造、ダイナミクス、または相互作用を解析するよりも、NMR が 1 つのアプリケーションとなって、SAXS などの他の測定手法と組み合わせにより、タンパク質の解析を行う研究手法が増えている点でした。今後はこのような手法を自分の研究にも取り込み発展させていくために、NMR に加え様々な他の手法についても幅広く理解を深めていく必要があると感じました。

次回 2016 年の ICMRBS は京都で行われます。今回の経験を生かし次回も参加できるよう研究に励み、良い結果を発表をできるよう頑張っていきたいと思えます。

最後になりますが、基金の設立にご尽力くださいました故京極好正先生、故阿久津政明様、その家族の皆様、また参加をご支援くださいました日本核磁気共鳴学会関係者の皆様に心よりの御礼申し上げます。ありがとうございました。

- [1] Hembram, D. S. S. *et al.*, *Biophys. Biochem. Res. Commun.* **438**, 653-659 (2013)

Report of Participation in the ICMRBS XXVI

Nagoya University, Postdoctoral Researcher

Chun-Jiun Yang

With the support from the Nuclear Magnetic Resonance Society of Japan, I attended the XXVIth International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems (ICMRBS) on August 24th-29th at Dallas, Texas. I would like to express my gratitude to committee members and sponsors giving me such a great opportunity to expand my knowledge and vision in the NMR field.

ICMRBS is one of the representative international symposiums for the solution-state and solid-state NMR applications to the biological system studies. NMR scientists all over the world got together to share their ideas and research results. I obtained a lot of information about different types of NMR methods and research targets through participating in the lectures given by these researchers. For instance, with the development of magic angle spin (MAS), the solid-state NMR has become a powerful technique for protein structures determination by using fast MAS frequencies and non-uniform sampling (NUS) schedule simultaneously, presented by Professor Tatyana Polenova. On another hand, Professor Hashim Al-Hashimi showed the non-canonical Hoogsteen base pairing existing at the high-energy state of the DNA conformation, which was determined by $R1\rho$ relaxation dispersion experiments, and suggested that the Hoogsteen base-pairing has much more biological importance than previously expected.

The title of my poster presentation is "Interface

Dynamics in FKBP12-ligand Complexes Studied by the High Pressure SAIL NMR Method". In this study, I focused on the aromatic ring flipping motions of Phe and Tyr residues in the free and the ligand-bound forms. By using the SAIL amino acids, I could determine the ring flipping rates of one Tyr and one Phe residue locating at the binding interface in the ligand bound states with high accuracy. To estimate the *extra* expanded volume for phenyl ring to flip, the "activation volume" was evaluated in three different types of FKBP12-ligand complexes by performing the high-pressure experiments. I got valuable suggestions from Dr. Ad Bax and Dr. Marius Clore during my presentation. In addition to learning from these authoritative scientists in NMR field, discussing to young researchers could also be very helpful in detail of technique skills and information. The way to study ring flipping motion in solid-state NMR by using deuterium spectra was taught by a postdoc in UIUC during the poster section. Seemingly, more and more researches will focus on the dynamics of aromatic rings beyond the well-established methods of methyl groups.

It is an excellent experience to communicate with foreign researchers and obtain information from them. It also stimulates me to work harder. Hopefully, I could also contribute to NMR society in the future.

固体クライオコイルMASプローブの開発

京都大学大学院理学研究科化学

竹腰 清乃理

1. はじめに

皆さんも身にしみてご理解の通り、信号ノイズ比 (Signal-to-Noise Ratio, SN比) が悪いことがNMRの弱点の一つである。そのため、特に、磁気回転比 γ が小さい核スピンのNMRは困難で、可能な場合は γ の大きな ^1H や ^{19}F からの分極移動 (INEPTやNOEやCPなど) やさらに γ の大きな電子スピンの分極移動 (DNP) などの信号強度増大法が適用されている。もちろん単に磁場強度の大きな磁場を用いることでも信号強度は向上するために、なんとか理屈をつけて、高額な磁場を導入して、後で困ることになったりする。また、試料の温度を下げるとCurie-Weiss則に従って核スピン分極が大きくなるためにSN比は向上する。この場合、緩和時間も長くなることが多いので、注意が必要である。

SN比を上げるもう一方の手段はノイズを減らすことである。NMRのSN比を関係するパラメータだけで記述すると以下の(1)式となる。

$$\text{SN} = \frac{V_s}{V_N} \propto \sqrt{\frac{Q \cdot \eta}{T_c + T_a}} \quad (1)$$

ここで、 V_s はNMR信号強度、 V_N は雑音強度、 Q はプローブ Q 値 (信号の検出効率)、 η はフィリングファクター (コイルの体積に試料体積が占める割合)、 T_c は検出コイルの実温度、 T_a は受信プリアンプ雑音温度 (雑音指数を温度換算したもの) である。つまり、検出コイルを冷やして、ついでに、受信プリアンプも冷やすと、受信系の雑音温度が低くなり、SN比が向上する。また、コイルの電気抵抗は交流の場合でも低温である程度低下するために、コイルを冷やすことで Q 値が高くなりSN比が向上する。実際に、溶液のNMRプローブでは、そのような受信系冷却が可能なプローブが市販されており、SN比として公称4~10倍程度の向上が可能だとされている。当然固体でも同じようなアプローチは有効であると考えられる。しかしながら、約10年前に我々が検討を始めた当時には、固体高分解能NMRを可能にするマジック角試料回転 (MAS)

を行い、かつ、受信系だけを冷却できるプローブ (以下、クライオコイルMASプローブ) は存在せず、誰もやってくれないし仕方がないので、自分で作ることにした。

我々は、平成17年10月から平成23年3月まで、科学技術振興機構・戦略的創造研究推進事業 (物質現象の解明と応用に資する新しい計測・分析基盤技術) の課題「材料開発に資する高感度多核固体NMR法の開発」において、クライオコイルMASプローブに関して当時は日本電子 (株) と称していた会社の水野チーム (現・(株) JEOL RESONANCE、略して、JRI) との共同で基礎研究を行った。通常のNMRプローブでは、 $T_c = 300\text{K}$ 、 $T_a = 70 \sim 90\text{K}$ 、 $Q = 100 \sim 200$ (周波数に依る) 程度であるが、我々の作成したクライオコイルMASプローブでは、 $T_c < 20\text{K}$ 、 $T_a < 15\text{K}$ 、 $Q = 400 \sim 600$ (周波数に依る) となり、感度向上率4倍以上を達成した。この感度向上はわかりやすく言うと信号の積算に1週間を要する測定が半日以内で終わるということである。以下に、我々が行った技術的な開発の歩みにしてまとめた。今後、この手の研究開発を行う人の参考になることを願っている。技術ノートというよりもむしろエッセイとして読んでいただきたい。

2. クライオコイルMASプローブ1号機の開発

作りたいプローブは (1) 試料温度はコイル温度と独立、(2) コイルは極低温、(3) 信号アンプは動作可能な温度、を満たす物である。乗り越えなければいけない問題点は、(1) に関してはコイルと試料管の間の断熱、(2) ではコイルの冷やし方、(3) では低温で動作するduplexer、さらには(4) MAS角調整法…などなどが山積みであった。

(1) に関しては、あまり断熱層を分厚くする (コイル径を試料径に対して大きくする) と、式(1)の η が低下してしまうために、どう設定するかが問題であるが、1号機ではChemagnetics社の5mmスピニングシステムを採用し、コイルの径を13mmと

大きめに設定した。これはこの時点では最終的な感度向上率を問題にするより、むしろいろんな課題をチェックできるプローブを早く作りたかったからである。(2)に関しては、当初は液体He槽にコイルを浸すデザインを考えたが、結局、液体Heフローで冷却するデザインを採用した(図1)^[1,2]。設計・製作には(株)クライオウェアの藤岡耕治氏の助けが大きく、2号機以下の製作にもご協力いただいている。効率的な冷却と機械的・電気的性能の両立を目的としてシルクハット状のサファイアピンを作成して、コイルを筒の部分に無電解Cuメッキを施して作成し、^{つば}銚の部分と液体Heの熱交換機を繋いで冷やす構造を採用した。

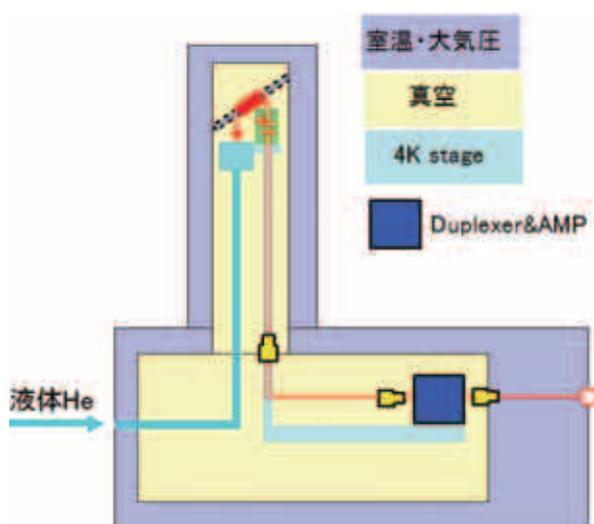


図1 平成18年10月時点のクライオコイルMASプローブのポンチ絵



図2 我が子(プローブ1号機)を抱く母((株)JEOL RESONANCE 水野)

(3)について、duplexerは信号アンプとコイルの間に inser するために、低温で動作することは必須であるが、従来のSiダイオードは低温で動作せず、なんらかの工夫が必要であった。研究のスタート時点では目途がついていなかったが、昼ご飯の道すがらの相談で解決策を思いついた。単に、低温で動作するGaAs系のダイオードを使えばよいと考えるかもしれないが、電圧に強いものは漏れが大きく、漏れが小さいものは電圧に弱いなど、Siダイオードをそのまま置き換えることはできない。そこで、これらを組み合わせることで目的を果たすことができると考え、実際に低温(～40K)で動作するものを作成できた^[3,4]。

(4)のMAS角調整法に関してはこの時点では誰かに突っ込まれたらいやだなあ～くらいの認識で、とりあえず、設計と同時に各部位の電子部品や部材などの室温～低温(4K)での物性評価を行い、平成20年度には1号機が完成した(図2)。対象は¹Hとした。これは、duplexerに使うλ/4長ケーブルが短くて収納が楽であり、購入した低温動作する信号アンプが高周波数で性能がいいからである。

以上のような準備・開発研究を重ねて、平成19年度中に1号機を作成し、性能評価を行った(図3)。室温でのプローブQ値は170とChemagnetics社の市販プローブのQ値230よりも低かったが、低温(～9K)では566と高くなり、同じ試料を用いた実測の比較で約3.4倍の感度向上を達成できた。この時点で竹腰のモチベーション～みんなが無理だっというからやっやろう～は昇華しているが、まだ、上記の(4)で挙げたMAS角調整法が未解決であり、また、¹Hじゃあ意味がないねえと言いやすい批判をする人もいて(こういうのは常に存在する)、磁気回転比γが小さい核スピンのクライオコイルMASによる感度向上を目指すべく、2号機の製作にとりかかった。

3. クライオコイル MAS プローブ 2号機の開発

2号機においては、1号機に比べてフィリングファクターを向上するべく、試料-コイル間のクリアランスを縮小した(5mmφの試料管外径に対して、コイル内径を13mmφから9mmφにした)。また、低周波数の観測核として、²H@7Tおよび⁶Li@14Tに対する単核共鳴回路を作り、これを用いてNMR測定を行った。その結果、⁶Li-NMRで市販のプローブと比較して3.05倍の感度向上を達成できた。図4にLiCoO₂の過剰なLiに伴うマイナーサイト間の交

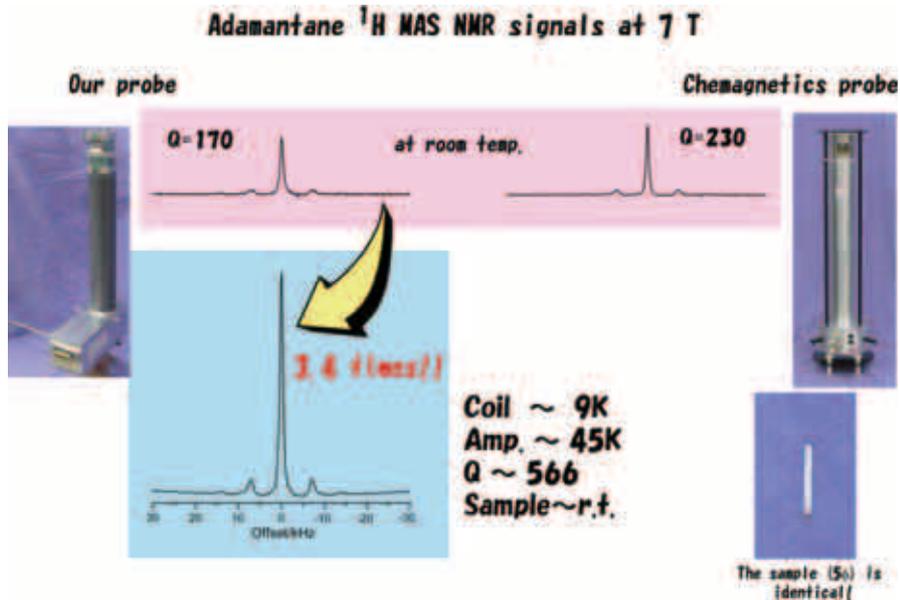


図3 1号機の性能アピール

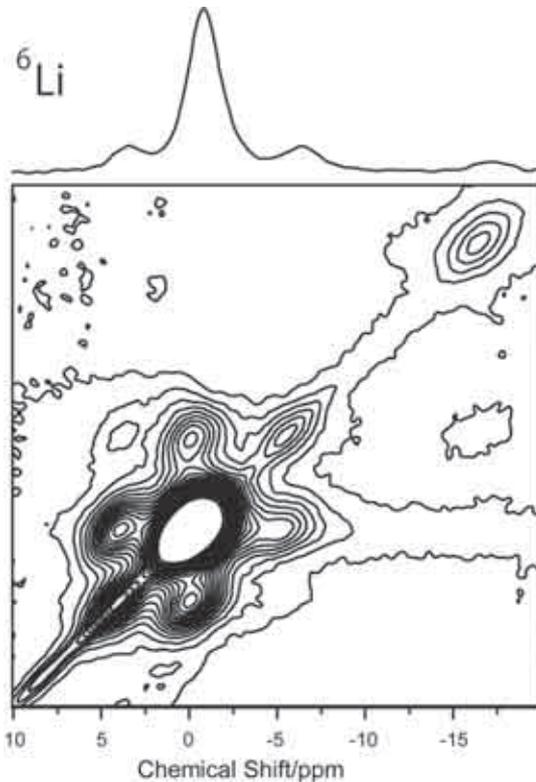
換 ^6Li - ^6Li スピン交換NMRスペクトルを示す。2Dが測定できることから長時間その性能が安定的に動作することを示すことができた。

マジック角試料回転角調整法であるが、従来プローブのようにコイルの機械的位置を調整することは、クライオコイルMASプローブの場合には難しい。そこで、機械的ではない方針でマジック角試料回転角を変化させ、その角度を精密に制御するための装置として、「マジック角微小制御用 X_0 シムコイル」を開発した^[5]。この方法はむしろSTMASのように 0.01° 精度のMAS角制御が必要な実験にこそ有用ではないかと考えて、現在、その原理、構造・構成、動作について論文執筆中である。

4. クライオコイル MAS プローブ 3号機

～未来へ

ここまで出来ると欲が出てきて、3号機では、試料-コイル間のクリアランスをさらに縮小し(5mm ϕ の試料管外径に対して、コイル内径を13mm ϕ →9mm ϕ →8mm ϕ)、当初の研究計画になかった禁断の ^1H - ^{13}C 二重共鳴実験に乗り出してしまった。二重共鳴というより、デカップルはいくらQ値が高くても必要パワー(W)が少ないからといっても、そう高くない真空では放電するのは自明であり、当初はやる気は全くなかったのだが、常に存在する単共鳴じゃあ意味がないねえと言いやすい批判をする人はやっぱり存在して、ちょっとやり始めてしまった。これに関しては、現在も完全には(みんなが普通に使うには)できていない。なんとか来年度までに目途を付けたいと考えている。

図4 LiCoO_2 の二次元 ^6Li - ^6Li 相関NMRスペクトル。交換時間は333 ms

また、Chemagneticsの試料管では困るというJRIの方のプローブの本質と関係ない意見で、4号機では、JRI社製のロータ長~22.5mmの専用4mm試料管とその回転機構(最高速度18kHz)を搭載した。

3号機までは測定に液体Heを用いていたが、大変なので(図5)、4号機以降では作成した冷凍機でHeを回収して用いるようにした。また、試料交換の際にプローブを磁場から出す必要があり、これも

大変なので、溶液のNMRプローブのように、磁場上部から空気圧で出し入れする機構を作成したようである。本質とは関係ないので、ここでは詳しく説明しない。共鳴周波数に関しても、現在では単共鳴ではあるが、ある程度広い周波数をカバーできるようになっている。

現在、このようにして作成したプローブを科学技術振興機構「先端計測分析技術・機器開発プログラム」「開発成果の活用・普及促進」の支援を受け、(株)JEOL RESONANCE、物質・材料研究機構、京都大学の3施設に設置して、産業界、研究機関、大学等に開放しています (<http://kuchem.kyoto-u.ac.jp/bun/Fukyu/>)。ちょっと感度向上のパワーを体験したいという方はぜひ上記制度を利用してみてください。

最後に、ほぼ二人三脚でここまで一緒に登ってきた(株)JEOL RESONANCEの水野敬氏と水野セブンと私が呼んでいる職人さんたち、特に、クライオウエアの藤岡さんに、われらは結構良く頑張ってきたよねえと感謝いたします。

参考文献

- [1] 「高分解能NMRプローブ」特許第493323号、出願日2007年3月28日；US Pat. 8/013608、出願日2009年6月19日
- [2] Mizuno, T., Hioka, K., Fujioka, K., and Takegoshi, K., (2008) Development of a Magic-angle Spinning Nuclear Magnetic Resonance Probe with a Cryogenic Detection System for Sensitivity Enhancement, *Rev. Sci. Instrum.*, **79**, 044706.
- [3] 核磁気共鳴装置用送受信切替回路および核磁気共鳴装置」特再公表2010-532956、出願日2008年10月8日；PCT公開 WO 2010/041712、出願日2009年10月8日；US. Appl. 13/121763、出願日2011年8月4日；EU. Appl. 09819246.1、出願日2011年6月24日
- [4] Mizuno, T. and Takegoshi, K., (2009) Development of a Cryogenic Duplexer for Solid-state Nuclear Magnetic Resonance, *Rev. Sci. Instrum.*, **80**, 124702.
- [5] 「NMRにおけるマジック角精密調整法及び装置」特開2011-075472、出願日2009年10月1日；US. Appl. 12/885861、出願日2010年9月20日；EU. Appl. 10185575.7、出願日2010年10月1日



図5 LiCoO₂の二次元⁶Li-⁶Li相関NMRスペクトルの交換時間依存性を測定する当時は博士研究員の野田君



竹腰 清乃理 (たけごし・きよのり)

1979年3月 京都大学理学部化学科卒業
 1984年3月 京都大学大学院理学研究科博士課程化学専攻修了(理学博士)
 1984年4月 カナダ プリティッシュコロンビア大学博士研究員
 1986年10月 米国 カリフォルニア大学バークレー校博士研究員
 1987年11月 材料科学技術振興財団研究員
 1988年8月 北海道大学高分子学科 助手
 1993年7月 京都大学理学研究科大学院 助教授
 2005年 日本核磁気共鳴学会会員
 2006年10月 京都大学理学研究科大学院 教授(現職)

$^{13}\text{C}/^1\text{H}$ DNP-MASプローブの開発

株式会社JEOL RESONANCE

中村 新治

1. 高磁場 DNP 法

未知試料の分子構造を解析する手法としてNMRは必要不可欠な手法となっている。その一方で、NMR分光法が電磁波の中で最も低いエネルギー帯にあたるラジオ波領域の周波数を利用するが故に、数ある分析機器の中で最も感度の低い分析法となっている。NMRが優れた分析法であっても、感度が低いことは、NMRを利用する研究者にとって大きなデメリットになっている。NMR装置開発の分野に携わる者にとっても、NMR信号の感度を向上させる技術の開発は非常に重要な課題となっている。

高感度化を実現する技術として、偏極率の大きな初期磁化を利用する方法がある。これを実現する最も直接的な方法は、高磁場磁石を利用することである。導入コストが高いことを除けば、NMR研究者にとって利用上のデメリットの少ない方法と

なっている。他の技術としては、DNPなどの高エネルギー遷移を利用する技術が近年盛んに開発されている。これらの手法は高感度化の面で見れば、磁場強度を上げるよりもはるかに高い感度を、高磁場磁石よりもはるかに低価格の導入コストで入手できると期待できる。しかしながら、多次元NMR法と併用できない手法であったり、分解能を犠牲にする手法である場合があり、汎用的な分析法とは言い難い面もあった。

検出法の工夫によって高感度化を達成しようとする手法がある。中でも極低温プローブと呼ばれる低温技術を利用したプローブは分析法としての汎用性を失わずに、高い感度を得られる方法として知られている。溶液試料に対してはUltraCOOLプローブ、固体試料に対してはCryoCoil MASプローブと呼ばれる装置が一般に利用することができるようになっている (JEOL RESONANCE 製)。両プローブに共通した原理は、検出コイルをはじめとする検出回路を極低温に冷却して、コイルの感度を高めると同時に、熱的なノイズを減少させることによって高感度化を実現することである。UltraCOOLプローブは従来の室温プローブと比較して4~10倍の感度が得られる (図1a)。その結果、従来比で1/25~1/100倍の短時間解析が可能となる。プローブ以外の付属装置としてギフォード・マクマホン冷凍機、ヘリウム圧縮機、真空排気ポンプ等のわりと大がかりな装置が必要となる。そのため導入コストは従来プローブの数倍となる。しかしながら、一旦起動、冷却してしまえば、すべては通常の室温プローブとほとんど変わらない使用感であることもあり、広く利用されるようになってきている。

高磁場DNP(Dynamic Nuclear Polarization、動的核分極)法は、電子スピンと核スピンの間で生じるオーバーハウザーが発見した現象を利用した高感度化法である^[1]。 ^1H に比べて約660倍高い共鳴周波数をもつ電子スピン遷移を飽和させることで大きな ^1H の初期磁化を得る方法である。従来DNPは低

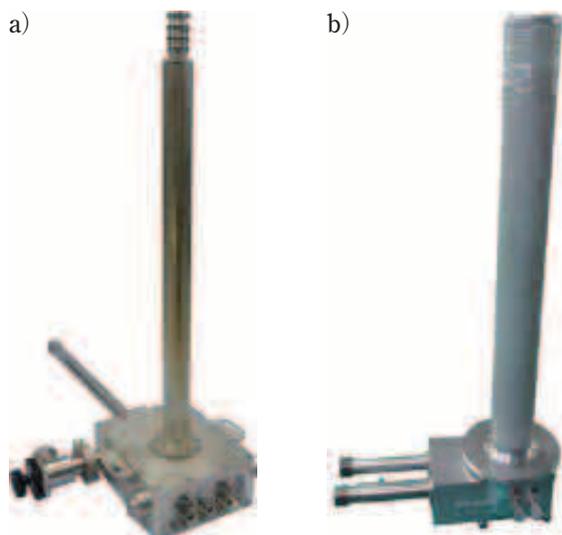


図1 a) UltraCOOLプローブ (600 MHz CHタイプ)。溶液試料を対象とした極低温プローブと分類されるプローブ。検出コイル等を冷却する方法で、高いNMR感度が得られる。高磁場にも適用できて、従来のNMRプローブの高感度版として置き換えが可能になる。b) DNP-MASプローブ (600 MHz 3.2 mm $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ DNP-MASプローブ)。低温固体試料を対象とした高磁場DNPを実現するNMRプローブ

磁場中に限られる現象と考えられてきたが、近年、高磁場中において高感度化が実現できることが実証されてきた。従来の固体NMRの感度に比べて、数百倍以上の感度が得られている。高磁場DNP法の原理として、試料を極低温にしなければならないことが求められるので、従来の固体高分解能NMR法に完全に置き換えられる手法ではない。それでも試料が極低温であることを除けば、高磁場DNPは実用性の高い高分解能固体NMR法と両立する手法であり、十分に汎用性の高い手法であるといえる。これまでに著者は大阪大学蛋白質研究所 藤原敏道教授と共同で高磁場DNP装置の開発を行ってきた^[2]。先のNMR学会誌Vol.3の技術レポートにて高磁場DNP装置の開発についての解説が成されている^[3]。この便利帳では、DNP-MASプローブ(図1b)を開発してきた開発者としての立場で、高磁場DNP装置の紹介を行っていきたい。

2. 主要装置の紹介

高磁場DNPに必要な主要な技術要件は、(1) 電子スピン共鳴周波数の発振器、(2) マイクロ波の伝送装置、(3) マイクロ波照射のできる極低温CPMASプローブ、(4) 極低温MASのための冷却装置である(図2)。以下では、これら装置を順に紹介する。

2.1. ジャイロトロン

高磁場中にある電子スピンを共鳴させる周波数を発信する装置が必要である。¹H共鳴周波数として600 MHzになる14.1 Tの磁場中での電子スピンの共鳴周波数は約400 GHzである。波長が0.75 mmであるためにサブミリ波と呼ばれる。効果的なDNP

のためには数ワット以上のサブミリ波の出力が必要とされており、ジャイロトロンといわれる光源がよく使われる^[4]。

2.2. 伝送系

サブミリ波を効率よく試料へ伝送する。ジャイロトロンからNMRプローブまでの伝送には、外径が数十mmのオーバーサイズ円形導波管が用いられる。市販されている銅管をそのまま使用して導波管として用いた場合でも、ほとんど減衰することなく伝送が可能である。この場合は非常に安価に製作することが可能である。サブミリ波のモードを気にするような実験では、コルゲート導波管と呼ばれる特別な導波管を用意するが、これは非常に高価である。

2.3. 試料調製

高磁場DNPでは特別な試料調製が必要になる。試料には電子スピンの供給元としてラジカル増感剤と呼ばれる化合物を添加する。ラジカル増感剤は研究対象となる物質と共に低温でガラス状態に転移するグリセロール-水マトリックスに分散させる(図3)。試料にサブミリ波が照射されると電子スピン遷移が飽和し、DNP現象により電子スピン近傍の¹H核スピンの分極が増大する。増大した¹H核スピン分極はスピン拡散によりガラスマトリックスと溶質分子の¹H核スピン分極を増大させるように拡散する。

2.4. 極低温MAS冷却システム

電子スピン分極は核スピン分極に比べて大きい。電子スピンの緩和が存在するために電子と¹Hの磁気回転比の差ほどの感度利得を得ることは実際にはできない。電子スピン緩和を抑えて大きな感

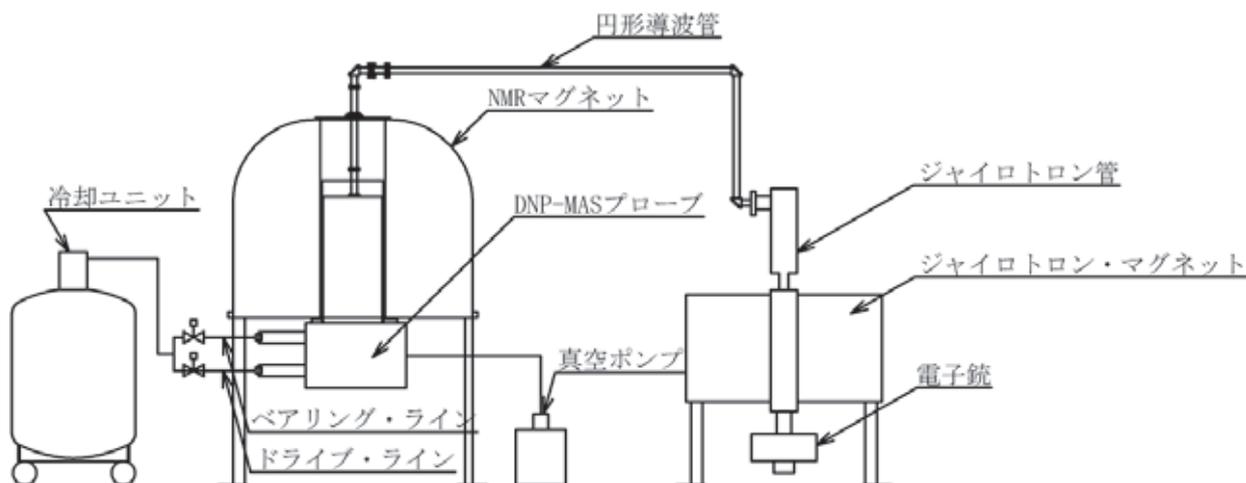


図2 高磁場DNP装置の主要な構成ユニット：左から冷却ユニット、NMRマグネットとDNP-MASプローブ、ジャイロトロン。ジャイロトロンとDNP-MASプローブの間に円形導波管が設置される。プローブには(場合によってはジャイロトロンにも)真空ポンプが必要になる。

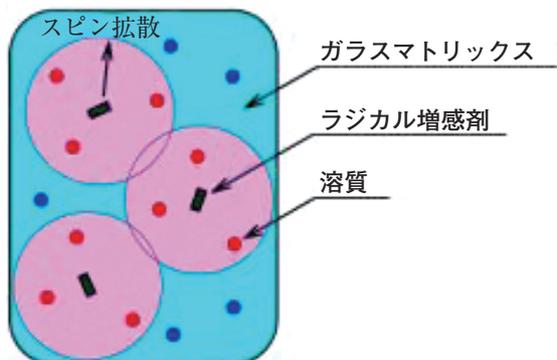


図3 DNP試料。ラジカル増感剤の近傍の溶質の核スピンの分極が増大するイメージ図。ラジカル増感剤として化合物トタポール、ガラスマトリックスとしてはグリセロール/重水/水の混合物が使用されることが多い

度増大の効果を得るには、できる限り試料を冷却する必要がある。現在のところ高磁場DNPに利用できると考えられているラジカル増感剤では100 K以下に試料を冷却しなければならない。

2.4.1. 90Kまでの冷却システム

90 Kまで試料を冷却したDNPを行うには、窒素ガスを冷媒とする冷却システムを利用するのが便利である。実際の運用の方法の一例として、高圧圧縮空気を原料として、窒素PSA (Pressure Swing Adsorption) を利用した窒素ガス発生装置を構成する方法がある(図4)。こうして得た低温ガスを固体試料管の回転駆動に必要なベアリングガスとドライブガスとして利用する。窒素ガスを冷却するために液体冷媒を定期的に補充すれば、安定して長時間の運用が可能なシステムを構築することが可能である。

2.4.2. 90K以下の冷却システム

電子スピンの緩和は低温ほど遅くなる。90 K以下の温度では温度変化に対して顕著に緩和が遅くなり、それだけDNPによる感度も飛躍的に増大する。低温では電子スピン分極と核スピン分極も温度に反比例して大きくなる効果があり、更に感度増大に寄与する。結果として、90 K以上のDNPに比べて一桁以上の感度増大が期待できる。

90 K以下の温度では冷媒ガスとしてヘリウムを利用する。比較的容易に実施できる方法の一つとして、液体ヘリウムを気化させて冷媒として使用する方法がある。この方法にて試料を20 Kから40 Kに冷却することができる。我々が実験結果として得た室温比数百倍の感度もこの方法を使って実現してきた。

2.5. DNP-MASプローブ

より高い感度を得るために試料温度はできるだ

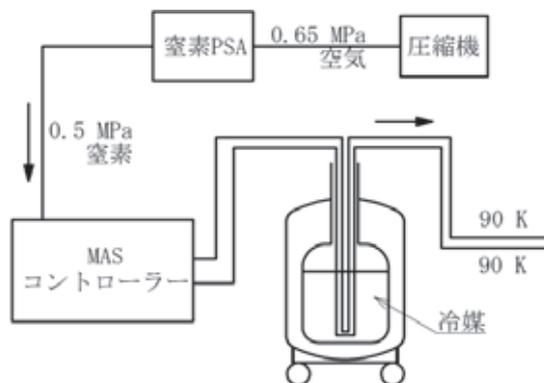


図4 窒素PSAを利用した固体低温MAS冷却システム

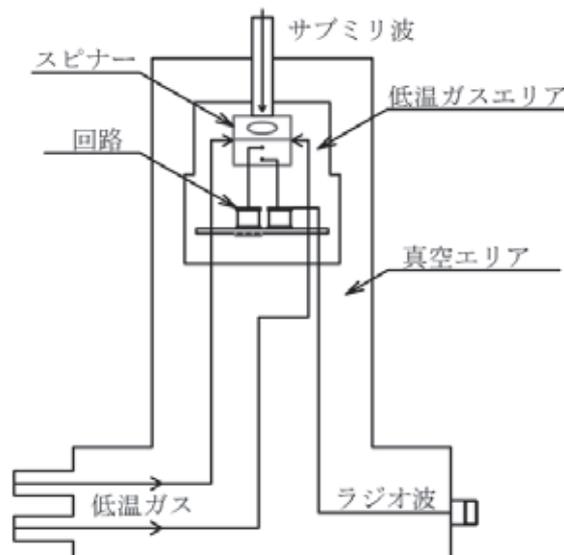


図5 プローブの概略図。MAS駆動のガスラインに低温ガスを使用する。MAS駆動に使われた低温ガスはスピナー全体と回路を冷却してプローブの外に排気される。低温エリアは真空エリアで覆うように配置して断熱構造を形成させる。サブミリ波は上部から導波管を使って導入する

け下げたい要求がある。一方で、冷媒を使用する量についてはできるだけ抑えたい要求もある。合理的な冷媒の使用量で試料を低温に維持できるプローブが求められる。固体高分解能NMRプローブにとってはMAS (マジック角試料回転) に必要なガス量が最低限必要なガス量となる。したがって、MASに必要なガス流量にて低温を維持できることが理想的である。我々のDNP-MASプローブではこれを達成するに十分な断熱性能を有するために、スピナーとNMR回路を低温ガスエリアに設置し、その周囲を真空断熱エリアで覆う構造を実現した(図5)。真空エリアを介しての熱リーク量は非常に小さいためにほとんど無視することができる。低温エリアを支持する構造体やガスを供給する配管等を介した熱リークについても低温技術を使って最小になるようにデザインした。結果として、ヘリウ

ムを使用した冷却システムと組み合わせて、試料温度20Kを達成することができた。同時に、DNP-MASプローブを90K仕様の窒素PSA固体低温MAS冷却システムと組み合わせた場合でも試料温度90Kを達成することができた。最も厳しい温度仕様に適合するようにプローブをデザインした結果である。MAS駆動のガスに低温ガスを利用したことの更なる利点として、試料管を含むスピナー全体を冷却することになり、結果として、試料内の温度分布を著しく小さくする効果が期待できる点にある。局所的に異なる温度のガスを吹き付ける冷却方式は、試料中に温度分布を生じさせ、その結果として、DNP感度に空間分布が生じさせてしまう可能性がある。

試料管の外径は3.2mmを採用している(図6a)。高磁場DNPでは多くの試料は必要ない。3.2mm試料管は室温窒素ガスで運用する環境では20kHz以上の高速試料回転も可能なので、高磁場で ^{13}C 核、 ^1H 核の固体NMRの応用研究に向いている。試料管の外見は従来の固体試料管と差異はない。しかしながら、サブミリ波照射、かつ極低温の環境に置かれるため、高磁場DNP向けの特種な仕様となっている。サブミリ波に対する透過性が高い材料であることが必須である。固体試料管で使用されることの多いセラミックスは透過性が高い材料である。多くを望まなければ選択肢は多い。ただし、試料を少しでも冷却したい目的には試料管自体がサブミリ波を吸収して発熱することは僅かでも避けたい。実際に我々が使用した試料管の材料の透過率は99%以上となっており、その発熱量は無視できるほど小さくなっている。スピナーの基本的なデザインはCP-MASプローブ採用のスピナーと同じである(図6b)。ガス軸受はジルコニアになっているため、極低温でも問題なく使用可能である。

導波管はスピナー上部から挿入し、NMR検出コイルと干渉しない位置に配置するようにした。サブミリ波は試料管の回転軸に垂直に照射される。試料回転したときには試料に対するサブミリ波の照射方向が変化するようになる。サブミリ波は実試料のような有機物質に対しては透過性が低い。照射表面からミリオーダーで大きく減衰する。結果、照射されていない側にある電子スピンはほとんど励起されない。試料回転した時には、実質的な照射面積が増加するので、高感度化を促進させる配置になっている。

NMR測定のための高周波回路の仕様としては汎用性の高い ^{13}C 、 ^1H 核を観測対象にしたCP-MASプローブと同程度の性能が最終的な目標となる。この目標に対してヘリウムガスの低い絶縁性が阻害要因になるとの予想があった。開発当初には、 ^1H 照射での放電が発生し、測定上の大変大きな制約となる問題であった。また $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ の二重共鳴化を実施する上で技術的な問題も抱えており実現できていなかった。ごく最近、これらの問題に対して大きな進捗があった。固体NMR測定に足りるCP照射、 ^1H デカップリング照射に成功し、極低温下において ^{13}C CP-MASスペクトルの取得に成功した。標準的な室温の固体プローブと比較したときには、まだまだ劣る部分があるが、我々の開発にとっては大きな進捗である。

3. DNP-MAS プローブの性能

これまで述べてきた装置を実際に使用して得た最近の結果を報告する(表1)。表中の数値は細かな実験条件に左右され変化する。また、実験当時の装置環境にて測定した結果であるために、最終的な目標値には達していない項目も存在している。それでも、かなり良好な結果が得られていると考え

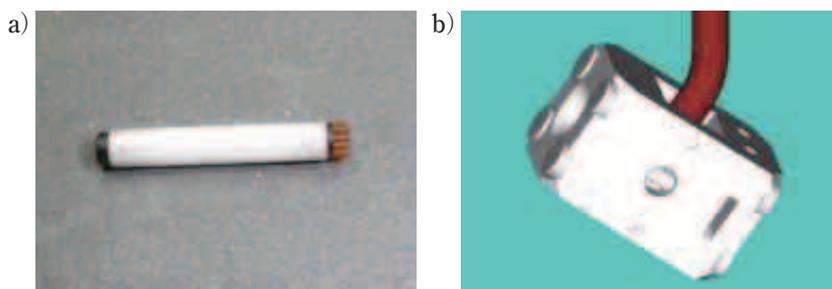


図6 試料管、スピナー、導波管。a) 3.2 mm試料管。写真はジルコニア製試料管。他にサブミリ波透過性の高い特別な窒素ケイ素製試料管、単結晶サファイア試料管もある。b) 3.2mmスピナー。CP-MASプローブデザインのスピンナーをベースにDNP-MASプローブ仕様に合わせて改良した。サブミリ波を伝送する導波管をスピナー上部に挿入する構造となっている

ている。当面の開発対象マグネットは ^1H 周波数で600 MHz、700 MHzとしている。高磁場DNPの開発の分野では世界最高レベルの磁場強度となっている。高磁場DNPの感度はクロス効果と呼ばれるDNP機構に支配されていると考えられており、その影響で、感度は磁場強度に反比例して減少する。そのため、高磁場ほど高感度を得にくい。N₂冷却の場合の室温感度比は予想に反してかなり低めの値になっているが、それでも、He冷却の場合比較した感度の結果は、試料温度を下げることにより得られる感度利得が相当に大きいものであることを示している。プローブタイプとしてはCP-MASタイプで開発を進めている。開発開始当初はラジオ波による放電が問題になっていた。これについても上ですでに述べたようにNMR測定に必要なラジオ波照射系列、CP、 ^1H デカップリング等も行えることを実証することができている。

4. 今後のこと

今回紹介した高磁場DNP装置にはまだまだ改善の余地がある。いずれの部分にも更なる感度向上に寄与するだけの改善の余地があり、現在の得られている感度をさらに数倍上げる見通しがある。高磁場DNP装置は現在のところそれほど多く普及しているわけではないが、将来的には広く利用されると期待している。

表1 高磁場DNP装置の達成値。表は2014年初めまでに得た結果をまとめた

		N ₂ 冷却	He冷却
1H周波数		600 MHz, 700 MHz	
プローブタイプ		CP-MAS	
観測核	LF	^{13}C , ^{79}Br	
	HF	^1H	
試料回転		7 kHz	3 kHz
試料温度		90 ~ 100 K	20 ~ 40 K
室温感度比		20倍 \geq	500倍 \geq

引用文献

- [1] Maly, T., Debelouchina, G.T., Bajaj, V.S., Hu, K.N., Joo, C.G., Mak-Jurkauskas, M.L., Sirigiri, J.R., van der Wel, P.C.A., Herzfeld, J., Temkin, R.J., and Griffin, R.G., (2008) Dynamic nuclear polarization at high magnetic fields. *J. Chem. Phys.* **128**, 052211.
- [2] Matsuki, Y., Ueda, K., Idehara, T., Ikeda, R., Ogawa, I., Nakamura, S., Toda, M., Anai, T., Fujiwara, T., (2012) Helium-cooling and -spinning dynamic nuclear polarization for sensitivity-enhanced solid-state NMR at 14 T and 30 K. *J. Magn. Reson.* **225**, 1-9
- [3] 藤原 敏道 (2013) 高磁場DNP装置の開発. *NMR* **4**, 113-116.
- [4] Matsuki, Y., Ueda, K., Idehara, T., Ikeda, R., Kosuga, K., Ogawa, I., Nakamura, S., Toda, M., Anai, T., and Fujiwara, T., (2012) Application of continuously frequency-tunable 0.4 THz gyrotron to dynamic nuclear polarization for 600 MHz Solid-State NMR. *J. Infrared Millim. Terahz. Waves.* **33**, 745-755.



中村 新治 (なかむら・しんじ)

1996年3月 京都大学理学部卒業

2001年3月 京都大学大学院理学研究科 博士課程 研究指導認定

2004年3月 京都大学大学院理学研究科 博士(理学)取得

2005年3月 日本電子株式会社入社

2010年4月 分社化により株式会社JEOL RESONANCE 転籍(現職)

東京農工大学 朝倉研究室

東京農工大学
朝倉 哲郎

東京農工大学に着任してから、34年目になります。来年の3月で定年退官を迎えますが、今年、今後4年間の科学研究費が通りましたので、しばらくは、大学で研究を続けることになりそうです。“最終講義”は、本学科学博物館での企画展、“衣料から医療へ～シルクで創る人工血管～”に合わせて、早々と本年4月に行いました。その際配布したパンフレットの1,2ページを掲載しました(図1)。

さて、研究室は目まぐるしく変わりました。博物館助教の中澤先生がテニアトラック准教授として、昨年、本学生命工学科内で独立した研究室を立ち上げ、一方、朝倉研助教の鈴木先生は今年4月から福井大学のテニアトラック講師として転出、そのかわりに特任助手として奥下先生が来て一緒に絹のNMR研究を進めています。朝倉研の博士課程

学生は現在4人、今年の10月から、さらに2人加わりました。修士課程学生は2年生が4人、1年生は来年退官のため取らず、また、卒研生は3人おられます。それ以外は、非常勤研究員が4人、秘書が2人という陣容です。専用を使用するNMR装置は、400MHzが2台ですが、適宜、分子研の920MHz等を使用させていただいております。

現在、絹の再生医療材料への応用研究とともに、行いつつあるNMR関連の研究テーマは、以下のようになります。

1. 家蚕絹の繊維化後の構造 (Silk II) の決定
2. 絹の再生医療材料の開発と含水状態でのNMR解析 (科研費課題)
3. エリ蚕絹ならびにクモの糸 (絹) の構造解析
4. その他 (主に企業の研究者と)

企画展のパンフレットから

はじめに

東京農工大学では、明治7年(1874)の内務省勸業領内藤新宿出張所の設立から140年にわたり、シルクの研究がつけられてきました。そのような背景のもと、朝倉研究室が、本学工学部製糸学科で1981年2月にスタートしてから、33年間にわたって“シルクの基礎と応用”について研究を続けてきました。本企画展は、その集大成ともいえる内容です。

シルクは繊維の女王として絶えず新たな合成繊維開発のターゲットとされてきました。一方、シルクは、長年にわたって縫合糸として体内に埋め込まれて使われてきており、優れた再生医療材料としての高い可能性を有しています。

朝倉研究室では、高性能の分析手段である“NMR”を駆使して、様々なシルクの構造に関する知見を長きにわたり蓄積してきました。その知見に基づいて、一層の高機能性を有する新しいシルクを設計・生産するとともに、現在、高齢化社会に向けて急務な再生医療材料—特に、需要が極めて高いにもかかわらず、開発されていない“小口径の人工血管”—を、シルクの特徴を最大限に生かし開発しています。シルクの素晴らしさと人工血管など再生医療材料として、極めて有望であることを感じていただけたら幸いです。

本研究は、実に、多くの学生諸君ならびに多くの共同研究者によって支えられており、多くの方々との研究成果の結晶です。一緒に研究を進めていただいた多くの方々へ深く感謝いたします。



企画展実行委員長
工学府 生命工学科 朝倉哲郎

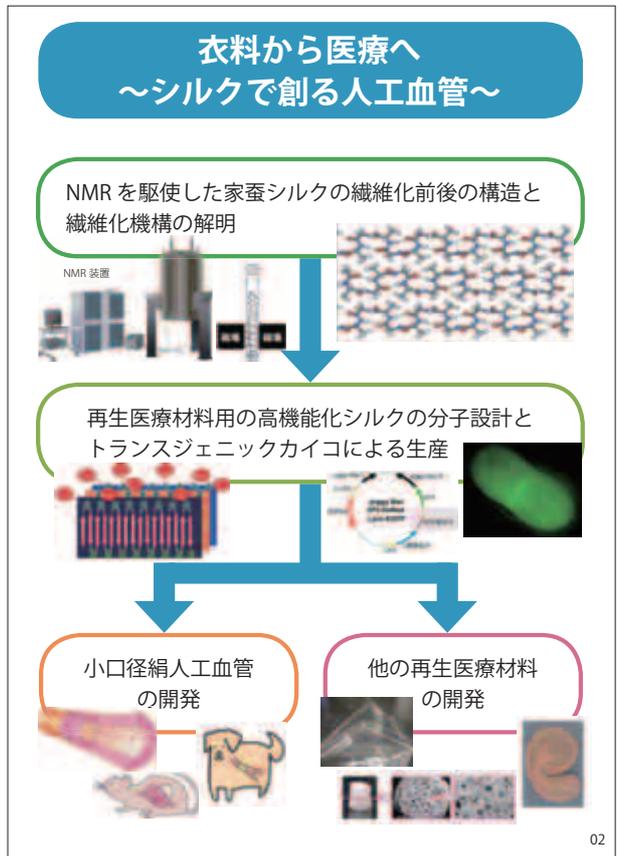


図1 企画展のパンフレットの1,2ページ

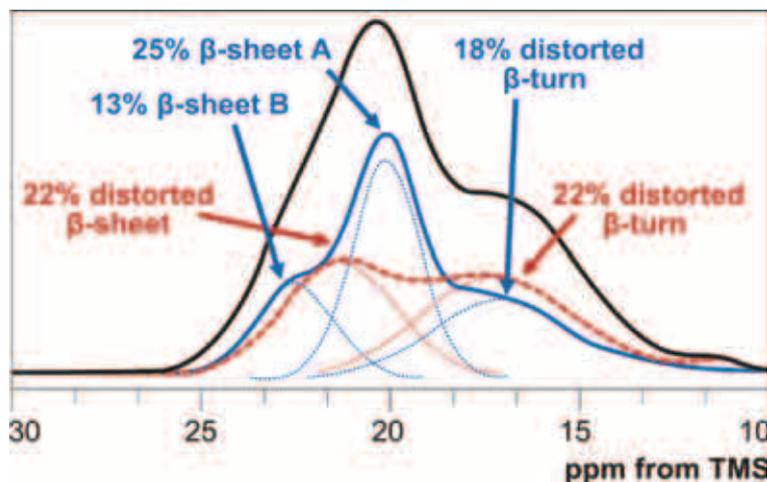


図2 家蚕絹繊維の不均一構造を反映した固体 ^{13}C CP/MAS NMRスペクトル (アラニン残基のメチル基を拡大)

まず、1. Silk IIの決定ですが、これは、これまで20年かけて決定してきた家蚕絹の繊維化前の構造 (Silk I) に続くテーマであり、Silk IIの決定によって本研究は一段落すると考えています。そもそも、何故、絹の研究をするようになったかと言うと、図1にあるように、5齢期後半の生きた蚕 (繭を作る直前の熟蚕) をNMR管に入れて、直接、蚕体内で桑葉から絹が生合成される様子や水に溶けた繊維化前の絹構造の解明を行うことに興味があったからです。特に、家蚕は常温、常圧下、水溶液から、わずかな力で、同じ太さの鋼鉄線に匹敵する強度の絹繊維を創出します。人類は現在、このような環境に優しい作り方で高強度の繊維を作ることには到底できません。蚕体内での特殊な繊維化前の構造がキーであると考え、先ず、その構造の解明に集中してきたのですが、自信のある構造にたどりついた時は、本当にうれしく、研究者冥利に尽きるとは、この事かと思いました。

さて、ここでSilk IIの構造研究に戻ります。図2に、家蚕絹繊維のアラニン残基のメチル基領域を拡大した固体 ^{13}C CP/MAS NMRスペクトルを示しています (外側太い実線部 (黒))。図中の中実線部 (青) は、56%を占める結晶部、破線部 (赤) は44%を占める非晶部です。細い破線線部は、各ピークをガウシアンを仮定して分離した図です。

5つのピークから成る不均一構造であることがわかります。ポイントは、結晶部中の2種類の分子間構造、AとBの決定 (原子座標レベル) です。我々が報告してきたタンパク質のアラニン残基のC β 化学シフト-内部回転角の等高線プロットによると、 β シート構造領域内では、内部回転角が変化しても、到底、このように大きなシフト差は再現されま

せん。すなわち、AとBのピークは、分子間構造の違いに起因することがわかります。現在、AとBの分子間構造の原子座標レベルでの決定は、概ね、終了しています。共同研究を進めてきた多くの研究者とともに、論文を執筆中です。

また、その決定のために、当時助教の山内先生 (今年8月からカザフスタンのNazarbayev Univ.に異動) を中心とした“極微小コイルを用いた超高速固体NMRマイクロプローブの開発” (JSTの先端計測分析技術・機器開発のサポートを7年間にわたって受け、現在、JEOLから販売) ならびに“分子研の920 MHz装置への本プローブ導入による ^1H 固体高分解能NMR測定”や京都大学梶先生のグループとの共同研究による“CASTEPを用いた化学シフト計算”を行ってきました。その過程で、生化学の教科書によく引用されてきたMarsh、Paulingらによる“家蚕絹の逆平行 β シート構造の分子間構造モデル”は、明確に否定されました。逆平行 β シート構造自身は間違いではないのですが、その分子間構造が違っていました。

さらに、絹繊維を直接、または、様々なプロセッシングを経て、各種再生医療材料を開発する場合、移植する生体中は、必ず、水が存在するため、絹と水の間相互作用を知ることは、どうしても必要でした。ここでもNMRは威力を発揮します。2のテーマです。図3は、家蚕絹繊維 (左:天然絹糸、右:一度溶解過程を経た再生絹糸) を重水中に浸漬した状態で測定した、重水の $^2\text{HT}_1$ (スピン-格子緩和時間) と T_2 (スピンスピン緩和時間) の二次元等高線マップで、ラプラス逆変換を行って得られています。

ニューヨーク市立大のBrout准教授ならびに千葉

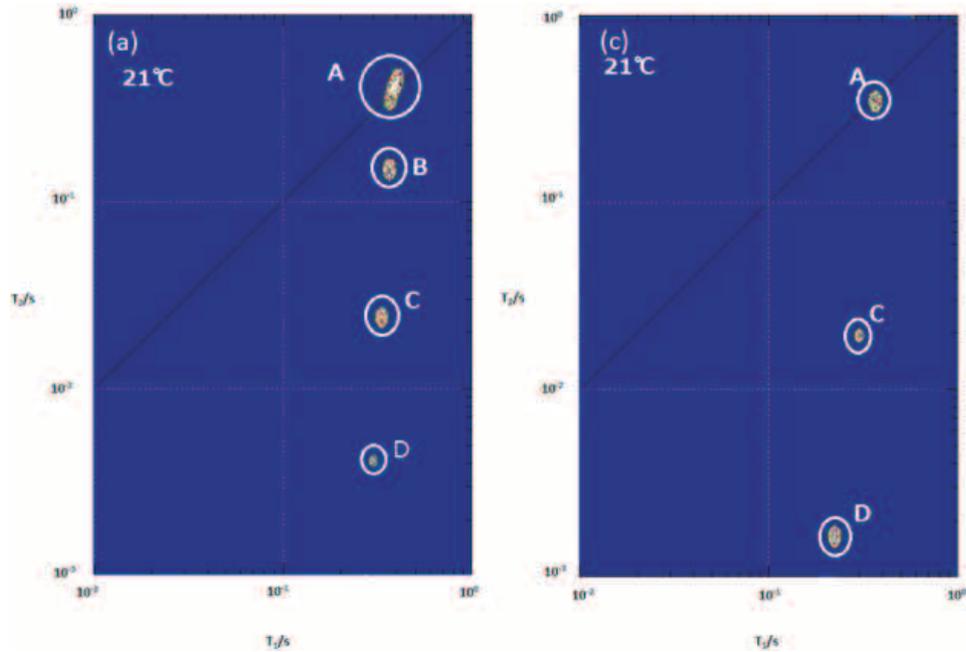


図3 家蚕絹繊維（天然繊維と再生繊維）を重水中に浸漬した状態で測定した ${}^2\text{HT}_1\text{-T}_2$ 二次元等高線マップ

大の大窪助教との共同研究です。このNMRの興味深い測定結果を、是非、再生医療材料の開発に結び付けたいと考えています。

スパイダーマンでおなじみの“天然で最も強い”と言われるクモ牽引糸は1GPの強度を有しますが、

野蚕の一種であるエリ蚕絹繊維は同じような一次構造を持ちながら、強度は1/5程度です。何故でしょうか。3.のテーマです。詳細は、他の機会に譲ることにしますが、まだまだ、絹のNMR研究は尽きません。

横浜国立大学理工学部 内藤研究室

工学府 機能発現工学専攻

槇野 義輝

はじめに

内藤研究室では、生体分子の構造や運動性を、核磁気共鳴分光法 (NMR) を用いて明らかにし、機能発現の分子機構を理解する研究を行っています。生体分子の中でも生体膜に強く結合して、膜に埋め込まれたペプチドや膜蛋白質は、信号伝達・イオン透過・物質透過を制御して、生命活動の維持に重要な役割を果たしています。その構造情報を得ることのために本研究室では、固体NMRの手法を用いて、膜結合生体分子の構造と機能の相関を分子論的に明らかにする研究を行っています。各人が測定対象となる試料を化学合成あるいは生化学的手法で調製し、その試料に適した分光学的手法を用いて、分子構造を解明する研究を行っています。



図1 固体NMR分光器 (Bruker 600 Avance III)

研究内容

1) 高度好塩菌中の光受容膜タンパク質の構造と機能の解明

塩濃度の高い湖に生息する高度好塩菌の紫膜に存在するバクテリオロドプシンは光駆動型プロトンポンプ機能を持つ膜タンパク質です。この膜タンパク質は発色団であるレチナールが光異性化を起こし、これがトリガーとなってタンパク質の構造変化を誘起してプロトンポンプ活性を示すことが知られています。また細菌の光応答である光走性をもつ光受容膜タンパク質の性質も調べています。内藤研究室では、この膜タンパク質の光応答過程を固体NMRにより観測し、プロトンポンプ活性や光情報伝達の分子機構を明らかにする研究を行っています。

バクテリオロドプシンは発色団レチナールが7本膜貫通ヘリックスで囲まれた構造を持ちます。このバクテリオロドプシンに光照射を行ったとき、レチナールやタンパク質側がどのような構造変化を起こすのかを固体NMRを用いて明らかにする研究を行っています。

信号伝達機能をもつセンサーロドプシンII (SRII) は光のエネルギーを受けてレチナールに光異性化がおり、これによりSRIIとトランスデューサー (pHtrII) の相互作用変化がおりpHtrIIに信号が伝達され最終的に鞭毛モーターのスイッチが入り、光から逃げる負の光走性を示します。研究室では光照射NMRを開発し、この信号伝達の分子機構を解明する研究を行っています。

固体NMR分光器は600 MHz (図1) や400 MHz (図2) を主に使用しています。

2) ヒトカルシトニンのアミロイド線維形成の分子機構

ヒトカルシトニンはペプチドホルモンであり、骨にカルシウムが蓄積される過程を調節する働きもっています。そのため、ヒトカルシトニンは骨粗鬆症の治療薬として使われていましたが、生体内

で容易に線維形成する性質が明らかになり、治療薬として使用することが難しいことが分かりました。またこの線維形成の様子はアルツハイマー病等の原因物質とされるアミロイド線維の形成機構と同様であることが認識されています。本研究室ではこの細胞内で起こる線維形成の分子機構を明らかにする研究を行っています。固体NMRの手法を用いることで、モノマーが線維に変化する過程を線維形成量変化と構造変化の両方を同時に観測すること



図2 光照射固体NMR分光器 (CMX infinity-400 下部から光照射用のファイバーが導入されている)

が可能です。これまでヒトカルシトニンの線維形成過程や線構造を明らかにしており、最近アミロイド線維形成中間体の構造解析や線維形成阻害の研究に応用しています。

3) 生体防御に関与する抗菌性ペプチドの作用機序の解明

生体内には外部からの細菌の侵入を防ぐ生体防御のシステムが働いています。その中でも抗菌ペプチドは細菌の細胞膜に特異的に結合し、細胞膜に穴を開けて、イオンの透過を促進し、その結果細菌は死滅してしまう抗菌機構が働いています。本研究室では様々な抗菌ペプチド(メリチン、ラクトフェリシン、アラメシチン、ポンピニンなど)の細胞膜との相互作用をおよび膜結合構造について固体NMRを用いて明らかにし、抗菌活性を分子論的に解明する研究を行っています。

4) 新規固体NMR測定法の開発

これまで述べた膜結合生体分子や線維形成分子の分子構造を明らかにするために、本研究室では固体NMRの手法を使っています。そこで目的分子の構造解析を行うために新しい固体NMR法の開発研究も行っています。先述した光受容膜タンパク質の光活性状態を明らかにするために独自に光照射固体NMR装置(図2、3)の開発を行っています。この開発では、光ファイバーによりMAS試料管の上部からLED光を照射し、加工したガラス管

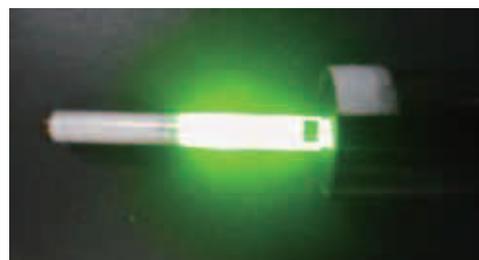
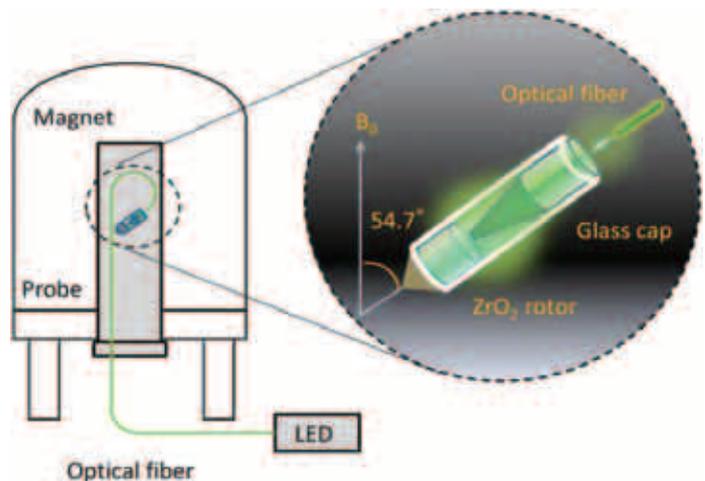


図3 新規固体NMR装置 (左) マイクロ波発生装置 (右) 光照射装置

キャップを経て試料管内部から光照射できるシステムを構築しています。また、分子のマイクロ波加熱機構を解明するためにマイクロ波照射固体NMR装置の開発を行っています。この装置ではマグネトロン(図3)を用いて発生されたマイクロ波をプローブ内に伝送し、試料をマイクロ波照射しながらNMR測定を行うことができます。さらに高速・高温加熱することが可能になりました。このマイクロ波照射NMR装置を用いて、液晶分子のマイクロ波

加熱分子機構が明らかになってきています。

研究室での日常

内藤研究室では各人がそれぞれのテーマに沿って研究を行っています。コアタイムは10時から5時ですが、それぞれの実験状況によって自らのペースで研究をしています。週に2回行われるゼミでは、それぞれの研究の進捗報告、NMRに関する輪講、論文紹介を行っています。

公益財団法人サントリー生命科学財団 生物有機科学研究所

構造生命科学研究所 機能構造グループ

森 祥子、岩下 孝

公益財団法人サントリー生命科学財団 生物有機科学研究所に所属する森、岩下と申します。今回は、当財団に関してNMR研究を中心にご紹介させていただきます。

財団、研究組織概要

当研究所は1946年2月にサントリー創業家の故佐治敬三理事長により設立された財団法人食物化学研究所をその起源としています。佐治敬三氏は自身も有機化学者であったため、研究所設立にあたりその目的を「国民の健康と栄養の向上に寄与すること」とし、有機化学を基盤とした研究事業を行いました。1979年には、生命科学分野の発展を背景に、「生物有機化学およびこれに関連する科学の学術振興をもって人類の幸福と繁栄に寄与する」ことを目的とし、財団法人サントリー生物有機科学研究所に名称を変更しました。その後の法改正に伴い、公益財団法人としての現在の組織体制が確立しています。財団では、研究助成制度、奨学金制度および学術集会助成制度等の研究奨励助成事業を運営するほか、科学人材育成事業として1980年に日本初の博士客員研究員制度を開始し、現在まで多くの研究員がこの制度の下に研究所に所属し、基礎研究に力を注いでいます。

財団の研究事業を担う生物有機科学研究所の研究組織は、主に生物学的手法を用いて生物の多様性の原理を解明しようとする統合生体分子機能研究部と、有機化学的手法で生命現象を分子・原子レベルで解明しようとする構造生命科学研究所に分かれており、さらに後者は分子動態 (MS)、生体分子化学 (有機合成) および機能構造 (NMR) の各グループで研究活動を行っています。NMR装置は、我々の所属する機能構造グループが管理していますが、装置利用は他グループのメンバーにも開放され、NMRを主体とした研究だけでなく、有機合成で得られた化合物や天然物由来の低分子化合物の構造決定にも幅広く活用されています。

NMR装置の変遷

当研究所では1978年、著名な天然物有機化学者である中西香爾先生を所長に迎えてから、当時はまだ珍しい超伝導磁石を用いたFT-NMR装置であるニコレー社製のNT-360 (^1H 共鳴周波数360MHz)を導入しました。その後、GE社製のGN-500 (同500MHz)への更新や、1990年代には固体専用装置CMX-300 Infinity (同300MHz)の導入を行いました。現在は更なる更新を経て、溶液用装置はAVANCE III HD 400 (^1H 共鳴周波数400.13MHz)、



図1 NMR室の写真

(左から)AVANCE III 600(固体専用)、AVANCE 600、AVANCE III HD 400

AVANCE 600 (同600.33 MHz)、AVANCE 750 (同750.13 MHz) の3台、固体専用装置はAVANCE III 600 (同600.13 MHz) というBruker社製の装置を保有しています(図1、2)。このうち溶液のAVANCE 600およびAVANCE 750ではクライオプローブを用い、感度の要求されるタンパク質の測定や微量サンプルの測定を行ってきました。来年5月には、当研究所のあるサントリー研究センターの移転に伴い、750 MHzの装置を800 MHzに更新しさらに好条件での測定を期待しています。



図2 AVANCE 750

研究事業に関して

当研究所は公益財団のため、公益性の高い事業を行うことが要求されます。公益研究事業としては、独自のテーマを設定し基礎研究を行うほか、大学等の要望に応じた機器分析による研究支援も行っています。

独自テーマの公益研究事業において、構造機能(NMR)グループは、現在8名のメンバーで種々の研究を行っています。当研究所の特徴は、先にも記した通り、有機化学、生物学の研究者が共存し研究を行っている点です。構造機能グループでは、他分野の研究者と協働することでより広い視野での研究を目指しています。各研究員が各々研究テーマを持ち、タンパク質とその核酸および脂質との相互作用や、天然の低分子化合物の構造解析などの研究を行っています。

NMR グループの研究① タンパク質 NMR

タンパク質研究においては、動的なゆらぎを観測するため緩和分散法等を用い、種々の解析を行っています。緩和分散法では、構造変化における中間状態のような存在比の低い構造についても解析できます。NMRグループではこの手法を用い、iPS細胞の作製時に導入される転写因子Sox2およびOct3/4のDNA認識機構の解明に取り組んできました。タンパク質中の α ヘリックス構造および天然変性領域について、DNA認識すなわち特異的な結合状態に至るまでの過程におけるこの領域の揺らぎの解析を行っています。近年はこの転写因子Sox2にin-cell NMRの手法を適用し、細胞実験に精通した統合生体分子機能研究部とより発展的な実験条件を探りつつ研究を進めています。

NMR グループの研究② 固体 NMR

1990年代の固体専用NMR装置の導入以降は、

この装置を用いて脂質二重膜中のペプチドの構造解析を始めました。1995年に中嶋暉躬先生が研究所長に就任され、所内でクモヤサソリの毒の研究が盛んに行われる中、固体NMRでは膜にポアを形成するサソリのペプチド毒素のポア形成機構の研究を進めました。さらに近年、生体分子化学(有機合成)グループとの協力により、脂質アンカー型のタンパク質モデルを構築することに成功しました^[1]。これをリポソームやバイセルといった脂質二重膜モデル中に埋め込み、解析を行っています。

NMR グループの研究③ 低分子構造解析

低分子の構造解析も当グループが積極的に取り組む重要な研究テーマです。これまでに、当研究所のNMR装置を駆使した構造解析が多数行われてきました。当研究所として最初の高磁場NMR装置を導入した1980年代は、海洋天然物化学が盛んになった時期でした。名古屋大学平田義正先生とその門下の静岡大学上村大輔先生のグループではイワサナギンチャクから得られる強力な海産毒素であるパリトキシンの構造研究を行っており、当研究所ではNT-360を用いてパリトキシン分解物のスピノ系を明らかにし、構造を推定していきました。パリトキシン(図3)は、分子量が2600を超えながらも繰り返し構造を含まず、非常に構造解析の困難な有機化合物です。このNMRスペクトルの完全帰属は3D TOCSY-HSQCなどを駆使し2001年によく達成されました²⁾。また近年の大きな成果としては、2004年の楠本正一先生の所長就任後に共同研究を行うこととなった、東京大学西山賢一先生の発見されたMPIaseの構造解析があります。MPIaseとはMembrane Protein Integraseを意味しており、タンパク質膜挿入活性を有する非タンパク質性の因

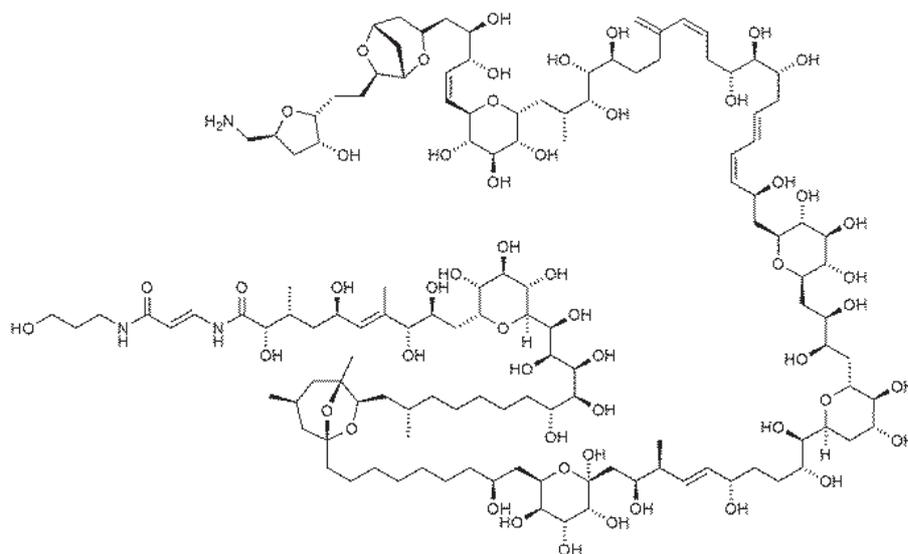


図3 パリティキシンの構造

子です^[3]。NMR解析等により得られたその構造は、3種のアミノ糖からなるユニットを10回ほど繰り返した糖鎖がピロリン酸を介してジアシルグリセロールに結合した(図4)、糖脂質が酵素様活性を有する例としては初めてのもので、さらに構造活性相関などの研究が進行しています。

当研究所には、公益事業の一貫として大学等構造解析支援のシステムがあり、特に低分子構造解析の技術はこのシステムの中で大いに活用されています。近年も、分子動態 (MS) グループによる解析で得られた分子式等の情報と、NMRによるスピン結合等の情報をあわせることで、生物活性を有する未知の天然有機化合物の構造決定に寄与する成果を上げています。

まとめ

以上、生物有機科学研究所における研究等々を大まかにご紹介させて頂きましたが、我々はサントリー社のR&D部門を擁する研究センターの建物内をその拠点としながらも、公益事業としての基礎研究に精力的に取り組んでいます。再来年の研究所創立70周年に向け、基礎科学の進展に寄与する新たな知見を得るべく、研究員は日々切磋琢磨しています。

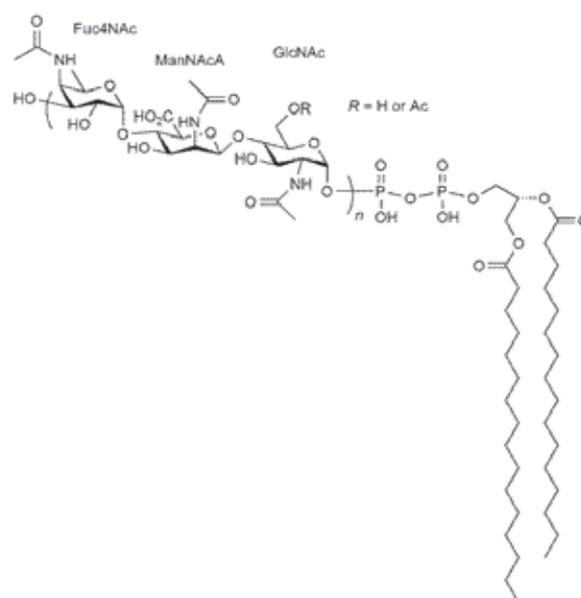


図4 MPLaseの構造 (n=7-14)

参考文献

- [1] Nomura, K., Harada, E., Sugase, K., and Shimamoto, K. (2014) Solid-state NMR spectra of lipid-anchored proteins under magic angle spinning. *J. Phys. Chem. B* **118**, 2405-2413.
- [2] Kan, Y., Uemura, D., Hirata, Y., Ishiguro, M., and Iwashita, T. (2001) Complete NMR signal assignment of palytoxin and *N*-acetylpalytoxin. *Tetrahedron Lett.* **42**, 3197-3202.
- [3] Nishiyama, K., Maeda, M., Yanagisawa, K., Nagase, R., Komura, H., Iwashita, T., Yamagaki, T., Kusumoto, S., Tokuda, H., Shimamoto, K. (2012) MPLase is a glycolipozyme essential for membrane protein integration. *Nat. Commun.* **3**, 1260.

千葉県生命の森リゾートで開催された 第15回若手NMR研究会便り

千葉工業大学大学院工学研究科工学専攻博士後期課程1年

天野 亮

はじめに

2014年7月11日～13日の3日間、第15回若手NMR研究会が生命の森リゾート(千葉県長生郡)で開催されました。若手NMR研究会は、NMRを用いて研究を行う若手研究者がNMRについて学びNMRを用いた最新の研究に触れることを目的に毎年開催されています。さらに、NMRを用いて研究を行う若手研究者同士が一堂に会することでお互いの研究を知り、交流する場としての役割も担っております。ここでは実行委員を代表し、第15回若手NMR研究会の開催までの道のりや会期中の様子についてご報告したいと思います。

開催までの道のり

若手NMR研究会は、毎年、NMRを用いて研究を行っている研究室が持ち回りで運営しております。昨年6月に京都大学の片平先生の研究室が主催された第14回NMR研究会の懇親会にて、ご指名をいただき、幹事代表を担当することになりました。坂本泰一先生から開催の了承をいただいた後、私以外の坂本研究室の大学院生と相談をいたしました。その結果、天野亮(D1)を代表とし、高田健多(M1)、幸田美彩子(M1)、石井裕也(M2)、星野啓治(M2)の計5名が実行委員として準備を行いました。

実行委員会では、まず研究会のテーマについて議論し、第15回では「タンパク質・核酸とNMR」をテーマとして掲げることにいたしました。

NMRの測定・解析は初学者には敷居が高いので、今年の若手NMR研究会は、NMRの基礎、構造解析、相互作用解析など幅広く学べる研究会にすることにいたしました。ご講演していただく具体的な講師の方々については、実行委員が各々教科書や論文、NMR討論会の要旨集等を持ち寄り、全国から集まる若手研究者の方々に興味を持っていただけるような先生を検討いたしました。また、参加される若手研究者の方々に活発な研究議論をして

いただくため、第14回に引き続き、ポスター発表の時間を設けました。最終的なプログラムは以下のようにになりました。

7月11日

講演1. 池上 貴久 先生(横浜市立大学)
「有機低分子、生体高分子NMRの測定データ処理において留意したいパラメータ」
講演2. 小林 直宏 先生(大阪大学)
「MagROを用いたNMRスペクトル解析」
企画1. 研究室紹介プレゼンテーション

7月12日

講演3. 古川 亜矢子 先生
(公益財団法人サントリー生命科学財団)
「リアルタイムNMR法によるDNA修飾酵素反応の定量解析」
講演4. 田中 好幸 先生(東北大学)
「多核NMR分光法による機能性核酸分子の局所観測およびJ値・化学シフト値による状態解析」
講演5. 河野 俊之 先生(北里大学)
「超高感度タンパク質NMRシグナル帰属技術」
講演6. 高橋 栄夫 先生(横浜市立大学)
「緩和現象を活用したNMR相互作用解析技術」
企画2. ポスター発表(9演題)

7月13日

講演7. 佐藤 一 先生(ブルカー・バイオスピン株式会社)
「NMRのハードウェア」
講演8. 鎌足 雄司 先生(岐阜大学)
「タンパク質の構造揺らぎと機能発現、論理的創薬」

会場は、緑あふれる環境の中、NMRの知識だけではなく心身ともに豊かになっていただこうと考え、千葉県・房総の静かな森の中に位置する「生命の森リゾート」と致しました。

1年前に千葉県開催が決まってからプログラム、会場、企業および学会協賛交渉、ホームページ公開など実行委員全員で分担して準備してきました。一つの研究室による開催なので、頻繁に打合せを行いました。その甲斐もあり、たくさんの企業および学会にご協賛いただき、また、たくさんの若手研究者の方々にご参加いただきました。

会期中の様子

2泊3日の会期中は大きなトラブルもなく、爽やかな天候にも恵まれ、円滑に運営することができました。

今年の若手NMR研究会は池上先生のご講演から始まりました。池上先生には、研究会全体を通して基礎となる、NMR測定およびNMRデータの解析の際の重要なパラメータ、スペクトル幅、パルス幅やパワー、window関数などについて講義していただきました。続いて、小林先生には、タンパク質の立体構造決定のための統合的スペクトル解析ツールであるMagRO、FLYAを用いた全自動的な



写真1 講演中の様子。多くの質問やコメントがありました

解析、CYANAによる完全自動的NOE帰属と構造計算について講義していただきました。

2日目は、初めに、古川先生にリアルタイムNMR法によるDNA修飾酵素APOGEC3Gのシトシンの脱アミノ化反応の定量解析について講義していただきました。続いて、田中先生には、多核NMR分光法により得られるヘテロ核のNMRパラメータ、主に化学シフト値およびJ値の構造解析への応用やヘテロ核が形成する化学結合の状態解析を行うための考え方について講義していただきました。

昼食を挟みまして、午後からは、300残基以上のタンパク質であっても、20–200 μ M程度の低濃度で2次元NMR測定のみを用いて簡単にシグナルの完全帰属ができる方法(MAGICAL法)について河野先生に講義していただきました。続いて、高橋先生には緩和についての基礎、さらに交差緩和現象を活用した分子間交差飽和法による相互作用解析法、DIRECTIONリガンドエピトープマッピング、交差相関緩和現象を活用した結合型ペプチド分子の二面角決定法について講義していただきました。

3日目は、佐藤先生にNMRのハードウェアである超電導磁石、クライオプローブ、NMR Thermometer、さらにはDynamic Nuclear Polarization、Non-Uniform Samplingについて講義していただきました。最後に、鎌足先生には、タンパク質の揺らぎ、構造転移、機能発現におけるキャビティと水和の重要性、論理的創薬と抗プリオン化合物の開発などについて講義していただきました。

いずれのご講演も興味深い内容で、質疑応答時には多くの質問やコメントがあり、白熱した議論となりました(写真1)。



写真2 集合写真。参加者の皆様、講師の先生方、多くの方々のおかげで盛会のうちに終わることが出来ました

合宿形式の研究会の醍醐味といえば、何と言いましても参加者同士の交流に尽きるかと思えます。1日目には夕食後、お酒を片手に研究室の紹介を行っていただきました。参加していただいた皆様の所属する研究室がどのようなところなのか、どのような研究をしているのかなど「笑い」を交えつつ発表していただきました。2日目の田中先生のご講演の後には、生命の森リゾートメディカルトレーニングセンター前で記念の集合写真を撮りました(写真2)。さらに、高橋先生のご講演の後には、ポスター発表を行い、参加者、講師の先生方を交えて活発な議論が行われました(写真3)。今回は優秀ポスター賞を設けて、講師の先生方および一般参加の方による審査の結果、山置佑大さん(京都大学)、大樂武範さん(東北大学)の2名の方が受賞されました。ポスター発表後は、ビュッフェ形式の懇親会で、おいしい料理に舌鼓をうちながら、参加していただいた皆様同士の交流が行われました(写真4)。

第15回研究会の反省と今後の発展

第15回若手NMR研究会の準備・運営に関しては、多くの方々のご協力のおかげで、盛会のうちに終えることができました。一方で、第15回のテーマを「タンパク質・核酸とNMR」とし、生体高分子に焦点を当てたため、やはり全体的に核酸やタンパク質の研究者が大多数でした。この偏りが材料系や固体などの生体高分子以外の研究されている方々の参加の敷居が高くなってしまったのではないかと考えられます。参加者の偏りが生じてしまったことは反省しなければなりません。さらに、持ち回りでの運営であることも影響して、次の年も、その次の年も似たようなテーマになってしまう可能性が危惧されます。しかしながら安易にテーマを「NMR一般」としてしまうと、参加者数を担保することや深い議論をすることが難しくなってしまうかもしれません。

生体高分子を扱っている研究者同士の交流もとても大切ですが、今後は材料応用や装置開発などのより幅広い分野の方々も気軽に参加していただき交流できるような企画・運営をしていくというの



写真3 学生セッション(ポスター発表)の様子。白熱した議論になりました



写真4 懇親会の様子

も、今後の若手NMR研究会、そしてNMR研究分野の発展のためにも重要なのではないかと思います。

第16回若手NMR研究会は首都大学東京の伊藤隆先生の研究室が主催する予定です。この記事を読み、研究会に興味を持たれた方々が、参加、ご講演、告知等、それぞれの立場で当研究会にお力をお貸し頂けると幸いです。

最後になりますが、ご参加いただいた皆様、講師の諸先生、会場の生命の森リゾートの皆様、協賛企業・学会の関係者、スタッフの皆様に、この場をお借りして心より御礼申し上げます。

参考サイト

第15回若手NMR研究会ホームページ

<http://www.le.it-chiba.ac.jp/sakamoto/wakate/index.html>

日本核磁気共鳴学会の決定事項

日本核磁気共鳴学会
2013年度 通常総会 議事次第

日時：2013年11月12日(火) 12時05分～12時35分

場所：石川県立音楽堂 邦楽ホール

総会次第

1. 開会の辞
2. 会長挨拶
3. 2013年NMR討論会世話人 挨拶
4. 事業報告
5. 2012年度 収支決算の承認
6. 2013年度 中間報告の承認
7. 2014年度 収支予算案の承認
8. 2014年度 役員を選任
9. 名誉会員推戴の提案
10. 2014年NMR討論会世話人 挨拶
11. ICMRBS-2016(京都)
12. 閉会の辞

会員数

会員種別	2011年 9月30日	2012年 9月30日	2013年 9月30日
正会員	395	421	431
学生会員	128	140	143
名誉会員	10	12	12
賛助会員	8	8	8
合計	541	581	594

H25 年度現役役員名簿

■ 会長 (H24-H25)

朝倉 哲郎 東京農工大学

■ 理事 (H25-H26) 会長 (*) 副会長 (**)

内藤 晶 (***) 横浜国立大学

阿久津秀雄 大阪大学

伊藤 隆 首都大学東京

河合 剛太 千葉工業大学

山本 泰彦 筑波大学

■ 理事 (H24-H25)

朝倉 哲郎 (*) 東京農工大学

池上 貴久 大阪大学
 嶋田 一夫 東京大学
 鈴木榮一郎 東京大学
 西村 善文 横浜市立大学
 藤原 敏道 大阪大学

■ 会計監査 (H24-H25)

相沢 智康 北海道大学
 山崎 俊正 農業生物資源研究所

■ 評議員 (H25-H26)

阿久津秀雄 大阪大学
 浅川 直紀 群馬大学
 浅野 敦志 防衛大学校
 伊藤 隆 首都大学東京
 稲垣 冬彦 北海道大学
 金橋 康二 新日鐵住金
 河合 剛太 千葉工業大学
 白川 昌宏 京都大学
 菅瀬 謙治 サントリー生命科学財団
 武田 和行 京都大学
 栃尾 豪人 京都大学
 内藤 晶 横浜国立大学
 西村 勝之 自然科学研究機構
 三島 正規 首都大学東京
 水野 元博 金沢大学
 武藤 裕 武蔵野大学
 山本 泰彦 筑波大学
 若松 馨 群馬大学

■ 評議員 (H24-H25)

伊倉 光彦 Ontario Cancer Institute
 池上 貴久 大阪大学
 梶 弘典 京都大学
 木川 隆則 理化学研究所
 菊地 淳 理化学研究所
 北原 亮 立命館大学
 児嶋長次郎 大阪大学
 嶋田 一夫 東京大学
 鈴木榮一郎 東京大学
 高橋 栄夫 横浜市立大学
 出村 誠 北海道大学
 西村 善文 横浜市立大学
 平沖 敏文 北海道大学

廣明 秀一 名古屋大学
藤原 敏道 大阪大学

児嶋長次郎 大阪大学
嶋田 一夫 東京大学
高橋 栄夫 横浜市立大学
竹腰清乃理 京都大学
楯 真一 広島大学
西村 善文 横浜市立大学
原田英里砂 サントリー生命科学財団
福士 江里 北海道大学
藤原 敏道 大阪大学
村上 美和 京都大学
吉水 広明 名古屋工業大学

事業報告

I. 現時点での会員数

II. 活動報告と方針の提案

● 2012年度

1. 第51回NMR討論会
2. 「日本核磁気共鳴学会 若手研究者渡航費助成金」の募集と選定
3. 会員サービスの推進
4. その他

● 2013年度

1. 第52回NMR討論会
2. 「日本核磁気共鳴学会 若手研究者渡航費助成金」の募集と選定
3. 会員サービスの推進
4. 学会機関誌 Vol. 4の発行
5. その他

● 2014年度(方針)

1. 第53回NMR討論会
2. 「日本核磁気共鳴学会 若手研究者渡航費助成金」の募集と選定
3. 会員サービスの推進
4. 学会機関誌 Vol. 5の発行
5. その他

■ 会計監査 (H26-H27)

河野 敬一 北海道大学
神藤平三郎 東京薬科大学

名誉会員としてHans Wolfgang Spiess先生(マックス・プランク高分子研究所(マインツ)所長)が承認された。

11月13日(水)開催の新評議員会および新理事会にて、平成26年度選出の評議員から理事(追加分)が選出された結果、平成26年度理事、会計監査、幹事は以下のように決定した。会長(*) 副会長(**)

■ 理事

内藤 晶(*)	横浜国立大学	H25-H27
嶋田 一夫(**)	東京大学	H26-H27
阿久津秀雄	大阪大学	H25-H26
朝倉 哲郎	東京農工大学	H26-H27
伊藤 隆	首都大学東京	H25-H26
加藤 晃一	自然科学研究機構	H26-H27
河合 剛太	千葉工業大学	H25-H26
竹腰清乃理	京都大学	H26-H27
藤原 敏道	大阪大学	H26-H27
山本 泰彦	筑波大学	H25-H26

日本核磁気共鳴学会 2013年度 通常総会 議事録

出席：出席99名+委任状49名

* 定足数 [一般会員431名(2013年9月30日現在)]
/5=86名

* 配布資料と投影資料に基づき全て承認された。

* 2012年度収支決算について監査報告がなされた。

日本核磁気共鳴学会役員

平成26年度の評議員、会計監査が選出、承認された。

■ 評議員 (H26-H27)

朝倉 哲郎 東京農工大学
片平 正人 京都大学
加藤 晃一 自然科学研究機構
菊地 淳 理化学研究所

■ 会計監査 (H26-H27)

河野 敬一 北海道大学
神藤平三郎 東京薬科大学

■ 幹事

出村 誠 北海道大学
水野 元博 金沢大学
高橋 栄夫 横浜市立大学

第53回NMR討論会 (2014)

第53回NMR討論会(2014)は大阪大学コンベンションセンター(吹田キャンパス)で開催します。開催場所は大阪の北部、北摂にあり、太陽の塔のある万博記念公園に隣接して、京阪神へのアクセスを含め交通の便利な位置にあります。本討論会は過去に大阪で5回開催され、約3回に1回は京阪神で開催されるなど、歴史的にNMRの研究やその応用も盛んな地域です。

今回の討論会の特徴として、公募シンポジウム(4件)を初めて導入したこと、パラレルセッションの時間を多く取りいれて口頭発表時間を十分確保したこと、また若手ポスター賞でも全員が口頭発表の機会を作ったことなどがあります。また、2日目(11月5日(水))には特別講演2件と海外招待講演6件を予定しております。これらにより活発な議論ができるように計画しました。また、好評を得ているNMR初心者の方へのチュートリアルコースを、今年も討論会に先立ち開催いたします。

第53回NMR討論会(2014) 世話人 藤原 敏道(大阪大学)

会期: 2014年11月4日(火)~6日(木)

チュートリアルコース 2014年11月3日(月)

会場: 大阪大学コンベンションセンター

〒565-0871 大阪府吹田市山田丘1-1

海外招待講演・特別講演 第2日目 11月5日(水)

11:10 ~ 11:45

海外招待講演1 座長 松木 陽

Recent advances in nanoscale MRI

Christian Degen (Department of Physics, ETH Zurich, Zurich, Switzerland)

11:45 ~ 12:20

海外招待講演2 座長 村田 道雄

Solid-state NMR for investigating membrane-curvature induction by viral proteins

Mei Hong (Department of Chemistry, MIT, Cambridge, MA, USA)

13:30 ~ 14:05

特別講演1 座長 河合 剛太

NMR structural biology on transcription factors and chromatin-related proteins

Yoshifumi Nishimura (Graduate School of Medical Life Science, Yokohama City University)

14:05 ~ 14:40

特別講演2 座長 伊藤 隆

Analytical and biotechnological applications of NMR

Ei-ichiro Suzuki (Japan Biological Informatics Consortium Research Institute; Graduate School of Agricultural and Life Sciences; Graduate School of Medical Life Science, Yokohama City University)

14:55 ~ 15:30

海外招待講演3 座長 嶋田 一夫

Substrate- and ligand-modulated conformational dynamics of membrane solute carriers revealed by NMR

James Chou (Harvard University Medical School, Boston, USA)

15:30 ~ 16:05

海外招待講演4 座長 吉岡 芳親

Magnetic resonance imaging in real time

Jens Frahm (Biomedizinische NMR Forschungs GmbH am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen, Germany)

16:20 ~ 16:55

海外招待講演5 座長 竹腰 清乃理

Metabolism and microarchitecture from advanced ¹H and ¹³C NMR spectroscopy and imaging

Lucio Frydman (Weizmann Institute, Israel)

16:55 ~ 17:30

海外招待講演6 座長 内藤 晶

Solid state NMR of disease-associated proteins: Methods and Results

Robert Tycko (National Institutes of Health Laboratory of Chemical Physics)

第1日目 11月4日(火)

公募型シンポジウム1

高度な安定同位体標識が拓く NMR 技術の展開

The expansion of NMR spectroscopy by elaborated stable isotope labeling

座長：竹内 恒、宮ノ入 洋平

The stable isotope labeling technique is critical to maximize the structural information obtained by an NMR experiment and to overcome the detection limit posed by the intrinsic low-sensitivity of the NMR spectroscopy. Thus the development of an elaborated stable isotope labeling technique plays a crucial role in advanced NMR studies such as structural analysis of large molecular proteins, drug development, metabolome analysis and molecular imaging. In this symposium, we will introduce various sample preparation methods and its latest applications to discuss how does stable isotope labeling can contribute to the expansion of NMR spectroscopy.

10:00 ~ 10:05 開会あいさつ：竹内 恒

座長：竹内 恒 (産業技術総合研究所)

10:05 ~ 10:17

植物培養細胞を用いた標識試料の調製方法とその応用例

大木 進野 (北陸先端科学技術大学院大学 ナノマテリアルテクノロジーセンター)

10:17 ~ 10:29

メチル TROSY 法による膜タンパク質の機能調節メカニズムの解明

大澤 匡範 (東京大学大学院 薬学系研究科)

10:29 ~ 10:41

高難度タンパク質の NMR 解析に向けた酵母発現系の活用

高橋 栄夫 (横浜市立大学大学院 生命医科学研究科)

10:41 ~ 10:53

安定同位体標識のための無細胞タンパク質合成系の改良

横山 順 (大陽日酸株式会社つくば研究所)

10:53 ~ 11:05

哺乳細胞による安定同位体標識の抗体創薬への利用

鳥澤 拓也 (中外製薬株式会社研究本部)

11:05 ~ 11:10 休憩/Break

座長：宮ノ入 洋平 (名古屋大学)

11:10 ~ 11:22

誤り検出符号によるノイズに強いアミノ酸選択標識法

葛西 卓磨 (理化学研究所 生命システム研究センター)

11:22 ~ 11:34

精製蛋白質への標識導入技術の開発

児嶋 長次郎 (大阪大学 蛋白質研究所)

11:34 ~ 11:46

微生物および植物バイオマスへの固体・溶液NMR解析

菊地 淳 (理化学研究所 環境資源科学研究センター)

11:46 ~ 11:58

タンパク質NMRの生体系への応用：新規MRI及びin-cell NMR法

Stable isotope-assisted NMR in living systems: novel MRI and in-cell NMR techniques

朽尾 豪人 (京都大学大学院 理学研究科)

11:58 ~ 12:00 結語：宮ノ入 洋平

第2日目 11月5日 (水)

公募型シンポジウム2

“in situ structural biology” opened up by in-cell NMR”

In-cell NMRが切り拓く「in situ 構造生物学」

座長：白川 昌宏、伊藤 隆、木川 隆則

生きた細胞の中の生体高分子の動態を観察するin-cell NMRは、生体高分子が実際に機能している場における真の姿に迫る学問領域「in situ 構造生物学」を推進し、特に真核細胞のin situ 構造生物学から得られる知見は、先端医療や創薬科学等にも波及的効果を及ぼし、ライフ・イノベーションの推進に大きく寄与することが期待される。本シンポジウムでは、国内外の当該分野の研究者に最先端の研究内容を紹介していただく予定である。

9:00 ~ 9:25

Protein dynamics in crowded environments

Takanori Kigawa (RIKEN Quantitative Biology Center)

9:25 ~ 9:50

In situ structural biology by NMR

Yutaka Ito (Department of Chemistry, Tokyo Metropolitan University)

9:50 ~ 10:15

Cell biology by optically detected magnetic resonance (ODMR) spectroscopy

Shirakawa Masahiro (Graduate School of Engineering, Kyoto University)

10:15 ~ 11:00

NMR and EPR spectroscopy of biological macromolecules in living cells.

Volker Dötsch (Institute of Biophysical Chemistry, Goethe University Frankfurt, Germany)

第3日目 11月6日(木)

公募型シンポジウム3

NMRとプリオン

NMR and Prion

座長：桑田 一夫

Aberrant forms of particular proteins accumulate in many neurodegenerative diseases, if not all, including Alzheimer's disease, and in type II diabetes mellitus, in a part of schizophrenia as well as in a part of cancer. These proteins are more or less infectious and their structures evolve during passages in the carefully designed experiments.

Thus they can be called as 'Prions'. Because these structural changes occur in a solution state, only NMR can detect their real-time evolution process in atom resolving power. This may be the beginning of the new NMR era in which researchers target a central biological problem 'Evolution of the infectious agents', which is evidently beyond the structural biology.

9:00 ~ 9:10

キネティックNMRによるタンパク質の'かたち'の進化の観測

Evolution of protein conformation observed by the 'Kinetic NMR'

桑田 一夫 (岐阜大学大学院 連合創薬医療情報研究科)

9:10 ~ 9:35

プリオン蛋白質のモルテングロビュール状態の発見とオリゴマー形成との関連

Identification of the molten globule state of prion protein and its relevance to β -rich oligomer conversion

本田 諒 (岐阜大学 医学部医学科)

9:35 ~ 10:00

Sup35天然変性領域のアミロイド構造多形形成機構の解明

Local compact structure in an intrinsically disordered protein Sup35-NM determines amyloid conformation

大橋 祐美子 (東京理科大学 理学部)

10:00 ~ 10:25

カルボニル炭素-カルボニル炭素相関NMRの利用による変性蛋白質の主鎖信号帰属

Application of carbonyl-carbonyl correlation NMR experiments with ultra-high resolution for resonance assignments of disordered proteins

吉村 優一 (Interdisciplinary Nanoscience Center, Aarhus University, Denmark)

10:25 ~ 10:50

固体NMRとTEMによるヒトカルシトニンにおけるアミロイド線維形成と阻害機構の解明

Amyloid fibril formation and inhibition mechanism of human calcitonin as studied by solid state NMR and TEM

内藤 晶 (横浜国立大学大学院 工学府、兵庫県立大学理学部大学院)

10:50 ~ 11:00 コメント 後藤 祐児

第3日目 11月6日(木)

公募型シンポジウム4

NMRの強みを生かした生体系への応用

NMR applications to biological systems

座長：嶋田 一夫、伊倉 光彦

NMR spectroscopy, which provides information about structures and dynamic of biomolecules under physiological conditions, contributes to structural biology immensely. In our proposed symposium, we will show NMR applications, including sample preparations, for better understanding of the functions of the biomolecules.

14:50 ~ 15:14

タンパク質の高エネルギー状態を標的とした構造生物学

High-energy conformations of proteins as a new target of structural biology

北原 亮 (立命館大学 薬学部薬学科)

15:14 ~ 15:38

チロシンキナーゼのNMR解析へ向けた試み：受容体型チロシンキナーゼの活性化機構

Development of the method for production of the isotope labeled tyrosine kinase, and its application to NMR analysis of the interaction between kinase domains required for activation of the receptor tyrosine kinase

小橋川 敬博 (熊本大学大学院 生命科学研究部)

15:38 ~ 16:02

SAIL法を利用したタンパク質構造揺らぎのNMR研究

NMR study on protein dynamics by the SAIL method

武田 光広 (名古屋大学理学研究科 構造生物学研究センター)

16:02 ~ 16:26

生細胞内の生命現象を観測するin-cell NMR法の開発と応用

A bioreactor for NMR observation of biological events inside living cells

西田 紀貴 (東京大学大学院 薬学系研究科)

16:26 ~ 16:50

Dissecting oncogenic RAS signaling by NMR

伊倉 光彦 (Princess Margaret Cancer Centre, University of Toronto)

チュートリアルコース

日時：11月3日(月)

会場：大阪大学コンベンションセンター 会議室2

13:00 ~ 14:00

「NMR法を基軸とした論文執筆」

菊地 淳 先生 (理化学研究所)

世界人口急増の反面、超高齢化社会が形骸化しつつある足元を省みて、本コースへの参加者には難解なNMRの世界を勉強しても、将来にわたって持続的に利用できるか不安な人々がいるかもしれない。一方で学術論文を受理させ足元を固めていけば、学位取得、就職、転職、グラント獲得、あわよくば更にPI等で

の後進指導へと結びつき、こうした“NMRを基軸とした”人材の持続性が本学会の興隆をも左右するであろう。本講演では蛋白質・代謝物群・バイオマス・環境試料へとNMRを基軸とした論文執筆を続け、自らの職を切り拓いてきた演者の体験を基に、着想・行動・文書化の三要素関係の重要性を述べたい。結論から言えば将来の不安は実績の蓄積で解消され、また本人さえ予期せぬ未来も拓かれる。現状では研究者の実績評価軸は学術論文に重きがあり、良い文書は死後においても無形財産として評価され得る。その論文執筆において最も重要な段階は多様な論文との出会いでもあり、良い出会いが動機と着想を育み、重い腰を上げ、数多くの失敗を乗り越えた際には他者に報告（論文化）せずにはいられなくなる。

14:00 ~ 15:00

「溶液NMR実験をデザインする楽しさ」

竹内 恒 先生 (産業技術総合研究所)

NMRの魅力は、実験の目的に合わせてサンプルを安定同位体標識する段階から、標識に合わせたNMR実験の実施、測定後の処理に至るまで多くの自由度があり、様々な工夫が可能な点にあると思います。ここではそのような工夫を行った事例と応用例をいくつかお示ししながら、NMR実験をデザインする楽しさ、有効性をお伝えすることが出来ればと思っています。

15:00 ~ 15:10 休憩

15:10 ~ 16:10

「NMRを1万倍高感度化する技術：DNP ～その基礎原理から最新の応用研究まで～」

根来 誠 先生 (大阪大学)

動的核偏極 (DNP : Dynamic Nuclear Polarization) は、誕生から60年かけてじっくりと発展を遂げた。現在では様々な試料において、極低温下でDNPを行うことで、通常のNMR分光やMRIに比べて一万倍程度高感度な測定が可能である。具体的には、ポリマー、リゾチーム、膜たんぱく質、ウイルス、薬品、アミロイド生成性ナノ結晶などの高感度分析、細孔物質の界面解析などへと適用されている。また、高偏極化した物質を溶かして体内に注射することで代謝イメージング、pHイメージングが可能で、がん治療の効果判定にも応用されている。本講演では、DNPの基礎原理について説明し、技術的側面における歴史的経緯に沿って上記の応用を紹介していく。また、試料を室温に保ったまま一万倍以上の高感度化が可能となる「トリプレットDNP」の進展についても紹介する。

16:10 ~ 17:40

「NMRはいかに創られたか：8. 二次元FT-NMR」

寺尾 武彦 先生 (京都大学 名誉教授)

教科書では長年にわたって積み重ねられた多数の研究結果が系統的に整理され、簡潔に淡々と記述されている。しかし、その行間には先人たちの汗と涙がにじみ、フィクションを超えるドラマが潜んでいる。本講演では時代を画したNMRの方法論の研究にスポットを当て、どのような時代背景の下でどういう人物が何をきっかけに歴史的な発想を得たのか、またどんな困難に出くわしてそれをどう解決して研究を完成させたかを人間的なエピソードを交えて話す。若い方々が話を通じて優れた科学者の研究に取り組む姿勢や学問に対する情熱を学んで頂ければ幸いである。今回は二次元FT-NMRについて話す予定である。

ニュースレターの記録

NMRニュースレターは核磁気共鳴学会会員相互のNMRに関する情報交換の場を提供するものです。会員サービスの一環として、会員からご投稿いただいたニュースレターを会員メーリングリストで配信するとともに、学会ホームページ (<http://www.nmrj.jp>) でもバックナンバーを公開いたします。配信内容は6ジャンルに分類しております。

1. 学会からのお知らせ・学会誌新着情報
2. 若手研究者渡航費助成
3. NMR 討論会・チュートリアルコース (参加方法、若手ポスター賞応募方法など)
4. 共催事業・学会・会議等開催案内
5. 求人 (企業・研究機関など)
6. 研究支援情報 (施設利用、教科書、機器提供、実験アイデア・ティップス、ソフトウェアの公開等)

◎ ニュースレターの受信設定 (会員個人登録情報の更新)

ニュースレターのメール配信をご希望の場合、会員専用ページからログインしていただき、個人登録メールアドレスの設定をお願いいたします。(受信メールアドレス変更設定も含む)

学会ホームページ <http://www.nmrj.jp> から「入会・会員ページ」→「会員専用ページ」を選択してください。

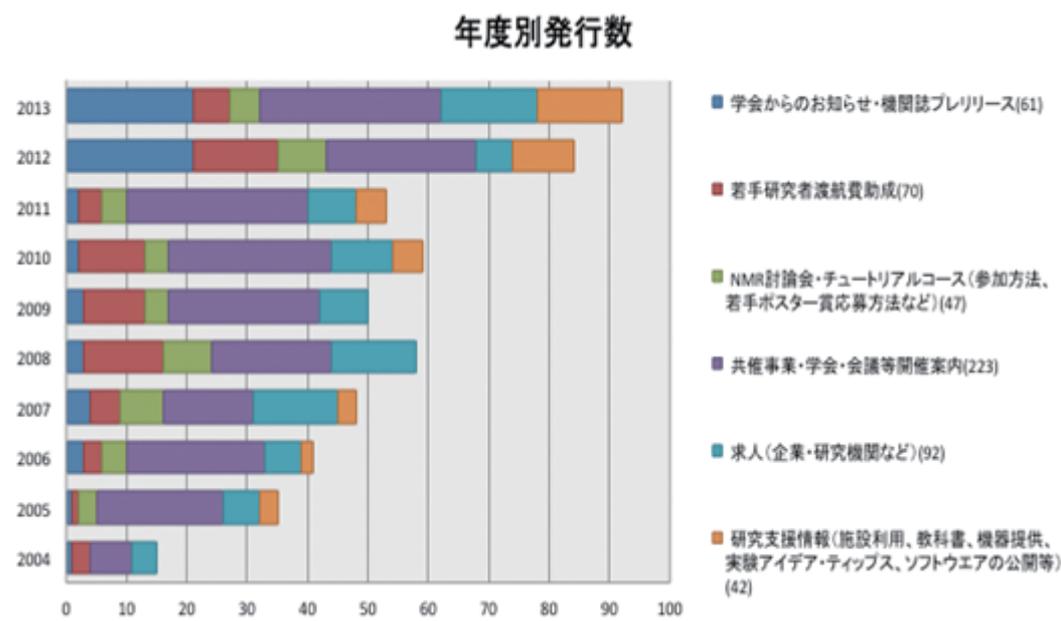
◎ バックナンバーの閲覧方法

学会ホームページ <http://www.nmrj.jp> から「NMR ニュースレター」→「バックナンバー」を選択してください。キーワード、発行日検索もできます。

◎ 記事の投稿方法について

会員からのニュースレターの投稿は随時受け付けております。原稿作成・投稿方法は、以下に掲載の「ニュースレター投稿規定」に従ってください。

ニュースレター No.448-544 (2013年4月～2014年3月)



ニュースレター投稿規定

本ニュースレターは日本核磁気共鳴学会会員相互のNMRに関する情報交換の場を提供するものです。会員からの情報提供(投稿)を随時受け付けます。お送りいただいた原稿は、原則として無審査で掲載しますが、NMRに無関係のものや公序良俗に反するなど本レターに不適切と理事会で判断したものは掲載不可とします。なお文責は投稿者にあり、本学会はレターの内容に起因するトラブルには一切責任を負わないものとします。

投稿ご希望の方は投稿規定をご覧いただき、原稿(PDF)を指定送付先(※)までお送りください。

[1] ニュースレターの内容について

▶ 学会からのお知らせ・学会誌新着情報

学会・学会事務局から会員への連絡事項。日本核磁気共鳴学会機関誌の新着情報。

▶ 若手研究者渡航費助成

若手研究者渡航費助成金(旧:京極記念基金)により参加された方の報告書。

▶ NMR 討論会・チュートリアルコース

NMR 討論会の発表・参加案内。チュートリアルコースの参加案内。若手ポスター賞応募方法など

▶ 共催事業・学会・会議等開催案内

講演会・研究会のお知らせ。国際会議の開催案内、参加報告(内容・感想等)。研究室の訪問者による小規模セミナー等で部外者参加を歓迎される場合など。

▶ 求人

企業、研究機関等からの求人情報。博士研究員・教官等の公募案内。

▶ 研究支援情報

施設利用、教科書(※1)、機器提供(※2)、その他NMRに関する研究支援情報(※3)。

※1: 新刊書の書評、最近読んだ興味深い論文の紹介。

※2: 新製品情報(新製品の紹介は賛助会員に限らせて頂きます)。不用物品情報(譲り受け等の交渉に関しては直接本人同士でお願いします)。

※3: 実験上のちょっとしたアイデア・工夫・ティップス、ソフトウェアの公開、出版はしないが報告しておきたい興味深い実験結果・スペクトル、研究に関する報告等。ただし、本レターはプライオリティーを保証するものではありません。自己の責任においてご投稿ください。引用はニュースレター内では自由ですが、他所で引用されたい場合はご本人の了解を得て私信として引用してください。

[2] 原稿の書式について

▶ 原稿(PDF)の長さは原則としてA4半ページ程度までとします。ただし、研究に関する報告、国際学会参加報告については2ページまでとします。

▶ 書式: 1行目左端に日付(2009年4月1日なら2009/04/01と書いて下さい)。2行目にタイトルを書いて下さい。3行目に所属・名前を書いて下さい。一行あけ、5行目から本文を書き始めてください。フォントは角ゴシック体、サイズはタイトル16ポイント、他はすべて12ポイントとしてください。原稿(PDF)はそのまま本学会ホームページに掲載します。

▶ 送付: 原稿(PDF)はメール添付ファイルで指定送付先(※)へお送りください。メールのタイトルは“ニュースレター”としてください。

※指定送付先 kyoumei_postman@sci.hokudai.ac.jp

▶ メールには原稿(PDF)を添付する以外に、メール本文には原稿の日付、タイトル、所属・名前をコピーし、一行あけて要約を記載してください。要約は会員メール案内用に使用します(若干編集する場合があります)。

日本核磁気共鳴学会規約

日本核磁気共鳴学会会則

第1条 本会は、日本核磁気共鳴学会 (The Nuclear Magnetic Resonance Society of Japan) という。

第2条 本会は、核磁気共鳴に関する基礎・応用研究、並びに啓蒙・教育活動を推進し、我が国における核磁気共鳴研究の発展に寄与することを目的とする

第3条 本会は、学術集会の開催、会報の発行、その他前条の目的を達成するために必要な事業を行う。

第4条 本会は、必要な地に支部を置くことができる。

第5条 本会の会員は一般会員、学生会員、賛助会員および名誉会員とする。

1. 一般会員および学生会員は核磁気共鳴に関する研究に従事、またはこれに関心を持つ個人であって、本会の目的に賛同し、定められた会費を納める者をいう。
2. 賛助会員は本会の目的に賛同し、定められた賛助会費1口以上を納める個人または団体をいう。
3. 名誉会員は、我が国の磁気共鳴研究に特に功労のあった者から、理事会の推薦を経て総会の議決により決定する。

第6条 会員は本会の行う諸事業に参加し、本会が出版物を発行する際は配布を受けることができる。

第7条 会員として入会しようとする個人または団体は、細則に定められた手続きに従って申込み、会長の承認を得なければならない。

第8条 会員は下記の会費を納めるものとする。ただし名誉会員はこれを要しない。原則として、毎年3月31日までに次年度の会費を納入するものとする。

- | | | |
|------|----|------------------|
| 一般会員 | 年額 | 7,000円 |
| 学生会員 | 年額 | 3,000円 |
| 賛助会員 | 年間 | 一口以上 (一口50,000円) |

第9条 会員は会長に届け出て退会することができる。会費を滞納した会員、または理事会で理由をあげて本会の会員として適当でないと決議され

た会員に関して、会長はそれらの者の会員資格を停止、あるいは除籍に処することができる。

第10条 本会には、次の役員 (理事、評議員) および会計監査をおく。

1. 理事 10名以内 (会長、副会長各1名を含む)
ただし、会長の理事任期が3年目になる場合は11名以内。
2. 評議員 35名以内 (理事を含む)
3. 会計監査 2名

第11条 役員は一般会員の中から一般会員の投票により選出され、総会で承認を得るものとする。理事は役員の内選により決定する。会長、副会長は理事の内選による。会計監査は理事以外の一般会員の中から一般会員の投票により選出される。役員の内選による。ただし、会長の任期は選出されてから2年とし、役員任期が3年となることを妨げない。会長は連続して再選されないものとする。ただし、非連続の再選はこれを妨げない。

第12条 会長は本会を代表して会務を総括する。

第13条 会長は理事会の承認を得て諸業務担当の幹事若干名をおくことができる。業務担当幹事は会長を助け、本会の運営にあたる。

第14条 副会長は会長を補佐し、会長が欠けたとき、または会長に事故があるときは会長の職務を代行する。

第15条 理事は理事会の審議に加わるほか、会長を助けて会務を執行する。

第16条 評議員は評議員会の審議に加わり、会の運営について評議する。また、理事会の諮問があった事項、その他必要と認める事項について助言する。

第17条 会議を分けて、総会、評議員会、理事会の3つとする。

第18条 総会を分けて、通常総会と臨時総会とし、会長がこれを召集してその議長となる。通常総会は毎年1回開催する。臨時総会は次の場合にこれを開く。

- (1) 理事会が必要と認めた場合
- (2) 一般会員の3分の1以上から議案を添えて請求があった場合

第19条 総会は一般会員の5分の1の出席により成立し、議事は出席者の過半数の同意を持って決する。ただし、可否同数のときは議長がこれを決する。一般会員は総会における議決権の行使を他の出席者に書面をもって委任することができる。

第20条 評議員会は会長がこれを招集して議長となる。評議員会は年1回以上これを開く。ただし、理事会が必要と認めた場合はこれを開かなければならない。

第21条 評議員会は2分の1以上の出席がなければ開くことができない。ただし、出席者に書面をもって委任することができる。評議員会の議事は出席者の過半数の同意をもって決し、可否同数の場合は議長がこれを決する。

第22条 理事会は会長がこれを招集して議長となる。理事会は会則に定めてある事項ならびに総会および評議員会の執行について議決する。

第23条 理事会は3分の2以上の出席がなければ開くことができない。理事会の議事は出席者の過半数の同意をもって決し、可否同数の場合は議長がこれを決する。ただし、理事会に出席できない理事はあらかじめ通知された事項について書面をもって議決に加わることができる。理事会があらかじめ通知していない事項について可決した場合は、これを欠席理事に通知しその賛否を求め、理事会の決議とすることができる。

第24条 理事会は年1回以上開催するものとする。

第25条 本会の会計年度は4月1日に始まり、翌年3月31日に終わる。

第26条 本会則の施行についての細則は別に定め、その変更は理事会の議決を経る。

第27条 本会則の変更ならびに本会の解散は総会の議決を経る必要がある。

第28条 本会則は、2001年11月15日より施行する。

第29条 付則

2004年4月から3年間は経過措置として、役員
の半数の任期を3年とすることができる。

2001年11月15日

日本核磁気共鳴学会総会議決

2002年4月1日

制定

2002年11月7日

改定

2003年11月26日

改定

2008年11月12日

第10条 評議員数、および第11条 会長の非
連続選出について

改定

2009年11月11日

第10条、第11条、第12条

改定

細 則

第1章 会員

第1条 本会に入会を希望する者は、所定の入会
申込書に必要事項を記入し、会長に提出するも
のとする。

第2章 総会

第2条 総会の議案は会長が作成し、理事会の議
を経た後提出する。議案には前年度の事業内容
および収支決算、新年度の事業計画、および収
支予算を含むものとする。なお、一般会員の3分
の1以上の賛成を得て、理事会に提案があった場
合には、これを最も近い総会の議題としなければ
ならない。

第3条 総会を開くときは、会長は予定された審議
事項の内容を一般会員にあらかじめ通告しなけれ
ばならない。

第3章 役員を選出

第4条 毎年役員を半数を改選する。役員および
会計監査の候補者は次のものの中から一般会員
の投票によって選ぶ。

1. 立候補した一般会員
2. 一般会員が推薦した一般会員（以下会員推薦
候補者）
3. 理事会が推薦した一般会員（以下理事会推薦
候補者）
4. 会計監査と役員を兼ねることはできない。

第5条 役員および会計監査の投票は次のように行
う。

1. 理事会は役員および会計監査の立候補者、お
よび会員推薦候補者をつのり、理事会推薦候
補者とともに一般会員に公示し、一般会員の
投票により役員および会計監査候補者を選ぶ。
2. 会長は一般会員の中から2名を選んで選挙管
理委員を委嘱する。選挙管理委員会は選挙事
務を行い、一部を選挙管理委員会管理の下に
業者に委託することができる。選挙管理委員

- は被選挙権を有する。
3. 役員は連続して3回まで、会計監査は連続して2回まで選出されることができる。それぞれ退任後2年間は同じ役職に就任することはできない。すでに、上記の選出回数に達した者の氏名は選挙要項に公告される。
4. 役員は得票者中の上位の者より順に改選定員数以内を選出、会計監査は得票者中の上位の者より順に2名を選出する。同数得票者については選挙要項に従って順位を定める。
- 第4章 幹事**
- 第6条 会長は理事会の承認を得て、会員の中から、必要に応じて諸業務担当幹事を委嘱する。幹事の任期は1年とする。ただし、会長の任期内で延長を妨げない。
- 第5章 学会機関誌編集委員会**
- 第7条 本学会に学会機関誌編集委員会をおく。
- 第8条 学会機関誌編集委員長は会長が理事の中から指名し、理事会の承認をもって決定する。
- 第9条 学会機関誌編集委員は編集委員長が会員の中から指名し、理事会の承認をもって決定する。
- 第10条 学会機関誌編集委員会は定期的に学会機関誌を発行し、会員に情報を発信する。
- 第6章 事務所**
- 第11条 本会の事務所は次のところにおく。
日本核磁気共鳴学会事務局〒650-0033 神戸市中央区江戸町85-1 ベイ・ウィング神戸ビル10階 (株)プロアクティブ内
- 第12条 年会費は(株)プロアクティブが指定する方法により納入するものとする。
- 第7章 細則の変更**
- 第13条 本細則の変更は理事会の議決による。
- 第14条 本細則は、2001年11月15日よりこれを実施する。ただし、本会発足時、第1回の役員を選出および幹事の承認は総会で行うものとし、それらの任期は2004年3月31日までとする。
- 2001年11月15日
日本核磁気共鳴学会総会議決
- 2002年4月1日
制定
- 2002年11月6日
改定
- 2003年6月21日
改定
- 2003年11月25日
改定
- 2005年6月25日
改定
- 2007年5月12日
改定
- 2008年4月29日
第5条-3 非選出期間の設定ならびに文言の修正。
第11条 プロアクティブの移転に伴う住所の変更。
改定
- 2008年11月11日
第6条 幹事の選出、任期について
改定
- 2009年3月21日
第4条、第5条
改定
- 2012年11月7日
第5章 第7、8、9条 学会機関誌編集委員会の定義について追加
改定
- 2013年3月17日
第5章 第10条 学会機関誌編集委員の定義について追加
改定
- 2014年3月9日
第5章 第9条と第10条の内容を交換
改定
- 選挙要項**
- 第1条 日本核磁気共鳴学会細則第3章に定める役員および会計監査の選出が、円滑に行われるようこの要項を定める。
- 第2条 選挙管理委員会は役員および会計監査の選挙を行うたびごとに設け、当選人を理事会へ報告した時点で解散する。
- 第3条 選挙管理委員会は委員の互選により委員長を定める。
- 第4条 選挙管理委員会は一般会員に対して役員および会計監査選挙の告示を行う。
- 第5条 選挙管理委員会は役員および会計監査の立候補者、および会員推薦候補者の受付を一般会員に公示しなければならない。
- 第6条 役員および会計監査の候補者を推薦する場合は、一般会員1名につき役員候補者は3名以

内、会計監査は1名を推薦することができる。役員候補者は3名以上推薦のあった会員を会員推薦役員候補者とする。

第7条 選挙管理委員会は、候補者の氏名、その他必要な事項を掲載した候補者名簿を作成し、これを選挙用ウェブサイト公表しなければならない。

第8条 投票は選挙用ウェブサイトで行う。投票用候補者リストより、役員は10名以内、会計監査は2名以内を選ぶ。

第9条 開票は、選挙管理委員会がこれを行う。

第10条

1. 評議員および会計監査は、得票数の最も多い候補者から、順次、会則第10条および細則第5条によって定められた定数までの候補者を当選とする。評議員、会計監査ともに当選圏内にある者は前者の当選者とする。
2. 末位に得票数の等しい候補者が2名以上あったときは、選挙管理委員会はこれらを併記して理事会に報告する。これらの候補者の当落は理事会が決定する。

第11条 評議員会における理事の選挙は選挙担当理事が管理する。新理事の被選挙権は次年度役員に選ばれた評議員にのみある。選挙権は次年度の全評議員にある。選挙は5名連記の無記名投票によって行い、定数および次点を決定する。開票に当たっては被選挙権を有しない評議員が立ち会う。

第12条 理事会における次期会長および次期副会長の選挙は選挙担当理事が管理する。まず、次期会長の選挙を行い、その結果を踏まえて次期副会長選挙を行う。次期会長、次期副会長の被選挙権、選挙権は次年度の全理事にある。ただし、現会長は会則第11条に基づき次期会長の被選挙権を持たない。副会長の任期は役員任期内とする。その後任の副会長の任期は会長の任期終了までとする。選挙は無記名投票によって行う。開票は選挙担当以外の理事の立会いの下に行う。

第13条 評議員および会計監査の選挙に関して疑義を生じたときは、選挙管理委員会の合議によって決定し、理事会に報告するものとする。

2003年6月21日

制定

2009年3月21日

第6条、第10条

改定

第11条、第12条

追加

2009年7月11日

第13条

改定

2012年7月14日

第7、8条

改定

日本核磁気共鳴学会機関誌投稿規程

(2014年9月30日改訂)

日本核磁気共鳴学会機関誌 (NMR学会誌) は、主にNMRに関する情報を公開し、会員の皆様の学術交流を目的とした会員サービスを提供します。会員の皆様からは、下に示す原稿の分類のうち、会長メッセージと巻頭エッセイを除外した原稿の投稿を歓迎します。また、解説、トピックス、技術レポートには、非会員の方からの投稿も受け付けます。ただし、投稿原稿の採択の可否は、編集委員の査読結果をもとに編集委員会で決定します。また、掲載された著作物の著作権は、本学会に帰属するものとします。

原稿は下に示す原稿作成要領を参考に作成し、NMR学会ホームページのトップページ (<http://www.nmrj.jp/index.php>) にあるNMR学会誌ページの原稿投稿フォームから投稿して下さい。図や表を他の文献から引用して使用する場合には、投稿前に著作権所有者から使用許可を得た上で、原稿投稿フォームから原稿と共に使用許可書 (PDF) を提出して下さい。

原稿の分類

●会長メッセージ

NMR学会会長からのメッセージ。2000字以内、1ページ。

●巻頭エッセイ

主にNMR討論会特別講演者からの寄稿。NMR学会、NMR討論会との関わりなどについてのエッセイ。NMR討論会の講演要旨と同一でも可。2,000～4,000字、1～2ページ (図表を含む)。

●解説

著者の研究成果および関連分野の現状の分かりやすい解説。8,000～16,000字、4～8ページ (図、表を含む)。

●トピックス

数年以内に発展した新しいNMRの展開についてのミニレビュー。4,000～8,000字、2～4ページ (図、表を含む)。

●研究報告

会員が単著あるいは共著 (非会員でも可) で投稿するオリジナル研究報告。6,000～12,000字、3～6ページ (図、表を含む)。

●NMR基礎講座

主にNMR討論会のチュートリアル講演者などによるNMRの基礎の解説。4,000～10,000字、2～4ページ (図、表を含む)。

●技術レポート

NMRの装置や測定方法の開発に関するレポート。4,000～8,000字、2～4ページ (図、表を含む)。

●NMR便利帳

NMR実験に便利な装置 (ハードウェア) や実験方法・解析 (ソフトウェア) の工夫、安全衛生 (磁場、高圧、高電圧、酸欠、毒物劇物) などに関する分かりやすい解説。4,000～6,000字、2～3ページ (図、表を含む)。

●海外学会参加報告

主に、若手研究者渡航費助成金受領者による寄稿。NMRニューズレターとして公開される報告書でも可。会員からの寄稿も歓迎します。2,000～4,000字、1～2ページ (図、表を含む)。

●NMR研究室便り

主にNMRを使って研究を行っている大学や公的機関、企業の開発室が、研究テーマ、構成員、特徴など、研究室の内容を紹介する。2,000～6,000字、1～3ページ (図、表を含む)。

●若手NMR研究会だより

若手NMR研究会の主催者による研究会報告、参加者の報告、講演者の要旨の寄稿。4,000～8,000字、2～4ページ (図、表を含む)。

原稿作成要領

- ・和文は明朝体、英文はTimesのフォントを用い、表題は14ポイント、本文は12ポイントで、docまたはdocxファイルで作成してください。
- ・原稿は、表題、執筆者氏名・所属、本文、引用文献、表、図の順番にまとめ、1つのファイルとして提出して下さい。
- ・巻頭エッセイ、解説、トピックス、研究報告、NMR基礎講座、技術レポート、NMR便利帳の執筆者は、略歴と顔写真のファイルを提出してください。
- ・図は、TIF, JPG, PDFファイルで600 dpi以上の解像度で作成してください。

- ・図、表には、番号を付すと共に、それぞれの説明を記入してください。
- ・引用文献は、次を参考にして書式を統一して下さい。
- 1) Javkhlantugs, N., Naito, A., and Ueda, K., (2011) Molecular dynamics simulation of bonbolitin II in the dipalmitoylphosphatidylcholine membrane bilayer. *Biophys. J.* **101**, 1212-1220.
- 2) 内藤 晶 (2011) 光センサータンパク質の情報伝達機能. *化学* **66**, 68-69.
- 3) Saito, H., Ando, I, and Naito, A. (2006) Solid State NMR Spectroscopy for Biopolymers. Principles and Applications. pp. 1-464, Springer, Dordrecht.

賛助会員名簿

味の素株式会社
 アジレント・テクノロジー株式会社
 SIサイエンス株式会社
 株式会社JEOL RESONANCE
 株式会社シゲミ
 ジャパン スーパーコンダクタ テクノロジー株式会社
 太陽日酸株式会社
 ブルカー・バイオスピン株式会社

平成26年9月10日現在の本学賛助会員は上記の通りです。
 本学会の事業に対してご賛助いただきましたこと、厚く御礼申し上げます。

日本核磁気共鳴学会機関誌編集委員会委員名簿 (2014 ~ 2015年度)

委員長	山本 泰彦	筑波大学
副委員長	浅野 敦志	防衛大学校
	池上 貴久	横浜市立大学
委員	浅川 直紀	群馬大学
	五十嵐俊介	味の素株式会社
	上田 卓見	東京大学
	恩田 光彦	株式会社三井化学分析センター
	河合 剛太	千葉工業大学
	児嶋長次郎	大阪大学
	柴田 友和	筑波大学
	菅瀬 謙治	サントリー生命科学財団
	出村 誠	北海道大学
	鳥澤 拓也	中外製薬株式会社
	福士 江里	北海道大学
	村上 美和	京都大学
	吉水 宏明	名古屋工業大学

編集後記

今年3月の理事会の席上で、私がNMR学会誌の編集委員長として指名された時は、まさに身が引き締まる思いでした。会員の皆様からの御期待に応えるため、今年度のNMR学会誌の編集委員会は、当該誌の編集の継続性を保証するために、昨年度の編集委員会から8名の委員に御留任いただくと共に、専門分野、所属などを総合的に判断して、総勢16名の委員で組織することに致しました。

前編集委員長そして現学会長の内藤 晶 横浜国立大学教授からの編集委員長の引き継ぎでは、編集作業要領の詳細についての内藤会長の単純明快な説明および丁寧に整理された編集記録ノートに目を見張り、内藤会長がおっしゃる通りに作業を進めれば、誰でも編集委員長の大役を務めることが出来ると思い込んでしまいました。実際には、大変な作業の連続でしたが、お陰様で、原稿を御執筆いただいた方々および編集委員の皆様のお力添えにより、会員の皆様に第5巻をお届けすることができました。

NMR学会誌は、文字通り、NMR学会の活動状況を会員の皆様に紹介すると同時に、NMRに関する最新かつ最先端の情報を交換する新たな機会を提供する媒体として機能することが求められています。NMR学会誌の改善のためには、会員の皆様からのフィードバックは不可欠です。私共編集委員16名全員が、NMR学会誌の改善のため粉骨砕身する覚悟はできていますので、御意見をお寄せいただければ幸いです。

最後になりましたが、NMR学会役員および会員の皆様、並びに株式会社クバプロ 松田國博 社長、阿部美由紀 氏、株式会社プロアクティブ 奥村美樹 氏には、NMR学会誌第5巻発行に向けて、多大なご尽力をいただきましたことに感謝申し上げます。今後ともNMR学会誌の発展にさらなるご協力をお願い申し上げます。

2014年9月 NMR学会誌編集委員長 山本泰彦

NMR

BULLETIN OF THE NUCLEAR
MAGNETIC RESONANCE SOCIETY OF JAPAN

Vol.5

2014年10月20日発行

発行：日本核磁気共鳴学会

編集：NMR学会機関誌編集室 株式会社クバプロ
〒102-0072 東京都千代田区飯田橋3-11-15
TEL：03-3238-1689 FAX：03-3238-1837

広告掲載一覧

(順不同)

アジレント・テクノロジー株式会社

SIサイエンス株式会社

株式会社 エルエイシステムズ

大阪大学蛋白質研究所

株式会社シゲミ

太陽日酸株式会社

日本カンタム・デザイン株式会社

日本電子株式会社

ブルカー・バイオスピン株式会社

アジレントの NMR 製品ラインアップ

コンソール、プローブ



400-MR DD2



DD2 400~800



ProPulse 500 / 600



OneNMR プローブ (溶液)



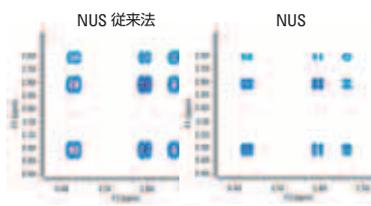
T3 プローブ (固体)

NMR 制御用ソフトウェア VnmrJ4.2



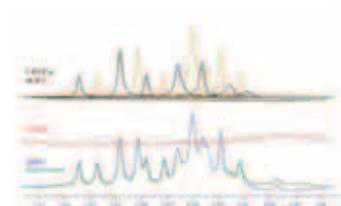
VeriPulse

キャリブレーションおよび
性能チェックを完全自動化



NUS

多次元スペクトルを従来と
同じ時間で高分解能測定



CRAFT

自動的に短時間に
スペクトルを波形分離

製薬、化学、食品など
幅広い分野に様々なアプリケーションを提供





安定同位体標識試薬

(^{13}C ^{15}N D $^{17}\text{-}^{18}\text{O}$)

Cambridge Isotope Laboratories.Inc(C.I.L)

- NMR用
アミノ酸 糖 塩安 CHL培地 NMR溶媒 ユビキチン
- トレーサー試験用
硫酸 硝酸塩 尿素 被覆肥料 $^{13}\text{CO}_2$ NaHCO_3 他
- メタルアイソトープ各種
Fe Cu Ni Cr Cd Ca Na K 他
- 希ガス 及び混合ガス
He Ne Ar Kr Xe他



<その他、下記メーカー品の販売代理店もしております。>

クロレラ工業(株)(日本)、ISO FLEX社(ロシア)、ICON社(米国)、OMICRON社(米国)

安定同位体受託分析

安定同位体比質量分析計(IR-MS)を導入し、安定同位体(^{13}C ^{15}N D ^{18}O ^{34}S)の受託分析を行っています。

- 測定項目

^{13}C ^{15}N D ^{18}O ^{34}S の Natural 及び Tracer

- 測定機器

サーモ フィッシャー サイエントIFIC(株)製

DELTA^{plus} XL DELTA^{plus} Advantage

DELTA V Plus、DELTA V Advantage 他



SIサイエンス(旧 昭光通商(株)安定同位体G)は国内唯一の ^{15}N 濃縮メーカーです。 ^{15}N 標識化合物のほか、永年にわたりCIL社(ケンブリッジアイソトープラボラトリーズ)の国内販売代理店として、安定同位体(SI)標識アミノ酸をはじめ様々なSI標識化合物をご提供しております。また、SIメタルやSI標識希ガスなど、安定同位体関連商材を幅広く取り扱っております。

 **SIサイエンス株式会社**

〒345-0023 埼玉県北葛飾郡杉戸町本郷473-3

TEL:0480-37-1555 FAX:0480-37-1533

E-mail:isotope@si-science.co.jp

URL:http://www.si-science.co.jp/



マルチプラットフォーム環境で動作する高機能NMR解析・レポートソフトウェア

Mitsubishi Research

http://www.las.jp/products/s10_mnova/index.html



MnovaNMRは、1Dおよび2DのNMRプロセス、アナリシス、レポートなどの高度な表示機能をもつソフトウェアです。

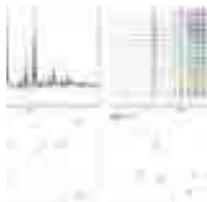
PowerPointのようなマルチページで編集が可能、またインターフェイスもPowerPointライクで、データプロセスなどの操作を印刷イメージと同じ画面描画でリアルタイムにおこなうことが可能です。

マルチプラットフォーム環境 (Windows, MacOS X, Linux) で動作し、NMRでの多様な研究をサポートします。

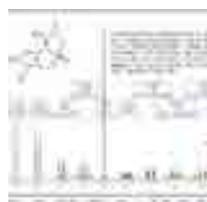
- 1Dおよび2D NMR処理をシンプルで直感的な自動プロセスと解析



- 複数のスペクトルを簡単操作



- クラス最高のNMRスペクトル分析



- プラグイン (NMRPredict Desktop, Verify, qNMR, Reaction Monitoring, Mnova DB, etc.) と統合し高度な機能を提供



- ほとんどのメーカーに対応した独立系ベンダーソフトウェア



無料で45日間のお試しが出来ます。
下記URLより必要事項を記入の上、お申し込みください。

<http://www.las.jp/support/form/index.html>

簡単導入、誰でも簡単操作のクラウド型電子実験ノート(ELN)

Accelrys Notebook

http://www.las.jp/products/s18_iLabber/index.html



メリット:

- 紙の実験ノートと電子的な実験データをまとめるのは煩雑な作業ですが、電子実験ノートによりノートの記載内容とデータを統一的にまとめられます。
- 研究員、学生の異動によりデータの喪失が避けられます。
- 過去の実験データの検索が容易になります。
- メンバー間や外部機関との実験データ、実験ノートの共有が容易になります。
- 実験記録等の改ざんしていない事の証明に使えます。
- 出張中や研究室が離れていても、リアルタイムで実験ノートやデータの状況などを閲覧できます。
- 実験ノートのテンプレートや複雑機能により、実験ノートを記載する時間を短縮できます。

無料で2週間のお試しが出来ます。
下記URLより必要事項を記入の上、お申し込みください。

http://www.las.jp/products/s18_iLabber/#point05

※ 研究室内にサーバーを立てて運用するサーバー版もございます。



http://www.las.jp/products/h11_activespectrum/index.html



卓上型 Micro-ESR

世界最小の卓上型電子スピ
ン共鳴 (EPR/ESR) スペクトロ
メーターをActive Spectrum
社がお届けします。

電子スピン共鳴の工業的、科学的および教育的応用が、今や極めてコスト効果の高いものとなります。ASI社の卓上型Micro-ESRは、9.5GHzで動作し、掃引幅が最大400ガウスでモル以下の感度を持つ、当社の特許ミニチュア電子スピン共鳴スペクトロメーターが含まれます。さらに、自動温度コントローラー、イーサーネットと複数のUSBポートを備えた完全なWindows7コンピュータシステムも含まれます。

応用例:

- 原油分析: アスファルテンとバナジウムの含有量
- 潤滑油分析: エンジンオイル、油圧オイル、タービンオイルの酸化
- スピントラップ (PBN, TEMPOL, DMPO)
- 熱コークス化
- 食品の保存期間(植物油、ビール、ワイン)
- スス
- バイオディーゼルの酸化安定性
- 触媒コークス化
- 船舶用エンジン内の原燃料希釈の検出



タッチパネル・ディスプレイ



サンプルの挿入

データインターフェース



株式会社エルエイシステムズ (L.A.SYSTEMS Inc.)

〒115-0005 東京都台東区上野1-11-5時計会館ビル1F

Tel: 03-5812-5311 Fax:03-5807-4050 e-mail: support@las.jp URL: http://www.las.jp

大阪大学 蛋白質研究所 NMR装置群 産業利用のご案内

大阪大学蛋白質研究所では、研究所の保有する 400 MHz～950 MHz までの溶液 NMR、固体 NMR 装置を産業界に開放しております。

(学術的利用にも開放しています。詳細は、以下 URL の応募方法をご覧ください)

<http://www.protein.osaka-u.ac.jp/kyoten/>

利用形態

- ◇ トライアルユース (無償)
- ◇ トライアルユース性能試験 (無償)
- ◇ 成果非占有 (有償)
- ◇ 成果占有 (有償)

トライアルユース (無償)・成果非占有利用の次回公募は 11 月 1 日～22 日までを予定しております。公募期間外であっても利用枠に空きがある場合には、利用が可能です。お気軽にお問い合わせください。

トライアルユース性能試験利用と成果占有利用には、特に公募期間は設けておりませんので、ご希望の場合にはメールにてお問い合わせください。



溶液 950 MHz NMR 装置

利用可能装置



固体 700 MHz NMR 装置

- ◇ 溶液 NMR 装置
950MHz (cryoTCI ($^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$))、800MHz (cryoTXI ($^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$))
600 MHz (cryoQCI-P ($^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}/^{31}\text{P}$))、500MHz (cryoBBO H/F ($^1\text{H}/^{19}\text{F}$, BB))、
400 MHz (BBFO (^1H , BB/ ^{19}F))
 - ◇ 固体 NMR 装置
700MHz DNP (3.2mm Double (HC, DNP)、700MHz (1.0mm Double (HX), 4.0mm, 3.2mm,
2.5mm Triple (HXY))、600 MHz DNP (4.0mm Double (HC, DNP))、500MHz (4.0mm,
3.2mm, Triple (HXY))
- 溶液・固体 NMR 装置共に空きがございます。お問い合わせください。

お問い合わせ先

大阪大学蛋白質研究所 機能構造計測学研究室 (担当 片平)

電話 06-6879-8598

メールアドレス nmrkaihou@protein.osaka-u.ac.jp

ホームページ <http://nmrfacility.info>

本事業は、文部科学省「先端研究基盤共用・プラットフォーム形成事業」の補助事業「先端核磁気共鳴装置群の産業利用支援プログラム」によって、運営されています。

対称形マイクロサンプルチューブ

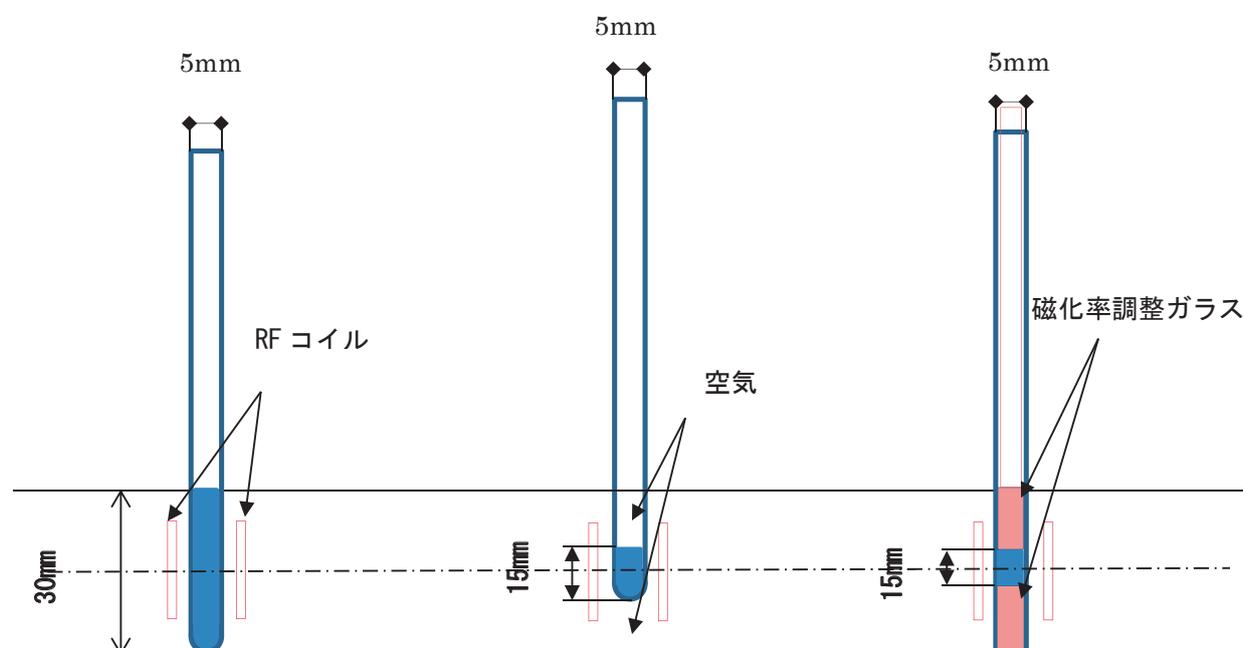
液高を低くして測定するにはシム調整の限界があります。対称形マイクロサンプルチューブは溶媒と同じ磁化率のガラスをサンプル管の上下に配置したためシム調整が可能になりました。現在、対応できる溶媒の種類は、 D_2O 、 $CDCl_3$ 、 $DMSO$ 、 C_6D_6 、 C_5D_5N 、 CD_3OD 、 CD_3CN です。

- ★サンプル量を少なくしてもシム調整が可能なので微量サンプルに最適
- ★DOSY (対流を少なくでき、温度勾配を極力少なく) (3mm 対称形マイクロが Better)
- ★Diffusion (対流を少なくでき、温度勾配を極力少なく) (3mm 対称形マイクロが Better)

5mm サンプルチューブ

5mm サンプルチューブ

対称形マイクロサンプルチューブ



5mm φ用プローブでの測定例

5mm φ サンプルチューブにシムが十分調整可能な液高に注入。	5mm φ サンプルチューブに濃度を上げるために溶媒を減らしたが、液高が低いためシム調整できない。	5mm φ 対称マイクロ形サンプルチューブに 5mm φ サンプルチューブの半分の量注入。シム調整問題なし。
液高 : 30mm	液高 : 15mm	液高 : 15mm
量 : 410 μL	量 : 210 μL	量 : 210 μL

本品は平成 21 年度日本化学会 「科学技術有効賞」 を受賞いたしました。

電話 042-624-2207
FAX 042-622-0937

 株式会社 シゲミ

<http://www.shigemi.co.jp>
shigemi-corp@nifty.com

安定同位体標識化合物

Stable Isotope for Structural Biology

大陽日酸は多次元NMRでの構造解析に必須な安定同位体標識化合物を高い品質・お求め易い価格で販売しております。

安定同位体標識無細胞タンパク質合成キット

独立行政法人理化学研究所の無細胞タンパク質合成技術をキット化したしました。

New!

無細胞くん[®] SI SS



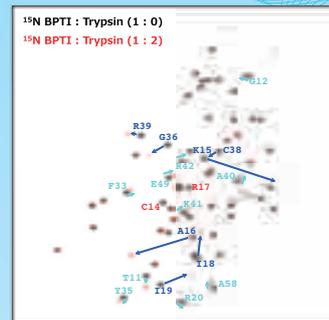
安定同位体標識タンパク質合成キット

無細胞くん[®] SI SS

SS結合を持つ抗体やサイトカインなどの分泌タンパク質合成専用キットです。安定同位体標識タンパク質の合成に最適です。

製品番号	製品名	数量	保存温度	希望納入価格(円)
A89-0126	無細胞くんSI SS	1キット	-80℃	65,000

BPTI プロテアーゼインヒビター ¹H-¹⁵N HSQCスペクトル



Biological Magnetic Resonance Data Bank 5358, 5359 were used for assignments.

無細胞くん[®] SI



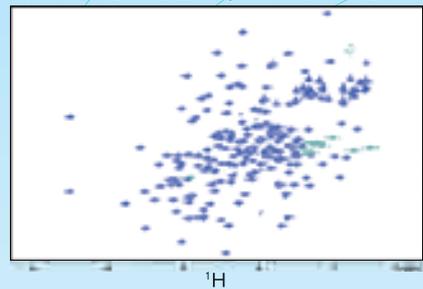
安定同位体標識タンパク質合成キット

無細胞くん[®] SI

安定同位体標識タンパク質合成専用キットです。迅速・簡単に大量合成できます(CATタンパク質最大合成量 5mg/mL)。発現確認用「無細胞くんQuick」と併せてお使い下さい。

製品番号	製品名	数量	保存温度	希望納入価格(円)
A29-0059	無細胞くんSI	1キット	-80℃	55,000

Ras (Y32W) タンパク質の ¹H, ¹⁵N-HSQCスペクトル



ご提供:独立行政法人理化学研究所生命分子システム基盤研究領域 NMR/ハイブライン高度化研究チーム殿

無細胞くん用 安定同位体標識アミノ酸

製品番号	製品名	数量	希望納入価格(円)	製品番号	製品名	数量	希望納入価格(円)
A107-0144	アミノ酸混合物水溶液-UL-d	1mL	ご相談	A42-0075	アミノ酸混合物水溶液-UL- ¹³ C, ¹⁵ N,d	1mL	35,000
A39-0072	アミノ酸混合物水溶液-UL- ¹⁵ N	1mL	15,000	A91-0128	アミノ酸混合物水溶液-Lys,Arg-UL- ¹³ C, ¹⁵ N	1mL	20,000
A41-0074	アミノ酸混合物水溶液-UL- ¹⁵ N,d	1mL	18,000	A92-0129	アミノ酸混合物水溶液-Lys,Leu-UL- ¹³ C, ¹⁵ N	1mL	20,000
A40-0073	アミノ酸混合物水溶液-UL- ¹³ C, ¹⁵ N	1mL	30,000	A108-0145	アミノ酸混合物水溶液-SeMet	1mL	ご相談

培地

- D-Glucose (¹³C, d)
- Salts (¹⁵N, d)
- Deuterium Oxide 99.9atom%

核酸

- NTPs / NMPs (¹³C, ¹⁵N, d)
- Phosphoramidites (¹³C, ¹⁵N, d)
- RNA-DNAオリゴマ合成

アミノ酸・ケト酸

- L-Amino Acids (¹³C, ¹⁵N, d)
- Algal Amino Acids (¹³C, ¹⁵N, d)
- α-Keto Acids (¹³C, d)

その他

- Pf1 NMR Cosolvent
- Tris-d₁₁, MES-d₁₃, HEPES-d₁₉
- Water-¹⁷O (10-90atom%)

※ 各種製品を取り揃えておりますのでお気軽にお問い合わせください。

製造・総販売元

大陽日酸株式会社 SI事業部

〒142-8558 東京都品川区小山1-3-26 東洋Bldg.
Tel.03-5788-8550 (代表) Fax.03-5788-8710

● 資料のご請求は、大陽日酸までお気軽にご用命ください。

メールアドレス Isotope.TNS@tn-sanso.co.jp

ホームページアドレス <http://stableisotope.tn-sanso.co.jp>



大陽日酸
The Gas Professionals

液体ヘリウム消費ゼロ

～NMR用 液体ヘリウムリカバリー装置～

NMR単体にて設置することにより、液体ヘリウム消費ゼロを実現するゼロボイルオフ型の装置。冷凍機の振動は、除振構造により最小限に抑えられており、常時稼働中でも測定に影響を与えません。

『JHRS シリーズ』の **4大** 特長

完全無冷媒型(液体ヘリウム供給不要)

クライオスタットを用いて冷却し、液体ヘリウムの蒸発を防止するための装置。クライオスタット内の圧力を検知し、圧力信号に応じて冷凍能力を制御することで、液体ヘリウムを一定に保ちます。

完全自動制御

稼働開始後は、全自動・無人運転のため、長期休暇中でも安心です。

既設NMRへの後付 (レトロフィット) 設置可能

すでにお持ちのNMRへの後付が可能です。ヘリウム問題により、停止中もしくは使用を制限している方々には朗報！設置後すぐにでも、安定稼働が実現します。



除振構造

装置運転時の冷凍機の振動は、除振構造により最小限に抑えられているため、常時稼働中でもスペクトルにはまったく影響がない、すなわち、測定に影響を与えません。

特許出願中(特願 2005-238892)

型式	JHRS-100CW-N	JHRS-100CW-0	JHRS-150CW-0
蒸発防止能力	0.6 L/日		0.9 L/日
適応マグネット	300 ~ 500 MHz		300 ~ 600 MHz
GM冷凍機 型式	RDK-408D2		RDK-415D
冷凍能力	1.0 W at 4.2 K		1.5 W at 4.2 K
ヘリウム 型式	F-50L		
圧縮機 消費電力	6.5 ~ 7.5 kW		

<納入実績>

- ・徳島文理大学
- ・東京理科大学
- 他

※NMR主要メーカー装置に実績あり

※蒸発防止能力は使用するヘリウムの純度や圧力によって異なります
JHRS-100CW-Nは1台でヘリウムと窒素の再凝縮が可能な製品です



JNM-ECZ500R

JNM-ECZ400S

核磁気共鳴装置

NMR spectrometer ZETA

JNM-ECZR シリーズ

自由度の高い、拡張性を追求したハイエンドモデル

基礎研究や応用研究を行うリサーチユース分野において、最先端の測定技術に対応した装置性能や、より精度の高い制御が必要なNMR装置が求められています。

JNM-ECZRシリーズは、そのような声に答え、最新のデジタル技術と高周波技術を駆使して開発されたFT NMRシステムです。

回路の高集積化により信頼性の向上と筐体の小型化を実現しながら、多チャンネル化や高出力パワーアンプアップグレードなどに対する拡張性は従来機以上です。

先進的なソフトウェアと自動化技術により、日常測定業務のすべてを自動化しながら、高度な先端測定に対応します。

JNM-ECZS シリーズ

小型・汎用性を追求したエントリーモデル

エントリーモデルであるECZSシリーズは、溶液2チャンネル測定において、ハイエンド機のECZRシリーズとほぼ同等の機能を有しながら、筐体サイズを従来小型機種から約60%小型化しました。先進的なソフトウェアと自動化技術により、日常測定業務のすべてを自動化。SuperCOOLプローブなどの極低温プローブ技術を応用した超高感度オートチューンプローブを付属することにより世界最高クラス感度を実現、様々な応用分野で高い能力を発揮します。

● 最先端の研究を支援する 最高性能と品質の製品群

ブルカー・バイオスピンは世界中の研究者の最先端の仕事を支援するため、とどまることなくその製品に磨きをかけて続けています。長年世界中の研究者に愛されてきたCryoProbeもAvance分光計も製品の世代を重ねるにつれて、製品ラインアップを拡充し、また基本的な性能を底上げしていくことで様々なニーズにこたえられるよう進化してきました。

いままでも、そしてこれからもブルカー・バイオスピンはユーザーの声に耳を傾けて製品開発に反映させてまいります。

高性能 CryoProbe™ ラインアップ

ブルカー・バイオスピンのHe温度CryoProbeは究極の感度を高分解能NMRの世界にもたらしました。その製品ラインアップは発売以来14年間拡大し続け、さまざまなアプリケーションに適したプローブを提供します。

また、世界中で1,400台以上ものCryoProbeが出荷されたという事実は、高品質と信頼の証です。

CryoProbes	400	500	600	700	800	850	900	950	1000
DCH C-H-D	✓	✓	✓	✓					
TCI H-C/N-D	✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓
TCI H-C/N-D 1.7 mm		✓	✓	✓	✓	✓			
QCI H/P-C/N/D		✓	✓	✓	✓	✓			
QCI H/F-C/N/D		✓	✓	✓					
TXO C/H-N-D		✓	✓	✓	✓				
DUX 2H		✓	✓	✓	✓	✓			
DUL-C-H-D 10 mm ET	✓	✓	✓						
BBFO		✓							
BBO H&F	✓	✓	✓						



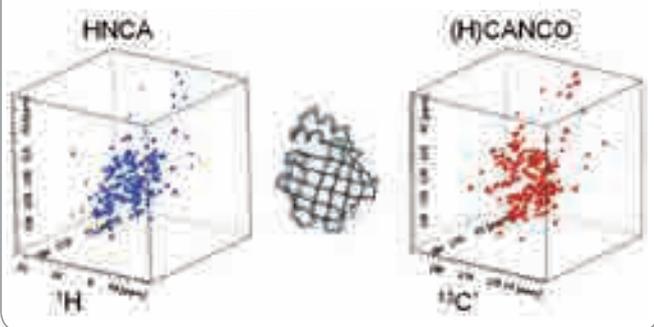
600 MHz 1.7 mm TCI MicroCryoProbe



Sample courtesy of Dr. Jacques Meyer, CEA Grenoble

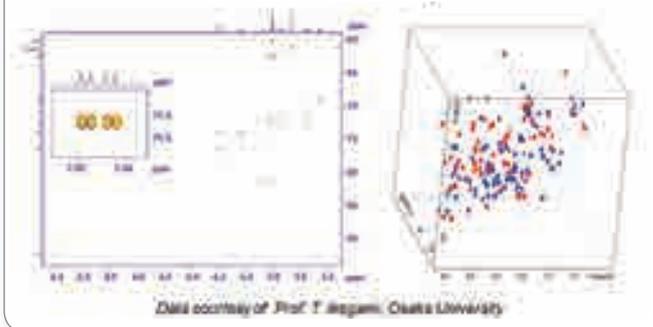
30 μ lの $H_2O:D_2O=9:1$ 中に $^{13}C/^{15}N$ ラベルされた Clostridium Pasteurianum Rubredoxin 73 μ gを溶かしたサンプルの測定例。3D HNCO (左) ns=4, 2K \times 40 \times 98 pnt, 5時間; 3D CBCANH (右) ns=8, 2k \times 32 \times 98, 8時間

700 MHz 5 mm TXO CryoProbe



$^{13}C/^{15}N$ ラベルされた LB-FABO1.3mMの3D IPAP HNCA-(H)CANCOデュアルレシーバ測定例。ns=2, 1k \times 40 \times 32 pnt (IPAP処理後), 12時間。構造は Vasile et al, J Biomol NMR; 25, 157-160, 2003より。

950 MHz 5 mm TCI CryoProbe



2mM Sucroseの2D 1H-13C HSQC, 測定時間393 ms (左)。Bilevel Adiabatic Decoupling ($\gamma B_1=3.7$ kHz)を使用。 $^{13}C/^{15}N$ ラベルされた ユビキチン0.4 mMの3D BEST-HNCOACB測定例 (右)。F2 \times F1=24 \times 64 pnt, 100 ms繰り返す時間、測定時間65分。